



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DIFERENTES SITIOS DE FOSFORILACIÓN EN EL EXTREMO CARBOXILO
DEL RECEPTOR α_1 D-ADRENÉRGICO, REGULAN SU FUNCIÓN,
LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y UNIÓN A β -ARRESTINAS 1/2

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
GABRIEL CARMONA ROSAS

DIRECTOR DE TESIS
DR. JESÚS ADOLFO GARCÍA SÁINZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTOR
DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DRA. ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES
FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO. FEBRERO DE 2019



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 del Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular, de la Universidad Nacional Autónoma de México, con financiamiento 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).

Gabriel Carmona Rosas fue alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM y fue apoyado por una beca de posgrado CONACyT.

RECONOCIMIENTOS

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

Dr. J. Adolfo García Sáinz	IFC-UNAM
Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez	IIB-UNAM
Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares	FQ-UNAM

El jurado del examen doctoral estuvo integrado por:

Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez	IFC-UNAM
Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez	IIB-UNAM
Dra. Claudia González Espinosa	CINVESTAV-IPN
Dra. Aliesha Araceli González Arenas	IIB-UNAM
Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes	CINVESTAV-IPN

Agradezco la asesoría técnica de la Dra. María Teresa Romero Ávila y la Dra. Roció 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
Dra. Ruth Rincón Heredia
Dr. Abraham Rosas Arellano

Unidad de Biología Molecular

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

Unidad de Computo

Ing. Juan Barbosa Castillo
Ing. Ivette Rosas Arciniega

Taller de Mantenimiento

Ing. Aurey Galván Lobato
Ing. Manuel Ortínez Benavides

Bioterio

Dr. Héctor Malangón
Dra. Claudia Rivera

Con amor y cariño a mis padres:

Carmen Rosas Martínez
Fernando Carmona García

*A mi hermana:
Lourdes Carmona Rosas, pese a todo.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. J. Adolfo García Sáinz, por permitirme trabajar y formarme en su laboratorio. Agradezco enormemente sus atenciones, consejos, enseñanzas y apoyo en cada una de mis actividades académicas y personales durante la licenciatura y el doctorado. Por ser un investigador y académico ejemplar. ¡Mejor tutor no pude tener!.

A la Dra. Clorinda Arias y la Dra. Rosario Muñoz, por hacer de mis evaluaciones semestrales un momento de crítica constructiva y aprendizaje. Por darme siempre las mejores enseñanzas e impulsarme a innovar, construir y aprender cada día mas. ¡Gracias!.

A la Dra. Ma. Teresa Romero, por darme la enorme oportunidad de aprender de ella desde la licenciatura. Nadie podría iniciar a un joven estudiante en la investigación mejor que la Dra. Romero. ¡Gracias por todo Tere!.

Al Dr. Marco Alfonso, al M. C. David Hernández y la Dra. Roció Alcántara, por ser pilares de esta investigación, por sus críticas, sugerencias y por su apoyo infinito en cada uno de los experimentos realizados. Este trabajo es de ustedes también. ¡Gracias amigos!.

A todos los miembros del jurado, por sus atenciones y su tiempo para revisar esta tesis. Sus comentarios y sugerencias fueron muy valiosas. ¡Gracias!.

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

Con mucho cariño a mi mejor amiga Ely, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas. No fue fácil, pero sin ti, hubiera sido imposible. ¡Te quiero!.

A David Gutiérrez, por ser un amigo ejemplar y nunca dejarme solo a pesar de todo. Por darle siempre un respiro a mi vida cuando más lo necesite. ¡Gracias *papu*!.

Con cariño a todos aquellos que me regalaron una sonrisa durante todos estos años: Manuel, Oscar, Nubia, Jenny, Gustavo, Agustín, Lucy, Ángel, Andrea, Jesús, Carlos, Juan Carlos, etc.

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Índice

Resumen.....	I
Abstract.....	II
Lista de abreviaturas.....	III
Lista de figuras y tablas.....	IV
Capítulo I	
1. Introducción.....	1
1.1. Receptores acoplados a proteínas G.....	1
1.1.1. Estructura y función.....	1
1.1.2. Fosforilación de GPCRs.....	4
1.2. El receptor α_{1D} -adrenérgico.....	8
1.2.1. Generalidades.....	8
1.2.2. Características funcionales del receptor α_{1D} -adrenérgico.....	9
1.2.3. Sitios de fosforilación del receptor α_{1D} -AR.....	10
1.3. β -arrestinas 1/2.....	11
1.3.1. Generalidades.....	11
1.3.2. Las β -arrestinas como proteínas adaptadoras.....	13
1.3.3. Las β -arrestinas como proteínas reguladoras de GPCRs.....	13
Capítulo II	
2. Justificación y planteamiento del problema.....	16
Capítulo III	
3. Hipótesis y objetivos.....	17
3.1. Hipótesis.....	17
3.2. Objetivo.....	17
3.2.1. General.....	17
3.2.3. Particulares.....	17
Capítulo IV	
4. Material y métodos.....	18
4.1. Reactivos.....	18
4.2. Plásmidos.....	18
4.3. Líneas celulares y transfecciones.....	19
4.4. Colocalización de receptores con el marcador de membrana plasmática.....	20
4.5. Fosforilación de receptores.....	20
4.6. Determinación de calcio intracelular.....	21

4.7. Fosforilación de ERK1/2.....	21
4.8 Internalización de receptores y colocación con las β -arrestinas 1/2 endógenas.....	21
4.9. Análisis estadístico.....	22

Capítulo V

5. Resultados.....23

5.1. Sitios de fosforilación del receptor α_{1D} -AR, mutagénesis dirigida y fosforilación de receptores.....	23
5.2. Visualización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR en condiciones basales mediante microscopia confocal.....	25
5.3. Colocalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR con la membrana plasmática en condiciones basales.....	29
5.4. Análisis de la fosforilación de las mutantes fosfo-miméticas del receptor α_{1D} -AR.....	30
5.5. Análisis del incremento de calcio intracelular por las mutantes del receptor α_{1D} -AR.....	30
5.6. Correlación de los niveles de fosforilación de las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR y su capacidad para movilizar calcio intracelular.....	32
5.7. Análisis de la activación de ERK1/2 por las mutantes del receptor α_{1D} -AR.....	33
5.8. Evaluación de los diferentes componentes que regulan la actividad de ERK1/2 inducida por el receptor α_{1D} -AR.....	34
5.9. Internalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR en respuesta a NA y PMA.....	38
5.10. Internalización de las mutantes fosfo-miméticas del receptor α_{1D} -AR en respuesta a NA y PMA.....	39
5.11. Análisis del reclutamiento de las β -arrestinas 1/2 endógenas por las mutantes del receptor α_{1D} -AR.....	41
5.12. Análisis del reclutamiento de las β -arrestinas 1/2 endógenas por las mutantes fosfo-miméticas del receptor α_{1D} -AR.....	41

Capítulo VI

6. Discusión.....45

6.1. Generalidades.....	45
6.2. Las mutantes del receptor α_{1D} -AR se fosforilan en respuesta a NA y PMA.....	46
6.3. La fosforilación del grupo distal regula la localización subcelular del receptor α_{1D} -AR.....	48
6.4. La tercera asa intracelular y el extremo carboxilo del receptor α_{1D} -AR regulan la movilización de calcio intracelular.....	52
6.5. La tercera asa intracelular y el extremo carboxilo del receptor α_{1D} -AR regulan la activación de ERK1/2.....	54

6.6. El receptor ΔN activa ERK1/2 a través de la actividad de PKC, GRK2, la transactivación del EGFR y la expresión de las β -arrestinas 1/2.....	55
6.7. La mutante ΔN -MutL3-M.T. activa ERK1/2 a través de la transactivación del EGFR y la expresión de las β -arrestinas 1/2.....	56
6.8. Las mutantes del receptor α_{1D} -AR muestran diferentes patrones de internalización en respuesta a NA y PMA.....	56
6.9. Las mutantes del receptor α_{1D} -AR con ácido aspártico, muestran diferentes patrones de internalización en respuesta a NA y PMA.....	58
6.10. Las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR se unen a las β -arrestinas 1/2 endógenas.....	59
6.11. Las mutantes del receptor α_{1D} -AR con ácido aspártico se unen de forma parcial a las β -arrestinas 1/2 endógenas.....	61

Capítulo VII

7.1. Conclusiones.....	66
------------------------	----

Referencias.....	68
------------------	----

Anexo 1: “*Different phosphorylation patterns regulate α_{1D} -adrenoceptor signaling and desensitization*”. Artículo de investigación. Antecedente directo del presente trabajo.

Anexo 2: Plásmidos generados durante el trabajo de tesis.

Anexo 3: Líneas celulares generadas durante el trabajo de tesis.

Anexo 4: “*Dissecting the signaling features of the multi-protein complex GPCR/ β -arrestin/ERK1/2*”.

Anexo 5: “*The role of β -arrestins in G protein-coupled receptor heterologous desensitization: A brief story*”.

Anexo 6: “*Distinct phosphorylation sites/clusters in the carboxyl terminus regulate α_{1D} -adrenergic receptor subcellular location and signaling*”. Artículo de investigación principal.

Resumen

El receptor α_{1D} -adrenérgico es una proteína de siete dominios transmembranales que ejerce una gran cantidad de funciones biológicas, las cuales tienen un impacto importante en el desarrollo de la hipertensión arterial y la hiperplasia prostática benigna. Recientemente, reportamos que diferentes patrones de fosforilación controlan la desensibilización del receptor α_{1D} -adrenérgico. Sin embargo, hasta el momento, no existen datos que reporten el papel de los diferentes sitios de fosforilación de este receptor en su función, señalización y localización subcelular. Para evaluar dichas funciones, mutamos aquellos residuos potencialmente fosforilables localizados en la tercera asa intracelular y en el extremo carboxilo terminal, por aminoácidos no fosforilables. Nuestros resultados confirman que estos residuos son fosforilados por diversas proteínas cinasas en respuesta a estímulos, como noradrenalina y ésteres de forbol. Además, identificamos que los residuos fosforilados localizados en el extremo carboxilo terminal, están organizados en dos grupos cercanos entre sí, así como dos residuos aislados en la región proximal (T442) y distal (S543) de este dominio intracelular. Nuestros resultados indican que la fosforilación del grupo distal (T507, S515, S516 y S518) favorece la presencia del receptor α_{1D} -adrenérgico en la membrana plasmática; estos datos fueron confirmados cuando tales residuos fueron mutados por ácido aspártico, permitiendo la generación de mutantes fosfo-miméticas que se localizaron en la membrana plasmática. Por otro lado, encontramos que la fosforilación de S442 en respuesta a noradrenalina y ésteres de forbol, es necesaria para la unión del receptor α_{1D} -adrenérgico con las β -arrestinas 1/2 endógenas. Adicionalmente, observamos que cualquier mutación puntual en el extremo carboxilo de este receptor, resulta en una activación sostenida de ERK1/2. Por el contrario, la movilización de calcio intracelular parece estar controlada tanto por la fosforilación de la tercera asa intracelular como por la del extremo carboxilo.

Abstract

The human α_{1D} -adrenergic receptor is a seven transmembrane-domain protein that exerts an important impact on the development of hypertension and benign prostatic hyperplasia. We recently reported that different phosphorylation patterns control α_{1D} -adrenergic receptor desensitization. However, to our knowledge, there is no data regarding the role(s) of this receptor's specific phosphorylation residues in its subcellular location and signaling profile. In order to address this issue, we mutated the identified phosphorylated residues located on the third intracellular loops and carboxyl tail. In this way, we experimentally confirmed α_{1D} -adrenergic receptor phosphorylation sites and identified, in the carboxyl tail, two groups of residues in close proximity to each other, as well as two individual residues in the proximal (T442) and distal (S543) regions. Our results surprisingly indicate that phosphorylation of the distal cluster (T507, S515, S516 and S518) targets α_{1D} -adrenergic receptor at the plasma membrane, i.e., substitution of these residues for unphosphorylatable amino acids results in the intracellular location of the receptors, whereas phospho-mimetic substitution allows plasma membrane localization. Moreover, we found that S442 phosphorylation is necessary for agonist- and phorbol ester-induced receptor colocalization with β -arrestins. Additionally, we observed that mutations in any of the phosphorylated residues at the carboxyl tail resulted in sustained ERK1/2 activation. In contrast, mobilization of intracellular calcium appears to be controlled by the phosphorylation of both the third intracellular-loop and the carboxyl-domain residues.

Lista de abreviaturas

GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G
TM: Transmembranales
NH3: Extremo amino
COOH: Extremo carboxilo
AECs: Asas extracelulares
AICs: Asas intracelulares
GDP: Guanosín difosfato
GTP: Guanosín trifosfato
PLC- β : Fosfolipasa C- β
IP3: Inositol trifosfato
DAG: Diacilglicerol
PKC: Proteína cinasa C
ATP: Adenosín trifosfato
GRKs: Cinasas de receptores acoplados a proteínas G
PKA: Proteína cinasa A
NA: Noradrenalina
ARs: Receptores adrenérgicos
PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato
GSK: Glucógeno sintasa cinasa
PI3K: Fosfatidil-inositol 3-cinasa
PAR-1: Receptor activado por proteasa 1
PAR-2: Receptor activado por proteasa 2
 β 2-AR: Receptor β 2-adrenérgico
V2R: Receptor de vasopresina 2
NK1R: Receptor de neurokinina 1
LPA: Acido lisofosfatídico
EGFR: Receptor de factor de crecimiento epidérmico
EGF: Factor de crecimiento epidérmico
BIM-I: Bisindolymaleimida – I
DN-GRK2: Dominante negativa de GRK-2
siRNAs: Pequeños RNAs de interferencia
S1P: Esfingosina 1-fosfato

Lista de figuras y tablas

Introducción

Figura 1: Estructura de GPCRs

Figura 2: Representación esquemática de la regulación de funciones sistemáticas por señalización a través de proteínas G

Figura 3: Señalización multifuncional por GPCRs

Figura 4: Desensibilización homóloga y heteróloga de GPCRs

Figura 5: Mecanismos potenciales de desensibilización independiente de fosforilación de GPCRs

Figura 6: Familia de receptores adrenérgicos

Figura 7: Estructura de la β -arrestina acoplada al receptor de la rodopsina

Figura 8: Formación del complejo multi-proteico GPCR/proteína G/ β -arrestina

Figura 9: Clasificación de GPCRs con base en su unión a las β -arrestinas

Tabla 1: Sitios de fosforilación del receptor α_{1D} -AR

Resultados

Figura 10: Representación esquemática de las mutantes del receptor α_{1D} -AR

Figura 11: NA y PMA inducen la fosforilación de las mutantes del receptor α_{1D} -AR

Figura 12: Localización subcelular de las mutantes del receptor α_{1D} -AR en condiciones basales y representación esquemática de las mutantes fosfo-miméticas

Figura 13: Cuantificación de la fluorescencia intracelular de las mutantes del receptor α_{1D} -AR en condiciones basales

Figura 14: Colocalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR con la membrana plasmática

Figura 15: NA y PMA inducen la fosforilación de las mutantes fosfo-miméticas del receptor α_{1D} -AR

Figura 16: Incremento de calcio intracelular inducido por la estimulación con NA y LPA en células que expresan las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR

Figura 17: Trazos representativos de la movilización de calcio intracelular inducido por NA y LPA en células que expresan las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR

Figura 18: Análisis de correlación entre los niveles de fosforilación y la movilización de calcio intracelular en células que expresan las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR

Figura 19: Curso temporal de activación de ERK1/2 inducido por NA en las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR

Figura 20: Regulación de la actividad de ERK1/2 por la actividad de PKC y GRK2 en las células que expresan el receptor ΔN

Figura 21: Regulación de la actividad de ERK1/2 por la transactivación del EGFR y la expresión de las β -arrestinas 1/2 en las células que expresan el receptor ΔN .

Figura 22: Regulación de la actividad de ERK1/2 por la transactivación del EGFR y la expresión de las β -arrestinas 1/2 en las células que expresan la mutante ΔN -MutIL3-M.T.

Figura 23: Curso temporal de internalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR inducido por la estimulación con NA

Figura 24: Curso temporal de internalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR inducido por la estimulación con PMA

Figura 25: Curso temporal de internalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR con ácido aspártico inducido por la estimulación con NA

Figura 26: Curso temporal de internalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR con ácido aspártico inducido por la estimulación con PMA

Figura 27: Colocalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR con las β -arrestinas 1/2 endógenas

Figura 28: Colocalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR con ácido aspártico con las β -arrestinas 1/2 endógenas

Tabla 2: Resumen de las características principales de las mutantes del receptor α_{1D} -AR

Discusión

Figura 29: Análisis de modelado de proteínas del receptor ΔN y de las mutantes fosfo-miméticas mediante el programa SWISS-MODEL

Figura 30: Análisis de modelado de proteínas del extremo carboxilo del receptor ΔN y de las mutantes fosfo-miméticas mediante el programa SWISS-MODEL

Figura 31: Características estructurales y funcionales del receptor ΔN y la mutante ΔN -MutL3

Figura 32: Características estructurales y funcionales de los sitios de fosforilación y de las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR

Figura 33: Características estructurales y funcionales de las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR con ácido aspártico

Capítulo I

Introducción

1.1. Receptores acoplados a proteínas G

1.1.1. Estructura y función

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) comprenden la familia de proteínas de membrana más grande registrada en el genoma humano. Estas proteínas comparten una topología común de siete dominios trans-membranales (TM) y regulan las respuestas celulares de una gran variedad de señales extracelulares, entre las que se encuentran los fotones, moléculas pequeñas, péptidos y proteínas. La diversidad de los ligandos extracelulares se refleja en la diversidad estructural de los más de 800 GPCRs existentes. La transducción de señales por parte de los GPCRs es fundamental para la mayoría de los procesos celulares, los cuales incluyen la visión, la percepción de olores y sabores, funciones neurológicas, cardiovasculares, endocrinas, así como reproductivas. Esto convierte a los GPCRs en una super familia de proteínas que son el blanco de diversas estrategias experimentales y terapéuticas (Katritch, et al., 2013).

A nivel estructural, los GPCRs se caracterizan por tener siete dominios TM unidos por tres asas intracelulares y tres asas extracelulares, así como un extremo amino terminal y un extremo carboxilo terminal (Figura 1). Los GPCRs en vertebrados están comúnmente divididos en 5 familias, esto en base a su secuencia de aminoácidos y a su similitud estructural: 1) rodopsina (familia A), 2) secretina (familia B), 3) glutamato (familia C), 4) adhesión y 5) frizzled/taste2 (Surgand, et al., 2006). La familia de la rodopsina es la más grande y más diversa de éstas, sus miembros se caracterizan por tener secuencias conservadas, lo cual implica que comparten características estructurales así como mecanismos de activación. A pesar de estas similitudes, los GPCRs individuales tienen una combinación característica de vías de transducción de señales que incluyen a las proteínas G, así como vías de señalización independientes de ellas (Rosenbaum, et al., 2009).

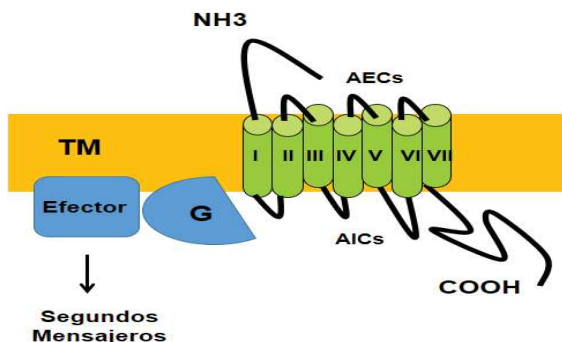


Figura 1: Estructura de GPCRs. Los GPCRs están compuestos por siete dominios transmembranales (TM) con estructura de alfa hélice, un extremo amino terminal (NH₃) y un extremo carboxilo terminal (COOH), conectados por tres asas extracelulares (AECs) y tres asas intracelulares (AICs). Imagen modificada de Carmona-Rosas, et al., 2018.

Después de la unión del agonista en diversas regiones del receptor*, las regiones TM, así como las regiones intracelulares, adoptan cambios conformacionales que inducen el acoplamiento y la activación de las proteínas G heterotriméricas. Las proteínas G están compuestas por las subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$, la subunidad $G\alpha$ contiene guanósín difosfato (GDP) en su estado inactivo. Después de la activación del receptor, el GDP es liberado de la subunidad $G\alpha$ y es remplazado por guanósín trifosfato (GTP), lo cual disocia el dímero $G\beta\gamma$ de la subunidad $G\alpha$ y activa a la proteína G. Posteriormente, la proteína G vuelve a su estado inactivo a través de la hidrólisis del grupo fosfato contenido en el GTP, convirtiéndolo nuevamente en GDP (Oldham & Hamm, 2008). Actualmente se conocen 21 subunidades $G\alpha$, 6 $G\beta$ y 12 $G\gamma$. Estas forman proteínas heterotriméricas que pueden agruparse típicamente en cuatro clases en base a la similitud de la subunidad $G\alpha$: G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ y $G_{12/13}$ (Baltoumas, et al., 2013). La combinación de las 21 subunidades $G\alpha$, 6 $G\beta$ y 12 $G\gamma$, crean diversos complejos heterotriméricos, lo cual contribuye a la especificidad tanto del receptor como del efector o sistema (Chung, 2013). Aunque se ha avanzado en dilucidar las características biológicas que regulan la función de las proteínas G, es difícil revelar con detalle la especificidad que existe entre las vías de señalización de los receptores y su interacción con las proteínas G (Figura 2).

Una de las vías de señalización más relevantes de los GPCRs, es la que está asociada a la proteína $G_{q/11}$. Esta vía es activada por hormonas capaces de movilizar calcio intracelular y de estimular a la enzima fosfolipasa C- β (PLC- β), la cual promueve la producción de los segundos mensajeros inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 produce la liberación de calcio almacenado en pozas intracelulares, mientras que el DAG recluta y activa a la proteína cinasa C (PKC), la cual tiene la capacidad de fosforilar diversos GPCRs, así como una gran cantidad de enzimas y proteínas. La conexión de estas moléculas ha sido ampliamente caracterizada. En varios tipos celulares, la movilización de calcio intracelular activa canales de calcio localizados en la membrana plasmática, lo cual permite la entrada de calcio extracelular hacia el interior de la célula para rellenar las pozas intracelulares o para aumentar todavía más la concentración de calcio (Neves, et al., 2002).

*Existen distintas formas de activación de GPCRs dependiendo del tipo de ligando y la región del receptor a la que este se une. Las regiones involucradas en la unión del ligando son la zona TM (sitio de unión exclusivo para fotones, aminos biogénicas, nucleósidos, eicosanoides, lípidos [ácido lisofosfatídico y esfingosina 1-fosfato]); la zona TM y las asas extracelulares (sitios de unión exclusivos para péptidos de ≤ 40 aminoácidos); las asas extracelulares y la región amino terminal (sitios de unión exclusivos para polipéptidos de ≤ 90 aminoácidos), y la región amino terminal (sitio de unión exclusivo para glicoproteínas de ≥ 30 kDa). Las interacciones entre los ligandos y los receptores pueden involucrar puentes de hidrogeno, asociaciones iónicas y contactos hidrofóbicos (Ji, et al., 1998).

Dentro de las múltiples vías de señalización, los GPCRs tienen la capacidad de regular canales iónicos y cinasas, las cuales tienen efectos sobre la proliferación y la supervivencia celular. Existe también una gran variedad de proteínas que se unen a los GPCRs, lo cual permite una mayor regulación de sus funciones. Cada una de las vías de señalización de los GPCRs tiene una cinética y una localización celular particular. Bajo diferentes circunstancias, el mismo receptor podrá inducir la apoptosis o promover la proliferación celular (Jacobson, 2015).

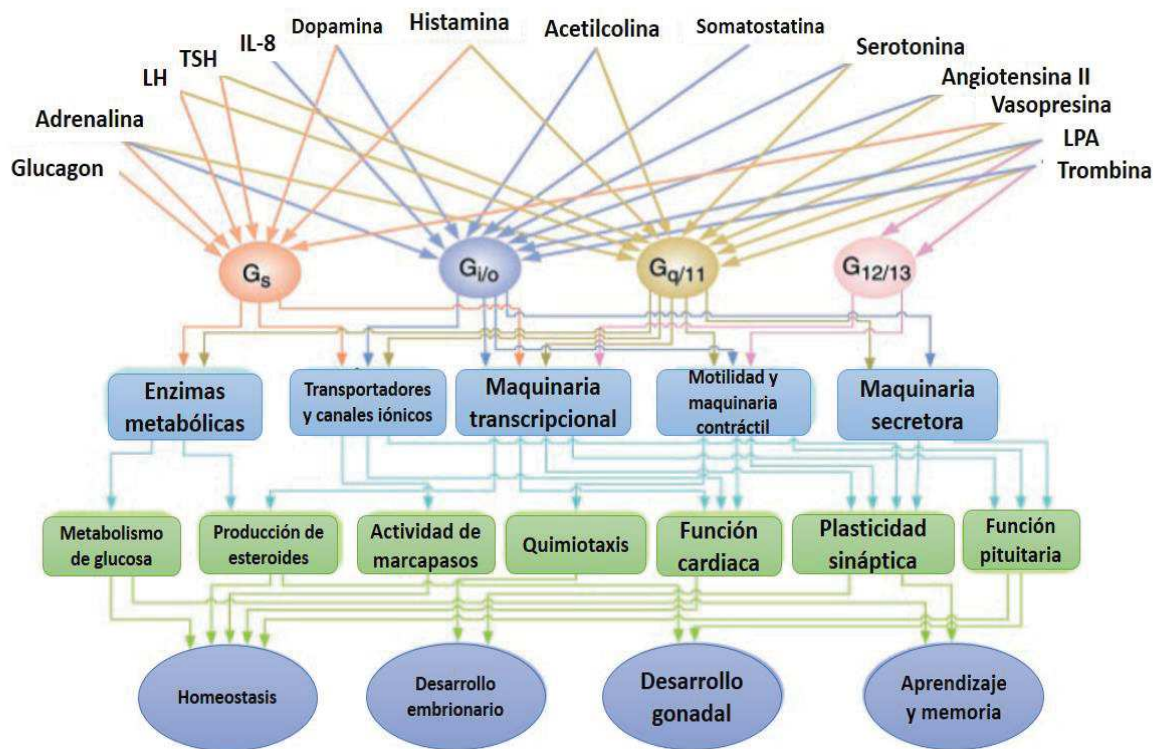


Figura 2: Representación esquemática de la regulación de funciones sistémicas por señalización a través de proteínas G. Diversos agentes extracelulares como hormonas (por ejemplo, glucagón, hormona luteinizante y adrenalina), neurotransmisores (acetilcolina, dopamina y serotonina), citosinas (IL-8), así como mediadores locales, (ácido lisofosfatídico [LPA]), señalizan a través de cuatro familias de proteínas G para regular diversos elementos de la maquinaria celular, como enzimas, canales iónicos y reguladores transcripcionales. La modulación de dicha maquinaria celular altera un gran número de funciones celulares, como cambios en el metabolismo en el hígado y el músculo, así como alteraciones en el ritmo cardíaco. Estas actividades celulares contribuyen a la regulación de sistemas a gran escala, como la homeostasis, el aprendizaje y la memoria. Por lo tanto, las vías de señalización asociadas a las proteínas G propagan información reguladora a través de diversos estratos que incrementan su complejidad organizacional. En todos los niveles, los ejemplos ilustrados en la presente figura son solo algunos de los agentes extracelulares que se acoplan a la familia de proteínas G, y por lo tanto, son capaces de regular diversas vías de señalización. Imagen modificada de Neves, et al; 2002.

Aunque los GPCRs operan principalmente a través de su acoplamiento con las proteínas G, su interacción con otras proteínas de andamiaje, como las β -arrestinas, pueden tener un impacto sobre diversos eventos de señalización. Ciertos ligandos pueden potencialmente activar una vía de señalización en vez de otra, el cual es un fenómeno conocido como *agonismo sesgado* o *selectividad funcional*. Los agonistas sesgados pueden selectivamente influir en vías de señalización que pueden ser usadas como blancos terapéuticos, sin embargo, algunos otros ligandos sesgados tienen la capacidad de activar

vías de señalización que producen efectos secundarios indeseables en los pacientes. A pesar de su importancia en el campo de la biología y la medicina, los aspectos estructurales y mecánicos que subyacen a la señalización sesgada, no han sido completamente entendidos (Kenakin & Christopoulos, 2013; Venkatakrishnan et al., 2013).

Por otro lado, diversos estudios han revelado que en la ausencia de un agonista, la mayoría de los GPCRs oscilan entre el estado inactivo y el estado activo, el cual a su vez, provoca la señalización (Lefkowitz, et al., 1993; Kenakin, 2001). El tiempo en el que el receptor se encuentra en el estado activo en la ausencia del agonista, es muy corto (el equilibrio favorece el estado inactivo), sin embargo, la actividad del receptor puede ser evaluada. Los agonistas no inducen al receptor a adoptar cambios conformacionales, pero sí a estabilizar y mantener la conformación alcanzada espontáneamente (Kobilka & Deupi, 2007). Adicionalmente, los GPCRs son capaces de adoptar diferentes conformaciones (Figura 3, denotado como R^{*1} , R^{*2} , R^{*3} , sucesivamente). Después de la unión estable del agonista, es concebible que solo una conformación principal del receptor se estabilice, promoviendo una cascada de señalización (como A_1R^{*1} de la figura 3) o, que más de una conformación del receptor y su señal sean alcanzadas (como A_1R^{*1} y A_1R^{*2}). Con el mismo receptor, otro agonista (A_2 , en la figura 3) puede estabilizar sólo una de aquellas conformaciones, ser un agonista parcial para alguna de las conformaciones adoptadas e incluso, ser un agonista inverso que reduce la actividad espontánea de un tercer estado del receptor. En una situación donde la función celular se encuentra comprometida, se puede apreciar el valor de aquellos ligandos que tienen preferencia por vías de señalización que resultan terapéuticas, así como la capacidad de inhibir otras vías de señalización indeseables para el sistema (Liggett, 2011).

1.1.2. Fosforilación de GPCRs

El estado de fosforilación de una proteína dada es el resultado de la actividad de dos grupos de enzimas: proteínas cinasas y proteínas fosfatasas. Las proteínas cinasas son fosfotransferasas que transfieren el grupo fosfato y de una molécula de adenosín trifosfato (ATP), a residuos de serina, treonina o tirosina dentro de una proteína, mientras que las fosfatasas son hidrolasas que liberan los grupos fosfatos de los residuos previamente mencionados. Diversos GPCRs son sujetos a fosforilación, y esta modificación post-transduccional está asociada con la desensibilización y el tráfico intracelular del receptor (Tobin, et al., 2008).

La activación de los GPCRs por un ligando promueve la rápida fosforilación del receptor, el cual es un proceso que no sólo produce el desacoplamiento del receptor de la proteína G, sino que también induce la activación de vías de señalización independientes de la proteína G. Actualmente, se conoce que la fosforilación de los receptores es un mecanismo de regulación complejo que involucra a un amplio rango de cinasas, desde las cinasas dependientes de segundos mensajeros, las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs), así como tirosina cinasas y las proteínas cinasas PKA, PKC, CK2 y CK1 α . El resultado de la actividad de dichas cinasas es la hiper-fosforilación de los receptores en aminoácidos localizados principalmente en la tercera asa intracelular y en el extremo carboxilo, lo cual a su vez, promueve el reclutamiento de proteínas de andamiaje, como las β -arrestinas, las cuales son capaces de activar vías de señalización específicas mientras el receptor se encuentra ya internalizado. La complejidad en el proceso de fosforilación de los GPCRs permite que los receptores sean fosforilados dependiendo del tipo celular en el cual se encuentren expresados, por lo tanto, un receptor podría tener diferentes propiedades de señalización dependiendo del contexto y tipo celular (Butcher et al., 2011).

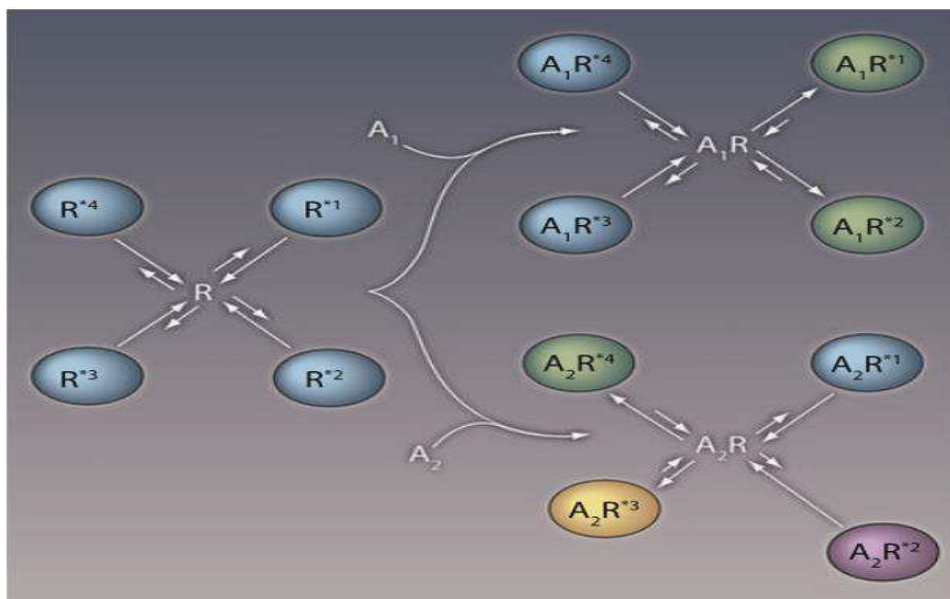


Figura 3: Señalización multifuncional por GPCRs. Múltiples conformaciones activas de un GPCR (R) en la ausencia (R^{*}) o presencia (AR^{*}) de un agonista (A₁ o A₂) son presentados. En la ausencia de un agonista, el receptor oscila entre varias conformaciones activas acompañado de una vía de señalización intracelular, aunque el equilibrio (señalado por el tamaño de las flechas) favorece el estado inactivo. La unión del agonista estabiliza una o más de las conformaciones activas (verde); otras pueden no ser afectadas (azul). Las diferencias en la estructura del agonista pueden llevar a la estabilización de diferentes conformaciones y diferentes señales, pueden ser menos efectivos en estabilizar una conformación en particular (amarillo) o, en el caso de un agonista inverso, pueden mover el equilibrio hacia el estado inactivo (purpura). Imagen modificada de Liggett, et al., 2011.

El proceso de fosforilación** está asociado a dos mecanismos de desensibilización de GPCRs: *desensibilización homóloga* y *desensibilización heteróloga*. La desensibilización homóloga involucra la unión del ligando con el receptor, posteriormente, las GRKs fosforilan al receptor en la tercera asa intracelular y en el extremo carboxilo, promoviendo así, una atenuación en su actividad; mientras que la desensibilización heteróloga involucra la fosforilación de GPCRs no activados por ligandos, dicha fosforilación es llevada a cabo por cinasas dependientes de segundos mensajeros, como la proteína cinasa A (PKA) y la PKC, en residuos localizados principalmente en la tercera asa intracelular y en el extremo carboxilo (Vázquez-Prado, et al., 2003). Durante ambos procesos de desensibilización, las β -arrestinas son capaces de unirse al receptor para promover su internalización, al mismo tiempo que promueven la activación de diversas vías de señalización, como la vía de MAP cinasas (Figura 4) (Tóth et al., 2018).

Como se mencionó previamente, diversos estudios han demostrado la existencia de un patrón específico de fosforilación en los GPCRs, el cual depende del tipo de ligando que los active y del tipo celular en el cual se encuentran expresados. Esto indica la presencia de un código de fosforilación que determina de manera importante la función de un receptor (Tobin et al., 2008). A pesar de que los GPCRs son fosfoproteínas, dicho código de fosforilación ha sido estudiado solamente en un número limitado de GPCRs mediante la técnica de espectrometría de masas; sin embargo, recientemente, más grupos de investigación han empezado a emplear esta técnica de estudio para conocer el patrón de fosforilación de diversos receptores (Alfonzo-Méndez, et al., 2017).

Algunos ejemplos de GPCRs cuyo código de fosforilación ha sido estudiado, es el de la rodopsina (Greene, et al., 1997), el receptor β_2 -adrenérgico (Nobles et al., 2011), el receptor de vasopresina 2 (Wu, et al., 2008), el receptor muscarínico M3 (Butcher et al., 2011), el receptor 2 de dopamina (Jeong et al., 2013), el receptor GPR120 (Butcher et al., 2014), el receptor para el neuropeptido FF2 (Bray et al., 2014), el receptor para la hormona paratiroidea (Zindel et al., 2016), así como el receptor de grelina (Bouzo-Lorenzo et al., 2016), entre otros. Los residuos encontrados en dichos receptores parecen regular ciertas

**La desensibilización de receptores a corto y largo plazo involucra la participación de diversas proteínas intracelulares, así como procesos relacionados con el tráfico vesicular. La fosforilación y el reclutamiento de las β -arrestinas son dos procesos esenciales que regulan la desensibilización de receptores. Adicionalmente, la ubiquitinación es un evento post-transduccional que tiene un papel importante en la desensibilización y degradación de diversos GPCRs por lisosomas y proteosomas. Igualmente, las fosfodiesterasas, proteínas de la familia RGS, y proteínas cinasas de anclaje A, participan también en la desensibilización de un gran número de receptores (Shenoy, et al., 2018).

características y procesos funcionales, como la inactivación del receptor, desensibilización, internalización, señalización e interacción con proteínas intracelulares (Alfonzo-Méndez et al., 2017).

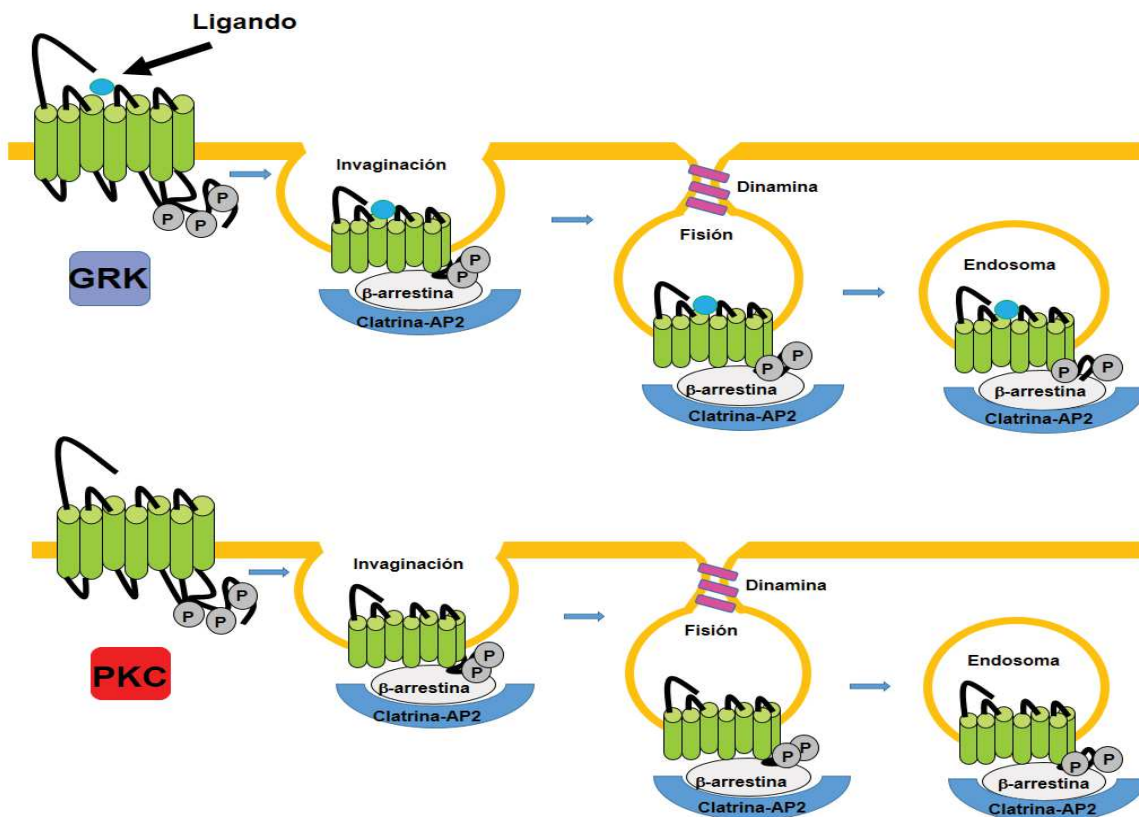


Figura 4: Desensibilización homóloga y heteróloga de GPCRs. El proceso de fosforilación de GPCRs está asociado a la desensibilización homóloga, en la cual, el receptor que es activado por su ligando es fosforilado por GRKs en sitios localizados principalmente en la tercera asa intracelular y en el extremo carboxilo. Por otro lado, en la desensibilización heteróloga, el receptor puede ser fosforilado aun en la ausencia de su ligando, debido a la activación de proteínas cinasas dependientes de segundos mensajeros, como la PKC, cuya actividad catalítica se ve reflejada en la fosforilación del receptor en la tercera asa intracelular y en el extremo carboxilo. Durante ambos procesos de desensibilización, el reclutamiento de la β -arrestina hacia el receptor promueve la internalización de este en vesículas de clatrina.

Por otro lado, varios estudios han reportado que la fosforilación de GPCRs por GRKs no necesariamente induce la desensibilización e internalización de los receptores, esto ha sido demostrado en el receptor α_{1B} -adrenérgico (Diviani et al., 1996), el receptor de endotelina A y B (Usui et al., 2000; Chiba, 1999; Freedman et al., 1997), el receptor de tromboxano A2 (Carman et al., 1999), el receptor muscarínico M3 (Carman et al., 1999), el receptor para la hormona paratiroidea (Dicker, et al., 1999), el receptor para la hormona liberadora de tirotrófina (Willets, et al., 2008), el receptor 2C de 5-hidroxitriptamina (Willets et al., 2008), el receptor metabotrópico 1A de glutamato (Dale et al., 2000; Dhami, et al., 2005) y el receptor tipo 1A de angiotensina II (Usui et al., 2000). Adicionalmente, otros

estudios han propuesto que la fosforilación de receptores por parte de GRK2 podría ser solo un evento secundario que no tiene un efecto sobre la desensibilización e internalización de receptores (Pao & Benovic, 2002).

El paradigma de que la fosforilación de un receptor no necesariamente induce su internalización, ha sido objeto de debate durante los últimos años. De hecho, esta desensibilización puede ocurrir a través de varios posibles mecanismos, incluyendo el efecto de un agonista sobre el tráfico intracelular de un receptor (Beaumont, et al., 1998), la unión de GRKs (Diviani et al., 1996), así como el reclutamiento de las β -arrestinas independientemente de la fosforilación del receptor (Ferguson et al., 1996; Palczewski et al., 1994) (Figura 5).

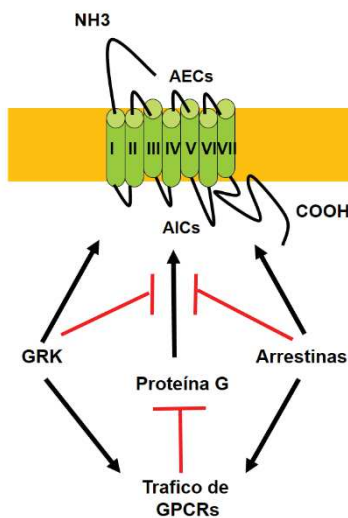


Figura 5: Mecanismos potenciales de desensibilización independientes de fosforilación de GPCRs. La unión del agonista promueve la interacción de tres clases de proteínas con los GPCRs: Las proteínas G, las GRKs y las arrestinas. La interacción de GRKs regula el desacoplamiento de la proteína G del receptor (desensibilización) a través de la fosforilación del receptor, la asociación física con el receptor o la asociación e inhibición de la proteína G. La interacción de las arrestinas también inhibe directamente el acoplamiento del receptor con la proteína G, mientras que el tráfico vesicular de receptores promueve la desensibilización y la regulación a la baja de receptores. Imagen modificada de Benovic, et al., 2002.

La habilidad de las GRKs y las β -arrestinas para promover el tráfico intracelular de GPCRs, puede también resultar en una separación física del receptor y la proteína G, y por lo tanto, regular su desensibilización (Ferguson, 2001; Krupnick & Benovic, 1998). Aunque cada uno de estos procesos puede contribuir a la desensibilización de un GPCR, la potencial habilidad de las GRKs para promover la fosforilación de receptores sin su consecuente internalización, es la principal idea de este paradigma (Pao & Benovic, 2002).

1.2. El receptor α_{1D} -adrenérgico

1.2.1. Generalidades

Las acciones de las catecolaminas, adrenalina y noradrenalina (NA), así como de otros agonistas simpaticomiméticos sintéticos, son reguladas a través de receptores adrenérgicos (ARs). Dichos receptores están agrupados en tres familias distintas (con tres miembros cada una) con base en sus características farmacológicas, similitud de secuencias y sus vías de señalización: α_1 -, α_2 - y β -ARs (Figura 6). La familia de los

receptores α_1 -adrenérgicos está constituida por el receptor α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} . Mutantes con actividad constitutiva de algunos de estos receptores han sido reportadas, mostrando información importante en el proceso de activación del receptor, su potencial oncogénico y sus características funcionales, mismas que permiten caracterizar agentes farmacológicos novedosos (Diviani et al., 1996; García-Sáinz, et al., 2010). Dicha familia de receptores adrenérgicos se acoplan a la proteína $G_{q/11}$, la cual promueve la actividad de la fosfolipasa C. Sin embargo, actualmente se sabe que estos receptores pueden acoplarse a otras clases de proteínas G, y por lo tanto, ser capaces de activar diferentes vías de señalización no canónicas. (Alfonzo-Mendez et al., 2016).

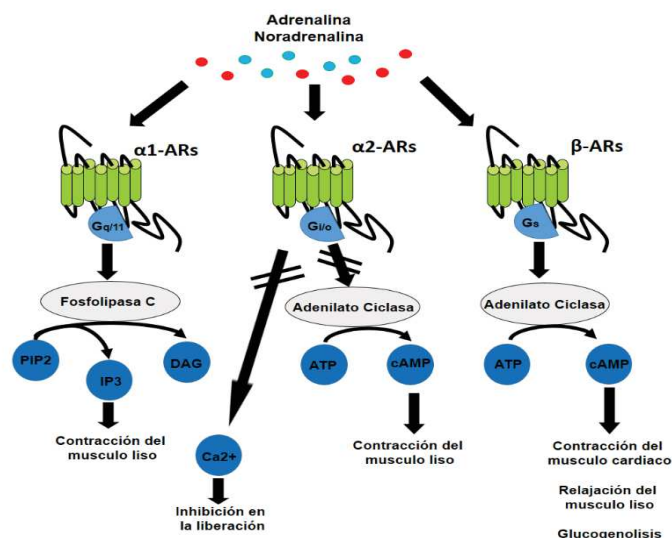


Figura 6: Familia de receptores adrenérgicos. Los receptores adrenérgicos están agrupados en tres familias. Los receptores α_1 , los cuales están acoplados a la proteína $G_{q/11}$, misma que es capaz de activar a la fosfolipasa C para producir IP3 y DAG a partir de la hidrólisis del PIP2; los receptores α_2 , los cuales están acoplados a la proteína $G_{i/o}$, misma que regula de forma negativa a la adenilato ciclasa y la liberación de calcio intracelular; y los receptores β adrenérgicos, los cuales están acoplados a la proteína G_s , cuya principal función es regular de forma positiva a la adenilato ciclasa para producir cAMP. (Fain & García-Sáinz, 1980)

1.2.2. Características funcionales del receptor α_{1D} -adrenérgico

El receptor α_{1D} -adrenérgico (α_{1D} -AR) tiene características particulares que han hecho de su estudio, un tema muy complicado e interesante (García-Sáinz & Villalobos-Molina, 2004). Por ejemplo, dicho receptor tiene niveles de expresión muy bajos en diversos tejidos así como en la membrana plasmática. Además, es un receptor constitutivamente activo, el cual se encuentra localizado principalmente en vesículas intracelulares (García-Sáinz & Torres-Padilla, 1999; García-Sáinz et al., 2010; Rodríguez-Pérez et al., 2009; Alfonzo-Mendez et al., 2016). Por otro lado, la eliminación de los primeros 79 aminoácidos del extremo amino, promueven su expresión en la membrana plasmática (Hague et al., 2004) y, de hecho, recientemente se reportó que tal corte proteolítico en el extremo amino ocurre en modelos donde el receptor nativo es sobre-expresado en diversas líneas celulares (Kountz et al., 2016). Igualmente, su heterodimerización con el receptor α_{1B} -adrenérgico incrementa sus niveles de expresión en la membrana plasmática (Hague et al., 2006). En conjunto, dichos procesos biológicos pueden ser interpretados como mecanismos fisiológicos que permiten la expresión de receptores funcionales.

Una vez localizado en la membrana plasmática, el receptor α_{1D} -AR tiene un mecanismo conservado de acción: el ligando se une a diversas regiones del receptor, lo cual induce cambios conformacionales que permiten su acoplamiento con la proteína $G_{q/11}$. Este proceso, como se mencionó anteriormente, induce la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato por la PLC- β , dando lugar a la producción de IP3 y DAG. El IP3 permite la liberación de calcio intracelular, mientras que el DAG activa a la PKC. Además, el receptor α_{1D} -AR es también capaz de activar la vía de señalización de ERK1/2 (Alfonzo-Mendez et al., 2016, Alfonzo-Méndez, et al., 2018). En comparación con los otros miembros de la familia de los receptores α_1 -AR, los mecanismos de regulación y función del receptor α_{1D} -AR han sido muy poco caracterizados.

Nuestro conocimiento actual sobre los mecanismos moleculares y celulares que gobiernan la actividad de este receptor en condiciones clínicas, es aún inadecuada e incompleta. De hecho, numerosos estudios clínicos indican que el receptor α_{1D} -AR tiene un papel fundamental en las funciones de la vejiga (Hampel et al., 2002; et al., 2005; Chen et al., 2005), la próstata (Walden, et al., 1999; Kojima et al., 2011), las arterias coronarias (Jensen et al., 2009), diversos procesos del sistema nervioso central (Mishima et al., 2004; Aono et al., 2015; Sadalge et al., 2003), regulación de la presión arterial (Lyssand et al., 2008) y posiblemente, en el desarrollo del cáncer (Morelli et al., 2014). Por lo tanto, entender los mecanismos moleculares por los cuales el receptor α_{1D} -AR ejerce sus funciones en diversos contextos celulares, abre la posibilidad de desarrollar ligandos farmacológicos con mejor respuesta terapéutica (Kountz et al., 2016).

1.2.3. Sitios de fosforilación del receptor α_{1D} -AR

Como se ha venido describiendo, diversos grupos de investigación han estudiado los sitios de fosforilación de un pequeño número de GPCRs, entre los cuales se encuentra el receptor de la rodopsina y el receptor β_2 -adrenergico (Alfonzo-Méndez et al., 2017). En el caso del receptor α_{1D} -AR, recientemente nuestro grupo de investigación reportó en células HEK293, los sitios de fosforilación de dicho receptor bajo diferentes condiciones: en condiciones basales, cuando el receptor es estimulado por su ligando natural (NA) y cuando las células son estimuladas con un éster de forbol (PMA), el cual tiene la capacidad de activar directamente a la PKC. El análisis de espectrometría de masas arrojó que existen 6 sitios potencialmente fosforilables en la tercera asa intracelular, así como 10 sitios potencialmente fosforilables en el extremo carboxilo. Es importante destacar que aun en condiciones

basales, el receptor muestra un patrón específico de fosforilación, el cual podría resultar de su actividad constitutiva y explicar su localización en vesículas intracelulares. Igualmente, en todas las condiciones en las que el patrón de fosforilación del receptor se estudió, se encontraron aminoácidos que son blancos de GRKs, PKC o ambas cinasas (Alfonzo-Méndez et al., 2018). La tabla 1 muestra el código de fosforilación del receptor α_{1D} -AR.

#	a.a.	Localización	Secuencia	Basal				NA				PMA			
				Hits	PKC	GRK	PKC GRK	Hits	PKC	GRK	PKC GRK	Hits	PKC	GRK	PKC GRK
300	S	IL3	KRERGKASEVLR ^S RIH	5				9				12			
323	S	IL3	DGAHGMR ^S AKGHTFR	15				77				115			
328	T	IL3	MRS ^S AKGHTFRSSLSV	4				11				17			
331	S	IL3	KGHTFR ^S SLSVRLK	-				3				-			
332	S	IL3	KGHTFR ^S SLSVRLK	4				7				1			
334	S	IL3	HTFRSSL ^S VRLKFS	15				23				15			
441	S	Ctail	GHHWRAS ^S TSGLRQDC	-				-				11			
442	T	Ctail	GHHWRAS ^S TSGLRQDC	-				1				1			
477	T	Ctail	PDPEPPG ^T PEMQAPV	7				2				15			
486	S	Ctail	EMQAPVA ^S RRKPPSA	2				-				12			
492	S	Ctail	ASRRKPP ^S AFREWRL	-				-				2			
507	T	Ctail	LGPFRRT ^T QLRAKV	-				1				1			
515	S	Ctail	TQLRAKV ^S SSLHKIR	-				2				3			
516	S	Ctail	QLRAKV ^S SSLHKIRA	1				16				25			
518	S	Ctail	RAKVSSL ^S HKIRAGG	3				6				17			
543	S	Ctail	RSEVEAV ^S SLGVPHEV	1				1				2			

Tabla 1: Sitios de fosforilación del receptor α_{1D} -AR. Los números indican el número de residuo y las letras indican el aminoácido y su localización en la tercera asa intracelular y el extremo carboxilo. En rojo se muestran los sitios que son fosforilados por PKC cuando las células son estimuladas con PMA, en verde se muestran los sitios que son fosforilados por GRKs cuando las células son estimuladas con NA, y en amarillo se muestran los sitios que son potencialmente fosforilados por ambas cinasas. Imagen modificada de Alfonzo-Méndez, et al., 2018.

1.3. β -arrestinas 1/2

1.3.1. Generalidades

Las β -arrestinas son una pequeña familia de cuatro proteínas homólogas que tienen un papel muy importante en la regulación de diversos GPCRs. La arrestina 1 (o arrestina visual) y la arrestina 4 (o arrestina de conos) se expresan exclusivamente en el sistema visual, mientras que la arrestina 2 (o β -arrestina 1) y la arrestina 3 (o β -arrestina 2) se expresan en múltiples tejidos (Carmona-Rosas, et al., 2018). Las estructuras cristalinas de las cuatro arrestinas en su conformación basal han sido reveladas, las cuales muestran la existencia de dos dominios principales (el dominio N y el dominio C), con estructuras β similares (Figura 7) (Granzin et al., 1998; Hirsch, et al., 1999; Han, et al., 2001; Park, et al., 2016).

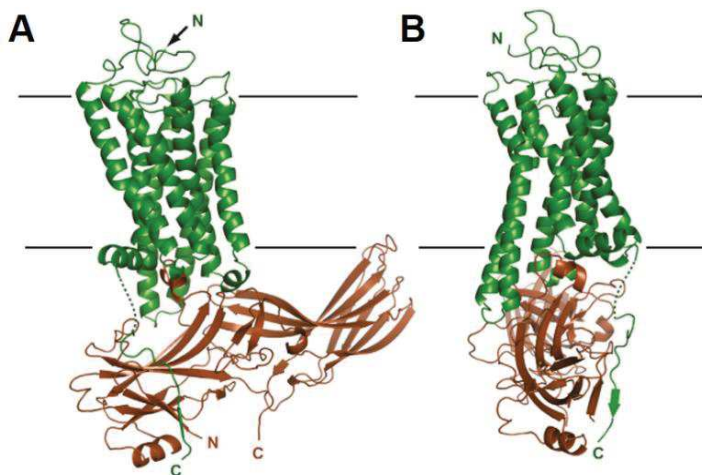


Figura 7: Estructura de la β -arrestina acoplada al receptor de rodopsina. El panel A muestra la estructura cristalina de la β -arrestina (café) unida al receptor de la rodopsina (verde). La β -arrestina contiene un dominio N, así como un dominio C, el primero interactúa con el extremo carboxilo del receptor para formar y estabilizar el complejo GPCR/ β -arrestina. El panel B muestra un giro de 90° grados de la estructura mostrada en el panel A. Imagen modificada de Zhou, et al., 2017.

Las arrestinas fueron originalmente identificadas en el sistema visual, así como en otros sistemas fisiológicos debido a su habilidad de regular la desensibilización de GPCRs previamente activados por un ligando, impidiendo así, el acoplamiento del receptor con su respectiva proteína G. Sin embargo, se ha descubierto que estas proteínas también funcionan como adaptadores de la maquinaria endocítica, proteínas de andamiaje y mediadores del tráfico de diversas proteínas trans-membranales. En el caso de los GPCRs, ambas β -arrestinas llevan a cabo dichas funciones mediante la inhibición de la señalización de receptores dependiente de proteínas G, al mismo tiempo que promueven la activación de otras vías de señalización (Carmona-Rosas et al., 2018). Sin embargo, es importante destacar que el acoplamiento de la proteína G y la β -arrestina en un mismo receptor, no es un mecanismo mutuamente excluyente. Diversos receptores son capaces de seguir señalizando a través de su proteína G activa mientras se encuentran internalizados, el cual es un proceso dependiente de β -arrestina (Figura 8) (Ranjan, et al., 2017).

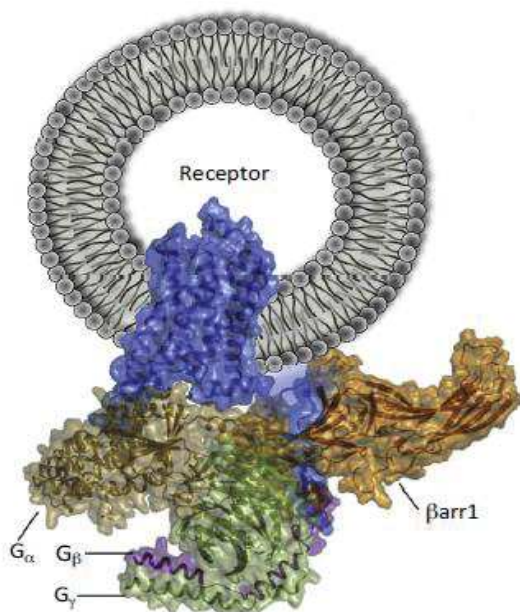


Figura 8: Formación del complejo multi-proteico GPCR/proteína G/ β -arrestina. La unión de la proteína G y de la β -arrestina con un receptor no es un mecanismo mutuamente excluyente. La formación de este complejo proteico permite que el receptor siga señalizando mientras se encuentra internalizado en endosomas. Imagen modificada de Ranjan, et al., 2017.

1.3.2. Las β -arrestinas como proteínas adaptadoras

Diversos grupos de investigación han demostrado que las vías de señalización de GPCRs no son exclusivamente lineales, es decir, un receptor puede acoplarse a más de un tipo de proteína G, mientras que otros pueden interactuar con efectores independientes de las proteínas G, mediante los dominios PDZ localizados en los dominios intracelulares de los receptores (Reiter, et al., 2012). Como se mencionó anteriormente, además de la familia de proteínas G, dos familias de proteínas específicas interactúan con un gran número de GPCRs en su estado conformacional activo: GRKs y β -arrestinas. Se pensaba que dichas proteínas limitaban su función al control de la desensibilización, internalización y reciclamiento de receptores (Vauquelin & von Mentzer, 2007). Sin embargo, durante la última década, se ha demostrado que estas proteínas también cumplen un rol como transductor de señales asociadas al receptor. De especial importancia, las β -arrestinas 1/2 son proteínas de andamiaje que interactúan con una gran variedad de proteínas intracelulares, así como proteínas cinasas, promoviendo de esta manera, la fosforilación de múltiples sustratos citosólicos (Xiao et al., 2007). Algunos mecanismos de señalización regulados por las β -arrestinas incluyen la formación de fibras de estrés dependientes de Rho-A, la inhibición del factor nuclear kappa B, expresión de genes mediante la estabilización de la proteína I κ B, la desfosforilación de la vía de señalización de AKT mediante proteínas fosfatasas, la activación de la proteína glucógeno sintasa cinasa (GSK), la activación de la vía de MAP cinasas, la activación de mecanismos que impiden la apoptosis, así como la activación de la proteína fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) (Reiter et al., 2012).

1.3.3. Las β -arrestinas como proteínas reguladoras de GPCRs

Actualmente se sabe que los GPCRs activados por ligandos son fosforilados en un proceso que regula el acoplamiento del receptor con vías de señalización intracelulares. Dependiendo de los diferentes contextos metabólicos y celulares, los patrones de fosforilación del receptor han dado lugar a un “código de fosforilación”, el cual tiene un papel fundamental en la señalización del receptor (Butcher et al., 2011). Igualmente, la interacción de los GPCRs con las β -arrestinas 1/2, requiere de un código específico de fosforilación en el extremo carboxilo del receptor, el cual es llevado a cabo por GRKs después de la activación del receptor por su ligando (Zhou et al., 2017). Sin embargo, es importante mencionar que la generación de dicho código de fosforilación para la unión de las β -

arrestinas, puede ser también generado por la actividad de la PKC, aunque en muy pocos receptores se ha estudiado este fenómeno (Tóth et al., 2018). Aunque la fosforilación del receptor es la señal que recluta a las β -arrestinas, esta no es la única forma en que estas dos proteínas pueden interactuar (Tobin et al., 2008). Basados en el patrón de reclutamiento de las β -arrestinas, los GPCRs son generalmente clasificados como receptores tipo A o tipo B. Los receptores tipo A, como el receptor β_2 -adrenérgico, se unen de forma transitoria a las β -arrestinas y muestran un rápido reciclamiento hacia la membrana plasmática después de ser internalizados. Por otro lado, los receptores tipo B, como el receptor de vasopresina 2 (V2R), muestran una interacción más fuerte con las β -arrestinas, además de ser sometidos a degradación por proteosoma (Figura 9). Los receptores tipo B usualmente tienen más grupos de residuos fosforilables de serina y treonina a lo largo del extremo carboxilo, mientras que los receptores tipo A muestran una menor presencia de dichos residuos en el extremo carboxilo. Es concebible por lo tanto, que dichos grupos de residuos fosforilables en los receptores tipo B, contribuyan a una mayor afinidad de estos GPCRs con las β -arrestinas (Kumari et al., 2016). Sin embargo, mediante el uso del receptor activado por proteasa-1 (PAR-1), el receptor de sustancia P y el receptor de leucotrieno, se ha demostrado que la fosforilación del receptor no es indispensable para reclutar a las β -arrestinas (Richardson et al., 2003; Chen, et al., 2004; Jala, et al., 2005; Tobin et al., 2008). Otros estudios han demostrado que la eliminación de los sitios de fosforilación del receptor de orexina OX1 y del receptor activado por proteasa-2 (PAR-2), no impide el reclutamiento de las β -arrestinas hacia estos receptores (Milasta et al., 2005; Stalheim, 2005; Tobin et al., 2008). Una posible explicación a dicho fenómeno recae en dos distintos componentes que regulan la formación del complejo GPCR/ β -arrestina: El primero es la interacción mediante múltiples puntos de contacto entre la conformación activa del receptor y el sensor de activación, el cual se encuentra localizado en la superficie cóncava de la β -arrestina; mientras que el segundo involucra la interacción entre los fosfatos contenidos en el receptor fosforilado y el sensor de fosfatos localizado en el centro polar de la β -arrestina (Tobin et al., 2008). Además de esto, el extremo carboxilo de cada receptor posee un “sello distintivo” que define el perfil de señalización que dicho receptor mostrara. Esto se ha demostrado mediante la construcción de receptores quimeras, donde el extremo carboxilo del receptor β_2 -adrenérgico (β_2 -AR) es remplazado por el extremo carboxilo del receptor de vasopresina 2 (V2R) y viceversa; los resultados mostraron que la primera mutante se comporta como el receptor V2R nativo, mientras que la segunda mutante se comporta como el receptor β_2 -AR nativo (Tohgo et al., 2003). Igualmente, usando el mismo método experimental con el receptor PAR-2 y el receptor de

neuroquinina-1 (NK1R), el primero muestra el perfil de señalización del segundo, y viceversa (Pal, et al., 2013). Es interesante que además de los elementos estructurales que el extremo carboxilo de cada receptor usa para unirse a las β -arrestinas, cada receptor tiene un perfil de señalización único del cual el extremo carboxilo es indispensable (Carmona-Rosas et al., 2018).

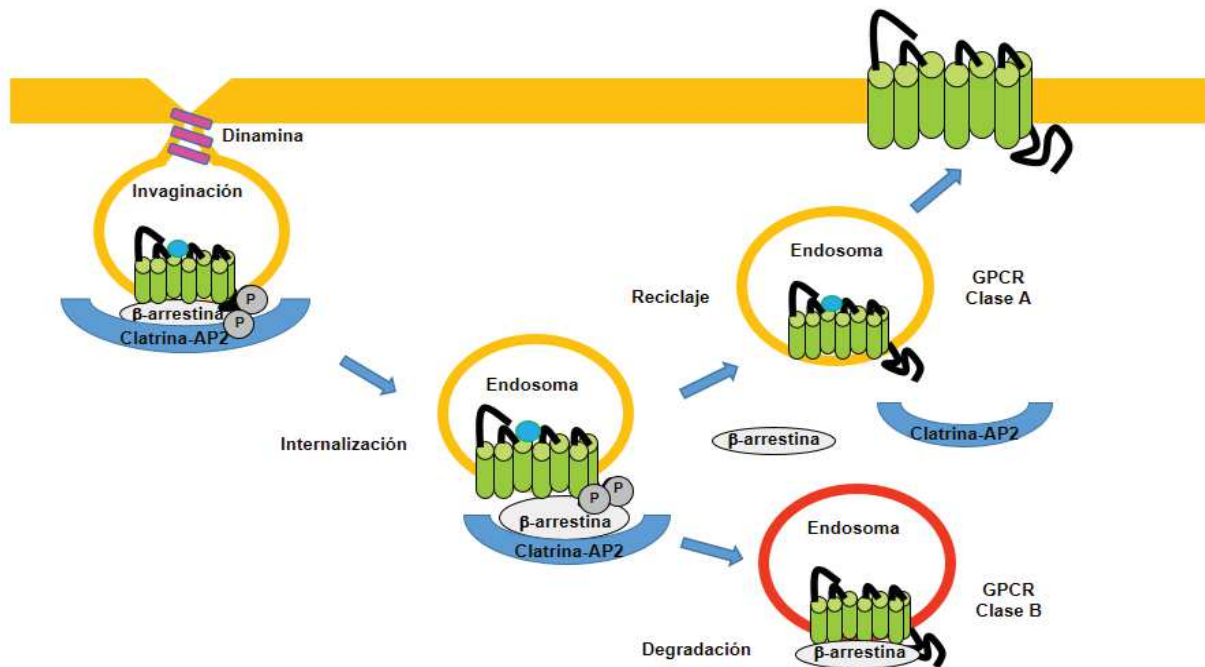


Figura 9: Clasificación de GPCRs con base en su unión a las β -arrestinas. Los GPCRs han sido clasificados en clase A y clase B dependiendo de su unión a las β -arrestinas y su patrón de internalización. Los receptores tipo A se unen transitoriamente a las β -arrestinas y son reciclados a la membrana plasmática, mientras que los receptores clase B muestra una mayor unión a las β -arrestinas y son posteriormente degradados por el proteosoma. Imagen modificada de Carmona-Rosas, et al., 2018.

Capítulo II

Justificación y planteamiento del problema

El estudio del receptor α_{1D} -AR ha representado un reto para un gran número de grupos de investigación. Dicho receptor se encuentra localizado en vesículas intracelulares en condiciones basales, tiene actividad constitutiva y se encuentra fosforilado aun en la ausencia de un estímulo o ligando (Alfonzo-Mendez et al., 2016). Sin embargo, el corte de los primeros 79 aminoácidos del extremo amino permite su expresión en la membrana plasmática, lo cual sugiere que dicho dominio extracelular regula la localización subcelular de este receptor (Hague et al., 2004). Además, recientemente se reportó que este corte proteolítico ocurre en modelos donde el receptor nativo es sobre-expresado en diversas líneas celulares (Kountz et al., 2016). Igualmente, su dimerización con el receptor α_{1B} -AR permite que el receptor α_{1D} -AR sea reclutado hacia la membrana plasmática, permitiendo que esté disponible para regular las acciones de catecolaminas como la adrenalina y la noradrenalina (Hague et al., 2006).

Por otro lado, el estudio de los sitios de fosforilación de diversos GPCRs a través de espectrometría de masas, ha permitido dilucidar el rol que cada sitio de fosforilación tiene en la función y regulación de dichos receptores (Alfonzo-Méndez et al., 2017). Recientemente, nuestro grupo de investigación reportó los sitios de fosforilación del receptor α_{1D} -AR cuando las células en las cuales se encuentra expresado, son estimuladas con NA y PMA. Nuestros resultados mostraron que existen 6 residuos potencialmente fosforilables en la tercera asa intracelular, así como 10 residuos potencialmente fosforilables en el extremo carboxilo. Dicha fosforilación de residuos es llevada a cabo por PKC α/β y GRK2. Así mismo, reportamos el rol que tienen los residuos de la tercera asa intracelular y el extremo carboxilo en la regulación y función del receptor α_{1D} -AR (Alfonzo-Méndez et al., 2018) (*Este estudio puede ser consultado en el anexo 1*). A pesar de estos avances, nuestro trabajo se limitó a estudiar únicamente la función de los dominios intracelulares del receptor α_{1D} -AR, dejando de lado el rol que cada residuo en el extremo carboxilo tiene en la función y regulación de dicho receptor. Por esta razón, el presente trabajo pretende dilucidar la función de los residuos localizados en el extremo carboxilo, así como su impacto en la función y regulación del receptor α_{1D} -AR.

Capítulo III

Hipótesis y objetivos

3.1. Hipótesis

Los sitios de fosforilación localizados en el extremo carboxilo del receptor α_{1D} -AR regulan diferencialmente su función, localización subcelular y su unión a las β -arrestinas 1/2.

3.2. Objetivo

3.2.1. General

Estudiar el rol que tienen los diferentes sitios de fosforilación localizados en el extremo carboxilo en la regulación y función del receptor α_{1D} -AR.

3.2.2. Particulares

Con base en los sitios de fosforilación encontrados por espectrometría de masas en nuestro reciente trabajo, generar mutantes de los sitios de fosforilación localizados en el extremo carboxilo del receptor α_{1D} -AR, y evaluar su repercusión funcional a los siguientes niveles:

- Perfil de fosforilación cuando las células son estimuladas con noradrenalina (NA) y ésteres de forbol (PMA).
- Localización subcelular en condiciones basales.
- Movilización de calcio intracelular en respuesta a la estimulación con NA y ácido lisofosfatídico (LPA).
- Activación y regulación de la vía de MAPK/ERK.
- Perfil de internalización en respuesta a la estimulación con NA y PMA.
- Unión a las β -arrestinas 1/2 en respuesta a la estimulación con NA y PMA.

Capítulo IV

Material y métodos

4.1. Reactivos

Noradrenalina (-) (NA), propanolol, bisindolylmaleimida I (BIM-I), forbol 12-miristato-13-acetato (PMA) y el ácido lisofosfatídico (LPA), fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Chemical. AG1478 fue obtenido de Calbiochem y el EGF fue obtenido de Preprotech. [³²P]Pi (8500–9120 Ci/mmol) fue comprado a Perkin-Elmer Life Sciences. El medio de Eagle modificado por Dulbecco, el suero fetal bovino, la tripsina, la lipofectamina 2000, la anfotericina B, la estreptomicina, la penicilina, la doxiciclina, la higromicina B, la blasticidina, el Fura2-AM y la aglutinina de germen de trigo, fueron comprados a Invitrogen-Life Technologies. Las membranas de difluoruro de polivinilideno fueron obtenidas de BioRad, y el kit de quimioluminiscencia “Super Signal West”, fue comprado a Thermo Fisher Scientific. La polietilenimina fue obtenida de Polyscience. La proteína A acoplada a agarosa fue obtenida de Merck-Millipore. El anticuerpo monoclonal anti-GFP fue obtenido de Clontech (número de catálogo 632381, lote A5033481), mientras que el anticuerpo policlonal anti-GFP fue generado en nuestro laboratorio (Avendaño-Vázquez, et al., 2005). El anticuerpo anti-fosfo-ERK (Thre202/Tyr204) (número de catálogo 9101S, lote 30) y anti-total-ERK (p42/44) (número de catálogo 4695S, lote 21) fueron obtenidos de Cell Signaling Technology; el anticuerpo monoclonal anti-β-arrestina1/2 (número de catálogo sc-7491, lote D1615), fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology (Sc-74591). La tetrametil-rodamina conjugada AffiniPure raton anti-conejo IgG (código 715-025-150) fue obtenida de Jackson Immunology. Los RNA de interferencia (siRNA) para β-arrestina 1 (número de catálogo AM16708, lote AS027ZUU), β-arrestina 2 (número de catálogo AM16708, lote AS027ZUT) y el siRNA “scramble” (número de catálogo AM4611, lote AS026WKE) fueron comprados a Thermo Fisher Scientific. Los anticuerpos secundarios fueron obtenidos de Jackson Immuno-Research y Zymed (Thermo Fisher Scientific). La dilución de anticuerpos fue de 1:1000 para los anticuerpos primarios y de 1:10,000 para los anticuerpos secundarios.

4.2. Plásmidos

El cDNA que codifica para la versión truncada del extremo amino, así como para la versión truncada del extremo amino y del extremo carboxilo del receptor α_{1D} -AR unidos a la EGFP (construcciones $\Delta 1-79$ y $\Delta 1-79/\Delta 440-572$, respectivamente [Rodríguez-Pérez, et al., 2009]),

fueron subclonados en el plásmido pEGFP-N1 (Clontech). Estas construcciones fueron posteriormente subclonadas en el plásmido pCDNA5/FRT/TO para generar las construcciones p Δ N- α 1D-AR-EGFP y p Δ N Δ C- α 1D-AR-EGFP (Flp-In T-rex expression system, Invitrogen). Las construcciones previas fueron mutadas (S300/323/331/332/334A,T328V) para generar las construcciones p Δ N-MutIL3-EGFP y p Δ N Δ C-MutIL3-EGFP. La construcción p Δ N-MutIL3-EGFP fue posteriormente usada como templado para mutar y generar las siguientes mutantes: p Δ N-MutIL3-T442V-EGFP, p Δ N-MutIL3-S543A-EGFP, p Δ N-MutIL3-T477V,S486/492A-EGFP, p Δ N-MutIL3-T507V,S515/516/518A-EGFP, p Δ N-MutIL3-T477V,S486/492A,T507V,S515/516/518A-EGFP, p Δ N-MutIL3-T442/477V,S486/492A,T507V,S515/516/518/543A-EGFP, p Δ N-MutIL3-T477D,S486/492D-EGFP, p Δ N-MutIL3-T507D,S515/516/518D-EGFP y p Δ N-MutIL3-T442/477D,S486/492D,T507D,S515/516/518/543D-EGFP. Todas estas construcciones fueron elaboradas comercialmente por Mutagenex, Inc. La inserción adecuada así como las mutaciones, fueron confirmadas por secuenciación (Mutagenex, Inc) (*Las características de cada plásmido pueden ser consultadas en el anexo 2*). El plásmido para la expresión de la dominante negativa de la GRK2 fue donado por el Dr. Jeffrey Benovic (Thomas Jefferson University) (Kong, et al., 1994).

4.3. Líneas celulares y transfecciones

Las líneas celulares parentales HEK293 (células embrionarias de riñón humano) Flp-In T-rex (Invitrogen) fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 μ g/ml de estreptomina, 100U/ml de penicilina y 0.25 μ g/ml de amfotericina B. Para generar las líneas celulares del receptor inducible, las líneas celulares parentales HEK293 Flp-In T-rex fueron transfectadas con el plásmido pCDNA5/FRT/TO, el cual contiene el cDNA que codifica para las mutantes del receptor α 1D-AR previamente descritas, así como el pOG44, usando Lipofectamina 2000, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas fueron seleccionadas con 100 μ g/ml de higromicina B y 5 μ g/ml de blasticidina, como ya se ha descrito en otros estudios (Alfonzo-Méndez et al., 2018; Ward, et al., 2011; Sánchez-Reyes et al., 2014) La expresión del receptor fue inducida con 1 μ g/ml de doxiciclina de 14 a 24 horas antes de iniciar los experimentos. En todos los experimentos donde se usó noradrenalina, se añadió 1 μ M de propranolol para bloquear las acciones sobre los receptores β -adrenérgicos, dicho compuesto no tiene ningún impacto sobre los parámetros basales de los experimentos. En aquellos ensayos donde se usó la dominante negativa de

la GRK2, el plásmido fue transfectado usando polietilenimina (Ming Hsu & Uluda Ğ, 2012) y los experimentos fueron realizados 72 horas después de la transfección. En los experimentos donde se bloqueó la expresión de las β -arrestinas 1/2, los siRNAs de la β -arrestina 1 y β -arrestina 2, fueron mezclados y transfectados a las células con Lipofectamina 2000 siguiendo las instrucciones de manufactura, 48 horas antes de realizar los experimentos.

4.4. Colocalización de receptores con el marcador de membrana plasmática

Las líneas celulares transfectadas fueron sembradas a un 50% de confluencia en cajas Petri con fondo de vidrio y cultivadas por 24 horas a 37°C en medio con 1% de suero. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con 4% de paraformaldehído en buffer de fosfatos 0.1 M, por 30 minutos a temperatura ambiente, y lavadas nuevamente tres veces con PBS. Una vez fijadas las células, estas fueron marcadas con 1 mg/ml de aglutinina de germen de trigo e incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras fueron lavadas tres veces con PBS. Las imágenes de microscopia confocal fueron obtenidas en un microscopio Olympus Fluoview FV10, con un objetivo de inmersión de aceite de 60x, un zoom de 5.0, una apertura focal de 2.0, una calidad de imagen de x16, y un tamaño de imagen de 512 x 512. Para determinar la colocalización del receptor α_{1D} -adrenérgico con la membrana plasmática, la sobreposición de los dos fluoróforos (EGFP/Alexa 350) fue medido usando el software ImageJ (Collins, 2007). Las imágenes representativas mostrando el canal verde fluorescente, el canal azul fluorescente, la fusión de imágenes y las imágenes de colocalización pixel por pixel, son presentadas. Al menos 10 diferentes imágenes por condición fueron obtenidas en cada experimento.

4.5. Fosforilación de receptores

La fosforilación de receptores fue llevada a cabo con base en reportes anteriores (Rodríguez-Pérez, et al., 2009; Alfonzo-Méndez et al., 2018). Las células fueron sembradas en cajas de seis pozos e incubadas durante 3 horas con medio de Eagle modificado por Dulbecco libre de fosfatos, y suplementado con 50 μ Ci/ml [³²P]Pi. Las células marcadas fueron estimuladas con los compuestos indicados y lavadas con buffer de fosfatos salina (137.9mM NaCl, 2.7mM KCl, Na₂HPO₄ 10mM; pH7.4) (PBS) y solubilizadas por 1 hora en buffer de lisis (Alfonzo-Méndez et al., 2018). Los extractos fueron centrifugados y los supernadantes fueron incubados toda la noche con proteína A agarosa y suero anti-EGFP

generado en nuestro laboratorio (Avendaño-Vázquez et al., 2005). Las muestras fueron sujetas a SDS-PAGE, transferidas a membranas de nitrocelulosa y expuestas por 24 horas. La cantidad de receptor fosforilado fue evaluada por análisis de fosfo-imagen analysis. Los Western-Blots para los controles de carga se realizaron usando un anticuerpo comercial anti-EGFP (Clontech).

4.6. Determinación de calcio intracelular

Las concentraciones de calcio intracelular fueron determinadas con base a reportes previos (Rodríguez-Pérez, et al., 2009; Rodríguez-Pérez, et al., 2009; Alfonzo-Méndez et al., 2018). Resumiendo, las células fueron ayunadas de suero por dos horas, posteriormente, fueron incubadas con 2.5 μ M del marcador fluorescente de calcio, Fura-2/AM, en buffer Krebs-Ringer-HEPES, con 0.05% de albumina bovina, a un pH de 7.4 por 1 hora a 37°C. Las células marcadas fueron lavadas 3 veces para eliminar los residuos de marcador no incorporados. La medición de fluorescencia fue evaluada con longitudes de onda de excitación de 340 y 380 nm, una longitud de onda de emisión de 510 nm y un intervalo de corte establecido de 0.5 s, usando un espectrofluorómetro de luminiscencia Aminco-Bowman Series 2. Los niveles de calcio intracelular fueron calculados como se ha descrito en estudios previos (Alfonzo-Méndez et al., 2018).

4.7. Fosforilación de ERK1/2

Las células fueron ayunadas 2 horas antes de realizar los experimentos. Después de la estimulación con los compuestos indicados, las células fueron lavadas con buffer de fosfatos salina frío y lisados con buffer Laemmli (Laemmli, 1970). Los lisados fueron centrifugados a 12,000 x g por 5 minutos, y el sobrenadante de proteínas fue separado por SDS-PAGE. Las proteínas fueron electrotransferidas en membranas de PVDF y posteriormente, los ensayos de Western-Blot fueron llevados a cabo. Se corrieron muestras por duplicado en paralelo para determinar la actividad de t-ERK y p-ERK. Para la normalización de los datos, la respuesta máxima fue considerada como el 100%.

4.8. Internalización de receptores y colocalización con las β -arrestinas 1/2 endógenas

Los ensayos de internalización y colocalización con las β -arrestinas 1/2 endógenas fueron realizados en base a estudios previos (Alcántara-Hernández et al., 2017). Las líneas

celulares transfectadas fueron sembradas a un 50% de confluencia en cajas Petri con fondo de vidrio y cultivadas por 24 horas a 37°C en medio con 1% de suero y estimuladas con los compuestos descritos. Después de la estimulación, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con 4% de paraformaldehído en buffer de fosfatos 0.1 M, por 30 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente lavadas tres veces con PBS. Para determinar la internalización del receptor, la fluorescencia intracelular fue cuantificada usando el software ImageJ (Collins, 2007). Para determinar la colocalización del receptor α_{1D} -adrenérgico con las β -arrestinas 1/2 endógenas, las células fueron fijadas como se indicó previamente, y las muestras fueron permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.3%, por 15 minutos a 4°C. Las células fueron posteriormente incubadas con BSA al 3% por 1.5 horas a temperatura ambiente, en la ausencia o presencia de anticuerpo anti- β -arrestina 1/2 (1:200), con 3% de BSA en buffer salino con Tris base 50mM, pH de 7.4, y con 0.1% de Tween 20. Después de este proceso, las muestras fueron lavadas dos veces, e incubadas por dos horas en el mismo buffer con anticuerpo secundario conjugado con tetrametil-rodamina (1:500), y posteriormente lavadas con PBS en agitación suave. Las imágenes de microscopia confocal fueron obtenidas en un microscopio Olympus Fluoview FV10, con un objetivo de inmersión de aceite de 60x, un zoom de 5.0, una apertura focal de 2.0, una calidad de imagen de x16, y un tamaño de imagen de 512 x 512. Para determinar la colocalización del receptor α_{1D} -adrenérgico-EGFP con las β -arrestinas 1/2 marcadas con rodamina, la sobreposición de los dos fluoróforos (EGFP/rodamina) fue medido usando el software ImageJ (Collins, 2007). Las imágenes representativas mostrando el canal verde fluorescente, el canal rojo fluorescente, la fusión de imágenes y las imágenes de colocalización pixel por pixel, son presentadas. Al menos 10 diferentes imágenes por condición fueron obtenidas en cada experimento.

4.9. Análisis estadístico

La comparación estadística entre grupos fue evaluada usando un análisis de varianza paramétrico (ANOVA), y usando una prueba post-hoc de Bonferroni. Para los análisis de relación entre la fosforilación y la movilización de calcio intracelular, se realizó un análisis de correlación de Pearson (Pearson's r). Se usó el software incluido en el programa GraphPad Prism 6 para realizar dichos análisis. Un valor mínimo de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo (Significativo [*], hasta altamente significativo [***]).

Capítulo V

Resultados

5.1. Sitios de fosforilación del receptor α_{1D} -AR, mutagénesis dirigida y fosforilación de receptores

Usando la técnica de espectrometría de masas, recientemente reportamos que el receptor α_{1D} -AR contiene seis sitios potencialmente fosforilables (S300, S323, T328, S331, S332, S334) en la tercera asa intracelular (IL3), así como diez sitios potencialmente fosforilables (S441, T442, T477, S486, S492, T507, S515, S516, S518, S543) en el extremo carboxilo (Alfonzo-Méndez et al., 2018). Es importante mencionar que el residuo S441 se encontró únicamente en uno de los tres ensayos de espectrometría de masas, por lo cual, al considerarlo un residuo inconsistente, fue descartado de futuros estudios. Uno de los objetivos principales del presente trabajo, fue mostrar experimentalmente el rol que cada residuo en el extremo carboxilo tiene en la función del receptor α_{1D} -AR. Para dicho propósito, primero identificamos que los sitios de fosforilación en el extremo carboxilo tienen una distribución particular: dos residuos aislados (T442, S543), así como dos grupos de residuos localizados a lo largo del extremo carboxilo. Nombramos dichos grupos de fosforilación como grupo proximal (G.P.; T477, S486, S492) y grupo distal (G.D.; T507, S515, S516, S518) (Figura 10A). Tomando dicha distribución de residuos en consideración, generamos una combinación de mutaciones puntuales y deleciones en el receptor α_{1D} -AR (Figura 10B). Como se mencionó anteriormente, el extremo amino del receptor α_{1D} -AR regula de manera negativa su localización en la membrana plasmática, por lo tanto, generamos todas nuestras mutantes sin dicho dominio extracelular (ΔN). Posteriormente, realizamos sustituciones de los 6 aminoácidos localizados en la tercera asa intracelular por residuos no fosforilables (ΔN -MutIL3). Tomando esta mutante como templado, realizamos mutaciones puntuales en el extremo carboxilo del residuo proximal T442V (ΔN -MutIL3-R.P.), del residuo distal S543A (ΔN -MutIL3-R.D.), así como de los grupos distal y proximal (ΔN -MutIL3-G.P. y ΔN -MutIL3-G.D., respectivamente). Igualmente, generamos una doble mutante (ΔN -MutIL3-M.D.) donde ambos grupos de residuos fosforilables fueron mutados, además de una mutante total (ΔN -MutIL3-M.T.), donde todos los residuos fosforilables del extremo carboxilo fueron mutados por residuos no fosforilables. Finalmente, usamos una mutante reportada en nuestro más reciente trabajo, donde el extremo carboxilo del receptor fue cortado (ΔN - ΔC), así como una mutante donde además de este corte, los residuos de la tercera asa intracelular fueron mutados por residuos no fosforilables (ΔN -MutIL3- ΔC)

(Alfonzo-Méndez et al., 2018). Todas las mutantes previamente mencionadas fueron marcadas con la proteína verde fluorescente (EGFP) para poder ser visualizadas por microscopia confocal y para su estudio en ensayos bioquímicos (*Las características específicas de cada línea celular, pueden ser consultadas en el anexo 3*).

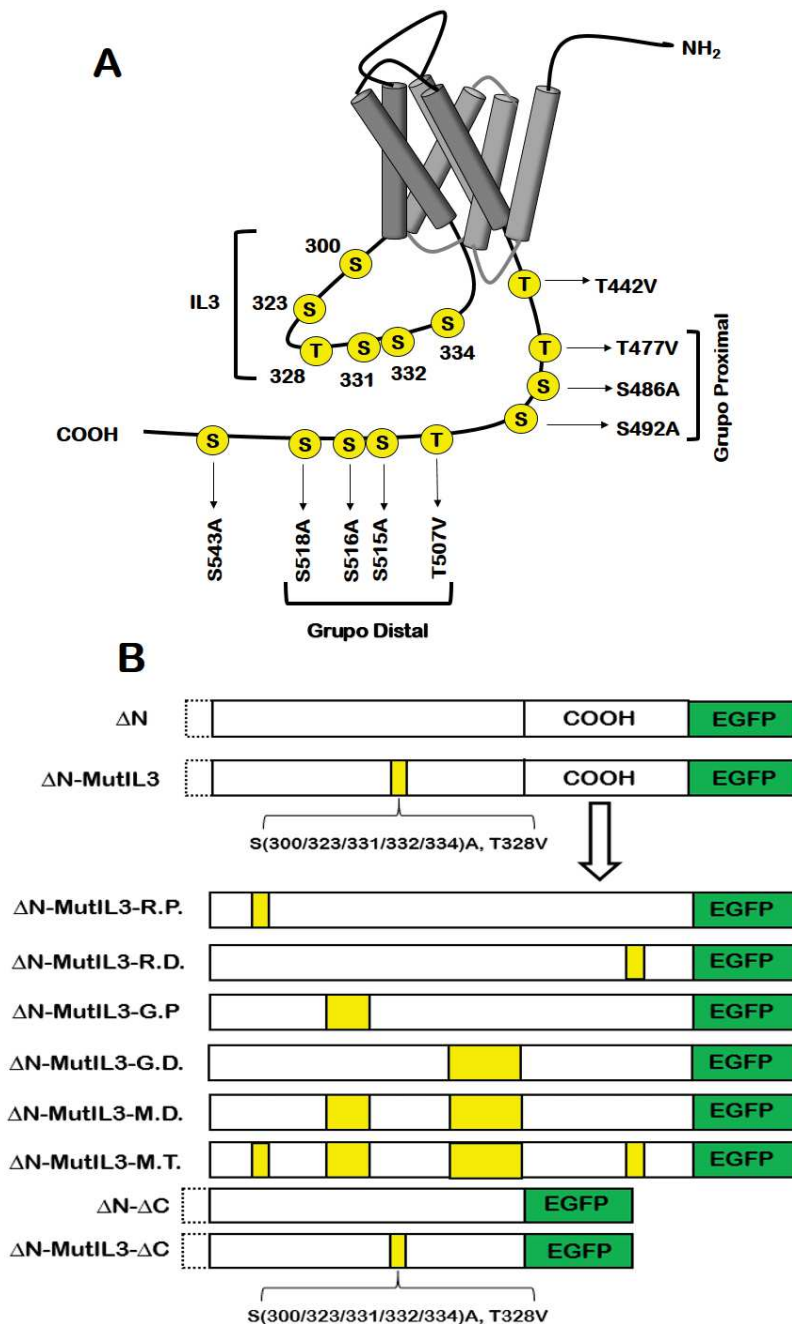


Figura 10: Representación esquemática de las mutantes del receptor α_{1D} -AR. Panel A: Los residuos fosforilables del receptor α_{1D} -AR detectados por espectrometría de masas, están localizados principalmente en la tercera asa intracelular (IL3) y en el extremo carboxilo (COOH). Dichos residuos fueron mutados por aminoácidos no fosforilables: los residuos de serina fueron cambiados por residuos de alanina, mientras que los residuos de treonina fueron cambiados por residuos de valina. Panel B: Representación esquemática de las mutantes del receptor α_{1D} -AR. Las zonas de líneas punteadas en la construcciones representan la delección de los primeros 79 aminoácidos del extremo amino del receptor. La mutante ΔN -MutIL3 fue generada tomando al receptor ΔN como templado. Las secciones amarillas en esta mutante indican que los residuos S300, S323, S331, S332, S334 y T328, localizados en la tercera asa intracelular, fueron mutados por residuos no fosforilables, como se describió previamente. Posteriormente, la mutante ΔN -MutIL3 fue mutada en T442 (ΔN -MutIL3-R.P.), S543 (ΔN -MutIL3-R.D.), T477, S486, S492 (ΔN -MutIL3-G.P.), T507, S515, S516, S518 (ΔN -MutIL3-G.D.), T477, S486, S492, T507, S515, S516, S518 (ΔN -MutIL3-M.D.) y T442, T477, S486, S492, T507, S515, S516, S518, S543 (ΔN -MutIL3-M.T.).

Posteriormente, usamos la línea celular HEK293 Flp-In T-rex system para expresar las mutantes previamente descritas y realizar ensayos de fosforilación durante la desensibilización homóloga y heteróloga, en presencia de 10 μM de noradrenalina (NA) o 1 μM de forbol miristato acetato (PMA) por 15 minutos. Simultáneamente, medimos la fosforilación del receptor ΔN con el resto de las mutantes y normalizamos los datos de fosforilación detectados respecto a los parámetros basales. Las concentraciones de los

agentes, así como los tiempos de incubación fueron elegidos con base en nuestro reciente trabajo (Alfonzo-Méndez et al., 2018). Como se ilustra en la figura 11A, los parámetros de fosforilación basales del receptor ΔN muestran un incremento de aproximadamente el doble después de la estimulación con NA y PMA. Ambos agentes también incrementaron los niveles de fosforilación de la mutante ΔN -MutIL3, aunque en una menor proporción ($\approx 50\%$). Cuando se analizó el nivel de fosforilación de la mutante ΔN -MutIL3-R.P., se observó un incremento marginal de dichos niveles de fosforilación en respuesta a NA y PMA (Figura 11B). Por otro lado, las mutantes ΔN -MutIL3-R.D. y ΔN -MutIL3-G.P. mostraron un incremento en sus niveles de fosforilación después de la estimulación con NA, pero no después de la estimulación con PMA (Figura 11C y 11D). Posteriormente, cuando evaluamos la mutante ΔN -MutIL3-G.D., no se detectó ningún incremento en los niveles de fosforilación después de la estimulación con estos agentes (Figura 11E). Es importante mencionar que la fosforilación en la mutante ΔN -MutIL3-M.D. disminuyó por debajo de los niveles basales del receptor ΔN (Figura 11F), mientras que la mutante ΔN -MutIL3-M.T. mostró un mayor decremento en los niveles de fosforilación (Figura 11G). Estos datos confirman experimentalmente que la fosforilación del receptor α_{1D} -AR ocurre en los residuos mostrados en la figura 10A; sin embargo, la presencia del residuo S441, localizado en el extremo carboxilo, podría contribuir a los bajos niveles de fosforilación detectados incluso en la mutante ΔN -MutIL3-M.T. Dichos resultados también sugieren que el residuo T442 es un regulador clave en la fosforilación total del receptor. Además, nuestros datos sugieren que el grupo distal y el residuo S543 son los principales aminoácidos que son fosforilados en respuesta a la estimulación con PMA.

5.2. Visualización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR en condiciones basales mediante microscopia confocal

Posteriormente, evaluamos las células que expresan las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR mediante microscopia confocal. En condiciones basales, observamos que el receptor ΔN , y las mutantes ΔN -MutIL3, ΔN -MutIL3-R.P. y ΔN -MutIL3-R.D., están principalmente localizadas en la membrana plasmática. Por el contrario, las mutantes ΔN -MutIL3-G.P., ΔN -MutIL3-G.D., ΔN -MutIL3-M.D. y ΔN -MutIL3-M.T., fueron localizadas en vesículas intracelulares (Figura 12A). Con base en estas observaciones, evaluamos la fluorescencia intracelular para determinar cuantitativamente la localización subcelular de cada mutante. Los datos fueron normalizados con base en la señal detectada en el receptor ΔN .

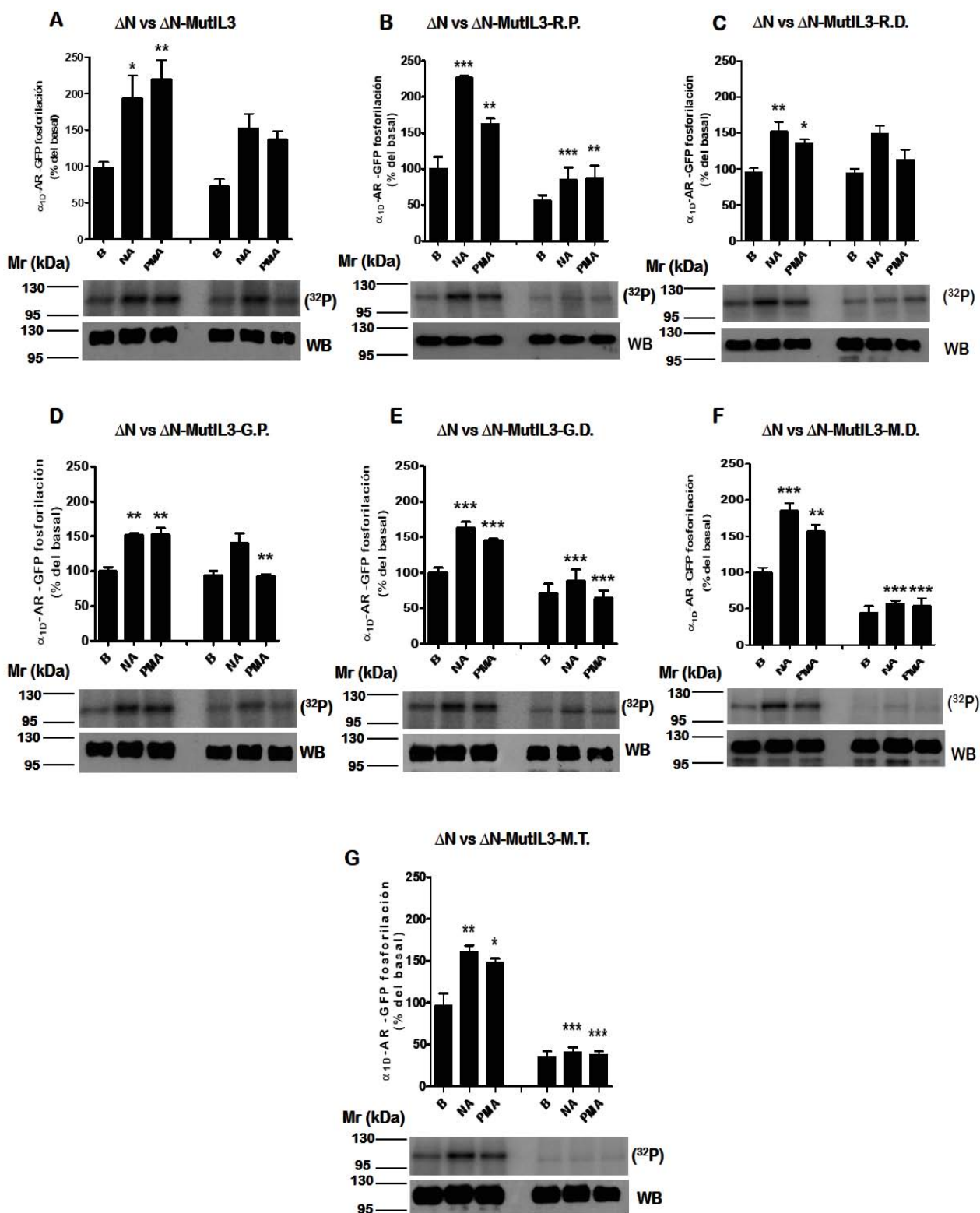


Figura 11: NA y PMA inducen la fosforilación de las mutantes del receptor α_{10} -AR. Las células que expresan las diferentes construcciones fueron estimuladas con 10 μ M de NA y 1 μ M de PMA por 15 minutos y comparadas con el receptor ΔN . En todos los casos, las muestras fueron procesadas en paralelo y los datos fueron normalizados respecto al porcentaje del basal. Las líneas trazadas representan la media y las líneas verticales representan el S.E.M. de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs Basal, NA o PMA. Las autorradiografías representativas y los Western-Blots son presentados debajo de cada gráfica.

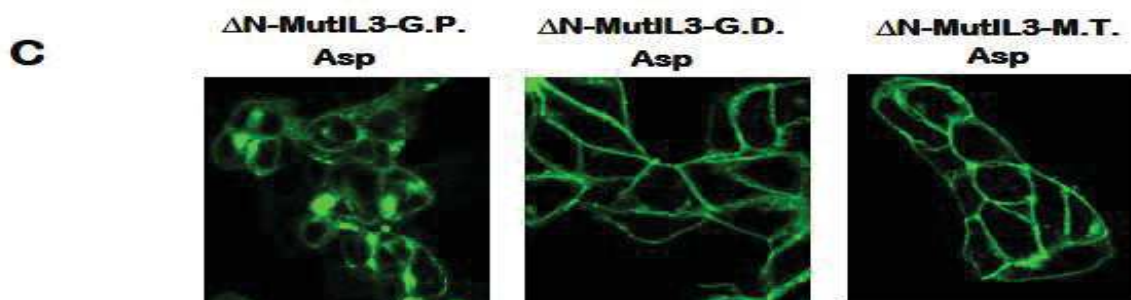
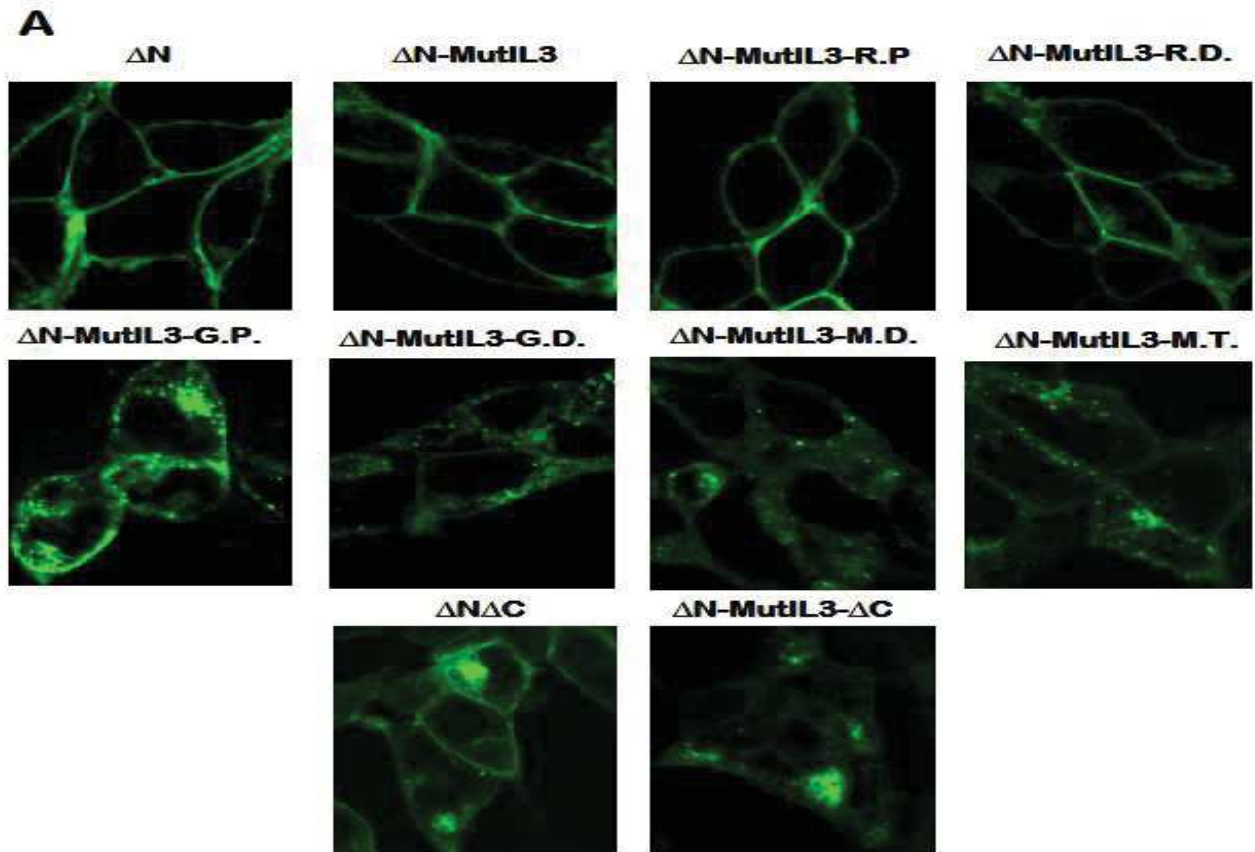


Figura 12: Localización subcelular de las mutantes del receptor α_{1D} -AR en condiciones basales y representación esquemática de las mutantes fosfo-miméticas. Panel A: Las células que expresan las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR fueron analizadas en condiciones basales mediante microscopía confocal. Las imágenes son representativas de 5-7 experimentos independientes usando preparaciones celulares diferentes. Panel B: la mutante ΔN -MutIL3 fue usada como templado para sustituir los residuos localizados en el grupo proximal (ΔN -MutIL3-G.P. Asp), el grupo distal (ΔN -MutIL3-G.D. Asp) así como ambos grupos de residuos y ambos residuos individuales localizados a lo largo del extremo carboxilo (ΔN -MutIL3-M.T. Asp) por ácido aspártico, con el fin de mimetizar el estado fosforilación del receptor. Las secciones rojas en las construcciones representan dichas mutaciones. Panel C: Las mutantes ΔN -MutIL3-G.P. Asp, ΔN -MutIL3-G.D. Asp y ΔN -MutIL3-M.T. Asp fueron analizadas en condiciones basales mediante microscopía confocal. Las imágenes son representativas de 5-7 experimentos independientes usando preparaciones celulares diferentes.

Como se muestra en la figura 13, se detectó una fluorescencia intracelular mínima en los receptores ΔN , ΔN -MutIL3, ΔN -MutIL3-R.P. y ΔN -MutIL3-R.D., mientras que las mutantes ΔN -MutIL3-G.P., ΔN -MutIL3-G.D., ΔN -MutIL3-M.D. y ΔN -MutIL3-M.T. mostraron un incremento importante en la fluorescencia intracelular. Sin embargo, en aquellas mutantes donde el extremo carboxilo fue truncado ($\Delta N\Delta C$ y ΔN -MutIL3- ΔC), se observó un incremento incluso mayor de fluorescencia intracelular en comparación con las mutantes anteriores. En otras palabras, el corte del extremo carboxilo o mutaciones en los grupos de fosforilación localizados en dicho dominio intracelular, impiden que el receptor α_{1D} -AR se exprese en la membrana plasmática.

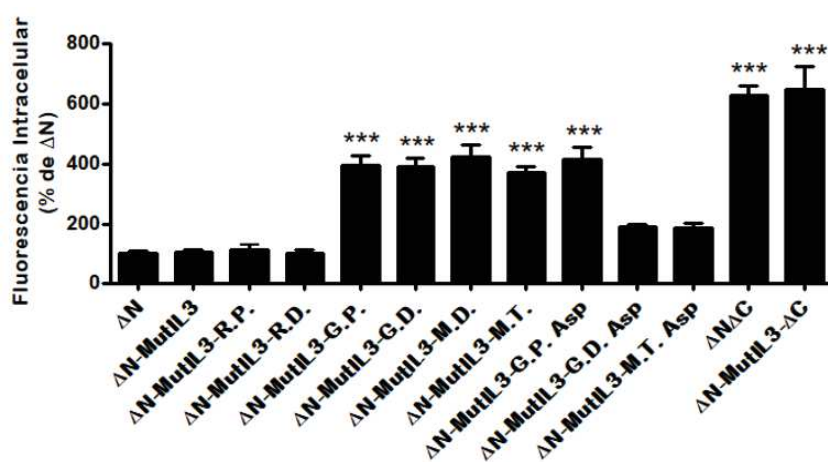


Figura 13: Cuantificación de la fluorescencia intracelular de las mutantes del receptor α_{1D} -AR en condiciones basales. La acumulación de la fluorescencia intracelular en condiciones basales fue cuantificada por cada mutante del receptor α_{1D} -AR. Las líneas trazadas representan la media y las líneas verticales representan el S.E.M. de al menos 7 experimentos independientes en los cuales de 3-5 células fueron analizadas (n=20-35). *p<0.05 vs ΔN .

Bajo la premisa anterior, planteamos la hipótesis de que la fosforilación de ambos grupos de residuos localizados en el extremo carboxilo, regulan la localización subcelular del receptor α_{1D} -AR. Con el fin de comprobar dicha hipótesis, generamos mutantes fosfomiméticas con sustituciones por ácido aspártico. Como se muestra en la figura 12B,

sustituimos los residuos localizados en el grupo proximal (ΔN -MutIL3-G.P. Asp), en el grupo distal (ΔN -MutIL3-G.D. Asp), así como en ambos grupos y ambos residuos individuales (ΔN -MutIL3-M.T. Asp). Nuestros datos mostraron que la mutante ΔN -MutIL3-G.P. Asp se encuentra localizada principalmente en vesículas intracelulares (Figura 12C). Dicha mutante muestra un incremento de la fluorescencia intracelular similar al de aquellas mutantes que se encuentran internalizadas. Por otro lado y sorprendentemente, las mutantes ΔN -MutIL3-G.D. Asp y ΔN -MutIL3-M.T. Asp, se encuentran totalmente localizadas en la membrana plasmática (Figura 12C), mostrando niveles de fluorescencia intracelular equivalentes al del receptor ΔN (Figura 13). Nuestros datos sugieren que la fosforilación del grupo de residuos localizado en la región distal del extremo carboxilo, es necesaria y suficiente para regular la presencia del receptor α_{1D} -AR en la membrana plasmática.

5.3. Colocalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR con la membrana plasmática en condiciones basales

Para comprobar que la mutación de diversos residuos fosforilables en el extremo carboxilo del receptor α_{1D} -AR contribuye a su localización intracelular y a la pérdida de su expresión en la membrana plasmática en condiciones basales, usamos un marcador específico de la membrana plasmática y evaluamos su colocalización con diversas mutantes del receptor α_{1D} -AR. La figura 14A muestra que el receptor ΔN , así como la mutante ΔN -MutIL3, se encuentran localizadas principalmente en la membrana plasmática. Sin embargo, las mutantes ΔN -MutIL3-G.D. y ΔN -MutIL3-M.T. muestran un nivel de colocalización menor con la membrana plasmática. Por otro lado, las mutantes ΔN -MutIL3-G.D. Asp y ΔN -MutIL3-M.T. Asp, se encuentran totalmente localizadas en la membrana plasmática, mostrando un nivel de colocalización similar al del receptor ΔN .

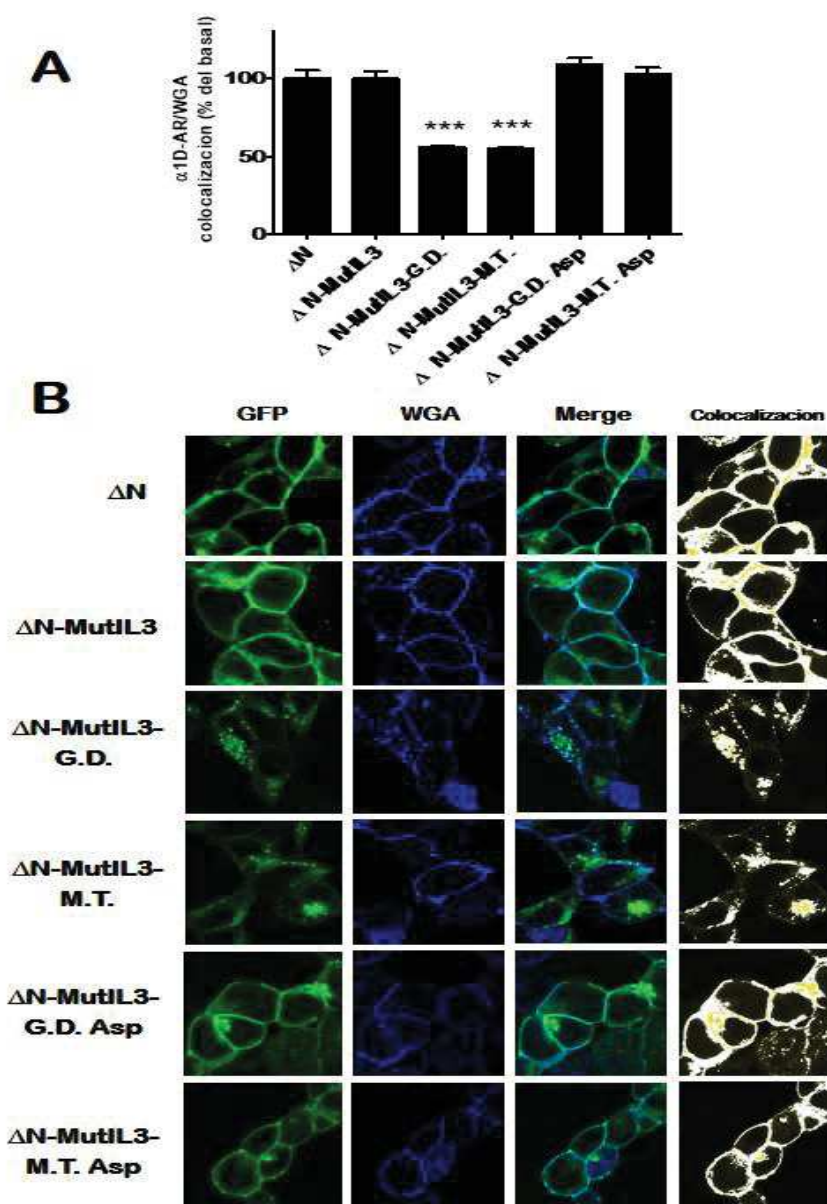


Figura 14: Colocalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR con la membrana plasmática

Panel A: La colocalización del receptor ΔN y de las mutantes ΔN -MutIL3, ΔN -MutIL3-G.D., ΔN -MutIL3-M.T., ΔN -MutIL3-G.D. Asp y ΔN -MutIL3-M.T. Asp, con la membrana plasmática, fue analizada en condiciones basales. Las líneas trazadas representan la media y las líneas verticales representan el S.E.M. de al menos 7 experimentos independientes en los cuales de 3-5 células fueron analizadas (n=20-35). *p<0.05 vs Basal. Panel B: Las imágenes representativas de las mutantes del receptor α_{1D} -AR (canal verde), la membrana plasmática (canal azul), el merge (merge) y la colocalización (colocalización) son presentadas.

5.4. Análisis de fosforilación de las mutantes fosfo-miméticas del receptor α_{1D} -AR

Después de analizar la localización subcelular de las mutantes fosfo-miméticas, realizamos ensayos de fosforilación de dichas mutantes siguiendo el mismo protocolo realizado en la figura 11. La figura 15A muestra que en respuesta a NA y PMA, la mutante Δ N-MutIL3-G.P. Asp tiene niveles de fosforilación muy bajos ($\approx 10\%$) en comparación con el receptor Δ N. Sin embargo, las mutantes Δ N-MutIL3-G.D. Asp (figura 15B) y Δ N-MutIL3-M.T. Asp (figura 15C) muestran niveles de fosforilación ligeramente más elevados ($\approx 30\%$) en respuesta NA, pero no en respuesta a PMA. Nuestros datos sugieren que pudieran existir más sitios de fosforilación localizados en el extremo carboxilo, mismos que no fueron detectados en nuestros ensayos de espectrometría de masas, o cuyo valor Ascore fue muy bajo para ser considerados.

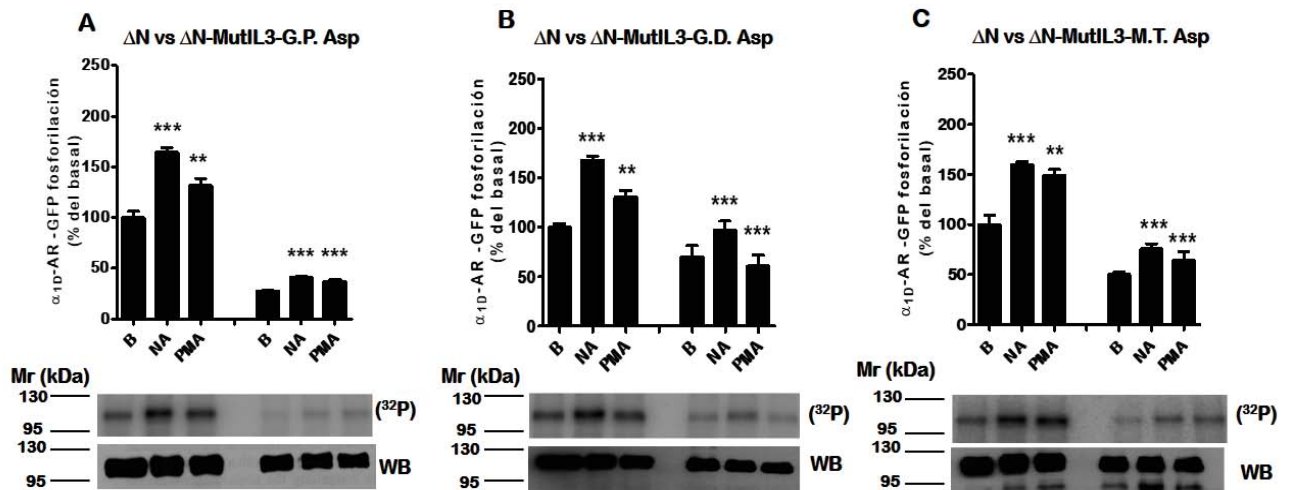


Figura 15: NA y PMA inducen la fosforilación de las mutantes fosfo-miméticas del receptor α_{1D} -AR. Las células que expresan las diferentes construcciones con ácido aspártico fueron estimuladas con $10 \mu\text{M}$ de NA y $1 \mu\text{M}$ de PMA por 15 minutos y comparadas con el receptor Δ N. En todos los casos, las muestras fueron procesadas en paralelo y los datos fueron normalizados respecto al porcentaje del basal. Las líneas trazadas representan la media y las líneas verticales representan el S.E.M. de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs Basal, NA o PMA. Las autorradiografías representativas y los Western-Blots son presentados debajo de cada gráfica

5.5. Análisis del incremento de calcio intracelular por las mutantes del receptor α_{1D} -AR

Por otro lado, evaluamos el incremento de calcio intracelular inducida por la estimulación con $10 \mu\text{M}$ de NA en las células que expresan las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR. Como se muestra en la figura 16, la estimulación con NA incrementa los niveles de calcio intracelular en aproximadamente 100 nM en las células que expresan el receptor Δ N; mientras que dicha concentración de calcio intracelular fue ligeramente menor en aquellas células que expresan la mutante Δ N-MutIL3. Por otro lado, en aquellas células que

expresan las mutantes que carecen de los residuos individuales así como el grupo proximal y distal (ΔN -MutIL3-R.P., ΔN -MutIL3-R.D., ΔN -MutIL3-G.P., ΔN -MutIL3-G.D.), el incremento de calcio intracelular inducida por NA fue significativamente menor en comparación con el receptor ΔN . Igualmente, en aquellas células que expresan las mutantes que carecen de ambos grupos de residuos así como de ambos residuos individuales (ΔN -MutIL3-D.M. y ΔN -MutIL3-T.M.), el incremento de calcio intracelular fue incluso menor que en las mutantes anteriores y en comparación con el receptor ΔN . Cuando examinamos las células que expresan las mutantes fosfo-miméticas, observamos que la mutante con el grupo proximal mutado (ΔN -MutIL3-G.P. Asp) recupera su capacidad para elevar los niveles de calcio intracelular de manera parcial. Sin embargo, la estimulación de las células que expresan las mutantes con el grupo distal, así como ambos grupos y ambos residuos individuales sustituidos por ácido aspártico (ΔN -MutIL3-G.D. Asp y ΔN -MutIL3-M.T. Asp), resultó en un incremento importante en los niveles de calcio intracelular a niveles comparables con el receptor ΔN . Así mismo, cuando se evaluaron las células que expresan la mutante $\Delta N\Delta C$, el incremento de calcio intracelular fue también similar al del receptor ΔN . Sin embargo, cuando se evaluó la actividad de la mutante ΔN -MutIL3- ΔC , el incremento de calcio intracelular disminuyó de forma significativa en comparación con el receptor ΔN . Como control positivo, medimos el incremento de calcio intracelular en todas las células que expresan las mutantes previamente mencionadas, estimulando a los receptores endógenos para ácido lisofosfatídico (LPA) con 1 μM de LPA. Bajo estas condiciones, detectamos un incremento de calcio intracelular consistente de aproximadamente 100 nM en todas las líneas celulares. La figura 17 muestra los trazos representativos del incremento de calcio intracelular en el receptor ΔN , así como en cada una de las mutantes, cuando estas son estimuladas con 10 μM de NA y 1 μM de LPA.

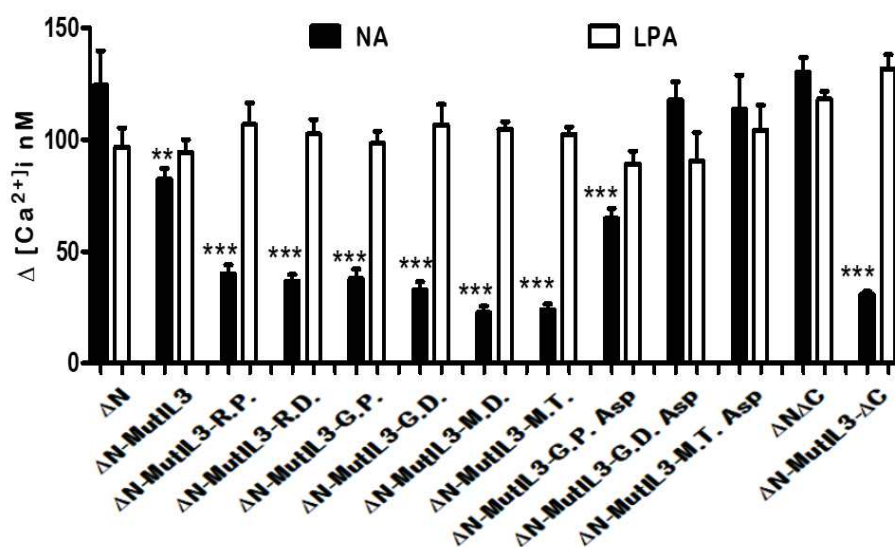


Figura 16: Incremento de calcio intracelular inducido por la estimulación con NA y LPA en células que expresan las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR. Las células que expresan las diferentes construcciones fueron estimuladas con 10 μM de NA o 1 μM de LPA, y el incremento de calcio intracelular fue evaluado. Las líneas trazadas representan la media y las líneas verticales representan el S.E.M. de al menos 6 experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs ΔN .

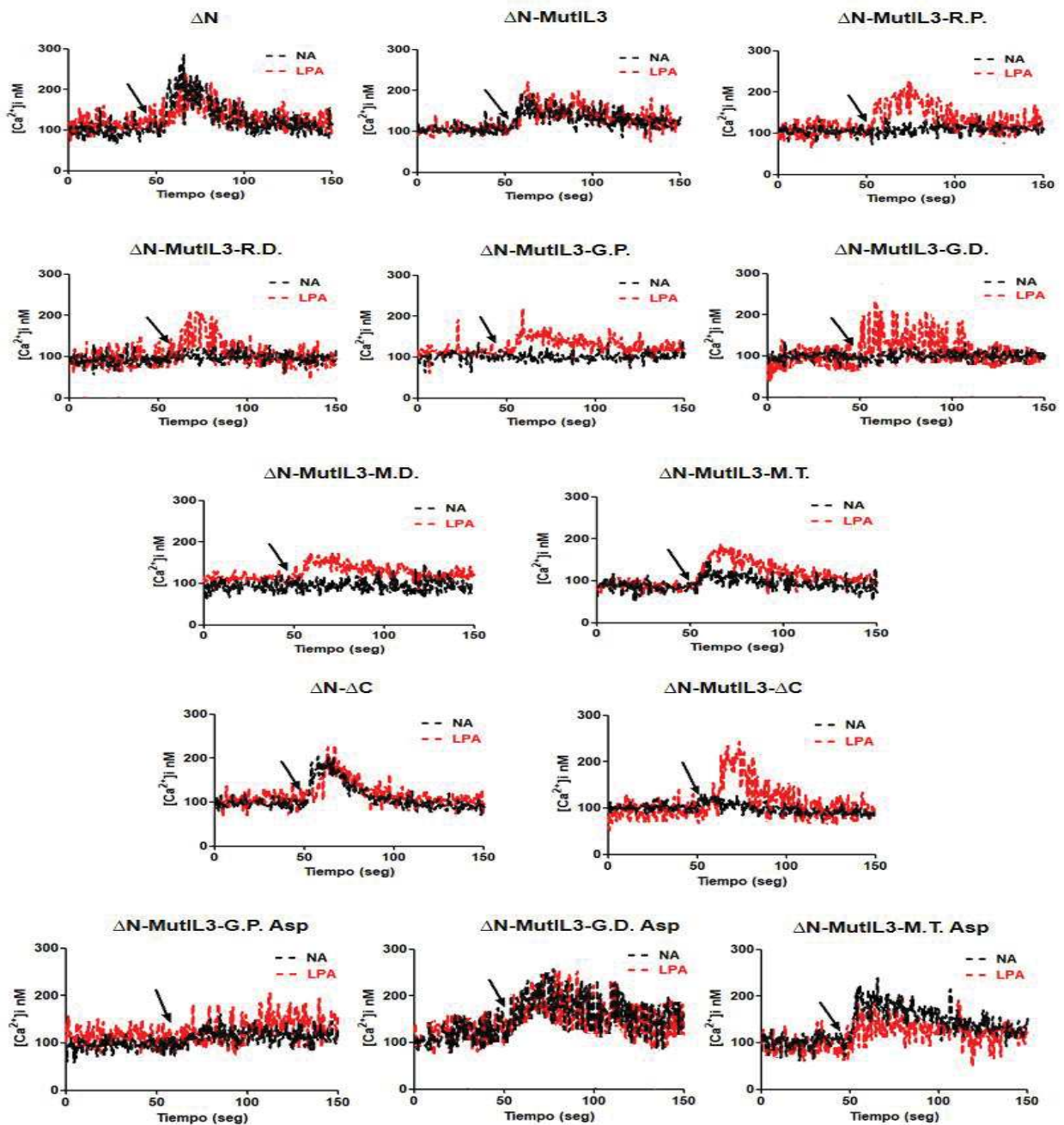


Figura 17: Trazos representativos de la movilización de calcio intracelular inducido por NA y LPA en células que expresan las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR. Las células que expresan las diferentes construcciones fueron estimuladas con 10 μ M de NA o 1 μ M de LPA al segundo 50, y el incremento de calcio intracelular fue evaluado.

5.6. Correlación de los niveles de fosforilación de las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR y su capacidad para movilizar calcio intracelular

Posteriormente, realizamos un análisis de correlación entre los niveles de fosforilación de las mutantes del receptor α_{1D} -AR por PKC α/β y GRK2, y su capacidad para movilizar calcio intracelular. Para realizar dicho análisis, tomamos en cuenta los valores medios de fosforilación por NA y PMA de cada una de las mutantes, y los valores medios obtenidos

por la movilización de calcio intracelular en respuesta a NA. Los valores fueron graficados de la siguiente manera: ^{32}P (NA) vs $i[\text{Ca}^{2+}]$ y ^{32}P (PMA) vs $i[\text{Ca}^{2+}]$. La figura 18A-B muestra un nivel de correlación de 0.8583 entre la fosforilación de las mutantes del receptor α_{1D} -AR por NA y su capacidad para movilizar calcio intracelular, mientras que el nivel de correlación entre la fosforilación inducida por PMA y la movilización de calcio intracelular de dichas mutantes, fue de 0.8909. Estos datos sugieren que la fosforilación del receptor ΔN y de las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR, pudiera favorecer la movilización de calcio intracelular en respuesta a NA debido a la capacidad de aquellas mutantes de ser activadas, fosforiladas y de unirse a su respectiva proteína G. Los valores obtenidos de las mutantes ΔN -MutIL3-G.P. Asp, ΔN -MutIL3-G.D. Asp y ΔN -MutIL3-M.T. Asp, no fueron tomados en cuenta para el presente análisis, debido a que presentan otro patrón de fosforilación y capacidad para movilizar calcio intracelular en respuesta a NA.

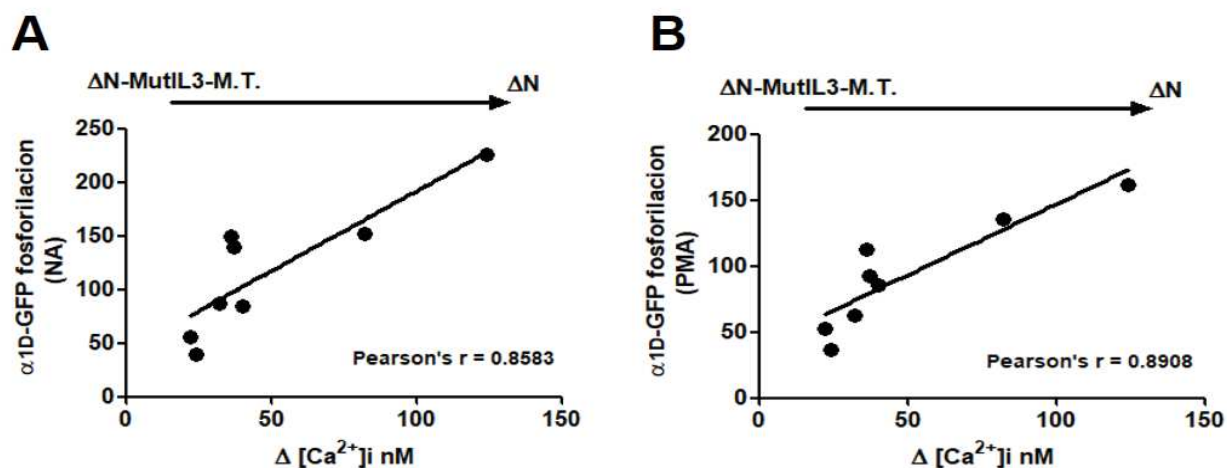


Figura 18: Análisis de correlación entre los niveles de fosforilación y la movilización de calcio intracelular en células que expresan las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR. Se correlacionaron los niveles de fosforilación inducidos por NA y PMA detectados en las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR, con la movilización de calcio intracelular en respuesta a NA. Cada punto representa la media del valor de fosforilación detectado en una mutante, en relación con la media del valor obtenido de la movilización de calcio intracelular de la misma mutante.

5.7. Análisis de la activación de ERK1/2 por las mutantes del receptor α_{1D} -AR

Después de evaluar el incremento de calcio intracelular, investigamos otra vía de señalización activada por el receptor α_{1D} -AR. Para lograr dicho objetivo, evaluamos la activación de ERK1/2 en condiciones basales, a los 2, 5, 15, 30 y 60 minutos de estimulación con 10 μM de NA. Como se ilustra en la figura 19, el receptor ΔN muestra un rápido incremento en la fosforilación de ERK1/2 a los 5 y 15 minutos, posteriormente, dicha fosforilación disminuye a los 30 y 60 minutos de estimulación, alcanzando niveles similares

al de las condiciones basales. Por otro lado, el resto de las mutantes del receptor α_{1D} -AR muestran también un rápido incremento en la fosforilación de ERK1/2, sin embargo, dicha actividad se mantiene hasta los 60 minutos de estimulación. Los Western-Blots representativos de p-ERK1/2 y t-ERK1/2 de cada mutante se presentan en la figura 19.

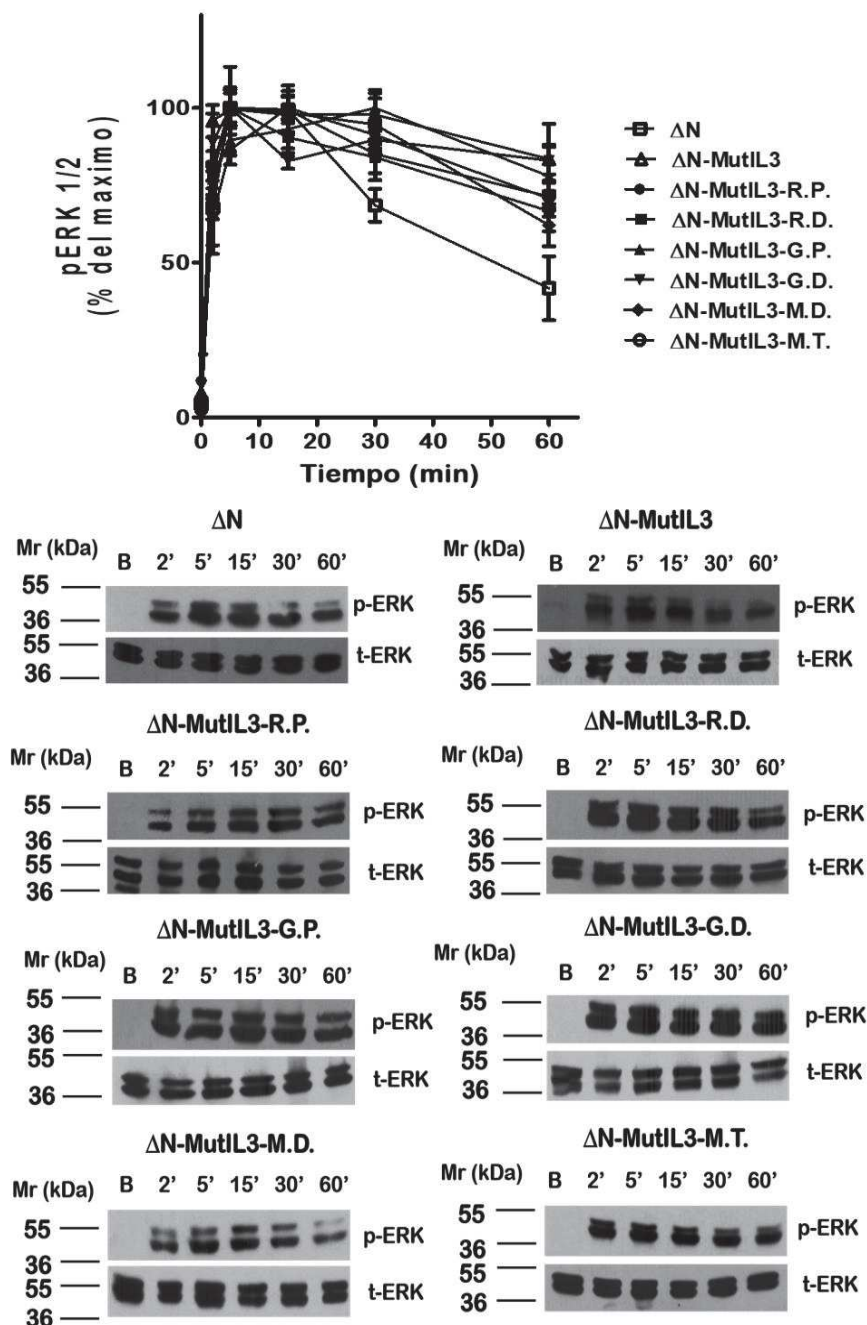


Figura 19: Curso temporal de activación de ERK1/2 inducido por NA en las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR. Las células que expresan las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR fueron estimuladas con $10 \mu\text{M}$ de NA en los tiempos indicados, y la fosforilación de ERK1/2 fue determinada. Las líneas trazadas representan la media y las líneas verticales representan el S.E.M. de al menos 4 experimentos independientes. Los Western-Blot representativos de p-ERK y t-ERK son presentados debajo de la gráfica.

5.8. Evaluación de los diferentes componentes que regulan la actividad de ERK1/2 inducida por el receptor α_{1D} -AR

Además de evaluar la activación de ERK1/2 por las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR, exploramos los elementos que regulan esta vía de señalización usando las células que expresan el receptor ΔN como modelo. Primero, evaluamos si la fosforilación de ERK1/2 es

regulada por PKC y GRK2. La figura 20A-B muestra que cuando las células fueron pre-tratadas con 1 μ M de bisindolylmaleimida I (BIM-I) (inhibidor de amplio espectro de isoformas de PKC) por 15 minutos, o transfectadas con una dominante negativa de GRK2 (DN-GRK2), los niveles de fosforilación de ERK1/2 en respuesta a NA disminuyen parcialmente a los 5 y 60 de estimulación.

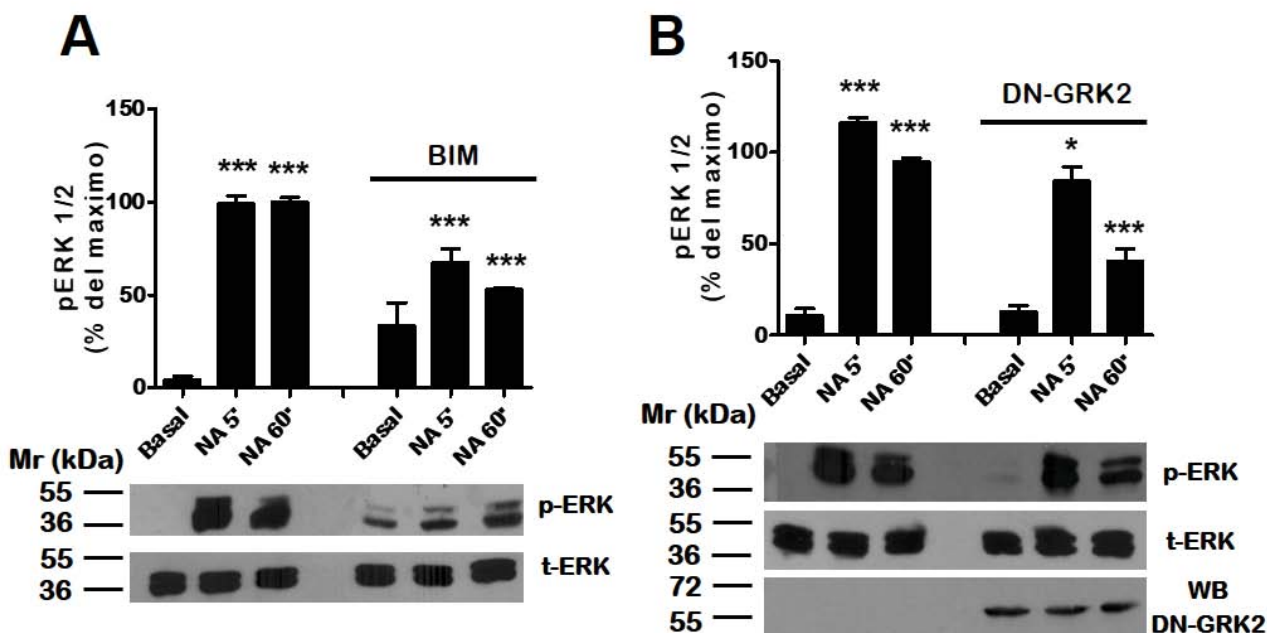


Figura 20: Regulación de la actividad de ERK1/2 por la actividad de PKC y GRK2 en las células que expresan el receptor Δ N. Panel A-B: Las células fueron pre-tratadas con 1 μ M de BIM-I o transfectadas con la dominante negativa de GRK2 (DN-GRK2) y posteriormente estimuladas con 10 μ M de NA en los tiempos establecidos. Las líneas trazadas representan la media y las líneas verticales representan el S.E.M. de al menos 3 experimentos independientes. * p <0.05 vs Basal o NA. Los Western-Blot representativos de p-ERK y t-ERK son presentados debajo de cada gráfica. Igualmente, los Western-Blots de la sobre-expresión de GRK2 son presentados de debajo de la gráfica.

Igualmente, evaluamos la posibilidad de que la transactivación del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) por el receptor α_{1D} -AR, pudiera contribuir a la activación de ERK1/2. La figura 21A muestra que en células que expresan el receptor Δ N y que son estimuladas con 100 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) durante 15 minutos, se detectó un incremento en la fosforilación de ERK1/2. Además, se pre-incubaron a las células con 10 μ M de AG1478 (inhibidor específico de la cinasa del EGFR) por 30 minutos y posteriormente, se estimularon las células con EGF, lo cual resultó en un decremento importante en la fosforilación de ERK1/2. Así mismo, se estimularon las células con 10 μ M de NA por 15 minutos, detectándose un incremento importante en la fosforilación de ERK1/2. Sin embargo, dicha fosforilación fue inhibida cuando las células fueron pre-tratadas con AG1478 y posteriormente estimuladas con NA.

Por otro lado, actualmente se sabe que la fosforilación y activación de ERK1/2 puede depender de la unión de las β -arrestinas 1/2 al receptor, formando el complejo multi-proteico GPCR/ β -arrestina/ERK1/2 (Carmona-Rosas et al., 2018) (*Información respecto a la formación de este complejo, puede ser consultada en el anexo 4*). Para explorar la formación de dicho complejo multi-proteico, bloqueamos la expresión de las β -arrestinas 1/2 con pequeños RNAs de interferencia (siRNAs). La figura 21B muestra un incremento en los niveles de fosforilación de ERK1/2 cuando las células que expresan el receptor ΔN son estimuladas con NA a los 5 y 60 minutos. Posteriormente, un siRNA "scramble" fue probado en la misma línea celular, sin diferencias observables en la fosforilación de dichas cinasas. Sin embargo, cuando se bloqueó la expresión de las β -arrestinas 1/2, se observó un decremento significativo en la activación de ERK1/2 a los 5 y 60 minutos de estimulación con NA. Confirmamos los bajos niveles de expresión de las β -arrestinas 1/2 por Western-Blot.

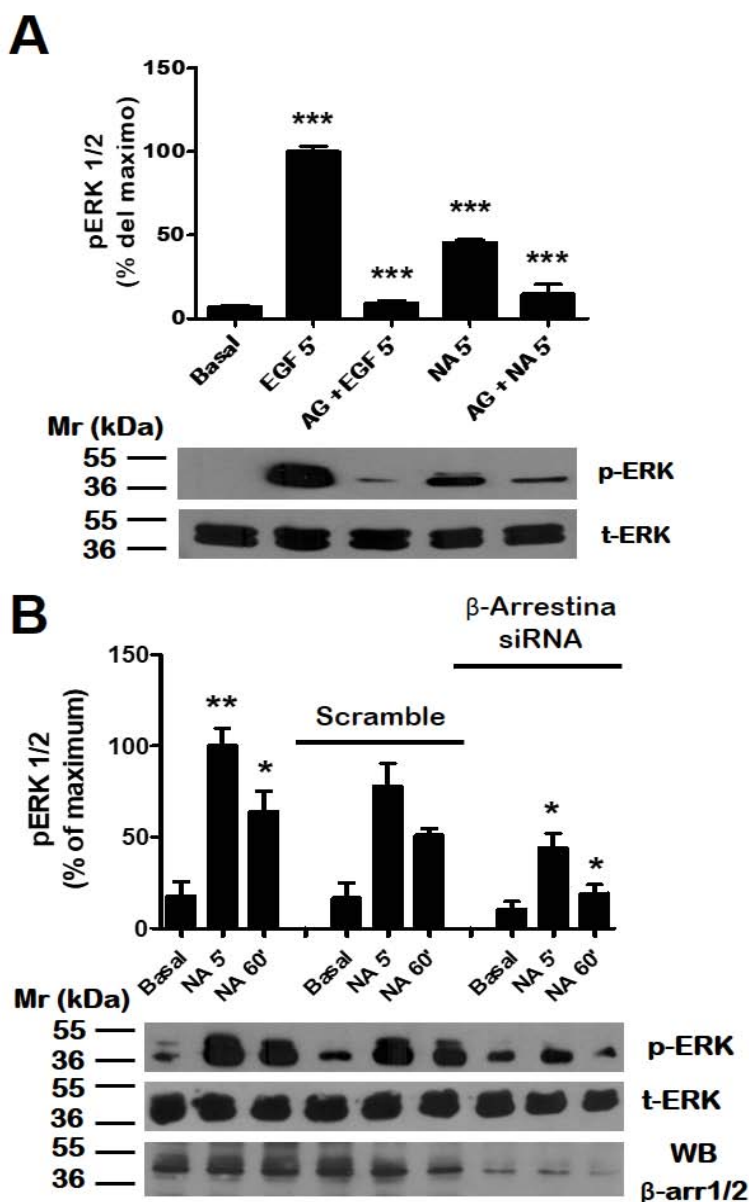


Figura 21: Regulación de la actividad de ERK1/2 por la transactivación del EGFR y la expresión de las β -arrestinas 1/2 en las células que expresan el receptor ΔN . Panel A: Las células fueron pre-tratadas en la presencia o ausencia de 10 μ M de AG1478 y después estimuladas con 100 ng/ml de EGF o 10 μ M de NA en los tiempos indicados. Panel B: La expresión de β -arrestina 1/2 fue bloqueada usando siRNAs específicos. Adicionalmente, un siRNA "scramble" fue transfectedo. Las células fueron estimuladas con 10 μ M de NA en los tiempos establecidos. Las líneas trazadas representan la media y las líneas verticales representan el S.E.M. de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs Basal o NA. Los Western-Blot representativos de p-ERK y t-ERK son presentados debajo de cada gráfica. Igualmente, los Western-Blots de la inhibición de la expresión de β -arrestina1/2 son presentados de debajo de la gráfica.

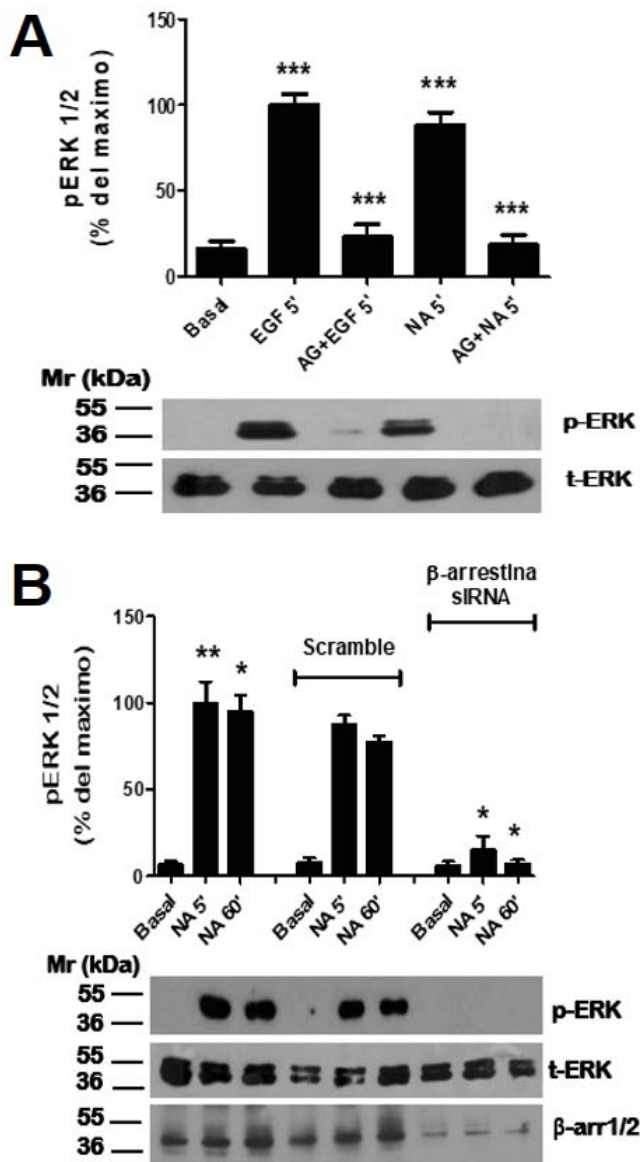


Figura 22: Regulación de la actividad de ERK1/2 por la transactivación del EGFR y la expresión de las β -arrestinas 1/2 en las células que expresan la mutante Δ N-MutL3-M.T. Panel A: Las células fueron pre-tratadas en la presencia o ausencia de 10 μ M de AG1478 y después estimuladas con 100 ng/ml de EGF o 10 μ M de NA en los tiempos indicados. Panel B: La expresión de β -arrestina 1/2 fue bloqueada usando siRNAs específicos. Adicionalmente, un siRNA "scramble" fue transfectado. Las células fueron estimuladas con 10 μ M de NA en los tiempos establecidos. Las líneas trazadas representan la media y las líneas verticales representan el S.E.M. de al menos 3 experimentos independientes. * p <0.05 vs Basal o NA. Los Western-Blot representativos de p-ERK y t-ERK son presentados debajo de cada gráfica. Igualmente, los Western-Blots de la inhibición de la expresión de β -arrestina1/2 son presentados de debajo de la gráfica.

Para comprobar que el receptor α_{1D} -AR, a pesar de no tener sitios potencialmente fosforilables, tiene la capacidad de activar ERK1/2 mediante la transactivación del EGFR y del reclutamiento de las β -arrestinas 1/2, evaluamos la activación de la mutante Δ N-MutL3-M.T. en respuesta a la estimulación con NA, siguiendo el mismo protocolo empleado en la figura 21A y 21B. La figura 22A muestra que la transactivación del EGFR por la mutante Δ N-MutL3-M.T., resulta en una activación total de ERK1/2. Sin embargo, dicha respuesta disminuye de forma significativa cuando la cinasa del EGFR es inhibida con AG1478, y la mutante Δ N-MutL3-M.T. es posteriormente estimulada con NA durante 5 minutos.

La capacidad de la mutante Δ N-MutL3-M.T. para formar el complejo multi-proteico GPCR/ β -arrestina/ERK1/2, fue comprobada mediante el bloqueo de la expresión de las β -arrestinas 1/2 en aquellas células que expresan dicha mutante. La figura 22B muestra que el uso de siRNAs específicos para bloquear ambas proteínas de andamiaje, resulta en una disminución total en la activación de ERK1/2 a los 5 y 60 minutos de estimulación con NA. Confirmamos los bajos niveles de expresión de las β -arrestinas 1/2 por Western-Blot.

En conclusión, nuestros datos sugieren que la transactivación de EGFR por el receptor α_{1D} -AR, la actividad de PKC, GRK2, así como la expresión de las β -arrestinas 1/2, regulan de manera parcial la vía de señalización de ERK1/2

5.9. Internalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR en respuesta a NA y PMA

Posteriormente, evaluamos la internalización del receptor α_{1D} -AR a los 5, 15, 30 y 60 minutos de estimulación con 10 μ M de NA y 1 μ M de PMA. Para lograr dicho fin, tomamos en cuenta únicamente aquellas mutantes que se expresan en la membrana plasmática en condiciones basales. Como se muestra en la figura 23A, las células que expresan el receptor Δ N fueron estimuladas con NA, observándose un aumento de fluorescencia intracelular a los 5 y 15 minutos, sin embargo, dicha señal regresó a niveles basales a los 60 minutos de estimulación. Por otro lado, las células que expresan la mutante Δ N-MutL3 mostraron altos niveles de fluorescencia intracelular durante los 60 minutos de estimulación. Cuando las células que expresan las mutantes Δ N-MutL3-R.P. y Δ N-MutL3-R.D. fueron estimuladas con NA, la cinética de internalización de los receptores fue similar en comparación con el receptor Δ N, es decir, se detectó un incremento en la fluorescencia intracelular a los 5 y 15 minutos y un decremento parcial de dicha señal a los 30 y 60 minutos de estimulación. La figura 23B muestra las imágenes representativas del perfil de internalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR cuando estas son estimuladas con NA.

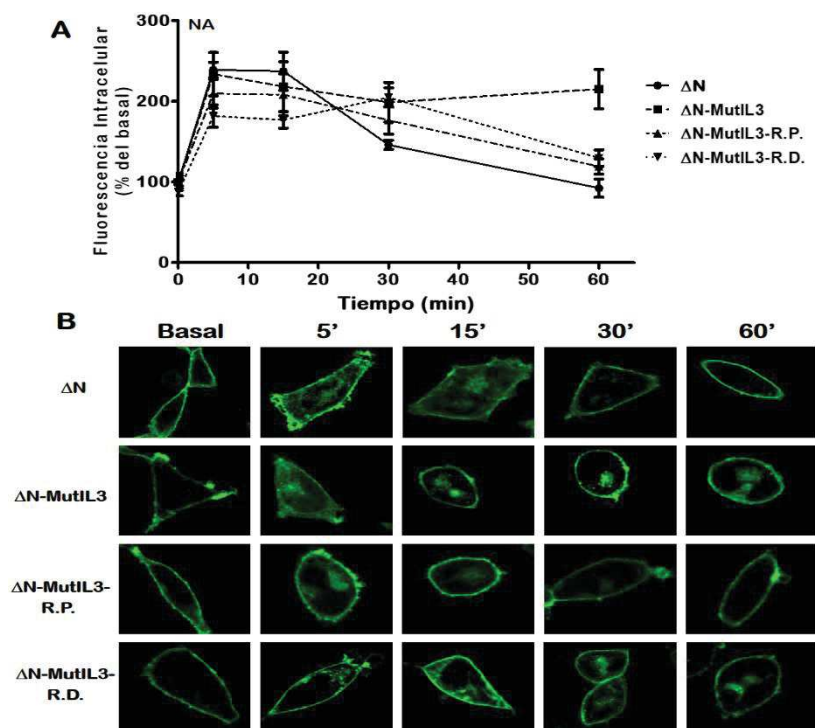


Figura 23: Curso temporal de internalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR inducido por la estimulación con NA. Panel A: Acumulación de fluorescencia intracelular en respuesta a 10 μ M de NA en las células que expresan el receptor Δ N y las mutantes Δ N-MutL3, Δ N-MutL3-R.P. y Δ N-MutL3-R.D. Las líneas trazadas representan la media y las líneas verticales representan el S.E.M. de al menos 7 experimentos independientes en los cuales de 3-5 células fueron analizadas (n=20-35). Panel B: Imágenes representativas de la internalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR en respuesta a 10 μ M de NA.

Por otro lado, evaluamos la cinética de internalización de las mutantes previamente descritas estimulando a las células con PMA. Como se muestra en la figura 24A, el receptor ΔN permanece en la membrana plasmática a los 5 y 15 minutos de estimulación, posteriormente, es internalizado a los 30 y 60 minutos. Las mutantes ΔN -MutIL3, ΔN -MutIL3-R.P. y ΔN -MutIL3-R.D. tienen un perfil inicial de internalización similar, es decir, son parcialmente internalizadas a los 5 y 15 minutos de estimulación, y posteriormente la fluorescencia intracelular disminuye. La figura 24B muestra las imágenes representativas del perfil de internalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR cuando las células en las cuales se encuentran expresadas son estimuladas con PMA.

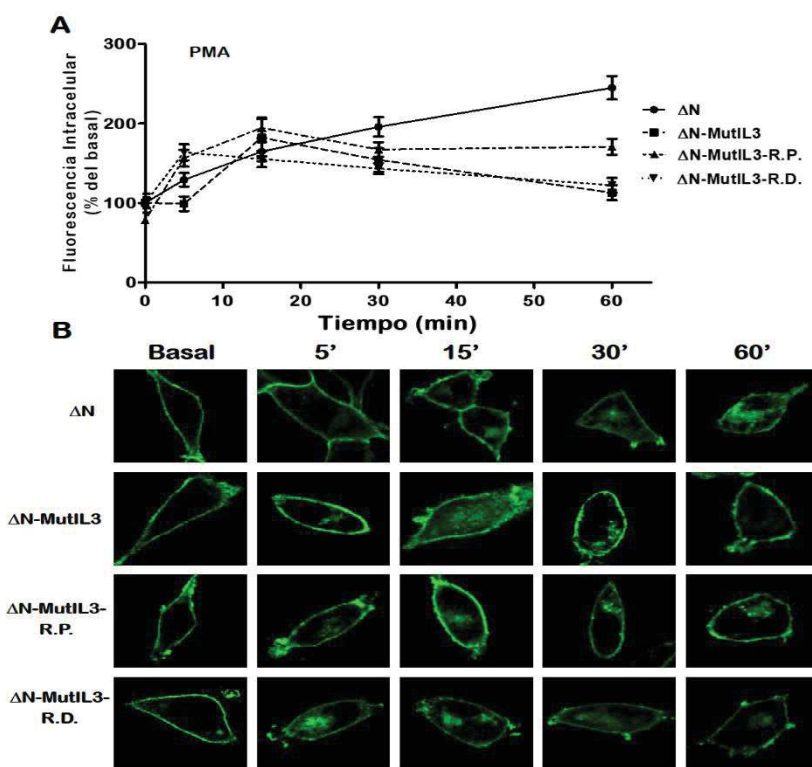


Figura 24: Curso temporal de internalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR inducido por la estimulación con PMA. Panel A: Acumulación de fluorescencia intracelular en respuesta a 1 μ M de PMA en las células que expresan el receptor ΔN y las mutantes ΔN -MutIL3, ΔN -MutIL3-R.P. y ΔN -MutIL3-R.D. Las líneas trazadas representan la media y las líneas verticales representan el S.E.M. de al menos 7 experimentos independientes en los cuales de 3-5 células fueron analizadas (n=20-35). Panel B: Imágenes representativas de la internalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR en respuesta a 1 μ M de PMA.

5.10. Internalización de las mutantes fosfo-miméticas del receptor α_{1D} -AR en respuesta a NA y PMA

Después de haber evaluado el perfil de internalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR, evaluamos el perfil de internalización de las mutantes con ácido aspártico que se encuentran localizadas en la membrana plasmática, es decir, la mutante ΔN -MutIL3-G.D. Asp y ΔN -MutIL3-M.T. Asp., en respuesta a NA y PMA. Como se muestra en la figura 25A, la mutante ΔN -MutIL3-G.D. Asp muestra un perfil de internalización parcial desde los 5 hasta los 60 minutos de estimulación con NA. Por otro lado, la mutante ΔN -MutIL3-M.T. Asp., muestra un perfil de internalización similar, pero con niveles de fluorescencia

intracelular más elevados. La figura 25B muestra las imágenes representativas del perfil de internalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR con ácido aspártico cuando estas son estimuladas con NA.

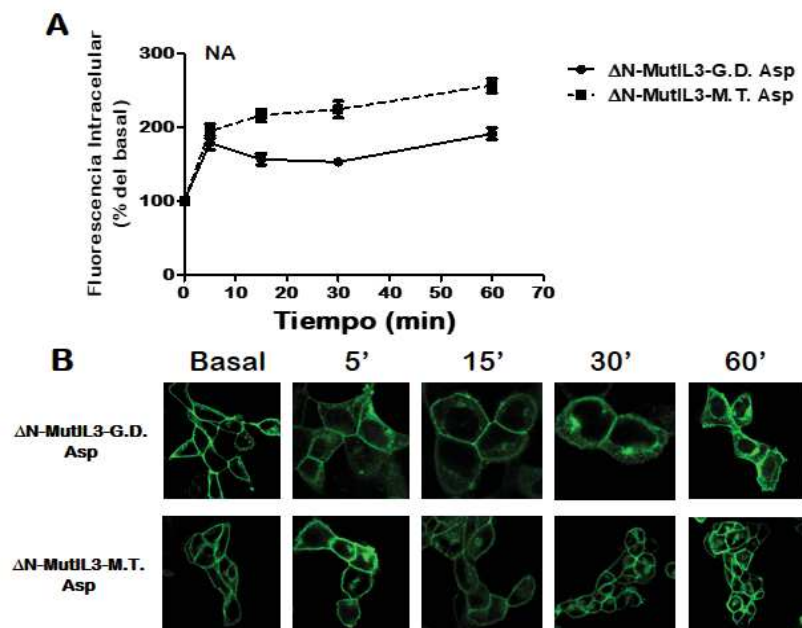


Figura 25: Curso temporal de internalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR con ácido aspártico inducido por la estimulación con NA. Panel A: Acumulación de fluorescencia intracelular en respuesta a 10 μ M de NA en las células que expresan las mutantes ΔN -MutIL3-G.D. Asp y ΔN -MutIL3-M.T. Asp. Las líneas trazadas representan la media y las líneas verticales representan el S.E.M. de al menos 7 experimentos independientes en los cuales de 3-5 células fueron analizadas (n=20-35). Panel B: Imágenes representativas de la internalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR en respuesta a 10 μ M de NA.

Posteriormente, evaluamos el perfil de internalización de las mutantes previamente descritas estimulando a las células con PMA. Como se muestra en la figura 26A, la mutante ΔN -MutIL3-G.D. Asp muestra un nivel de internalización parcial únicamente a los 30 minutos de estimulación, mientras que la mutante ΔN -MutIL3-M.T. Asp muestra un perfil de internalización más elevado desde los 5 hasta los 60 minutos de estimulación. La figura 26B muestra las imágenes representativas del perfil de internalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR con ácido aspártico cuando las células en las cuales se encuentran expresadas son estimuladas con PMA.

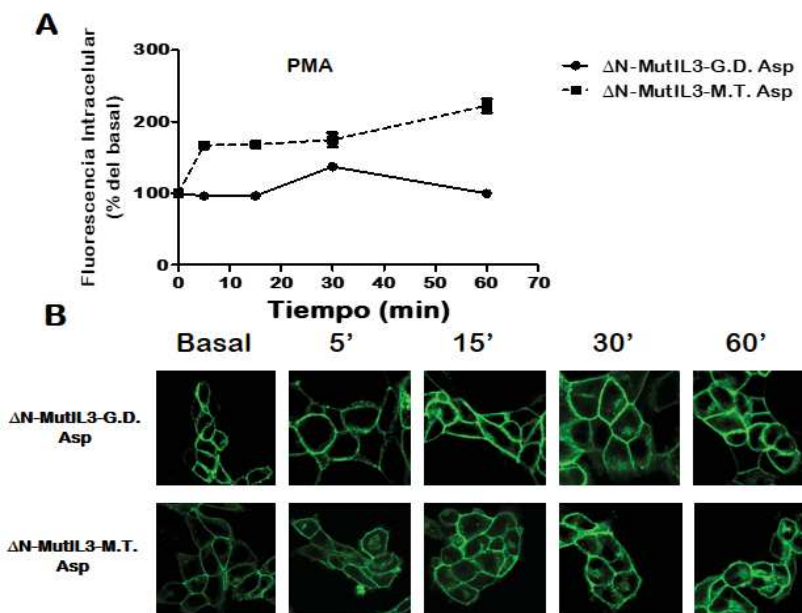


Figura 26: Curso temporal de internalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR con ácido aspártico inducido por la estimulación con PMA. Panel A: Acumulación de fluorescencia intracelular en respuesta a 1 μ M de PMA en las células que expresan las mutantes ΔN -MutIL3-G.D. Asp y ΔN -MutIL3-M.T. Asp. Las líneas trazadas representan la media y las líneas verticales representan el S.E.M. de al menos 7 experimentos independientes en los cuales de 3-5 células fueron analizadas (n=20-35). Panel B: Imágenes representativas de la internalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR en respuesta a 1 μ M de PMA.

5.11. Análisis del reclutamiento de las β -arrestinas 1/2 endógenas por las mutantes del receptor α_{1D} -AR

Las β -arrestinas son proteínas de andamiaje que son conocidas por unirse a GPCRs activados por su ligando. Este proceso permite que los GPCRs puedan seguir señalizando mientras se encuentran internalizados en endosomas, el cual es un proceso dependiente de β -arrestinas (Shenoy & Lefkowitz, 2005; Sudha et al., 2011). Por lo tanto, evaluamos la unión de las β -arrestinas 1/2 endógenas con aquellas mutantes del receptor α_{1D} -AR que se encuentran localizadas en la membrana plasmática, tomando en consideración el tiempo en el cual cada mutante se encuentra totalmente internalizada cuando las células son estimuladas con NA y PMA. Como se muestra en la figura 27A, cuando las células son tratadas con los compuestos previamente mencionados, el receptor ΔN y las mutantes ΔN -MutIL3 y ΔN -MutIL3-R.D., se unen a las β -arrestinas 1/2. Es importante mencionar que en condiciones basales, todas las mutantes colocalizan con las β -arrestinas 1/2, aunque en un menor grado. Sin embargo, la mutante ΔN -MutIL3-R.P. es incapaz de colocalizar con las β -arrestinas 1/2 en mayor medida respecto a las condiciones basales cuando las células son estimuladas con NA y PMA. Las imágenes representativas de la interacción de cada mutante del receptor α_{1D} -AR con las β -arrestinas 1/2 endógenas bajo las condiciones de estimulación previamente mencionadas, son presentadas en la figura 27B. Por otro lado, se intentó evaluar la interacción del resto de las mutantes del receptor α_{1D} -AR que se encuentran internalizadas con las β -arrestinas 1/2, sin embargo, no se detectó ningún grado de colocalización entre dichas proteínas.

5.12. Análisis del reclutamiento de las β -arrestinas 1/2 endógenas por las mutantes fosfo-miméticas del receptor α_{1D} -AR

Después de haber examinado el reclutamiento de las β -arrestinas 1/2 hacia las mutantes del receptor α_{1D} -AR, evaluamos el reclutamiento de dichas proteínas de andamiaje a las mutantes del receptor α_{1D} -AR con ácido aspártico localizadas en la membrana plasmática, y bajo las mismas condiciones de estimulación previamente descritas. La figura 28A muestra que la mutante ΔN -MutIL3-G.D. Asp colocaliza de manera parcial con las β -arrestinas 1/2 cuando las células son estimuladas con NA, pero no cuando son estimuladas con PMA. Por otro lado, la mutante ΔN -MutIL3-M.T. Asp colocaliza parcialmente con las β -arrestinas 1/2 cuando las células son estimuladas con NA y PMA. Las imágenes representativas de la interacción de cada mutante del receptor α_{1D} -AR con las β -arrestinas

1/2 endógenas bajo las condiciones de estimulación previamente mencionadas, son presentadas en la figura 28B.

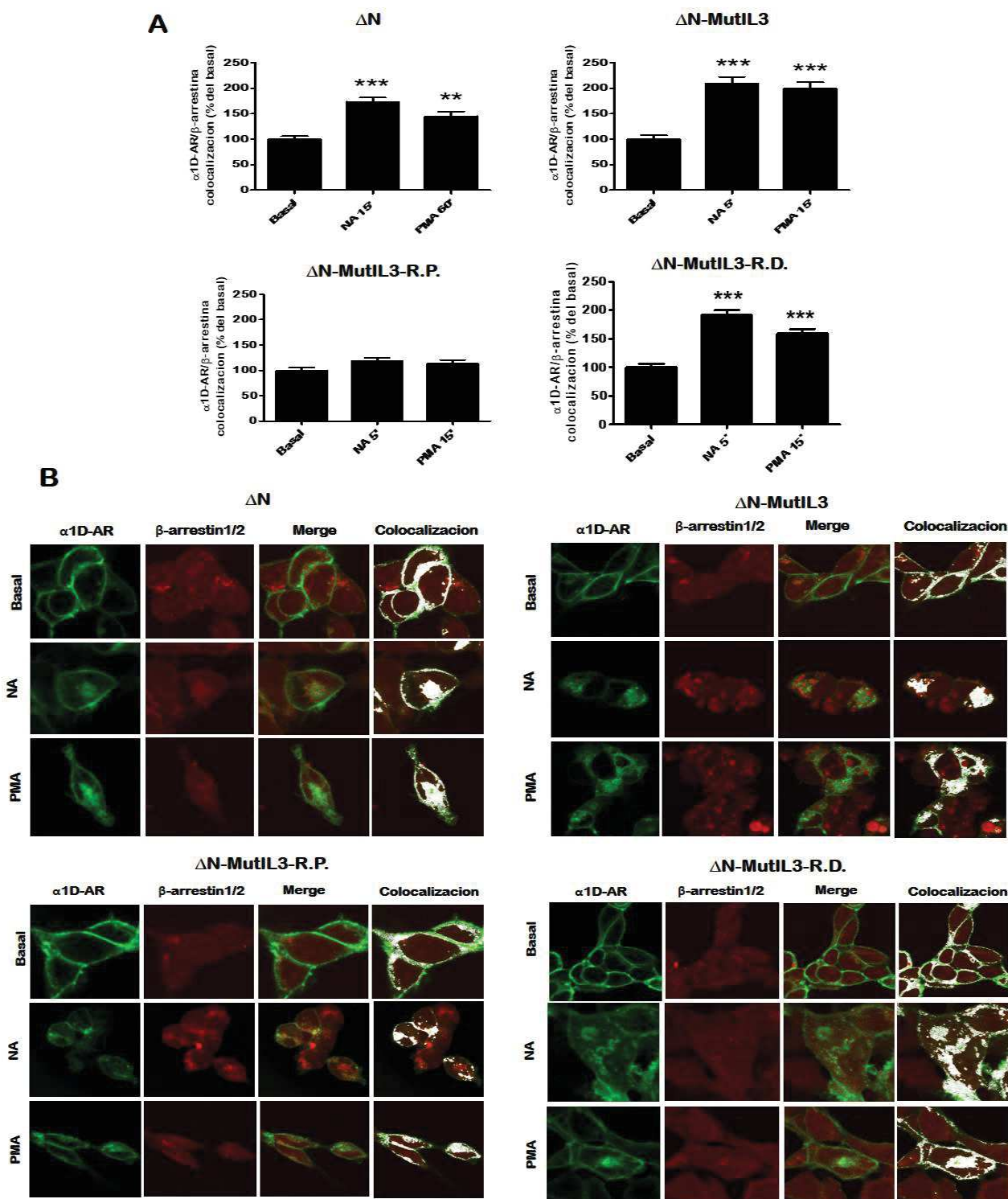


Figura 27: Colocalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR con las β -arrestinas 1/2 endógenas. Panel A: Las células que expresan el receptor ΔN y las mutantes ΔN -MutL3, ΔN -MutL3-R.P. y ΔN -MutL3-R.D. fueron estimuladas con 10 μM de NA o 1 μM de PMA en los tiempos en los cuales cada mutante muestra un mayor nivel de internalización. Las líneas trazadas representan la media y las líneas verticales representan el S.E.M. de al menos 7 experimentos independientes en los cuales de 3-5 células fueron analizadas (n=20-35). * $p < 0.05$ vs Basal. Panel B: Las imágenes representativas de las mutantes del receptor α_{1D} -AR (canal verde), las β -arrestinas 1/2 (canal rojo), el merge (merge) y la colocalización (colocalización) son presentadas.

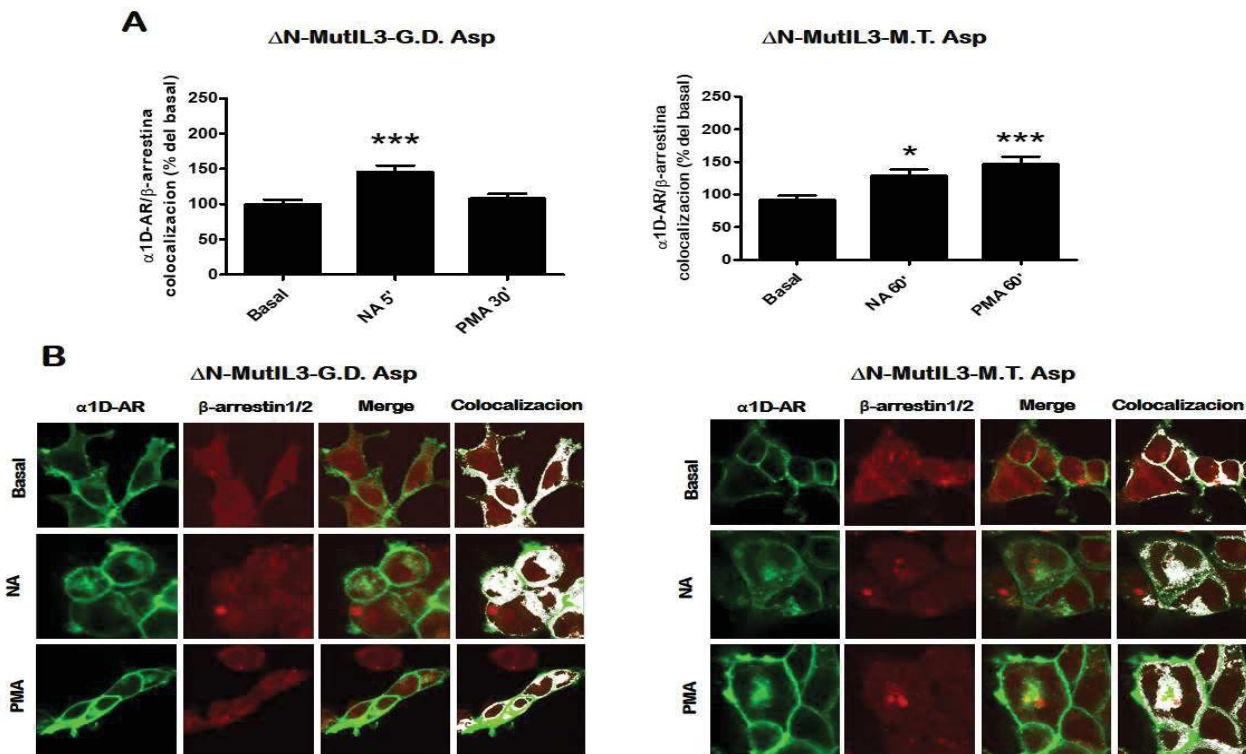


Figura 28: Colocalización de las mutantes del receptor α_{1D} -AR con ácido aspártico con las β -arrestinas 1/2 endógenas. Panel A: Las células que expresan las mutantes ΔN -MutIL3-G.D. Asp y ΔN -MutIL3-M.T. Asp fueron estimuladas con 10 μM de NA o 1 μM de PMA en los tiempos en los cuales cada mutante muestra un mayor nivel de internalización. Las líneas trazadas representan la media y las líneas verticales representan el S.E.M. de al menos 7 experimentos independientes en los cuales de 3-5 células fueron analizadas (n=20-35). * $p < 0.05$ vs Basal. Panel B: Las imágenes representativas de las mutantes del receptor α_{1D} -adrenérgico (canal verde), las β -arrestinas 1/2 (canal rojo), el merge (merge) y la colocalización (colocalización) son presentadas.

Finalmente, la tabla 2 resume las características principales de cada mutante del receptor α_{1D} -AR, su localización subcelular en condiciones basales, su proceso de reciclamiento o degradación posterior a la estimulación con NA o PMA, su interacción con las β -arrestinas 1/2 endógenas, su capacidad de activar ERK1/2 e incrementar los niveles de calcio intracelular, así como sus niveles de fosforilación.

Mutante del Receptor α_{1D} -adrenérgico	Localización subcelular	Reciclamiento o proceso de degradación		Colocalización con β -arrestinas 1/2		Activación de ERK1/2	Incremento de calcio intracelular	Fosforilación	
		NA	PMA	NA	PMA			NA	PMA
ΔN	Membrana plasmática	Completo	Permanece en citoplasma	✓	✓	Disminuye a los 30 y 60 minutos	Total	Total	Total
ΔN -MutL3	Membrana plasmática	Permanece en citoplasma	Parcial	✓	✓	Sostenida	Parcial	Parcial	Parcial
ΔN -MutL3- $\Delta R.P.$	Membrana plasmática	Completo	Parcial	X	X	Sostenida	Mínimo	Parcial	Parcial
ΔN -MutL3- $\Delta R.D.$	Membrana plasmática	Parcial	Parcial	✓	✓	Sostenida	Mínimo	Parcial	Mínimo
ΔN -MutL3- $\Delta G.P.$	Citoplasma	-	-	-	-	Sostenida	Mínimo	Parcial	Mínimo
ΔN -MutL3- $\Delta G.D.$	Citoplasma	-	-	-	-	Sostenida	Mínimo	Mínimo	Mínimo
ΔN -MutL3- $\Delta M.D.$	Citoplasma	-	-	-	-	Sostenida	Mínimo	Mínimo	Mínimo
ΔN -MutL3- $\Delta M.T.$	Citoplasma	-	-	-	-	Sostenida	Mínimo	Mínimo	Mínimo
ΔN - ΔC	Citoplasma	-	-	-	-	Sostenida*	Total	Parcial*	Parcial*
ΔN -MutL3- ΔC	Citoplasma	-	-	-	-	Sostenida*	Mínimo	Nulo*	Nulo*
ΔN -MutL3- $\Delta G.P.$ Asp	Citoplasma	-	-	-	-	-	Parcial	Mínimo	Mínimo
ΔN -MutL3- $\Delta G.D.$ Asp	Membrana plasmática	-	-	-	-	-	Total	Parcial	Mínimo
ΔN -MutL3- $\Delta M.T.$ Asp	Membrana plasmática	-	-	-	-	-	Total	Parcial	Parcial

Tabla 2: Resumen de las características principales de las mutantes del receptor α_{1D} -AR. Se presenta la localización subcelular de cada una de las mutantes del receptor α_{1D} -AR en condiciones basales, el proceso al cual son sometidas después de que las células son estimuladas con NA o PMA, su interacción con las β -arrestinas 1/2 endógenas (debido a la fosforilación del receptor), su capacidad para activar ERK1/2, así como para incrementar los niveles de calcio intracelular, y los niveles de fosforilación que presentan (valores arbitrarios). *Resultados previamente reportados (Marco-Alfonzo et al., 2018). Simbología: (✓): Colocalización con β -arrestinas 1/2. (X): Ausencia de colocalización con β -arrestinas 1/2. (-): Ensayos experimentales no realizados.

Capítulo VI

Discusión

6.1. Generalidades

La fosforilación de GPCRs ha sido principalmente asociada al proceso de desensibilización de tales receptores. Es ahora claro que dicha fosforilación regula no solamente el desacoplamiento del receptor de la proteína G, sino también la asociación del receptor con numerosas proteínas de señalización intracelular, principalmente a través del reclutamiento de las β -arrestinas 1/2 (Shenoy & Lefkowitz, 2005). Adicionalmente, el uso de mutagénesis dirigida, estudios bioquímicos, espectrometría de masas, así como el uso de fosfoanticuerpos específicos, han establecido que los GPCRs son ampliamente fosforilados y que la combinación de los sitios de fosforilación representa un “código de fosforilación”, el cual determina la señalización intracelular de un receptor específico (Prihandoko, et al., 2015). La significancia biológica de este proceso ha sido indicada por diversos estudios que han demostrado que diferentes subtipos de GPCRs pueden ser diferencialmente fosforilados dependiendo del tejido en el cual se encuentren expresados, lo cual sugiere que el código de fosforilación puede ser empleado para regular vías de señalización en tejidos y células específicas. Estos códigos de fosforilación pueden también ser manipulados farmacológicamente, ya que diferentes ligandos son capaces de regular diferentes patrones de fosforilación en GPCRs (Butcher et al., 2011; Alcántara-Hernández et al., 2017). La regulación en la fosforilación de GPCRs por ligandos puede ser uno de los mecanismos por los cuales los ligandos son capaces de dirigir la señalización hacia una vía en vez de otra, es decir, una “señalización sesgada”. Por lo tanto, aunque la fosforilación de GPCRs ha sido sujeto de intensa investigación por varias décadas, es muy probable que el impacto fisiológico y farmacológico de la fosforilación será un tema de estudio por los siguientes años (Prihandoko et al., 2015).

El receptor α_{1D} -AR es conocido por ser un GPCR muy elusivo, cuya expresión, localización subcelular y función, así como su rol en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, han sido poco caracterizados (García-Sáinz & Villalobos-Molina, 2004). La habilidad de diversos agonistas y ésteres de forbol para inducir la fosforilación del receptor α_{1D} -AR y la asociación de este proceso con la desensibilización del receptor, ha sido reportada previamente (García-Sáinz, et al., 2004).

El presente trabajo exploró el rol que tienen los distintos sitios de fosforilación localizados en el extremo carboxilo en la regulación y señalización del receptor α_{1D} -AR. Nuestros resultados muestran que dichos sitios de fosforilación regulan de manera específica el proceso de señalización y localización subcelular de este receptor.

6.2. Las mutantes del receptor α_{1D} -AR se fosforilan en respuesta a NA y PMA

Mediante la técnica de espectrometría de masas, recientemente identificamos la presencia de 6 sitios potencialmente fosforilables en la tercera asa intracelular, así como 9 sitios potencialmente fosforilables en el extremo carboxilo del receptor α_{1D} -AR. Dichos residuos son fosforilados por GRK2 y PKC α/β en respuesta a la estimulación con NA y PMA (Alfonzo-Méndez, et al., 2018). Es importante mencionar que otros residuos fueron detectados en nuestros análisis de espectrometría de masas, sin embargo, el valor Ascore fue muy bajo, descartando en un principio la posibilidad de que dichos residuos fueran totalmente relevantes en la regulación y desensibilización del receptor α_{1D} -AR. Al mismo tiempo, el residuo T441 fue identificado únicamente en uno de los tres ensayos de espectrometría de masas a los cuales fue sometido este receptor, por esta razón, decidimos descartar este residuo en el presente estudio.

El patrón de fosforilación de las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR muestra características distintivas. La fosforilación de todas las mutantes generadas en respuesta a la estimulación con NA y PMA por 15 minutos, fue comparada con el receptor ΔN . Como se muestra en la figura 11, la fosforilación del receptor ΔN se incrementa en aproximadamente el doble, mientras que la fosforilación de la mutante ΔN -MutL3 se incrementa en menor grado ($\approx 50\%$) en respuesta a dichos estímulos. Esto es consistente con la presencia de varios sitios fosforilables en la tercera asa intracelular del receptor α_{1D} -AR. Por otro lado, la fosforilación de la mutante ΔN -MutL3-R.P. fue mucho menor a lo esperado, con un incremento en los niveles de fosforilación de aproximadamente un 10%. Estos resultados ponen en evidencia la importancia del residuo T442 en la fosforilación del receptor α_{1D} -AR. T442 podría estar contribuyendo a regular la fosforilación de los residuos del extremo carboxilo mediante cambios conformacionales de este dominio intracelular que impiden que distintas cinasas catalicen una reacción de fosforilación en los residuos encontrados. Pese a ser una teoría plausible, estudios específicos de biología estructural serán necesarios para evaluar el plegamiento y exposición de residuos fosforilables a lo largo del extremo carboxilo. Sin embargo, la mutante ΔN -MutL3-R.D. muestra un perfil de fosforilación

esperado, es decir, una fosforilación inducida por NA similar a la del receptor ΔN , pero con un nivel de fosforilación parcial inducido por PMA. Esto confirma que S543 es un residuo altamente fosforilable por GRK2 y PKC α/β , lo cual fue reportado en nuestro reciente trabajo de investigación (Alfonzo-Méndez et al., 2018).

Así mismo, en aquellas mutantes cuyos grupos de fosforilación fueron mutados, se observó un patrón de fosforilación parcial, el cual es consistente con la cantidad de residuos mutados en el grupo proximal (3 residuos) y en el grupo distal (4 residuos). La mutante ΔN -MutIL3-G.P. muestra un nivel de fosforilación total inducido por NA, pero un nivel de fosforilación parcial inducido por PMA. Esto confirma los resultados de nuestro análisis de espectrometría de masas, el cual indica que T477, localizado en el grupo proximal, es un residuo altamente fosforilable por GRK2 y PKC α/β , mientras que S486 y S492 son residuos fosforilables únicamente por PKC α/β . Al mismo tiempo, la mutante ΔN -MutIL3-G.D. muestra niveles de fosforilación mucho menores inducidos por NA y PMA respecto al receptor ΔN . Una vez más, esto es consistente con la evidencia de que T507, S515, S516 y S518, son residuos altamente fosforilables tanto por GRK2 como por PKC α/β .

Finalmente, las mutantes ΔN -MutIL3-M.D. y ΔN -MutIL3-M.T. muestran niveles de fosforilación mucho menores respecto al receptor ΔN y a las mutantes previamente estudiadas. Esto confirma que los 9 residuos detectados por espectrometría de masas en el extremo carboxilo, son fosforilados por diversas cinasas. En estas dos últimas mutantes, se puede apreciar una disminución importante y significativa de los niveles basales de fosforilación, lo cual reafirma los reportes previos que indican que el receptor α_{1D} -AR se encuentra fosforilado constitutivamente, mientras que nuestros resultados muestran que son estos residuos en el extremo carboxilo los que se encuentran fosforilados en condiciones basales. Sin embargo, incluso en la mutante ΔN -MutIL3-M.T., aun se pueden apreciar bajos niveles de fosforilación, lo cual es un indicativo de la presencia de más residuos potencialmente fosforilables, aunque dichos residuos fueron detectados por espectrometría de masas y con un valor Ascore muy bajo en comparación con otros residuos. Por lo tanto, los 15 aminoácidos localizados en el receptor del α_{1D} -AR, son sitios altamente fosforilables por proteínas cinasas. Es importante mencionar que en nuestros estudios previos, no detectamos ningún nivel de fosforilación en la mutante ΔN -MutIL3- ΔC en condiciones basales o en respuesta a NA y PMA. Esto, una vez más, plantea la posibilidad de la existencia de residuos no identificados y potencialmente fosforilables localizados a lo largo del extremo carboxilo.

6.3. La fosforilación del grupo distal regula la localización subcelular del receptor α_{1D} -AR

Nuestro análisis de microscopia confocal muestra que las mutantes ΔN , ΔN -MutIL3, ΔN -MutIL3-R.P. y ΔN -MutIL3-R.D., se encuentran localizadas en la membrana plasmática en condiciones basales. La capacidad de estas mutantes de expresarse en la membrana plasmática, está regulada por el corte proteolítico de los primeros 79 aminoácidos del extremo amino del receptor (Hague et al., 2004); dicha mutación ha sido empleada en otros estudios para lograr la expresión de este receptor en la superficie celular (Pupo, et al., 2003; Hague et al., 2004; García-Sáinz et al., 2010; García-Sáinz et al., 2004; Rodríguez-Pérez, et al., 2009; Rodríguez-Pérez, et al., 2009).

Por otro lado, las mutantes ΔN -MutIL3-G.P, ΔN -MutIL3-G.D., ΔN -MutIL3-M.D. y ΔN -MutIL3-M.T., se encuentran localizadas principalmente en vesículas intracelulares en condiciones basales. Esto sugiere que existen residuos tanto en el grupo proximal como en el grupo distal, que regulan la localización subcelular del receptor α_{1D} -AR. Para entender este proceso, debemos recordar que la fosforilación de algunos GPCRs convencionales, como el receptor β_2 -adrenergico, es el proceso mediante el cual el receptor es internalizado en vesículas intracelulares. En el caso del receptor α_{1D} -AR, la mutación a alanina o valina de residuos potencialmente fosforilables en el extremo carboxilo, inducen la internalización del receptor. Esto va en contra del dogma central de internalización de receptores; en otras palabras, hasta este punto de nuestra investigación, sugerimos que además del corte proteolítico de los primeros 79 aminoácidos del extremo amino, la fosforilación de ciertos residuos en el extremo carboxilo, promueve la localización del receptor α_{1D} -AR en la membrana plasmática. Igualmente, las mutantes $\Delta N\Delta C$ y ΔN -MutIL3- ΔC , se encuentran localizadas en vesículas intracelulares en condiciones basales, aunque en mayor proporción, lo cual apoya la teoría de la existencia de elementos estructurales, como residuos ácidos, que regulan de manera indirecta la localización subcelular de diversos GPCRs. Estos resultados confirman que varios residuos localizados en el extremo carboxilo, regulan principalmente la localización subcelular del receptor α_{1D} -AR. El papel que diversos residuos localizados en el extremo carboxilo tienen en la localización subcelular de diversos GPCRs, ha sido demostrado por varios grupos de investigación. Por ejemplo, se han encontrado aminoácidos, secuencias conservadas y regiones hidrofóbicas en el extremo carboxilo de la rodopsina, del receptor β_2 -AR y del receptor α_2C -AR, que

podrían interactuar con elementos de la maquinaria de transporte de proteínas y promover el reciclamiento de dichos receptores hacia la membrana plasmática desde los endosomas, o facilitar su retención en el retículo endoplasmico (Wu, G. 2012).

Una vez obtenidos estos resultados y planteada la hipótesis de que la fosforilación de ciertos residuos localizados en el extremo carboxilo, regulan la expresión del receptor α_{1D} -AR en la membrana plasmática, generamos mutantes fosfo-miméticas de los residuos localizados en ambos grupos de fosforilación, así como de los residuos aislados distribuidos a lo largo del extremo carboxilo. La figura 12C muestra claramente el diseño de dichas mutantes. Cuando se analizó la localización subcelular de la mutante ΔN -MutIL3-G.P. Asp en condiciones basales, se observó que dicha mutante forma agregados en el citoplasma, lo cual descarta la posibilidad de que los 3 residuos localizados en el grupo proximal, regulen la localización subcelular del receptor α_{1D} -AR. Sin embargo, cuando se analizó la mutante ΔN -MutIL3-G.D. Asp en condiciones basales, esta se encuentra localizada en la membrana plasmática, lo cual indica que los cuatro residuos localizados en el grupo distal, favorecen la expresión del receptor α_{1D} -AR en la membrana plasmática. Estos resultados fueron confirmados con la mutante ΔN -MutIL3-M.T. Asp, la cual, al igual que la anterior, se encuentra expresada principalmente en la membrana plasmática. La cuantificación de los niveles de fluorescencia intracelular de cada mutante en condiciones basales se presenta en la figura 13.

Nuestros resultados ponen en duda la idea general que plantea que la fosforilación de los GPCRs induce su internalización en vesículas intracelulares, y abre un nuevo capítulo en el estudio de estas proteínas, el cual sugiere que, al menos para el receptor α_{1D} -AR, la fosforilación de residuos localizados en el extremo carboxilo promueve la expresión de este GPCR en la membrana plasmática. Así mismo, diversos estudios han demostrado la importancia de residuos hidrofóbicos localizados en el extremo carboxilo en la exportación desde el retículo endoplasmico hacia la membrana plasmática de una gran cantidad de GPCRs* (Wu, G. 2015); cambios en la polaridad debido a la fosforilación del extremo carboxilo del receptor α_{1D} -AR, podría contribuir de la misma manera, a su exportación desde diversos compartimentos celulares (como el retículo endoplasmico) hacia la membrana plasmática.

Aunque la cuantificación de fluorescencia intracelular es un indicativo confiable de la cantidad de receptor internalizado, nuestros análisis de colocalización de diversas mutantes del receptor α_{1D} -AR con la membrana plasmática (la cual fue marcada con aglutinina de germen de trigo [Alexa 350]), demuestra que la fosforilación de los residuos localizados en el grupo distal, regulan la localización del receptor α_{1D} -AR en la membrana plasmática. Por el contrario, mutaciones en los residuos localizados en el grupo proximal, así como de T442 y S543, no solo promueve la internalización del receptor en vesículas de clatrina, sino que también impide que dichas mutantes se expresen totalmente en la membrana plasmática. Esto tiene gran relevancia, ya que aunque diversos GPCRs pueden ser internalizados en vesículas de clatrina después de ser estimulados, una gran cantidad de receptores pueden permanecer en la membrana plasmática; sin embargo, el receptor α_{1D} -AR disminuye de forma importante sus niveles de localización en la superficie celular, lo cual es consistente con el grado de colocalización que diversas mutantes tienen con la membrana plasmática.

Respecto a las mutantes Δ N-MutIL3-G.P. Asp, Δ N-MutIL3-G.D. Asp y Δ N-MutIL3-M.T. Asp, estas muestran un nivel de fosforilación menor que el receptor Δ N, cuando son estimuladas con NA y PMA. De especial importancia es el patrón de fosforilación de la mutante Δ N-MutIL3-G.P. Asp, en la cual los niveles de fosforilación son muy bajos, considerando que solo un grupo con tres residuos de aminoácidos potencialmente fosforilables fueron sustituidos por ácido aspártico. Esto cobra relevancia por una razón principal; las sustituciones de residuos en el grupo proximal por ácido aspártico, podrían inducir cambios conformacionales en el extremo carboxilo, lo cual podría impedir la exposición de más residuos que son altamente fosforilables tanto por GRK2 como por PKC α/β . Por otro lado, como se muestra en la figura 15, la mutante Δ N-MutIL3-M.T. Asp muestra niveles de fosforilación parciales, aunque más elevados en comparación con la mutante Δ N-MutIL3-G.P. Asp; esto sugiere nuevamente que existen más residuos fosforilables a lo largo del extremo carboxilo que no fueron detectados consistentemente por espectrometría de masas, o cuyo valor Ascore fue muy bajo para ser considerados.

‡ La función del extremo carboxilo en regular el transporte hacia la membrana plasmática, ha sido descrito para varios GPCRs. Estudios realizados con mutagénesis dirigida en el extremo carboxilo terminal, han permitido la identificación del motivo LL (leucina-leucina), además de otros motivos hidrofóbicos, como el E(x)3LL, FN(x)2LL(x)3L, F(x)3F(x)3F, L(x)3F(x)3F, y Y(x)3F(x)3F. Estos motivos regulan la exportación desde el retículo endoplasmico hacia la membrana plasmática de los receptores α_{1B} -AR y α_{2B} -AR, los receptores de serotonina 5HT1A y 5HT1B, el receptor de dopamina D1, los receptores de vasopresina V2 y V3, así como el receptor para el neuropeptido Y2. Aunque el motivo F(x)6LL y otros motivos hidrofóbicos regulan la exportación desde el retículo endoplasmico, los mecanismos moleculares subyacentes son aún desconocidos. Debido a que estos motivos se encuentran localizados cerca de la región TM, es posible que la mutación de dichos motivos promueva una disrupción en el adecuado plegado del receptor, impidiendo que estos sean capaces de abandonar el retículo endoplasmico y llegar a la membrana plasmática (Wu, G. 2015).

Aunque los residuos de ácido aspártico localizados en el extremo carboxilo del receptor α_{1D} -AR podrían estar contribuyendo a generar cambios conformacionales en dicho dominio intracelular, esta teoría debe ser evaluada mediante técnicas avanzadas de biología estructural. El presente trabajo de investigación no pretende abordar a profundidad este tema, sin embargo, un análisis de modelado de proteínas puede dar indicios acerca de las diferentes conformaciones estructurales de las mutantes fosfo-miméticas del receptor α_{1D} -AR. Mediante el uso del programa SWISS-MODEL[†], evaluamos los posibles cambios conformacionales sufridos por las mutantes Δ N-MutIL3-G.P. Asp, Δ N-MutIL3-G.D. Asp y Δ N-MutIL3-M.T. Asp. La figura 29 muestra ligeros cambios conformacionales en las zonas TM de dichas mutantes en comparación con el receptor Δ N. Sin embargo, la tercera asa intracelular de cada mutante parece adoptar distintas posiciones estructurales y espaciales (modificaciones en la estructura terciaria y plegamiento del dominio intracelular), lo cual podría contribuir a la exposición de más sitios altamente fosforilables por proteínas cinasas. La exposición y fosforilación de estos residuos podría explicar el patrón de fosforilación e internalización de las mutantes Δ N-MutIL3-G.P. Asp, Δ N-MutIL3-G.D. Asp y Δ N-MutIL3-M.T. Asp. en respuesta a NA y PMA.

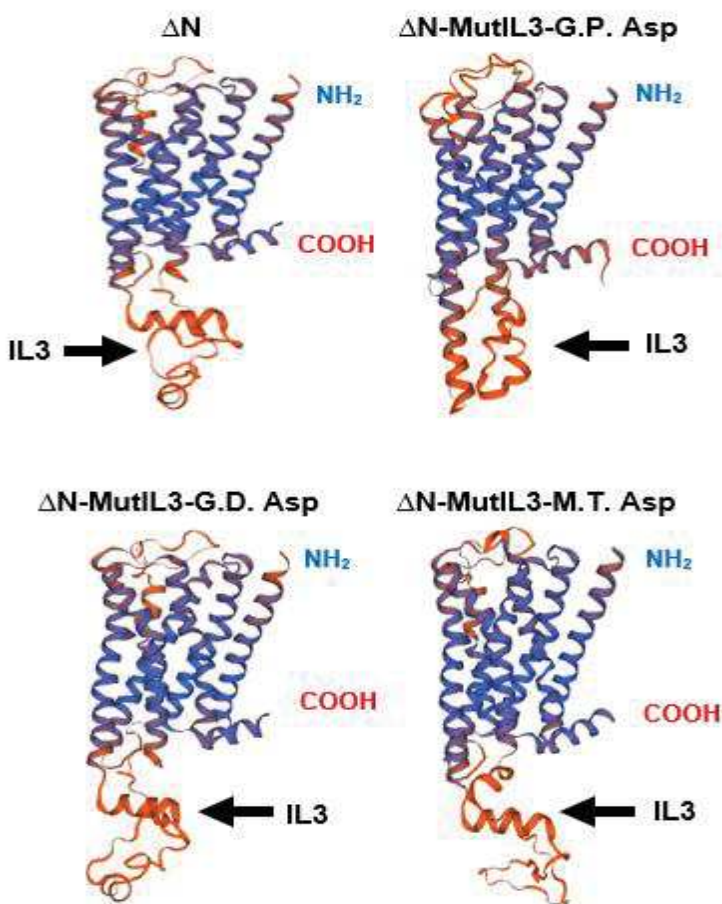


Figura 29: Análisis de modelado de proteínas del receptor Δ N y de las mutantes fosfo-miméticas mediante el programa SWISS-MODEL. Las secuencias de aminoácidos de los cuatro receptores fueron obtenidas y evaluadas mediante el programa SWISS-MODEL. Las predicciones estructurales fueron obtenidas mediante la comparación de las secuencias de los receptores con templados de proteínas previamente cristalizadas (ej. receptor β_2 -AR). El color de la región representa la confiabilidad del modelo en comparación con el templado. (Azul: confiabilidad alta. Rojo: confiabilidad media)

[†] <https://swissmodel.expasy.org/>

Así mismo, la figura 30 muestra que al evaluar exclusivamente el extremo carboxilo terminal de estos cuatro receptores mediante SWISS-MODEL, no se observaron cambios estructurales significativos en ninguno de los modelos. Esto resulta interesante si se considera que las mutaciones del receptor ΔN fueron hechas en el extremo carboxilo terminal, mientras que los posibles cambios conformacionales fueron observados en la tercera asa intercelular. Sin embargo, la posible influencia de los residuos de ácido aspártico localizados en el extremo carboxilo sobre la conformación estructural de la tercera asa intracelular, es un tema que deberá de ser analizado en futuros estudios.

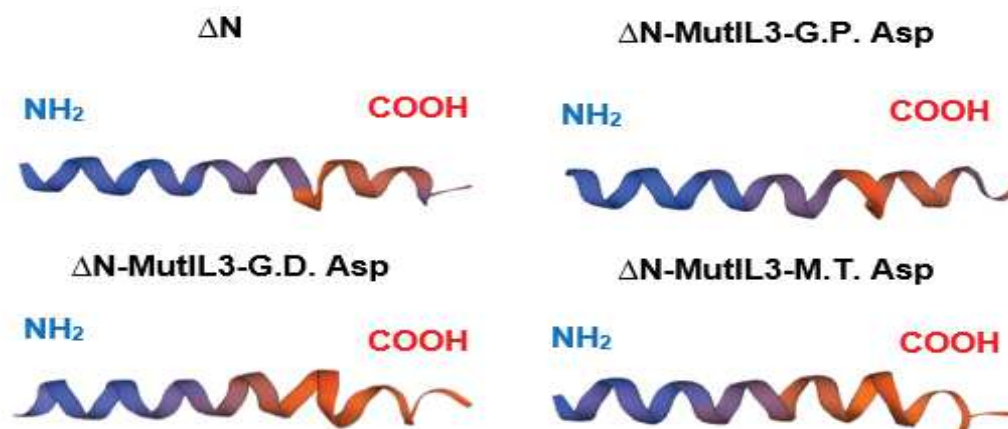


Figura 30: Análisis de modelado de proteínas del extremo carboxilo del receptor ΔN y de las mutantes fosfo-miméticas mediante el programa SWISS-MODEL. Las secuencias de aminoácidos de los cuatro dominios intracelulares fueron obtenidas y evaluadas mediante el programa SWISS-MODEL. Las predicciones estructurales fueron obtenidas mediante la comparación de las secuencias de los receptores con templados de proteínas previamente cristalizadas. El color de la región representa la confiabilidad del modelo en comparación con el templado. (Azul: confiabilidad alta. Rojo: confiabilidad media)

6.4. La tercera asa intracelular y el extremo carboxilo del receptor α_{1D} -AR regulan el incremento de calcio intracelular

Una de las propiedades del receptor α_{1D} -AR es inducir el incremento de calcio intracelular en respuesta a la estimulación con NA. Nuestro estudio evaluó la participación de los sitios de fosforilación localizados en la tercera asa intracelular y en el extremo carboxilo en la activación de esta vía de señalización. La figura 16 muestra que el receptor ΔN tiene la capacidad de incrementar los niveles de calcio intracelular en aproximadamente 130 nM en respuesta a NA. Sin embargo, la mutante ΔN -MutIL3 incrementa los niveles de calcio intracelular de manera parcial (≈ 90 nM). Esto sugiere que los sitios localizados en la tercera asa intracelular podrían regular el acoplamiento del receptor con la proteína $G_{q/11}$, la cual se encarga de activar esta vía de señalización. Estos datos confirman nuestros reportes anteriores (Alfonzo-Méndez et al., 2018). Por otro lado, el incremento de calcio intracelular

por parte de las mutantes ΔN -MutIL3-R.P., ΔN -MutIL3-R.D., ΔN -MutIL3-G.P. y ΔN -MutIL3-G.D. fue notoriamente menor en comparación con el receptor ΔN y la mutante ΔN -MutIL3. Esto indica que los residuos individuales, así como los residuos que se encuentran agrupados en el extremo carboxilo, además de aquellos localizados en la tercera asa intracelular, tienen un papel relevante en el incremento de calcio intracelular inducido por NA. Esto permite plantear la hipótesis de que dichos residuos localizados en el extremo carboxilo, son sitios de unión de la proteína $G_{q/11}$, la cual pierde la capacidad de unirse al receptor cuando estos residuos se encuentran mutados o ausentes. Por otro lado, el incremento de calcio intracelular por parte de las mutantes ΔN -MutIL3-M.D. y ΔN -MutIL3-M.T. confirma los resultados previamente discutidos. En dichas mutantes, la activación de esta vía de señalización es ligeramente menor que las mutantes antes analizadas, lo cual refuerza la hipótesis del papel de los residuos localizados en el extremo carboxilo en el acoplamiento del receptor con la proteína G. Si bien esta hipótesis cobra relevancia y solidez cuando se analizan los datos, la evaluación de la mutante $\Delta N\Delta C$ y ΔN -MutIL3- ΔC sugiere que aunque los sitios del extremo carboxilo son importantes en el acoplamiento del receptor con la proteína G y en el incremento de calcio intracelular, dichos residuos no son indispensables, ya que la mutante $\Delta N\Delta C$ tiene la capacidad de activar esta vía de señalización a niveles similares a los del receptor ΔN . Por el contrario, la mutante ΔN -MutIL3- ΔC muestra un incremento en los niveles de calcio intracelular comparables con la mutante ΔN -MutIL3-M.T., lo cual permite reafirmar la hipótesis de que tanto los residuos localizados en la tercera asa intracelular así como los residuos localizados en el extremo carboxilo, contribuyen al acoplamiento del receptor con la proteína G, sin embargo, los residuos localizados en la tercera asa intracelular son indispensables para dicho acoplamiento, mientras que la ausencia de los residuos localizados en el extremo carboxilo no interfieren con el acoplamiento del receptor con la proteína G; en otras palabras, mientras los residuos localizados en la tercera asa intracelular estén presentes, el receptor α_{1D} -AR puede acoplarse a la proteína $G_{q/11}$.

Por otro lado, el estudio de las mutantes ΔN -MutIL3-G.P. Asp, ΔN -MutIL3-G.D. Asp y ΔN -MutIL3-M.T. Asp, demuestra la funcionalidad de dichos receptores para incrementar los niveles de calcio intracelular. La respuesta parcial de la mutante ΔN -MutIL3-G.P. Asp indica que aunque dicha mutante se encuentra localizada en vesículas intracelulares, una porción de receptores se encuentra expresada en la membrana plasmática, los cuales tienen la capacidad de unirse a la proteína $G_{q/11}$ e incrementar los niveles de calcio intracelular a niveles comparables a la mutante ΔN -MutIL3. Sin embargo, es claro que las

mutantes ΔN -MutIL3-G.D. Asp y ΔN -MutIL3-M.T. Asp son capaces de activar esta vía de señalización debido a su completa localización en la membrana plasmática. Igualmente, estos datos sugieren que la fosforilación de los residuos localizados en el extremo carboxilo en condiciones basales, no solo permiten la localización del receptor α_{1D} -AR en la membrana plasmática, sino también el acoplamiento del receptor con la proteína $G_{q/11}$. Este argumento pone en duda el planteamiento de que la fosforilación de los GPCRs promueve el desacoplamiento de la proteína G del receptor, y por lo tanto, la inhibición de diferentes vías de señalización.

6.5. La tercera asa intracelular y el extremo carboxilo del receptor α_{1D} -AR regulan la activación de ERK1/2

Otra de las vías de señalización activadas por el receptor α_{1D} -AR, es la vía de las MAP cinasas. Nuestro más reciente trabajo de investigación reportó la activación de esta vía de señalización por varias mutantes del receptor α_{1D} -AR, específicamente por el receptor ΔN y las mutantes ΔN -MutIL3, $\Delta N\Delta C$ y ΔN -MutIL3- ΔC (Alfonzo-Méndez et al., 2018). El presente estudio evaluó la participación de los sitios de fosforilación localizados en el extremo carboxilo del receptor α_{1D} -AR en la activación de ERK1/2. La grafica 19 muestra que el receptor ΔN , como ya se había reportado anteriormente, induce la activación de ERK1/2 a los 5 y 15 minutos de estimulación con NA, sin embargo, dicha actividad decae a los 30 y 60 minutos de estimulación. Por el contrario, todas las mutantes generadas del receptor α_{1D} -AR, muestran una activación de esta vía de señalización sostenida hasta los 60 minutos de estimulación con NA. Estos resultados pueden ser sujetos a diversas interpretaciones; la disminución en la actividad de ERK1/2 a los 30 y 60 minutos por parte del receptor ΔN , sugiere que la fosforilación de este receptor atenúa su actividad y por lo tanto, disminuye la actividad de la vía de las MAP cinasas. Por otro lado, la activación sostenida de ERK1/2 por parte de las diversas mutantes del receptor α_{1D} -AR, sugiere que la ausencia de fosforilación en residuos localizados en la tercera asa intracelular así como en el extremo carboxilo, impiden que el receptor α_{1D} -AR disminuya su actividad y por lo tanto, mantenga activa la vía de las MAP cinasas. Adicionalmente, nuestros datos sugieren que aquellas mutantes del receptor α_{1D} -AR que son capaces de activar ERK1/2, pero son incapaces de movilizar calcio intracelular, se comportan como *receptores sesgados*; es decir, son capaces de activar una vía de señalización y no otra. La habilidad de comportarse como receptores sesgados puede deberse a que las mutantes son incapaces de acoplarse a la proteína $G_{q/11}$, misma regula la movilización de calcio intracelular, mientras que las

mismas mutantes reclutan a las β -arrestinas 1/2, las cuales, al mismo tiempo, pueden reclutar y activar ERK1/2, independientemente de la actividad de la proteína G. La formación del complejo multi-proteico GPCR/ β -arrestina/ERK1/2 permite que dicho ensamblaje biológico se comporte como una estructura proteica con la capacidad de señalizar a través de ERK1/2 y fosforilar diversos sustratos citosolicos. Por lo tanto, nuestros datos indican que todas las mutantes generadas del receptor α_{1D} -AR, tienen esta capacidad de ensamblaje y señalización.

6.6. El receptor ΔN activa ERK1/2 a través de la actividad de PKC, GRK2, la transactivación del EGFR y la expresión de las β -arrestinas 1/2

Nuestra investigación extendió el estudio de la vía de señalización de MAP cinasas a los componentes que regulan su actividad, tomando como modelo el receptor ΔN . Es importante mencionar que diversos receptores pueden emplear diferentes componentes intracelulares para promover la activación de ERK1/2, lo cual habla de la capacidad de varias proteínas y cinasas para activar esta vía de señalización.

La figura 20 muestra algunos de los diferentes componentes que median la activación de ERK1/2 por parte del receptor α_{1D} -AR. Por un lado, la activación de ERK1/2 es regulada de forma parcial por la actividad de la PKC y de GRK2 (Figura 20A-B). El nivel de regulación de esta vía por ambas cinasas es desconocido, sin embargo, podemos plantear la hipótesis de que la fosforilación del receptor ΔN por parte de la PKC y de GRK2, promueve el reclutamiento de las β -arrestinas 1/2 hacia el receptor, favoreciendo la formación del complejo GPCR- β -arrestina, el cual, a su vez, pudiera ser capaz de reclutar y activar a ERK1/2. Por otro lado, la transactivación del receptor para EGF por el receptor α_{1D} -AR, muestra que ambos receptores tienen la capacidad de activar esta vía de señalización en conjunto, lo cual fue demostrado inhibiendo al receptor de EGF con un bloqueador específico (AG1478) (Figura 21A). La hipótesis de que el receptor ΔN tiene la capacidad de reclutar a las β -arrestinas para activar ERK1/2 de manera independiente de la proteína G, fue confirmada cuando la expresión de ambas β -arrestinas fue inhibida empleando siRNAs específicos; nuestros resultados mostraron que la actividad de ERK1/2 fue disminuida debido a la ausencia de estas proteínas de andamiaje (Figura 21B). Por lo tanto, el presente estudio sugiere que el receptor α_{1D} -AR tiene la capacidad de formar el complejo multi-proteico GPCR- β -arrestina-ERK1/2, el cual, podría llevar a cabo sus funciones de señalización mientras se encuentra localizado en vesículas intracelulares.

6.7. La mutante Δ N-MutL3-M.T. activa ERK1/2 a través de la transactivación del EGFR y la expresión de las β -arrestinas 1/2

La capacidad del receptor α_{1D} -AR de activar ERK1/2 a través de la transactivación del EGFR y del reclutamiento de las β -arrestinas 1/2, fue evaluada usando a la mutante Δ N-MutL3-M.T. como modelo. Esta mutante carece de sitios de fosforilación en la tercera asa intracelular y el extremo carboxilo, siendo incapaz de acoplarse a su respectiva proteína G, además, carece de la capacidad para movilizar calcio intracelular en respuesta a NA. Sin embargo, como se muestra en la figura 22A, nuestros resultados sugieren que dicha mutante puede transactivar al receptor EGFR para activar ERK1/2; esta acción puede ser llevada a cabo mediante el reclutamiento de las β -arrestinas 1/2 hacia al receptor, aunque el mecanismo de activación del EGFR por parte del complejo GPCR/ β -arrestina, es aún desconocido.

El sensor estructural empleado por las β -arrestinas 1/2 para unirse a receptores activados sin necesidad de ser fosforilados, parece ser un mecanismo compatible con las múltiples funciones del receptor α_{1D} -AR. La activación de la mutante Δ N-MutL3-M.T. parece favorecer el reclutamiento de las β -arrestinas 1/2 hacia al receptor para promover la activación de ERK1/2. La figura 22B demuestra que esta mutante tiene la capacidad de formar el complejo multi-proteico GPCR/ β -arrestina/ERK1/2, a través de los cambios conformacionales detectados por las β -arrestinas. Además, esto sugiere que, a pesar de no acoplarse a su respectiva proteína G y movilizar calcio intracelular, dicha mutante tiene la capacidad de activar otra vía de señalización distinta, lo que la convierte en un receptor sesgado.

6.8. Las mutantes del receptor α_{1D} -AR muestran diferentes patrones de internalización en respuesta a NA y PMA

El análisis de las mutantes del receptor α_{1D} -AR que se encuentran localizadas en la membrana plasmática, sugiere que dichas mutantes tienen diferente cinética de internalización inducida por la estimulación con NA y PMA. Recordemos que aquellas mutantes que se localizan en la membrana plasmática en condiciones basales, son el receptor Δ N, la mutante Δ N-MutL3, Δ N-MutL3-R.P. y Δ N-MutL3-R.D. La figura 23 muestra que, en respuesta a NA, el receptor Δ N se internaliza a los 5 y 15 minutos de estimulación,

posteriormente, a los 30 y 60 minutos es reciclado hacia la membrana plasmática o degradado por lisosomas. Sin embargo, la mutante ΔN -MutIL3 muestra un patrón de internalización sostenido hasta los 60 minutos de estimulación. Estos resultados nos llevan a proponer que los sitios de fosforilación localizados en la tercera asa intracelular, regulan el reciclaje o degradación del receptor α_{1D} -AR en respuesta a NA; además, dichos sitios son potencialmente fosforilables por PKC α/β y GRK2. Este mecanismo de reciclaje o degradación puede deberse a la desfosforilación de dichos residuos por proteínas fosfatasas, permitiendo su reciclaje hacia la membrana plasmática, o a su ubiquitinación después de la estimulación del receptor, lo cual es una señal intracelular que permite su degradación por lisosomas o proteosomas. Por otro lado, las mutantes ΔN -MutIL3-R.P. y ΔN -MutIL3-R.D. muestran un perfil de internalización inducido por NA similar al del receptor ΔN . Nuestros datos sugieren que la ausencia de fosforilación de T442 y S543, compensa la función de los residuos fosforilables localizados en la tercera asa intracelular en el reciclaje o degradación del receptor α_{1D} -AR; en otras palabras, la fosforilación de estos residuos por PKC α/β y GRK2, en ausencia de los residuos fosforilables localizados en la tercera asa intracelular, permite que el receptor α_{1D} -AR se internalice en respuesta a NA.

Por otro lado, evaluamos la cinética de internalización de los receptores previamente mencionados en respuesta a PMA. La figura 24 muestra que el receptor ΔN tiene un patrón de internalización progresivo desde los 5 hasta los 60 minutos de estimulación. Esto quiere decir que el receptor no es procesado para ser degradado por lisosomas o reciclado hacia la membrana plasmática, contrario a los resultados obtenidos cuando el mismo receptor es estimulado con NA (el receptor se internaliza a los 5 y 15 minutos, y posteriormente es reciclado o degradado por lisosomas a los 30 y 60 minutos de estimulación). Nuestros datos también muestran que las mutantes ΔN -MutIL3, ΔN -MutIL3-R.P. y ΔN -MutIL3-R.D., tienen una cinética de internalización similar entre ellas, es decir, se internalizan a los 5 y 15 minutos de estimulación, pero son parcialmente degradadas o recicladas hacia la membrana plasmática a los 30 y 60 minutos. Esto sugiere que los residuos fosforilables localizados en la tercera asa intracelular, así como los residuos proximal y distal localizados en el extremo carboxilo, regulan la internalización del receptor α_{1D} -AR en respuesta a PMA. Todo este conjunto de residuos son potencialmente fosforilables por PKC α/β , lo cual es consistente con la internalización parcial y sostenida del receptor. La hipótesis de degradación o reciclaje de receptores después de ser estimulados, es un tema de investigación que debe de ser estudiado en consecuencia. Sin embargo, nuestro estudio

se limita únicamente a estudiar la cinética de internalización de las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR.

6.9. Las mutantes del receptor α_{1D} -AR con ácido aspártico, muestran diferentes patrones de internalización en respuesta a NA y PMA

Como mencionamos anteriormente, la fosforilación del grupo proximal de residuos localizados en el extremo carboxilo, regula la localización del receptor α_{1D} -AR en la membrana plasmática. Estos resultados son de gran importancia, ya que demuestran que la fosforilación de receptores no necesariamente induce su internalización en vesículas de clatrina. Las mutantes ΔN -MutIL3-G.P. Asp y ΔN -MutIL3-M.T. Asp, demuestran que esta fosforilación del receptor α_{1D} -AR, permite su localización en membrana plasmática. Por lo tanto, evaluamos el patrón de internalización de dichas mutantes en respuesta a NA y PMA, estimulando las células a los mismos tiempos en que estimulamos las mutantes previamente analizadas. Como se observa en la figura 25, nuestros datos muestran que la mutante ΔN -MutIL3-G.P. Asp, tiene una cinética de internalización parcial y sostenida desde los 5 hasta los 60 minutos de estimulación con NA. Esto no resulta sorprendente si consideramos que los cuatro residuos localizados en el grupo distal, fueron sustituidos por aminoácidos fosfo-miméticos; además, en dicha mutante, aún existen residuos en el grupo proximal, así como los residuos proximal y distal, los cuales, pueden ser fosforilados por PKC α/β y GRK2. Sin embargo, de especial interés es la mutante ΔN -MutIL3-M.T. Asp, la cual, al ser estimulada con NA, muestra un nivel de internalización elevado y sostenido desde los 5 hasta los 60 minutos de estimulación. Estos resultados fueron totalmente inesperados, ya que es una mutante cuyos sitios de fosforilación localizados en la tercera asa intracelular así como en el extremo carboxilo, fueron mutados por ácido aspártico. Además, dichos niveles de internalización fueron incluso mayores que los observados en la mutante ΔN -MutIL3-G.D. Asp. Nuestros datos permiten plantear una hipótesis que explique este fenómeno: aunque nuestro análisis de espectrometría de masas encontró 6 residuos potencialmente fosforilables en la tercera asa intracelular, así como 9 residuos potencialmente fosforilables en el extremo carboxilo, otros residuos fueron también detectados en estos dominios intracelulares, sin embargo, el valor Ascore fue muy bajo, y la detección fue poco consistente. Sin embargo, esto sugiere que dichos residuos pudieran estar siendo fosforilados por GRK2 en respuesta a la estimulación con NA. Además, resulta también plausible el sugerir que la mutación de todos los residuos localizados en el extremo carboxilo por ácido aspártico, favorecen que este dominio intracelular se pliegue de una

manera particular, permitiendo que los residuos detectados con un valor Ascore bajo, sean expuestos y fosforilados por GRK2. Este cambio estructural en el extremo carboxilo no se llevaría a cabo en la mutante Δ N-MutIL3-G.D. Asp, ya que en dicha mutante, solo los residuos localizados en el grupo proximal fueron mutados, manteniendo la conformación nativa del extremo carboxilo y ocultando los residuos detectados por espectrometría de masas.

Por otro lado, evaluamos la cinética de internalización de las mutantes previamente mencionadas en respuesta a PMA y empleando el mismo protocolo. La grafica 26 indica que la mutante Δ N-MutIL3-G.D. Asp no muestra niveles de internalización considerables, excepto a los 30 minutos de estimulación, donde se puede apreciar un ligero aumento de la fluorescencia intracelular. Sin embargo, dichos niveles de fluorescencia caen por completo a los 60 minutos de estimulación. Nuestros datos sugieren que la fosforilación de la mutante Δ N-MutIL3-G.D. Asp, no induce su internalización en comparación con las mutantes previamente descritas, esto a pesar de existir residuos localizados en el grupo proximal, así como el residuo proximal y el residuo distal, los cuales son fosforilados por PKC α/β y GRK2. Una posible explicación a dicho fenómeno, sugiere que la fosforilación de residuos en el grupo distal no solo permite que el receptor se exprese en la membrana plasmática, sino que también impide que el receptor sea internalizado a pesar de ser fosforilado en respuesta a PMA. Adicionalmente, la estimulación de la mutante Δ N-MutIL3-M.T. Asp por PMA, permite una elevada y sostenida internalización desde los 5 hasta los 60 minutos de estimulación. Estos datos nos permiten plantear la hipótesis antes descrita: la mutación de todos los residuos localizados en el extremo carboxilo por ácido aspártico, induce una conformación estructural de dicho dominio intracelular que permite la exposición y fosforilación de residuos detectados por espectrometría de masas, aunque con un valor Ascore muy pequeño. Sin embargo, parece que la fosforilación de dichos residuos es suficiente para inducir una internalización total y sostenida del receptor Δ N-MutIL3-M.T. Asp.

6.10. Las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR se unen a las β -arrestinas 1/2 endógenas

Después de la estimulación por un ligando, diversos GPCRs son internalizados mediante un proceso que requiere el reclutamiento de las β -arrestinas 1/2 hacia el receptor. La formación del complejo GPCR/ β -arrestina, permite que la maquinaria endocítica se

ensamble y el GPCR sea internalizado en vesículas de clatrina (Sudha, et al., 2011). Es importante mencionar que este proceso de internalización no impide que los GPCRs sigan señalizando, de hecho, se ha demostrado que múltiples receptores son capaces de activar diversas vías de señalización mientras se encuentran localizados en endosomas (Ranjan et al., 2017). Por esta razón, decidimos evaluar si las diferentes mutantes del receptor α_{1D} -AR son capaces de unirse a estas proteínas de andamiaje después de la estimulación con NA y PMA. Para lograr dicho objetivo, medimos la formación del complejo GPCR/ β -arrestina solo con aquellas mutantes que se encuentran localizadas en la membrana plasmática; además, consideramos los tiempos de estimulación con NA y PMA en cada mutante con base en los tiempos máximos de internalización observados en nuestros experimentos de internalización.

Como se muestra en la figura 27, el receptor ΔN , así como las mutantes ΔN -MutIL3 y ΔN -MutIL3-R.D., son capaces de unirse a las β -arrestinas 1/2 endógenas cuando las células son estimuladas con NA y PMA. Es importante destacar varios aspectos de estos resultados; en condiciones basales, nuestros resultados indican que dichas mutantes colocalizan con las β -arrestinas 1/2, esto es de especial importancia, ya que reafirma los resultados de reportes previos que indican que el receptor α_{1D} -AR se encuentra constitutivamente activo, además, el receptor se encuentra fosforilado en condiciones basales, y su estructura transmembranal e intracelular es idéntica a la de un receptor activado por su ligando. Esto sugiere que las β -arrestinas 1/2 son capaces de unirse al receptor empleando su sensor estructural y su sensor de fosfatos, los cuales contribuyen en coordinación, o de forma aislada, al acoplamiento de diversos GPCRs con las β -arrestinas 1/2.

Pocos estudios han demostrado que durante la desensibilización heteróloga, diversos GPCRs son capaces de reclutar a las β -arrestinas 1/2, lo cual significaría que estas proteínas de andamiaje regulan la internalización de estos receptores cuando son fosforilados en ausencia de su ligando (*Información respecto a la unión de las β -arrestinas 1/2 a GPCRs durante la desensibilización heteróloga, puede ser consultada en el anexo 5*). Nuestro laboratorio recientemente reporto que el receptor α_{1A} -AR no solo es capaz de unirse a las β -arrestinas 1/2 endógenas cuando las células son estimuladas con PMA, sino que también son capaces de activar la vía de señalización de las MAP cinasas (Alcántara-Hernández et al., 2017). Nuestros resultados demuestran que el receptor α_{1D} -AR también es capaz de reclutar a las β -arrestinas 1/2 durante la desensibilización homóloga y

heteróloga. Sin embargo, la capacidad de activar la vía de las MAP cinasas durante este último proceso de desensibilización y mediante la activación del dímero $\beta\gamma$, es un aspecto que debe ser investigado en futuros estudios.

Por otro lado, nuestros datos muestran que aunque la mutante ΔN -MutIL3-R.P. se une a las β -arrestinas 1/2 en condiciones basales, la señal de colocalización no aumenta de forma significativa cuando las células son estimuladas con NA o PMA. Esto sugiere que la fosforilación del residuo T442 es importante para la unión de las β -arrestinas 1/2 con el receptor α_{1D} -AR. Igualmente, recordemos que dicha mutante no se fosforila de forma significativa en respuesta a NA o PMA, lo cual nos hace pensar que T442 es un regulador clave en la fosforilación, internalización y unión de β -arrestinas 1/2 con el receptor α_{1D} -AR. Lo anterior planteado es apoyado por estudios que demuestran que la fosforilación del extremo carboxilo es un paso elemental en la unión de GPCRs con las β -arrestinas 1/2.

6.11. Las mutantes del receptor α_{1D} -AR con ácido aspártico se unen de forma parcial a las β -arrestinas 1/2 endógenas

Nuestro trabajo extendió el estudio del reclutamiento de las β -arrestinas 1/2 endógenas hacia las mutantes ΔN -MutIL3-G.D. Asp y ΔN -MutIL3-M.T. Asp, usando el mismo protocolo de estimulación antes descrito. Como se muestra en la figura 28, ambas mutantes colocalizan con las β -arrestinas 1/2 en condiciones basales; esto sugiere que dichas mutantes tienen una estructura conformacional activa, en especial la mutante ΔN -MutIL3-M.T. Asp, lo cual permite que el sensor estructural de las β -arrestinas 1/2 detecte dicha conformación, y se unan a las mutantes. Por otro lado, la mutante ΔN -MutIL3-G.D. Asp se une a las β -arrestinas 1/2 únicamente cuando las células son estimuladas con NA, aunque de manera parcial. Igualmente, la mutante ΔN -MutIL3-M.T. Asp se une con dichas proteínas de andamiaje de forma parcial cuando las células son estimuladas con NA y PMA. Estos resultados sugieren que la sustitución de residuos por ácido aspártico en el extremo carboxilo, tiene un efecto negativo sobre la capacidad del receptor α_{1D} -AR para reclutar a las β -arrestinas 1/2. Esto puede deberse principalmente a cambios estructurales en el extremo carboxilo que impiden que el extremo amino de las β -arrestinas 1/2 se unan al receptor, lo cual resultaría en un menor nivel de colocalización. Sin embargo, aunque estos cambios estructurales en el extremo carboxilo podrían considerarse como respuestas factibles, diversos estudios de biología estructural serán necesarios para examinar el acoplamiento del receptor α_{1D} -AR con las β -arrestinas 1/2.

El establecimiento del “código de barras de fosforilación” como una teoría para explicar la diversidad de respuestas celulares generadas por un receptor estimulado, ha sido ampliado en un reciente trabajo de revisión, en el cual, se sugiere que la fosforilación de un receptor dado por diferentes cinasas, resulta en el reclutamiento de las β -arrestinas, las cuales regulan la desensibilización e internalización del receptor. *Este código de fosforilación en el extremo carboxilo es “traducido” en información específica hacia las β -arrestinas, las cuales son capaces de adoptar diversas conformaciones estructurales, que les permiten unirse y activar a una gran variedad de moléculas y segundos mensajeros*[§] (Yang, et al., 2017). La posibilidad de que este mecanismo de fosforilación y trasducción de señales este siendo empleado por el receptor α_{1D} -AR, resulta posible si se toman en cuenta aquellos sitios que son fosforilados por PKC y GRK2, su relación con el reclutamiento de las β -arrestinas 1/2 hacia las diferentes mutantes generadas, y su capacidad para activar diversas vías de señalización de forma independiente de la proteína G, como la vía de las MAP cinasas.

Finalmente, las figuras 31, 32 y 33, proporcionan un panorama general sobre las características estructurales y funcionales de los sitios de fosforilación y de las mutantes del receptor α_{1D} -AR. Se destaca su fosforilación inducida por NA y PMA, su localización subcelular, internalización y unión a β -arrestinas 1/2 en respuesta a NA y PMA, su capacidad para movilizar calcio intracelular y activar ERK1/2. Para el receptor ΔN y la mutante ΔN -MutIL3-M.T., se señala su capacidad de activar ERK1/2 a través de la actividad de PKC, GRK2, la transactivación del EGFR, y del reclutamiento de las β -arrestinas 1/2.

§ La fosforilación de GPCRs juega un importante papel en la regulación de su propia función. El concepto de “código de barras de fosforilación” desarrollado en la última década, explica la naturaleza multidimensional de la red de señalización de los GPCRs, y proporciona un importante mecanismo por el cual las funciones de los GPCRs son reguladas mediante su interacción con las β -arrestinas. El “flute model” para la teoría del “código de barras de fosforilación”, expande nuestro conocimiento, y revela datos preliminares sobre la capacidad de las β -arrestinas para leer, reconocer y traducir el “fosfo-mensaje” codificado en el receptor, mediante la interacción del extremo carboxilo terminal de este, y el extremo amino terminal de las β -arrestinas, permitiendo así, que dichas proteínas de andamiaje adopten una gran variedad de cambios conformacionales para reclutar diversas moléculas efectoras. El mecanismo de “código de barras de fosforilación”, podría, en conjunto con los cambios conformacionales del receptor debido a la estimulación por un ligando, dictar el perfil de señalización empleado por las β -arrestinas (Yang, et al., 2017).

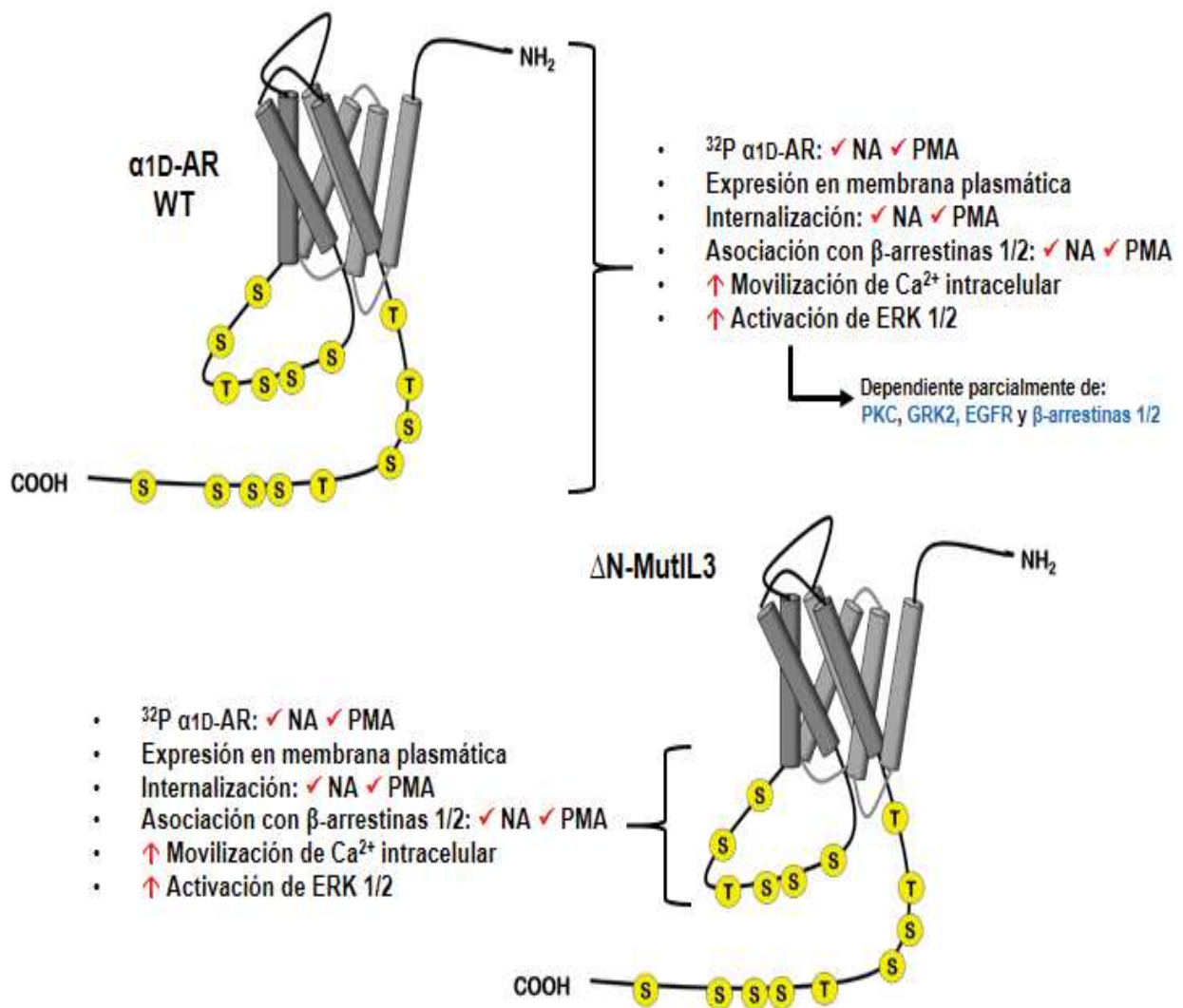


Figura 31: Características estructurales y funcionales del receptor ΔN y la mutante ΔN -MutL3. Se indica la fosforilación de ambos receptores inducida por NA y PMA, su localización subcelular en condiciones basales, internalización y unión a β -arrestinas 1/2 en respuesta a NA y PMA, así como su capacidad para movilizar calcio intracelular y activar ERK1/2. En el caso del receptor ΔN , se señala si la activación de ERK1/2 es dependiente de la actividad de PKC, GRK2, la transactivación del EGFR y del reclutamiento de las β -arrestinas 1/2 (azul)

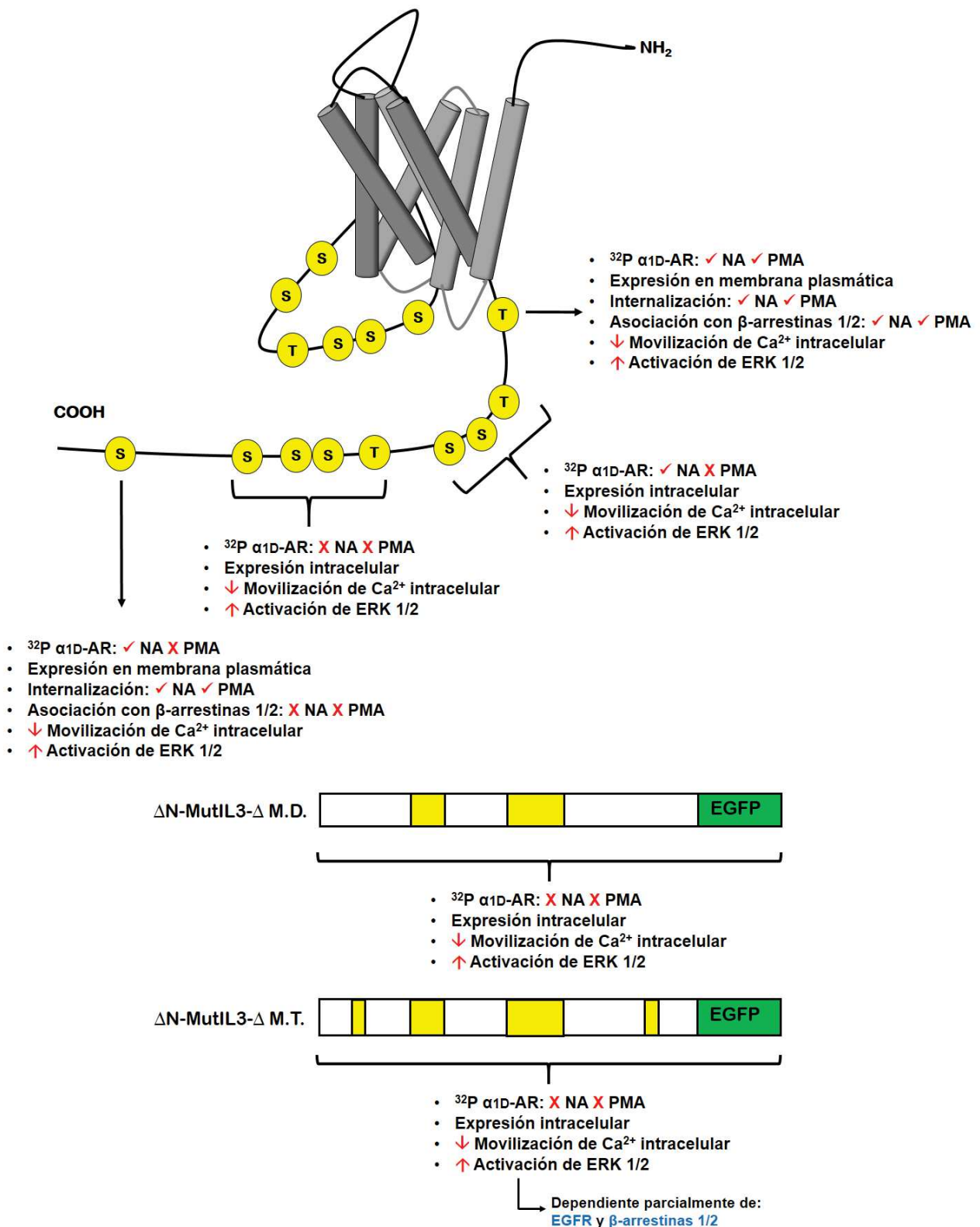


Figura 32: Características estructurales y funcionales de los sitios de fosforilación y de las diferentes mutantes del receptor α_{1D}-AR. Se destaca la función de los residuos proximal y distal, y de los grupos de residuos proximal y distal localizados en el extremo carboxilo. Igualmente, se señalan las mutantes con ambos grupos de residuos mutados (ΔN-MutIL3-M.D), así como aquella mutante con la totalidad de residuos mutados y localizados en el extremo carboxilo (ΔN-MutIL3-M.T.). De todas las mutantes mencionadas, se indica su fosforilación inducida por NA y PMA, su localización subcelular en condiciones basales, internalización y unión a β-arrestinas 1/2 en respuesta a NA y PMA, así como su capacidad para movilizar calcio intracelular y activar ERK1/2. En el caso de la mutante ΔN-MutIL3-M.T., se señala si la activación de ERK1/2 es dependiente de la transactivación del EGFR y del reclutamiento de las β-arrestinas 1/2 (azul).

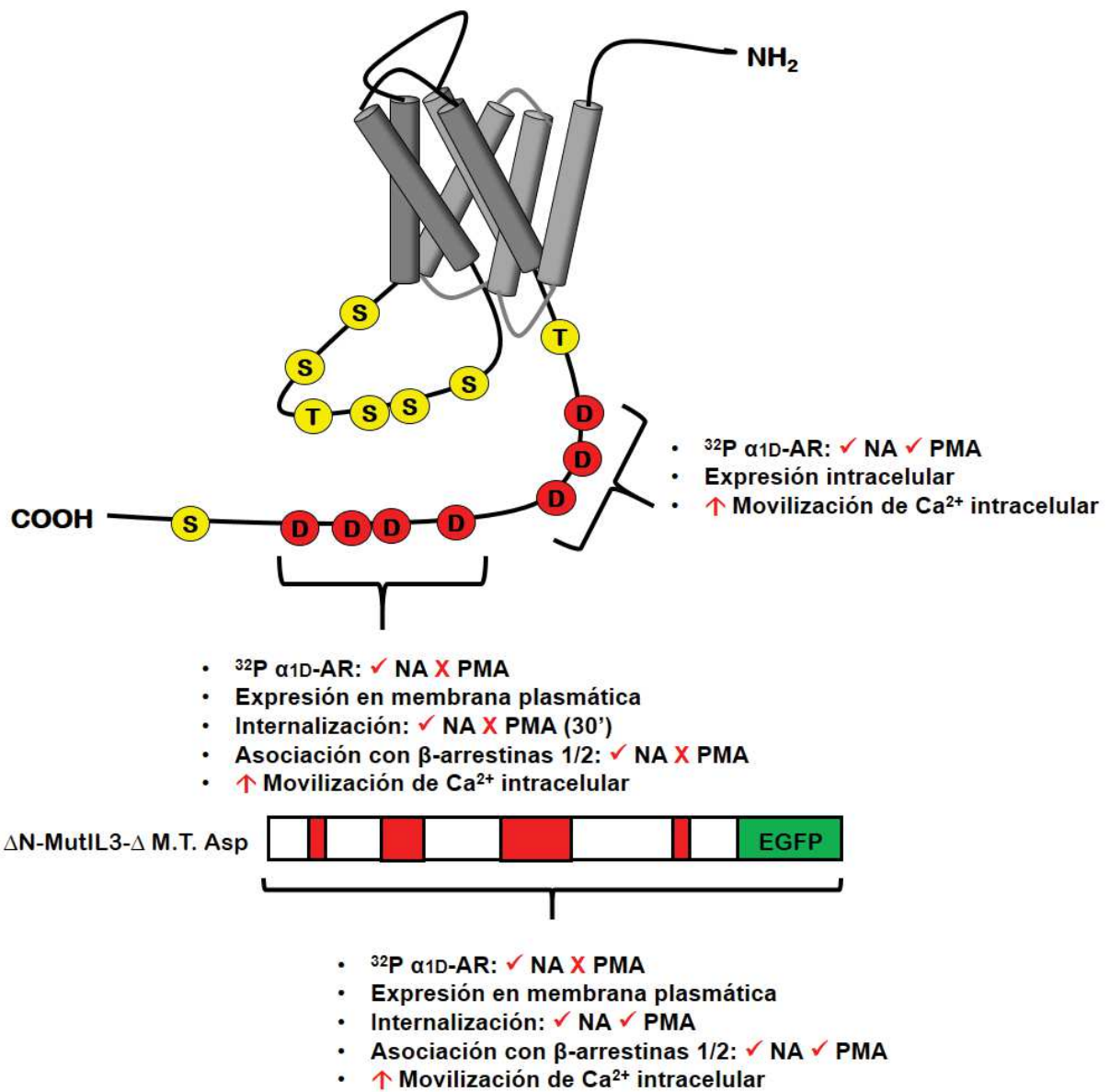


Figura 33: Características estructurales y funcionales de las diferentes mutantes del receptor $\alpha_{1\text{D}}\text{-AR}$ con ácido aspártico. Se destaca la función de los grupos de residuos proximal y distal con sustituciones de ácido aspártico, así como aquella mutante con la totalidad de residuos mutados por ácido aspártico y localizados en el extremo carboxilo ($\Delta\text{N-MutI3-M.T. Asp}$). De todas las mutantes mencionadas, se indica su fosforilación inducida por NA y PMA, su localización subcelular en condiciones basales, internalización y unión a β -arrestinas 1/2 en respuesta a NA y PMA, así como su capacidad para movilizar calcio intracelular.

Capítulo VII

Conclusiones

El presente trabajo contribuyó a evaluar el papel de los diversos sitios de fosforilación localizados en el extremo carboxilo en la función y localización subcelular del receptor α_{1D} -AR. Nuestros métodos experimentales fueron llevados a cabo con base en nuestro más reciente estudio, donde a través de espectrometría de masas, detectamos diversos sitios de fosforilación en la tercera asa intracelular y en el extremo carboxilo de este GPCR. Debido al gran número de sitios detectados, dicho trabajo se enfocó únicamente en explorar el papel de los dominios intracelulares en la función del receptor α_{1D} -AR. Sin embargo, decidimos realizar mutaciones puntuales en el extremo carboxilo para conocer el papel de cada sitio de fosforilación en la regulación y función de este receptor. Nuestros resultados muestran que la regulación del receptor α_{1D} -AR por parte de dichos residuos de fosforilación, es muy compleja. Proponemos que T442 es un residuo de especial importancia en la fosforilación y acoplamiento de las β -arrestinas 1/2 al receptor α_{1D} -AR. Además, la fosforilación del grupo distal de este receptor, permite su completa inserción en la membrana plasmática. Esto es muy importante, ya que hasta la fecha, ningún estudio ha demostrado que la fosforilación de ciertos residuos localizados en el extremo carboxilo de un GPCR, controle su localización en la membrana plasmática. Nuestros datos nos llevan a plantear la hipótesis de que la ausencia de fosforilación en los residuos localizados en el grupo distal, dificulta o impiden la inserción del receptor α_{1D} -AR en la membrana plasmática. Este planteamiento, junto con la actividad intrínseca del receptor α_{1D} -AR, explican por qué este receptor presenta niveles de fosforilación elevados aun en la ausencia de un ligando (Alfonzo-Méndez et al., 2018). Además, de acuerdo a los resultados de espectrometría de masas, los residuos S516 y S518, se encuentran fosforilados en condiciones basales, lo cual apoya la hipótesis anteriormente planteada. Por lo tanto, es posible sugerir que durante la internalización del receptor y el proceso de reciclamiento, una serie de diferentes proteínas cinasas y fosfatasas podrían estar participando en la formación de complejos de señalización de una manera dinámica.

Recientemente, se reportó que la expresión del receptor para esfingosina-1-fosfato (S1P) en la membrana plasmática, está controlada por la inhibición de la PKC, es decir, la inhibición de dicha cinasa induce la internalización de este GPCR, aunque los sitios específicos de fosforilación son hasta el momento desconocidos (Sensken & Gräler, 2010). Igualmente, se ha reportado que la fosforilación de diversas subunidades de los receptores

AMPA/NMDA favorecen su expresión en la membrana plasmática, lo cual sugiere que este no es un proceso exclusivo de GPCRs (Comenencia-Ortiz, et al., 2009; Lin et al., 2009; Kibaly, et al., 2016; Abramian et al., 2014).

Finalmente, es la primera vez que un grupo de investigación genera un gran número de mutantes del receptor α_{1D} -AR para su estudio. Esto nos ha permitido explorar el rol de la tercera asa intracelular y del extremo carboxilo, así como la función de los sitios de fosforilación localizados en dichos dominios intracelulares en la regulación de este receptor. A pesar de estos grandes avances, es importante reconocer la existencia de más sitios de fosforilación localizados a lo largo del extremo carboxilo, los cuales podrían estar regulando la función y señalización de este receptor. Para estudiar dichos sitios, sugerimos la mutación de todos aquellos residuos potencialmente fosforilables en el extremo carboxilo, incluso en aquellos donde el valor Ascore haya sido muy bajo en comparación con otros residuos. De esta manera, podremos saber con mayor exactitud el rol del extremo carboxilo en la función del receptor α_{1D} -AR.

El presente trabajo fue publicado en Cellular Signaling. La referencia del trabajo es la siguiente:

Gabriel Carmona-Rosas, David A. Hernández-Espinosa, Rocío Alcántara-Hernández, Marco A. Alfonzo-Méndez and J. Adolfo García-Sainz. Distinct phosphorylation sites/clusters in the carboxyl terminus regulate α_{1D} -adrenergic receptor subcellular localization and signaling. *Cellular Signaling*, 9;53:374-389. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.11.003.

Para consultar el documento completo, revise el anexo 6

Referencias

1. Abramian, A. M., Comenencia-Ortiz, E., Modgil, A., Vien, T. N., Nakamura, Y., Moore, Y. E., Maquire, J. L., Terunuma, M., Davies, P. A. & Moss, S. J. (2014). Neurosteroids promote phosphorylation and membrane insertion of extrasynaptic GABAA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(19), 7132–7137.
2. Alcántara-Hernández, R., Hernández-Méndez, A., Romero-Ávila, M. T., Alfonzo-Méndez, M. A., Pupo, A. S., & García-Sáinz, J. A. (2017). Noradrenaline, oxymetazoline and phorbol myristate acetate induce distinct functional actions and phosphorylation patterns of α 1A-adrenergic receptors. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1864*(12), 2378–2388.
3. Alfonzo-Méndez, M. A., Alcántara-Hernández, R., & Adolfo García-Sáinz, J. (2017). Novel structural approaches to study GPCR regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(1), 1–17.
4. Alfonzo-Méndez, M. A., Carmona-Rosas, G., Hernández-Espinosa, D. A., Romero-Ávila, M. T., & García-Sáinz, J. A. (2018). Different phosphorylation patterns regulate α 1D-adrenoceptor signaling and desensitization. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1865*(6), 842–854.
5. Alfonzo-Mendez, M. A., Castillo-Badillo, J. A., Romero-Avila, M. T., Rivera, R., Chun, J., & Garcia-Sainz, J. A. (2016). Carboxyl terminus-truncated alpha1D-adrenoceptors inhibit the ERK pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *389*(8), 911–920.
6. Aono, Y., Taguchi, H., Saigusa, T., Uchida, T., Takada, K., Takiguchi, H., Shirakawa, T., Shimizu, N., Koshikawa, N & Cools, A. R. (2015). Simultaneous activation of the α 1A-, α 1B- and α 1D-adrenoceptor subtypes in the nucleus accumbens reduces accumbal dopamine efflux in freely moving rats. *Behavioural Pharmacology*, *26*(iii), 73–80.
7. 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.
8. Baltoumas, F. A., Theodoropoulou, M. C., & Hamodrakas, S. J. (2013). Interactions of the α -subunits of heterotrimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: A critical review and analysis of interacting surfaces, conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials. *Journal of Structural Biology*, *182*(3), 209–218.
9. Beaumont, V., Hepworth, M. B., Luty, J. S., Kelly, E., & Henderson, G. (1998). Somatostatin receptor desensitization in NG108-15 cells. A Consequence of Receptor Sequestration. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(50), 33174–33183.
10. Bouchelouche, K., Andersen, L., Alvarez, S., Nordling, J., & Bouchelouche, P. (2005). Increased contractile response to phenylephrine in detrusor of patients with bladder outlet obstruction: Effect of the α 1a and α 1D-adrenergic receptor antagonist tamsulosin. *Journal of Urology*, *173*(2), 657–661.

11. Bouzo-Lorenzo, M., Santo-Zas, I., Lodeiro, M., Nogueiras, R., Casanueva, F. F., Castro, M., Pazos, Y., Tobin, A. B., Butcher, A. J. & Camiña, J. P. (2016). Distinct phosphorylation sites on the ghrelin receptor, GHSR1a, establish a code that determines the functions of β -arrestins. *Scientific Reports*, 6(August 2015), 1–14.
12. Bray, L., Froment, C., Pardo, P., Candotto, C., Burlet-Schiltz, O., Zajac, J. M., Mollerau, C. & Moulédous, L. (2014). Identification and functional characterization of the phosphorylation sites of the neuropeptide FF2 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 289(49), 33754–33766.
13. Butcher, A. J., Hudson, B. D., Shimpukade, B., Alvarez-Curto, E., Prihandoko, R., Ulven, T., Milligan, G & 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.
14. Butcher, A. J., Prihandoko, R., Kong, K. C., McWilliams, P., Edwards, J. M., Bottrill, A., Mistry, S. & 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.
15. Carman, C. V., Parent, J. L., Day, P. W., Pronin, A. N., Sternweis, P. M., Wedegaertner, P. B., Gilman, A. G. & Kozasa, T. (1999). Selective regulation of G alpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *Journal of Biological Chemistry*, 274(48), 34483–34492.
16. Carmona-Rosas, G., Alcántara-Hernández, R., & Hernández-Espinosa, D. A. (2018). Dissecting the signaling features of the multi-protein complex GPCR/ β -arrestin/ERK1/2. *European Journal of Cell Biology*, 97(5), 349–358.
17. Chen, C. H., Paing, M. M., & Trejo, J. (2004). Termination of Protease-activated Receptor-1 Signaling by β -Arrestins Is Independent of Receptor Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(11), 10020–10031.
18. Chen Q, Takahashi S, Zhong S, Hosoda C, Zheng HY, Ogushi T, Fujimura T, Ohta N, Tanoue A, Tsujimoto G, Kitamura T. (2005). Function of the lower urinary tract in mice lacking alpha1D-adrenoceptor. *The Journal of Urology*, 174(1), 370–374.
19. Shibasaki, T., Moroi, K., Nishiyama, M., Zhou, J., Sakamoto, A., Masaki, T., Kazumitsu, I., Haga, T. & Kimura, S. (1999). Characterization of the carboxyl terminal-truncated endothelin B receptor coexpressed with G protein-coupled receptor kinase 2. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 47(4), 569–577.
20. Chung, K. Y. (2013). Structural aspects of GPCR-G protein coupling. *Toxicological Research*, 29(3), 149–155.
21. Collins, T. J. (2007). ImageJ for microscopy. *BioTechniques*, 43(1 Suppl), 25–30.
22. Dale, L. B., Bhattacharya, M., Anborgh, P. H., Murdoch, B., Bhatia, M., Nakanishi, S., & Ferguson, S. S. G. (2000). G protein-coupled receptor kinase-mediated desensitization of metabotropic glutamate receptor 1A protects against cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 275(49), 38213–38220.

23. Dhami, G. K., Babwah, A. V., Sterne-Marr, R., & Ferguson, S. S. G. (2005). Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor 1 signaling requires G protein-coupled receptor kinase 2 binding to the second intracellular loop. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 24420–24427.
24. Dicker, F., Quitterer, U., Winstel, R., Honold, K., & Lohse, M. J. (1999). Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Science, United States of America*, 96(May), 5476–5481.
25. Diviani, D., Lattion, A. L., Larbi, N., Kunapuli, P., Pronin, A., Benovic, J. L., & Cotecchia, S. (1996). Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensitization of the alpha1B-adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 271(9), 5049–5058.
26. Ferguson, S. S., Downey, W. E., Colapietro, A. M., Barak, L. S., Ménard, L., & Caron, M. G. (1996). Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5247), 363–6.
27. Ferguson, S. S. G. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological Reviews*, 53(1), 1–24.
28. Freedman, N. J., Ament, A. S., Oppermann, M., Stoffel, R. H., Exum, S. T., & Lefkowitz, R. J. (1997). Phosphorylation and Desensitization of Human Endothelin A and B Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 272(28), 17734–17743.
29. 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.
30. García-Sáinz, J. A., Romero-Ávila, M. T., & Medina, L. del C. (2010). α 1D-Adrenergic receptors. Constitutive activity and reduced expression at the plasma membrane. *Methods in Enzymology*, 484(C), 109–125.
31. 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.
32. 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), 113–120.
33. Granzin, J., Wilden, U., Choe, H. W., Labahn, J., Krafft, B., & Buldt, G. (1998). X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments. *Nature*, 391(6670), 918–921.
34. Greene, N. M., Williams, D. S., & Newton, A. C. (1997). Identification of protein kinase C phosphorylation sites on bovine rhodopsin. *Journal of Biological Chemistry*, 272(16), 10341–10344.

35. Hague, C., Chen, Z., Pupo, A. S., Schulte, N. A., Toews, M. L., & Minneman, K. P. (2004). The N Terminus of the Human alpha1D-Adrenergic Receptor Prevents Cell Surface Expression. *Journal of Experimental Therapeutics*, 309(1), 388–397.
36. 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.
37. Hampel, C., Dolber, P. C., Smith, M. P., Savic, S. L., Throff, J. W., Thor, K. B., & Schwinn, D. A. (2002). Modulation of bladder alpha1-adrenergic receptor subtype expression by bladder outlet obstruction. *The Journal of Urology*, 167(3), 1513–1521.
38. Han, M., Gurevich, V. V, Vishnivetskiy, S. A., Sigler, P. B., & Schubert, C. (2001). Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure*, 9(9), 869–880.
39. Hirsch, J. A., Schubert, C., Gurevich, V. V., & Sigler, P. B. (1999). The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: A model for arrestin's regulation. *Cell*, 97(2), 257–269.
40. Jacobson, K. A. (2015). New paradigms in GPCR drug discovery. *Biochemical Pharmacology*, 98(4), 541–555.
41. Jala, V. R., Shao, W. H., & Haribabu, B. (2005). Phosphorylation-independent β -arrestin translocation and internalization of leukotriene B4 receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4880–4887.
42. Jensen, B. C., Swigart, P. M., Laden, M. E., DeMarco, T., Hoopes, C., & Simpson, P. C. (2009). The Alpha-1D Is the Predominant Alpha-1-Adrenergic Receptor Subtype in Human Epicardial Coronary Arteries. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(13), 1137–1145.
43. Jeong, J., Park, Y. U., Kim, D. K., Lee, S., Kwak, Y., Lee, S. A., Suh, Y. H., Gho, Y. S., Hwang, D. & Park, S. K. (2013). Cdk5 phosphorylates dopamine D2 receptor and attenuates downstream signaling. *PLoS ONE*, 8(12), 1–9.
44. Ji, T. H., Grossmann, M., & Ji, I. (1998). G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem*. 273(28), 17299-302.
45. Katritch, V., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2013). Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 53(7), 531–556.
46. Kenakin, T. (2001). Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *The FASEB Journal*, 15(3), 598–611.
47. Kenakin, T., & Christopoulos, A. (2013). Signalling bias in new drug discovery: Detection, quantification and therapeutic impact. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(3), 205–216.
48. Kibaly, C., Kam, A. Y. F., Loh, H. H., & Law, P. Y. (2016). Naltrexone Facilitates Learning and Delays Extinction by Increasing AMPA Receptor Phosphorylation and Membrane Insertion. *Biological Psychiatry*. 79(11):906-916.

49. Kobilka, B. K., & Deupi, X. (2007). Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(8), 397–406.
50. Kojima, Y., Sasaki, S., Kubota, Y., Imura, M., Oda, N., Kiniwa, M., Hayashi, Y. & Kohri, K. (2011). Up-regulation of α 1a and α 1d-adrenoceptors in the prostate by administration of subtype selective α 1-adrenoceptor antagonist tamsulosin in patients with benign prostatic hyperplasia. *Journal of Urology*, 186(4), 1530–1536.
51. Kong, G., Penn, R., & Benovic, J. L. (1994). A beta-adrenergic receptor kinase dominant negative mutant attenuates desensitization of the beta 2-adrenergic receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(18), 13084–7.
52. 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-Yaflin, A., Wang, E. H., Scott, J. D. & Hague, C. (2016). Endogenous N-terminal domain cleavage modulates α 1D-adrenergic receptor pharmacodynamics. *Journal of Biological Chemistry*, 291(35), 18210–18221.
53. Krupnick, J. G., & Benovic, J. L. (1998). The Role of Receptor Kinases and Arrestins in G Protein–Coupled Receptor Regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 38(1), 289–319.
54. Kumari, P., Srivastava, A., Banerjee, R., Ghosh, E., Gupta, P., Ranjan, R., Chen, X., Gupta, B., Gupta, C., Jaiman, D. & Shukla, A. K. (2016). Functional competence of a partially engaged GPCR- β -arrestin complex. *Nature Communications*, 7, 1–16.
55. Lefkowitz, R. J., Cotecchia, S., Samama, P., & Costa, T. (1993). Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends in Pharmacological Sciences*, 14(8), 303–307.
56. Liggett, S. B. (2011). Phosphorylation barcoding as a mechanism of directing GPCR signaling. *Science Signaling*, 4(185), 2–5.
57. Lin, D. T., Makino, Y., Sharma, K., Hayashi, T., Neve, R., Takamiya, K., & Huganir, R. L. (2009). Regulation of AMPA receptor extrasynaptic insertion by 4.1N, phosphorylation and palmitoylation. *Nature Neuroscience*, 12(7), 879–887.
58. Lyssand, J. S., DeFino, M. C., Tang, X. B., Hertz, A. L., Feller, D. B., Wacker, J. L., Adams, M. E. & Hague, C. (2008). Blood pressure is regulated by an α 1D-adrenergic receptor/dystrophin signalosome. *Journal of Biological Chemistry*, 283(27), 18792–18800.
59. Milasta, S., Evans, N. A., Ormiston, L., Wilson, S., Lefkowitz, R. J., & Milligan, G. (2005). The sustainability of interactions between the orexin-1 receptor and beta-arrestin-2 is defined by a single C-terminal cluster of hydroxy amino acids and modulates the kinetics of ERK MAPK regulation. *The Biochemical Journal*, 387(Pt 3), 573–84.
60. Ming Hsu, C. Y., & Uluda Ğ, H. (2012). A simple and rapid nonviral approach to efficiently transfect primary tissue-derived cells using polyethylenimine. *Nature Protocols*, 7(5), 935–945.

61. Mishima, K., Tanoue, A., Tsuda, M., Hasebe, N., Fukue, Y., Egashira, N., Takano, Y., Kamiya, H. O., Tsujimoto, G., Iwasaki, K. & Fujiwara, M. (2004). Characteristics of behavioral abnormalities in $\alpha 1d$ -adrenoceptors deficient mice. *Behavioural Brain Research*, 152(2), 365–373.
62. Morelli MB, Amantini C, Nabissi M, Liberati S, Cardinali C, Farfariello V, Tomassoni D, Quaglia W, Piergentili A, Bonifazi A, Del Bello F, Santoni M, Mammana G, Servi L, Filosa A, Gismondi A, Santoni G. (2014). Cross-talk between alpha 1D-adrenoceptors and transient receptor potential vanilloid type 1 triggers prostate cancer cell proliferation. *Bmc Cancer*, 14, 1–13.
63. Neves, S. R., Ram, P. T., & Iyengar, R. (2002). G protein pathways. *Science*, 296(5573), 1636–1639.
64. Nobles KN, Xiao K, Ahn S, Shukla AK, Lam CM, Rajagopal S, Strachan RT, Huang TY, Bressler EA, Hara MR, Shenoy SK, Gygi SP, Lefkowitz RJ. (2011). Distinct phosphorylation sites on the β 2-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin. *Science Signaling*, 4(185), 1–11.
65. Oldham, W. M., & Hamm, H. E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 60–71.
66. Pal, K., Mathur, M., Kumar, P., & DeFea, K. (2013). Divergent β -arrestin-dependent signaling events are dependent upon sequences within G-protein-coupled receptor C termini. *Journal of Biological Chemistry*, 288(5), 3265–3274.
67. Palczewski, K., Buczylo, J., Ohguro, H., Annan, R. S., Carr, S. A., Crabb, J. W., Kaplan M. W., Johnson, R. S. & Walsh, K. A. (1994). Characterization of a truncated form of arrestin isolated from bovine rod outer segments. *Protein Science*, 3(2), 314–324.
68. Pao, C. S., & Benovic, J. L. (2002). Phosphorylation-Independent Desensitization of G Protein-Coupled Receptors ? *Science STKE (October)*, 1–4.
69. Park, J. Y., Lee, S. Y., Kim, H. R., Seo, M. D., & Chung, K. Y. (2016). Structural mechanism of GPCR-arrestin interaction: Recent breakthroughs. *Archives of Pharmacal Research*, 39(3), 293–301.
70. Prihandoko, R., Bradley, S. J., Tobin, A. B., & Butcher, A. J. (2015). Determination of GPCR phosphorylation status: Establishing a phosphorylation barcode. *Current Protocols in Pharmacology*, 2015(June), 2.13.1-2.13.26.
71. Pupo, A. S., Uberti, M. A., & Minneman, K. P. (2003). N-terminal truncation of human $\alpha 1D$ -adrenoceptors increases expression of binding sites but not protein. *European Journal of Pharmacology*, 462(1–3), 1–8.
72. Ranjan, R., Dwivedi, H., Baidya, M., Kumar, M., & Shukla, A. K. (2017). Novel Structural Insights into GPCR- β -Arrestin Interaction and Signaling. *Trends in Cell Biology*, 27(11), 851–862.
73. Reiter, E., Ahn, S., Shukla, A. K., & Lefkowitz, R. J. (2012). Molecular Mechanism of β -Arrestin-Biased Agonism at Seven-Transmembrane Receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52(1), 179–197.

74. Richardson, M. D., Balias, A. M., Yamaguchi, K., Freilich, E. R., Barak, L. S., & Kwatra, M. M. (2003). Human substance P receptor lacking the C-terminal domain remains competent to desensitize and internalize. *Journal of Neurochemistry*, *84*(4), 854–863.
75. Rodríguez-Pérez, C. E., Calvo-Ochoa, E., Kalashnikova, E. V., Reyes-Cruz, G., Romero-Ávila, M. T., & García-Sáinz, J. A. (2009). Receptor tyrosine kinases regulate α 1D-adrenoceptor signaling properties: Phosphorylation and desensitization. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *41*(6), 1276–1283.
76. Rodríguez-Pérez, C. E., Romero-Ávila, M. T., Reyes-Cruz, G., & García-Sáinz, J. A. (2009). Signaling properties of human α 1D-adrenoceptors lacking the carboxyl terminus: Intrinsic activity, agonist-mediated activation, and desensitization. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *380*(2), 99–107.
77. Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., & Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, *459*(7245), 356–363.
78. Sadalge, A., Coughlin, L., Fu, H., Wang, B., Valladares, O., Valentino, R., & Blendy, J. A. (2003). A1D Adrenoceptor Signaling Is Required for Stimulus Induced Locomotor Activity. *Molecular Psychiatry*, *8*(7), 664–672.
79. 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. (2014). Free fatty acids and protein kinase C activation induce GPR120 (free fatty acid receptor 4) phosphorylation. *European Journal of Pharmacology*, *723*(1), 368–374.
80. Sensken, S. C., & Gräler, M. H. (2010). Down-regulation of S1P1 receptor surface expression by protein kinase C inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(9), 6298–6307.
81. Shenoy, S. K., & Lefkowitz, R. J. (2005). Seven-Transmembrane Receptor Signaling Through β -Arrestin. *Science Signaling*, *2005*(308), cm10-cm10.
82. Shenoy, S. K., & Lefkowitz, R. J. (2011). β -Arrestin-Mediated Receptor Trafficking and Signal Transduction. *Trends in Pharmacological Sciences*, *32*(9), 521–533.
83. Shenoy, S. K. & Rajagopal, S. (2018). GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cell Signal*. *41*:9, 9-16.
84. Stalheim, L. (2005). Multiple Independent Functions of Arrestins in the Regulation of Protease Activated Receptor-2 Signaling and Trafficking. *Molecular Pharmacology*, *67*(1), 78–87.
85. Surgand, J. S., Rodrigo, J., Kellenberger, E., & Rognan, D. (2006). A chemogenomic analysis of the transmembrane binding cavity of human G-protein-coupled receptors. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, *62*(2), 509–538.
86. 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.

87. Tohgo, A., Choy, E. W., Gesty-Palmer, D., Pierce, K. L., Laporte, S., Oakley, R. H., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. & Luttrell, L. M. (2003). The stability of the G protein-coupled receptor- β -arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 6258–6267.
88. Tóth, A. D., Prokop, S., Gyombolai, P., Várnai, P., Balla, A., Gurevich, V. V., Hunyady, L. & Turu, X. G. (2018). Heterologous phosphorylation-induced formation of a stability lock permits regulation of inactive receptors by β -arrestins. *Journal of Biological Chemistry*, 293(3), 876–892.
89. Usui, H., Nishiyama, M., Moroi, K., Shibasaki, T., Zhou, J., Ishida, J., Fukamizu, A., Haga, T., Sekiya, S. & Kimura, S. (2000). RGS domain in the amino-terminus of G protein-coupled receptor kinase 2 inhibits Gq-mediated signaling. *International Journal of Molecular Medicine*, 5(4), 335–340.
90. Vázquez-Prado, J., Casas-González, P., & García-Sáinz, J. A. (2003). G protein-coupled receptor cross-talk: Pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cellular Signalling*, 15(6), 549–557.
91. Venkatakrisnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F., & Madan Babu, M. (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 494(7436), 185–194.
92. Walden, P. D., Gerardi, C., & Lepor, H. (1999). Localization and expression of the alpha1A-1, alpha1B and alpha1D-adrenoceptors in hyperplastic and non-hyperplastic human prostate. *The Journal of Urology*, 161(2), 635–40.
93. Ward, R. J., Alvarez-curto, E., & Milligan, G. (2011). *Receptor Signal Transduction Protocols*, 746, 21–37.
94. Willets, J. M., Taylor, A. H., Shaw, H., Konje, J. C., & Challiss, R. A. J. (2008). Selective Regulation of H 1 Histamine Receptor Signaling by G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 in Uterine Smooth Muscle Cells. *Molecular Endocrinology*, 22(8), 1893–1907.
95. Wu, G., David, J. E., & Zhang M. (2015). Regulation of α 2B-adrenergic receptor export trafficking by specific motifs. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 132, 227-244.
96. Wu, G. (2012). Regulation of post-Golgi traffic of G protein-coupled receptors. *Subcell Biochem*. 63, 83-95.
97. Wu, S., Birnbaumer, M., & Guan, Z. (2008). Phosphorylation analysis of G protein-coupled receptor by mass spectrometry: Identification of a phosphorylation site in V2 vasopressin receptor. *Analytical Chemistry*, 80(15), 6034–6037.
98. Xiao, K., McClatchy, D. B., Shukla, A. K., Zhao, Y., Chen, M., Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. (2007). Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(29), 12011–12016.
99. Yang, Z., Yang, F., Zhang, D., Liu, Z., Lin, A., Liu, C., Xiao, P., Yu, X., & Sun, J. P. (2017). Phosphorylation of G protein-coupled receptors: From the barcode hypothesis to the flute model. *Mol Pharmacol*. 92(3), 201-210.

100. Zhou, X. E., He, Y., de Waal, P. W., Gao, X., Kang, Y., Van Eps, N., Yin, Y., Pal, K., Goswami, D., White, T. A., Barty, A., Latorraca, N. R., Chapman, H. N., Hubbell, W. L., Dror, R. O., Stevens, R. C., Cherezov, V., Gurevich, V. V., Griffin, P. R., Ernst, O. P., Melcher, K., Xu, H. E. (2017). Identification of Phosphorylation Codes for Arrestin Recruitment by G Protein-Coupled Receptors. *Cell*, 170(3), 457–469.e13.
101. Zindel, D., Engel, S., Bottrill, A. R., Pin, J. P., Prezeau, L., Tobin, A. B., Bunemann, M., Krasel, C. & Butcher, A. J. (2016). Identification of key phosphorylation sites in PTH1R that determine arrestin3 binding and fine-tune receptor signaling. *Biochemical Journal*, 473(22), 4173–4192.



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Molecular Cell Research

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

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



Marco A. Alfonso-Méndez, Gabriel Carmona-Rosas, David A. Hernández-Espinosa, M. Teresa Romero-Ávila, J. Adolfo García-Sáinz*

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Adrenergic receptor
Mass spectrometry
Receptor phosphorylation
Calcium
Extracellular-signal-regulated kinase
Receptor internalization
Receptor desensitization

ABSTRACT

Human α_{1D} -adrenoceptors (α_{1D} -ARs) are a group of the seven transmembrane-spanning proteins that mediate many of the physiological and pathophysiological actions of adrenaline and noradrenaline. Although it is known that α_{1D} -ARs are phosphoproteins, their specific phosphorylation sites and the kinases involved in their phosphorylation remain largely unknown. Using a combination of in silico analysis, mass spectrometry and site directed mutagenesis, we identified distinct α_{1D} -AR phosphorylation patterns during noradrenaline- or phorbol ester-mediated desensitizations. We found that the G protein coupled receptor kinase, GRK2, and conventional protein kinases C isoforms α/β , phosphorylate α_{1D} -AR during these processes. Furthermore, we showed that the phosphorylated residues are located in the receptor's third intracellular loop (S300, S323, T328, S331, S332, S334) and carboxyl region (S441, T442, T477, S486, S492, T507, S515, S516, S518, S543) and are conserved among orthologues but are not conserved among the other human α_1 -adrenoceptor subtypes. Additionally, we found that phosphorylation in either the third intracellular loop or carboxyl tail was sufficient to regulate calcium signaling desensitization. By contrast, mutations in either of these two domains significantly altered mitogen activated protein kinase (ERK) pathway and receptor internalization, suggesting that they have differential regulatory mechanisms. Our data provide new insights into the functional repercussions of these posttranslational modifications in signaling outcomes and desensitization.

1. Introduction

α_1 -Adrenoceptors comprise a subfamily of G protein coupled receptors (GPCRs) that mediate many of adrenaline and noradrenaline (NA) actions [1,2]. This receptor subfamily is composed of three members, the α_{1A} , α_{1B} , and α_{1D} subtypes [2]; the latter receptor was studied in the present work. As is true for all GPCRs, α_{1D} -adrenoceptors (α_{1D} -ARs) are structurally characterized by an extracellular amino terminus, an intracellular carboxyl terminus (Ctail), and seven membrane-spanning segments connected by three intracellular and three extracellular loops [2,3]. Agonist binding to α_{1D} -ARs induces conformational changes that sequentially activate Gq/11 and phospholipase C β ; this latter enzyme triggers phosphatidylinositol 4,5 bis-phosphate hydrolysis generating diacylglycerol and inositol 1,4,5-trisphosphate. These second messengers lead to an increase in intracellular Ca²⁺ levels and protein kinase C activation [1–4]. Moreover, α_{1D} -ARs are able to stimulate the ERK mitogen activated protein kinase

pathway [5,6].

α_{1D} -ARs play important roles in regulating human tissue homeostasis and are also involved in the pathophysiology of diseases such as hypertension and benign prostatic hyperplasia, among others [1,7–10]. This receptor subtype has several unique characteristics, some of which have hindered its study (reviewed in [11]). These include a low detection in many tissues by radioligand binding techniques [12] and its subcellular localization; it is abundant in intracellular vesicles and scarce at the plasma membrane [13–17]. α_{1D} -AR retention in intracellular vesicles is responsible for its low plasma membrane localization and appears to be due to a motif present at the amino terminus [13–15]. Deletion of the coding sequence for the first 79 amino acids has been employed to favor α_{1D} -AR membrane expression in transfected model cells [13–15,18,19]. Interestingly, recent evidence indicates that proteolytic processing of the α_{1D} -AR amino terminus domain is a physiological mechanism employed by cells to generate functional receptors [20], which supports the use of engineered

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

* Corresponding author at: Inst. Fisiología Celular, UNAM, Ap. Postal 248, Ciudad de México CP 04510, Mexico.

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

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.03.006>

Received 15 December 2017; Received in revised form 2 March 2018; Accepted 13 March 2018

Available online 15 March 2018

0167-4889/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

truncated receptors. In addition, α_{1D} -ARs exhibit constitutive activity that appears to be physiologically relevant, preventing abrupt changes in blood pressure and tissue perfusion [21–23].

Desensitization prevents receptor over-activation in response to prolonged or intense stimulation and is a conserved mechanism for the fine-tuning of cell responsiveness [24]. During this process, receptor phosphorylation appears to be a pivotal step, as it prompts the recruitment of scaffold proteins such as β -arrestins, leading to receptor internalization [24–26]. α_{1D} -AR signaling is subjected to negative regulation upon sustained agonist stimulation (homologous desensitization), and in response to unrelated mediators acting either through activation of other GPCRs, receptor tyrosine kinases, or protein kinase C (PKC) (heterologous desensitization) [6,18,27]. It is generally accepted that GPCR kinases (GRKs) phosphorylate this group of receptors during homologous desensitization, whereas second messenger-activated protein kinases such as PKC, seem to play major roles during the heterologous processes [28,29]. GRKs and PKCs are two protein kinase subfamilies involved in a plethora of physiological responses and have been classified based on their structure and cofactor regulation. On the one hand, PKCs have been grouped into: a) conventional (α , the splice variants β I and β II), b) novel (δ , ϵ , η , θ and μ), and c) atypical (ζ and λ) [30,31]. On the other hand, GRKs are categorized into the following subfamilies: a) visual (GRK1 and 7), b) GRK2 subfamily (GRK2 and 3), and c) GRK4 subfamily (GRK 4, 5 and 6) [32].

α_{1B} -ARs represent the most studied α_1 -AR and they are considered as prototypical of this receptor subfamily. Cottechia and colleagues have shown that five serine residues located at the α_{1B} -AR Ctail are the main sites of receptor phosphorylation and targets of GRK and PKC, as well as mainly responsible for receptor desensitization [33,34]. Interestingly, it is known that the α_{1A} - [35] and α_{1D} -AR subtypes are phosphorylated and desensitized even in Ctail-truncated mutants [19]. We recently reported that α_{1A} -ARs are phosphorylated at residues located at both the intracellular loop 3 (IL3) and the Ctail [36]. To the best of our knowledge, no information concerning the α_{1D} -AR specific phosphorylation sites has been reported and the kinases involved are largely unknown. Hence, the objective of this research was to identify and functionally characterize the α_{1D} -ARs phosphorylation sites and the kinases involved during homologous and heterologous desensitization.

To achieve this goal, we immunopurified α_{1D} -ARs and used mass spectrometry to assess the presence of phosphorylated residues; this was performed under baseline conditions and after cell stimulation with noradrenaline or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). We observed differential phosphorylation under the conditions explored and experimentally showed that GRK2 is mainly involved in the α_{1D} -AR phosphorylation observed during homologous desensitization, whereas conventional PKC isoforms participate in the heterologous process.

2. Material and methods

2.1. Reagents

(–)-Noradrenaline (NA), phorbol myristate acetate (PMA), bisindolylmaleimide I, and propranolol were obtained from Sigma-Aldrich Chemical. Paroxetine was a generous gift from Psicofarma SA de CV (Mexico) (<http://www.psicofarma.com.mx/>). Gö 6976 was from Calbiochem. [32 P]Pi (8500–9120 Ci/mmol) was obtained from Perkin-Elmer Life Sciences. Dulbecco's modified Eagle's medium, fetal bovine serum, trypsin, Lipofectamine 2000, streptomycin, penicillin, amphotericin B, blasticidin, hygromycin B, doxycycline hyclate and Fura-2AM were purchased from Invitrogen-Life Technologies. Polyethyleneimine was obtained from Polyscience. Polyvinylidene difluoride membranes were from BioRad, and SuperSignal West Pico Chemiluminescence kits were from Thermo Fisher Scientific. Agarose-coupled protein A was obtained from Merck-Millipore. Anti-phospho-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) (catalog number 9101S, lot: 30) and anti-total ERK (p42/44) (catalog number 4695S, lot: 21) antibodies were obtained from Cell

Signaling Technology; monoclonal anti-GFP was from Clontech (catalog number 632381, lot A5033481) and polyclonal anti-GFP was generated in our laboratory [37]. Secondary antibodies were purchased from Zymed (Thermo Fisher Scientific) or Jackson ImmunoResearch. Antibody dilutions were 1: 1000 for primary antibodies and 1: 10,000 for secondary antibodies.

2.2. Plasmids

cDNA coding for either amino- or amino/carboxyl truncated- α_{1D} -AR-EGFP constructs (Δ 1–79 and Δ 1–79 and Δ 440–572, respectively [19]) were subcloned into pEGFP-N1 (Clontech). These constructs were further subcloned into pCDNA5/FRT/TO to generate p Δ N- α_{1D} -AR-EGFP and p Δ NAC- α_{1D} -AR-EGFP (Flp-In T-rex expression system, Invitrogen). The latter constructs were mutagenized (S300/323/331/332/334A/T328V) to generate p Δ N-MutIL3-EGFP and p Δ NAC-MutIL3-EGFP by Mutagenex, Inc. Proper insertion and mutagenesis was confirmed by sequencing (Mutagenex, Inc.). pOG44 was obtained from Invitrogen. The plasmid for expression of the dominant negative form of GRK2, GRK2-K220R, was kindly donated by Dr. Jeffrey Benovic (Thomas Jefferson University) [38].

2.3. Cells and transfections

Parental Flp-In T-Rex HEK293 cells (Invitrogen) were routinely grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 μ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 0.25 μ g/ml amphotericin B. To generate inducible receptor-expressing cells, parental Flp-In T-Rex HEK293 cells were transfected with pCDNA5/FRT/TO, containing the cDNA coding for the desired mutant, and pOG44 using Lipofectamine 2000 following the manufacturer's instructions. Transfected cells were subjected to selection with 5 μ g/ml blasticidin and 100 μ g/ml hygromycin B, as previously described [39,40]. Experiments were performed after inducing receptor expression with 1 μ g/ml doxycycline hyclate (14–24 h). In all experiments using noradrenaline, 1 μ M propranolol was also added to avoid any β -adrenergic action; the β -blocker did not alter baseline parameters by itself (data not shown). In assays using the dominant negative form of GRK2, plasmid was transfected using polyethyleneimine [41] and experiments were carried out 72 h after transfection.

2.4. α_{1D} -AR purification and mass spectrometry analysis

We used ten 10 cm-diameter dishes (90% confluence) of HEK 293 cells expressing the α_{1D} -AR-EGFP per condition, in each experiment. Control experiments using non-induced HEK 293 cells were also performed. Cells were stimulated as indicated, washed twice with ice-cold PBS and solubilized for 1 h at 4 °C with ice-cold lysis buffer (10 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1% sodium cholate, 1% Nonidet P40, 10% SDS, 5 mM EDTA, pH 7.4, 10 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, leupeptine 20 mg/ml, phenylmethylsulfonyl fluoride 100 mg/ml, bacitracin 500 mg/ml, soybean trypsin inhibitor 50 mg/ml, 1 mM p-serine, 1 mM p-threonine and 1 mM p-tyrosine). The solubilized extracts were centrifuged at 12,700 \times g for 15 min. Pre-cleaning of the supernatants was performed using 100 μ l of protein A-agarose with constant agitation for 1 h at 4 °C. After 5000 \times g centrifugation, the supernatants were incubated overnight under constant agitation with 30 μ l anti-GFP serum and 30 μ l of protein A-agarose. Pellets were washed five times with lysis buffer and solubilized with Laemmli sample buffer [42] containing 20 mg/ml dithiothreitol, 10% SDS and 8 M urea. The samples were resolved by SDS-PAGE by running two 10% gels in parallel, one containing > 95% of the sample and another with the remaining amount. The first gel was stained with colloidal Coomassie Blue and the bands of interest were excised and sent for mass spectrometry analysis to the Taplin Mass Spectrometry Facility (Harvard Medical School). The second gel was used to confirm the presence of EGFP-tagged receptors

by Western blotting. Three different purification-mass spectrometry experiments were performed. A probability-based score, Ascore [43], that measures the probability of correct phosphorylation site localization based on the presence and intensity of site-determining ions in MS/MS spectra was employed. Two considerations were made: a) Ascore values > 19 were considered as the limit for reliable phosphorylation sites and b) when two sites were detected in the same peptide the different Ascore values were considered [43].

2.5. Receptor phosphorylation

Receptor phosphorylation was performed as previously described [19]. In brief, cells cultured in six well plates were incubated for 3 h in phosphate-free Dulbecco's Modified Eagle's media supplemented with 50 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{32}P]Pi. Labeled cells were stimulated as indicated, washed with ice-cold phosphate-buffered saline (137.9 mM NaCl, 2.7 mM KCl, Na_2HPO_4 10 mM; pH 7.4) (PBS) and solubilized for 1 h in the lysis buffer described above. The extracts were centrifuged and supernatants were incubated overnight with protein A-agarose and anti-eGFP antiserum generated in our laboratory [37]. Samples were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and exposed for 18–24 h. The amount of phosphorylated receptor was assessed by PhosphorImager analysis. Western blotting for loading controls was performed using a commercial anti-eGFP antibody (Clontech).

2.6. Intracellular calcium determinations

Intracellular calcium concentrations were assessed as previously described [18,19]. Cells were serum-starved for 2 h, 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. Labeled cells were washed three times to eliminate unincorporated dye. Fluorescence measurements were performed at 340- and 380-nm excitation wavelengths and at a 510-nm emission wavelength, with a chopper interval set to 0.5 s, using an Aminco-Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer. Intracellular calcium levels were calculated as described by Grynkiewicz et al. [44]

2.7. ERK 1/2 phosphorylation

Cells were serum-starved for 2 h. After stimulation with the indicated agents, cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed with Laemmli sample buffer [42]. Lysates were centrifuged at 12, 700 $\times g$ for 5 min, and proteins in supernatants were separated by SDS-PAGE. Proteins were electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membranes and immunoblotting was performed. Duplicate samples were run in parallel to determine total- and phospho-ERK 1/2 levels. For data normalization, the maximum response was considered as 100%.

2.8. Confocal microscopy

Cells were cultured in glass-bottomed Petri dishes and stimulated with the agents, for the times indicated, and immediately fixed with 4% paraformaldehyde. Images from 3 to 6 independent experiments, performed on different days, were obtained using a Fluoview Confocal microscope model FV10i (Olympus, LD laser, 405 nm [18 mW], 473 nm [12.5 mW], 635 nm [10 mW], 559 nm) with a water-immersion objective (60 \times). EGFP was excited at 480 nm, and the emitted fluorescence was detected at 515–540 nm. To determine the levels of receptor internalization, intracellular fluorescence (pixels) was measured using ImageJ software. Data were normalized to values obtained from unstimulated cells.

2.9. In silico analysis

Receptor sequences were obtained from the UniProt Knowledgebase [45]. α_{1D} -ARs orthologs: human (ID P25100); rat (ID 23944); mouse (ID P97714); pig (ID Q9TTM9); rabbit (ID O02666); human α_{1B} -AR (ID P35368) and human α_{1A} -AR (ID P35348). The sequence alignments were performed using the blast-protein suite (protein-protein BLAST, (<http://www.uniprot.org/blast/>)). The possible phosphorylation sites were obtained from analysis performed using NetPhos 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) [46] and the Group-based Prediction System, GPS 2.0 (<http://gps.biocuckoo.org/>) [47] on-line services, employing cut-off values of 0.75 and 4, respectively. Prediction of the probable protein kinases involved was obtained using GPS 2.0 [47].

2.10. Statistical analysis

Statistical comparisons between groups were performed employing a parametric analysis of variance with Bonferroni's post-test, assuming Gaussian data distribution (<http://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm>). We used the software included in the GraphPad Prism 6 software to perform these analyses. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Mass spectrometry analysis of α_{1D} -AR phosphorylation sites

A major goal of the present work was to identify the α_{1D} -AR sites phosphorylated under baseline and stimulated conditions. To accomplish this, we performed receptor immunopurification experiments using Flp-In T-Rex HEK293 cells expressing the 1–79 amino terminus-truncated α_{1D} -AR-EGFP (ΔN) [13–15] and treated with: vehicle (baseline), 10 μM NA or 1 μM PMA, for 15 min. As indicated previously, the amino-truncated receptor construct was used to achieve membrane expression; incubation times and agent concentrations were selected based on previously reported receptor phosphorylation data [19]. As shown in the Coomassie blue-stained gel, protein bands of this receptor's predicted molecular weight (M_r ~110 kDa, arrow) were enriched in the different samples (Fig. 1 panel A, left panel). The bands were identified by Western blotting using commercial anti-GFP antibodies (Fig. 1, panel A, right panel). To further confirm the specificity of the purified receptor, we compared immunopurified samples from Flp-In T-Rex HEK293 cells maintained in the absence or presence of doxycycline, which induces α_{1D} -AR-EGFP expression. As expected, a band with the molecular weight of the receptor was observed only in the sample obtained from cells in which α_{1D} -AR-EGFP expression was induced, as shown in both the Coomassie blue-stained gel and the anti-GFP Western blot (Fig. 1, panel B).

Mass spectrometry analysis of the immunopurified bands, from three independent experiments, revealed peptides corresponding to 38% of the total α_{1D} -AR sequence. From this total protein coverage, 66.6% of the IL3 and 77.1% of Ctail sequences were detected (Supplemental Fig. S1). Data showed receptor phosphorylation under basal conditions (Table 1). Additionally, phosphorylation sites were detected both at the receptor's third intracellular loop (IL3) and Ctail; some of these sites were predicted by bioinformatic analysis (Supplemental Table S1). At the IL3, we found that S331 appeared phosphorylated after NA stimulation, whereas S300, S323, S332, S334 and T328 were detected in the absence of stimulus and after cell activation with either NA or PMA (Table 1). By contrast, phosphorylation sites at the Ctail showed similarities and differences under the conditions studied; i. e., baseline phosphorylation sites: T477, S486, S516, S518, S543; NA: T442, T477, T507, S515, S516, S518, S543; and PMA-induced phosphorylation: S441, T442, T477, S486, S492, T507, S515, S516, S518, S543 (Fig. 2, panel A and Table 1). Other phosphorylation sites were detected but their Ascore was low.

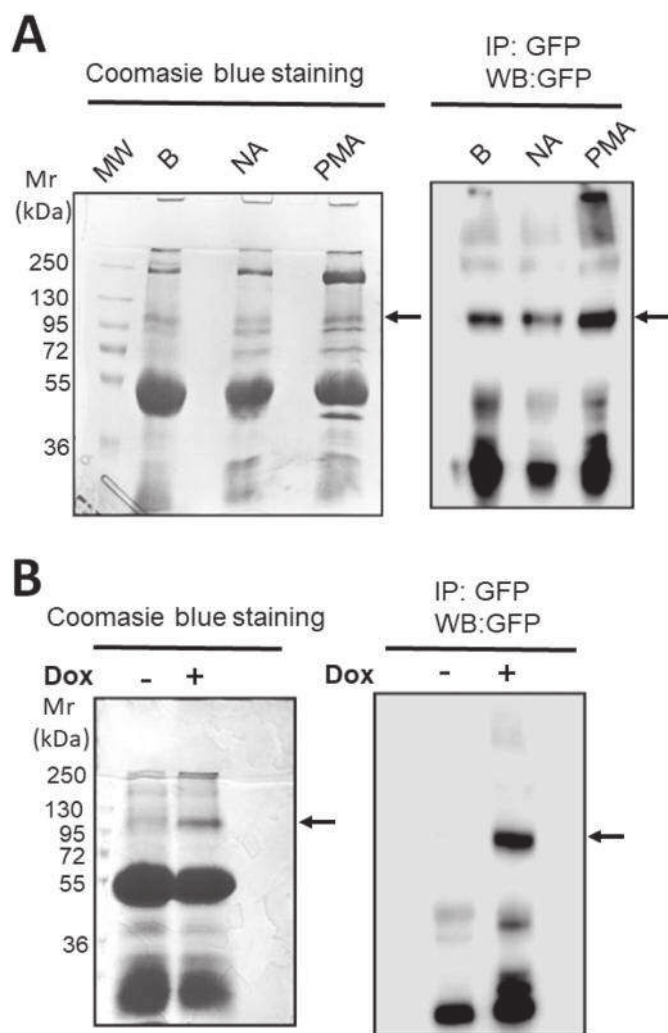


Fig. 1. Representative α_{1D} -AR immunopurification samples employed for the mass spectrometry studies. Panel A, Cells expressing the ΔN α_{1D} -AR-EGFP construct were treated with: no agent (baseline, B), 10 μ M NA, or 1 μ M PMA, for 15 min; subsequently were lysed and subjected to immunopurification as described in the Experimental Procedures. Samples were separated by SDS- polyacrylamide gel electrophoresis and stained with Coomassie blue (left image); molecular weight markers are shown in the first lane and their Mr is indicated. A small aliquot was also subjected to electrophoresis, and the gel was electrotransferred to a polyvinylidene fluoride membrane. Western blotting was performed using anti-GFP antibodies (right image). The arrows indicate α_{1D} -AR-EGFP localization. Three purifications, including the three different conditions, were performed on different days, and sent to mass spectrometry analysis. Panel B, immunopurified extracts from cells induced (doxycycline, Dox+) or not induced (Dox-) to express the α_{1D} -AR-EGFP construct were subjected to the procedure indicated for Panel A.

The putative protein kinases involved in these phosphorylations were explored by *in silico* analysis. Using the Group-based Prediction System, GPS 2.0 the kinases with significant likelihood of catalyzing phosphorylation at every detected site were identified. Unsurprisingly, in many cases, several kinases, including members of the GRK and PKC families, were able to phosphorylate these sites; other protein kinases, such as PKA, AKT, PDK-1 and members of the MAP kinase family, were also identified in the protein kinase prediction analysis (Supplemental Table S2). To obtain a general overview we color-coded the phosphorylated residues as follows: predicted protein kinase, GRK (green); predicted protein kinase, PKC (red); both kinase families were predicted (yellow). This generated the phosphorylation patterns shown in Table 1 and Fig. 2 (panel A), which suggest that qualitative differences in the α_{1D} -AR phosphorylation patterns exist under the conditions studied (Table 1).

Sequence alignment of the IL3 and Ctail domains of the α_{1D} -ARs of

different species was subsequently performed (Supplemental Fig. S2). A high degree of conservation among these orthologues, in almost all the phosphorylation sites, was detected. By contrast, when these domains of human α_{1A} -, α_{1B} - and α_{1D} -AR subtypes, were aligned, the identified phosphorylation sites were barely conserved (Supplemental Fig. S3).

3.2. α_{1D} -AR intracellular domains have distinct phosphorylation kinetics

Taking into consideration the previous bioinformatic and mass spectrometry analysis, we generated the mutant receptors shown in Fig. 2, panel B: 1) The 1-79 amino terminus-truncated receptor used in the previously described experiments (ΔN); 2) a 1-79 amino terminus- and 441–572 carboxyl terminus-truncated mutant ($\Delta N\Delta C$), previously described [19]; 3) the amino-truncated mutant with IL3 mutations [S (300, 323, 331, 332, 334)A, T328V] (ΔN -MutIL3) and 4) an amino- and carboxyl-truncated mutant with the substitutions described above at the IL3 ($\Delta N\Delta C$ -MutIL3). All these mutants were tagged with the EGFP for confocal microscopy visualization and immunoprecipitation studies.

We then performed time-course analysis of NA-induced receptor phosphorylation employing the different mutants. As shown in Fig. 3 (panel A), ΔN receptor baseline phosphorylation was rapidly increased after stimulation for 2, 5 and 15 min with NA; receptor phosphorylation subsequently decreased towards baseline level. By contrast, NA stimulation also induced rapid increases in $\Delta N\Delta C$ receptor phosphorylation, but this remained elevated throughout the experiment. Kinetics of mutant ΔN -MutIL3 phosphorylation in response to NA was markedly similar to that of $\Delta N\Delta C$. We detected no phosphorylation of $\Delta N\Delta C$ -MutIL3 at any of the times examined (Fig. 3, panel A).

In subsequent experiments, PKC was pharmacologically activated with PMA to mimic heterologous desensitization. A dramatic increase in ΔN phosphorylation was observed after 2 min of stimulation with PMA; this increase in receptor phosphorylation persisted after 5, 15, 30 and 60 min of stimulation (Fig. 3, panel B). This kinetic profile was also observed in cells expressing the receptor mutants $\Delta N\Delta C$ and ΔN -MutIL3, although the stimulation magnitude was smaller. Again, we detected no phosphorylation of the $\Delta N\Delta C$ -MutIL3 receptor (Fig. 3, panel B). Moreover, we simultaneously assessed the phosphorylation of the ΔN receptor with the other mutants and normalized all data to the phosphorylation observed in the ΔN mutant under baseline conditions. We observed a marked increase in the ΔN mutant phosphorylation, after stimulation for 15 min with NA or PMA, compared to $\Delta N\Delta C$ and ΔN -MutIL3 α_{1D} -AR mutants; these mutants also showed an increase in phosphorylation, but clearly to a lesser extent (~50%) (Supplemental material Fig. S4; panels A and B, respectively). When comparing ΔN with the $\Delta N\Delta C$ -MutIL3 mutant, we detected phosphorylation only in the former (Supplemental material Fig. S4, panel C). Collectively, these data experimentally confirmed that the α_{1D} -AR IL3 and Ctail domains are phosphorylated during homologous and heterologous desensitization. The data suggest that α_{1D} -AR IL3 phosphorylation mainly takes place at residues S300, S323, S331, S332, S334 and T328.

3.3. GRK2 and PKC α/β phosphorylate α_{1D} -AR during homologous and heterologous desensitization

Our next objective was to determine the protein kinases involved in α_{1D} -AR phosphorylation during homologous and heterologous desensitization. *In silico* analysis suggested major roles of GRK2 and PKC isoforms α/β , and of other protein kinases to a lesser extent (Supplemental Table S2). Taking this into consideration, we first blocked GRK2 activity using paroxetine, an antidepressant that has been shown to inhibit this protein kinase [48–50]. Cells expressing ΔN α_{1D} -ARs were preincubated with 100 μ M paroxetine for 15 min and then challenged with 10 μ M NA or 1 μ M PMA to assess receptor phosphorylation (Fig. 4, panel A). Paroxetine slightly diminished (not statistically significant) baseline receptor phosphorylation and markedly inhibited the actions of both NA and PMA. As anticipated, in parallel

Table 1 α_{1D} -AR phosphorylated peptides detected by mass spectrometry.

Immunopurified α_{1D} -ARs from cells incubated for 15 min in the absence of stimulus (baseline) or with 10 μ M NA or 1 μ M PMA were subjected to mass spectrometry analysis. The phosphopeptides identified are indicated with the modified residues marked in red; the sequence position (#), and domain location are indicated, as well as the number of times such peptide was identified (Hits). The prediction that such phosphorylation could be catalyzed by PKC isoforms (red), GRKs (green) or both (yellow) is also indicated.

#	a.a.	Location	Sequence	Baseline				NA				PMA			
				Hits	PKC	GRK	PKC GRK	Hits	PKC	GRK	PKC GRK	Hits	PKC	GRK	PKC GRK
300	S	IL3	KRERGKASEVVLRIH	5				9				12			
323	S	IL3	DGAHGMRSAKGHTFR	15				77				115			
328	T	IL3	MRSAKGHTFRSSLSV	4				11				17			
331	S	IL3	KGHTFRSSLSVRLK	–				3				–			
332	S	IL3	KGHTFRSSLSVRLK	4				7				1			
334	S	IL3	HTFRSSLSVRLKFS	15				23				15			
441	S	Ctail	GHHWRASSTGSLRQDC	–				–				11			
442	T	Ctail	GHHWRASSTGSLRQDC	–				1				1			
477	T	Ctail	PDPEPPGTPEMQAPV	7				2				15			
486	S	Ctail	EMQAPVASRRKPPSA	2				–				12			
492	S	Ctail	ASRRKPPSAFREWRL	–				–				2			
507	T	Ctail	LGPFRFP TQLRAKV	–				1				1			
515	S	Ctail	TQLRAKVSLSHKIR	–				2				3			
516	S	Ctail	QLRAKVSLSHKIRA	1				16				25			
518	S	Ctail	RAKVSSLSHKIRAGG	3				6				17			
543	S	Ctail	RSEVEAVSLGVPHEV	1				1				2			

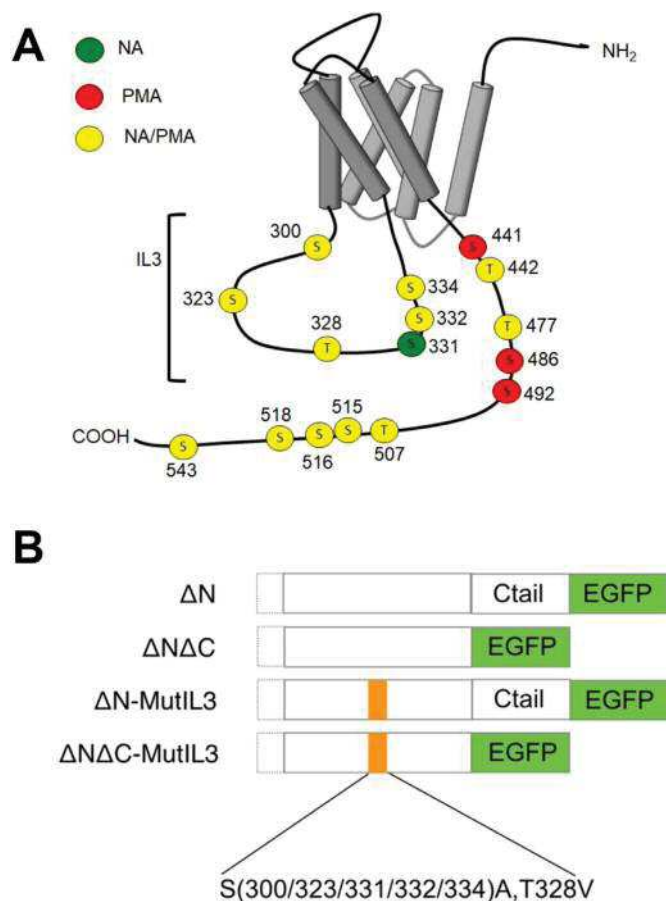


Fig. 2. Diagrams of the α_{1D} -AR indicating the observed phosphorylation sites and the different constructs employed in this study. Panel A, phosphorylation sites observed. Numbers indicate the residue sequence position, and letters identify the amino acid. Green (NA) sites only observed phosphorylated in samples from cells incubated with noradrenaline; Red (PMA) sites only observed in samples from cells incubated with phorbol myristate acetate; and Yellow (NA/PMA) sites observed phosphorylated in cells incubated with either NA or PMA. IL3, intracellular loop 3. Panel B, constructs. Δ N, dotted line in the diagram, indicates deletion of sequence coding for amino acids 1–79; Ctail represents amino acids 440–572. Orange section indicates the intracellular loop 3 and the numbers below represent the mutagenesis performed: serine residues changed to alanine and threonine 328 changed to valine.

experiments incubated only with a vehicle control, cell treatment with NA or PMA clearly increased Δ N α_{1D} -AR phosphorylation levels (Fig. 4, panel A). Similar experiments were performed using cells expressing the Δ N Δ C (Fig. 4, panel B) or the Δ N-MutIL3 receptor mutants (Fig. 4, panel C) and we obtained similar results, i.e., preincubation with paroxetine consistently inhibited the actions of NA and PMA. To further confirm these observations, we transfected cells expressing Δ N with a dominant negative form of GRK2. We observed that the Δ N receptor phosphorylation elicited by NA and PMA was partially inhibited by the GRK2 dominant negative mutant, as compared to control cells treated with the same agents (Supplementary material, Fig. S5, panel A) and similar results were obtained with the Δ N Δ C (Supplementary material Fig. S5, panel B) and Δ N-MutIL3 α_{1D} -AR mutants (Supplementary material, Fig. S5, panel C). Both approaches suggested that GRK2 participated in the α_{1D} -AR IL3 and Ctail domain phosphorylation, during homologous desensitization.

Next, we sought to identify the PKC isoforms involved in α_{1D} -AR heterologous desensitization. To do this, we used bisindolylmaleimide I, a general PKC inhibitor [51], and Gö 6976, a PKC inhibitor specific for the α/β isoforms [52]. Employing parallel experiments, we observed an increase in Δ N α_{1D} -AR phosphorylation upon NA and PMA incubation (Fig. 5, panel A). When cells were preincubated for 15 min with bisindolylmaleimide I, NA was able to increase this receptor phosphorylation; by contrast, the action of PMA was essentially abolished. Similar data were obtained using the Δ N Δ C and Δ N-MutIL3 α_{1D} -AR mutants pretreated with bisindolylmaleimide I, i.e., selective blockade of the action of PMA and only a small partial effect on NA-induced receptor phosphorylation (Fig. 5, panels B and C). Essentially the same data were obtained in experiments employing the three α_{1D} -AR mutants preincubated with Gö 6976 (Supplementary material, Fig. S6, panels A, B and C). These data suggest that PKC α/β might phosphorylate the identified α_{1D} -AR residues located at IL3 and Ctail domains during heterologous desensitization.

3.4. Phosphorylation sites at α_{1D} -AR third intracellular loops and carboxyl tail regulate Ca^{2+} signaling turn-off

The possible role of α_{1D} -AR IL3 and Ctail phosphorylation sites, in calcium signaling, was analyzed. As shown in Fig. 6 (panel A), NA triggered a rapid, but transient, increase in calcium concentration in cells expressing the Δ N and Δ N Δ C mutants. However, the NA-induced calcium response in cells expressing mutant Δ N-MutIL3 was diminished and that of the Δ N Δ C-MutIL3 receptor construct-expressing cells was barely detectable or absent in some of the experiments (Fig. 6, panel A,

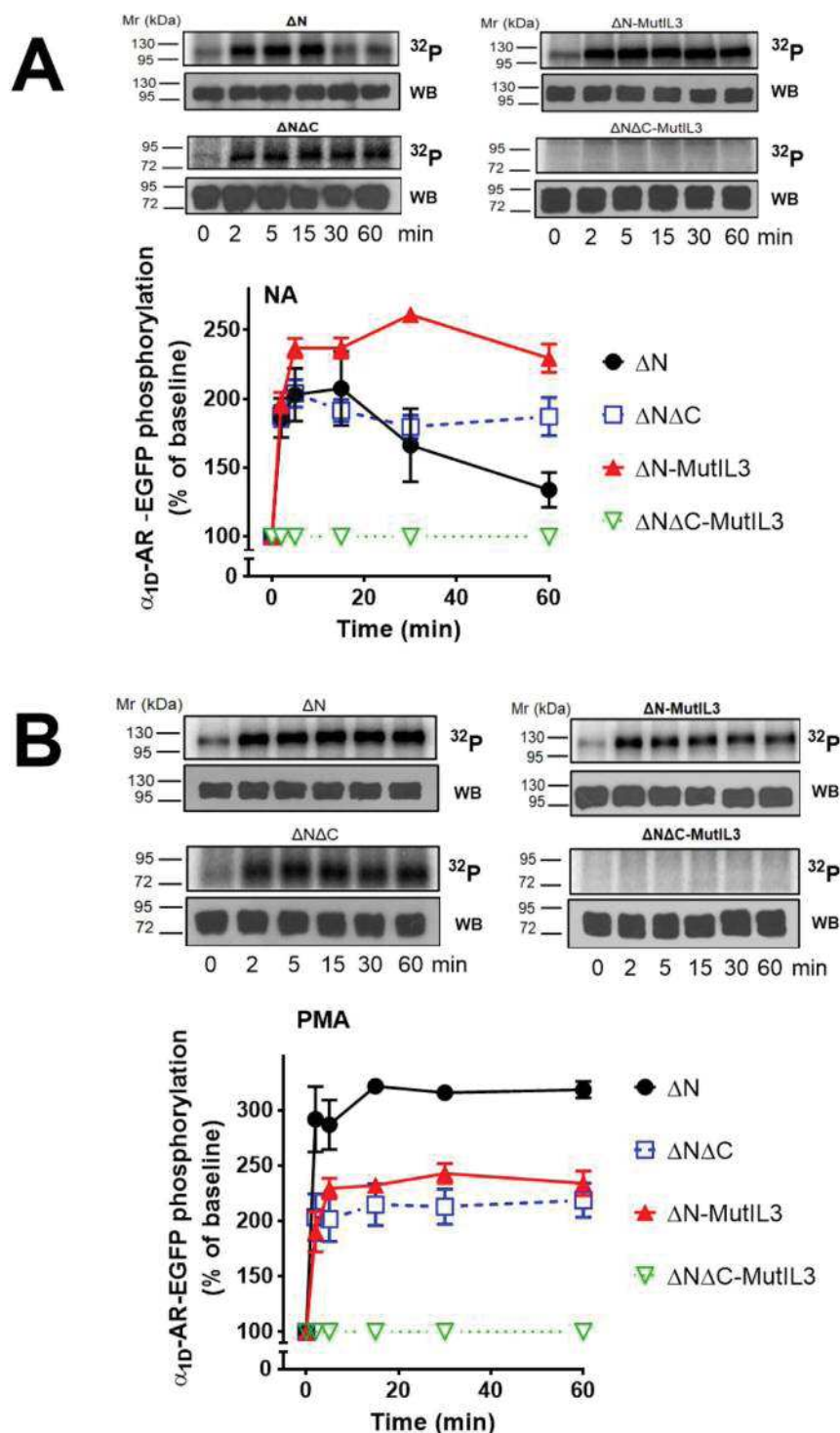


Fig. 3. Time-course of NA- and PMA-induced phosphorylation of the different α_{1D} -AR-EGFP mutants employed. Panel A, cells expressing the different constructs were incubated for the times indicated in the presence of 10 μ M NA and receptor phosphorylation was determined as indicated in the Experimental Procedures. ΔN mutant (black solid circles, black solid line; n = 6); $\Delta N\Delta C$ mutant (blue open square, blue dashed line; n = 4); ΔN -MutL3 mutant (red solid triangle, red solid line; n = 3); and $\Delta N\Delta C$ -MutL3 mutant (green inverted open triangle, green dotted line; n = 3). The number of independent experiments performed on different days (n) is indicated for each mutant and the means and vertical lines representing the S.E.M. are plotted. Representative autoradiographs (32 P) and Western blots (WB) are presented above the graph. Panel B, cells expressing the different constructs were incubated for the times indicated in the presence of 1 μ M PMA and receptor phosphorylation was determined as indicated in the Experimental Procedures. ΔN mutant (black solid circles, black solid line; n = 4); $\Delta N\Delta C$ mutant (blue open square, blue dashed line; n = 3); ΔN -MutL3 mutant (red solid triangle, red solid line; n = 3); and $\Delta N\Delta C$ -MutL3 mutant (green inverted open triangle, green dotted line; n = 4). The number of independent experiments performed on different days (n) is indicated for each mutant and plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. Representative autoradiographs (32 P) and Western blots (WB) are presented above the graph.

green line). To determine the possible functional repercussions of α_{1D} -AR domain phosphorylation sites in heterologous desensitization, we pharmacologically activated PKC with PMA for 5 and 10 min and then challenged the cells with NA. As anticipated, in cells expressing ΔN α_{1D} -ARs, PMA decreased the NA-induced calcium response at both times tested (~30%), i.e., receptors were desensitized by PKC activation (Fig. 6, panel B). A similar effect was observed in cells expressing $\Delta N\Delta C$ and incubated with PMA for 5 min; however, preincubation for 10 min with PMA resulted in markedly diminished response to NA (~70%) (Fig. 6, panel C). Interestingly, ΔN -MutL3 fully desensitized at both times assessed (Fig. 6, panel D). PKC inhibitors (1 μ M

bisindolylmaleimide I or 1 μ M Gö 6976) by themselves did not alter NA action (data not shown) but were able to block or markedly diminish the inhibitory action of PMA in the different mutants studied (Fig. 6, panels B–D).

To evaluate the role of α_{1D} -AR intracellular domains in calcium signaling during homologous desensitization, we incubated cells with 10 μ M NA for 5 or 10 min; after this incubation, the cells were washed twice with buffer to remove the catecholamine and the cells were then stimulated again with NA. In cells expressing the ΔN receptor, we observed a clear desensitization after 5 min, which was even more intense after 10 min of preincubation with NA (Fig. 6, panel B). Cells expressing

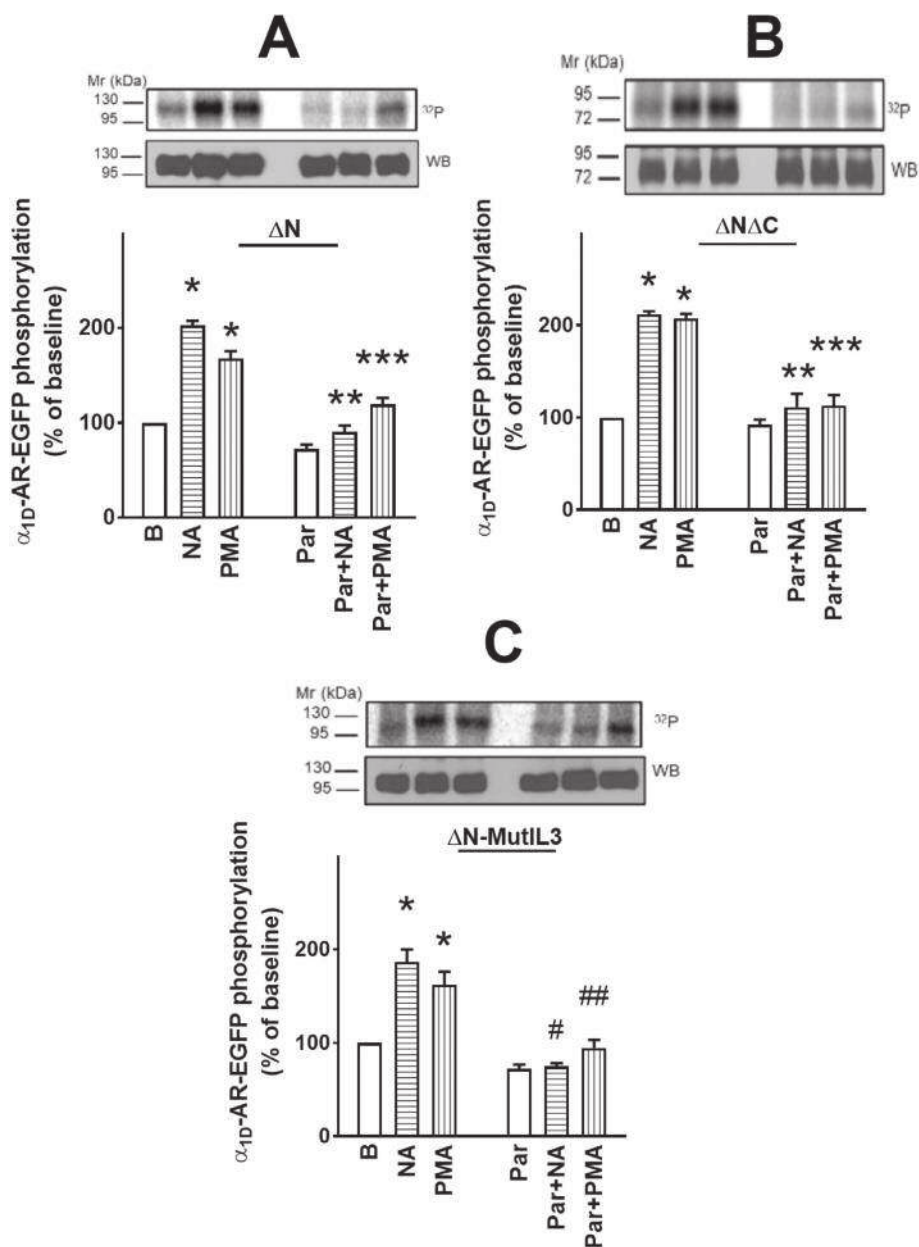


Fig. 4. Effect of paroxetine on NA- and PMA-induced phosphorylation of the α_{1D} -AR-EGFP mutants. Cells expressing the different constructs were incubated for 15 min in the absence of any agent or 100 μ M paroxetine (Par) and then further incubated for 15 min in the absence of any stimulus (B, baseline) or presence of 10 μ M NA or 1 μ M PMA; receptor phosphorylation was determined as indicated in the Experimental Procedures. In all cases cultures were processed in parallel and data were normalized to the percentage of the baseline value. Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of 5 independent experiments performed on different days. Panel A, cultures of the ΔN mutant. * $P < 0.001$ vs. baseline; ** $P < 0.001$ vs. NA alone; *** $P < 0.03$ vs. PMA alone. Panel B, cultures of the $\Delta N\Delta C$ mutant. * $P < 0.001$ vs. baseline; ** $P < 0.001$ vs. NA alone; *** $P < 0.001$ vs. PMA alone. Panel C, cultures of the ΔN -MutIL3 mutant. * $P < 0.001$ vs. baseline; ** $P < 0.001$ vs. NA alone; *** $P < 0.005$ vs. PMA alone. Representative autoradiographs (^{32}P) and Western blots (WB) are presented above each of the graphs.

$\Delta N\Delta C$ and ΔN -MutIL3 fully desensitized at both times tested (Fig. 6C and D).

Taking together, these data suggested functional redundancy in these α_{1D} -AR intracellular domains, i.e., the phosphorylation sites present in either IL3 or Ctail seems to be enough to allow calcium-signaling attenuation. Unfortunately, the $\Delta N\Delta C$ -MutIL3 α_{1D} -AR was defective in calcium signaling, which precluded further studies.

3.5. Phosphorylation of α_{1D} -AR intracellular domains regulates the ERK signaling pathway

The time-course of NA-induced ERK activation was investigated. In cells expressing the different α_{1D} -AR mutants, ERK 1/2 phosphorylation markedly increased after 2 and 5 min of incubation with NA. After this time, when the ΔN mutant was stimulated, ERK 1/2 phosphorylation decreased progressively reaching near-baseline levels at 60 min (Fig. 7); when the $\Delta N\Delta C$ mutant was activated, ERK 1/2 phosphorylation decreased more slowly and in cells expressing the ΔN -MutIL3 mutant, ERK 1/2 phosphorylation levels remained elevated even after 60 min.

Surprisingly, activation of $\Delta N\Delta C$ -MutIL3 α_{1D} -ARs by NA rapidly increased ERK 1/2 phosphorylation and this response was sustained during the 60 min of observation (Fig. 7). These experiments suggest that the α_{1D} -AR IL3 and Ctail domains are not redundant for regulating the ERK pathway.

3.6. Phosphorylation of α_{1D} -AR intracellular domains and receptor internalization

Finally, we studied α_{1D} -AR-EGFP internalization using confocal microscopy. In cells expressing the ΔN mutant, the receptor was mainly localized at the plasma membrane, with intracellular fluorescence barely detectable (Baseline) (Supplemental Fig. S7). This changed upon stimulation with NA; i.e., we observed marked intracellular fluorescence accumulation upon stimulation for 5 and 15 min with NA, and at later times of NA stimulation decreased to levels like to those observed under baseline conditions. By contrast, PMA-mediated internalization occurred more slowly, progressively reaching a maximum after 60 min (Fig. 8, panel A and Supplemental Fig. S7). In these cells, when GRK2

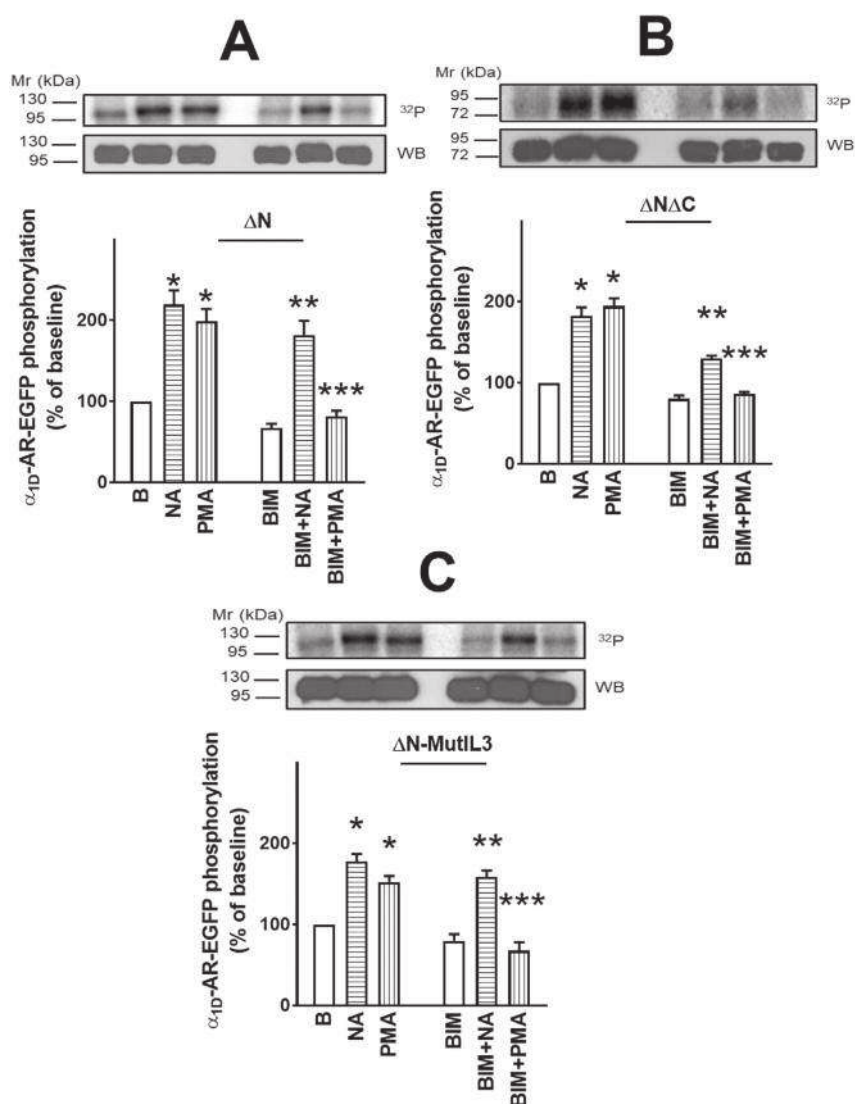


Fig. 5. Effect of bisindolylmaleimide I on NA- and PMA-induced phosphorylation of the α_{1D} -AR-EGFP mutants. Cells expressing the different constructs were incubated for 15 min in the absence of any agent or 1 μ M bisindolylmaleimide I (BIM) and then further incubated for 15 min in the absence of any stimulus (B, baseline) or presence of 10 μ M NA or 1 μ M PMA; receptor phosphorylation was determined as indicated in the Experimental Procedures. In all cases cultures were processed in parallel and data were normalized to the percentage of the baseline value. Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of 5 independent experiments performed on different days. Panel A, cultures of the ΔN mutant. * P < 0.001 vs. baseline; ** P < 0.001 vs. baseline and P < 0.001 vs. BIM, *** P < 0.001 vs. PMA alone. Panel B, cultures of the $\Delta N\Delta C$ mutant. * P < 0.001 vs. baseline; ** P < 0.005 vs. BIM and P < 0.001 vs. NA alone; *** P < 0.001 vs. PMA alone. Panel C, cultures of the ΔN -MutIL3 mutant. * P < 0.001 vs. baseline; ** P < 0.001 vs. BIM; *** P < 0.001 vs. PMA alone. Representative autoradiographs (32 P) and Western blots (WB) are presented above each of the graphs.

was inhibited by pretreatment with 100 μ M paroxetine, receptor internalization was markedly diminished with fluorescence remaining primarily at the plasma membrane after 15 min of NA treatment, whereas NA-induced internalization occurred, as expected, in control cells incubated without the inhibitor (Fig. 8, panel C, and Supplemental Fig. S8). Paroxetine treatment alone induced some reduction in cell size (contraction) (Supplemental Fig. S8) but did not induce any change in the receptor subcellular distribution (Fig. 8, panel C). Similarly, co-transfection of the GRK2 dominant negative mutant, markedly reduced NA-induced internalization (Supplemental Fig. S9). When cells were preincubated with Gö 6976 to block PKC activity and then were treated with PMA no receptor internalization was detected (Fig. 8, panel D and Supplemental Fig. S10). Cells pretreated with Gö 6976 appeared to have less intracellular fluorescence, but this small change was not statistically significant. These data indicate that GRK2 and PKC activities are relevant for α_{1D} -AR internalization during both homologous and heterologous desensitizations. In cells expressing the ΔN -MutIL3 mutant, the receptor was also mainly localized at the plasma membrane under baseline conditions (Supplemental Fig. S11); receptor internalization was observed in response to NA or PMA but the kinetics of these processes differ from those observed with the ΔN mutant (Fig. 8, panels A and B). Stimulation for 5 and 15 min with NA increased intracellular fluorescence accumulation and this remained at a similar level after 30 and 60 min of stimulation with the adrenergic agonist.

PMA-mediated internalization reached its maximum at 15 min and remained at a similar level during the 60 min of incubation (Fig. 8, panel B and Supplemental Fig. S11). Unexpectedly, cells expressing Ctail-truncated receptors ($\Delta N\Delta C$ and $\Delta N\Delta C$ -MutIL3 mutants) showed an important amount of fluorescence located intracellularly (Supplemental Fig. S12) blocking the possibility of studying internalization of Ctail-truncated α_{1D} -AR receptors.

4. Discussion

The major contributions of this work were the identification of α_{1D} -AR phosphorylation sites and the discovery that these sites differ when cells are stimulated by NA or PMA during homologous and heterologous desensitization, respectively. To the best of our knowledge, only phosphorylation sites of hamster α_{1B} -AR and human α_{1A} -AR have been reported for the α_1 -AR subfamily [33,36]. Regarding the α_{1B} -AR, Diviani and coworkers [33] used mutagenesis to identify phosphorylation of S404, S408 and S410 after noradrenaline stimulation and S394 and S400 upon phorbol ester treatment. These sites are located exclusively at the receptor Ctail and are conserved in the human orthologue but not in human α_{1D} -AR. We previously identified a total of 18 phosphorylated residues in α_{1A} -ARs, distributed along carboxyl tail and third intracellular loop [36]. Although the 16 α_{1D} -AR phosphorylated residues detected by mass spectrometry are also dispersed through the same

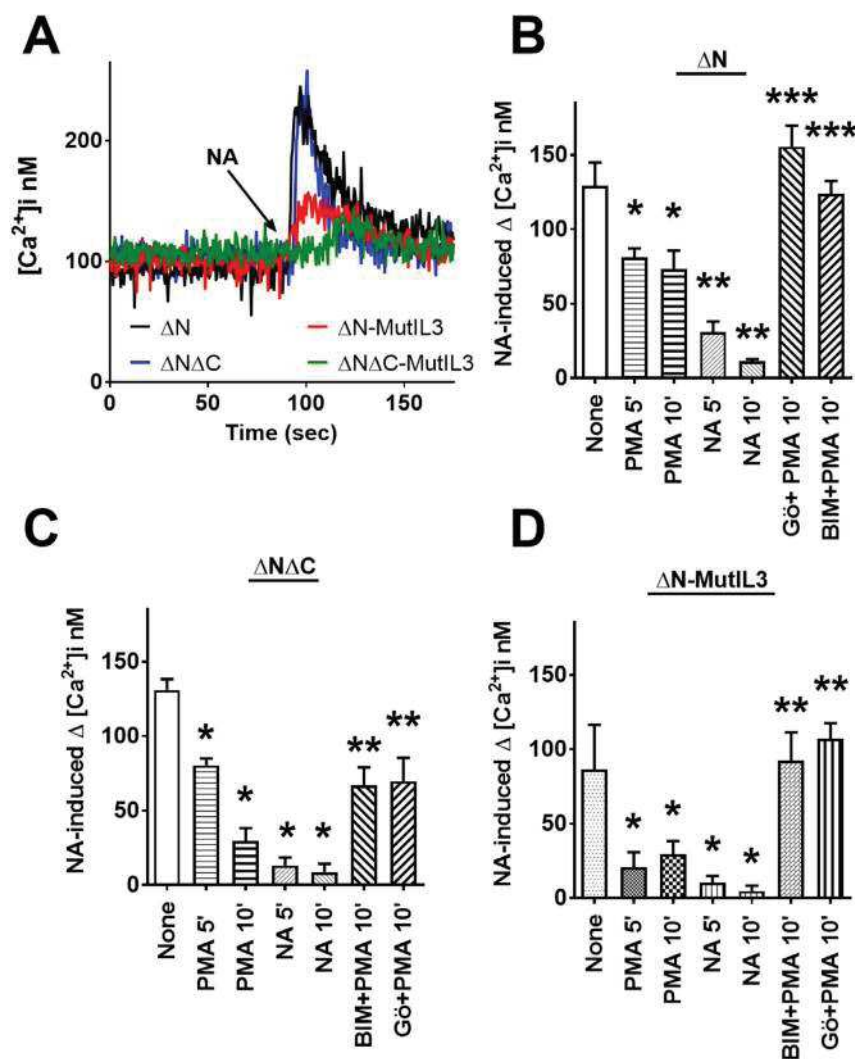


Fig. 6. Noradrenaline-induced increase in intracellular calcium levels and desensitization of the α_{1D} -AR-EGFP mutants. Panel A, representative calcium tracings of the effect of 10 μ M NA in cells expressing the different α_{1A} -AR-EGFP mutants. Arrow indicates the time of NA addition to the cells. The tracings are color-coded: Δ N mutant-expressing cells, black; Δ N Δ C mutant-expressing cells, blue; Δ N-MutIL3 mutant-expressing cells, red; and Δ N Δ C-MutIL3 mutant-expressing cells, green. In panels B-D, the cells were preincubated as indicated in the abscissas (i.e., none, no treatment; 1 μ M PMA for 5 or 10 min; 10 μ M NA for 5 or 10 min; 1 μ M BIM or 1 μ M Gö for 15 min followed by 1 μ M PMA for 10 min. When NA was used in the preincubation, the cells were washed twice and resuspended in fresh buffer; in the other preincubations the cells were not washed. After these cells were challenged with 10 μ M NA and the increase in intracellular calcium was registered. Data are presented as the increase in intracellular calcium (nM) induced by the catecholamine. In all cases, plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of 6–10 determinations in independent experiments. Panel B (Δ N mutant-expressing cells): * P < 0.005 vs. none; ** P < 0.001 vs. none; *** P < 0.05 vs. PMA 10 min. Panel C (Δ N Δ C mutant-expressing cells): * P < 0.01 vs. none; ** P < 0.001 vs. none; *** P < 0.005 vs. PMA 10 min. Panel D (Δ N-MutIL3 mutant-expressing cells): * P < 0.001 vs. none; ** P < 0.001 vs. PMA 10 min.

intracellular domains, they are not conserved in the α_{1A} -AR subtype; only phospho-T507 of the α_{1D} -AR corresponds to phospho-S407 of the α_{1A} -AR subtype. The latter data suggest that specific phosphorylation sites in each member of the subfamily might be responsible for the differential signaling and regulatory properties of these receptors.

Mass spectrometry analysis has allowed the identification of a growing number of receptor phosphorylation sites (Reviewed in [53]). We found phosphorylation sites at both the IL3 and Ctail; in the IL3, NA-induced phosphorylation of S331 was the only change observed, whereas the phosphorylation patterns changed markedly with the different treatments, at the Ctail. Interestingly, when comparing the sites detected by mass spectrometry with those predicted by bioinformatic tools, the correspondence was approximately 50%. Our results revealed that α_{1D} -ARs are phosphorylated under baseline conditions and that cell stimulation with either NA or PMA modified these patterns. These data are consistent with the phosphorylation bar code hypothesis, which described specific muscarinic M₃ receptor phosphorylation patterns generated after different stimuli [54,55] and our data obtained with α_{1A} -ARs [36]. We have consistently observed that α_{1D} -ARs are phosphorylated under baseline conditions [18,19,27]; therefore, it is not surprising to observe that 11 out of the 16 identified phosphorylation sites were present in samples from non-stimulated samples. Several additional aspects should also be considered. α_{1D} -ARs have constitutive activity [21,23,56–58] and signaling associated with them is likely to be constantly occurring. Additionally, the mass spectrometry analysis used is qualitative and represents the pooled

information of many individual receptors in different cells. It is therefore likely, that the information obtained represents the pooled data of a population of receptors phosphorylated to different extents and at different positions. The increased number of phosphorylated peptides, quantitatively (hits) and qualitatively (i. e., phosphorylation at different residues) seem to reflect NA- and PMA-induced receptor phosphorylation. Analysis of the kappa opioid receptor phosphorylation [59] has shown that two full agonists, U50, 488H and etorphine, phosphorylate S356, T357, T363 and S369. However, U50, 488H induced higher levels of phosphorylation and internalization than etorphine. Additionally, it was determined that ~60% and ~30% of the kappa opioid receptor populations were phosphorylated following U50,488H and etorphine treatments, respectively [59]. Thus, in addition to the phosphorylation bar codes, the differential α_{1D} -AR outcomes elicited by NA and PMA might be attributed to “phosphorylation thresholds”, i.e., the possibility that a minimum number of receptors with a particular phosphorylation pattern may be required to trigger a response. Quantitative experimental work will be required to confirm this hypothesis.

In comparative parallel experiments, we observed that both the carboxyl truncated mutant Δ N Δ C and the IL3 mutant (Δ N-mutIL3) were subjected to phosphorylation but that this occurred to a lesser extent than with the Δ N mutant. Therefore, both IL3 and Ctail domains contribute to total receptor phosphorylation. Consistent with this idea is the observation that receptor phosphorylation was not detected in a mutant lacking the Ctail and mutated at the IL3 (Δ N Δ C-mutIL3). Therefore, the experimental evidence indicates that α_{1D} -ARs are mainly

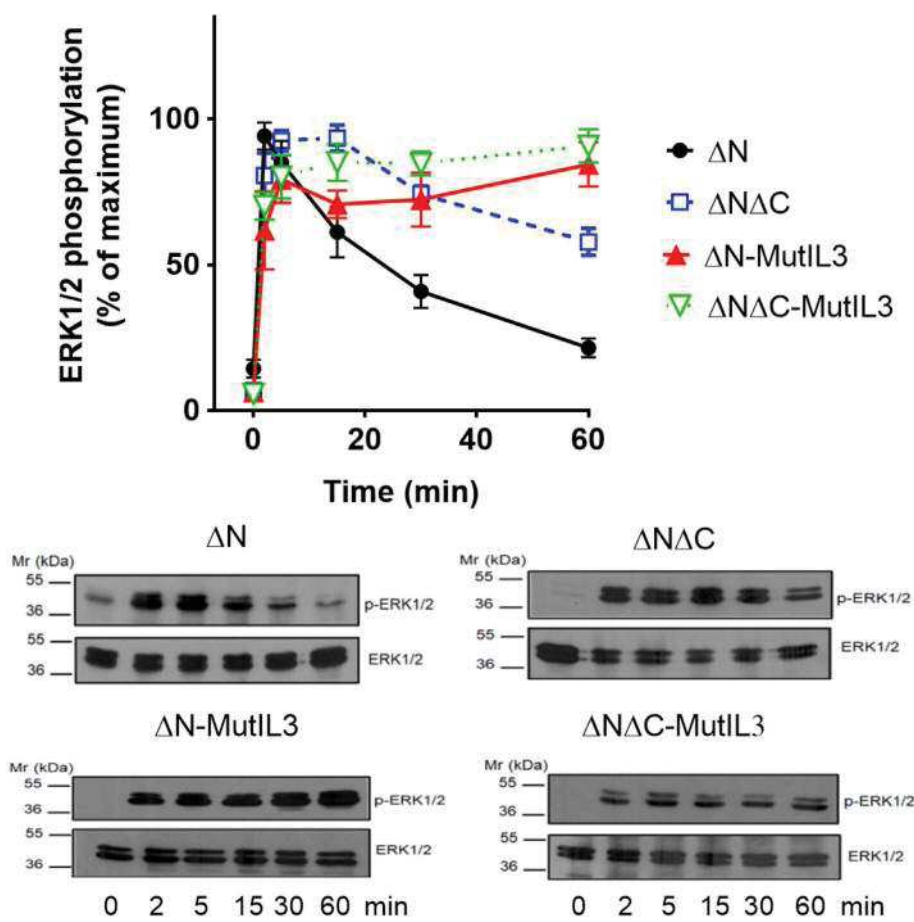


Fig. 7. Time-course of NA-induced ERK 1/2 phosphorylation in cells expressing the different α_{1D} -AR-EGFP mutants. Cells expressing the different constructs were incubated for the times indicated in the presence of 10 μ M noradrenaline (NA) and ERK 1/2 phosphorylation levels were determined as indicated in the Experimental Procedures. Δ N mutant (black solid circles, black solid line; n = 5); Δ N Δ C mutant (blue open square, blue dashed line; n = 6); Δ N-MutIL3 mutant (red solid triangle, red solid line; n = 4); and Δ N Δ C-MutIL3 mutant (green inverted open triangle, green dotted line; n = 6). The number of independent experiments performed on different days (n) is indicated for each mutant. Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. Representative Western blots for total ERK 1/2 and phospho-ERK 1/2 are presented below the graph.

phosphorylated at residues S300, S323, S332, S334 and T328, located at the IL3. Mass spectrometry identification of phosphorylation sites at the IL3 has been observed in other GPCRs including the β_2 -adrenoceptors [60], α_{2A} -adrenoceptors [61], vasopressin V2 [62], and dopamine D2 receptors [63], among others.

In this work we also observed a marked change in the phosphorylation status of residues located at the α_{1D} -AR's Ctail; we identified two clusters of residues at this domain: 1) T477, S486, S292, and 2) T507, S515, S516, S518. However, further experiments will be needed to determine their role in receptor function and regulation. Previously,

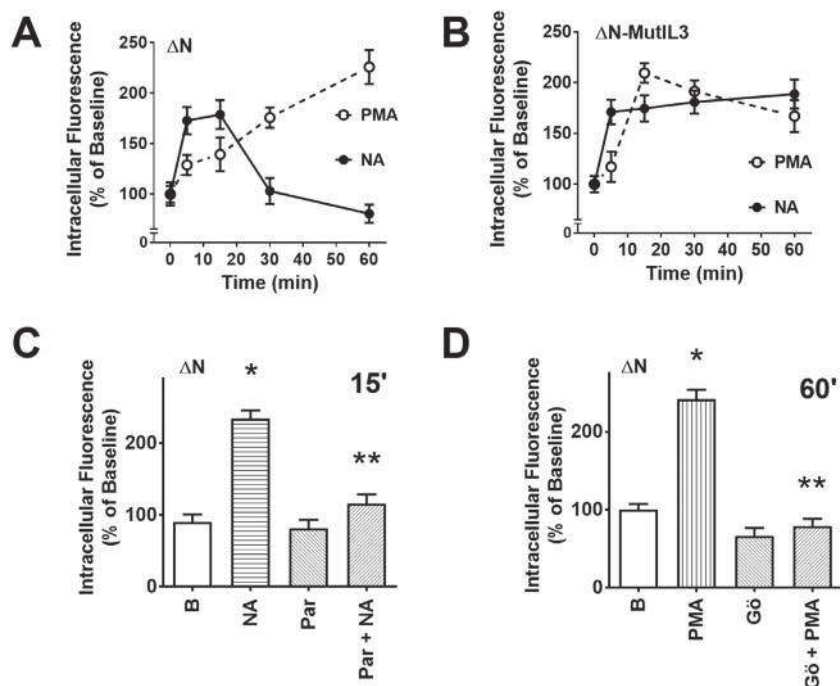


Fig. 8. Effects of NA, PMA, paroxetine and Gö 6976 on Δ N- α_{1D} -AR-EGFP and Δ N-MutIL3 internalization. Panels A and B, Accumulation of intracellular fluorescence in response to 10 μ M NA or 1 μ M PMA stimulation in cells expressing Δ N- and Δ N-MutIL3- α_{1D} -AR-EGFP constructs. Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of 5–6 independent experiments in which 5–6 different cells were analyzed (n = 30–35). Panel C, cells expressing the Δ N- α_{1D} -AR-EGFP construct were incubated for 15 min in the absence or presence of 100 μ M paroxetine (Par) and then the cells were incubated for 15 min with vehicle or 10 μ M NA. Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of 4 independent experiments in which 3–5 different cells were analyzed (n = 16–20). **P* < 0.001 vs. baseline (B); ***P* < 0.02 vs. NA. Panel D, cells expressing the Δ N- α_{1D} -AR-EGFP construct were incubated for 15 min in the absence or presence of 1 μ M Gö 6975 (Gö) and then the cells were incubated for 60 min with vehicle or 1 μ M PMA. Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of 4 independent experiments in which 3–5 different cells were analyzed (n = 16–20). **P* < 0.001 vs. baseline (B); ***P* < 0.001 vs. PMA.

study of the free fatty acid receptor 4, FFA4, by Prihandoko et al. [64] identified five phosphorylation sites arranged in two clusters located in the Ctail: 1) T347, T349, S350 and 2) S357 and S361. They found that cluster 1 mostly regulated Akt triggering, while cluster 2 participated in receptor internalization [64]. These data indicate that there are different points of regulation controlled by phosphorylated residues in close proximity.

The prediction that several protein kinases might phosphorylate α_{1D} -ARs obtained in by in silico analysis, adds complexity to the fine dissection of the entities involved. In the present work we analyzed the possible involvement of two of these kinases: PKC and GRK2. To confirm the role of PKC during heterologous desensitization we used a pharmacological approach. In an effort to narrow down the PKC isoforms involved in α_{1D} -AR, we employed Gö 6976, a PKC inhibitor with specificity for the α/β isoforms [52]. Using this inhibitor, we observed not only a dramatic decrease in PMA-induced receptor phosphorylation but also functional evidence of the roles of these PKC isoforms in calcium signaling desensitization, and receptor internalization. The finding that conventional PKC isoforms are involved in heterologous desensitization is not surprising. We previously reported their involvement in the phosphorylation and desensitization of other GPCRs, such as lysophosphatidic acid receptor 1 (LPA₁) [65] and sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P₁) [66]. It is possible that these PKC isoforms might participate in phosphorylation and desensitization of a much larger number of GPCRs.

Additionally, the participation of GRK2 during homologous desensitization was studied. The use of pharmacological (paroxetine) and genetic (expression of GRK2-dominant negative mutant) approaches to decrease GRK2 activity diminished α_{1D} -AR phosphorylation and internalization. Interestingly, preincubation with paroxetine or GRK2-dominant negative mutant expression inhibited receptor internalization when cells were stimulated with NA. Interestingly, paroxetine was able to decrease both NA- and PMA-induced α_{1D} -AR phosphorylation. It is known that PKC can phosphorylate and activate GRK2 [67,68]; therefore, it is possible that crosstalk between these protein kinases might participate in the observed effects.

It was of interest that mutation of α_{1D} -AR IL3 or deletion of the Ctail had an impact on several of the signaling events triggered by receptor activation. As observed previously, using Rat-1 fibroblasts [19], and also in the present work with HEK293 cells, Ctail truncation (Δ NA Δ C) had little effect on the maximum calcium increase. However, IL3 mutation (Δ N-MutIL3) resulted in a receptor with a diminished ability to increase intracellular calcium and that in which the Ctail was truncated (Δ NA Δ C-MutIL3) hardly induce any increase in intracellular calcium in response to NA. There is evidence indicating that the IL3 plays a key role in GPCR-G protein coupling and that also other intracellular domains might participate [69,70]. Therefore, our data suggest that such α_{1D} -AR domains (IL3 and Ctail) might participate in receptor-Gq protein coupling and that mutation of the first and deletion of the second could hamper this interaction. PMA-induced α_{1D} -AR desensitization was observed in the Δ N mutant and was more rapid and more intense in the Δ NA Δ C and Δ N-MutIL3 receptor mutants. Nevertheless, this desensitization was also observed with receptors lacking the Ctail or the phosphorylation sites present in the IL3, which suggests that the function of these sites in receptor desensitization may be redundant. As indicated, cells expressing the Δ NA Δ C-MutIL3 mutant barely increased intracellular calcium levels in response to NA stimulation, which did not allow us to test their sensitivity to PMA. Similarly, homologous desensitization of the calcium response was essentially irreversible, which limited further experimentation and conclusions, i. e. receptor activation might lead to depletion of calcium or signaling intermediates, such as phosphoinositides, and not necessarily indicate actions at the receptor level.

When NA-induced ERK 1/2 phosphorylation time-courses were studied some unexpected findings were made. In cells expressing the Δ N construct, NA action was rapid and transient; this is similar to what

has been previously observed by another group [5]. It was surprising that cells expressing the Δ NA Δ C-MutIL3 mutant, which were inefficient in increasing intracellular calcium levels were able to rapidly increase ERK 1/2 phosphorylation in response to NA stimulation and sustain this effect throughout the 60 min of the experiment; i.e. these receptors signaled in a biased fashion. Interestingly, cells expressing the Δ N-MutIL3 receptors also showed a similar sustained ERK 1/2 phosphorylation response. These data suggested that the phosphorylated residues identified in the IL3 might play a major role in desensitizing the receptor-mediated ERK 1/2 response. However, we cannot rule out roles of the receptor's Ctail. NA-induced ERK 1/2 phosphorylation of cells expressing the Δ NA Δ C mutant decreased at a much slower rate than those expressing the Δ N mutant. In addition, we have previously shown that deletion of the α_{1D} -AR Ctail alters the MAP kinase pathway in a cell context-dependent fashion [6]. The α_{1D} -AR Ctail appears to be of importance for its proper plasma membrane processing i.e., folding/targeting/insertion, in particular through interaction of a Ctail-located α_{1D} -AR PDZ domain with syntrophins [71,72]. Unfortunately, this limited further experiments to explore α_{1D} -AR Ctail-truncated receptor internalization.

Finally, the receptor internalization kinetics of the Δ N construct was very different in response to NA and PMA. The action of NA was transient, reaching a maximum level within 15 min and subsequently decreasing, whereas the response to PMA was almost linear during the 60 min of incubation. How such differential internalization kinetics is related to the described phosphorylation patterns or to receptor- β -arrestin interaction is currently unknown. Our present findings represent an additional step towards understanding α_{1D} -AR signaling and identify new possibilities to further analyze the molecular events that participate in the regulation of these receptors.

Transparency document

The <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.03.006> associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to Psicopharma SA de CV for the generous gift of paroxetine and to Dr. Edith Zárate, Head of Academic Relations and Collaborations of this industry, for her kind help. We thank Dr. Jeffrey Benovic for his generous donation of the plasmid for expression of the GRK2-dominant negative mutant. The advice of Ross Tomaino, Associate Director of the Taplin Mass Spectrometry Facility (Harvard Medical School, USA) was very important for the development of this work, and it is gratefully acknowledged. We thank Dr. Aurelio Hernández-Méndez and Dr. Rocío Alcántara-Hernández for their help and advice during the initial phase of this work. The technical help and advice of Juan Barbosa, Aurey Galván, and Manuel Ortíz, is gratefully acknowledged. We thank Nadia T. Cedillo-Romero for her editorial work with the revised version of the manuscript. This work was partially supported by Grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) [Grant numbers 253156 and FDC-882] and Dirección General de Personal Académico [PAPIIT, Grant number IN200915]. GC-R and DAH-E are students of Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas and Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, respectively, and are supported by Fellowships from CONACYT.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.03.006>.

References

- [1] J.A. García-Sáinz, J. Vázquez-Prado, R. Villalobos-Molina, Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease, *Arch. Med. Res.* 30 (1999) 449–458.
- [2] J.P. Hieble, D.B. Bylund, D.E. Clarke, D.C. Eikenburg, S.Z. Langer, R.J. Lefkowitz, K.P. Minneman, R.R. Ruffolo Jr., International Union of Pharmacology. X, Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update, *Pharmacol. Rev.* 47 (1995) 267–270.
- [3] R.J. Lefkowitz, A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 52 (2013) 6366–6378.
- [4] J.A. García-Sáinz, J. Vázquez-Prado, L.C. Medina, Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation, *Eur. J. Pharmacol.* 389 (2000) 1–12.
- [5] M. Pérez-Aso, V. Segura, F. Monto, D. Barettoni, M.A. Noguera, G. Milligan, P. D'Ocon, The three alpha1-adrenoceptor subtypes show different spatio-temporal mechanisms of internalization and ERK1/2 phosphorylation, *Biochim. Biophys. Acta* 1833 (2013) 2322–2333.
- [6] M.A. Alfonso-Mendez, J.A. Castillo-Badillo, M.T. Romero-Ávila, R. Rivera, J. Chun, J.A. García-Sáinz, Carboxyl terminus-truncated alpha1D-adrenoceptors inhibit the ERK pathway, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 389 (2016) 911–920.
- [7] A. Tanoue, Y. Nasa, T. Koshimizu, H. Shinoura, S. Oshikawa, T. Kawai, S. Sunada, S. Takeo, G. Tsujimoto, The alpha(1D)-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 765–775.
- [8] M. Ibarra, J.A. Terrón, J.J. López-Guerrero, R. Villalobos-Molina, Evidence for an age-dependent functional expression of alpha 1D-adrenoceptors in the rat vasculature, *Eur. J. Pharmacol.* 322 (1997) 221–224.
- [9] R. Villalobos-Molina, J.J. López-Guerrero, M. Ibarra, Functional evidence of alpha1D-adrenoceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats, *Br. J. Pharmacol.* 126 (1999) 1534–1536.
- [10] R. Gisbert, K. Ziani, R. Miquel, M.A. Noguera, M.D. Ivorra, E. Anselmi, P. D'Ocon, Pathological role of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats, *Br. J. Pharmacol.* 135 (2002) 206–216.
- [11] J.A. García-Sáinz, R. Villalobos-Molina, The elusive alpha(1D)-adrenoceptor: molecular and cellular characteristics and integrative roles, *Eur. J. Pharmacol.* 500 (2004) 113–120.
- [12] M. Yang, F. Verfurth, R. Buscher, M.C. Michel, Is alpha1D-adrenoceptor protein detectable in rat tissues? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 355 (1997) 438–446.
- [13] C. Hague, Z. Chen, A.S. Pupo, N.A. Schulte, M.L. Toews, K.P. Minneman, The N terminus of the human {alpha}1D-adrenergic receptor prevents cell surface expression, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309 (2004) 388–397.
- [14] C. Hague, M.A. Uberti, Z. Chen, R.A. Hall, K.P. Minneman, Cell surface expression of {alpha}1D-adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with {alpha}1B-adrenergic receptors, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 15541–15549.
- [15] A.S. Pupo, M.A. Uberti, K.P. Minneman, N-terminal truncation of human alpha1D-adrenoceptors increases expression of binding sites but not protein, *Eur. J. Pharmacol.* 462 (2003) 1–8.
- [16] D. Chalothorn, D.F. McCune, S.E. Edelman, M.L. García-Cazarin, G. Tsujimoto, M.T. Piascik, Differences in the cellular localization and agonist-mediated internalization properties of the alpha(1)-adrenoceptor subtypes, *Mol. Pharmacol.* 61 (2002) 1008–1016.
- [17] D.F. McCune, S.E. Edelman, J.R. Olges, G.R. Post, B.A. Waldrop, D.J. Waugh, D.M. Perez, M.T. Piascik, Regulation of the cellular localization and signaling properties of the alpha(1B)- and alpha(1D)-adrenoceptors by agonists and inverse agonists, *Mol. Pharmacol.* 57 (2000) 659–666.
- [18] C.E. Rodríguez-Pérez, E. Calvo-Ochoa, E.V. Kalashnikova, G. Reyes-Cruz, M.T. Romero-Ávila, J.A. García-Sáinz, Receptor tyrosine kinases regulate alpha1D-adrenoceptor signaling properties: phosphorylation and desensitization, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 1276–1283.
- [19] C.E. Rodríguez-Pérez, M.T. Romero-Ávila, G. Reyes-Cruz, J.A. García-Sáinz, Signaling properties of human alpha(1D)-adrenoceptors lacking the carboxyl terminus: intrinsic activity, agonist-mediated activation, and desensitization, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 380 (2009) 99–107.
- [20] T.S. Kountz, K.S. Lee, S. Aggarwal-Howarth, E. Curran, J.M. Park, D.A. Harris, A. Stewart, J. Hendrickson, N.D. Camp, A. Wolf-Yadlin, E.H. Wang, J.D. Scott, C. Hague, Endogenous N-terminal domain cleavage modulates alpha1D-adrenergic receptor pharmacodynamics, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 18210–18221.
- [21] J.A. García-Sáinz, M.E. Torres-Padilla, Modulation of basal intracellular calcium by inverse agonists and phorbol myristate acetate in rat-1 fibroblasts stably expressing alpha1D-adrenoceptors, *FEBS Lett.* 443 (1999) 277–281.
- [22] R. Gisbert, M.A. Noguera, M.D. Ivorra, P. D'Ocon, Functional evidence of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in rat aorta, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295 (2000) 810–817.
- [23] K. Ziani, R. Gisbert, M.A. Noguera, M.D. Ivorra, P. D'Ocon, Modulatory role of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in conductance arteries, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282 (2002) H475–481.
- [24] S. Rajagopal, S.K. Shenoy, GPCR desensitization: acute and prolonged phases, *Cell. Signal.* 41 (2018) 9–16.
- [25] M.T. Drake, S.K. Shenoy, R.J. Lefkowitz, Trafficking of G protein-coupled receptors, *Circ. Res.* 99 (2006) 570–582.
- [26] S.K. Shenoy, R.J. Lefkowitz, beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction, *Trends Pharmacol. Sci.* 32 (2011) 521–533.
- [27] J.A. García-Sáinz, F.G. Vázquez-Cuevas, M.T. Romero-Ávila, Phosphorylation and desensitization of alpha1D-adrenergic receptors, *Biochem. J.* 353 (2001) 603–610.
- [28] J.A. Pitcher, N.J. Freedman, R.J. Lefkowitz, G protein-coupled receptor kinases, *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 653–692.
- [29] J. Vázquez-Prado, P. Casas-González, J.A. García-Sáinz, G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions, *Cell. Signal.* 15 (2003) 549–557.
- [30] A.C. Newton, Protein kinase C: poised to signal, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298 (2010) E395–402.
- [31] A.X. Wu-Zhang, A.C. Newton, Protein kinase C pharmacology: refining the toolbox, *Biochem. J.* 452 (2013) 195–209.
- [32] K.E. Komolov, J.L. Benovic, G protein-coupled receptor kinases: past, present and future, *Cell. Signal.* 41 (2018) 17–24.
- [33] D. Diviani, A.L. Lattion, S. Cotecchia, Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the alpha1B-adrenergic receptor, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 28712–28719.
- [34] A.L. Lattion, D. Diviani, S. Cotecchia, Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the alpha 1B-adrenergic receptor, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 22887–22893.
- [35] R.R. Price, D.P. Morris, G. Biswas, M.P. Smith, D.A. Schwinn, Acute agonist-mediated desensitization of the human alpha 1a-adrenergic receptor is primarily independent of carboxyl terminus regulation: implications for regulation of alpha 1aAR splice variants, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 9570–9579.
- [36] R. Alcántara-Hernández, A. Hernández-Méndez, M.T. Romero-Ávila, M.A. Alfonso-Méndez, A.S. Pupo, J.A. García-Sáinz, Noradrenaline, oxymetazoline and phorbol myristate acetate induce distinct functional actions and phosphorylation patterns of alpha1A-adrenergic receptors, *Biochim. Biophys. Acta* 1864 (2017) 2378–2388.
- [37] S.E. Avendaño-Vázquez, A. García-Caballero, J.A. García-Sáinz, Phosphorylation and desensitization of the lysophosphatidic acid receptor LPA1, *Biochem. J.* 385 (2005) 677–684.
- [38] G. Kong, R. Penn, J.L. Benovic, A beta-adrenergic receptor kinase dominant negative mutant attenuates desensitization of the beta 2-adrenergic receptor, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 13084–13087.
- [39] R.J. Ward, E. Alvarez-Curto, G. Milligan, Using the Flp-In T-Rex system to regulate GPCR expression, *Methods Mol. Biol.* 746 (2011) 21–37.
- [40] O.B. Sánchez-Reyes, M.T. Romero-Ávila, J.A. Castillo-Badillo, Y. Takei, A. Hirasawa, G. Tsujimoto, R. Villalobos-Molina, J.A. García-Sáinz, Free fatty acids and protein kinase C activation induce GPR120 (free fatty acid receptor 4) phosphorylation, *Eur. J. Pharmacol.* 723 (2014) 368–374.
- [41] C.Y. Hsu, H. Uludag, A simple and rapid nonviral approach to efficiently transfect primary tissue-derived cells using polyethylenimine, *Nat. Protoc.* 7 (2012) 935–945.
- [42] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [43] S.A. Beausoleil, J. Villen, S.A. Gerber, J. Rush, S.P. Gygi, A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization, *Nat. Biotechnol.* 24 (2006) 1285–1292.
- [44] G. Grynkiewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien, A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 3440–3450.
- [45] C. UniProt, Activities at the universal protein resource (UniProt), *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) D191–198.
- [46] N. Blom, S. Gammeltoft, S. Brunak, Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites, *J. Mol. Biol.* 294 (1999) 1351–1362.
- [47] Y. Xue, J. Ren, X. Gao, C. Jin, L. Wen, X. Yao, GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy, *Mol. Cell. Proteomics* 7 (2008) 1598–1608.
- [48] S. Guo, R.L. Carter, L.A. Grisanti, W.J. Koch, D.G. Tilley, Impact of paroxetine on proximal beta-adrenergic receptor signaling, *Cell. Signal.* 38 (2017) 127–133.
- [49] K.T. Homan, E. Wu, M.W. Wilson, P. Singh, S.D. Larsen, J.J. Tesmer, Structural and functional analysis of g protein-coupled receptor kinase inhibition by paroxetine and a rationally designed analog, *Mol. Pharmacol.* 85 (2014) 237–248.
- [50] D.M. Thal, K.T. Homan, J. Chen, E.K. Wu, P.M. Hinkle, Z.M. Huang, J.K. Chuprun, J. Song, E. Gao, J.Y. Cheung, L.A. Sklar, W.J. Koch, J.J. Tesmer, Paroxetine is a direct inhibitor of g protein-coupled receptor kinase 2 and increases myocardial contractility, *ACS Chem. Biol.* 7 (2012) 1830–1839.
- [51] D. Toullec, P. Pianetti, H. Coste, P. Bellevergue, T. Grand-Perret, M. Ajakane, V. Baudet, P. Boissin, E. Boursier, F. Loriolle, The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 15771–15781.
- [52] G. Martiny-Baron, M.G. Kazanietz, H. Mischak, P.M. Blumberg, G. Kochs, H. Hug, D. Marme, C. Schachtele, Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 9194–9197.
- [53] M.A. Alfonso-Méndez, R. Alcántara Hernández, J.A. García-Sáinz, Novel structural approaches to study GPCR regulation, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 27.
- [54] A.J. Butcher, R. Prihandoko, K.C. Kong, P. McWilliams, J.M. Edwards, A. Bottrill, S. Mistry, A.B. Tobin, Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 11506–11518.
- [55] A.B. Tobin, A.J. Butcher, K.C. Kong, Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling, *Trends Pharmacol. Sci.* 29 (2008) 413–420.
- [56] J.A. García-Sáinz, M.T. Romero-Ávila, L.C. Medina, alpha(1D)-Adrenergic receptors constitutive activity and reduced expression at the plasma membrane, *Methods Enzymol.* 484 (2010) 109–125.
- [57] R. Gisbert, F. Pérez-Vizcaino, A.L. Cogolludo, M.A. Noguera, M.D. Ivorra, J. Tamargo, P. D'Ocon, Cytosolic Ca²⁺ and phosphoinositide hydrolysis linked to constitutively active alpha 1D-adrenoceptors in vascular smooth muscle, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305 (2003) 1006–1014.

- [58] M.A. Noguera, M.D. Ivorra, P. D'Ocon, Functional evidence of inverse agonism in vascular smooth muscle, *Br. J. Pharmacol.* 119 (1996) 158–164.
- [59] S. AbdAlla, H. Lothar, A. el Massiery, U. Quitterer, Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness, *Nat. Med.* 7 (2001) 1003–1009.
- [60] S. Gao, C. Malbon, H.Y. Wang, Probing the stoichiometry of beta2-adrenergic receptor phosphorylation by targeted mass spectrometry, *J. Mol. Signal.* 9 (2014) 3.
- [61] M.G. Eason, S.P. Moreira, S.B. Liggett, Four consecutive serines in the third intracellular loop are the sites for beta-adrenergic receptor kinase-mediated phosphorylation and desensitization of the alpha 2A-adrenergic receptor, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 4681–4688.
- [62] S. Wu, M. Birnbaumer, Z. Guan, Phosphorylation analysis of G protein-coupled receptor by mass spectrometry: identification of a phosphorylation site in V2 vasopressin receptor, *Anal. Chem.* 80 (2008) 6034–6037.
- [63] J. Jeong, Y.U. Park, D.K. Kim, S. Lee, Y. Kwak, S.A. Lee, H. Lee, Y.H. Suh, Y.S. Gho, D. Hwang, S.K. Park, Cdk5 phosphorylates dopamine D2 receptor and attenuates downstream signaling, *PLoS One* 8 (2013) e84482.
- [64] R. Prihandoko, E. Alvarez-Curto, B.D. Hudson, A.J. Butcher, T. Ulven, A.M. Miller, A.B. Tobin, G. Milligan, Distinct phosphorylation clusters determine the signaling outcome of free fatty acid receptor 4/G protein-coupled receptor 120, *Mol. Pharmacol.* 89 (2016) 505–520.
- [65] A. Hernández-Méndez, R. Alcántara-Hernández, G.C. Acosta-Cervantes, J. Martínez-Ortiz, S.E. Avendaño-Vázquez, J.A. García-Sáinz, Conventional protein kinase C isoforms mediate phorbol ester-induced lysophosphatidic acid LPA1 receptor phosphorylation, *Eur. J. Pharmacol.* 723 (2014) 124–130.
- [66] M.A. Morquecho-León, S. Bazúa-Valenti, M.T. Romero-Ávila, J.A. García-Sáinz, Isoforms of protein kinase C involved in phorbol ester-induced sphingosine 1-phosphate receptor 1 phosphorylation and desensitization, *Biochim. Biophys. Acta* 1843 (2014) 327–334.
- [67] C. Krasel, S. Dammeier, R. Winstel, J. Brockmann, H. Mischak, M.J. Lohse, Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 1911–1915.
- [68] R. Winstel, S. Freund, C. Krasel, E. Hoppe, M.J. Lohse, Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 2105–2109.
- [69] J. Wess, G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition, *FASEB J.* 11 (1997) 346–354.
- [70] S. Cotecchia, L. Stanasila, D. Diviani, K. Bjorklof, O. Rossier, F. Fanelli, Structural determinants involved in the activation and regulation of G protein-coupled receptors: lessons from the alpha1-adrenergic receptor subtypes, *Biol. Cell.* 96 (2004) 327–333.
- [71] Z. Chen, C. Hague, R.A. Hall, K.P. Minneman, Syntrophins regulate alpha1D-adrenergic receptors through a PDZ domain-mediated interaction, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 12414–12420.
- [72] J.S. Lyssand, M.C. Defino, X.B. Tang, A.L. Hertz, D.B. Feller, J.L. Wacker, M.E. Adams, C. Hague, Blood pressure is regulated by an alpha1D-adrenergic receptor/dystrophin signalosome, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 18792–18800.

Plásmidos generados durante el trabajo de tesis

Plásmido	Descripción	Resistencia
Δ N-EGFP/T-rex	Fusión del receptor α 1D-AR Δ -79-EGFP	Ampicilina
Δ N-MutlL3-EGFP/T-rex	Fusión del receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A,T328V-EGFP	Ampicilina
Δ N-MutlL3-R.P.-EGFP/T-rex	Fusión del receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A,T328V, T442V-EGFP	Ampicilina
Δ N-MutlL3-R.D.-EGFP/T-rex	Fusión del receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A,T328V, S543A-EGFP	Ampicilina
Δ N-MutlL3-G.P.-EGFP/T-rex	Fusión del receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A,T328V, T477V,S486/492A-EGFP	Ampicilina
Δ N-MutlL3-G.D.-EGFP/T-rex	Fusión del receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A,T328V, T507V,S515/516/518A-EGFP	Ampicilina
Δ N-MutlL3-M.D.-EGFP/T-rex	Fusión del receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A,T328V, T477V,S486/492A,T507V,S515/516/518A -EGFP	Ampicilina
Δ N-MutlL3-M.T.-EGFP/T-rex	Fusión del receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A,T328V, T442/477V,S486/492A,T507V,S515/516/518/543A -EGFP	Ampicilina
Δ N- Δ C-EGFP/T-rex	Fusión del receptor α 1D-AR Δ -79, Δ 544-572-EGFP	Ampicilina
Δ N-MutlL3- Δ C-EGFP/T-rex	Fusión del receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A,T328V, Δ 544-572-EGFP	Ampicilina
Δ N-MutlL3-G.P. Asp-EGFP/T-rex	Fusión del receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A,T328V, T477D,S486/492D-EGFP	Ampicilina
Δ N-MutlL3-G.D. Asp-EGFP/T-rex	Fusión del receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A,T328V, T507D,S515/516/518D-EGFP	Ampicilina
Δ N-MutlL3-M.T. Asp-EGFP/T-rex	Fusión del receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A,T328V, T442/477D,S486/492D,T507D,S515/516/518/543D-EGFP	Ampicilina

ANEXO 3

Líneas celulares generadas durante el trabajo de tesis

Plásmido	Línea Celular	Descripción	Sistema
Δ N-EGFP	HEK 293	Expresan receptor α 1D-AR Δ -79-EGFP	T-rex
Δ N-MutI3-EGFP	HEK 293	Expresan receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A, T328V-EGFP	T-rex
Δ N-MutI3-R.P.-EGFP	HEK 293	Expresan receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A, T328V, T442V-EGFP	T-rex
Δ N-MutI3-R.D.-EGFP	HEK 293	Expresan receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A, T328V, S543A-EGFP	T-rex
Δ N-MutI3-G.P.-EGFP	HEK 293	Expresan receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A, T328V, T477V, S486/492A-EGFP	T-rex
Δ N-MutI3-G.D.-EGFP	HEK 293	Expresan receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A, T328V, T507V, S515/516/518A-EGFP	T-rex
Δ N-MutI3-M.D.-EGFP	HEK 293	Expresan receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A, T328V, T477V, S486/492A, T507V, S515/516/518A-EGFP	T-rex
Δ N-MutI3-M.T.-EGFP	HEK 293	Expresan receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A, T328V, T442/477V, S486/492A, T507V, S515/516/518/543A -EGFP	T-rex
Δ N- Δ C-EGFP	HEK293	Expresan receptor α 1D-AR Δ -79, Δ 544-572-EGFP	T-rex
Δ N-MutI3- Δ C-EGFP	HEK 293	Expresan receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A, T328V, Δ 544-572-EGFP	T-rex
Δ N-MutI3-G.P. Asp-EGFP	HEK 293	Expresan receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A, T328V, T477D, S486/492D-EGFP	T-rex
Δ N-MutI3-G.D. Asp-EGFP	HEK 293	Expresan receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A, T328V, T507D, S515/516/518D-EGFP	T-rex
Δ N-MutI3-M.T. Asp-EGFP	HEK 293	Expresan receptor α 1D-AR Δ -79, S300/323/331/332/334A, T328V, T442/477D, S486/492D, T507D, S515/516/518/543D-EGFP	T-rex



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Cell Biology

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

Review

Dissecting the signaling features of the multi-protein complex GPCR/ β -arrestin/ERK1/2

Gabriel Carmona-Rosas*, Rocío Alcántara-Hernández, David Alejandro Hernández-Espinosa

Instituto de Fisiología Celular (UNAM), México City, 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

G protein-coupled receptors (GPCRs)
 G protein
 β -arrestin
 Extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2)
 Phosphorylation
 Multi-Protein complex

ABSTRACT

G protein-coupled receptors (GPCRs) have emerged as key biological entities that regulate a plethora of physiological processes and participate in the onset and development of many diseases. Moreover, these receptors are important targets of almost 25% of the current therapeutic drugs in the market. Upon agonist binding, GPCRs activate a great number of signaling pathways, resulting in important cellular events like gene transcription, survival, proliferation and differentiation. In order to activate such events, GPCRs interact with a variety of scaffold and molecular entities, particularly with G proteins, but also with β -arrestins and the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) pathway, forming unique signaling modules. The aim of this review is to analyze the signaling features of the multi-protein complex GPCR- β -arrestin-ERK1/2, a unique signaling module that has received considerable attention from different research groups due to its molecular and physiological roles in diverse cellular contexts.

1. Introduction

In signal transduction, the formation of a multi-protein complex is synonymous of regulation, specificity, efficacy, integration of downstream elements and signaling pathways in a single cell (Pawson and Scott, 2010). Specific sequences (regions, domains and motifs) and post-translational modification of proteins (phosphorylation, ubiquitination or sumoylation, among others) are key processes that allow these cellular events to occur (Ye and Zhang, 2013). The multi-protein complex GPCR/ β -arrestin/ERK1/2, has received considerable attention during the last decade due its pivotal roles in multiple cellular functions and in the onset of several diseases.

Looking at the beginning of the whole signal transduction complex, G protein-coupled receptors (GPCRs) are seven transmembrane (7TM) proteins that comprise the largest family of transmembrane proteins in cells. Nearly ~800–1200 different GPCRs have been identified in humans (<http://sevens.cbrc.jp/>) and the chemical diversity of ligands, from biogenic amines to proteases (Gether, 2000) have made these receptors an important target of almost 25% of the current therapeutic

drugs in the market (O'Hayre et al., 2013). GPCRs share a 7TM α -helical structure with an extracellular N-terminal domain and an intracellular C-terminal domain, including three extracellular loops (ECLs) and three intracellular loops (ICLs) (Kobilka, 2007) (Fig. 1A). It is traditionally known that three families of proteins are able to interact almost universally and in a stimulus-dependent fashion with GPCRs. These are the heterotrimeric G proteins (hence the name of G protein-coupled receptors), the G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and the arrestin proteins (Ahn et al., 2003).

2. Understanding the main components of the multi-protein complex GPCR/ β -arrestin/ERK1/2

2.1. GPCR signaling

It is thought that drugs that activate GPCRs are able to modulate the rate of receptors that are in an active signaling conformation relative to those that are in an inactive, non-signaling conformation. Based on the classical model for GPCRs activity, upon agonist binding, the receptor

Abbreviations: GPCRs, G protein-coupled receptors; TM, transmembrane; ECLs, extracellular loops; ICLs, intracellular loops; GRKs, G protein-coupled receptor kinases; MAPKs, mitogen activated protein kinases; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases 1 and 2; JNK, c-JUN N-terminal kinase; RTKs, receptor tyrosine kinases; EGF, epidermal growth factor; PDGF, platelet-derived growth factor; M3-R, m3-muscarinic receptor; A2-ARs, α 2-adrenergic receptors; β 2AR, β 2-adrenergic receptor; V2R, vasopressin-2 receptor; PAR-1/2, protease-activated receptor-1 and -2; NK1R, neurokinin-1 receptor; V2Rpp, vasopressin-2 receptor phospho-peptide; β 2V2R, receptor where the C-tail of β 2AR is replaced by that of V2R; β 1AR, β 1-adrenergic receptor; AT1AR, angiotensin-I A receptor; AT12AR, angiotensin-II A receptor; siRNA, small interfering RNA; PKC, protein kinase C; RNAi, RNA interference; AT1R, angiotensin-1 receptor; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; CRISPR-Cas9, clustered regularly interspaced short palindromic repeats; FFA4, free fatty acid 4 receptor; FHS, follicle-stimulating hormone; CXCR4, chemokine receptor 4

* Corresponding author.

E-mail addresses: gcarmona@email.ifc.unam.mx (G. Carmona-Rosas), ralcanta@ifc.unam.mx (R. Alcántara-Hernández), despinosa@email.ifc.unam.mx (D.A. Hernández-Espinosa).<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2018.04.001>Received 30 January 2018; Received in revised form 14 March 2018; Accepted 3 April 2018
0171-9335/ © 2018 Elsevier GmbH. All rights reserved.

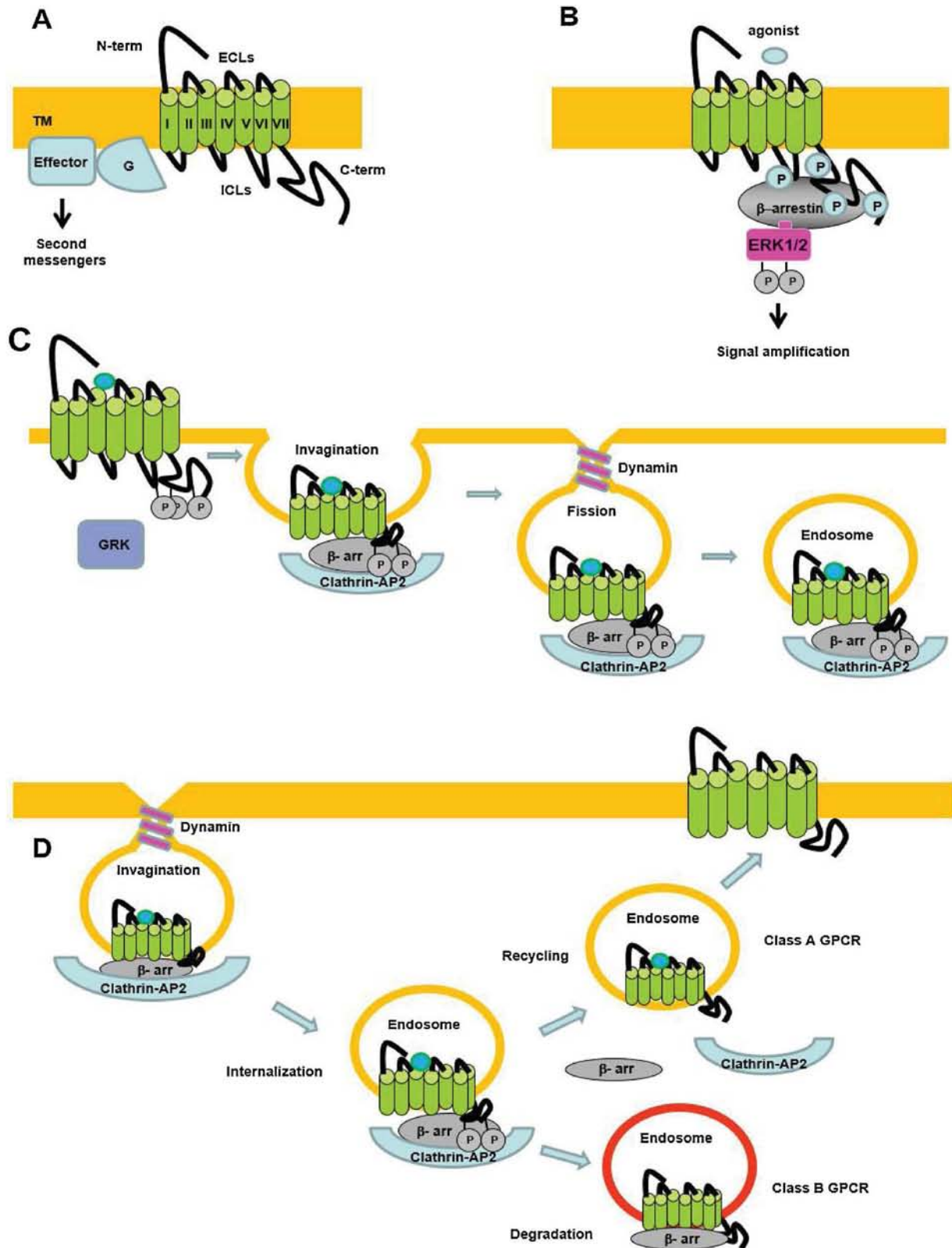


Fig. 1. Basic signaling features of the multi-protein complex GPCR/ β -arrestin/ERK1/2. **A)** GPCRs share a seven-transmembrane (7TM) α -helical structure with an extracellular N-terminal domain and an intracellular C-terminal domain consisting of three extracellular loops (ECLs) and three intracellular loops (ICLs). **B)** Upon agonist binding, GPCRs are able to activate ERK1/2 in a β -arrestin-dependent fashion. This suggests that there is a strong interaction among these three molecules, forming a functional multi-protein complex. **C)** After the GRK-mediated phosphorylation of a GPCR, β -arrestins bind to the receptor and recruit clathrin and AP-2, leading to the internalization of the receptor into endosomes. **D)** GPCRs have been classified as class A and class B based on their β -arrestin recruitment and internalization pattern. Class A receptors bind transiently to β -arrestins and are recycled back to the plasma membrane, whereas class B receptors exhibit a stronger interaction with β -arrestins and are further degraded by proteasome.

adopts a conformation that triggers the activation of associated G proteins (Rajagopal et al., 2010), resulting in the exchange of GDP for GTP by the $G\alpha$ subunit and leading to the dissociation of the protein complex in $G\alpha$ and $G\beta\gamma$ subunits. This event causes the activation of signaling pathways that depend on the isoform of the $G\alpha$ subunit (Neves et al., 2002). The activation and further signaling of GPCRs induce their phosphorylation on the cytoplasmic loops and the C-terminal domain, mainly by second messenger-activated protein kinases (such as PKC and PKA), resulting in the internalization and loss of receptor function (Avenidaño-Vázquez et al., 2005). On the other hand, phosphorylation by GRKs, triggers the binding of arrestins and the subsequent desensitization and internalization of the receptor into clathrin-coated vesicles (Rajagopal et al., 2010).

2.2. β -arrestins as scaffold proteins

As far as arrestins are concerned, they are a small family of four homologous proteins that have a pivotal role in the regulation of GPCRs signaling. Arrestin 1 (or visual arrestin) and arrestin 4 (or cone arrestin) are exclusively expressed in the visual system, whereas arrestin 2 (or β -arrestin 1) and arrestin 3 (or β -arrestin 2) are widely expressed (Lhose and Hoffman, 2014; Park et al., 2016). Interestingly, the crystal structure of the four arrestins in their basal state reveals the presence of two main domains (the N-domain and the C-domain) with similar seven-strand β -sandwich structures (Granzin et al., 1998; Hirsch et al., 1999; Han et al., 2001; Sutton et al., 2005; Zhan et al., 2011). Arrestins were originally identified due to their ability to regulate the desensitization of several ligand-activated receptors by blocking the binding of G proteins (Park et al., 2016). However, it has been discovered that these proteins are also able to function as adaptors of the endocytic machinery, scaffold proteins and mediators in the trafficking of a variety of cell-surface proteins. In the case of GPCRs, both β -arrestins perform these functions through the inhibition of upstream G protein-dependent signaling and fostering different downstream signaling pathways (Shenoy and Leftkowitz, 2011). However, it is important to keep in mind that the binding of β -arrestins and G proteins to the receptor is not mutually exclusive, this allows for the internalized receptor to keep signaling through the G protein while in intracellular vesicles (Ranjan et al., 2017). Details of this mutual mechanism will be discussed later on. Subsequent studies have discovered that β -arrestins are also able to interact with other signaling proteins, including members of the mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway (e.g. Raf1, MEK1, ERK1/2, and JNK2), E3 ubiquitin ligases (e.g. Mdm2), cAMP phosphodiesterases (e.g. PDE4D), Ral-GDP dissociation stimulator, the glycogen synthase kinase-3 regulator complex (e.g. PP2A-AKT-GSK3), regulator of the nuclear factor- κ B signaling (e.g. I κ Ba-I κ Ka), and acting filament-severing complex (e.g. cofilin-choronofin-LIMK), among many others (Gurevich and Gurevich, 2006; Shenoy and Leftkowitz, 2011; DeFea, 2011; Luttrell and Miller, 2013; Park et al., 2016). An excellent comprehensive review describing the multiple functions of β -arrestins in GPCRs signaling, and the specific roles that these proteins perform in different cellular contexts was recently published, and readers are referred to this (Peterson and Luttrell, 2017).

2.3. General features of the MAPK cascade

From all the plethora of proteins that interact with β -arrestins, the MAPKs cascades are of particular interest. They are known to regulate a great number of cellular functions, including growth, proliferation, survival and apoptosis (Shaul and Seger, 2007). Three main kinases integrate this signal transduction pathway: MAPKKK, MAPKK and MAPK. After being activated by extracellular stimuli, MAPKKK is able to phosphorylate and activate MAPKK, which in turn phosphorylates and activates downstream MAPK. Activation of MAPK leads to the phosphorylation of multiple substrates that can be found in cellular compartments, such as nucleus, mitochondria, Golgi apparatus and

endoplasmic reticulum (ER), among many others. Currently, four classical MAPK kinases have been identified: extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 and ERK5. The ERK1/2 pathway was the first MAPK to be described, and it is also one of the most studied due to its implications in the onset and development of several diseases as well as in different nuclear processes, such as gene transcription and chromatin remodeling (Columbe and Meloche, 2007; Plotnikov et al., 2011). Moreover, during the last years, several research groups have been studying the functional implications of the β -arrestins/ERK1/2 interaction and its consequences in various GPCRs signaling outcomes (Nobles et al., 2011; Perez-Aso et al., 2013; Zindel et al., 2016). Besides, the whole multi-protein complex GPCR/ β -arrestins/ERK1/2 (Fig. 1B), has also been of great interest due to the structural elements that dictate its interactions, and the distinct signaling outcomes in which the whole multi-protein complex is involved.

Even though the activation of ERK1/2 can be triggered in a β -arrestin-dependent fashion, other mechanisms are used by GPCRs to regulate the activity of this signal transduction pathway, including the activation of focal adhesion and second messenger-activated protein kinases and the subsequent phosphorylation of downstream signaling proteins, such as Rap1 and Raf isoforms. In addition, a great number of GPCRs are able to transactivate receptor tyrosine kinases (RTKs), like the epidermal growth factor (EGF) and platelet-derived growth factor (PDGF) receptors, resulting in the activation of ERK1/2 (Hawes et al., 1995; Lev et al., 1995; Dikic et al., 1996; Wan and Huang, 1998; Schmitt and Stork, 2000; Luttrell et al., 2000).

2.4. Endocytosis and its role in the activation of ERK1/2

It is currently known that stimulation of GPCRs leads to the formation of intracellular vesicles containing ligand-activated receptors, commonly referred as endosomes, which are inaccessible to hydrophilic drugs, in a process known as internalization or endocytosis. This internalization process allows for both β -arrestins to serve as scaffold proteins that link the receptors with clathrin-coated vesicles. After the phosphorylation of GPCRs by GRKs, both β -arrestins are able to interact with elements of the endocytic machinery, such as clathrin and the β 2-adaptin subunit of the AP-2 complex, promoting the formation of receptor/ β -arrestin complexes in punctuated pits at the cell surface. Subsequently, receptors either alone or bound to β -arrestins are internalized into endosomes, where they can be degraded or recycled back at plasma membrane (Fig. 1C). Even though a great number of receptors are internalized through clathrin-coated vesicles in a β -arrestin-dependent process, there are additional pathways commonly used by some GPCRs to internalize, such as caveolae (Pierce and Leftkowitz, 2001a). At this point, it is important to consider that the initial G protein activation by GPCRs takes place at the plasma membrane, whereas the signaling pathways activated by internalized receptors are mediated by β -arrestins recruitment. For this β -arrestin-dependent process, it has been reported that activated ERK1/2 is associated with receptors localized in endosomes that are constitutively formed or in response to receptor activation. Interestingly, by restricting clathrin-dependent endocytosis of different GPCRs, such as LPA and RTKs like EGFR (Luttrell et al., 1997), there is a significant inhibition in the activation of this cascade, which suggests that endocytosis of these two types of receptors has a pivotal role in signaling through ERK1/2. The isolation of protein aggregates containing specific GPCRs/ β -arrestins/ERK1/2 complexes, has buttressed the hypothesis that endosome-associated β -arrestins function as molecular scaffolds for the assembly of specific kinase cascades and for the recruitment of other signaling proteins that regulate the activity of different GPCRs from intracellular vesicles (Sorkin and von Zastrow, 2000). However, other studies have demonstrated that endocytosis of some GPCRs, such as the m3-muscarinic receptor (M3-R) (Budd et al., 1999) and the three α 2-adrenergic receptors (α 2-ARs) (DeGraff et al., 1999; Schramm and Limbird, 1999),

among many others (Roche et al., 1999; Yang et al., 1999; Li et al., 1999; Blaukat et al., 1999; Pierce et al., 2000), is not required for the activation of ERK1/2, suggesting that activation of such kinases by receptor endocytosis cannot be universally applied for all GPCRs (Pierce et al., 2000). The discrepancies in this endocytosis-mediated activation of ERK1/2 might suggest that it is not the receptor itself, but different cellular components downstream are required to couple the GPCR- β -arrestin complex to the endocytic machinery and activate ERK1/2 (Pierce et al., 2001b).

Taking all these data into account, β -arrestin-dependent signaling represents just a different mechanism used by many GPCRs to activate the ERK1/2 pathway. However, it is important to keep in mind that the ability of any given receptor to activate such kinases may also depend on different cellular contexts (Luttrell et al., 2000), allowing for the same receptor to activate ERK1/2 in a β -arrestin-dependent or -independent fashion (Pierce et al., 2001b).

3. Basic structural and signaling features of the GPCR/ β -arrestin interaction

3.1. Structural elements that govern the formation of the GPCR/ β -arrestin complex

The generation of crystal structures is an essential element that provides atomic details of the interaction among different proteins. During the last years, a couple of studies have described the structural elements that govern the interaction of GPCRs and arrestins. By using femtosecond X-ray laser crystallography, it was reported the crystal structure of the active human rhodopsin bound to a pre-activated mouse visual arrestin. The structural complex reveals a clear interaction between the N-terminal domain of arrestin and the C-terminal tail of rhodopsin. Besides, three phosphorylation sites (S334, S338 and S343) located in the C-terminal tail of rhodopsin interact with three positively charged regions located at the N-terminal domain of arrestin. These results supports the notion that phosphorylated rhodopsin is able to activate arrestin through a C-terminal tail exchange mechanism: the rhodopsin C-terminal tail induces a displacement of the C-terminal of arrestin, which causes a destabilization of the polar core of arrestin. This phenomenon allows for a 20° rotation of both N- and C-terminal domains of arrestins that opens a cleft between the middle and the C-terminal loops, where the ICL2 helix of rhodopsin can fit. In addition, the finger loop of arrestin (residues 70–80) contains three negative charged residues (E71, D72 and D74) that interact with a positive charged intracellular rhodopsin TM bundle, resulting in a stronger interaction between the two proteins, which suggests that rhodopsin and arrestin engagement could also be mediated by complementary charges (Kang et al., 2015).

Even though the rhodopsin/arrestin complex is the only full crystal structure resolved at the present, another study reported the crystal structure of β -arrestin 1 in complex with a fully phosphorylated 29-aminoacid C-terminal peptide derived from the human V2 vasopressin receptor (V2Rpp), which is able to functionally and conformationally activate β -arrestin 1 (Nobles et al., 2007). These results suggest that V2Rpp binds to the N-terminal domain of β -arrestin 1 through extensive interactions between the phosphates located at the V2Rpp and the β -arrestin 1 arginine and lysine side chains. Moreover, two basic residues (K10 and K11) in the N-terminal domain of β -arrestin 1 make specific contacts with two phosphorylation sites (pS363 and pS357) on the V2Rpp. It is proposed that the extensive and specific interactions between V2Rpp and the β -arrestin 1 N-terminal domain impair the binding of other GPCRs with β -arrestin 1, however, it would be also possible for a single molecule of arrestin to bind the C-terminal tail of one receptor and at the same time interact with the TM core of another receptor (Shukla et al., 2013). The structural features revealed by these two protein complexes, have provided not only atomic details of the general GPCR/arrestin interaction interface, but also offer novel

insights into the activation process of arrestins. On the other hand, β -arrestins also need to be dephosphorylated to serve as scaffold proteins. Both β -arrestins are phosphorylated in their basal conformation in the cytoplasm, and appear to be dephosphorylated upon receptor binding, in fact, β -arrestins phosphorylation may inhibit their interaction with components of the endocytic machinery, although further studies will be necessary to confirm this. Besides, relevant phosphorylation sites are localized in distal (β -arrestin 1) or proximal (β -arrestin 2) C-terminal, suggesting that receptor-induced C-terminal release may also promote β -arrestins dephosphorylation, further facilitating their interaction with the endocytic machinery (Gurevich and Gurevich, 2003).

3.2. Recruitment of β -arrestins by GPCRs

It is currently known that ligand-activated receptors are phosphorylated in a process that regulates receptor coupling to downstream signaling pathways. Depending on different cellular contexts, the patterns of receptor phosphorylation has been proposed to generate a particular “bar code”, which directs relevant receptor signaling (Butcher et al., 2011). In addition, interaction of GPCRs with β -arrestins requires a specific phosphorylation pattern on the receptor C-terminal tail, which is also mediated by GRKs after the activation of the receptor by a ligand (Zhou et al., 2017). Even though the phosphorylation of the receptor is the signal that recruits β -arrestins, this is not the only way for this interaction to occur (Tobin et al., 2008). Based on their relative pattern of β -arrestin recruitment, GPCRs are generally categorized as either class A or class B receptors. Class A receptors, such as the β 2-adrenergic receptor (β 2AR) bind transiently to β -arrestins and show a rapid recycling at the cell surface after being internalized. Class B receptors, on the other hand, such as the vasopressin-2 receptor (V2R), exhibit a stronger interaction with β -arrestins and show proteosomal degradation (Fig. 1D). Class B receptors usually have phosphorylatable Ser/Thr clusters at their C-terminal tail, while class A receptors appear to primarily have more scattered Ser/Thr residues. It is conceivable that such clusters of Ser/Thr residues in class B receptors provide a significant contribution towards a higher affinity for β -arrestins (Kumari et al., 2016). However, by using the protease-activated receptor-1 (PAR-1), substance P and leukotriene B4 receptors as models, several studies have suggested that receptor phosphorylation is not required for β -arrestins recruitment (Richardson et al., 2003; Chen et al., 2004; Jala et al., 2005; Tobin et al., 2008). In the same lines, other studies have reported that removal of phosphorylation sites on the orexin OX1 and PAR-2 receptors does not affect their interaction with β -arrestins (Milasta et al., 2005; Stalheim et al., 2005; Tobin et al., 2008). A possible explanation of this phenomenon is explained by two distinct components that govern the formation of the GPCR/ β -arrestin complex. The first one is the interaction through multiple points of contact between the active form of the receptor and the “activation” sensor, which is located at the concave surface of β -arrestin. The second one is the interaction between the phosphates contained in the phosphorylated receptor with the “phosphate” sensor located in the polar core of β -arrestin (Gurevich and Benovic, 1993; Hirsch et al., 1999; Tobin et al., 2008). In addition, it is proposed that the formation of the GPCR/ β -arrestin complex could be enhanced by a disruption of the salt bridge at the polar core of β -arrestin (Tobin et al., 2008). Interestingly, the C-terminal tail of each receptor possesses a unique fingerprint that defines the signaling profile that a receptor will have. By swapping the C-terminal tail of the β 2AR and the V2R, the β 2AR features the signaling profile of the V2R, whereas the V2R features the signaling profile of the β 2AR (Tohgo et al., 2003). Similarly, by using the same experimental approach with the PAR2 receptor and the neurokinin-1 receptor (NK1R), the first one features the signaling profile of the second one and viceversa (Pal et al., 2012). It is interesting that in addition to the structural elements that the C-terminal tail uses to bind β -arrestins, each receptor has a unique signaling pattern that relies on their C-terminal domain.

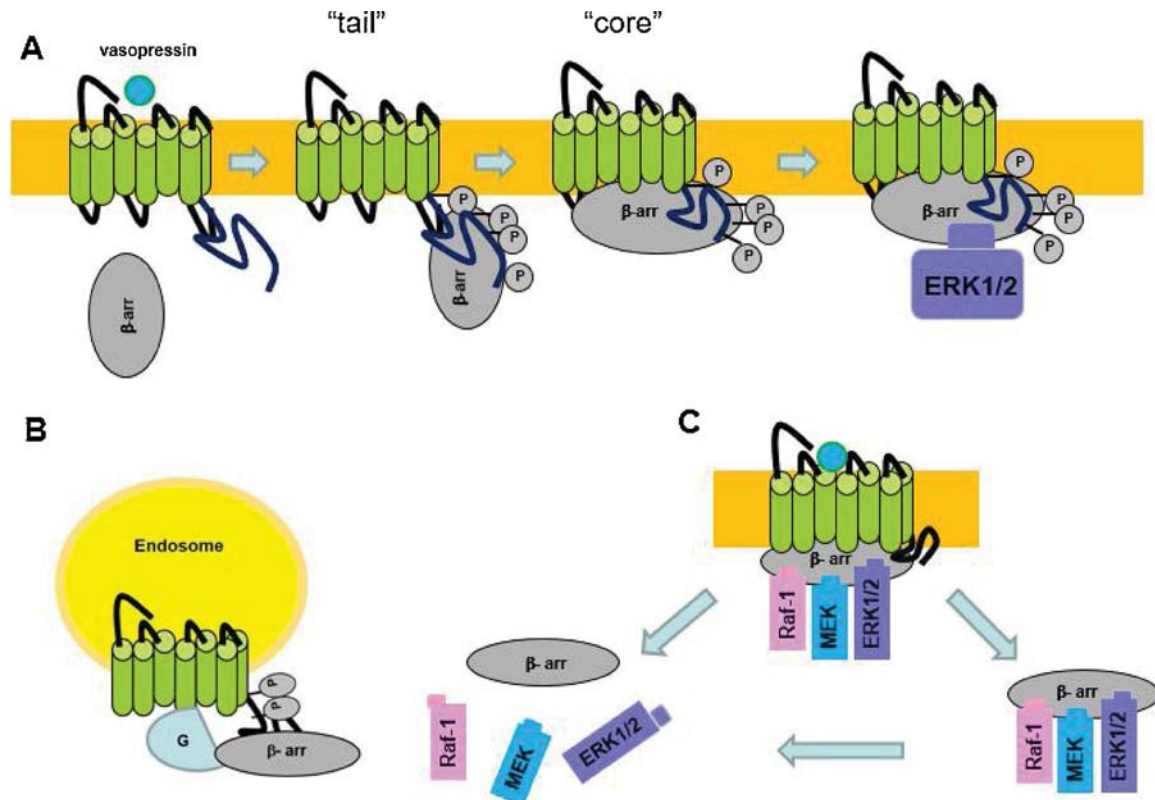


Fig. 2. The GPCR, β -arrestin and G protein engagement mechanism and the β -arrestin/MAPK cascade interaction. A). β -arrestin uses two sequential mechanisms to engage the receptor. The first one involves the interaction of the phosphorylated C-terminal tail of the receptor and the N-terminal domain of β -arrestin. The second one involves a core interaction, which consists on the insertion of the β -arrestin finger loop within the receptor TM core, resulting in the formation of the GPCR/ β -arrestin complex. B). The binding of β -arrestins and G proteins to the receptor is not a mutually exclusive mechanism. The formation of this set of proteins allows for a receptor to keep signaling even when it has been internalized in a β -arrestin-dependent fashion. C). The MAPK cascade interacts with the GPCR/ β -arrestin complex through two different mechanisms. In the first mechanism, the receptor/ β -arrestin complex interacts directly with Raf1 and ERK1/2, facilitating the activation of ERK1/2, whereas in the second mechanism, the complex β -arrestin/Raf1/ERK1/2 may form when β -arrestin is bound and then dissociates from the receptor. Eventually, this β -arrestin/Raf1/ERK1/2 complex has to disassemble.

3.3. Dynamic and functional features of the GPCR/ β -arrestin complex

Recent studies have described, from a dynamic and functional point of view, the mechanisms by which the GPCR/ β -arrestin complex interacts and carries out its functions, from the desensitization and internalization of receptors, to the activation of different signaling pathways, like the ERK1/2 cascade. A research group devised a strategy to form and purify a functional human β 2AR/ β -arrestin 1 complex to visualize its architecture and the interaction among the two proteins. The results suggest that β -arrestin 1 is able to use two sequential mechanisms to bind the receptor. The first one involves an interaction between the phosphorylated C-terminal tail of the receptor and the N-terminal domain of the β -arrestin 1, allowing for the receptor to keep signaling through a G protein-dependent mechanism, while the second one involves a core interaction between β -arrestin finger loop and the receptor core (Fig. 2A). It is possible that this latter protein arrangement impairs GPCR engagement of G protein, resulting in the loss of classical GPCR signaling and the subsequent internalization of the receptor (Shukla et al., 2014). In addition, other studies have supported the notion that the core interaction appears to be crucial for mediating receptor desensitization (Cahill et al., 2017).

On the other hand, by using the chimeric receptor β 2V2R (where the C-tail of the β 2AR is replaced by that of V2R), which displays class B profile of β -arrestins recruitment, it was demonstrated this mutant is able to bind partially and totally to β -arrestin 1, besides, the core interaction is dispensable for the this chimeric receptor to internalize and activate ERK1/2. Interestingly, this same study demonstrated that and even for a prototypical class A GPCR, such as the β 2AR, this core

interaction is not essential for internalization and ERK1/2 activation. These observations indicate that both class A and B receptors are capable of undergoing endocytosis and triggering ERK1/2 activation when engaged with β -arrestin only through the phosphorylated C-terminal tail. Moreover, when the ICL3 was truncated from the chimeric β 2V2R or from other class B GPCR, a transient core interaction can still occur (Kumari et al., 2016). Similarly, β -arrestin 2 is able to mediate ERK1/2 activation downstream of β 1-adrenergic receptor (β 1AR) despite a very transient interaction and dissociation from the receptor (Ranjan et al., 2016; Eichel et al., 2016). Interestingly, another study found two serines (S461 and S462) located in the distal C-tail of the β 1AR, which are able to regulate the binding of β -arrestin 2 and the internalization of the receptor (Hinze et al., 2017). These results are in agreement with the classical notion that G proteins and β -arrestins compete for overlapping binding sites in the receptor TM core. This has been supported by studies reporting that megaplexes of a single class B GPCR, β -arrestin and heterotrimeric G protein may exist, explaining the sustained G protein signaling from endosomes (Thomsen et al., 2016) (Fig. 2B). All these data suggest that there is a clear correlation between the GPCRs that form GPCR/ β -arrestin tail conformation complexes and the GPCRs that can activate G protein from intracellular vesicles, a typical characteristic featured by the class B receptors. In contrast, GPCRs that rely more heavily on the core conformation, are not able to activate G proteins after being internalized by β -arrestin (Cahill et al., 2017).

Besides to be part of the endocytic machinery and play crucial structural roles in the interaction with GPCRs, β -arrestins function as adaptor or scaffold proteins, allowing the formation of huge complexes and modulating several cellular functions that are independent of G

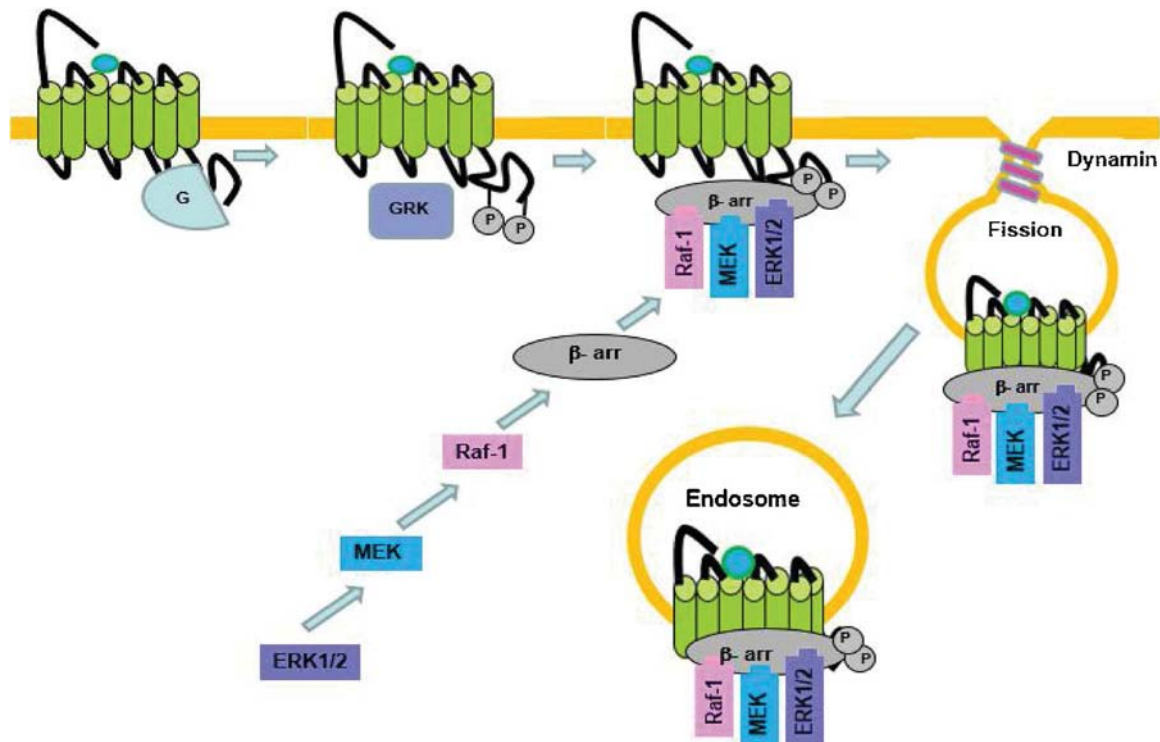


Fig. 3. GPCRs are able to use β -arrestins as scaffold proteins to activate the MAPK cascade. When a GPCR is activated by a ligand, β -arrestins are recruited to the receptor. Once the GPCR- β -arrestin complex has been formed, the three main components of the MAPK cascade, Raf1, MEK and ERK1/2 bind to the complex, while at the same time, the receptor is internalized into endosomes, thus forming a GPCR- β -arrestin-MAPK complex that is able to activate cytosolic substrates.

protein and other second messengers (Shukla et al., 2014). As we previously mentioned, the ERK1/2 (MAPK) cascade (the last component of the entire mitogen activated protein kinase cascades) are signaling proteins that are able to interact with β -arrestins. In particular, the ERK1/2 pathway has received considerable attention from several research groups due to its GPCR- and β -arrestin-dependent signaling outcomes. It is important to keep in mind that the binding of β -arrestins to the receptor is essential to assemble a complex with ERK1/2 and with the endocytic machinery, otherwise, a soluble β -arrestin would not be able to bind to these components with a high affinity (Gurevich and Gurevich, 2003). In order to understand the interaction among GPCRs, β -arrestins and the ERK1/2 pathway, it is necessary to briefly mention other important elements that integrate the entire MAPKs cascade, such as Raf1 (MAPKKK) and MEK1 (MAPKK), which are also able to interact with β -arrestins.

4. Interaction and roles of the entire MAPK cascades in the multi-protein complex

4.1. Recruitment of the MAPK components to the GPCR/ β -arrestin complex

It is well known that the Raf1/MEK1/ERK1/2 signaling cascade exists in the cytoplasm and that it can be triggered by second messengers following the activation of G proteins and β -arrestins. The interaction of these kinases and the subsequent signaling cascade was initially demonstrated with the β 2AR, although eventually the G protein-independent ERK1/2 signaling pathway was generalized to other receptors. It is important to keep in mind that until today, no enzymatic activity has been detected for β -arrestins, which strongly suggests that their role is probably to assemble signaling modules, allowing different elements to remain in close contact for long periods of time, thus modifying the dynamics of several main reaction cascades (Bourquard et al., 2015).

In the first place, the formation of the multi-protein complex GPCR/

β -arrestins/MAPKs may occur through two different mechanisms: 1) the receptor/ β -arrestin complex recruits Raf1 and ERK1/2, further promoting the activation of ERK1/2. However, it is possible that the formation of this set of proteins completely depends on the binding of β -arrestin to the receptor, so that the split of the GPCR/ β -arrestin complex leads to the dissociation of Raf1 and ERK1/2. 2) The dissociation of β -arrestin from the receptor promotes the formation of the β -arrestin/Raf1/ERK1/2 complex, although eventually it has to disassemble (Fig. 2C). The first scenario suggests that if the binding of the receptor increases the affinity of β -arrestin for MAPKs, the β -arrestin/MAPKs complex should increase the affinity of β -arrestin for the receptor. It is important to consider that the generation of this multi-protein complex has two different consequences. In the first one, the activation ERK1/2 is only associated to the GPCR/ β -arrestin complex, while in the second one, the activation of ERK1/2 can also take place in the cytoplasm, promoting the phosphorylation of multiple downstream substrates (Gurevich and Gurevich, 2003). Interestingly, subsequent studies have demonstrated that all three kinases are able to bind β -arrestins in all conformational states with a different degree of affinity, forming a unique signaling module (Coffa et al., 2011).

Along the same lines, another study described a mechanism for the formation of the multi-protein complex GPCR/ β -arrestin/ERK1/2 using the angiotensin-I A receptor (AT1AR) as a model and studying the role of Raf1 and MEK1 in the formation of the entire complex. In the first place, the activation of the receptor results in the redistribution of ERK1/2 into intracellular vesicles along with AT1AR/ β -arrestin aggregates. This process allows for the formation of protein complexes containing the AT1AR, β -arrestin, and the three components of the MAPK cascade: Raf1, MEK1 and ERK1/2. A more detailed examination of the formation of this complex suggests that there is a direct interaction between Raf1 and β -arrestin 2, which significantly improves the assembly of the entire MAPKs cascade in a single complex. In addition, the order in which the multi-protein complex is assembled indicates that the activation of the AT1AR facilitates the interaction among Raf1,

ERK1/2 and β -arrestin 2, and then, an association of this set of proteins with the AT1AR may occur. Taken together, all these data confirm the notion that β -arrestins not only functions as scaffold proteins to regulate the activation of ERK1/2, but also have an important role in directing active ERK1/2 to specific cellular locations (Luttrell et al., 2000).

Considering the interaction of the three main components of the MAPK cascade with the GPCR- β -arrestin complex, an overview of the ensemble and signaling properties of this multi-protein complex can be depicted: the activation of a receptor leads to the phosphorylation of its intracellular domains, such as the C-tail and the IL3 by GRKs, promoting the recruitment of β -arrestins to the receptor. This latter process allows for the binding of the three components of the MAPK cascade while the receptor is internalized in endosomes, forming a signaling module that is able to phosphorylate and activate a myriad of cytosolic substrates (Fig. 3) (Luttrell, 2002).

5. The activation of ERK1/2 can be mediated by two different GPCR-dependent mechanisms

As we previously mentioned, among the MAPKs cascade, the association of β -arrestin with ERK1/2 and its signaling outcomes have been extensively characterized. Two main pathways for the activation of ERK1/2 by alternate GPCRs have been described; the first one has to do with the activation of G proteins and the second one with the recruitment of β -arrestins. Moreover, clear differences exist between these two mechanisms: G protein-mediated ERK1/2 activation is transient, localized in the nucleus and promotes gene transcription and cellular differentiation through the phosphorylation of different transcription factors, such as Elk-1, whereas β -arrestin-dependent ERK1/2 signaling is sustained, localized in clathrin-coated vesicles and stabilized in endosomes, allowing for the activation of different cytosolic substrates (Fig. 4). The characterization of these two independent signaling pathways has been achieved through the employment of a great number of experimental techniques, such as the use of biased ligands, small interfering RNA (siRNA) and specific inhibitors of protein kinase C (PKC), among many others (Leftkowitz and Shenoy, 2005; Luttrell, 2002). Differences in these two signaling pathways can be appreciated in the angiotensin-I receptor (AT1R) and the V2R, classified as type B receptors, which strongly interact with both β -arrestins and promote a

sustained activation of ERK1/2 in endosomes, whereas the β 2AR, a classical type A receptor, transiently interacts with β -arrestins and induces a short activation of ERK1/2 (Jean-Charles et al., 2017). Interestingly, by depleting both β -arrestins, other studies have suggested that sustained ERK1/2 activation can also be mediated by G proteins, which is in contrast with the classical paradigm that β -arrestins promote sustained G-protein-independent signaling pathways (Leftkowitz and Shenoy, 2005; Luo et al., 2008). In addition, G proteins and β -arrestins can act in sequence or in a concerted fashion. For example, the activation of ERK1/2 by several chemokine receptors is sensitive to both pertussis toxin-mediated inhibition of $G_{i/o}$ protein and siRNA-mediated depletion of β -arrestins (Leftkowitz and Shenoy, 2005). On the other hand, by using the RNA interference (RNAi) technique to deplete the expression of both β -arrestins, it was reported that the β -arrestin-dependent functions of some GPCRs are inhibited, whereas those functions that are β -arrestin-independent are potentiated. This was clearly demonstrated using the β 2AR and the angiotensin-II A receptor (AT2AR) as models, where depletion of both β -arrestins resulted in an increase in the levels of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) by β 2AR, and inhibition in the β 2AR and AT2A receptor internalization as well as an important decrease in the activation of ERK1/2 by AT2AR. This study suggests that GPCRs are able to activate ERK1/2 employing β -arrestins as transducers, which is in agreement with others studies that demonstrate that over-expression of these two proteins potentiate the activation of ERK1/2 (Ahn et al., 2003).

Recently, the use of the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR-Cas9) technique, was employed to completely abolish the expression of the $G_{q/11}$ protein and both β -arrestins. Using the free fatty acid 4 (FFA4) receptor as a model, it was reported that the activation of ERK1/2 by this GPCR is G protein-dependent, with no participation of β -arrestins (Alvarez-Curto et al., 2016). In the same lines, by using genome editing, conditional gene deletion and siRNAs targeting to the G_s protein and both β -arrestins, another study reported that β -arrestins are dispensable for the activation of ERK1/2 by the β 2AR. Interestingly, the authors indicate that the activation of ERK1/2 was totally G protein-dependent whereas both β -arrestins restrain a total activation of ERK1/2. Even though these data suggest that this class of receptors uses only the G protein to activate ERK1/2, the activation of these kinases could be mediated by other molecules like the $\beta\gamma$ subunits of the activated G protein. Besides, there is a possibility

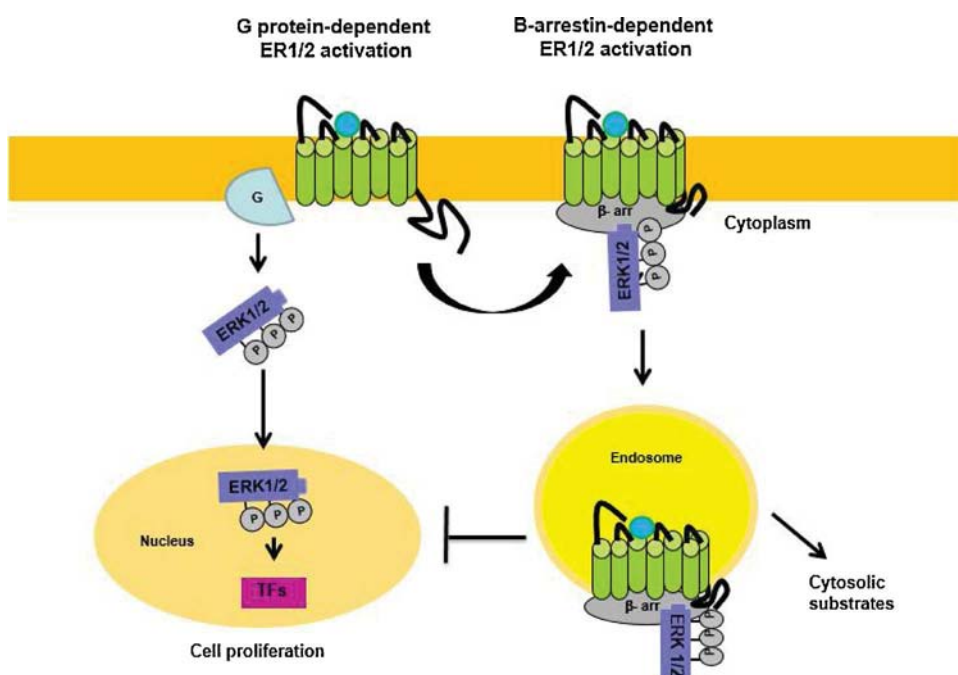


Fig. 4. The ERK1/2 pathway can be activated in a G protein- and β -arrestin-dependent fashion. The classical paradigm suggests that G protein-dependent ERK1/2 activation is transient and is primarily localized in the nucleus, promoting different nuclear events, such as gene transcription and chromatin remodeling through the phosphorylation of different transcription factors, such as Elk-1, whereas the β -arrestin-dependent ERK1/2 activation is sustained, localized in endosomes, allowing for the entire multi-protein complex to activate a great number of cytosolic substrates.

that in this class of receptors, β -arrestins do not play a role in the activation of ERK1/2, but they dictate its cellular localization, although further studies will be necessary to confirm this hypothesis (O'Hayre et al., 2017).

5.1. A functional feedback allows for the formation of the multi-protein complex GPCR/ β -arrestin/ERK1/2

Due to the functional interaction that exists among β -arrestins and the MAPK cascade, it would not be adventurous to assume that there is a strong feedback among some components of the MAPK cascade and β -arrestin, affecting directly some GPCRs functions. A very elegant study reported a functional interaction within the GPCR/ β -arrestin/ERK1/2 complex, suggesting that activation of ERK1/2 leads to the desensitization and internalization of receptors into clathrin-coated vesicles. It is likely that this phenomenon is conserved among those GPCRs that recruit β -arrestin 2 after being stimulated. According to this study, the loss of GPCRs functions could represent a heterologous desensitization that had not been described previously. Besides, because a great number of GPCRs are able to activate ERK1/2, the signaling features of such receptors could also be affected by the activation of these kinases. It should be noticed that in this same study, it was demonstrated that the phosphorylation of β -arrestin 2 on Ser14 and Thr276 by ERK1/2, was an essential step for the ERK1/2-promoted GPCR-sequestration, which is in agreement with the hypothesis that the phosphorylation of β -arrestin 2 may mimic the phosphorylated receptor, thus promoting a high affinity interaction with inactive, non-phosphorylated receptor (Paradis et al., 2015). Nevertheless, this is not the only report that demonstrates a strong feedback among the MAPK cascade and β -arrestin 2. A recent study shows that activation of serotonin 5-HT_{2C} receptors, which are able to activate ERK1/2 in a β -arrestin-dependent fashion, promotes the phosphorylation of β -arrestin 2 on Thr383 by MEK1, which in turn allows for the recruitment of ERK1/2 to the GPCR/ β -arrestin 2 complex and the subsequent activation of ERK1/2. In addition, phosphorylation of β -arrestin 2 on Thr383 is involved in the activation of ERK1/2 by other GPCRs through a β -arrestin-dependent mechanism, such as the β 2AR, follicle-stimulating hormone (FSH) receptor and the C-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4), but does not affect the ability of the 5-HT₄ receptor to activate ERK1/2 in a β -arrestin-independent fashion (Cassier et al., 2017). Collectively, these results suggest that for the multi-protein complex GPCR/ β -arrestin/ERK1/2 to function, there must exist not only a one-direction functional interaction, but also a complete and strong feedback among all the molecules that integrate the entire complex

6. Conclusion

The formation of multi-protein complexes after the activation of GPCRs is an essential step for the propagation and amplification of different signaling pathways. Some crystal structures have provided unique information regarding the structural elements that governs the interaction among cell-surface proteins and downstream signaling molecules. One of the most important breakthroughs in the field was the resolution of the two main GPCR-signaling complexes crystal structures, the β 2AR coupled to its G_s protein (Rasmussen et al., 2007) and the human rhodopsin coupled to a pre-activated visual arrestin (Kang et al., 2015). Moreover, the crystal structure of other GPCRs have been solved during the last decade, opening the possibility for the design of more effective drugs with less side effects (Manglik et al., 2012; Huang et al., 2013; Chrencik et al., 2015). The formation of the multi-protein complex GPCR/ β -arrestin/ERK1/2 has a myriad of cellular effects after agonist binding, from gene transcription to cell growth, differentiation and proliferation. Even though no crystal structure of the complex β -arrestin-ERK1/2 has been solved, several studies have succeeded explaining the intra-molecular interactions among the entire multi-protein complex, from traditional experimental approaches

(Coffa et al., 2011) to computational 3D models (Bourquard et al., 2015). However, more studies will be necessary to fully understand the whole structural elements that govern their intra-molecular interactions and to explain the role of the entire complex in multiple cellular processes.

Author contributions

The draft of this review was initially conceived by Gabriel Carmona-Rosas and was jointly written by Gabriel Carmona-Rosas, Rocío Alcántara-Hernández and David Alejandro Hernandez Espinosa. Gabriel Carmona-Rosas is a student of the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas-UNAM and a recipient of a fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank Dr. J. Adolfo García-Sáinz, Dr. Diego Gonzalez-Halphen (Instituto de Fisiología Celular-UNAM) and Dr. Jose Vazquez-Prado (Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional) for suggestions and comments in the manuscript.

References

- Ahn, S.N., Nelson, C.D., Garrison, T.R., Miller, W.E., Leftkowitz, R.J., 2003. Desensitization, internalization, and signaling functions of β -arrestins demonstrated by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (4), 1740–1744. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.262789099>.
- Alvarez-Curto, E., Inoue, A., Jenkins, L., Raihan, S.Z., Prihandoko, R., Tobin, A.B., Milligan, G., 2016. Target elimination of G proteins and arrestins defines their specific contributions to both intensity and duration of G protein-coupled receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 291 (53), 27147–27159. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M116.754887>.
- Avendaño-Vázquez, S.E., García-Caballero, A., García-Sáinz, J.A., 2005. Phosphorylation and desensitization of the lysophosphatidic acid receptor LPA1. *Biochem. J.* 385 (3), 677–684. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20040891>.
- Blaukat, A., Pizard, A., Rajerison, R.M., Alhenc-Gelas, F., Müller-Esterl, W., Dikic, I., 1999. Activation of mitogen-activated protein kinase by the bradykinin B2 receptor is independent of receptor phosphorylation and phosphorylation-triggered internalization. *FEBS Lett.* 451 (3), 337–341. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00613-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00613-4).
- Bourquard, T., Landomiel, F., Reiter, E., Crepieux, P., Ritchie, D.W., Aze, J., Poupon, A., 2015. Unraveling the molecular architecture of a G protein-coupled receptor/ β -arrestin/Erk module complex. *Sci. Rep.* 1 (5), 1–13. <http://dx.doi.org/10.1038/srep10760>.
- Budd, D.C., Rae, A., Tobin, A.B., 1999. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by a Gq/11-coupled muscarinic receptor is independent of receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 274 (18), 12355–12360. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.18.12355>.
- Butcher, A.J., Prihandoko, R., Choi Kong, K., McWilliams, P., Edwards, M.J., Bottrill, A., Mistry, S., Tobin, A.B., 2011. Differential G-protein-coupled receptors phosphorylation provides evidence for a signaling barcode. *J. Biol. Chem.* 286 (13), 11506–11518. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.154526>.
- Cahill III, T.J., Thomsen, A.R.B., Tarrasch, J.T., Plouffe, B., Nguyen, A.H., Yang, F., Huang, L.Y., Kahsai, A.W., Bassoni, D.L., Gavino, B.J., Lamerdin, J.E., Triest, S., Shukla, A.K., Berger, B., Little IV, J., Antar, A., Blanc, A., Qu, C.X., Chen, X., Kawakami, K., Inoue, A., Aoki, J., Steyaert, J., Sun, J.P., Bouvier, M., Skiniotis, G., Leftkowitz, R.J., 2017. Distinct conformations of GPCR- β -arrestin complexes mediate desensitization, signaling, and endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (10), 2562–2567. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1701529114>.
- Cassier, E., Gallay, N., Bourquard, T., Claeysen, S., Bockaert, J., Crepieux, P., Poupon, A., Reiter, E., Marin, P., Vandermoere, F., 2017. Phosphorylation of β -arrestin2 at Thr383 by MEK underlies β -arrestin-dependent activation of Erk1/2 by GPCRs. *Elife* 6, 1–21. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.23777>.
- Coffa, S., Breitman, M., Hanson, S.M., Callaway, K., Kook, S., Dalby, K.N., Gurevich, V.V., 2011. The effect of arrestin conformation on the recruitment of c-Raf1, MEK1, and ERK1/2 activation. *PLoS One* 6 (12), 1–12. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028723>.
- Columbe, P., Meloche, S., 2007. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1773 (8), 1376–1387. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.11.001>.
- Chen, C.H., Paing, M.M., Trejo, J., 2004. Termination of protease-activated receptor-1 signaling by β -arrestins is independent of receptor phosphorylation. *J. Biol. Chem.*

- 279 (11), 10020–10031. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M310590200>.
- Chrencik, J.E., Roth, C.B., Terakado, M., Kurata, H., Moi, R., Kihara, Y., Warshaviak, D., Nakade, S., Asmar-Rovira, G., Mileni, M., Mizuno, H., Griffith, M.T., Rodgers, C., Han, G.W., Velazquez, J., Chun, J., Stevens, R.C., Hanson, M.A., 2015. Crystal structure of antagonist bound human lysophosphatidic acid receptor 1. *Cell* 161 (7), 1633–1643. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.002>.
- Huang, J., Chen, S., Zhang, J.J., Huang, X.Y., 2013. Crystal structure of oligomeric β 1-adrenergic G protein coupled receptors in ligand-free basal state. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20 (4), 419–425. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2504>.
- DeFea, K.A., 2011. Beta-arrestins as regulators of signal termination and transduction: how do they determine what to scaffold? *Cell. Signal.* 23 (4), 621–629. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.10.004>.
- DeGraff, J.L., Gagnon, A.W., Benovic, J.L., Orsini, M.J., 1999. Role of arrestins in endocytosis and signaling of alpha2-adrenergic receptor subtypes. *J. Biol. Chem.* 274 (16), 11253–11259. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.16.11253>.
- Dikic, I., Tokiwa, G., Lev, S., Courtneidge, S.A., Schlessinger, J., 1996. A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* 383 (6600), 447–450. <http://dx.doi.org/10.1038/383547a0>.
- Eichel, K., Jullie, D., von Zastrow, M., 2016. Beta-Arrestin drives MAP kinase signalling from clathrin-coated structures after GPCR dissociation. *Nat. Cel. Biol.* 18 (3), 303–310. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb3307>.
- Gether, U., 2000. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* 21 (1), 90–113. <http://dx.doi.org/10.1210/edrv.21.1.0390>.
- Granzin, J., Wilden, U., Choe, H.W., Labahn, J., Krafft, B., Buldt, G., 1998. X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments. *Nature* 397 (6670), 918–921. <http://dx.doi.org/10.1038/36147>.
- Gurevich, V.V., Benovic, J.L., 1993. Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. *J. Biol. Chem.* 268 (16), 11628–11638. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=J+Biol+Chem.+1993+Jun+5%3B268\(16\)%3A11628-38](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=J+Biol+Chem.+1993+Jun+5%3B268(16)%3A11628-38).
- Gurevich, V.V., Gurevich, E.V., 2003. The new face of active receptor bound arrestin attracts new partners. *Structure* 11 (9), 1037–1042. [http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126\(03\)00184-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126(03)00184-9).
- Gurevich, E.V., Gurevich, V.V., 2006. Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol.* 7 (9), 236. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2006-7-9-236>.
- Han, M., Gurevich, V.V., Vishnivitskiy, S.A., Sigler, P.B., Schubert, C., 2001. Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane translocation. *Structure* 9 (9), 869–880. [http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00644-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00644-X).
- Hawes, B.E., van Biesen, T., Koch, W.J., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J., 1995. Distinct pathways of Gi- and Gq-mediated mitogen activated protein kinase action. *J. Biol. Chem.* 270 (29), 17148–17153. <http://www.jbc.org/content/270/29/17148.full.pdf>.
- Hinz, L., Ahles, A., Ruprecht, B., Kuster, B., Engelhardt, S., 2017. Two serines in the distal C-terminus of the human β 1-adrenoceptor determine β -arrestin2 recruitment. *PLoS One* 12 (5), 1–15. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0176450>.
- Hirsch, J.A., Schubert, C., Gurevich, V.V., Sigler, P.B., 1999. The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell* 97 (2), 257–259. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80735-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80735-7).
- Jala, V.R., Shao, W.H., Haribabu, B., 2005. Phosphorylation-independent β -arrestin translocation and internalization of leukotriene B4 receptors. *J. Biol. Chem.* 280 (6), 4880–4887. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M409821200>.
- Jean-Charles, P.Y., Kaur, S., Shenoy, S.K., 2017. GPCR signaling via β -arrestin-dependent mechanisms. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* <http://dx.doi.org/10.1097/FJC.0000000000000482>. (Epub ahead of print).
- Kang, Y., Zhou, X.E., Gao, X., He, Y., Liu, W., Ishchenko, A., Barty, A., White, T.A., Yefanov, O., Han, G.W., Xu, Q., de Waal, P.W., Ke, J., Tan, M.H., Zhang, C., Moeller, A., West, G.M., Pascal, B.D., Van Eps, N., Caro, L.N., Vishnivitskiy, S.A., Lee, R.J., Suino, P.K.M., Gu, X., Pal, K., Ma, J., Zhi, X., Boutet, S., Williams, G.J., Messerschmidt, M., Gati, C., Zatspein, N.A., Wang, D., James, D., Basu, S., Roy, C.S., Conrad, C.E., Coe, J., Liu, H., Lisova, S., Kupitz, C., Grotjohann, I., Fromme, R., Jiang, Y., Tan, M., Yang, H., Li, J., Wang, M., Zheng, Z., Li, D., Howe, N., Zhao, Y., Standfuss, J., Diederichs, K., Dong, Y., Potter, C.S., Carragher, B., Caffrey, M., Jiang, H., Chapman, N.H., Spence, J.C., Fromme, P., Weierstall, U., Ernst, O.P., Katritch, V., Gurevich, V.V., Griffin, P.R., Hubbell, W.L., Stevens, R.C., Cherezov, V., Melcher, K., Xu, H.E., 2015. Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature* 532 (7562), 561–567. <http://dx.doi.org/10.1038/nature14656>.
- Kobilka, B.K.G., 2007. Protein coupled receptor structure and activation. *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (4), 794–807. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamer.2006.10.021>.
- Kumari, P., Srivastava, A., Banerjee, R., Ghosh, E., Gupta, P., Ranjan, R., Chen, X., Gupta, B., Gupta, C., Jaiman, D., Shukla, A.K., 2016. Functional competence of a partially engaged GPCR- β -arrestin complex. *Nat. Commun.* 9 (7), 1–16. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms13416>.
- Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E., Musacchio, J.M., Plozman, G.D., Rudy, B., Schlessinger, J., 1995. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 376 (6543), 737–745. <http://dx.doi.org/10.1038/376737a0>.
- Leftkowitz, R., Shenoy, S.K., 2005. Transduction of receptor signals by β -Arrestins. *Science* 308 (5721), 512–517. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1109237>.
- Lhose, M.J., Hoffman, C., 2014. Arrestin interactions with G protein coupled receptors. *Handb. Exp. Pharmacol.* 219, 15–56. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-41199-1_2.
- Li, J.G., Luo, L.Y., Krupnick, J.G., Benovic, J.L., Liu-Chen, L.Y., 1999. U50,488-induced internalization of the human kappa opioid receptor involves a beta-arrestin- and dynamin-dependent mechanism. Kappa receptor internalization is not required for mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 274 (17), 12087–12094. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.17.12087>.
- Luo, J., Busillo, J.M., Benovic, J.L., 2008. M3 muscarinic acetylcholine receptor-mediated signaling is regulated by distinct mechanisms. *Mol. Pharmacol.* 74, 338–347. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.107.044750>.
- Luttrell, L.M., Della Rocca, G.J., van Biesen, T., Luttrell, D.K., Leftkowitz, R.J., 1997. Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J. Biol. Chem.* 272, 4637–4644. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.7.4637>.
- Luttrell, L.M., 2002. Activation and targeting of mitogen-activated protein kinases by G-protein-coupled receptors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80 (5), 375–382. <http://dx.doi.org/10.1139/Y02-045>.
- Luttrell, L.M., Roudabush, F.L., Choy, E.W., Miller, W.E., Field, M.E., Pierce, K., Leftkowitz, R.J., 2000. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by β -arrestin scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (5), 2449–2454. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.041604898>.
- Luttrell, L.M., Miller, W.E., 2013. Arrestins as regulators of kinases and phosphatases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 118, 115–147. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394440-5.00005-X>.
- Manglik, A., Kruse, A.C., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Mathiesen, J.M., Sunahara, R.K., Pardo, L., Weis, W.I., Kobilka, B.K., Granier, S., 2012. Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* 485 (7398), 321–326. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10954>.
- Milasta, S., Evans, N.A., Ormiston, L., Wilson, S., Leftkowitz, R., Milligan, G., 2005. The sustainability of interactions between the orexin-1 receptor and β -arrestin-2 is defined by a single C-terminal cluster of hydroxy amino acids and modulates the kinetics of ERK MAPK regulation. *Biochem. J.* 1 (387, Pt. 3), 573–584. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20041745>.
- Neves, S.R., Ram, P.T., Iyengar, R., 2002. G protein pathways. *Science* 296 (5573), 1636–1639. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1071550>.
- Nobles, K.N., Guan, Z., Xiao, K., Oas, T., Leftkowitz, R.J., 2007. The active conformation of β -arrestin-1: direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of β -arrestin1 and -2. *J. Biol. Chem.* 282 (29), 21370–21381. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M611483200>.
- Nobles, K.N., Xiao, K., Ahn, S., Shukla, K.A., Lam, M.C., Rajagopal, S., Strachan, T.R., Huang, Y.T., Bressler, A.E., Hara, R.M., Shenoy, K.S., Gygi, P.S., Leftkowitz, R.J., 2011. Distinct phosphorylation sites on the β 2-Adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -Arrestin. *Sci. Signal.* 4 (185), 1–10. <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.2001707>.
- O'Hayre, M., Vazquez-Prado, J., Kufareva, I., Stawiski, R.W., Handel, T.M., Seshagiri, S., Gutkind, J.S., 2013. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Cancer* 13 (6), 412–424. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3521>.
- O'Hayre, M., Eichel, K., Avino, S., Zhao, X., Steffen, D.J., Feng, X., Kawakami, K., Aoki, J., Messer, K., Sunahara, R., Inoue, A., von Zastrow, M., Gutkind, J.S., 2017. Genetic evidence that β -arrestins are dispensable for the initiation of β 2-adrenergic receptor signaling to ERK. *Sci. Signal.* 10 (484), 1–13. <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.aal3395>.
- Pal, K., Mathur, M., Kumar, P., DeFea, K., 2012. Divergent β -Arrestin-dependent signaling events are dependent upon sequences within G-protein coupled receptor C termini. *J. Biol. Chem.* 288 (5), 3265–3274. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.400234>.
- Paradis, J.S., Ly, S., Blondel-Tepaz, E., Galan, J.A., Beautrais, A., Scott, M.G., Enslin, H., Marullo, S., Roux, P.P., Bouvier, M., 2015. Receptor sequestration in response to β -arrestin-2 phosphorylation by ERK1/2 governs steady-state levels of GPCR cell-surface expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (37), 5160–5168. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1508836112>.
- Park, J.Y., Lee, S.Y., Kim, H.E., Seo, M.D., Chung, K.Y., 2016. Structural mechanism of GPCR-arrestin interaction: recent breakthroughs. *Arch. Pharm. Res.* 39 (3), 293–301. <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-016-0712-1>.
- Pawson, C.T., Scott, J.D., 2010. Signal integration through blending, bolstering and bifurcating of intracellular information. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17 (6), 653–658. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1843>.
- Peterson, Y.K., Luttrell, L.M., 2017. The diverse roles of arrestin scaffolds in G protein-coupled receptor signaling. *Pharmacol. Rev.* 63 (3), 256–297. <http://dx.doi.org/10.1124/pr.116.013367>.
- Perez-Aso, M., Segura, V., Monto, F., Baretino, D., Noguera, M.A., Milligan, G., D'Ocon, P., 2013. The three α 1-adrenoceptor subtypes show different spatio-temporal mechanisms of internalization and ERK1/2 phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1833 (10), 2322–2333. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamer.2013.06.013>.
- Pierce, K.L., Maudsley, S., Daaka, Y., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J., 2000. Role of endocytosis in the activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade by sequestering and nonsequestering G protein-coupled receptors. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (4), 1489–1494. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.4.1489>.
- Pierce, K.L., Leftkowitz, R.J., 2001a. Classical and new roles of β -arrestins in the regulation of G protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 28 (10), 727–733. <http://dx.doi.org/10.1038/35094577>.
- Pierce, K.L., Luttrell, L.M., Leftkowitz, R.J., 2001b. New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene* 20 (13), 1532–1539. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1204184>.
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., Seger, R., 2011. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim. Biophys. Acta* 1813 (9), 1619–1633. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamer.2010.12.012>.
- Rajagopal, S., Rajagopal, K., Leftkowitz, R.J., 2010. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (5), 373–386. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3024>.

- Ranjan, R., Gupta, P., Shukla, A.K., 2016. GPCR signaling: beta-arrestins kiss and remember. *Curr. Biol.* 26 (7), 285–288. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2016.02.056>.
- Ranjan, Ravi., Dwivedi, H., Baidya, M., Kumar, M., Shukla, A.K., 2017. Novel structural insights into GPCR- β -arrestin interaction and signaling. *Trends Cell Biol.* 27 (11), 851–862. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2017.05.008>.
- Rasmussen, S.G.F., Choi, H.J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., Schertler, G.F., Weis, W.I., Kobilka, B.K., 2007. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450 (7168), 383–387. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06325>.
- Richardson, M.D., Balias, A.M., Yamaguchi, K., Freilich, E.R., Barak, L.S., Watra, M.M., 2003. Human substance P receptor lacking the C-terminal domain remains competent to desensitize and internalize. *J. Neurochem.* 84 (4), 854–863. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01577.x>.
- Roche, J.P., Bounds, S., Brown, S., Mackie, K., 1999. A mutation in second transmembrane region of the CB1 receptor selectively disrupts G protein signaling and prevents receptor internalization. *Mol. Pharmacol.* 56 (3), 611–618. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.56.3.611>.
- Schmitt, J.M., Stork, P.J., 2000. β_2 -adrenergic receptor activated extracellular signal-regulated kinases (ERKs) via the small G protein rap1 and the serine/threonine kinase B-Raf. *J. Biol. Chem.* 275 (33), 25342–25350. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M003213200>.
- Schramm, N.L., Limbird, E., 1999. Stimulation of mitogen-activated protein kinase by G protein-coupled alpha2-adrenergic receptors does not require agonist-elicited endocytosis. *J. Biol. Chem.* 274 (35), 24935–24940. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.35.24935>.
- Shaul, Y.D., Seger, R., 2007. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1773 (8), 1213–1226. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.005>.
- Shenoy, S.K., Leftkowitz, R.J., 2011. β -arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol. Sci.* 32 (9), 521–533. <http://dx.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., Staus, D.P., Hilger, D., Uysal, S., Huang, L.Y., Paduch, M., Tripathi, S.P., Koide, A., Koide, S., Weis, W.I., Kossiakoff, A.A., Kobilka, B.K., Leftkowitz, R.J., 2013. Structure of active β -arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature* 497 (7447), 137–141. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12120>.
- Shukla, A.K., Westfield, G.H., Xiao, K., Reis, R.I., Huang, L.Y., Shukla, P.T., Quian, J., Li, S., Blanc, A., Oleskie, A.N., Dosey, A.M., Su, M., Liang, C.R., Gu, L.L., Shan, J.M., Chen, X., Hann, R., Choi, M., Yao, X.J., Klink, B.U., Kahsai, A.W., Sidhu, S.S., Koide, S., Penczek, P.A., Kossiakoff, A.A., Woods, V.L., Kobilka, B.K., Skiniotis, G., Leftkowitz, R.J., 2014. Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature* 512, 218–222. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13430>.
- Sorkin, A., von Zastrow, M., 2000. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (8), 600–614. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm883>.
- Stalheim, L., Ding, Y., Gullapalli, A., Paing, M.M., Wolfe, B.L., Morris, D.R., Trejo, J., 2005. Multiple independent functions of arrestins in the regulation of protease-activated receptor-2 signaling and trafficking. *Mol. Pharmacol.* 67 (1), 78–87. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.104.006072>.
- Sutton, R.B., Vishnivetskiy, S.A., Robert, J., Hanson, S.M., Raman, D., Knox, B.E., Kono, M., Navarro, J., Gurevich, V.V., 2005. Crystal structure of cone arrestin at 2.3 Å: evolution of receptor specificity. *J. Mol. Biol.* 354 (5), 1069–1080. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2005.10.023>.
- Thomsen, A.R., Plouffe, B., Cahill III, T.J., Shukla, A.K., Tarrasch, J.T., Dosey, A.M., Kahsai, A.W., Strachan, R.T., Pani, B., Mahoney, J.P., Huang, L., Breton, B., Heydenreich, F.M., Sunahara, R.K., Skiniotis, G., Bouvier, M., Leftkowitz, R.J., 2016. GPCR-G protein- β -arrestin super-complex mediates sustained G protein signaling. *Cell* 166 (4), 907–919. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.004>.
- Tobin, A.B., Butcher, A.J., Kong, K.C., 2008. Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signaling. *Trends Pharmacol. Sci.* 29 (8), 413–420. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2008.05.006>.
- Tohgo, A., Choy, E.W., Gesty, P.D., Pierce, K.L., Laporte, S., Oakley, R.H., Caron, M.G., Leftkowitz, R.J., Luttrell, L.M., 2003. The stability of the G protein-coupled receptor beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J. Biol. Chem.* 278 (27), 6258–6267. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M212231200>.
- Wan, Y., Huang, X.Y., 1998. Analysis of the Gs/mitogen-activated protein kinase pathway in mutant S49 cells. *J. Biol. Chem.* 273 (23), 14533–14537. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.23.14533>.
- Yang, W., Wang, D., Richmond, A., 1999. Role of clathrin-mediated endocytosis in CXCR2 sequestration, resensitization, and signal transduction. *J. Biol. Chem.* 274 (16), 11328–11333. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.16.11328>.
- Ye, F., Zhang, M., 2013. Structures and target recognition modes of PDZ domains: recurring themes and emerging pictures. *Biochem. J.* 455, 1–14. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20130783>.
- Zhan, X., Gimenez, L.E., Gurevich, V.V., Spiller, B.W., 2011. Crystal structure of arrestin-3 reveals the basis of the difference in receptor binding between two non-visual subtypes. *J. Mol. Biol.* 406 (3), 467–478. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2010.12.034>.
- Zhou, X.E., He, Y., de Wal, P.W., Gao, X., Kang, Y., Van Eps, N., Yin, Y., Pal, K., Goswami, D., White, T.A., Barty, A., Latorraca, N.R., Chapman, H.N., Hubbel, W.L., Dror, R.O., Stevens, R.C., Cherezov, V., Gurevich, H.N., Griffin, P.R., Ernst, O.P., Melcher, K., Xu, E., 2017. Identification of phosphorylation codes for arrestin recruitment by G protein-coupled receptors. *Cell* 170 (3), 457–469. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.002>.
- Zindel, D., Engel, S., Bottrill, A.R., Philippe, P.J., Prezeau, L., Tobin, B.A., Bunemann, M., Krasel, C., Butcher, J.A., 2016. Identification of key phosphorylation sites in PTH1R that determine arrestin3 binding and fine-tune receptor signaling. *Biochem. J.* 473 (22), 4173–4192. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20160740>.

The role of β -arrestins in G protein-coupled receptor heterologous desensitization: A brief story

12

Gabriel Carmona-Rosas¹, Rocío Alcántara-Hernández,
David Alejandro Hernández-Espinosa

Instituto de Fisiología Celular (UNAM), Mexico City, Mexico

¹Corresponding author: e-mail address: gcarmona@email.ifc.unam.mx

CHAPTER OUTLINE

1 Introduction.....	196
2 The Formation of GPCR/ β -Arrestin Complexes During the Homologous and Heterologous Desensitization Processes.....	196
2.1 The Role of β -Arrestins in GPCR Regulation.....	197
3 The Role of β -Arrestins in Heterologous Desensitization: Describing a Few Number of Studies.....	199
4 Coda/Future Directions.....	200
Acknowledgments.....	201
Author Contributions.....	201
Conflicts of Interest.....	201
References.....	201
Further Reading.....	204

Abstract

G protein-coupled receptors (GPCRs) are transmembrane proteins that have an important impact in a myriad of cellular functions. Posttranslational modifications on GPCRs are a key processes that allow these proteins to recruit other intracellular molecules. Among these modifications, phosphorylation is the most important way of desensitization of these receptors. Several research groups have described two different desensitization mechanisms: heterologous and homologous desensitization. The first one involves the phosphorylation of the receptors by protein kinases, such as PKC, following the desensitization and internalization of the receptor, while the second one involves the phosphorylation of the receptors by GRKs, allowing for the receptor to recruit β -arrestins to be desensitized and internalized.

Interestingly, a few number of studies have described the participation of β -arrestins during the heterologous desensitization process. Hence, the aim of this review is to briefly explore the role that β -arrestins play during the heterologous desensitization of several GPCRs.

1 INTRODUCTION

G protein-coupled receptors (GPCRs) have an important impact in a great variety of cellular processes (Bockaert & Pin, 1999; Kumari, Gosh, & Shukla, 2015; Miao & McCammon, 2016). The superfamily of GPCRs involves almost 1000 members that are encoded by the genome (Ikeda, Sugihara, & Suwa, 2018; Santos et al., 2017), and they are well known to be the target of almost 20–40% of the current therapeutic drugs in the market (Celebiri & Godbole, 2018; Insel et al., 2018; Smith, Lefkowitz, & Rajagopal, 2018). Currently, almost 30 GPCRs have been crystalized, allowing not only for a high resolution view of the receptor in order to design more specific drugs with less side effects (Grisshammer, 2017; Kruse, Manglik, Kobilka, & Weis, 2013; Stauch & Cherezov, 2018) but also to elucidate the residues and the intracellular domains that are responsible for the binding to other intracellular proteins (Deupi, 2014; Kang et al., 2015; Lu & Wu, 2016). One of the molecules that are known to bind GPCRs after being phosphorylated, is β -arrestins. These proteins were originally discovered due to their ability to desensitize and internalize several activated GPCRs during homologous desensitization (Carmona-Rosas, Alcantara-Hernandez, & Hernandez-Espinoza, 2018), however, recent studies have demonstrated that β -arrestins are also able to desensitize and internalize receptors during heterologous desensitization (Shi et al., 2017; Zhang & Kim, 2017). This means that the recruitment of β -arrestins to a GPCR may occur when the receptor is phosphorylated both in ligand-dependent and -independent fashions (Bohn, Lefkowitz, & Caron, 2002; Chaturvedi et al., 2018; Ranjan, Dwivedi, Baidya, Kumar, & Shukla, 2017). In addition to this, we recently described that β -arrestins are important scaffold proteins that need to be recruited to a receptor in order to form the multi-protein complex GPCR/ β -arrestin/ERK1/2, which is able to activate different downstream signaling pathways (Carmona-Rosas et al., 2018). We do not pretend to present a vast analysis of the few studies that reported the recruitment of β -arrestins to the receptor during the heterologous desensitization process, but rather, describing the key elements of such interaction and the subsequent signaling pathways that are activated.

2 THE FORMATION OF GPCR/ β -ARRESTIN COMPLEXES DURING THE HOMOLOGOUS AND HETEROLOGOUS DESENSITIZATION PROCESSES

GPCR desensitization is understood as a decrease in the coupling between the phosphorylated receptor and the G proteins. This process allows for the receptor to be internalized through the endocytic machinery, resulting in an important decline of

the receptor response (Magalhaes, Dunn, & Ferguson, 2012). Currently, there are two main types of desensitization: (1) homologous desensitization, which is the result of the activation of the receptor by a ligand and the phosphorylation of the receptor intracellular domains, by G protein-coupled receptor kinases (GRKs), hence, resulting in the internalization of the receptor by their coupling to β -arrestin proteins (Shenoy & Lefkowitz, 2011). The latter proteins were described as scaffold elements that the GPCRs employ to amplify their signaling pathways and to be internalized into clathrin-coated pits (Delom & Fessart, 2011; Irannejad et al., 2013; Puthenveddu & Von Zastrow, 2006) and (2) heterologous desensitization, which is a ligand-independent process where the receptor is phosphorylated in its intracellular domains by second messenger-dependent protein kinases, such as protein kinase A (PKA) or protein kinase C (PKC) (Benovic et al., 1985).

Understanding the interaction between the homologous and heterologous desensitization of GPCRs is currently an important field of study. Several reports have related GRK2 and β -arrestins with the PKA/PKC-mediated regulatory pathway. For example, the activated GRK2 is able to bind PKC β through its pleckstrin homology domain, resulting in the inhibition of PKC. In addition, β -arrestins are able to inhibit the PKC-mediated regulatory pathways through the recruitment and activation of the diacylglycerol (DAG) kinase, which subsequently regulates the conversion of DAG into phosphatidic acid (PA). Besides, it has been reported that β -arrestins can recruit cAMP phosphodiesterases to ligand-activated receptors, promoting the degradation of cAMP, and inhibiting the activation of PKC (Fig. 1A) (Zhang & Kim, 2017).

2.1 THE ROLE OF β -ARRESTINS IN GPCR REGULATION

Even though β -arrestins are known to hinder the binding of the receptor with the G protein, different studies have reported that the conformation of the supercomplex GPCR- β -arrestin-G protein exists, which allows the receptor to keep signaling in a β -arrestin- and G protein-dependent fashion while internalized. It is important to mention that the formation of this multi-protein complex is particular of class B receptors, which have a great number of serine and threonine residues in the C-terminal tail, enabling the recruitment of β -arrestins (Thomsen et al., 2016). On the other hand, class A receptors are known to have less phosphorylated residues in the C-terminal tail, which impairs the binding of β -arrestins to the receptors. In addition, class B receptors may undergo homologous and heterologous desensitization, being the phosphorylation of the receptor the main signal that allows the binding of β -arrestins and the subsequent internalization and trafficking of the receptors (Oakley, Laporte, Holt, Caron, & Barak, 2000). This process has been demonstrated with several GPCRs, in particular with the β 2-adrenergic receptor, (β 2-AR), a class A receptor, where the addition of phosphoacceptor residues in the C-terminal tail, improves the binding of β -arrestin 2 to the receptor (Zindel et al., 2015). The participation of β -arrestins in the regulation of GPCRs is a key process that allows for the regulation of these receptors and the activation of different signaling

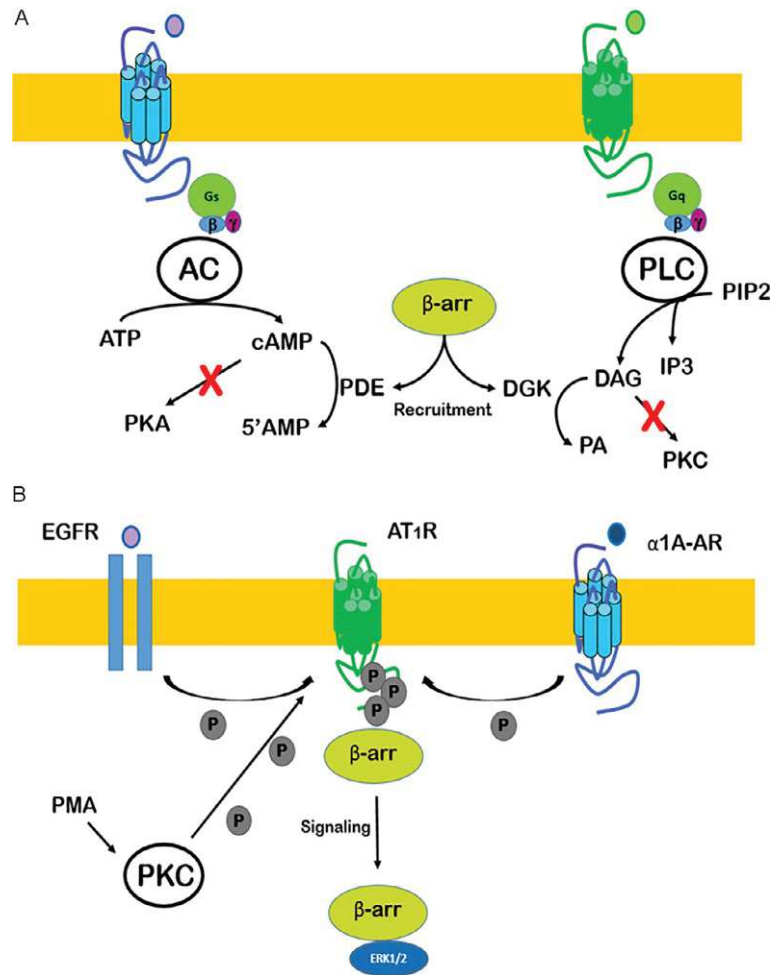


FIG. 1

Schematic representations of the putative roles of β -arrestins during GPCR heterologous desensitization. (A) β -Arrestins are able to inhibit the PKC-mediated signaling pathways through the activation of the diacylglycerol (DAG) kinase, which is responsible for the conversion of DAG into phosphatidic acid (PA), hence, decreasing the activity of PKC. In addition, β -arrestins are able to activate and recruit cAMP phosphodiesterases to ligand-activated receptors, fostering the degradation of cAMP, and inhibiting the activity of PKC. (B) The recruitment of β -arrestin 2 to the unstimulated angiotensin 1 receptor (AT1) is regulated by the activation of PKC, the α 1A-adrenergic receptor (α 1A-AR), and the epidermal growth factor receptor (EGFR), which in turn, promotes the phosphorylation of the AT1 receptor and the recruitment of β -arrestin 2.

pathways, such as the MAPK cascade (Carmona-Rosas et al., 2018). Interestingly, a few number of studies have reported the participation of these scaffold proteins during the heterologous desensitization of several GPCRs, opening a new way of studying the regulation of these transmembrane proteins.

3 THE ROLE OF β -ARRESTINS IN HETEROLOGOUS DESENSITIZATION: DESCRIBING A FEW NUMBER OF STUDIES

During the last years, several studies have reported the participation of β -arrestins during the homologous desensitization. However, little is known about the role that these proteins play during the heterologous desensitization process. Our research group recently reported that the activation of the sphingosine-1-phosphate receptor (S1P) allows for the binding of β -arrestin 2 to the α 1B-adrenergic receptor (α 1B-AR) (Castillo-Badillo et al., 2015). In addition, we also reported that the phosphorylation of the α 1A-adrenergic receptor (α 1A-AR) by PKC induces the binding of endogenous β -arrestin 1/2 to the receptor. These results were further confirmed by coimmunoprecipitation assays of the α 1A-AR and the endogenous β -arrestins 1/2 (Alcántara-Hernández et al., 2017). Along the same lines, it has been reported that the activation of some GPCRs coupled to the G_s and G_q proteins promotes the phosphorylation of cardiac β 2-AR by PKA and PKC. This process allows for the binding of the phosphodiesterase 4D (PDE4D) to the phosphorylated receptor in a β -arrestin-dependent manner. Subsequently, the PDE4D will have the role of hydrolyzing the cAMP generated by the activation of the β 2-AR.

Another study reported that in neurons from the locus coeruleus, the brief stimulation of the μ -opioid receptor with Met⁵-enkephalin, causes its homologous desensitization, however, longer times of stimulation produces the heterologous desensitization of the α 2-adrenergic receptors (α 2-ARs). Such heterologous process is regulated by β -arrestin 2 and the activation of ERK1/2. Interestingly, the inhibition in the expression of β -arrestin 2 does not have an effect in the internalization of the μ -opioid receptor, but does have an impact in the heterologous desensitization of the α 2-ARs (Dang, Chieng, & Christie, 2012). This interesting study suggests that the recruitment of β -arrestin to the α 2-ARs by heterologous desensitization, enables the formation of a multi-protein complex that involves the α 2-ARs, β -arrestin 2, and ERK1/2. Disruption at any protein level inhibits the assemble of such complex. In addition, the activation of the neuropeptide FF2 receptor was sufficient to recruit β -arrestin 2 to the μ -opioid receptor, but not to induce its internalization. Besides, this recruitment of β -arrestin is the result of the phosphorylation of the receptor at serine 377 by GRK2, but not by PKA or PKC as would be expected in a heterologous desensitization model (Mouledous et al., 2012). Along the same lines, the phosphorylation of the δ -opioid receptor at serine 344 by PKC leads to the heterologous desensitization of this receptor, which is also regulated by the recruitment of β -arrestins and the internalization of the receptor into clathrin-coated vesicles (Xiang et al., 2001).

Interestingly, another study reported the participation of PKC in the phosphorylation and internalization of the dopamine 2 receptor (D2). In such study, it was described that the pharmacological activation of PKC induces the phosphorylation of multiple sites within two main domains in the C-terminal tail of the D2 receptor, resulting in the recruitment of β -arrestins and the desensitization and internalization of the receptor (Namkung & Sibley, 2004). Similarly, this was not the only study that related the activation of PKC with the phosphorylation and subsequent internalization of the D2 receptor. The activation of the neurotensin receptor 1 (NT1R) leads to the PKC-mediated phosphorylation of the D2 receptor, triggering the recruitment of β -arrestin 1, and the uncoupling of the receptor with the G protein (Thibault, Albert, Pineyro, & Trudeau, 2011).

Recently, it was also described that the activation of PKC, $G_{q/11}$ GPCRs, and epidermal growth factor receptor (EGFR), promotes the recruitment of β -arrestin 2 to the unstimulated angiotensin 1 receptor AT1 (Fig. 1B). This process enables for the formation of a stability lock, which depends on the phosphorylated residues located in the C-terminal tail of the receptor and two conserved phospho-binding lysines in the β -arrestin 2 N-terminal domain. This process also promotes the activation of the MAPK pathway, which depends on the internalization of the receptor by β -arrestin 2. This study suggests that the solely phosphorylation of the receptor is sufficient to recruit and activate β -arrestins, which may serve as a novel mechanism of β -arrestin activation (Toth et al., 2018).

Finally, it has been described that chronic insulin treatment of Rat1 fibroblast leads to the downregulation of β -arrestin 1 through ubiquitination and proteosomal degradation, which is associated with a decrease in insulin growth factor receptor I (IGF-I), lysophosphatidic acid (LPA), and β 2-AR stimulation of the MAP kinase pathway. This deficit in the activation of such kinases was restored by the expression of exogenous wild-type β -arrestin 1 in insulin-treated cells. This suggests that the insulin-induced decrease in β -arrestin 1 plays a role in the activation of the MAP kinase signaling pathway triggered by some GPCRs (Dalle et al., 2002).

4 CODA/FUTURE DIRECTIONS

The regulation of GPCRs by β -arrestins is a process that has been extensively described for many research groups. It has been proposed that several receptors have a particular phosphorylation bar code, which allows the receptors to bind β -arrestins and use this interaction to activate other signaling pathways (Zhou et al., 2017). Even though this interaction has been characterized in homologous desensitization models, little is known about such interaction during the heterologous desensitization process. Efforts have to be done in order to further understand this cellular process. Additionally, it would be of great interest to explore the heterologous desensitization of other RTKs and their binding to β -arrestin 1/2, which could open the possibility to design new drugs with less side effects.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. J. Adolfo García-Sáinz (Instituto de Fisiología Celular) for suggestions and comments in the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The draft of this review was initially conceived by G.C.-R. and was jointly written by G.C.-R., R.A.-H., and D.A.H.E.. G.C.-R. is a student of the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas-UNAM and a recipient of a fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Alcántara-Hernández, R., Hernández-Méndez, A., Romero-Avila, M. T., Alfonzo-Méndez, M. A., Pupo, A. S., & García-Sainz, J. A. (2017). Noradrenaline, oxymetazoline and phorbol myristate acetate induce distinct functional actions and phosphorylation patterns of α_{1A} -adrenergic receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Molecular Cell Research*, 1864(12), 2378–2388. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.09.002>.
- Benovic, J. L., Pike, L. J., Cerione, R. A., Staniszewski, C., Yoshimasa, T., Codina, J., et al. (1985). Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(11), 7094–7101.
- Bockaert, J., & Pin, J. P. (1999). Molecular tinkering of G protein coupled receptors: An evolutionary success. *The EMBO Journal*, 18(7), 1723–1729. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.7.1723>.
- Bohn, L. M., Lefkowitz, R. J., & Caron, M. G. (2002). Differential mechanisms of morphine antinociceptive tolerance revealed in (beta)-arrestin-2 knock-out mice. *Journal of Neuroscience*, 22(23), 10494–10500. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-23-10494.2002>.
- Carmona-Rosas, G., Alcántara-Hernández, R., & Hernández-Espinoza, D. A. (2018). Dissecting the signaling features of the multi-protein complex GPCR/ β -arrestin/ERK1/2. *European Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2018.04.001>. Epub ahead of print.
- Castillo-Badillo, J. A., Sánchez-Reyes, O. B., Alfonzo-Méndez, M. A., Romero-Ávila, M. T., Reyes-Cruz, G., & García-Sainz, 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>.

- Celebire, D., & Godbole, A. (2018). Internalization of G-protein-coupled receptors: Implication in receptor function, physiology and diseases. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 32(2), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2018.01.004>.
- Chaturvedi, M., Schilling, J., Beautrait, A., Bouvier, M., Benovic, J. L., & Shukla, A. K. (2018). Emerging paradigm of intracellular targeting of G protein-coupled receptors. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(7), 533–546. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.04.003>.
- Dalle, S., Imamura, T., Rose, D. W., Worrall, D. S., Ugi, S., Hupfeld, C. J., et al. (2002). Insulin induces heterologous desensitization of G-protein-coupled receptor and insulin-like growth factor I signaling by downregulating beta-arrestin-1. *Molecular and Cell Biology*, 22(17), 6272–6285. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.17.6272-6285.2002>.
- Dang, V. C., Chieng, B. C., & Christie, M. J. (2012). Prolonged stimulation of μ -opioid receptors produces β -arrestin-2-mediated heterologous desensitization of α 2-adrenoceptor function in locus ceruleus neurons. *Molecular Pharmacology*, 82(3), 473–480. <https://doi.org/10.1124/mol.112.079350>.
- Delom, F., & Fessart, D. (2011). Role of phosphorylation in the control of clathrin-mediated internalization of GPCR. *International Journal of Cell Biology*, 2011, 246954. <https://doi.org/10.1155/2011/246954>.
- Deupi, X. (2014). Relevance of rhodopsin studies for GPCR activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Bioenergetics*, 1837(5), 674–682. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.09.002>.
- Grisshammer, R. (2017). New approaches towards the understanding of integral membrane proteins: A structural perspective on G protein-coupled receptors. *Protein Science*, 26(8), 1493–1504. <https://doi.org/10.1002/pro.3200>.
- Ikeda, M., Sugihara, M., & Suwa, M. (2018). SEVENS: A database for comprehensive GPCR genes obtained from genomes: Update to 68 eukaryotes. *Biophysics and Physicobiology*, 15, 104–110. https://doi.org/10.2142/biophysico.15.0_104.
- Insel, P. A., Sriam, K., Wiley, S. Z., Wilderman, A., Katakia, T., McCann, T., et al. (2018). GPCRomics: GPCR expression in cancer cells and tumors identifies new, potential biomarkers and therapeutic targets. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 431–475. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00431>.
- Irannejad, R., Tomshine, J. C., Tomshine, J. R., Chevalier, M., Mahoney, J. P., Steyaert, J., et al. (2013). Conformational biosensors reveal GPCR signaling from endosomes. *Nature*, 495(7442), 534–538. <https://doi.org/10.1038/nature12000>.
- Kang, Y., Zhou, X. E., Gao, X., He, Y., Liu, W., Ishchenko, A., et al. (2015). Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature*, 523(7562), 561–567. <https://doi.org/10.1038/nature14656>.
- Kruse, A. C., Manglik, A., Kobilka, B. K., & Weis, W. I. (2013). Applications of molecular replacement to G protein-coupled receptors. *Acta Crystals*, 69(Pt 11), 2287–2292. <https://doi.org/10.1107/S090744491301322X>.
- Kumari, P., Gosh, E., & Shukla, A. K. (2015). Emerging approaches to GPCR ligand screening for drug discovery. *Trends Molecular Medicine*, 21(11), 687–701. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.09.002>.
- Lu, M., & Wu, B. (2016). Structural studies of G protein-coupled receptors. *IUBMB Lifestyles*, 68(11), 894–903. <https://doi.org/10.1002/iub.1578>.
- Magalhaes, A. C., Dunn, H., & Ferguson, S. S. (2012). Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *British Journal of Pharmacology*, 165(6), 1717–1736. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01552.x>.

- Miao, Y., & McCammon, J. A. (2016). G-protein coupled receptors: advances in simulation and drug discovery. *Current Opinion in Structural Biology*, *41*, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.06.008>.
- Mouledous, L., Froment, C., Dauvillier, S., Burlet-Schitzl, O., Zajac, J. M., & Mollereau, C. (2012). GRK2 protein-mediated transphosphorylation contributes to loss of function of μ -opioid receptors induced by neuropeptide FF (NPFF2) receptors. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(16), 12736–12749. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.314617>.
- Namkung, Y., & Sibley, D. R. (2004). Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization, and trafficking of the D2 dopamine receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(47), 49533–49541. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408319200>.
- Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G., & Barak, L. S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(22), 17201–17210. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910348199>.
- Puthenveddu, M. A., & Von Zastrow, M. (2006). Cargo regulates clathrin-coated pit dynamics. *Cell*, *127*(1), 113124. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.035>.
- Ranjan, R., Dwivedi, H., Baidya, M., Kumar, M., & Shukla, A. K. (2017). Novel structural insights into GPCR- β -arrestin interaction and signaling. *Trends in Cell Biology*, *27*(11), 851–862. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.05.008>.
- Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A. P., Donadi, R. S., Bologa, C. G., et al. (2017). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, *16*(1), 19–34. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.230>.
- Shenoy, S. K., & Lefkowitz, R. J. (2011). β -arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends in Pharmacological Science*, *32*(9), 5214–5233. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.05.002>.
- Shi, Q., Li, M., Mika, D., Fu, Q., Kim, S., Phan, J., et al. (2017). Heterologous desensitization of cardiac β -adrenergic signal via hormone-induced β AR/arrestin/PDE4 complexes. *113*(6), 656–670. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx036>.
- Smith, J. S., Lefkowitz, R. J., & Rajagopal, S. (2018). Biased signaling: from simple switches to allosteric microprocessors. *Nature Reviews Drug Discovery*, *17*, 243–260. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.229>.
- Stauch, B., & Cherezov, V. (2018). Serial femtosecond crystallography of G protein-coupled receptors. *Annual Review of Biophysics*, *47*, 377–397. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070317-033239>.
- Thibault, D., Albert, P. R., Pineyro, G., & Trudeau, L. E. (2011). Neurotensin triggers dopamine D2 receptor desensitization through a protein kinase C and beta-arrestin1-dependent mechanism. *Annual Review of Biophysics*, *286*(1), 9174–9187. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.166454>.
- Thomsen, A. R. B., Plouffe, B., Cahill, T. J., 3rd., Shukla, A. K., Tarrasch, J. T., Dosey, A. M., et al. (2016). GPCR-G protein- β -arrestin super-complex mediates sustained G protein signaling. *Cell*, *166*(4), 907–919. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.004>.
- Toth, A. D., Prokop, S., Gyombolai, P., Varnai, P., Balla, A., Gurevich, V. V., et al. (2018). Heterologous phosphorylation-induced formation of a stability lock permits regulation of inactive receptors by β -arrestins. *The Journal of Biological Chemistry*, *293*(3), 876–892. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.813139>.
- Xiang, B., Yu, G. H., Guo, L., Chen, L., Hu, W., Pei, G., et al. (2001). Heterologous activation of protein kinase C stimulates phosphorylation of delta-opioid receptor at serine 344, resulting in beta-arrestin- and clathrin-mediated receptor internalization. *The Journal of Biological Chemistry*, *247*(7), 4709–4716. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006187200>.

- Zhang, Z., & Kim, K.-M. (2017). Multifactorial regulation of G protein-coupled receptor endocytosis. *Biomolecules Therapeutics*, 25(1), 26–43. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2016.186>.
- Zhou, X. E., He, Y., de Waal, P. W., Gao, X., Kang, Y., Van Eps, N., et al. (2017). Identification of phosphorylation codes for arrestin recruitment by G protein-coupled receptors. *Cell*, 170(3), 457–469. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.002>.
- Zindel, D., Butcher, A. J., Al-Sabah, S., Lanzerstorfer, P., Weghuber, J., Tobin, A. B., et al. (2015). Engineered hyperphosphorylation of the β 2-adrenoceptor prolongs arrestin-3 binding and induces arrestin internalization. *Molecular Pharmacology*, 87(2), 349–362. <https://doi.org/10.1124/mol.114.095422>.

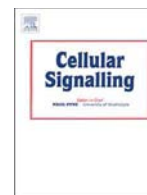
FURTHER READING

- Bjarnadottir, T. K., Gloriam, D. E., Hellstrand, S. H., Kristiansson, H., Fredriksson, R., & Schiöth, H. B. (2006). Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics*, 88(3), 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.04.001>.
- Gurevich, E. V., Uversky, E. V., & V. N. (2018). Arrestins: Structural disorder creates rich functionality. *Protein Cell*. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0501-8>. Epub ahead of print.
- Yu, J., Arttamangkul, S., Evans, C. J., Williams, J., & von Zastrow, M. (2009). Neurokinin1 receptors regulate morphine-induced endocytosis and desensitization of mu opioid receptors in CNS neurons. *Journal of Neuroscience*, 29(1), 222–233. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4315-08.2009>.



Contents lists available at ScienceDirect

Cellular Signalling

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

Distinct phosphorylation sites/clusters in the carboxyl terminus regulate α_{1D} -adrenergic receptor subcellular localization and signaling



Gabriel Carmona-Rosas, David A. Hernández-Espinosa, Rocío Alcántara-Hernández, Marco A. Alfonso-Méndez¹, J. Adolfo García-Sainz*

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

ARTICLE INFO

Keywords:

α_{1D} -adrenergic receptor phosphorylation
 α_{1D} -adrenergic receptor
 Receptor phosphorylation
 Membrane localization
 Phosphorylation clusters

ABSTRACT

The human α_{1D} -adrenergic receptor is a seven transmembrane-domain protein that mediates many of the physiological actions of adrenaline and noradrenaline and participates in the development of hypertension and benign prostatic hyperplasia. We recently reported that different phosphorylation patterns control α_{1D} -adrenergic receptor desensitization. However, to our knowledge, there is no data regarding the role(s) of this receptor's specific phosphorylation residues in its subcellular localization and signaling. In order to address this issue, we mutated the identified phosphorylated residues located on the third intracellular loop and carboxyl tail. In this way, we experimentally confirmed α_{1D} -AR phosphorylation sites and identified, in the carboxyl tail, two groups of residues in close proximity to each other, as well as two individual residues in the proximal (T442) and distal (S543) regions. Our results indicate that phosphorylation of the distal cluster (T507, S515, S516 and S518) favors α_{1D} -AR localization at the plasma membrane, i. e., substitution of these residues for non-phosphorylatable amino acids results in the intracellular localization of the receptors, whereas phospho-mimetic substitution allows plasma membrane localization. Moreover, we found that T442 phosphorylation is necessary for agonist- and phorbol ester-induced receptor colocalization with β -arrestins. Additionally, we observed that substitution of intracellular loop 3 phosphorylation sites for non-phosphorylatable amino acids resulted in sustained ERK1/2 activation; additional mutations in the phosphorylated residues in the carboxyl tail did not alter this pattern. In contrast, mobilization of intracellular calcium and receptor internalization appear to be controlled by the phosphorylation of both third-intracellular-loop and carboxyl terminus-domain residues. In summary, our data indicate that a) both the phosphorylation sites present in the third intracellular loop and in the carboxyl terminus participate in triggering calcium signaling and in turning-off α_{1D} -AR-induced ERK activation; b) phosphorylation of the distal cluster appears to play a role in receptor's plasma membrane localization; and c) T442 appears to play a critical role in receptor phosphorylation and receptor- β -arrestin colocalization.

1. Introduction

G protein-coupled receptors (GPCRs) are the most abundant class of sensors of the external (light, odors, tastants) and the internal (hormone, neurotransmitters, autacoids) milieu [1]. These receptors participate in essentially all key physiological processes and are involved in the development of many diseases, making them the target of 20–40% of current therapeutic drugs on the market [2,3]. Among the GPCR family are the adrenergic receptors. These receptors have been classified into α_1 -, α_2 -, and β -adrenergic subfamilies on the basis of their structure and signaling; each subfamily is formed by three members

[4]. In turn, the α_1 -adrenergic receptors (α_1 -ARs) are composed of the α_{1A} -, α_{1B} - and α_{1D} - subtypes; the latter receptor was the subject of the present work.

As are all the members of the GPCR family, α_{1D} -ARs are constituted of seven membrane-spanning domains connected by three extracellular and three intracellular loops, an extracellular amino terminus, and an intracellular carboxyl tail (CTail) [4]. α_{1D} -ARs have some unique features that have made their study very challenging. For example, α_{1D} -ARs have been difficult to detect in many tissues [5] and, when over-expressed, they have a low level of expression at the plasma membrane, being mainly localized in intracellular vesicles [6–9]. Additionally, α_{1D} -

* Corresponding author at: Inst. Fisiología Celular, UNAM, Ap. Postal 70-248, Ciudad de México 04510, Mexico.

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

¹ Present Address: Laboratory of Molecular Biophysics, National Heart, Lung, and Blood Institute, NIH, Bethesda, MD 20892, USA.

<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.11.003>

Received 20 September 2018; Received in revised form 8 November 2018; Accepted 8 November 2018

Available online 09 November 2018

0898-6568/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

ARs have constitutive activity with physiological and pathophysiological relevance; in particular this receptor subtype appears to be involved in the regulation of tissue perfusion and the control of blood pressure, and in the pathogenesis of hypertension [10–20]. Deletion of the first α_{1D} -AR 79 amino acids increases its localization at the plasma membrane [7,8,21–24]. Interestingly, cleavage in the amino terminus occurs endogenously in human cell lines, which suggests that this could be a physiological mechanism employed by cells to generate functional α_{1D} -ARs localized at the plasma membrane [25]. Once at the plasma membrane, α_{1D} -ARs appear to have a conserved mechanism of action: agonist binding to the receptor's extracellular region induces transmembrane conformational changes, which trigger intracellular $G_{q/11}$ -receptor interactions. This activates phosphatidylinositol 4, 5 bisphosphate hydrolysis by PLC- β , generating inositol 1, 4, 5-trisphosphate and diacylglycerol. Inositol trisphosphate causes the release of calcium from intracellular stores, while diacylglycerol is able to activate protein kinase C (PKC) and together these mediators intracellularly propagate the signal. Sustained α_{1D} -AR stimulation triggers the binding of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and the phosphorylation of α_{1D} -ARs third intracellular loops and carboxyl tails, which reduces responsiveness through a mechanism known as homologous desensitization [22–24,26,27]. Additionally, PKC activation induces α_{1D} -AR phosphorylation and reduces responsiveness, a process known as heterologous desensitization [22–24,26,27]. During the former processes, the scaffold protein, β -arrestin, seems to associate with the receptor-signaling complex, favoring the action of the endocytic machinery, receptor internalization, and putatively switching from G protein-mediated to β -arrestin-mediated signaling [28–33].

As compared to other members of the α_1 - subfamily, α_{1D} -AR regulatory mechanisms remain poorly characterized. It is known that agonists, such as noradrenaline (NA), and pharmacological activation of PKC by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) induce phosphorylation and desensitization of α_{1D} -ARs [10,22,26,27]. Using mass spectrometry analysis, our group recently reported distinct α_{1D} -AR phosphorylation patterns in response to NA or PMA [22]; the data suggested possible roles of GRK2 and conventional PKC isoforms α and β in phosphorylations associated with α_{1D} -AR homologous and heterologous desensitization. Six phosphorylated residues in the α_{1D} -AR third intracellular loop (IL3) and nine in the CTail were detected consistently and with high probability [22]. This large number of phosphorylation sites and their location in different receptor domains complicate the experimental analysis of their functional relevance. Hence, the aim of the present work was to further explore the role of some of these residues in α_{1D} -AR function. In order to tackle this issue, we generated several receptor mutants and assessed their phosphorylation state, internalization, and β -arrestin binding, as well as activation of ERK 1/2 and calcium signaling. Here we show that residues located in the carboxyl tail play roles in the signaling and subcellular location of this adrenergic receptor. Our data indicate that there are different points of regulation controlled by phosphorylated residues in close proximity in the α_{1D} -AR CTail.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

(–)-Noradrenaline (NA), propranolol, BMY 7378, phorbol myristate acetate (PMA), and lysophosphatidic acid (LPA) were obtained from Sigma-Aldrich Chemical. AG1478 was obtained from Calbiochem and EGF was obtained from Preprotech. [32 P]Pi (8500–9120 Ci/mmol) was obtained from Perkin-Elmer Life Sciences. Dulbecco's modified Eagle's medium, fetal bovine serum, trypsin, Lipofectamine 2000, amphotericin B, streptomycin, penicillin, doxycycline hyclate, hygromycin B, blasticidin, and Fura-2AM were purchased from Invitrogen-Life Technologies. Wheat germ agglutinin Alexa Fluor-350 conjugate (catalog number W11263), Super Signal West Pico chemiluminescence kits,

small interfering RNA (siRNA) for β -arrestin 1 (catalog number AM16708, lot AS027ZUU), β -arrestin 2 (catalog number AM16708, lot AS027ZUT), and scrambled siRNA (catalog number AM4611, lot AS026WKE) were obtained from Thermo Fisher. Polyvinylidene difluoride and nitrocellulose membranes were obtained from BioRad. Polyethyleneimine was obtained from Polyscience. Agarose-coupled protein A was obtained from Merck-Millipore. Monoclonal anti-GFP was from Clontech (catalog number 632381, lot A5033481) and polyclonal anti-GFP was generated in our laboratory [22,23,34]. Anti-phospho-ERK 1/2 (Thre202/Tyr204) (catalog number 9101S, lot: 30) and anti-total ERK (p42/44) (catalog number 4695S, lot: 21) antibodies were obtained from Cell Signaling Technology; β -Arrestin-1/2 (catalog number sc-7491, lot D1615) monoclonal antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Sc-74,591). Tetramethyl-rhodamine-conjugated AffiniPure anti-donkey mouse IgG (code 715-025-150) was from Jackson Immunology. were purchased from Thermo Fisher Scientific. Secondary antibodies were obtained from Jackson Immuno-Research and Zymed (Thermo Fisher Scientific). Antibody dilutions were 1:1000 for primary antibodies and 1:10,000 for secondary antibodies.

2.2. Plasmids

cDNA coding for either amino terminus-truncated or amino- and carboxyl termini-truncated- α_{1D} -AR-EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) constructs ($\Delta 1$ –79 and $\Delta 1$ –79 and $\Delta 440$ –572, respectively [24]) were subcloned into pEGFP-N1 (Clontech). These constructs were further subcloned into pCDNA5/FRT/TO to generate p Δ N- α_{1D} -AR-EGFP and p Δ N Δ C- α_{1D} -AR-EGFP (Flp-In T-Rex expression system, Invitrogen), as previously described [22]. The latter constructs were mutagenized to change the detected phosphorylated serines and threonine 328 in IL3 [22] into alanines or valine, respectively (S300/323/331/332/334A,T328 V) i. e., plasmids: p Δ N- α_{1D} -AR-MutIL3-EGFP and p Δ N Δ C- α_{1D} -AR-MutIL3- α_{1D} -AR-EGFP. The p Δ N-MutIL3- α_{1D} -AR-EGFP construct was then used as a template to mutagenize and generate the following mutants: 1) T442V, 2) S543A, 3) T477V,S486/492A, 4) T507V,S515/516/518A, 5) T477V, S486/492A,T507V,S515/516/518A, 6) T442/477V,S486/492A,T507V, S515/516/518/543A, 7) T477D,S486/492D, 8) T507D,S515/516/518D and 9) T442/477D,S486/492D,T507D,S515/516/518/543D. All these constructs were performed by Mutagenex, Inc. and proper modification was confirmed through sequencing by the same company.

2.3. Cells and transfection

HEK293 cells do not seem to express α_1 -ARs as evidenced by the absence of calcium response to NA (in the presence of propranolol) [35] and specific radioligand binding (unpublished). Parental Flp-In T-Rex HEK293 cells (Invitrogen) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 μ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 0.25 μ g/ml amphotericin B. To generate inducible receptor-expressing cells, parental Flp-In T-Rex HEK293 cells were transfected with pCDNA5/FRT/TO, containing the cDNA coding for the previously described α_{1D} -AR mutants, and pOG44 using Lipofectamine 2000 following the manufacturer's instructions. Transfected cells were selected with 100 μ g/ml hygromycin B and 5 μ g/ml blasticidin, as previously described [22,36]. Receptor expression was induced with 1 μ g/ml doxycycline hyclate 14–24 h before performing experiments. In all experiments using NA, 1 μ M propranolol was also present, to avoid any β -adrenergic action; the addition of propranolol by itself had no impact on any of the parameters studied. In experiments in which the expression of β -arrestin 1/2 was knocked down, both the β -arrestin 1 and 2 siRNA (50 nmol final of each plasmid for each 3 cm-diameter dishes) were combined and transfected using Lipofectamine 2000, following the manufacturer's instructions, and cells were cultured for 48 h prior to being used.

2.4. Receptor phosphorylation

Receptor phosphorylation was performed as previously described [22,24]. In brief, cells, cultured in six well plates, were incubated for 3 h in phosphate-free Dulbecco's Modified Eagle's media supplemented with 50 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{32}P]Pi. Labeled cells were stimulated with the indicated compounds, washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) solution and solubilized for 1 h in the lysis buffer [22,24]. The extracts were centrifuged and supernatants were incubated overnight with protein A-agarose and anti-EGFP antiserum. Samples were subjected to SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes and exposed for 24 h. The amount of phosphorylated receptor was assessed by PhosphorImager analysis. Western blotting for loading controls was performed using monoclonal anti-EGFP antibodies.

2.5. Intracellular calcium determinations

Intracellular calcium concentrations were determined as previously described [22,24]. In brief, cells were serum-starved for 2 h, then loaded with 2.5 μM Fura-2/AM for 1 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. Labeled cells were washed three times to eliminate unincorporated dye. Fluorescence measurements were assessed at 340- and 380-nm excitation wavelengths and at a 510-nm emission wavelength, with a chopper interval set at 0.5 s, using an Aminco-Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer. Intracellular calcium levels were calculated as described by Grynkiewicz et al. [37].

2.6. ERK 1/2 phosphorylation

Cells were serum-starved for 2 h before experiments. After stimulation with the indicated compounds, cells were washed with ice-cold PBS and lysed with Laemmli sample buffer [38]. Lysates were centrifuged at 12,000 $\times g$ for 5 min, and proteins in supernatants were separated by SDS-PAGE. Proteins were electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membranes and immunoblotting was performed. Duplicate samples were run in parallel to determine total-ERK and phospho-ERK 1/2. For data normalization, the maximal response was considered as 100%.

2.7. Intracellular fluorescence, receptor internalization and colocalization with endogenous β -arrestin 1/2

Receptor internalization and colocalization assays with endogenous β -arrestin 1/2 were performed as described [22,39]. In brief, cells were seeded to reach 50% confluence into glass-bottomed Petri dishes and were cultured for 24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ in media containing 1% serum and stimulated with NA or PMA. After stimulation, the cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 30 min at room temperature, and then washed three times with PBS. To determine intracellular fluorescence and receptor internalization, the plasma membrane was delineated using the differential interference contrast image, and fluorescence in such an area was excluded; intracellular fluorescence was quantified employing ImageJ software [40–42]. To determine membrane-receptor colocalization additional experiments were performed using Alexa Fluor-350-conjugated wheat germ agglutinin (20 $\mu\text{g/ml}$) for membrane labeling. To determine the colocalization of the α_{1D} -AR with β -arrestin 1/2, the cells were fixed, as indicated previously, and samples were permeabilized with 0.3% Triton X-100 for 15 min at 4 $^{\circ}\text{C}$. The samples were then incubated with 3% BSA for 1.5 h at room temperature, in the absence or presence of the anti- β -arrestin 1/2 antibody (1:200) with 3% BSA in 50 mM Tris base-buffered saline (pH 7.4) containing 0.1% Tween 20. After this process, the samples were washed twice, were incubated for 2 h in the same buffer containing a tetramethyl-rhodamine-conjugated secondary antibody

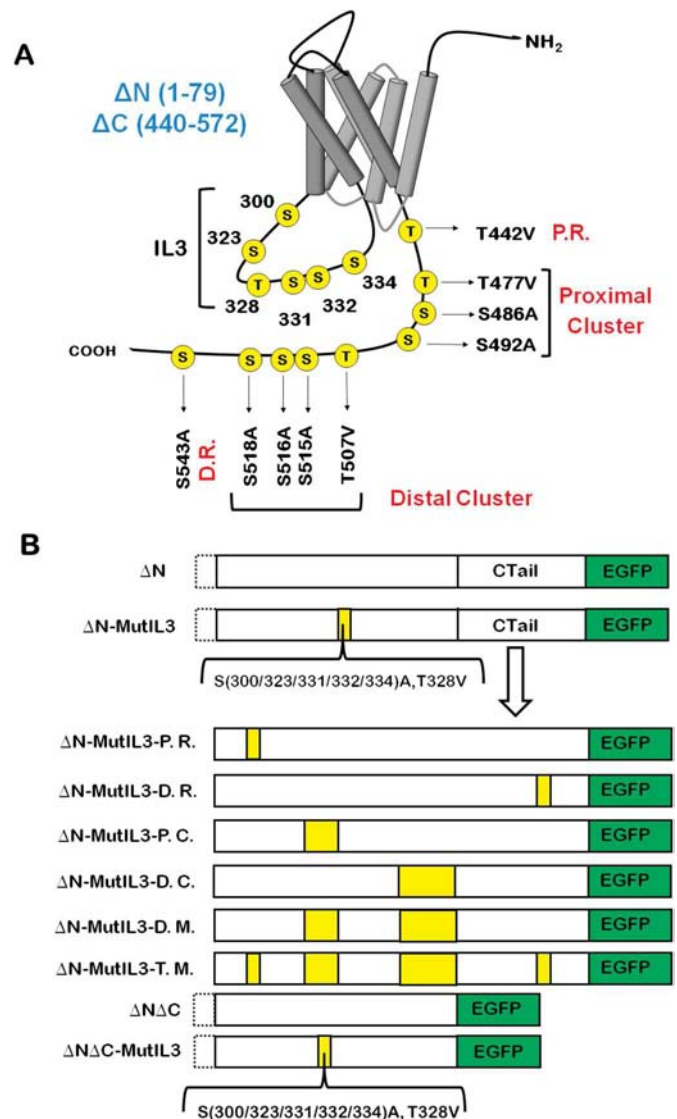


Fig. 1. Schematic representation of the α_{1D} -AR mutants. Panel A: The phosphorylation residues of the α_{1D} -AR detected by MS analysis are located in the IL3 and in the C-terminal tail. Such residues were mutagenized to non-phosphorylatable amino acids: serine residues changed into alanine and threonine residues changed into valine. Panel B: Schematic representation of the α_{1D} -AR mutants. Dotted lines in the constructs represent the deletion of the first 79 amino acids of the N-terminal region (ΔN , 1–79). The mutant $\Delta\text{N-MutIL3}$ was generated taking the ΔN receptor as a template. Yellow section in this mutant indicates that the residues S300, S323, S331, S332, S334 and T328 located in the IL3, were mutagenized by non-phosphorylatable residues, as previously described. Subsequently, the $\Delta\text{N-MutIL3}$ mutant was mutagenized in T442 ($\Delta\text{N-MutIL3-P.R.}$), S543 ($\Delta\text{N-MutIL3-D.R.}$), T477, S486, S492 ($\Delta\text{N-MutIL3-P.C.}$, proximal cluster), T507, S515, S516, and S518 ($\Delta\text{N-MutIL3-D.C.}$, distal cluster), T477, S486, S492, T507, S515, S516, and S518 ($\Delta\text{N-MutIL3-D.M.}$) and T442, T477, S486, S492, T507, S515, S516, S518, and S543 ($\Delta\text{N-MutIL3-T.M.}$). Deletion of the last amino acids (440–572) in the C-Tail (ΔN).

(1500) and then washed with PBS with soft agitation. Confocal microscopy images were acquired with an Olympus Fluoview FV10 with an oil-immersion objective (60 \times at 5.0 zoom), 2.0 confocal aperture X16 quality high, and 512 \times 512 size. To determine α_{1D} -AR/ β -arrestin 1/2 colocalization, the overlap of the two fluorophores (EGFP/rhodamine) was estimated employing ImageJ software [40–42]. Representative images showing green channel fluorescence, red channel

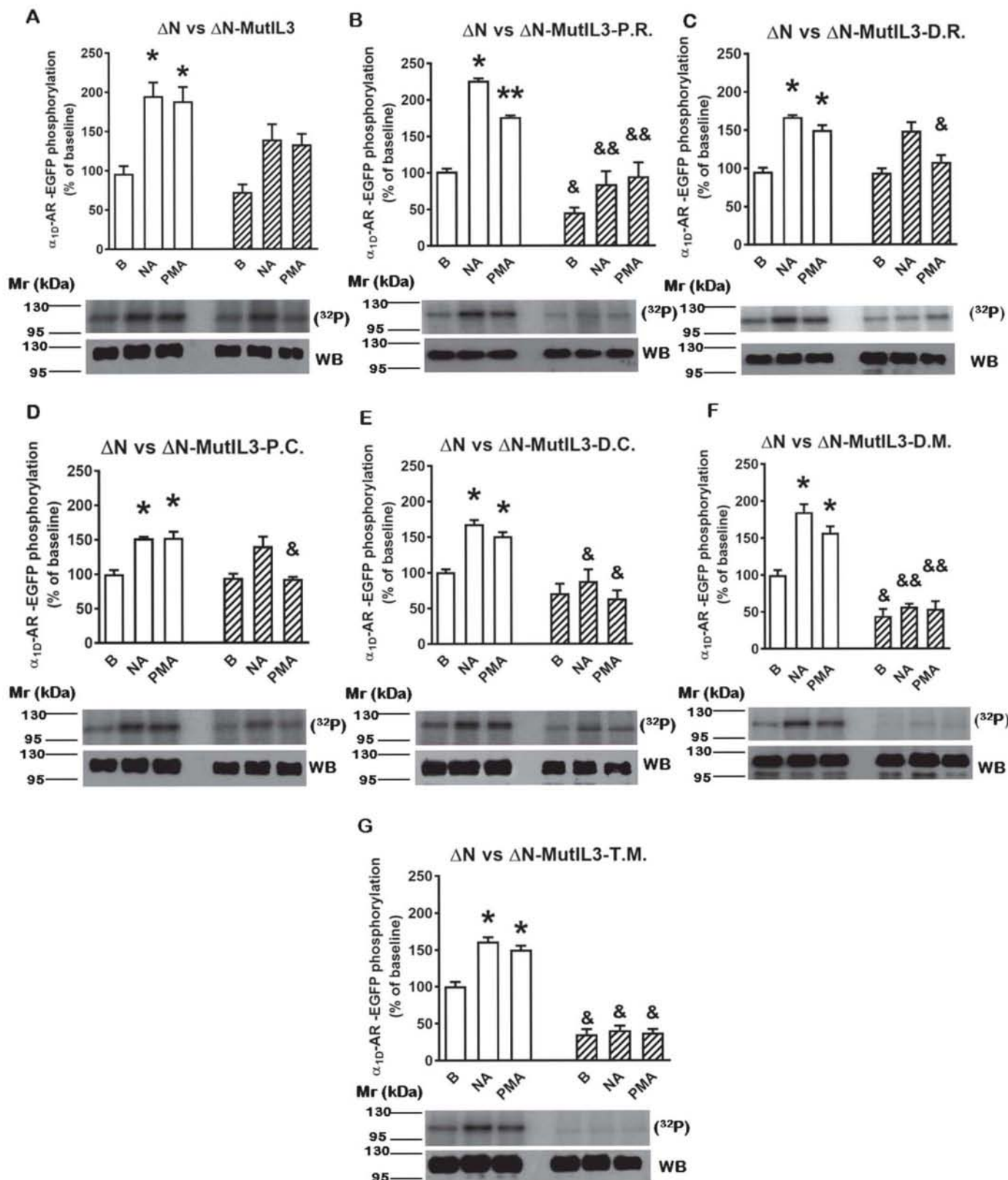


Fig. 2. NA- and PMA-induced phosphorylation of the different α_{1D} -AR mutants. Cells expressing the different constructs were stimulated with NA 10 μ M and PMA 1 μ M for 15 min and compared to the ΔN receptor. In all cases, cultures were processed in parallel and data were normalized to the percentage of the ΔN receptor's baseline (B) phosphorylation. Plotted lines are the means and vertical lines representing S.E.M. of 3–5 independent experiments. Representative autoradiographs and Western-blot are presented below each graph. Panel 2A, * $P < 0.005$ vs. ΔN receptor's baseline; Panel 2B, * $P < 0.001$ vs. ΔN receptor's baseline, ** $P < 0.005$ vs. ΔN receptor's baseline, & $P < 0.05$ vs. ΔN receptor's baseline, && $P < 0.001$ vs. ΔN receptor's corresponding stimulus; Panel 2C, * $P < 0.001$ vs. ΔN receptor's baseline, & $P < 0.01$ vs. ΔN receptor's PMA; Panel 2D, * $P < 0.005$ vs. ΔN receptor's baseline, & $P < 0.005$ vs. ΔN receptor's PMA; Panel 2E, * $P < 0.005$ vs. ΔN receptor's baseline, & $P < 0.001$ vs. ΔN receptor's corresponding stimulus; Panel 2F, * $P < .005$ vs. ΔN receptor's baseline, & $P < 0.005$ vs. ΔN receptor's baseline, && $P < 0.001$ vs. ΔN receptor's corresponding stimulus; Panel 2G, * $P < 0.001$ vs. ΔN receptor's baseline, & $P < 0.001$ vs. ΔN receptor's corresponding condition.

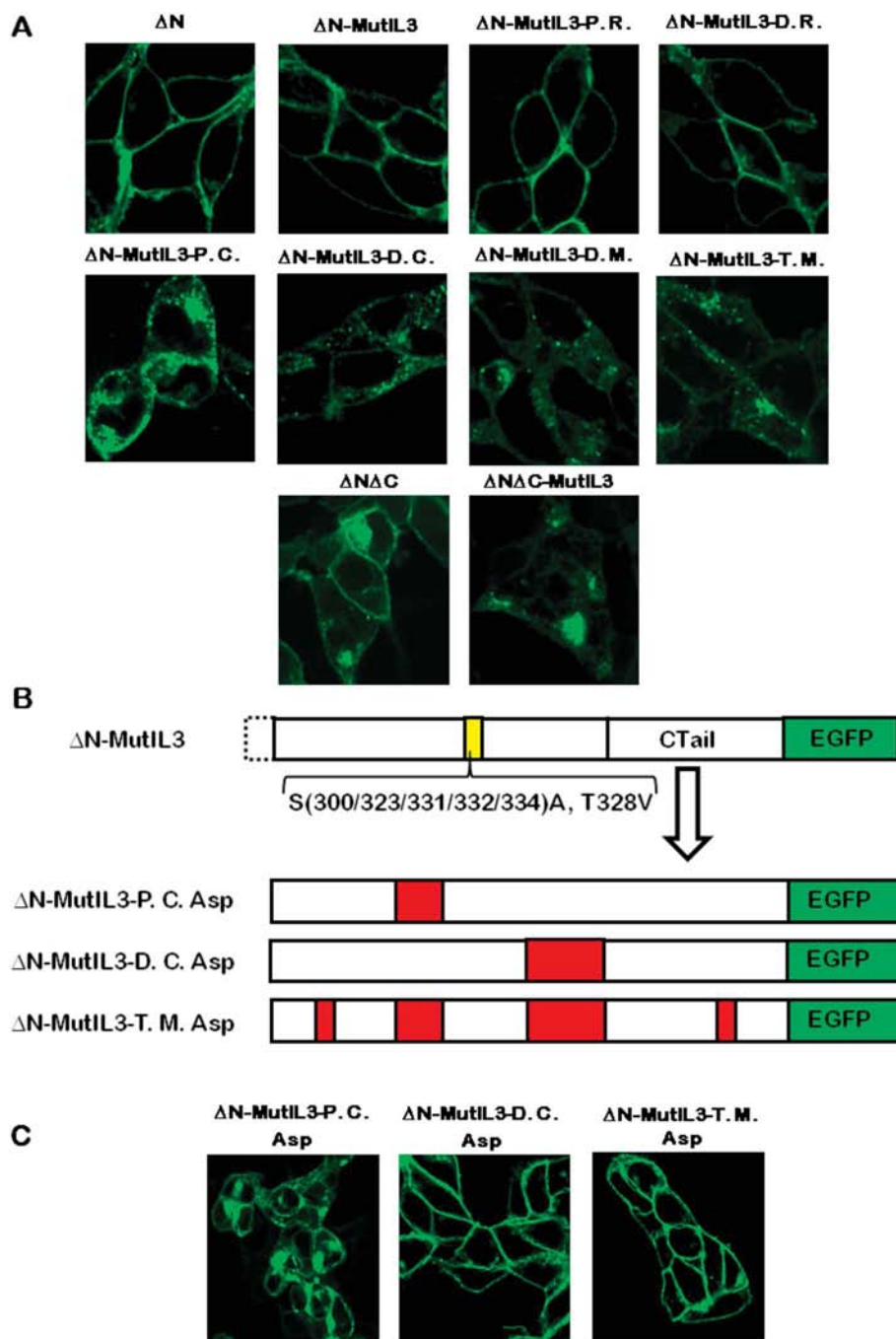


Fig. 3. Subcellular localization of α_{1D} -AR mutants under baseline conditions and schematic representation of the mutants with aspartic acid. Panel A: Cells expressing the different constructs of α_{1D} -AR were analyzed under baseline conditions by confocal microscopy. Images are representative of data of 5–7 experiments using different cell preparations. Panel B: Δ N-MutIL3 was used as a template to change the residues located in the proximal (Δ N-MutIL3-P.C. Asp), and distal cluster (Δ N-MutIL3-D.C. Asp) as well as in both clusters and both proximal and distal residues (Δ N-MutIL3-T.M. Asp), by aspartic acid (phospho-mimetic). Red sections in the constructs represent these mutations. Panel C: Δ N-MutIL3-P.C. Asp, Δ N-MutIL3-D.C. Asp, and Δ N-MutIL3-T.M. Asp mutants were analyzed under baseline conditions by confocal microscopy. Images are representative of data of 5–7 experiments using different cell preparations.

fluorescence, merged images, and pixel-by-pixel colocalization are presented. At least 10 different images per condition were obtained for each experiment.

2.8. Statistical analyses

Statistical comparisons between two conditions was performed employing the Student's *t*-test (Figures 7 and 20; indicated in the text). All other statistical analysis (comparisons between groups with three or more variables) were evaluated using a parametric analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post-test, assuming Gaussian data distribution (<http://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm>). We utilized the software included in GraphPad Prism 6 software to perform these analyses. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. α_{1D} -AR phosphorylation sites and site-directed mutagenesis

Using mass spectrometry, we previously reported that α_{1D} -AR harbors six phosphorylated residues (S300, S323, T328, S331, S332, and S334) in IL3 and nine more on the CTail (see below) [22]. One of the main goals of the present work was to experimentally define the role(s) of the CTail phosphorylation residues. To accomplish this, first we identified that phosphorylation sites in the CTail have a particular arrangement, i.e., two isolated residues (T442 and S543) and two groups of residues with close proximity; we named these groups as proximal cluster (T477, S486, S492) and distal cluster (T507, S515, S516, S518) (Fig. 1A). Taking this arrangement into account, we generated a combination of point mutations and deletions on the α_{1D} -AR (Fig. 1B). As

already mentioned, the α_{1D} -AR amino terminus negatively controls its membrane-targeting [7,8,21–24]. Therefore, all of the mutants were designed using the amino-truncated receptor (ΔN ; abbreviated names will be used for clarity). Non-phosphorylatable substitutions in the six residues in IL3 (ΔN -MutIL3) were obtained. These two modifications represent a compromise necessary to obtain: a) membrane expression and b) to eliminate the contribution of phosphorylation at the IL3 in our studies. Then, we used this latter mutant as a template to further individually mutagenize the proximal residue T442 V (ΔN -MutIL3-P.R.) and the distal residue S543A (ΔN -MutIL3-D.R.), as well as the proximal and distal clusters (ΔN -MutIL3-P.C. and ΔN -MutIL3-D.C., respectively). We also included a double mutant where both clusters were changed (ΔN -MutIL3-D.M.) and a total mutant (ΔN -MutIL3-T.M.), including all of these substitutions in the CTail. Finally, we employed the previously reported carboxyl tail-truncated receptor ($\Delta N\Delta C$) [22] and a further mutated form in which IL3 phosphorylated residues were changed into non-phosphorylatable amino acids ($\Delta N\Delta C$ -MutIL3) [22]. All of these mutants were tagged with EGFP for confocal microscopy imaging and biochemical studies.

Next we utilized Flp-In T-Rex HEK293 cells expressing the former mutants to assess receptor phosphorylation during homologous and heterologous desensitization, i.e., in the presence of 10 μM NA or 1 μM PMA for 15 min. Agents, concentrations, and incubation times were selected based on previously reported data [22]. In independent parallel experiments, the phosphorylation of the ΔN receptor was compared with each of the other mutants and all data were normalized to the phosphorylation of the ΔN receptor detected under baseline conditions. ΔN receptor baseline phosphorylation increased approximately 2-fold after stimulation with NA and PMA, as illustrated in Fig. 2A. In cells expressing the ΔN -MutIL3 receptor, baseline phosphorylation and the actions of NA and PMA were marginally decreased when compared to those of the ΔN receptor (not statistically significant). The CTail mutation on the proximal residue (ΔN -MutIL3-P.R.), resulted in a receptor with decreased baseline labeling and phosphorylation in response to NA and PMA (Fig. 2B). On the other hand, the mutant receptor with the non-phosphorylatable distal residue (ΔN -MutIL3-D.R.) did not exhibit any clear difference in baseline or NA-induced phosphorylation when compared with the ΔN mutant, but the effect of PMA was reduced (Fig. 2C). Similarly, the proximal cluster mutant (ΔN -MutIL3-P.C.) increased its phosphorylation in response to NA, but not after PMA stimulation (Fig. 2D). Interestingly, the receptor with the mutated distal cluster, ΔN -MutIL3-D.C., showed a slight decrease in basal phosphorylation but marked attenuation of phosphorylation observed in response to NA or PMA (Fig. 2E). Baseline phosphorylation of the receptor containing the double-cluster mutations (ΔN -MutIL3-D.M.) diminished below ΔN baseline levels and nearly no effect of NA or PMA was detected (Fig. 2F). Very similar results were obtained with the total mutant (ΔN -MutIL3-T.M.) (Fig. 2G). Overall, these data experimentally confirmed that α_{1D} -AR phosphorylation specifically occurs at the residues depicted in Fig. 1A. It appears that phosphorylatable residues in proximal and distal clusters and distal residue, S543, might be phosphorylated during PMA-induced desensitization and that mutations in the distal cluster also disturb NA-induced phosphorylation. Phosphorylation of $\Delta N\Delta C$ and ΔN -MutIL3- ΔC mutants was reported previously [22].

3.2. α_{1D} -AR plasma membrane localization is regulated by CTail distal cluster phosphorylation

Cells expressing the α_{1D} -AR mutants described previously were studied using confocal microscopy. Under baseline conditions, we observed that the control receptor (ΔN) and the mutant containing substitutions in the IL3 (ΔN -MutIL3), as well as receptors additionally containing single mutations in the proximal and distal residues (ΔN -MutIL3-P.R. and ΔN -MutIL3-D.R., respectively) were mainly located at the plasma membrane. In contrast, receptors including non-

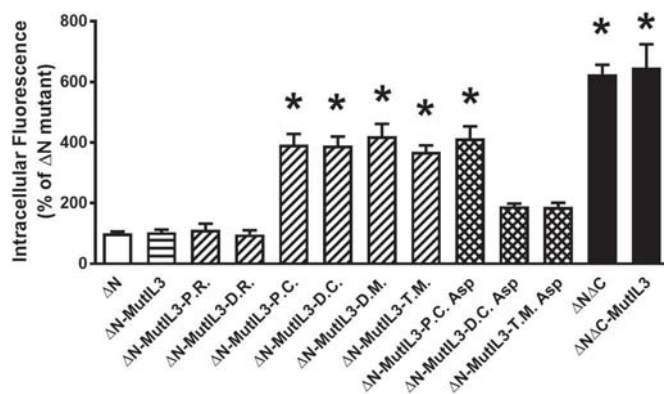


Fig. 4. Intracellular fluorescence quantification (α_{1D} -AR mutants) under baseline conditions. Accumulation of intracellular fluorescence under baseline conditions was quantified for α_{1D} -AR mutants. Data were normalized to that observed in cells expressing the ΔN mutant (100%). Plotted lines are the means and vertical lines representing S.E.M. of 7 independent experiments in each of which 3–5 cells were analyzed ($n = 20$ –35). * $P < 0.001$ vs ΔN .

phosphorylatable substitutions in the CTail proximal or distal clusters were found mainly in vesicles (Fig. 3A). Prompted by this observation, we measured intracellular fluorescence to qualitatively determine the main subcellular location of each mutant. As depicted in Fig. 4, we normalized all data to the signal detected in the control receptor (ΔN), i.e., it was considered as 100%. As Fig. 4 illustrates, we detected some intracellular fluorescence in ΔN , ΔN -MutIL3, ΔN -MutIL3-P.R. and in ΔN -MutIL3-D.R., whereas the following mutants showed approximately a 4-fold increment of fluorescence located intracellularly: ΔN -MutIL3-P.C., ΔN -MutIL3-D.C., ΔN -MutIL3-D.M. and ΔN -MutIL3-T.M. Moreover, the carboxyl truncated mutants ($\Delta N\Delta C$ and $\Delta N\Delta C$ -MutIL3) revealed a 6-fold increase of intracellular fluorescence. In other words, truncation of the entire CTail or substitutions in the phosphorylation clusters contained in this domain blocked the receptor's ability to reach or remain at the plasma membrane.

Under the latter premise, we hypothesized that phosphorylation of such residues in close proximity might regulate receptor subcellular localization. In order to test this, we generated phospho-mimetic mutants containing aspartic acid substitutions. As presented in Fig. 3B, the phosphorylatable residues were changed to aspartic acid in the proximal (ΔN -MutIL3-P.C. Asp) and distal clusters (ΔN -MutIL3-D.C. Asp), as well as in both clusters plus the isolated residues, to generate a total phospho-mimetic mutant (ΔN -MutIL3-T.M. Asp). We observed abundant vesicles in cells expressing ΔN -MutIL3-P.C. Asp (Fig. 3C). This mutant also showed a 4-fold increment of intracellular fluorescence, similar to the mutants lacking phosphorylation clusters (Fig. 4). Surprisingly, ΔN -MutIL3-D.C. Asp and ΔN -MutIL3-T.M. Asp mutants were fully expressed at the plasma membrane (Fig. 3C) and they both showed intracellular fluorescence levels equivalent to the control (intracellular fluorescence quantifications are presented in Fig. 4). In order to confirm these results, colocalization experiments employing Alexa Fluor-350-conjugated wheat germ agglutinin were performed with six of the mutants employed (ΔN , ΔN -MutIL3, ΔN -MutIL3-D.C., ΔN -MutIL3-T.M., ΔN -MutIL3-D.C. Asp and ΔN -MutIL3-T.M. Asp). Wheat germ agglutinin is generally considered as a membrane marker but also binds to glycoproteins present in other organelles [43]. Observations were normalized to the colocalization observed with cells expressing the ΔN mutant. As shown in Fig. 5, in non-permeabilized cells, the lectin labeled the plasma membrane but also some structures present inside the cells; this was much more clearly observed in cells containing large amounts of vesicles. Despite this, the colocalization data (Fig. 5) confirmed the previous findings (Fig. 4). Altogether, these results suggest that, specifically, distal-cluster phosphorylation could be necessary and sufficient to allow α_{1D} -AR plasma membrane localization.

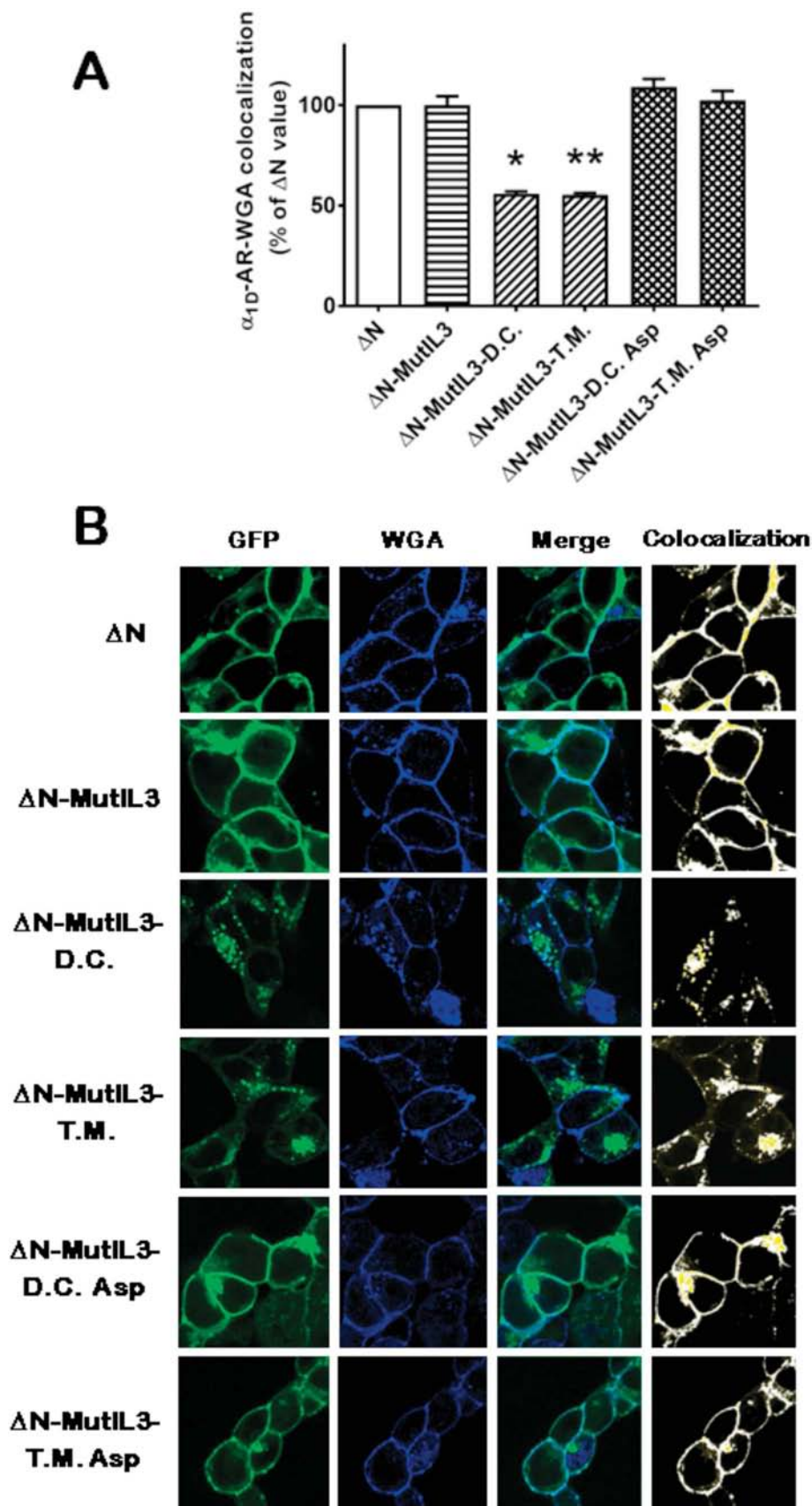


Fig. 5. Colocalization of α_{1D} -AR mutants with Alexa Fluor-350-conjugated wheat germ agglutinin (plasma membrane marker) under baseline conditions. Cells expressing the different constructs of α_{1D} -AR were fixed and stained with Alexa Fluor-350-conjugated wheat germ agglutinin (WGA), as indicated under Material and Methods. Fluorescence was analyzed under baseline conditions by confocal microscopy and ImageJ analysis. Panel A, Receptor-membrane marker colocalization, normalized to ΔN mutant baseline value (100%), is presented. Plotted are the means and vertical lines representing S.E.M. of 4 independent experiments in each of which 10 cells were analyzed ($n = 40$). * $P < 0.001$ vs. ΔN mutant and $P < 0.001$ vs. ΔN -MutL3-D.C. Asp; ** $P < 0.001$ vs. ΔN mutant and $P < 0.001$ vs. ΔN -MutL3-T.M. Asp. Panel B, representative images showing: receptor fluorescence (GFP), WGA fluorescence, Merge images and colocalization (white).

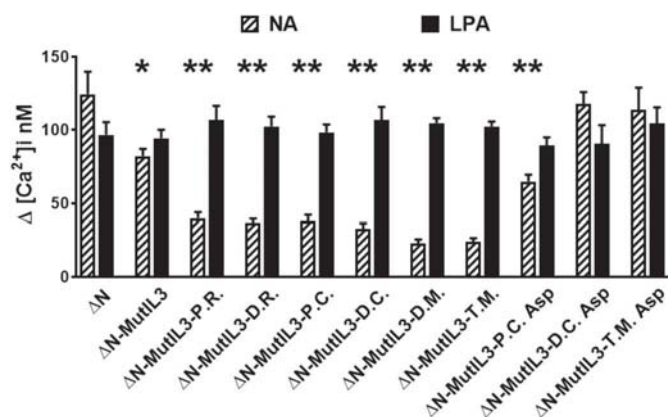


Fig. 6. NA- and LPA-induced mobilization of intracellular calcium in cells expressing the different α_{1D} -AR mutants. Cells expressing the different constructs were stimulated with NA 10 μ M (dashed bars) or LPA 1 μ M (solid bars) and increases ($\Delta [Ca^{2+}]_i$ nM; baseline subtracted) in intracellular calcium concentration were determined. Plotted are the means and vertical lines representing S.E.M. of 5–7 independent experiments. * $P < 0.005$ vs. ΔN , NA-stimulation; * $P < 0.001$ vs. ΔN , NA-stimulation. No significant difference was observed when the response to LPA stimulation in the different cell lines was compared.

3.3. Phosphorylation on α_{1D} -AR CTail specific residues regulates the mobilization of intracellular Ca^{2+}

Next, we evaluated agonist-induced mobilization of intracellular calcium to determine the functionality of the receptors previously described. As depicted in Figs. 6, 10 μ M NA elicited an increase of over 100 nM intracellular calcium in cells expressing the ΔN receptor, whereas it scarcely reached 100 nM in cells expressing the ΔN -MutIL3 mutant. Remarkably, in CTail mutants lacking phosphorylatable single residues or clusters (ΔN -MutIL3-P.R., ΔN -MutIL3-D.R., ΔN -MutIL3-P.C., and ΔN -MutIL3-D.C.), calcium release was markedly reduced as compared with those expressing the ΔN receptor. Calcium increments were even smaller in double and total mutants (ΔN -MutIL3-D.M. and ΔN -MutIL3-T.M.). As a positive control, we measured the response of endogenously expressed lysophosphatidic acid receptors, using 1 μ M LPA, and a consistent increase in calcium concentration (≈ 100 nM) was observed in cells expressing the different mutants. When we examined receptors containing the phospho-mimetic mutations, we observed that the proximal cluster mutant (ΔN -MutIL3-P.C. Asp) partially recovered its ability to mobilize intracellular calcium. Interestingly, distal cluster and total mutants containing the phospho-mimetic mutations (ΔN -MutIL3-D.C. Asp and ΔN -MutIL3-T.M. Asp) were able to increase calcium to concentrations similar to those of the control (ΔN receptor-expressing cells). These data suggest that phosphorylation of the CTail region, mainly at the distal cluster, controls the ability of α_{1D} -AR to trigger the calcium signaling pathway. NA-induced increases in intracellular calcium in cells expressing the ΔN and ΔN -MutIL3- ΔC mutants were reported previously [22]. The effect of NA on intracellular calcium concentration as affected by NA, PMA and BMY 7378 (inverse agonist) [10,11,24] is presented in Supplementary Fig. S1. In agreement with the previous data, NA action was robust in cells expressing the ΔN mutant; this was of smaller magnitude in cells expressing the ΔN -MutIL3 mutant and even smaller in cells expressing the ΔN -MutIL3-T.M. receptors. Similarly, the ability of PMA and BMY 7378 was very clear in cells expressing the ΔN mutant and marginal (but statistically significant) in cells expressing the total mutant (Supplementary Fig. S1).

3.4. α_{1D} -AR mutants' ERK activation kinetics

A different pathway initiated by α_{1D} -AR was investigated. ERK 1/2 phosphorylation was determined under baseline conditions and after 2, 5, 15, 30, and 60 min of incubation with 10 μ M noradrenaline. As it is shown in Fig. 7A, the ΔN mutant showed a rapid increase in ERK phosphorylation after 5 and 15 min, and subsequently, this signal decreased at 30 and 60 min. In the same way, the rest of the mutants also presented a quick increase in ERK 1/2 phosphorylation. However, the signal remained elevated in all of these even after 60 min of observation (this trend was statistically significant (Student's *t*-test $P < 0.05$; 60 min vs. ΔN mutant) except for the ΔN -MutIL3-D.R. and ΔN -MutIL3-D.M. mutants). Representative Western blots of the p-ERK 1/2 and total-ERK 1/2 of each mutant are presented (Fig. 7B).

3.5. α_{1D} -AR activation of ERK is regulated by the transactivation of the EGF receptor and β -arrestins

It has been observed that α_{1D} -AR activation induces the shedding of active epidermal growth factor (EGF) that stimulates the EGF receptor and contributes to the activation of ERK 1/2 [44]. Fig. 8A shows that when cells expressing the ΔN receptor are treated with EGF, a robust increase in ERK 1/2 phosphorylation can be detected. AG1478, a specific inhibitor of EGF receptor endogenous tyrosine kinase activity [45] totally abolished the EGF effect. Cells stimulated with NA for 5 min, also showed an important increase in ERK 1/2 phosphorylation; interestingly, this activation was markedly diminished when the cells were pre-incubated with AG1478 and then challenged with NA (Fig. 8A). It has been shown that activation of ERK depends in some cells on the binding of β -arrestins to GPCRs, forming a multi-protein complex: GPCR/ β -arrestin/ERK1/2 [32]. In order to explore the possible participation of β -arrestins, we knocked down the expression of β -arrestin 1/2 by using small interfering RNA. Fig. 8B illustrates the increase in ERK 1/2 phosphorylation when cells expressing the ΔN mutant were stimulated with NA for 5 and 60 min. Scrambled small interfering RNA induced a very small decrease (not statistically significant) of NA-induced ERK phosphorylation, as presented in the same figure. In contrast, when β -arrestin1/2 was knocked down, a clear decrease of NA-induced ERK phosphorylation was detected, at 5 and 60 min. β -arrestin 1/2 knock down was confirmed by Western blot analysis (Fig. 8B). The roles of EGF receptor transactivation and of β -arrestin 1/2 knock down were also tested in cells expressing the ΔN -MutIL3-T. M. mutant and the results were very similar, i. e., data confirmed the role of these processes in α_{1D} -AR ERK 1/2 activation (Supplementary Fig. S2). Overall, these experiments suggest that transactivation of EGF receptors and β -arrestins participate in NA-induced ERK 1/2 activation, in cells expressing the receptor mutants employed.

3.6. The α_{1D} -AR mutants have a different kinetic of internalization triggered by NA and PMA

α_{1D} -AR internalization using confocal microscopy was studied next. In order to achieve this, we exclusively studied the mutants that were mainly expressed at the plasma membrane under baseline conditions. Attempts to study this with mutants that were mainly internalized proved to be impossible with this approach. To evaluate the kinetic profiles of internalization, cells were stimulated with NA or PMA. The intracellular fluorescence of cells expressing each mutant, under baseline conditions, was considered as 100% (Figs. 9 and 10); these baseline values were very similar as shown in Fig. 4. As depicted in Fig. 9A, we stimulated the cells with NA 10 μ M and detected an increase in the intracellular fluorescence at 5 and 15 min in the ΔN mutant. Subsequently, the intracellular signal vanished and was barely detected at 30

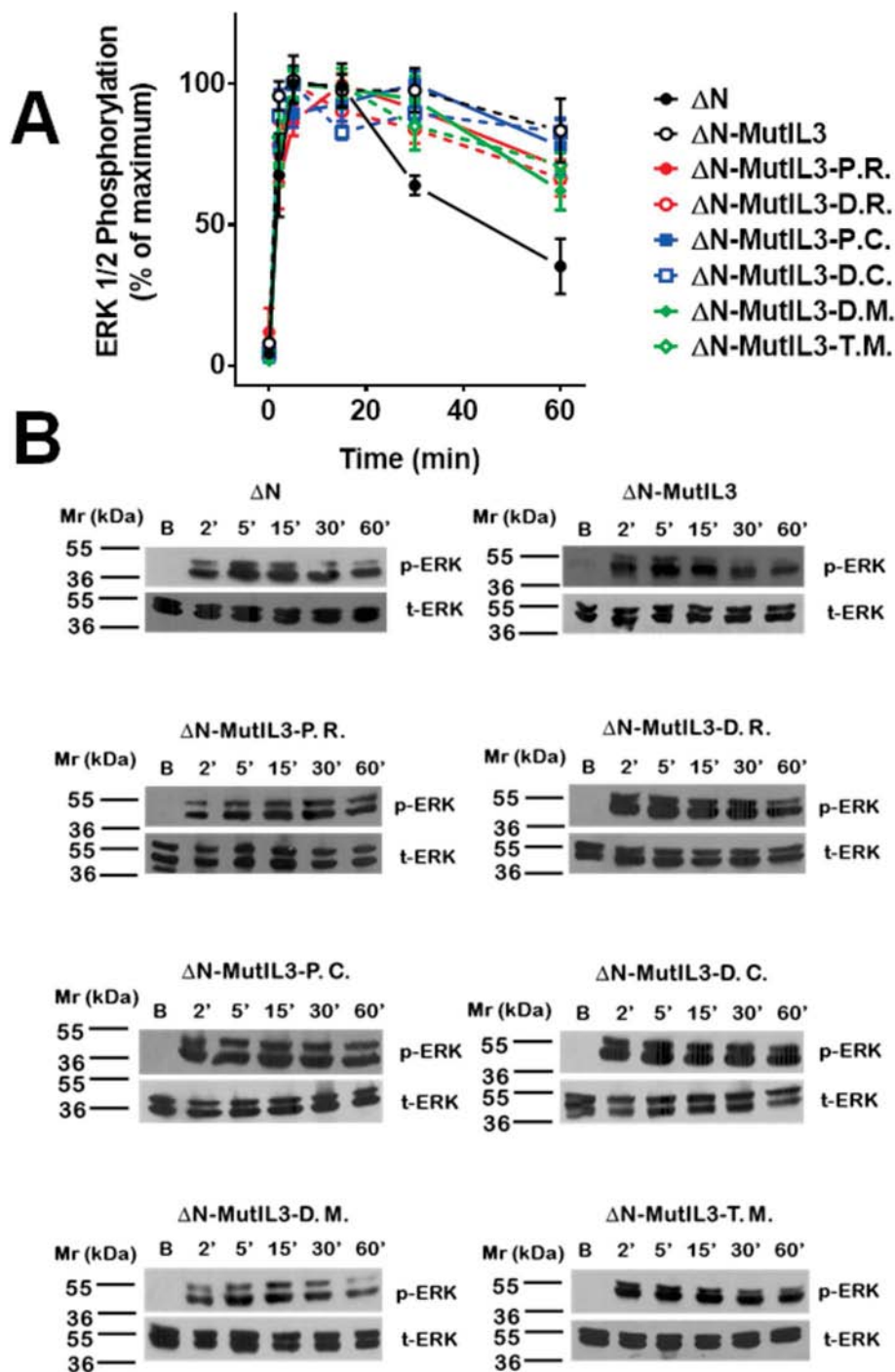


Fig. 7. Time-course of NA-induced activation of ERK1/2 in the different α_{1D} -AR mutants. Cells expressing the different constructs were stimulated for the times indicated with NA 10 μ M, and ERK1/2 phosphorylation was determined. Plotted lines are the means and vertical lines representing S.E.M. of at least 4 independent experiments. Representative Western-blot for total-ERK1/2 and phospho-ERK1/2 are presented below the graph.

and 60 min. The Δ N-MutIL3 mutant was also internalized in response to NA, but remained so, along the 60 min of stimulation (Student's *t*-test vs. the Δ N mutant, $P < 0.001$ at 60 min). Interestingly, the Δ N-MutIL3-P.R. and Δ N-MutIL3-D.R. mutants behaved in a similar manner to those of the Δ N mutant, i.e., there was an increase in intracellular fluorescence at 5 and 15 min and a partial decrease of such a signal at 30 and 60 min (Student's *t*-test: $P < 0.001$ vs. the Δ N mutant and $P < 0.001$

vs. the Δ N-MutIL3 mutant at 60 min). Fig. 9B presents the images of the kinetic profiles of internalization of each α_{1D} -AR mutant.

Next, we decided to evaluate the kinetic profile of internalization of the same mutants by stimulating the cells with 1 μ M PMA. As shown in Fig. 10A, we detected that the Δ N mutant progressively internalized during the 60 min of incubation. In contrast, the Δ N-MutIL3 reached the maximal internalization at 15 min and then intracellular fluorescence

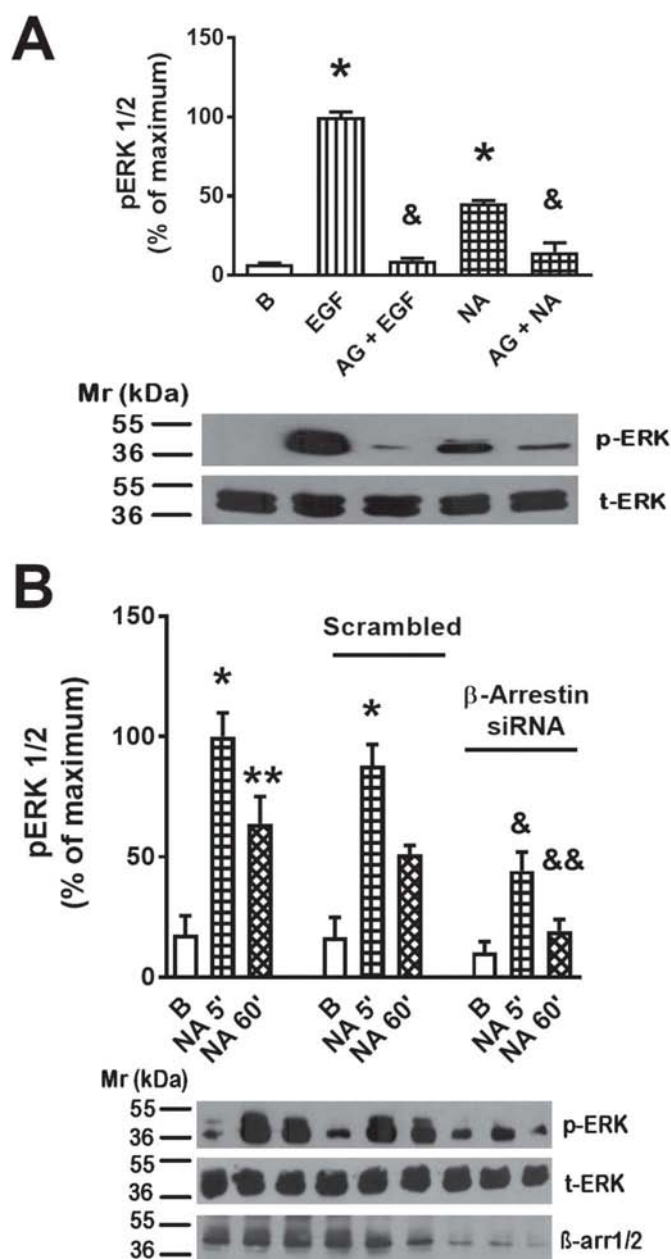


Fig. 8. Regulation of ERK 1/2 phosphorylation by EGF receptor transactivation and β -arrestins in cells expressing the ΔN receptor. Panel A: Cells were pre-incubated in the absence or presence of AG1478 $10\ \mu\text{M}$ (AG) and then challenged with EGF $100\ \text{ng/ml}$ or NA $10\ \mu\text{M}$ for 5 min. Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of 3 independent experiments. * $P < 0.001$ vs. baseline (B); & $P < 0.001$ vs. absence of AG1478. Representative Western-blot for total-ERK 1/2 and phospho-ERK 1/2 are presented below the histogram. Panel B: Cells were not transfected (first group or bars), or they were transfected with either a scrambled siRNA (second group of bars) or with a specific siRNAs to block the expression of β -arrestin 1/2 (third group of bars). Cells were stimulated with NA $10\ \mu\text{M}$ for 5 (5') or 60 min (60'). Plotted are the means and vertical lines representing S.E.M. of 3 independent experiments. * $P < 0.001$ vs. respective baseline (B); ** $P < 0.05$ vs. respective baseline (B); & $P < 0.005$ vs NA 5' non-transfected cells and $P < 0.05$ vs. NA 5' scrambled siRNA; && $P < 0.05$ vs. NA 60' non-transfected cells. Representative Western-blot for total-ERK 1/2, phospho-ERK 1/2, and β -arrestins (β -arr1/2) are presented below the histogram.

gradually decreased toward baseline values (Fig. 10A, Student's *t*-test vs. the ΔN mutant, $P < 0.001$ at 60 min). The ΔN -MutIL3-P.R. similarly reached its maximal internalization at 15 min, but intracellular fluorescence remained at that level during the remaining of the incubation (Student's *t*-test vs. the ΔN mutant and ΔN -MutIL3 mutant, $P < 0.001$ in both comparisons, at 60 min). The ΔN -MutIL3-D.R. mutant behaved like the ΔN -MutIL3 mutant (Fig. 10A, Student's *t*-test vs. the ΔN mutant, $P < 0.001$ at 60 min). Fig. 10B presents representative images of the kinetic profile of internalization of each α_{1D} -AR mutant under the action of PMA.

3.7. The α_{1D} -AR mutants colocalize with endogenous β -arrestin1/2

β -arrestins are scaffold proteins known to bind and participate in the internalization of ligand-activated receptors. This process allows for a GPCR to maintain signaling while internalized in endosomes in a β -arrestin-dependent fashion [29,46,47]. Hence, we examined the colocalization of endogenous β -arrestins with the α_{1D} -AR mutants that are expressed at the plasma membrane, taking into consideration the time at which each mutant was maximally internalized in response to NA or PMA. Data were normalized to the colocalization observed, under baseline conditions, in cells expressing each mutant. As it is shown in Fig. 11A, colocalization was observed under baseline conditions with all of the cells studied and mainly at the plasma membrane (Fig. 11B); this could be due to the α_{1D} -AR intrinsic activity. However, this was less clear with the ΔN -MutIL3-P.R. mutant (Fig. 11B). When cells were treated with NA or PMA, the ΔN , ΔN -MutIL3 and ΔN -MutIL3- Δ -D.R. mutants increased their colocalization with endogenous β -arrestin1/2, and colocalization was also clearly observed intracellularly (Fig. 11, panels A and B). Interestingly, the ΔN -MutIL3- Δ -P.R. mutant did not increase its colocalization with β -arrestins in response to NA or PMA. Representative images of the colocalization of each mutant with endogenous β -arrestin1/2, under the conditions described, are illustrated in Fig. 11B. When the primary anti- β -arrestin antibody was omitted during the immunostaining procedure, essentially no fluorescence was observed in the red channel and consequently no colocalization was detected; these data indicate that the observed fluorescence was due to detection of the anti- β -arrestin antibody and not to unspecific immunostaining by the secondary antibody (Supplementary Fig. S3). Colocalization of α_{1D} -AR and β -arrestin was absent in cells expressing receptors located in intracellular vesicles (data not shown). It must be stated that colocalization does not necessarily imply physical interaction of these proteins.

4. Discussion

α_{1D} -AR is known for being an elusive GPCR, whose expression, cellular localization, and function, as well as its roles in the development of cardiovascular diseases and other maladies, remain only partially known to date [48–51]. The ability of agonists and phorbol esters to induce α_{1D} -AR phosphorylation and the association of this process with receptor desensitization has been known for some time [22–24,26,27]. A series of α_{1D} -AR phosphorylation sites were recently defined by employing mass spectrometry [22]. This latter work revealed that there are six phosphorylated residues located in the IL3 and nine in the CTail, and that several protein kinases could putatively target such residues, including PKC α/β and GRK2. In our present experiments, we observed that as the phosphorylation sites were substituted by non-phosphorylatable amino acids, baseline phosphorylation, as well as those observed in response to receptor activation (NA) or PKC stimulation (PMA), decreased. Therefore, the identified 15 amino acids seem to be the major targets of the protein kinases involved

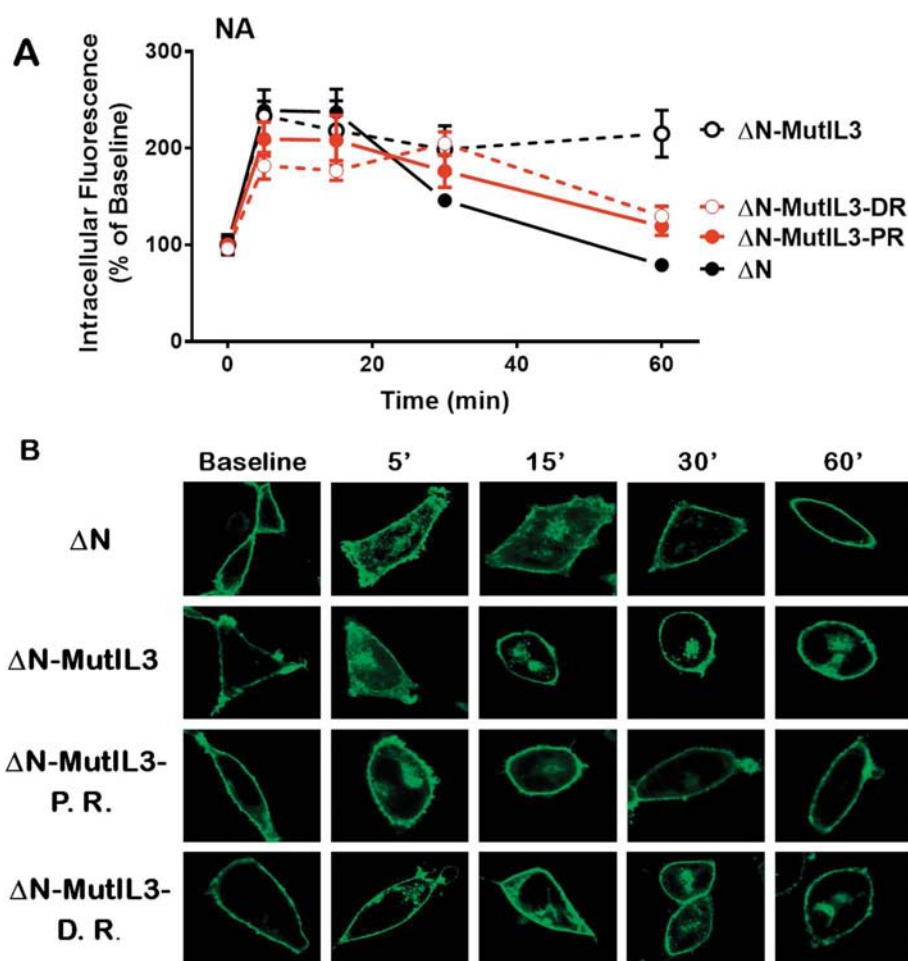


Fig. 9. Time-course of NA-induced internalization of the different α_{1D} -AR mutants. Panel A: Accumulation of intracellular fluorescence in response to NA 10 μ M in cells expressing the Δ N, Δ N-MutIL3, Δ N-MutIL3-P.R. and Δ N-MutIL3-D.R. mutants. The intracellular fluorescence observed, under baseline conditions, in cells expressing each of the mutants was considered as 100%. Plotted are the means and vertical lines representing S.E.M. of 7 independent experiments in each of which 3–5 cells were analyzed ($n = 20$ –35). Panel B: Representative images.

in α_{1D} -AR phosphorylation. However, in the total mutant, i. e. in the receptor in which all the 15 detected residues were substituted by non-phosphorylatable amino acids, a very weak but consistent receptor phosphorylation was detected, including some marginal actions of NA and PMA. It is important to consider that the reported phosphorylated residues were those that were consistently detected in the different mass spectrometry analysis performed and with high probability (i. e., high Ascore value [52]) [22]. However, during the course of that study, other phosphorylation sites were detected, although not in all the analysis or with low probability value. Therefore, it is possible that the remaining phosphorylation detected could be due to such sites. It should be mentioned that in our previous experiments using the mutant, Δ N Δ C-MutIL3 (in which the amino and carboxyl termini were deleted and the identified phosphorylated sites at the IL3 were substituted by non-phosphorylatable residues), we were unable to detect receptor phosphorylation and no evidence for stimulation by NA or PMA were observed [22]. These data suggest the possibility that the unidentified phosphorylation site(s) could be present at the CTail.

Interestingly, the Δ N-MutIL3-P.R. mutant in which the proximal residue, T442, was modified to valine showed a decrease in baseline as well as in stimulated (NA and PMA) receptor phosphorylation. Such decrease was much larger than could have been anticipated, because only one of the phosphorylation targets was modified. This might suggest that such a residue could be an important regulator of total receptor phosphorylation. In addition, this mutant, although mainly localized at the plasma membrane, appears to colocalize poorly with β -

arrestins in response to NA or PMA. This could be related with its decreased phosphorylation, since it has been shown structurally that phosphorylation of CTail peptides is critical for β -arrestin binding [53]. However, we cannot discard the possibility that the amino acid substitution could alter the structure in such a way that both receptor phosphorylation and colocalization with β -arrestins could be perturbed. GPCR association with β -arrestins has been mainly observed during homologous desensitization and the information of such possible interaction during heterologous desensitization is scarce; our present data suggest that this takes place in the course of both processes.

We previously observed that an amino- and carboxyl-termini-truncated receptor (i. e., the Δ N Δ C α_{1D} -AR mutant) was able to increase intracellular calcium (G protein signaling) and could be desensitized by PKC activation [18]. The lack of the CTail altered the mitogen activated kinase pathways in some cells (Rat-1 fibroblasts or neuroblastoma B103), but not in the HEK cell line [17]. We also observed that mutants lacking the CTail (i. e., the Δ N Δ C and Δ N Δ C-MutIL3 receptors) were mainly localized in intracellular vesicles [16], which was confirmed in the present work. It has been reported that the α_{1D} -AR CTail is of importance for this receptor's proper plasma membrane targeting/insertion, because interaction with proteins such as syntrophins seems to be involved and this takes place through the receptor's CTail-located PDZ domain [44,45].

One of the major findings of the present work is the relationship between phosphorylatable residues and α_{1D} -AR cellular localization. As already mentioned, current ideas indicate that GPCR phosphorylation

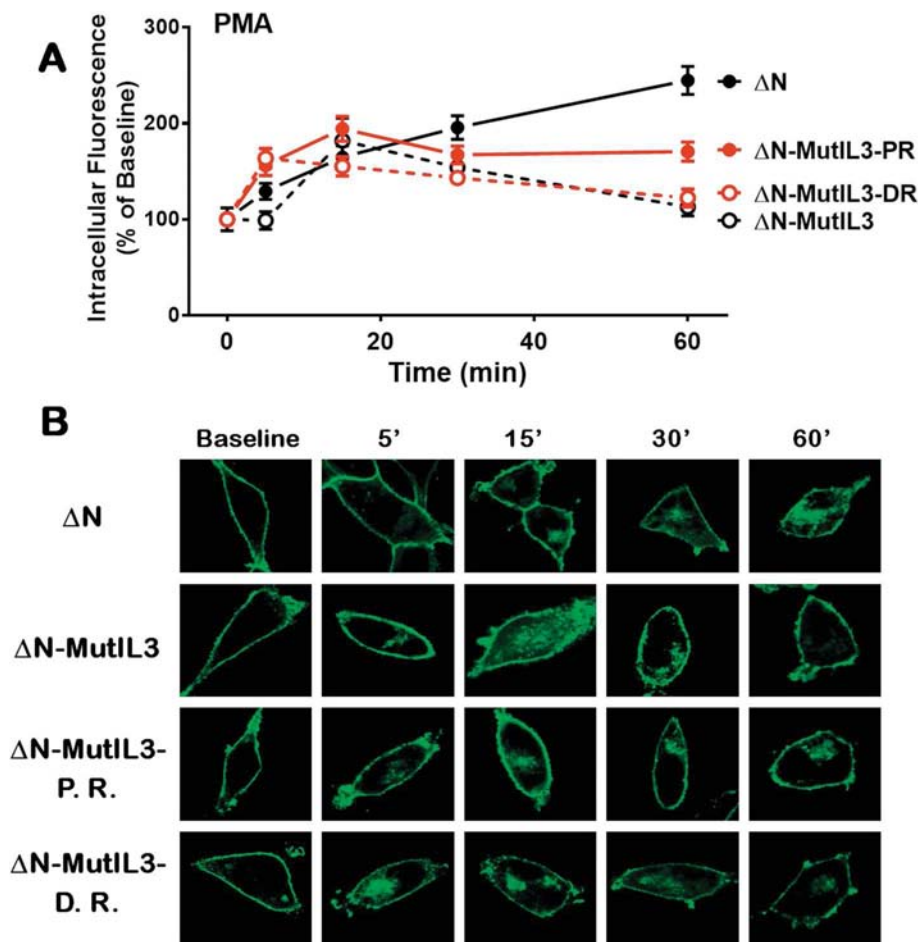


Fig. 10. Time-course of PMA-induced internalization of the different α_{1D} -AR mutants. Panel A: Accumulation of intracellular fluorescence in response to PMA1 μM in cells expressing the ΔN , ΔN -MutIL3, ΔN -MutIL3-P.R. and ΔN -MutIL3-D.R. mutants. The intracellular fluorescence observed, under baseline conditions, in cells expressing each of the mutants was considered as 100%. Plotted are the means and vertical lines representing S.E.M. of 7 independent experiments in each of which 3–5 cells were analyzed ($n = 20$ –35). Panel B: Representative images.

triggers an association with the scaffold protein, β -arrestin, favoring the action of the endocytic machinery, receptor internalization and putatively switching from G protein-mediated signaling to β -arrestin-mediated action [28–33]. Some of the present results indicate that not all GPCR phosphorylations trigger receptor internalization, but rather the opposite: these results were totally unexpected and extremely puzzling, but at the same time, are provocative and their interpretation is challenging.

Our data indicate that the phosphorylation state of residues T507, S515, S516, and S518, which are located in the distal cluster of the C-terminal tail, regulate the subcellular localization of α_{1D} -ARs. When these residues were exchanged for non-phosphorylatable amino acids, the α_{1D} -ARs were localized mainly in intracellular vesicles. This was contrary to our expectations; i. e., we anticipated that the absence of phosphorylation sites would favor receptor retention at the plasma membrane. The possibility that the amino acid substitutions could alter the receptor's conformation was considered, but substitution of these same residues for the phospho-mimetic amino acid, aspartic acid, restored the receptor's plasma membrane localization. This is completely counter to the general idea that all GPCR phosphorylations could be functionally translated into desensitization, internalization, and possible degradation, and that a general action of protein phosphatases might trigger receptor recycling. The present findings suggest that these processes are more complex than anticipated and that it is likely that phosphorylation at some specific sites could lead to internalization, whereas at others this might favor membrane localization. To the best

of our knowledge, this is the first study indicating that the phosphorylation of certain residues in a GPCR CTail could favor receptor localization at the plasma membrane. However, it must be mentioned that it has been reported that prolonged inhibition of PKC induces down-regulation of sphingosine 1-phosphate S1P₁ receptor surface expression, associated to decreased receptor phosphorylation, but the mechanisms or residues involved were not explored [54]. Similarly, there is evidence that phosphorylation of channel receptor (also called “ionotropic receptors”) subunits, such as those of AMPA/Glutamate receptors or GABA_A receptors increase their membrane localization (see, for example [55–58]).

The steady state density of plasma membrane receptors results from a balance between several complex processes, i. e., anterograde transport and insertion into the plasma membrane, internalization and recycling. Intracellular accumulation of receptors might result from decreased plasma membrane insertion, by a reduced time of residence in this organelle due to increased internalization or improper recycling; these events are not mutually exclusive and combinations might exit in response to key structural modification. The absence of α_{1D} -AR phosphorylation sites, in the distal CTail cluster, could render membrane targeting/insertion more difficult or could impede it. Similarly, it is possible that even if membrane insertion takes place, the absence of this phosphorylated sites could reduce the time of residence of these receptors at the plasma membrane by increasing its internalization and/or reducing its recycling back to this organelle. All these possibilities, together with the intrinsic activity of α_{1D} -ARs, might explain why with

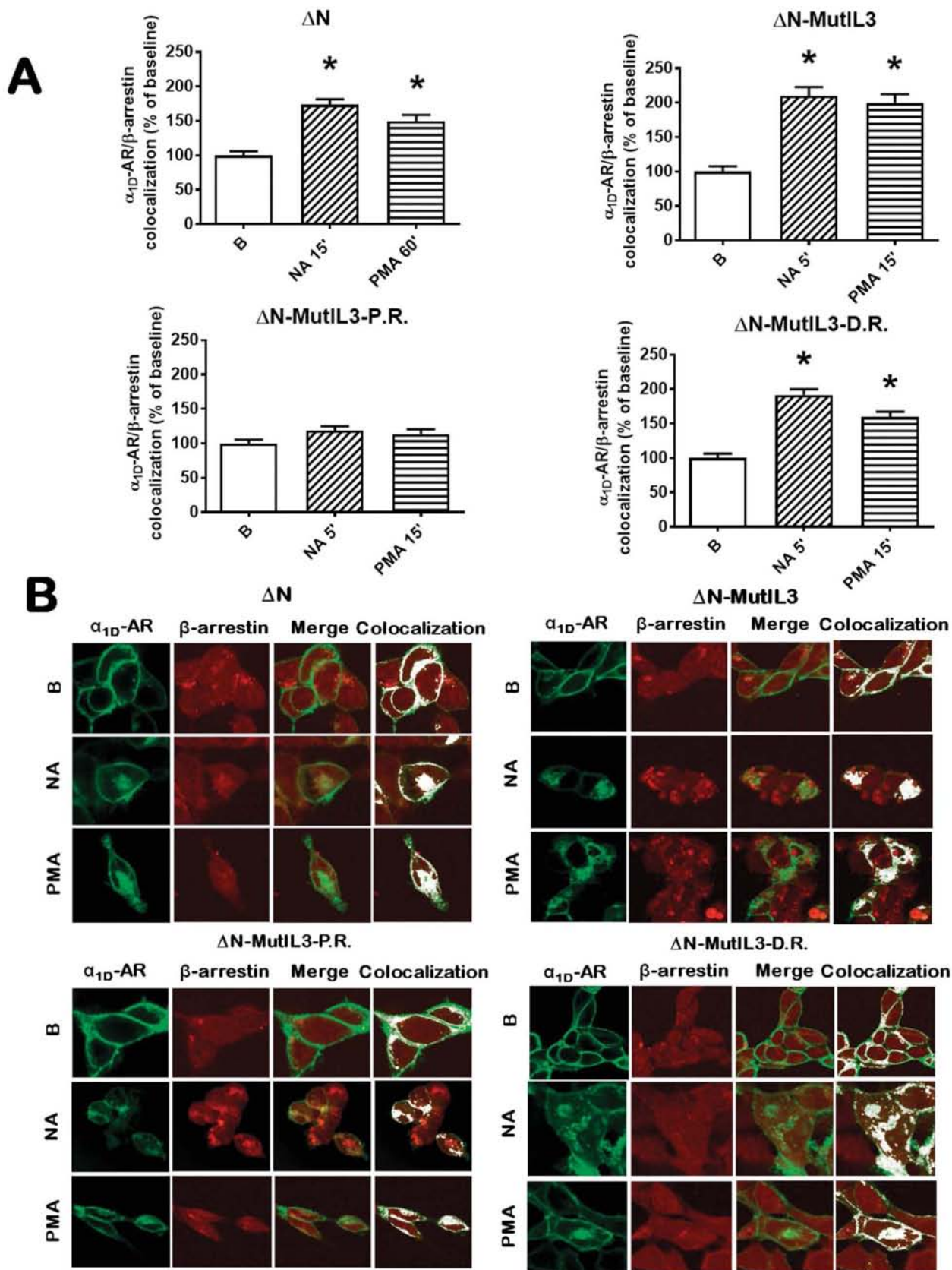


Fig. 11. Colocalization of the α_{1D} -AR mutants with endogenous β -arrestin 1/2. Panel A. Cells expressing the ΔN , ΔN -MutIL3, ΔN -MutIL3-P.R., and ΔN -MutIL3-D.R. mutants were treated without any agent (B, baseline) or stimulated with NA 10 μM or PMA 1 μM for the times at which each mutant showed a higher level of internalization (i. e., 5, 15 or 30 min, as indicated in each histogram). Data were normalized considering the baseline colocalization observed, under baseline conditions, as 100%. Plotted are the means and vertical lines representing S.E.M. of 7 independent experiments in each of which 3–5 cells were analyzed ($n = 20$ –35). * $P < 0.05$ vs. baseline (B). Panel B. Representative images are presented showing the α_{1D} -AR mutants (α_{1D} -AR, green channel), β -arrestins 1/2 (β -arrestins, red channel), merge images (merge) and colocalization (colocalization, white); treated as indicated; B, baseline, NA 10 μM or PMA 1 μM .

this receptor subtype, a relatively high degree of baseline phosphorylation was consistently observed [22–24,26,27]. In fact, S516 and S518 were detected as phosphorylated under baseline conditions in our work using mass spectrometry [22]. It is possible, therefore, to suggest that during receptor internalization and recycling processes, a series of different protein kinases and phosphatases could participate, forming functional elements of the signaling complexes, in a dynamic fashion.

Modification of the proximal cluster (T477, S486, and S492) with non-phosphorylatable amino acids also induces an important intracellular localization of these receptors, but substitution with aspartate did not favor their presence at the plasma membrane. This suggests that the proximal cluster might also play a role in receptor subcellular distribution but one of minor importance.

Interestingly, the Δ N- Δ C and Δ N-MutIL3- Δ C mutants exhibited a very high degree of internal localization as compared with the remainder of the mutants. This suggests the possibility that the CTail might exert a pivotal influence on the subcellular localization of this receptor. It is possible that, in addition to the detected phosphorylation sites, other undetected phosphorylation sites and/or structural elements in the CTail could have an impact on the expression of this GPCR at the plasma membrane.

The functional data obtained in this work are also worth considering. Previous information had shown that CTail truncation (i.e., the Δ NAC mutants) did not decrease the ability of NA to increase intracellular calcium concentration [22,24], the latter being a G protein-triggered action. However, substitution of the phosphorylation sites with non-phosphorylatable amino acids leads the Δ N-MutIL3 receptor mutant to exhibit a partially decreased ability to increase intracellular calcium in response to NA; similar data were obtained for the Δ NAC-MutIL3, as previously reported [22]. In addition, it was observed in this work that all of the different mutants of the CTail containing non-phosphorylatable amino acid substitutions exhibited a decreased calcium response to NA. In contrast, mutants with aspartate substitution in the clusters maintain the ability to increase intracellular calcium in response to the adrenergic agonist, either partially (Δ N-MutIL3-P. C. Asp mutant) or completely (Δ N-MutIL3-D. C. Asp and Δ N-MutIL3-T. M. Asp mutants). With these mutants there seems to exist a correlation between their ability to increase intracellular calcium in response to NA and their localization at the plasma membrane. In the case for the Δ NAC mutant, there was a large accumulation of receptors in intracellular vesicles but nonetheless, a full calcium response was observed [22,24]; with the Δ NAC-MutIL3 mutant NA-induced calcium response was smaller (confirmed in the present work, data not shown). It is likely, therefore, that membrane localization and an unmodified IL3 are critical for proper α_{1D} -AR-Gq interaction and consequent calcium signaling; however, we cannot discard the possibility that phosphorylatable residues or structural elements in the α_{1D} -AR CTail might participate in the interaction with Gq.

The ability of the different α_{1D} -AR receptor mutants to increase ERK 1/2 phosphorylation was studied. This is a signaling process that governs cell proliferation, differentiation and survival and it is modulated through many cellular pathways [32,59]. Not surprisingly, it was observed that both the expression of β -arrestin 1/2, and EGF receptor transactivation play roles in this action. We evaluated NA-activated ERK 1/2 phosphorylation in cells expressing the different receptors, and our results indicated that the kinetic profile of activation was very similar for all receptors containing the MutIL3 non-phosphorylatable mutation (i. e., a rapid and essentially sustained activation for up to 60 min) but different from what was observed with the Δ N receptor (i. e., a rapid activation that progressively decreased after 30 min); this is consistent with previous observations [22] and suggests the possibility that phosphorylation of IL3 plays a major role in turning off ERK 1/2 activation. Receptors containing the Δ N-MutIL3 mutation and non-phosphorylatable substitutions in the CTail markedly activated the ERK 1/2 pathway, but were defective in increasing intracellular calcium in response to NA, i.e., they behaved as biased receptors.

It has been observed that phosphorylation of a given GPCR can take place at different sites, depending on cell type and other conditions, and that this is associated with different functional outcomes. The possibility that such an association could be causally related has been suggested and has been denominated the bar-code hypothesis [60–62]. Efforts to characterize phosphorylation sites of different GPCRs and their functional significance have been reported (see, for example, [22,39,63–69]). The data presented here, supports the phosphorylation bar-code concept and indicates a new role for GPCR phosphorylation (i. e., one favoring membrane localization). If this is unique feature of α_{1D} -ARs or can be generalized for other GPCRs remains to be determined.

5. Conclusions

Our present results suggests that phosphorylation of a CTail distal cluster (T507, S515, S516 and S518) favors α_{1D} -AR localization at the plasma membrane, i. e., substitution of these residues for non-phosphorylatable amino acids results in the intracellular accumulation of the receptors, whereas phospho-mimetic substitution allows plasma membrane localization. Substitution of IL3 phosphorylation sites for non-phosphorylatable amino acids resulted in agonist-induced sustained ERK1/2 activation, which was not altered by additional mutations in the phosphorylated residues in the CTail. In contrast, mobilization of intracellular calcium appears to be controlled by IL3 and CTail phosphorylation states. IL3 mutation affects, differentially, NA- and PMA-induced receptor internalization and substitution of the CTail phosphorylation sites seems also to participate in this process.

Funding

This research was supported by Grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) [Grant numbers 253156 and Fronteras 882] <https://www.conacyt.gob.mx/> and Dirección General de Personal Académico-UNAM [PAPIIT, Grant number IN200915] <http://dgapa.unam.mx/>.

Declarations of interest

None.

Acknowledgments

The authors express their gratitude for advice and technical support to Dr. Maria Teresa Romero-Ávila from our laboratory and the following members of the indicated service units of our Institute: Dr. Héctor Malagón and Dr. Claudia Rivera (Bioterio); Dr. Fernando García, Dr. Ruth Rincón-Heredia, and Abraham Rosas-Arellano (Microscopía); Juan Barbosa and Gerardo Coello (Cómputo); Dr. María Luisa Durán-Pastén (Canalopatías); and Aurey Hernández and Manuel Ortín (Taller) for their advice and technical support. Gabriel Carmona-Rosas is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and received a doctoral fellowship (CVU: 695329) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.11.003>.

References

- [1] R. Fredriksson, H.B. Schiöth, The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes, *Mol. Pharmacol.* 67 (5) (2005) 1414–1425.
- [2] J.P. Overington, B. Al-Lazikani, A.L. Hopkins, How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (12) (2006) 993–996.
- [3] K. Sriram, P.A. Insel, G Protein-coupled Receptors as Targets for Approved drugs:

- how many Targets and how many drugs? *Mol. Pharmacol.* 93 (4) (2018) 251–258.
- [4] J.P. D.B. Bylund Hieble, D.E. Clarke, D.C. Eikenburg, S.Z. Langer, R.J. Lefkowitz, K.P. Minneman, R.R. Ruffolo, International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update, *Pharmacol. Rev.* 47 (2) (1995) 267–270.
- [5] M. Yang, F. Verfurth, R. Buscher, M.C. Michel, Is alpha1D-adrenoceptor protein detectable in rat tissues? *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 355 (4) (1997) 438–446.
- [6] D.F. McCune, S.E. Edelman, J.R. Olges, G.R. Post, B.A. Waldrop, D.J. Waugh, D.M. Perez, M.T. Piascik, Regulation of the cellular localization and signaling properties of the alpha(1B)- and alpha(1D)-adrenoceptors by agonists and inverse agonists, *Mol. Pharmacol.* 57 (4) (2000) 659–666.
- [7] C. Hague, Z. Chen, A.S. Pupo, N.A. Schulte, M.L. Toews, K.P. Minneman, The N terminus of the human {alpha}1D-adrenergic receptor prevents cell surface expression, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309 (1) (2004) 388–397.
- [8] A.S. Pupo, M.A. Uberti, K.P. Minneman, N-terminal truncation of human alpha1D-adrenoceptors increases expression of binding sites but not protein, *Eur. J. Pharmacol.* 462 (1–3) (2003) 1–8.
- [9] D. Chalothorn, D.F. McCune, S.E. Edelman, M.L. García-Cazarin, G. Tsujimoto, M.T. Piascik, Differences in the cellular localization and agonist-mediated internalization properties of the alpha(1)-adrenoceptor subtypes, *Mol. Pharmacol.* 61 (5) (2002) 1008–1016.
- [10] J.A. García-Sáinz, M.E. Torres-Padilla, Modulation of basal intracellular calcium by inverse agonists and phorbol myristate acetate in rat-1 fibroblasts stably expressing alpha1d-adrenoceptors, *FEBS Lett.* 443 (3) (1999) 277–281.
- [11] J.A. García-Sáinz, M.T. Romero-Ávila, L.C. Medina, Alpha(1D)-Adrenergic receptors constitutive activity and reduced expression at the plasma membrane, *Methods Enzymol.* 484 (2010) 109–125.
- [12] R. Gisbert, M.A. Noguera, M.D. Ivorra, P. D'Ocon, Functional evidence of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in rat aorta, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295 (2) (2000) 810–817.
- [13] R. Gisbert, K. Ziani, R. Miquel, M.A. Noguera, M.D. Ivorra, E. Anselmi, P. D'Ocon, Pathological role of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats, *Br. J. Pharmacol.* 135 (1) (2002) 206–216.
- [14] M.A. Noguera, M.D. Ivorra, P. D'Ocon, Functional evidence of inverse agonism in vascular smooth muscle, *Br. J. Pharmacol.* 119 (1) (1996) 158–164.
- [15] Z. Chen, C. Hague, R.A. Hall, K.P. Minneman, Syntrophins regulate alpha1D-adrenergic receptors through a PDZ domain-mediated interaction, *J. Biol. Chem.* 281 (18) (2006) 12414–12420.
- [16] I.A. Gallardo-Ortiz, S.N. Rodríguez-Hernández, J.J. López-Guerrero, L. Del Valle-Mondragon, P. Lopez-Sanchez, R.M. Touyz, R. Villalobos-Molina, Role of alpha1D-adrenoceptors in vascular wall hypertrophy during angiotensin II-induced hypertension, *Auton. Autacoid Pharmacol.* 35 (3) (2015) 17–31.
- [17] J.S. Lyssand, M.C. Defino, X.B. Tang, A.L. Hertz, D.B. Feller, J.L. Wacker, M.E. Adams, C. Hague, Blood pressure is regulated by an {alpha}1D-adrenergic receptor/dystrophin signalosome, *J. Biol. Chem.* 283 (27) (2008) 18792–18800.
- [18] A. Tanoue, Y. Nasa, T. Koshimizu, H. Shinoura, S. Oshikawa, T. Kawai, S. Sunada, S. Takeo, G. Tsujimoto, The alpha(1D)-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction, *J. Clin. Invest.* 109 (6) (2002) 765–775.
- [19] R. Villalobos-Molina, M. Ibarra, Alpha 1-adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the alpha 1D or alpha 1A subtypes, *Eur. Aust. J. Pharm.* 298 (3) (1996) 257–263.
- [20] R. Villalobos-Molina, M. Ibarra, Increased expression and function of vascular alpha1D-adrenoceptors may mediate the prohypertensive effects of angiotensin II, *Mol. Interv.* 5 (6) (2005) 340–342.
- [21] C. Hague, M.A. Uberti, Z. Chen, R.A. Hall, K.P. Minneman, Cell surface expression of {alpha}1D-adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with {alpha}1B-adrenergic receptors, *J. Biol. Chem.* 279 (15) (2004) 15541–15549.
- [22] M.A. Alfonso-Méndez, G. Carmona-Rosas, D.A. Hernández-Espinosa, M.T. Romero-Ávila, J.A. García-Sáinz, Different phosphorylation patterns regulate alpha1D-adrenoceptor signaling and desensitization, *Biochim. Biophys. Acta* 1865 (6) (2018) 842–854.
- [23] M.A. Alfonso-Méndez, J.A. Castillo-Badillo, M.T. Romero-Ávila, R. Rivera, J. Chun, J.A. García-Sáinz, Carboxyl terminus-truncated alpha1D-adrenoceptors inhibit the ERK pathway, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 389 (8) (2016) 911–920.
- [24] C.E. Rodríguez-Pérez, M.T. Romero-Ávila, G. Reyes-Cruz, J.A. García-Sáinz, Signaling properties of human alpha(1D)-adrenoceptors lacking the carboxyl terminus: intrinsic activity, agonist-mediated activation, and desensitization, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 380 (2) (2009) 99–107.
- [25] T.S. Kountz, K.S. Lee, S. Aggarwal-Howarth, E. Curran, J.M. Park, D.A. Harris, A. Stewart, J. Hendrickson, N.D. Camp, A. Wolf-Yadlin, E.H. Wang, J.D. Scott, C. Hague, Endogenous N-terminal domain cleavage modulates alpha1D-adrenergic receptor pharmacodynamics, *J. Biol. Chem.* 291 (35) (2016) 18210–18221.
- [26] J.A. García-Sáinz, C.E. Rodríguez-Pérez, M.T. Romero-Ávila, Human alpha-1D adrenoceptor phosphorylation and desensitization, *Biochem. Pharmacol.* 67 (2004) 1853–1858.
- [27] J.A. García-Sáinz, F.G. Vázquez-Cuevas, M.T. Romero-Ávila, Phosphorylation and desensitization of alpha1d-adrenergic receptors, *Biochem. J.* 353 (2001) 603–610 Pt 3.
- [28] K. Eichel, M. von Zastrow, Subcellular organization of GPCR signaling, *Trends Pharmacol. Sci.* 39 (2) (2018) 200–208.
- [29] S.K. Shenoy, R.J. Lefkowitz, Beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction, *Trends Pharmacol. Sci.* 32 (9) (2011) 521–533.
- [30] R.J. Lefkowitz, A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture), *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 52 (25) (2013) 6366–6378.
- [31] A.R. Thomsen, B. Plouffe, T.J. Cahill 3rd, A.K. Shukla, J.T. Tarrasch, A.M. Dosey, A.W. Khsai, R.T. Strachan, B. Pani, J.P. Mahoney, L. Huang, B. Breton, F.M. Heydenreich, R.K. Sunahara, G. Skinioti, M. Bouvier, R.J. Lefkowitz, GPCR-G protein-beta-arrestin super-complex mediates sustained G protein signaling, *Cell* 166 (4) (2016) 907–919.
- [32] G. Carmona-Rosas, R. Alcántara-Hernandez, D.A. Hernandez-Espinosa, Dissecting the signaling features of the multi-protein complex GPCR/beta-arrestin/ERK1/2, *Eur. J. Cell Biol.* 97 (5) (2018) 349–358.
- [33] C.A. Moore, S.K. Milano, J.L. Benovic, Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins, *Annu. Rev. Physiol.* 69 (2007) 451–482.
- [34] S.E. Avendaño-Vázquez, A. García-Caballero, J.A. García-Sáinz, Phosphorylation and desensitization of the lysophosphatidic acid receptor LPA1, *Biochem. J.* 385 (2005) 677–684 Pt 3.
- [35] J.A. Castillo-Badillo, O.B. Sánchez-Reyes, M.A. Alfonso-Méndez, M.T. Romero-Ávila, G. Reyes-Cruz, J.A. García-Sáinz, alpha1B-adrenergic receptors differentially associate with rab proteins during homologous and heterologous desensitization, *PLoS One* 10 (3) (2015) e0121165.
- [36] R.J. Ward, E. Alvarez-Curto, G. Milligan, Using the Flp-in T-Rex system to regulate GPCR expression, *Methods Mol. Biol.* 746 (2011) 21–37.
- [37] G. Gryniewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien, A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties, *J. Biol. Chem.* 260 (6) (1985) 3440–3450.
- [38] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (5259) (1970) 680–685.
- [39] R. Alcántara-Hernández, A. Hernández-Méndez, M.T. Romero-Ávila, M.A. Alfonso-Méndez, A.S. Pupo, J.A. García-Sáinz, Noradrenaline, oxymetazoline and phorbol myristate acetate induce distinct functional actions and phosphorylation patterns of alpha1A-adrenergic receptors, *Biochim. Biophys. Acta* 1864 (12) (2017) 2378–2388.
- [40] T.J. Collins, ImageJ for microscopy, *BioTechniques* 43 (1 Suppl) (2007) 25–30.
- [41] M. Hachet-Haas, N. Converset, O. Marchal, H. Matthes, S. Gioria, J.L. Galzi, S. Lecat, FRET and colocalization analyzer—a method to validate measurements of sensitized emission FRET acquired by confocal microscopy and available as an ImageJ Plug-in, *Microsc. Res. Tech.* 69 (12) (2006) 941–956.
- [42] S.M. Hartig, Basic image analysis and manipulation in ImageJ, *Curr. Protoc. Mol. Biol* 14 (2013) 15.1–15.12.
- [43] B. Chazotte, Labeling membrane glycoproteins or glycolipids with fluorescent wheat germ agglutinin, *Cold Spring Harb. Protoc.* (5) (2011).
- [44] L. Chen, R.R. Hodges, C. Funaki, D. Zoukhri, R.J. Gaivin, D.M. Perez, D.A. Dartt, Effects of alpha1D-adrenergic receptors on shedding of biologically active EGF in freshly isolated lacrimal gland epithelial cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291 (5) (2006) C946–C956.
- [45] A. Levitzki, E. Mishani, Tyrosinophostins and other tyrosine kinase inhibitors, *Annu. Rev. Biochem.* 75 (2006) 93–109.
- [46] D.S. Kang, X. Tian, J.L. Benovic, Role of beta-arrestins and arrestin domain-containing proteins in G protein-coupled receptor trafficking, *Curr. Opin. Cell Biol.* 27 (2014) 63–71.
- [47] S.K. Shenoy, R.J. Lefkowitz, Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin, *Science* (308) (2005) cm10.
- [48] J.A. García-Sáinz, J. Vázquez-Prado, L.C. Medina, Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation, *Eur. J. Pharmacol.* 389 (1) (2000) 1–12.
- [49] J.A. García-Sáinz, R. Villalobos-Molina, The elusive alpha(1D)-adrenoceptor: molecular and cellular characteristics and integrative roles, *Eur. J. Pharmacol.* 500 (1–3) (2004) 113–120.
- [50] R. Villalobos-Molina, M. Ibarra, Vascular alpha 1D-adrenoceptors: are they related to hypertension? *Arch. Med. Res.* 30 (5) (1999) 347–352.
- [51] R. Villalobos-Molina, J.J. López-Guerrero, M. Ibarra, Functional evidence of alpha1D-adrenoceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats, *Br. J. Pharmacol.* 126 (7) (1999) 1534–1536.
- [52] S.A. Beausoleil, J. Villen, S.A. Gerber, J. Rush, S.P. Gygi, A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization, *Nat. Biotechnol.* 24 (10) (2006) 1285–1292.
- [53] A.K. Shukla, A. Manglik, A.C. Kruse, K. Xiao, R.I. Reis, W.C. Tseng, D.P. Staus, D. Hilger, S. Uysal, L.Y. Huang, M. Paduch, P. Tripathi-Shukla, A. Koide, S. Koide, W.I. Weis, A.A. Kossiakoff, B.K. Kobilka, R.J. Lefkowitz, Structure of active beta-arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide, *Nature* 497 (7447) (2013) 137–141.
- [54] S.C. Sensen, M.H. Graler, Down-regulation of S1P1 receptor surface expression by protein kinase C inhibition, *J. Biol. Chem.* 285 (9) (2010) 6298–6307.
- [55] A.M. Abramian, E. Comenencia-Ortiz, A. Modgil, T.N. Vien, Y. Nakamura, Y.E. Moore, J.L. Maguire, M. Terunuma, P.A. Davies, S.J. Moss, Neurosteroids promote phosphorylation and membrane insertion of extrasynaptic GABAA receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (19) (2014) 7132–7137.
- [56] E. Comenencia-Ortiz, S.J. Moss, P.A. Davies, Phosphorylation of GABAA receptors influences receptor trafficking and neurosteroid actions, *Psychopharmacology* 231 (17) (2014) 3453–3465.
- [57] C. Kibaly, A.Y. Kam, H.H. Loh, P.Y. Law, Naltrexone facilitates learning and delays extinction by increasing AMPA receptor phosphorylation and membrane insertion, *Biol. Psychiatry* 79 (11) (2016) 906–916.
- [58] D.T. Lin, Y. Makino, K. Sharma, T. Hayashi, R. Neve, K. Takamiya, R.L. Huganir, Regulation of AMPA receptor extrasynaptic insertion by 4.1N, phosphorylation and palmitoylation, *Nat. Neurosci.* 12 (7) (2009) 879–887.
- [59] W. Kolch, Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions, *Biochem. J.* 351 (Pt 2) (2000) 289–305.
- [60] A.B. Tobin, G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom, *Br. J. Pharmacol.* 153 (Suppl. 1) (2008) S167–S176.
- [61] A.B. Tobin, A.J. Butcher, K.C. Kong, Location, location, location...Site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling, *Trends Pharmacol. Sci.* 29 (8) (2008) 413–420.
- [62] I. Torrecilla, E.J. Spragg, B. Poulin, P.J. McWilliams, S.C. Mistry, A. Blaukat, A.B. Tobin, Phosphorylation and regulation of a G protein-coupled receptor by protein kinase CK2, *J. Cell Biol.* 177 (1) (2007) 127–137.
- [63] M. Bouzo-Lorenzo, I. Santo-Zas, M. Lodeiro, R. Nogueiras, F.F. Casanueva, M. Castro, Y. Pazos, A.B. Tobin, A.J. Butcher, J.P. Camina, Distinct phosphorylation

- sites on the ghrelin receptor, GHSR1a, establish a code that determines the functions of ss-arrestins, *Sci. Rep.* 6 (2016) 22495.
- [64] A.J. Butcher, B.D. Hudson, B. Shimpukade, E. Alvarez-Curto, R. Prihandoko, T. Ulven, G. Milligan, A.B. Tobin, Concomitant action of structural elements and receptor phosphorylation determine arrestin-3 interaction with the free fatty acid receptor FFA4, *J. Biol. Chem.* 289 (26) (2014) 18451–18465.
- [65] A.J. Butcher, R. Prihandoko, K.C. Kong, P. McWilliams, J.M. Edwards, A. Bottrill, S. Mistry, A.B. Tobin, Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code, *J. Biol. Chem.* 286 (13) (2011) 11506–11518.
- [66] R. Prihandoko, E. Alvarez-Curto, B.D. Hudson, A.J. Butcher, T. Ulven, A.M. Miller, A.B. Tobin, G. Milligan, Distinct phosphorylation clusters determine the signaling outcome of free fatty acid receptor 4/G protein-coupled receptor 120, *Mol. Pharmacol.* 89 (5) (2016) 505–520.
- [67] D. Zindel, S. Engel, A.R. Bottrill, J.P. Pin, L. Prezeau, A.B. Tobin, M. Bunemann, C. Krasel, A.J. Butcher, Identification of key phosphorylation sites in PTH1R that determine arrestin3 binding and fine-tune receptor signaling, *Biochem. J.* 473 (22) (2016) 4173–4192.
- [68] X. Chen, B. Bai, Y. Tian, H. Du, J. Chen, 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.* 289 (45) (2014) 31173–31187.
- [69] L. Bray, C. Froment, P. Pardo, C. Candotto, O. Burlet-Schiltz, J.M. Zajac, C. Mollereau, L. Mouldous, Identification and functional characterization of the phosphorylation sites of the neuropeptide FF2 receptor, *J. Biol. Chem.* 289 (49) (2014) 33754–33766.