



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización e identificación de los sitios de fosforilación en el receptor α_{1B} -adrenérgico.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

David Alejandro Hernández Espinosa

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marina Macías Silva
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Dra. Marina Gavilanes Ruiz
[Facultad de Química, UNAM](#)

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., Mayo, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se realizó bajo la tutoría del Dr. J. Adolfo García-Sáinz, en el Departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con financiamiento por parte de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM (IN200718, IN201221) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (253156 y Fronteras 6676).

David Alejandro Hernández Espinosa fue alumno del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y fue apoyado por una beca de posgrado del CONACyT con número de CVU: 706381.

RECONOCIMIENTOS

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

Dr. J. Adolfo García Sáinz	IFC-UNAM
Dra. Marina Macias Silva	IFC-UNAM
Dra. Marina Gavilanes Ruiz	FQ-UNAM

El jurado del examen doctoral estuvo integrado por:

Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares	FQ-UNAM
Dra. Marcia Hiriart Urdanivia	IFC-UNAM
Dra. María Teresa Tusié Luna	IIBo-UNAM
Dra. Guadalupe Reyes Cruz	CINVESTAV
Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez	IFC-UNAM

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

Agradezco al personal de las Unidades de Apoyo del Instituto de Fisiología Celular

Unidad de Imagenología

M. C. Rodolfo Paredes Díaz
Dra. Ruth Rincón Heredia
Dr. Abraham Rosas Arellano

Unidad de Biología Molecular

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

Unidad de Computó

Ing. Juan Barbosa Castillo
Ing. Ivette Rosas Arciniega
M. en C. Gerardo Rosas Arellano

Taller de Mantenimiento

Ing. Aurey Galván Lobato
Ing. Manuel Ortínez Benavides

Bioterio

Dr. Héctor Malangón
Dra. Claudia Rivera

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

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme una educación gratuita de calidad.

Al Doctor Jesús Adolfo García Sáinz por la confianza depositada en mí a lo largo de los años y por su apoyo en cada momento en el desarrollo de este proyecto. Sus consejos, enseñanzas y anécdotas me acompañaran por el resto de mi vida. Gracias por todo.

A la Dra. Marina Macías Silva y a la Dra. Marina Gavilanes Ruiz por su compromiso y consejos durante el desarrollo de este trabajo. Gracias por creer en mí desde el inicio de la maestría y hasta el final del doctorado.

Agradezco a los miembros de mi jurado: la Dra. Rosario A. Muñoz Clares, la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, la Dra. María Teresa Tusié Luna, la Dra. Guadalupe Reyes Cruz y al Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez; por sus observaciones y comentarios que ayudaron a enriquecer la redacción de este trabajo.

A la Dra. Ma. Teresa Romero Ávila, por su apoyo y enseñanzas desde el primer día que entre al laboratorio 303-Sur. Este trabajo no hubiera sido posible sin su apoyo.

A Guadalupe (Lupita) Jiménez, por ser una parte fundamental en el mantenimiento y funcionamiento del laboratorio.

A la Dra. Rocio Alcántara Hernández, el Dr. Marco Alfonzo y al Dr. Gabriel Carmona, por ser parte fundamental de este trabajo. Sin su apoyo este trabajo no hubiera sido posible. Gracias por creer en mí y darme confianza en cada momento.

A mis compañeros del laboratorio 303-Sur. Juan Carlos, Sócrates, Alejandro, Raúl, Helivier, Gustavo, Karla, Emmanuel por todos los consejos y los momentos de diversión que siempre hacen del laboratorio un lugar agradable para trabajar.

A Albany Guerra, por acompañarme en estos cuatro años apoyándome, dándome ánimos y siempre creyendo en mí. Te encontré donde menos esperaba y espero seguir contigo esta aventura llamada vida.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Abreviaturas	3
1. Introducción	4
1.1 Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)	4
1.2 Receptores adrenérgicos	7
1.3 Receptor α_{1B} -adrenérgico	8
1.4 Modificaciones post-transduccionales de los GPCRs: Fosforilación	11
1.4.1 Modificaciones post-transduccionales del receptor α_{1B} -adrenérgico	12
1.5 Desensibilización de los GPCRs	14
1.6 GTPasas Rab	16
2. Justificación	19
3. Hipótesis	20
4. Objetivo	20
4.1 Objetivos particulares	20
5. Material y métodos	21
5.1 Reactivos	21
5.2 Plásmidos	21
5.3 Cultivo celular	22
5.4 Generación de líneas celulares estables: sistema inducible Flp-In TREx	23
5.5 Transfección transitoria	24
5.6 Determinación de la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$	24
5.7 Ensayo de Western blot	25
5.8 Inmunoprecipitación y marcaje metabólico – fosforilación	25
5.9 Análisis <i>in silico</i> del α_{1B} -adrenérgico	26
5.10 Análisis de sitios de fosforilación del receptor α_{1B} -AR por espectrometría de masas	27
5.11 Microcopia confocal	27
5.12 Análisis estadístico	28

6.Resultados Parte I: Papel de los cinco sitios de fosforilación en la función, señalización y desensibilización del receptor α_{1B} -AR	29
6.1 Diseño de las mutantes	29
6.2 Movilización de calcio intracelular en la por las distintas variantes del receptor α_{1B} -AR	30
6.3 Participación de los cinco residuos de serina en la desensibilización heteróloga del receptor α_{1B} -AR	32
6.4 La mutación en los residuos de fosforilación del receptor α_{1B} -AR tienen distinta cinética de fosforilación	33
6.5 La fosforilación del receptor α_{1B} -AR en los cinco residuos de serina regulan la vía de ERK	37
6.6 Participación de los sitios de fosforilación en el tráfico vesicular del α_{1B} -AR	39
7.Resultados parte II: Identificación y caracterización funcional de los sitios de fosforilación del receptor α_{1B} -AR	46
7.1 Análisis <i>in silico</i> del receptor α_{1B} -AR	46
7.2 Purificación del receptor α_{1B} -AR	48
7.3 Análisis de los resultados obtenidos por espectrometría de masas	50
7.4 Sitios de fosforilación del receptor α_{1B} -AR y código de fosforilación	54
8.Discusión	57
9.Conclusiones	67
10.Perspectivas	68
11.Bibliografía	69
12.Anexos	82
Anexo I: Plásmidos utilizados en este trabajo de tesis	82
Anexo II: Líneas celulares generadas durante el trabajo de tesis	83
Anexo III: Inhibición de la fosforilación del receptor α_{1B} -AR por paroxetina y la expresión de la DN-GRK2	84
Anexo IV. Artículos	85

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Representación estructural de los receptores acoplados a proteínas G	5
Figura 2. Activación de los GPCRs y clasificación de las proteínas G según la subunidad α	6
Figura 3. Familia de receptores adrenérgicos	8
Figura 4. Vía de señalización del receptor α_{1B} -AR	10
Figura 5. Esquema del receptor α_{1B} -AR adrenérgico humano	13
Figura 6. Mecanismo de desensibilización homóloga de los GPCRs	14
Figura 7. Mecanismo de desensibilización heteróloga de los GPCRs	15
Figura 8. Esquema general del tráfico endocítico y del reciclaje	18
Figura 9. Presencia de las cinco serinas reportadas que se fosforilan en el receptor α_{1B} -AR de hámster en distintas especies	29
Figura 10. Representación esquemática e imágenes de microscopio de las construcciones $p\alpha_{1Bh}$ -EGFP-N1-TREx utilizadas	30
Figura 11. Respuesta de calcio inducida por NA en células que expresan las distintas variantes del α_{1B} -AR	31
Figura 12. Efecto del PMA sobre la respuesta de calcio inducida por NA en células que expresan las distintas variantes del α_{1B} -AR	33
Figura 13. Cursos temporales de fosforilación de las variantes del receptor α_{1B} -AR en respuesta a noradrenalina	34
Figura 14. Cursos temporales de fosforilación de las variantes del receptor α_{1B} -AR en respuesta a PMA	35
Figura 15. Fosforilaciones comparativas entre los distintos tipos de receptor α_{1B} -AR	37
Figura 16. Efecto de la NA sobre la fosforilación de ERK1/2	38
Figura 17. Papel de la proteína cinasa GRK2 en la interacción del receptor α_{1B} -AR y la Rab5	40
Figura 18. Interacción entre el receptor y Rab5 en células expresando al receptor α_{1B} -AR silvestre o al receptor α_{1B} -AR variante en S406,410,412A	42
Figura 19. Internalización del receptor α_{1B} -AR	43

Figura 20. Cuantificación de la fluorescencia intracelular del receptor α_{1B} -AR como indicador de internalización	44
Figura 21. Predicción de los sitios de fosforilación del receptor α_{1B} -AR	47
Figura 22. Purificación del receptor α_{1B} -AR para los estudios de espectrometría de masa	50
Figura 23. Cobertura proteica obtenida en el análisis por espectrometría de masas	52
Figura 24. Genes asociados al receptor α_{1B} -AR	53
Figura 25. Sitios de fosforilación detectados por espectrometría de masas en muestras obtenidas de la construcción α_{1B} -AR-eGFP silvestre	54
Figura 26. Alineamiento de secuencias entre diferentes ortólogos del α_{1B} -AR	55
Figura 27. Modelo de tráfico vesicular del receptor α_{1B} -AR	60
Figura 28. Motivos fosforilados identificados en el receptor α_{1B} -AR	63
Tabla 1. Predicción de cinasas que fosforilan al receptor α_{1B} -AR	48
Tabla 2. Sitios de fosforilación localizados por espectrometría de masas y representación del código de fosforilación	51
Tabla 3. Proteínas asociadas al receptor α_{1B} -AR encontradas por espectrometría de masas	52

RESUMEN

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) son una superfamilia de proteínas de membrana que median distintas funciones fisiológicas. Dentro de esta superfamilia de proteínas se encuentran los receptores adrenérgicos que se dividen en tres familias (con tres miembros cada una). Dentro de la familia de los α_1 -adrenérgicos encontramos al receptor α_{1B} -adrenérgico que media diversas acciones de la adrenalina y la noradrenalina y que participa en muchos procesos fisiológicos.

La activación de los receptores α_{1B} -adrenérgicos produce la asociación del receptor con las proteínas $G_{q/11}$, ocasionando la señalización mediada por la liberación de Ca^{+} intracelular y la activación de la proteína cinasa C (PKC); subsecuentemente el receptor es fosforilado, desensibilizado e internalizado. Aunque se señala que la fosforilación de los receptores es un paso inicial en el proceso de desensibilización de varios GPCRs, existen trabajos recientes que apuntan que esta modificación post-traducciona también es importante para el reconocimiento y la asociación del receptor con otras proteínas, así como también en su función y localización subcelular.

Previamente, solo se habían reportado cinco sitios de fosforilación para el receptor α_{1B} -adrenérgico en el ortólogo de hámster, de los cuales dos de ellos son fosforilados por la PKC y tres por la proteína cinasa GRK2 (G protein coupled receptor kinase 2). En ese trabajo encontramos que en el receptor α_{1B} -adrenérgico humano estos mismos sitios, juegan un papel importante en la desensibilización, en el tráfico vesicular del receptor, y en la regulación de la vía de MAP cinasas. Por otro lado, describimos patrones de fosforilación del receptor bajo condiciones basales, así como también estimulándolo con noradrenalina (desensibilización homóloga) o estimulando a la proteína cinasa C (PKC) con forbol miristato acetato (PMA) (desensibilización heteróloga). A partir de estos experimentos se identificaron nuevos sitios de fosforilación localizados específicamente en la tercera asa intracelular y en la región carboxilo terminal del receptor.

ABSTRACT

G protein-coupled receptors (GPCRs) are a superfamily of membrane proteins that mediate different physiological functions. In this superfamily of proteins, we find the adrenergic receptors that can be divided into three families (with three members in each one). In the family of the α_1 -adrenergic receptors, we can find the α_{1B} -adrenergic receptor that mediates many noradrenaline's actions and participates in many physiological processes.

The activation of the α_{1B} -adrenergic receptor induces its interaction with the $G_{q/11}$ protein that causes the signaling mediated by the release of intracellular Ca^{2+} and the activation of the protein kinase C (PKC); subsequently the receptors are phosphorylated, desensitized and internalized. Even though receptor phosphorylation has been pointed as an initial step in the desensitization of different types of GPCRs, recent works indicate that this post-translational modification is also important for the recognition and association of the receptor with other proteins, as well as in its function and subcellular location.

Previously, only five phosphorylation sites for the α_{1B} -adrenergic receptor were detected studying the hamster ortholog; two are phosphorylated by the PKC and the other three by the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2). In this work we studied the same phosphorylation sites of the human α_{1B} -adrenergic receptor. Such sites play key roles in desensitization, in the vesicular trafficking of the receptor, and in the regulation of the ERK pathway. Moreover, we found a differential phosphorylation pattern under baseline conditions, stimulation with noradrenaline (homologous desensitization) or activation of PKC with phorbol myristate acetate (PMA) (heterologous desensitization). We identified new phosphorylation sites, specifically at the third intracellular loop and at the carboxyl terminus of the receptor.

Abreviaturas

AR: Receptor adrenérgico

COOH: Extremo carboxilo

DN-GRK2: Dominante negativa de GRK-2

FRET : Transferencia de Energía de Resonancia de Förster

GFP: Proteína verde fluorescente

GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G

GRK2: Cinasa de receptores acoplados a proteínas G 2

IL-3: Tercera asa intracelular

MS: Espectrometría de masas

NA: Noradrenalina

PKC: Proteína cinasa C

PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato

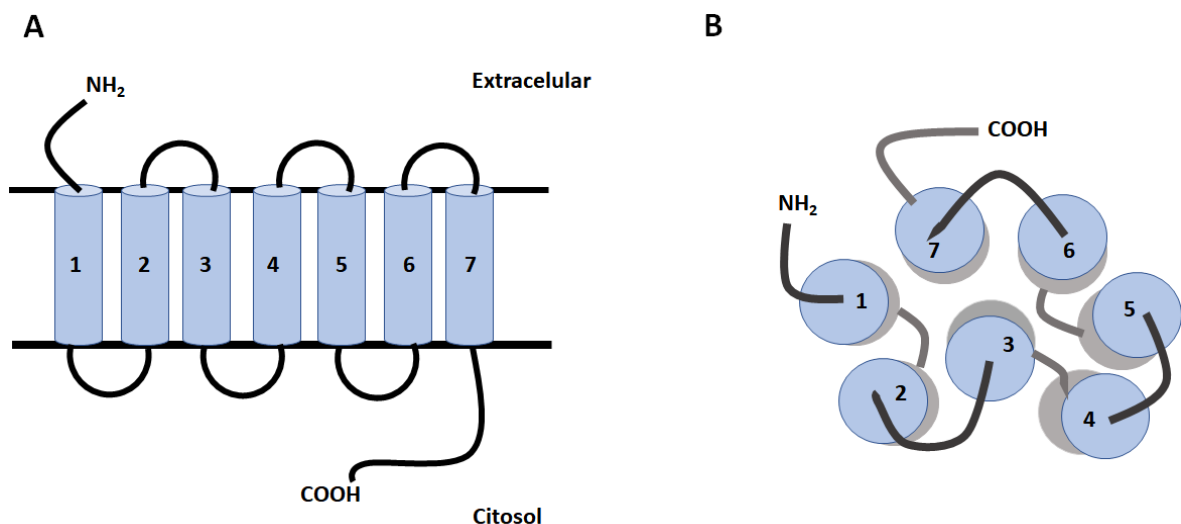
Ser: Serina

1. Introducción

1.1. Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)

Las células de los mamíferos presentan diversos tipos de receptores en su membrana plasmática, entre los que se encuentran los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, por sus siglas en inglés, *G protein coupled receptors*), y los cuales comprenden la familia de proteínas de membrana más grande encontrada en el genoma humano y en otros organismos. Se ha estimado que cerca de 800 genes codifican para estas proteínas (lo que representa entre el 3-5% de los genes que se codifican en el genoma humano) (Fredriksson & Schiöth, 2005). Los GPCRs en vertebrados se han dividido en cinco familias: la del glutamato, rodopsina, adhesión, frizzled/taste y la de secretina. Esta clasificación se realizó con base en sus características de unión a ligando, los mecanismos de señalización que activan, así como su secuencia (Fredriksson & Schiöth, 2005).

Aunque los GPCRs no comparten una gran similitud en su secuencia de aminoácidos (Kolakowski, 1994), todas las proteínas pertenecientes a esta superfamilia de receptores comparten una topología común formada por una sola cadena polipeptídica con siete dominios transmembranales, los cuales se encuentran conectados por asas intracelulares y extracelulares. También presentan una región amino terminal (NH_2) en la parte extracelular y una región carboxilo terminal (COOH) en la parte intracelular (Oldham & Hamm, 2006)(Fig. 1).



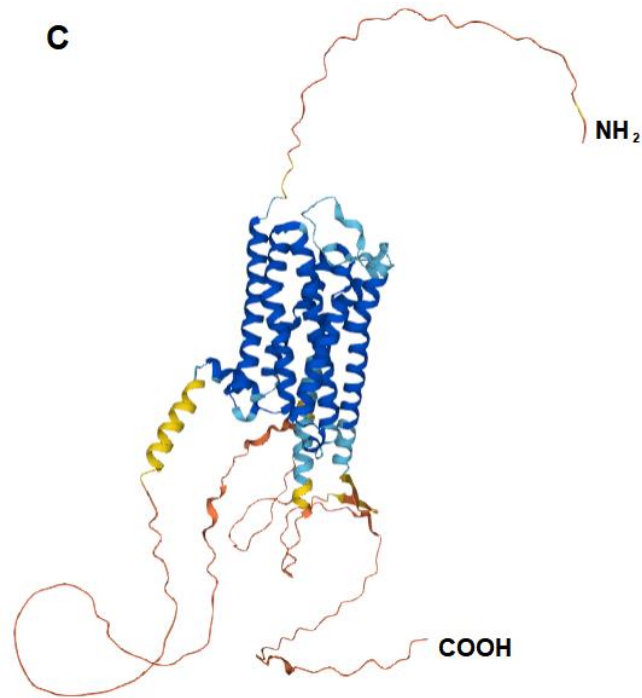


Figura 1. Representación estructural de los receptores acoplados a proteínas G. (A) Vista lateral del modelo de los receptores. **(B)** Vista aérea del modelo. **(C)** Modelo cristalográfico del receptor obtenido por AlphaFold. Las regiones azules presentan mayor confiabilidad del modelo, mientras que las regiones en amarillo y naranja representan regiones de baja confiabilidad.

La activación de los GPCRs, por la unión del agonista con el receptor, produce cambios conformacionales que implican arreglos en la orientación de los dominios transmembranales, dejando expuesta la región de unión con las proteínas G heterotriméricas (Kobilka, 2013). Las proteínas G están compuestas por las subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$; la subunidad $G\alpha$ tiene unido guanosín difosfato (GDP) en su estado inactivo. Después de la activación del receptor, se libera el GDP unido a la subunidad $G\alpha$ y es remplazado por guanosín trifosfato (GTP), provocando la disociación de esta subunidad del dímero $G\beta\gamma$, y así activando 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, convirtiéndola en GDP (Fig. 2) (Oldham & Hamm, 2008). Las proteínas G se dividen en cuatro clases con base en la similitud de la secuencia primaria de la subunidad $G\alpha$ y su función. Estas clases son G_s , G_i , $G_q/11$ y $G_{12/13}$. La subfamilia G_s activa a la adenil ciclasa, mientras que la activación de la proteína G_i provoca su inhibición. La subfamilia $G_{12/13}$ está

implicada en la regulación de proteínas G pequeñas que controlan la estructuración de citoesqueleto y la movilidad celular. Por último, la activación de la proteína Gq/11 aumenta la actividad de fosfolipasa C (PLC) (Fig. 2) (Neer, 1995) y la generación de los segundos mensajeros; diacilglicerol e inositol (IP3)

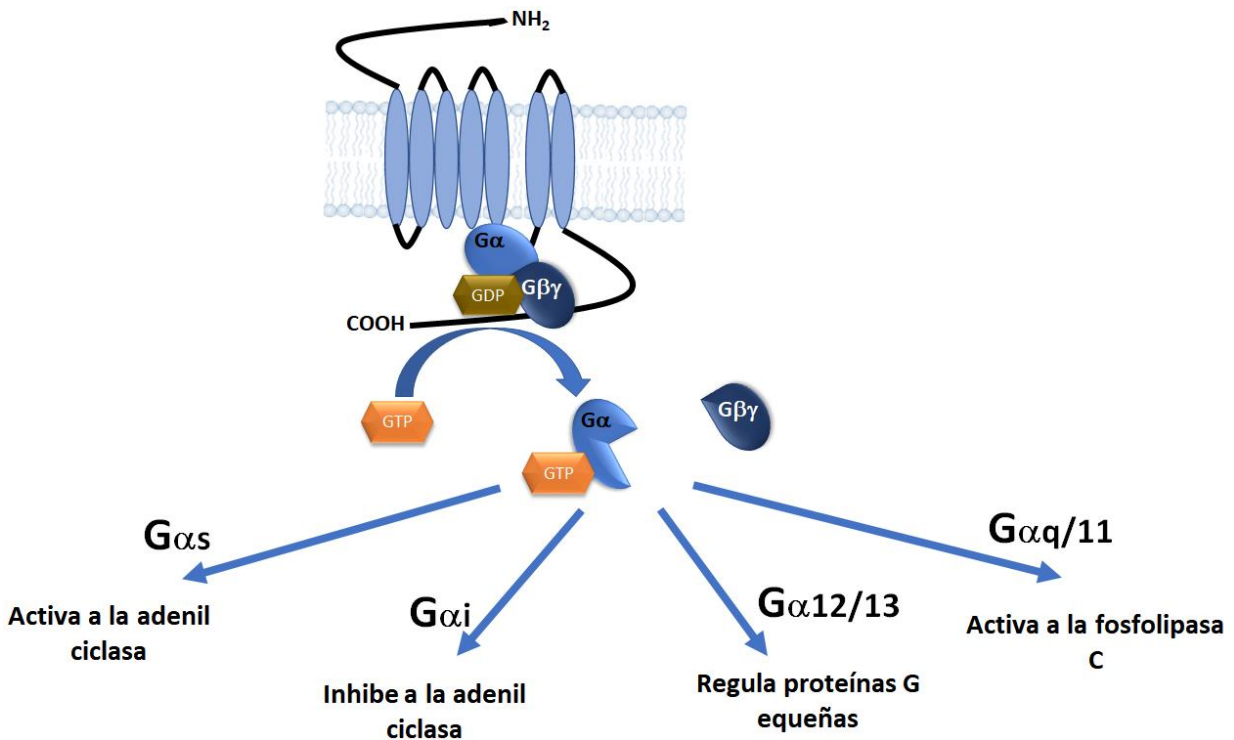


Figura 2. Activación de los GPCRs y clasificación de las proteínas G según la subunidad α.

Se estima que los GPCRs son blanco del 30-40% de los fármacos en el mercado (Hopkins & Groom, 2002), ya que, al tener la capacidad para interactuar con una gran variedad de ligandos de distinta naturaleza química, son capaces de mediar distintos procesos fisiológicos claves, los cuales incluyen: la regulación del sistema nervioso central, del sistema inmune y del sistema endocrino. Además, estos receptores participan en el desarrollo de distintas enfermedades, tales como el asma bronquial, la hipertensión arterial, las fallas cardiacas, la diabetes, entre otras (Blumenthal, 2017).

1.2 Receptores adrenérgicos

Las acciones de las catecolaminas, adrenérgicas naturales, adrenalina y noradrenalina, son mediadas a través de los receptores adrenérgicos, que son un grupo heterogéneo de GPCRs y que están involucrados en la reacción de “pelea o huida”. Esta reacción es la respuesta causada por la activación del sistema nervioso simpático que prepara al cuerpo en situaciones de peligro o de severa actividad física (Docherty, 2010).

Estos receptores se encuentran agrupados en tres familias distintas (con tres miembros cada uno), con base en sus características farmacológicas, las similitudes en su secuencia y sus vías de señalización, en: receptores adrenérgicos α_1 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}) que activan la vía de recambio de fosfoinosítidos- Ca^{2+} ; receptores adrenérgicos α_2 (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}) que inhiben la vía de la adenilil ciclasa y receptores adrenérgicos β (β_1 , β_2 , β_3) que activan la vía de la adenilil ciclasa (Paul et al., 1995). La característica de que cada familia de receptores adrenérgicos produce un efecto diferente en respuesta a la adrenalina depende de que cada subtipo de receptores adrenérgicos se acople preferencialmente a distintas proteínas G, dando como resultado la activación de diferentes vías de señalización (Fig. 3). Existen trabajos, donde se han utilizado mutantes con actividad constitutiva de estos receptores, han mostrado su importancia fisiológica, así como también su potencial oncogénico y sus características funcionales que permiten caracterizar y desarrollar nuevos agentes farmacológicos (Cotecchia, 2007).

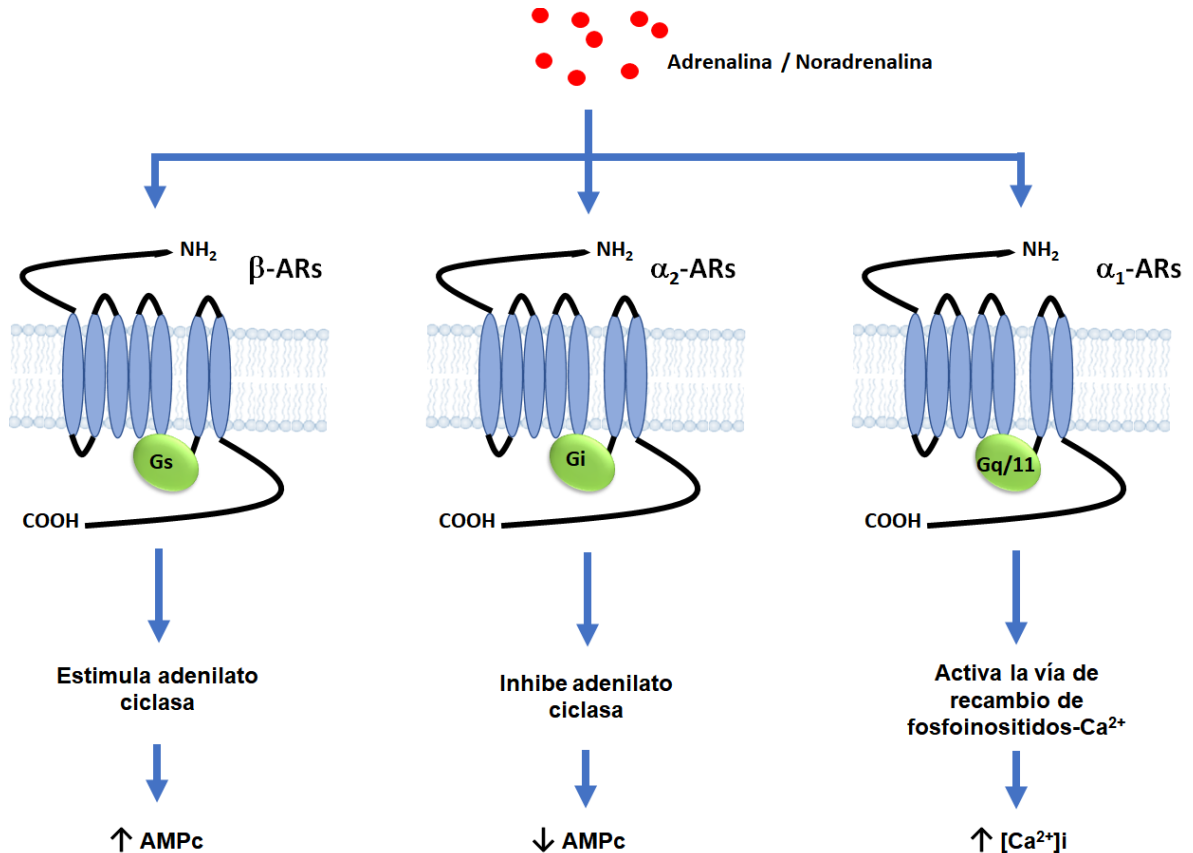


Figura 3. Familia de receptores adrenérgicos. Los receptores adrenérgicos se dividen en 3 familias. Los receptores α_1 se acoplan a la proteína $G_{q/11}$ la cual activa a la fosfolipasa C. Los receptores α_2 se acoplan a la proteína G_i provocando una regulación negativa del adenilil ciclasa. Por último, los receptores β se acoplan a la proteína G_s cuya función es regular positivamente al adenilil ciclasa.

1.3 Receptor α_{1B} -adrenérgico

El gen que codifica al receptor α_{1B} -adrenérgico (α_{1B} -AR) en humanos se localiza en el brazo largo del cromosoma 5, por lo que este cromosoma se ha relacionado en la regulación de la contracción del músculo liso (Akinaga et al., 2019; Krushkal et al., 1998) aunque hay evidencia de la participación del receptor α_{1D} -AR (R Villalobos-Molina et al., 2008; Rafael Villalobos-Molina & Ibarra, 1999). Este receptor está formado por una cadena polipeptídica de 520 aminoácidos y tiene una masa estimada de 90-100 kDa. Las dos primeras asas intracelulares contienen residuos de cisteína importantes, que permiten el plegamiento correcto de la proteína. En el

tercer dominio transmembranal se encuentra un motivo E/DRY altamente conservado que juega un papel importante en la activación del receptor (Cotecchia et al., 2002).

Actualmente no se conoce por completo la función del receptor α_{1B} -AR; sin embargo, se ha relacionado principalmente en la respuesta vasoconstrictora del músculo liso, el incremento de la presión sanguínea, en el crecimiento cardiaco y en la homeostasis de la glucosa de todo el cuerpo. En un modelo de ratón *knockout* para este receptor, se observaron cambios conductuales en los animales (tales como un incremento en la respuesta a nuevas situaciones y una disminución al momento de aprender tareas), un incremento en los niveles de glucógeno hepático, una disminución en la presión arterial, así como una disminución en la vasoconstricción en el músculo liso en la aorta torácica (Cotecchia et al., 2002). Por lo anterior, se han señalado al receptor α_{1B} -AR y al receptor α_{1D} -AR han sido señalados como elementos importantes tanto en el mantenimiento de la presión sanguínea como en el metabolismo (Akinaga et al., 2019; Cotecchia et al., 2002; R Villalobos-Molina et al., 2008; Rafael Villalobos-Molina & Ibarra, 1999).

La transducción de la señal se inicia cuando el agonista natural (adrenalina o noradrenalina) o un sintético se unen al receptor adrenérgico, lo que provoca un cambio conformacional que permite el acoplamiento con la proteína $G_{q/11}$. La activación de la proteína G, por el intercambio de GDP por GTP, activa a la fosfolipasa C beta, la cual promueve la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2), dando como resultado la formación de dos segundos mensajeros: el diacilglicerol (DAG) y el inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3). El IP_3 se une a su receptor canal localizado en el retículo endoplásmico, lo que promueve la liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares (Gilman, 1987; Neer, 1995). El calcio liberado y el diacilglicerol formado estimulan a la proteína cinasa C (PKC), que con otras cinasas propagan la señal (Fig. 4) (Garcia-Sáinz et al., 1980; Perez et al., 1993).

Los receptores acoplados a proteínas G son capaces de activar la vía de señalización de las cinasas MAP (MAPKs, Mitogen Activated Protein Kinase) principalmente a través de la proteína cinasa C (PKC) (Keffel et al., 2000; McCune et al., 2000; Waldrop et al., 2002). En la vía de ERK, tres cinasas se fosforilan de manera secuencial en residuos de serina, treonina y tirosina (Widmann et al., 1999). La primera proteína en ser fosforilada es el proto-oncogén serina/treonina cinasa (c-Raf-1), la cual se activa al fosforilarse y que posteriormente fosforila de manera consecutiva a MEK, que a su vez se activa y fosforila a ERK 1/2 (Fig. 4). La transducción de señales a través de esta vía juega un papel central en una gran variedad de respuestas celulares que incluyen la proliferación, diferenciación y muerte celular. Esto se debe a que al fosforilar ERK 1/2, éste se activa y transloca al ser activada se transloca al núcleo, en donde fosforila moléculas blanco como factores transcripcionales, los cuales llevan a cabo la expresión de distintos genes involucrados en las diferentes respuestas celulares como la proliferación y la supervivencia celular (Shaw & Saxton, 2003).

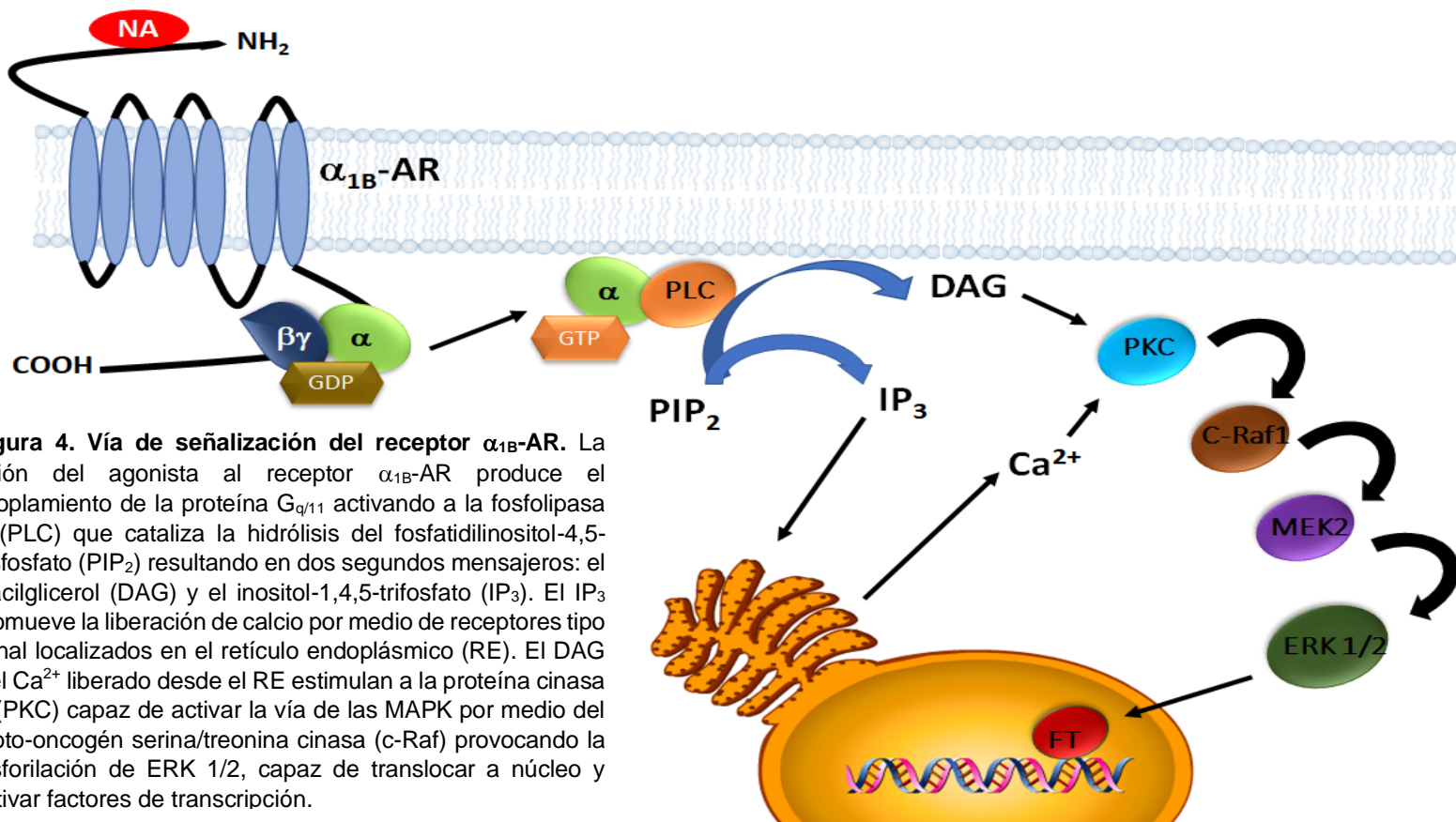


Figura 4. Vía de señalización del receptor α_{1B} -AR. La unión del agonista al receptor α_{1B} -AR produce el acoplamiento de la proteína G $_{q/11}$ activando a la fosfolipasa C (PLC) que cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP $_2$) resultando en dos segundos mensajeros: el diacilglicerol (DAG) y el inositol-1,4,5-trifosfato (IP $_3$). El IP $_3$ promueve la liberación de calcio por medio de receptores tipo canal localizados en el retículo endoplásmico (RE). El DAG y el Ca^{2+} liberado desde el RE estimulan a la proteína cinasa C (PKC) capaz de activar la vía de las MAPK por medio del proto-oncogén serina/treonina cinasa (c-Raf) provocando la fosforilación de ERK 1/2, capaz de translocar a núcleo y activar factores de transcripción.

1.4 Modificaciones post-transduccionales de los GPCRs: Fosforilación

Las modificaciones post-transduccionales son una serie de procesos dinámicos que cambian dependiendo del repertorio de proteínas sintetizadas en cada grupo celular y en respuesta a distintos estímulos externos. Dichas modificaciones repercuten en la función de las proteínas (Nørskov-Lauritsen & Bräuner-Osborne, 2015). Los GPCRs sufren modificaciones post-transduccionales, siendo las más comunes la fosforilación, la palmitoilación, la acetilación, la glicosilación y la ubiquitinación. Estas modificaciones juegan un papel importante en la regulación de la señal de los receptores, debido a que pueden repercutir principalmente en la función, localización subcelular y en el tráfico vesicular del receptor (Nørskov-Lauritsen & Bräuner-Osborne, 2015).

El estado de fosforilación de una proteína 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 gama (γ) y de una molécula de adenosín trifosfato (ATP), principalmente a residuos de serina, treonina o tirosina de las proteínas, mientras que las fosfatasas son hidrolasas que liberan los grupos fosfatos de los aminoácidos previamente mencionados. Diversos GPCRs son sujetos de fosforilación, y esta modificación post-transduccional está asociada con la desensibilización y el tráfico intracelular del receptor (Tobin et al., 2008), aunque también hay evidencia que sugieren la existencia de mecanismos de desensibilización independientes de fosforilación (Ferguson, 2007).

La activación de los GPCRs por la unión con su ligando promueve la fosforilación del receptor a través de distintos tipos de cinasas, entre las cuales se encuentran las cinasas (como en los receptores de algunos factores de crecimiento) de receptores acoplados a proteínas G (GRKs), así como la tirosina cinasas y las proteínas cinasas dependientes de segundos mensajeros como la PKA, la PKC, entre otras. La fosforilación del receptor por dichas cinasas, principalmente en la tercera asa intracelular (IL3) y en la región carboxilo terminal (COOH), favorece el desacoplamiento de la proteína G del receptor, la activación de vías de señalización

independientes de proteínas G y el reclutamiento de proteínas de andamiaje, como las β -arrestinas (Shukla et al., 2013), las cuales son capaces de activar vías de señalización aun cuando el receptor se encuentra internalizado.

Diversos estudios han demostrado la existencia de distintos patrones de fosforilación en los GPCRs, los cuales están determinados por el tipo celular en el cual se encuentran expresando estos receptores, así como también por el tipo de agonistas, agonistas parciales o agonistas inversos que se puedan unir al receptor. Esto indica la presencia de un código de fosforilación que determina la función de los receptores a través de la activación preferencial de una determinada vía de señalización, fenómeno conocido como señalización sesgada (Butcher et al., 2011; Martínez-Morales et al., 2021; Rajagopal et al., 2010; Tobin et al., 2008).

1.4.1 Modificaciones post-transduccionales del receptor α_{1B} -adrenérgico

Al igual que otros GPCRs, el receptor α_{1B} -AR puede ser sometido a modificaciones postraduccionales. Las modificaciones postraduccionales que presenta este receptor son la glicosilación en su región amino terminal y la palmitoilación y la fosforilación de residuos de aminoácidos en su región carboxilo terminal (Cotecchia et al., 2002; Stevens et al., 2001). La palmitoilación y la glucosilación no juegan aparentemente ningún papel en la función o localización subcelular del receptor. Por otro lado, la fosforilación en los cinco residuos de serina reportados hasta la fecha (Ser⁴⁰⁶, Ser⁴¹⁰ y Ser⁴¹² por GRK2 y Ser³⁹⁶ y Ser⁴⁰² por PKC) en la región carboxilo terminal juega un papel importante durante la desensibilización del receptor α_{1B} -AR de hámster (Fig. 5) (Björklöf et al., 2002; Diviani et al., 1997).

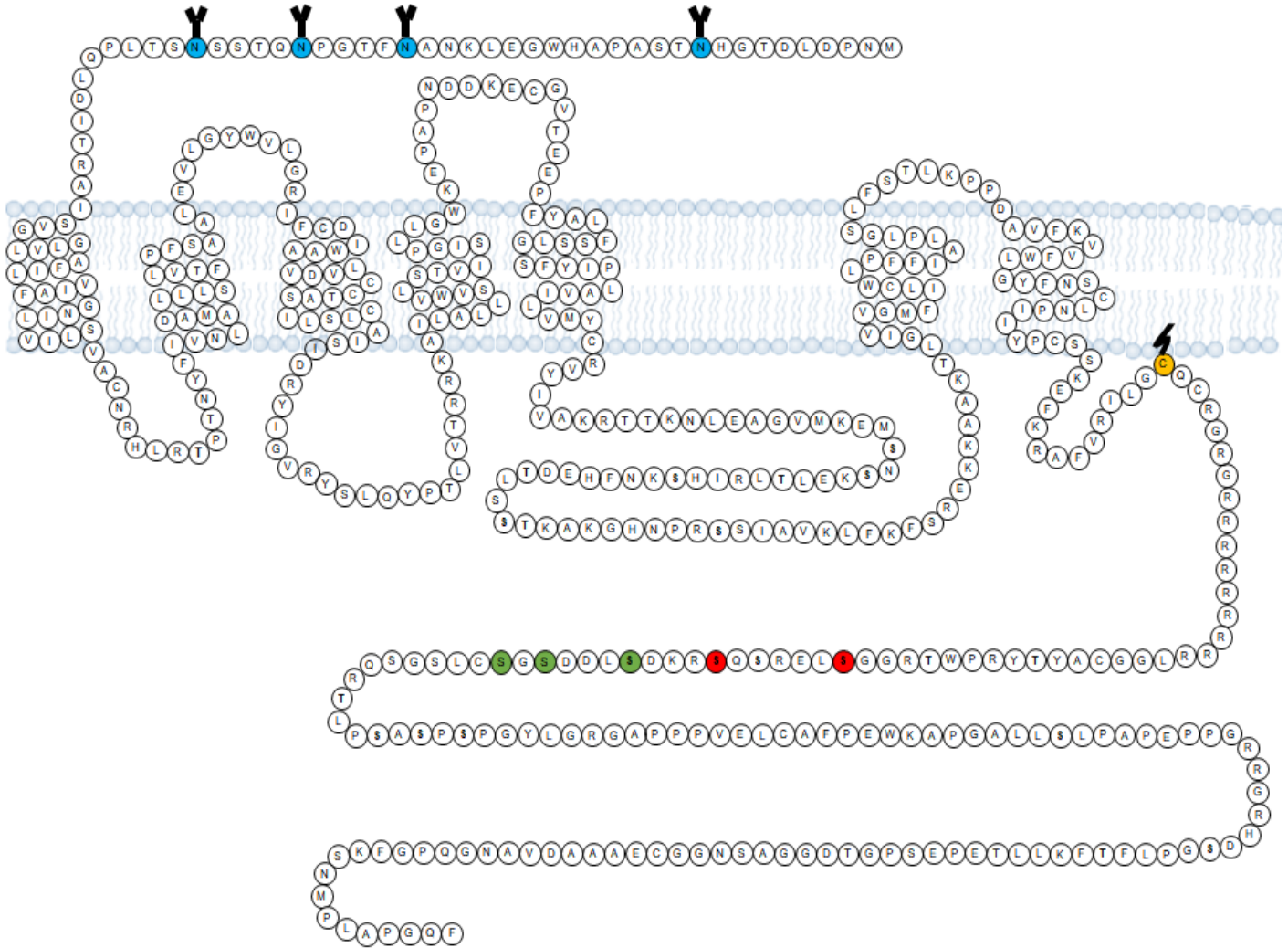


Figura 5. Esquema del receptor α_{1B} -AR adrenérgico humano. Modelo estructural del receptor α_{1B} -AD de humano. El esquema muestra la secuencia de aminoácidos, los sitios de dominios transmembranales, los sitios de glucosilación (•,T), el sitio de lipidación (•,S) y los sitios de fosforilación por PKC (•) y GRK (•).

1.5 Desensibilización de los GPCRs

La desensibilización de los GPCRs es un mecanismo complejo desarrollado por las células para protegerse de una respuesta sostenida por los receptores por su activación con agonistas, y que consiste en la pérdida de la capacidad de respuesta de los receptores a su ligando. Este mecanismo modula la actividad de los GPCRs, ya que la sobreseñalización por parte los receptores por tiempos prolongados pudiesen desembocar en consecuencias fatales para la célula o el organismo. Este proceso ocurre luego del estímulo hormonal y por lo general está asociada a la fosforilación del receptor, catalizada por distintas cinasas, como se mencionó anteriormente (García-Sáinz et al., 1999; Lefkowitz, 1998).

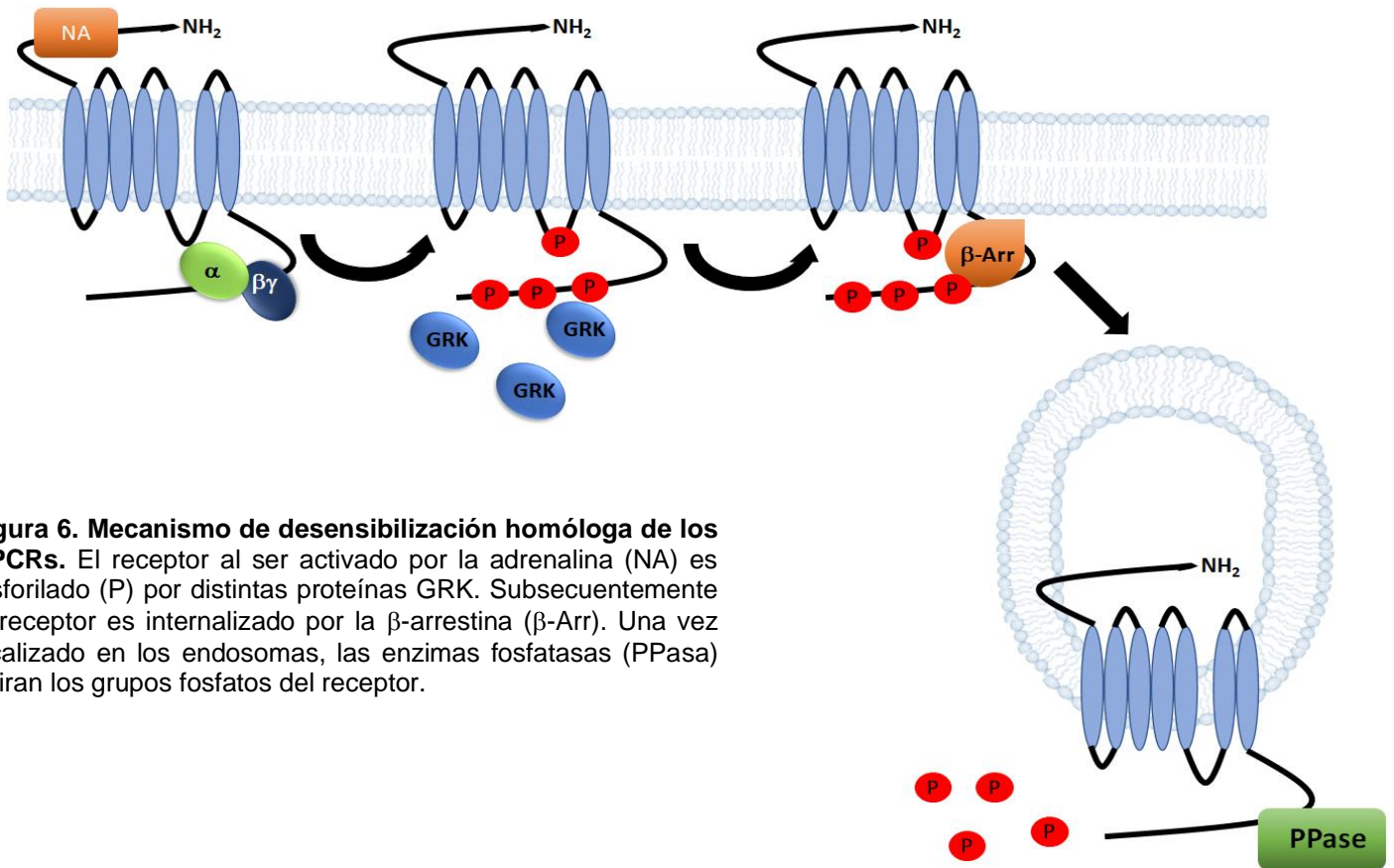


Figura 6. Mecanismo de desensibilización homóloga de los GPCRs. El receptor al ser activado por la adrenalina (NA) es fosforilado (P) por distintas proteínas GRK. Subsecuentemente el receptor es internalizado por la β -arrestina (β -Arr). Una vez localizado en los endosomas, las enzimas fosfatasas (PPase) retiran los grupos fosfatos del receptor.

Hay dos mecanismos generales de desensibilización para los GPCRs, las cuales se denominan: *desensibilización homóloga* y *desensibilización heteróloga*. La desensibilización homóloga involucra la unión del ligando con el receptor, lo que provocara la activación de cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) (Fig. 6).

Por otro lado, la desensibilización heteróloga involucra la fosforilación de los receptores en ausencia de su agonista, pero se produce por la activación de proteínas cinasas dependientes de segundos mensajeros, como la proteína cinasa A (PKA) y la proteína cinasa C (PKC), activadas por la vía de señalización de otros receptores localizados en la membrana celular (Fig. 7) (Vázquez-Prado et al., 2003). En ambos casos, la activación de las distintas cinasas conducirá a la fosforilación de los receptores, promoviendo la asociación entre el receptor y la β -arrestina, provocando la internalización del receptor y de esa manera atenuando su respuesta a agonistas (Fig. 6) (Ferguson et al., 1996). Una vez que se internalizan los receptores, estos se retienen en endosomas a través de su interacción con proteínas Rab, para ser ya sea reciclados a la membrana o dirigirse a lisosomas o al proteosoma para su degradación (Goodman et al., 1996).

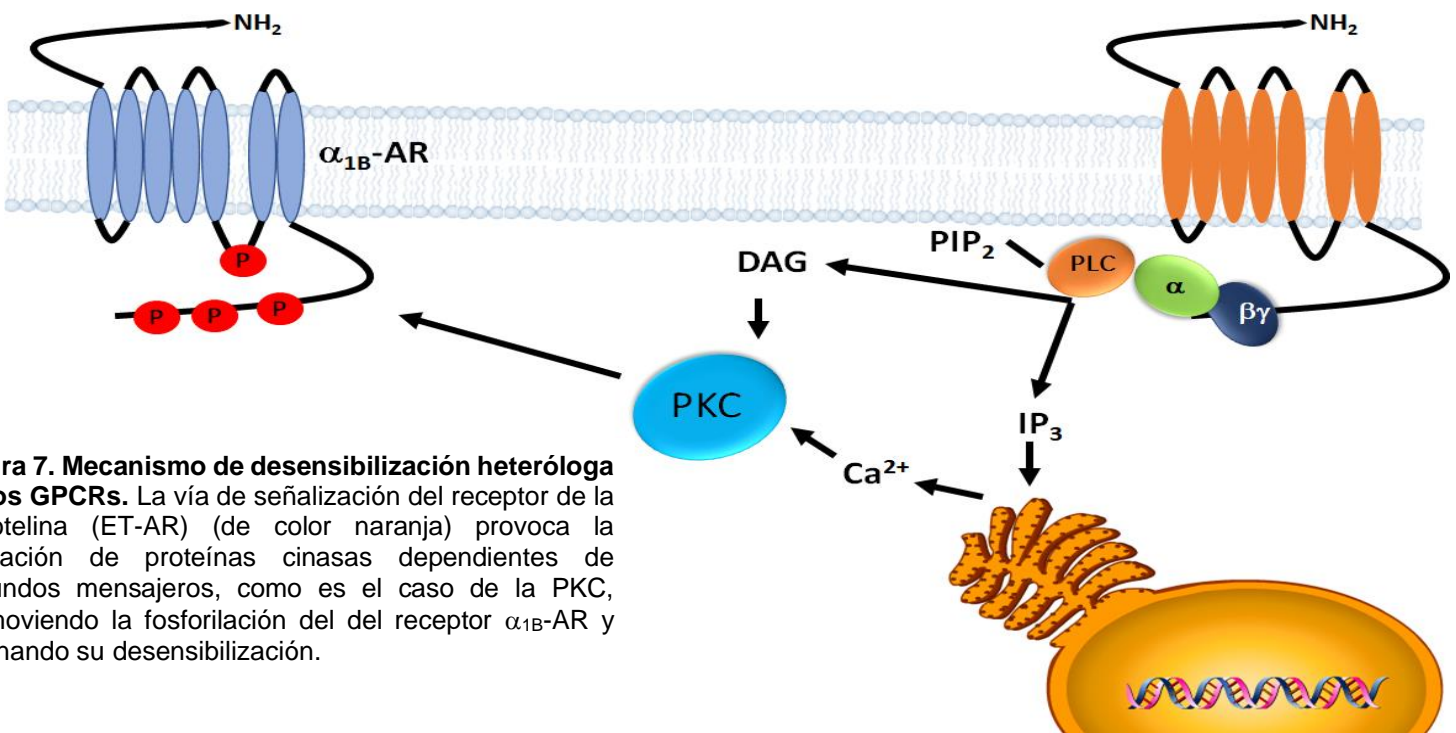


Figura 7. Mecanismo de desensibilización heteróloga de los GPCRs. La vía de señalización del receptor de la endotelina (ET-AR) (de color naranja) provoca la activación de proteínas cinasas dependientes de segundos mensajeros, como es el caso de la PKC, promoviendo la fosforilación del del receptor α_{1B} -AR y originando su desensibilización.

1.6 GTPasas Rab

Las proteínas Rab son una familia de proteínas pertenecientes a la superfamilia de las Ras GTPasa y constituyen el grupo más grande y diverso de las proteínas G monoméricas. A la fecha se han identificado más de 60 tipos diferentes de proteínas Rab. Se ha identificado que estas proteínas juegan un papel importante en el control de la endocitosis, en el tráfico vesicular, la fusión endosomal y la exocitosis (Sönnichsen et al., 2000; Stenmark, 2009; Zerial & McBride, 2001),

Al igual que las otras GTPasas, las proteínas Rab ciclan entre un estado inactivo a un estado activo cuando tienen unido un GDP o un GTP, respectivamente. El estado de unión con el nucleótido se regula por proteínas reguladoras de GTPasa (GAPs), que aceleran la tasa de hidrólisis de GTP a GDP, y por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFS), ya sea por medio de la catálisis del intercambio de GDP por GTP o bloqueando la disociación del GDP.

Una de las características más notables de esta superfamilia de proteínas es que las distintas isoformas de las proteínas Rab se encuentran localizadas en la cara citoplasmática de distintos organelos membranosos (Fig. 8) (Jordens et al., 2005; Zerial & McBride, 2001). La asociación entre las proteínas Rab y la membrana de los organelos se produce debido a la adición de grupos geranilo en la región carboxilo terminal.

Las proteínas Rab regulan la actividad de un gran número de GPCRs, entre los cuales se encuentran a los receptores de angiotensina II, los receptores de bradicinina B2, los receptores de tromboxano A2, los receptores de sensor de calcio, los receptores metabotrópicos del glutamato 1A, los receptores β_1 -adrenérgico, los receptores β_2 -adrenérgico, los receptores α_{2A} y α_{2B} adrenérgico y los receptores α_{1A} - y α_{1B} adrenérgicos (CITAS). En algunos casos se ha demostrado que las proteínas Rab, incluso en su estado inactivo, se encuentran unidas de manera directa a los GPCR, siendo la región carboxilo terminal del receptor la posible región donde se produce esta asociación (G. Wang et al., 2018).

Dentro de la superfamilia de las proteínas Rab, se ha reportado que las proteínas Rab5 y Rab9 son elementos claves al momento de determinar si los GPCRs se asocian con endosomas tempranos para un reciclaje rápido hacia la membrana plasmática o si están dirigidos a endosomas tardíos para un lento reciclaje y/o degradación, respectivamente. La proteína Rab5, la cual se localiza en endosomas tempranos, es un regulador esencial en la endocitosis ya que media la fusión endosomal rápida (Zhu et al., 2004). Por otro lado, la proteína Rab9, que se encuentra en los endosomas tardíos, se encarga de mediar el transporte entre estas vesículas y el aparato de Golgi (Fig. 8) (Choudhury et al., 2005; Kloer et al., 2010; Schwartz et al., 2007).

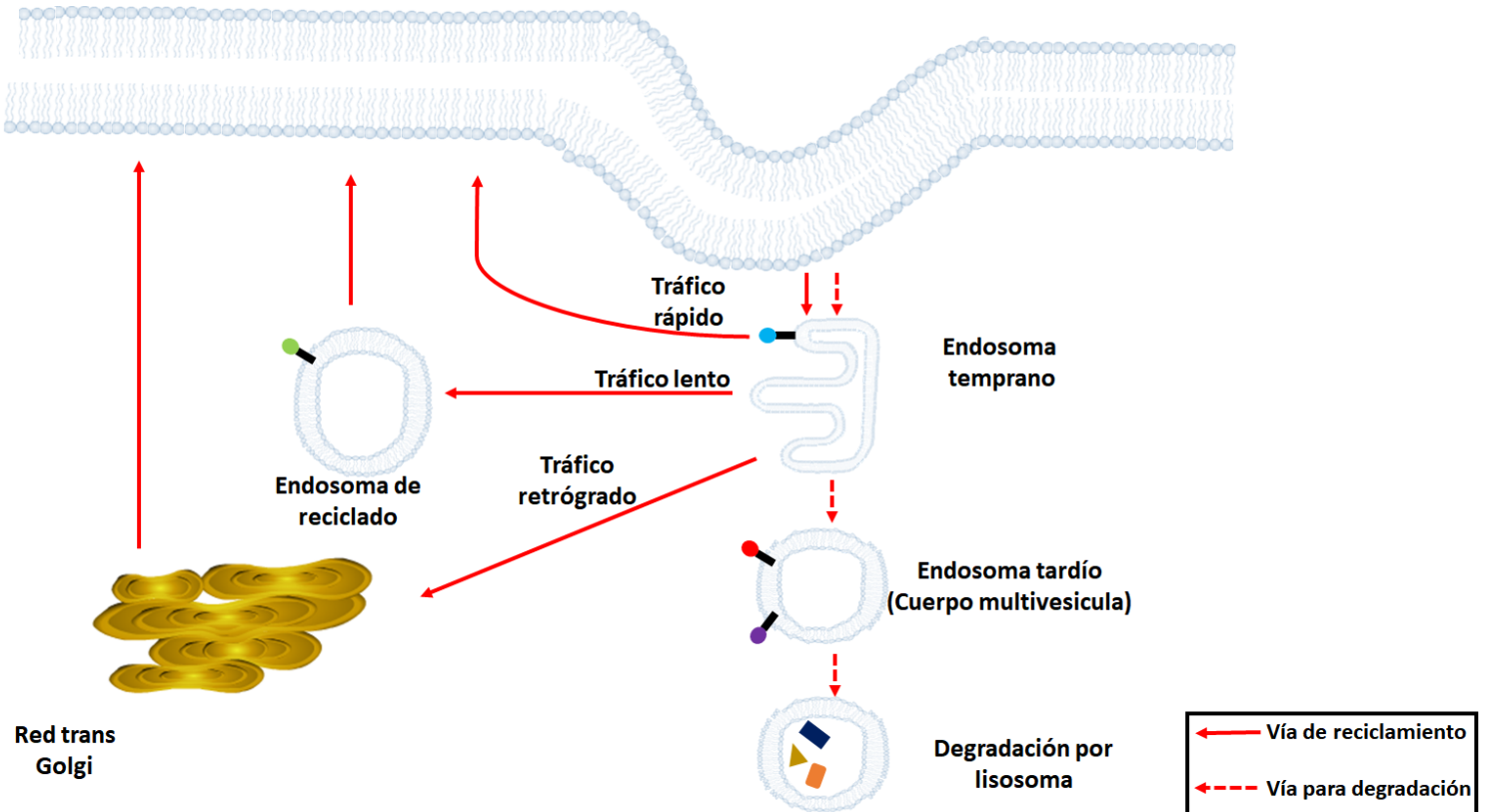


Figura 8. Esquema general del tráfico endocítico y del reciclamiento. Una vez que se produce la internalización las vesículas que transportan moléculas viajan hacia los endosomas tempranos. Una vez que se fusiona la vesícula con el endosoma, la vesícula endocítica libera la molécula, la cual es reconocida para enviarse a los distintos destinos. Los endosomas tempranos tienen dos compartimientos estructural y funcionalmente diferentes. La estructura en forma de dedos forma la red endosomal tubular para la ruta de reciclaje, mientras que el compartimiento donde se encuentra la región vacuolar, es para la ruta de degradación. La ruta de degradación va del endosoma temprano, pasando por el endosoma tardío, hasta llegar al lisosoma. La ruta para el reciclado consta de tres vías: el tráfico retrógrado, el tráfico lento y el tráfico rápido (tomado de Hyeoun McDermott y Kyoungtae Kim., 2015).

2. Justificación

El receptor α_{1B} -AR participa en muchos procesos fisiológicos importantes tales como la respuesta vasoconstrictora del músculo liso, el incremento de la presión sanguínea, el crecimiento del músculo cardíaco, la homeostasis de la glucosa, entre otras; por lo que su estudio es de gran interés (Cotecchia et al., 2002). Distintos grupos de trabajo, incluyendo el nuestro, han descrito que el receptor α_{1B} -AR es una fosfoproteína, cuya fosforilación es mediada por proteínas cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs), así como también por cinasas dependientes de segundos mensajeros como la proteína cinasa C (PKC). La fosforilación de los GPCRs es un evento importante ya que se le considera como uno de los primeros pasos durante la desensibilización e internalización de los receptores cuando estos son activados, ya sea por el agonista natural del receptor (desensibilización homóloga) o por segundos mensajeros activados por otros receptores de membrana (desensibilización heteróloga).

En el laboratorio estamos interesados en conocer los mecanismos que participan en la regulación de la función y el destino de los GPCRs. Aunque nuestro grupo de trabajo ha caracterizado a detalle el proceso de desensibilización del receptor α_{1B} -AR, mediada por su fosforilación por la acción de proteínas cinasas, aún falta por explorar el papel que pudiera tener la fosforilación del receptor en residuos específicos, y sus consecuencias en la señalización y en la desensibilización del receptor. Lo anterior se debe a que a la fecha solo se ha caracterizado la participación de cinco residuos de serina, localizados en la región carboxilo terminal del receptor α_{1B} -AR del ortólogo de hámster, que se fosforilan por GRK2 o por PKC (Diviani et al., 1997). Sin embargo, aún no hay datos sobre el posible papel que pudieran tener estos sitios de fosforilación en la regulación de la señalización del receptor humano.

3. Hipótesis

Las cinco serinas localizadas en la región carboxilo terminal del receptor α_{1B} -AR humano tendrán un papel parecido en la desensibilización y fosforilación del receptor reportada en el ortólogo de hámster.

4. Objetivo general

Estudiar la participación de las cinco serinas ya reportadas en la señalización y desensibilización del receptor α_{1B} -AR humano.

4.1. Objetivos particulares

I) A través de distintas variantes del receptor α_{1B} -AR, cuyos residuos de serinas 396, 402, 406, 410 y 412 sean cambiados por alaninas, caracterizar el receptor en los siguientes niveles funcionales:

- Desensibilización del receptor, estimada por la cuantificación del calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en respuesta a la estimulación.
- Fosforilación del receptor.
- Activación de la vía de MAPK/ERK por la acción de este receptor.
- Tráfico vesicular del receptor, por su asociación con proteínas Rab.

II) Determinar posibles sitios de fosforilación del receptor en su estado basal, así como también durante su respuesta ante su ligando natural (noradrenalina) y a la activación farmacológica de la PKC por el éster de forbol, PMA.

5. Materiales y métodos

5.1. Reactivos

Noradrenalina (-) (NA), propanolol, forbol 12 miristato-13- acetato (PMA), el ácido lisofosfatídico (LPA), bacitracina, inhibidor de tripsina, leupeptina, Hepes, pirofosfato de sodio, fluoruro de sodio, cloruro de magnesio, el ácido Etilén-di-amino-tetra-acético (EDTA), el Fluoruro de Fenil Metil Sulfonilo (PMSF), el Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), Triton X-100, Nonidet P-40, paraformaldehído y otros materiales de uso común se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical. Se compró el [32P]Pi (8500– 9120 Ci/mmol) en Perkin-Elmer Life Sciences. El medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), el antibiótico G418, el suero fetal bovino, la tripsina, la lipofectamina 2000, la anfotericina B, la estreptomycin, la penicilina, la doxiciclina, la higromicina B, la blasticidina, el Fura2-AM se obtuvieron de Invitrogen-Life Technologies. La proteína A agarosa y el luminol se obtuvieron de Merck-Millipore. Los kits de extracción de plásmidos de Invitrogene. El GenJet se adquirió de SignaGen Laboratories. Los plásmidos pEGFP-N1, pDsRed-N1 monomero-N1 se obtuvieron de Clontech. Las membranas de nitrocelulosa se obtuvieron de BioRad. La polietilenimina se obtuvo de Polyscience. El anticuerpo monoclonal anti-GFP fue obtenido de Clontech (número de catálogo 632381, lote A5033481), mientras que el anticuerpo policlonal anti-GFP se generó en nuestro laboratorio (Avenidaño-Vázquez et al., 2005). El anticuerpo anti-fosfo-ERK1/2 (Thre202/Tyr204) (número de catálogo 9101S, lote 30) y anti-ERK1/2 total (p42/44) (número de catálogo 4695S, lote 21) se compraron de Cell Signaling Technology. La tetrametil-rodamina conjugada AffiniPure ratón anti-conejo IgG (código 715-025-150) se obtuvo de Jackson Immunology. Los anticuerpos secundarios fueron obtenidos de Jackson Immunology-Research y Zymed (Thermo Fisher Scientific).

5.2. Plásmidos

El cDNA que codifica al receptor α_{1B} -AR de humano se subclonó en el plásmido pEGFP-N1 para obtener la construcción p α_{1B} H-EGFP-N1. Esta construcción luego se subclonó en el plásmido pCDNA5/FRT/TO para generar la

construcción $p_{\alpha_{1B}h}$ -EGFP-N1-TREx (Flp-In T-rex expression system, Invitrogen). Esta construcción fue utilizada como un templado para mutar y generar las siguientes construcciones: $p_{\alpha_{1B}h}$ -EGFP-N1-TREx S396/402A (PKC-m), $p_{\alpha_{1B}h}$ -EGFP-N1-TREx S406/410/412A (GRK-m) y $p_{\alpha_{1B}h}$ -EGFP-N1-TREx S396/402/406/410/412A (PKC+GRK-m). Todas estas construcciones se elaboraron comercialmente por Mutagenex, Inc. La inserción adecuada, así como las mutaciones, fueron confirmadas por secuenciación (Mutagenex, Inc).

El cDNA que codifica al receptor α_{1B} -AR de humano también se subclonó en el plásmido DsRed-Monomero-N1 para obtener la construcción $p_{\alpha_{1B}h}$ -DsRed-Monomero-N1. Esta construcción se utilizó posteriormente como un templado para mutar y generar la construcción $p_{\alpha_{1B}h}$ -DsRed-Monomero-N1 S S406/410/412A (GRK-m-DsRed). Se elaboró (comercialmente) la construcción del receptor mutado por Mutagenex, Inc. y las mutaciones se confirmaron por secuenciación (Mutagenex, Inc).

El plásmido para la expresión de la dominante negativa de la GRK2 fue generosamente donado por el Dr. Jeffrey Benovic (Thomas Jefferson University) (Kong et al., 1994). Por otro lado, los plásmidos para la expresión de ambas variantes de Rab5 (silvestre y dominante negativa) fueron generosamente donadas por el Dr. Robert Lodge (Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montreal, Canada) (Hunyady et al., 2002).

5.3. Cultivo celular

Las líneas celulares HEK293 (células embrionarias de riñón humano) se obtuvieron de la American Type Culture Collection. Las células se crecieron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, estreptomicina 100 μ g/ml, penicilina 100 U/ml y anfotericina B 0.25 μ g/ml. Los cultivos celulares se dejaron crecer en una incubadora en una atmósfera de CO₂ al 5 % y una temperatura de 37°C (Nuair CF autoflow). En todos los experimentos en que se usó NA, se utilizó 10 μ M de propranolol, para evitar la activación de

receptores endógenos β -adrenérgicos; el antagonista no presento efectos por sí mismo en los parámetros estudiados.

5.4. Generación de líneas celulares estables: sistema inducible Flp-In TREx

Las variantes de los receptores α_{1B} -AR silvestre, PKC-m (S396/402A), GRK-m (S406/410/412A) y PKC+GRK-m (S396/402/406/410/412A), fusionados con la GFP en su extremo carboxilo terminal, se transfectaron en una línea celular parentales HEK293 Flp-In T-REx.

Las células parentales HEK293 Flp-In T-REx se transfectaron con el plásmido pcDNA5/FRT/TO, el cual contiene el cDNA que codifica a las distintas variantes del receptor α_{1B} -AR mencionadas previamente, y con el plásmido pOG44, en una relación $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ de 6:1 con GenJet (SignaGen Laboratories), en medio Optimem sin suero y sin antibióticos. Después de dejar a las células incubándose con la mezcla por 24 horas, se reemplazó el medio Optimem fcon DMEM suplementado con blasticidina (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Después de 48 horas post transfección, las células se sembraron en placas de 6 pozos a una confluencia menor al 25%. Después de 72 horas post transfección el medio se reemplazó con DMEM con blasticidina (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e higromicina B (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Alfonzo-Méndez et al., 2018; Ward, et al., 2011; Sánchez-Reyes et al., 2014). Las células se mantuvieron en el medio de selección hasta la aparición de colonias aisladas y resistentes a los antibióticos. Se seleccionaron y crecieron distintas colonias celulares, las cuales se indujeron durante 14-18 horas con doxiciclina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para evaluar la expresión del reportero GFP mediante microcopia confocal. Se seleccionaron las clonas con buena expresión (fluorescencia) y respuesta a la NA (calcio intracelular). Se procuró que la expresión fuera similar en todas las líneas seleccionadas.

5.5. Transfección transitoria

El receptor $\alpha 1B$ -AR silvestre (WT) o mutado en sus sitios de fosforilación por GRK2 (GRK-m), unidos a la proteína DsRed, y las dos variantes de la proteína Rab5, unida a la GFP, se transfectaron en células HEK293 silvestres. Las células se transfectaron con 2 μ g de cada uno de los plásmidos usando polietilenimina (PEI) en medio Optimem sin suero y sin antibióticos. Las células se incubaron por 4 horas con la mezcla anterior y una vez transcurrido el tiempo el medio se reemplazó por DMEM suplementado con suero y antibiótico. Los experimentos realizados con estas células fueron llevados a cabo 48-72 horas después de la transfección.

5.6. Determinación de la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$

Para evaluar la concentración de Ca^{2+} intracelular se utilizaron células HEK293, que expresaban de manera estable a las distintas variables del receptor $\alpha 1B$ -AR. Antes de realizar los experimentos, las células se ayunaron durante toda la noche en medio DMEM libre de suero y antibiótico. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS (solución amortiguadora de fosfatos) pH 7.3 y se cargaron con el fluoróforo Fura-2/AM (2.5 μ M) en solución Krebs-HEPES-albumina, pH 7.4 (Hepes 20 mM, NaCl 120 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, $MgSO_4$ 1.2 mM, KCl 4.75 mM, albúmina 0.05%, glucosa 10 mM $CaCl_2$ 1.3 mM), durante 1 hora a 37 °C. Las células marcadas se lavaron con PBS para eliminar el exceso de Fura-2/AM y se despegaron mediante una incubación con versenato de sodio durante 5 minutos. Una vez despegadas, las células se resuspendieron suavemente y centrifugaron a 3,000 g durante 3 minutos. El sobrenadante se desechó y las células se lavaron 3 veces con solución Krebs-HEPES-albumina. Finalmente, las células se resuspendieron en 5 mL de solución Krebs-HEPES-albúmina.

Las mediciones de $[Ca^{2+}]_i$ se hicieron en un espectrofluorómetro AMINCO-Bowman serie-2 (Rochester, NY, USA), que detecta la fluorescencia con excitaciones a longitudes de onda de 340 y 380 nm y una de emisión de 510 nm del Fura-2/AM. Finalmente la concentración de Ca^{2+} intracelular se calculó usando el

software AB2 luminescence spectrometer, que calcula la fluorescencia máxima y mínima de acuerdo con la ecuación de Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985).

5.7. Ensayo de Western blot

Las células se sembraron en placas de seis pozos y se siguió un curso temporal de estimulación con NA (10 μ M) durante 2, 5, 30 y 60 min. Una vez finalizado los estímulos las células se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron con 300 μ L de amortiguador Leammli 1X (Tris 0.5 M, SDS al 10%, glicerol, β -mercaptoetanol) durante 1 hora. Los lisados se recuperaron y se calentaron a 96°C durante 5 minutos, posteriormente se centrifugaron a 12,700 g durante 5 min. Las muestras se corrieron en un gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. Las proteínas separadas mediante electroforesis se electro transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semiseca durante 60 minutos. Posteriormente la membrana se bloqueó con leche libre de grasas al 5% en TBS-Tween (NaCl 136 mM y Tris 19.8 mM, Tween 0.1% a pH 7.6) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave. Los anticuerpos primarios se diluyeron en TBS-Tween al 0.1% con albumina al 0.1% para pERK1/2 (1:1000) y al 5% para ERK1/2 total (1:5000), y se incubaron toda la noche a 4 °C. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora. El revelado de la membrana se hizo mediante quimioluminiscencia utilizando un kit comercial (SuperSignal West Pico Chemiluminescent, Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante. La señal obtenida se cuantificó por análisis densitométrico utilizando el software ImageJ.

5.8. Inmunoprecipitación y marcaje metabólico – fosforilación

La determinación de la fosforilación del receptor se llevó a cabo con base en lo reportado anteriormente por el laboratorio (GARCÍA-SÁINZ et al., 2001; Vázquez-Prado et al., 1997). Las células se resembraron en cajas de 6 pozos y se incubaron con 50 μ Ci/ml [³²P]Pi en medio DEMEM (Dulbecco's Modified Eagle's, por sus singlas

en inglés) sin suero y sin fosfatos durante tres horas a 37°C. Las células marcadas se estimularon ya sea con NA (10 µM) o con forbol miristato acetato (PMA) (1 µM). La reacción se detuvo lavando las células dos veces con PBS frío y posteriormente las células se lisaron en frío durante 1 hora con buffer de lisis con inhibidores de proteasas (PMSF, bacitracina, inhibidor de tripsina, leupeptina) y de fosfatasas (p-tirosina, p-treonina, p-serina, β-glicerofosfato, NaF, Na₄P₂O₇, Na₄V₂O₇). Los lisados se recuperaron y centrifugaron a 12,700 g por 15 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se inmunoprecipitó utilizando 5 µl de antisuero de conejo anti GFP y 25 µl de la proteína A agarosa; toda la noche a 4°C en agitación constante. Las muestras se centrifugaron y se lavaron 5 veces con buffer de lavado (Hepes, NaHPO₄, NaF, Tritón 10%, SDS 1%). Se agregó a cada muestra 100 µl de urea 8M/SDS 10% y buffer de Laemmli 2X (Laemmli, 1970), se desnaturalizaron y se pusieron en baño María a ebullición durante 10 minutos. Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes. Los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y fueron expuestos en placas para autorradiografía en el sistema PhosphorImager y se visualizaron mediante el Typhoon PhosphorImager y el programa ImageQuant.

5.9. Análisis *in silico* del α_{1B}-adrenérgico

Para identificar sitios probables de fosforilación en el receptor y las cinasas responsables se introdujo la secuencia primaria del ortólogo humano (Uniport, P35368) en el software GPS 2.0 (Group-based Prediction System) y en el servidor NetPhos 3.0. Para predecir y formar la estructura 3D de los receptores se utilizó el programa SwissModel y la manipulación de la estructura del receptor se realizó con el programa PyMol. El alineamiento de las secuencias del receptor humano con el ortólogo de hámster se llevó a cabo con la herramienta BLAST de NCBI.

5.10. Análisis de sitios de fosforilación del receptor α_{1B} -AR por espectrometría de masas (MS).

Se realizó una inmunoprecipitación masiva del receptor α_{1B} -AR silvestre fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) con ayuda de un antisuero anti-GFP (generados en el laboratorio) acoplados a perlas de proteína A agarosa. Se corroboró la identidad de la proteína purificada al correr la muestra en geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomasie y mediante Western blot con un anticuerpo monoclonal anti-GFP (Clonetech). La banda correspondiente al peso molecular esperado se cortó y se analizó en la Unidad de Espectrometría de Masas de la Universidad de Harvard. Los experimentos de purificación y espectrometría de masas se realizaron por triplicado.

5.11. Microscopia confocal

Preparación de células

Las células HEK293 que expresaban de manera transitoria al receptor unida a la proteína rojo fluorescente (DsRed) y a la proteína Rab5 unida a la proteína verde fluorescente (GFP) se sembraron en baja confluencia en cajas de fondo de vidrio de 35 mm y se incubaron por 24 horas. Luego realizar el estímulo, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% por 20 minutos y posteriormente se lavaron con PBS para eliminar el cualquier exceso de paraformaldehído.

Se tomaron las imágenes con un microscopio confocal Fluoview FV10i de Olympus con un objetivo 60x de inmersión en aceite. La proteína GFP se excitó a 480 nm y la fluorescencia emitida se detectó entre 515–540 nm; la proteína roja fluorescente DsRed se excitó a 557 nm y la fluorescencia emitida se detectó a 592 nm.

Transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET)

Para estudiar el tráfico vesicular del receptor y su asociación con la proteína Rab5, las células se transfectaron transitoriamente con el receptor α_{1B} -AR silvestre o mutado unido a la proteína roja fluorescente, DsRed, y con el de la proteína Rab5 silvestre unida a la proteína verde fluorescente, GFP. Estas células se sembraron en cajas de fondo de vidrio de 35 mm y se dejaron crecer durante 48 horas. Una vez pasado el tiempo, las células se estimularon con NA (10 μ M). Después del estímulo, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% al menos durante 20 minutos y posteriormente se lavaron con PBS para eliminar el cualquier exceso de paraformaldehído.

Las imágenes se tomaron en un microscopio confocal Fluoview FV10i de Olympus con un objetivo 60x de inmersión en aceite. La proteína GFP se excitó a 480 nm y la fluorescencia emitida se detectó entre 515–540 nm; la proteína roja fluorescente DsRed se excitó a 557 nm y la fluorescencia emitida se detectó a 592nm.

5.12. Análisis estadístico

Cuando se normalizaron los datos, se utilizó el promedio de referencia de cada experimento individual (es decir, el valor del 100%, resultante de los datos de tres a cuatro experimentos) para calcular todos los datos. Se utilizó una prueba de ANOVA y la comparación múltiple de Bonferroni para el análisis entre grupos, considerando $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Se utilizó el software Graph Prism 8 para Windows.

6. Resultados

Parte I: Papel de los cinco sitios de fosforilación en la función, señalización y desensibilización del receptor α_{1B} -AR

6.1. Diseño de las variantes del receptor

Con base a lo reportado por Diviani et al en el 1997 (Diviani et al., 1997), el receptor α_{1B} -AR presenta en su extremo carboxilo terminal cinco residuos de serinas que se fosforilan por dos diferentes cinasas, dos por la proteína cinasa C (PKC) y tres por la proteína cinasa de GPCRs 2 (GRK2). Cabe mencionar que en este trabajo de 1997 la caracterización de los sitios se realizó en el ortólogo de hámster, sin embargo, al realizar el análisis de secuenciación e identidad de la proteína respecto a la del humano, encontramos que esta última varía muy poco respecto a la del hámster. De hecho, el porcentaje de identidad de la secuencia del receptor entre ambas especies es de 94.6%, y los cinco residuos reportados en el ortólogo de hámster se encuentran conservados en el humano y otras especies (Fig. 9).

Ctail

```
ADA1B_HUMAN  GG[1]LERSQ[2]ERKDE[3]LDD[4]GG[5]CLSGSQ
ADA1B_RAT    GG[1]LERSQ[2]ERKDE[3]LDD[4]GG[5]CMSGTQ
ADA1B_MOUSE  GG[1]LERSQ[2]ERKDE[3]LDD[4]GG[5]CMSGSQ
ADA1B_MESAU  GG[1]LERSQ[2]ERKDE[3]LDD[4]GG[5]CMSGSQ
F1MGA6_BOVIN GG[1]LERSQ[2]ERKDE[3]LDD[4]GG[5]CLSGSQ
```

Figura 9. Presencia de las cinco serinas reportadas que se fosforilan en el receptor α_{1B} -AR de hámster en distintas especies. Alineamiento de secuencias correspondientes a la región carboxilo terminal (Ctail) del receptor α_{1B} -AR (ortólogo de humano, rata, ratón, hámster y vaca). Se señalan las serinas identificadas en el receptor de α_{1B} -AR de hámster.

Mediante mutagénesis de sitio dirigida se construyeron las variantes que se esquematizan en la Figura 9: 1) α_{1B} -AR Silvestre, que no presenta ningún cambio; 2) la PKC-m, que presenta las sustituciones en S396/402A; 3) GRK-m que presenta las mutaciones S406/410/412A; y 4) la PKC+GR-m que presenta las mutaciones S396/402/406/410/412A. Los residuos de serina se cambiaron por residuos de alanina para evitar la fosforilación en dichos sitios. La expresión de las distintas variantes del receptor se corroboró por microscopia confocal (Fig. 10).

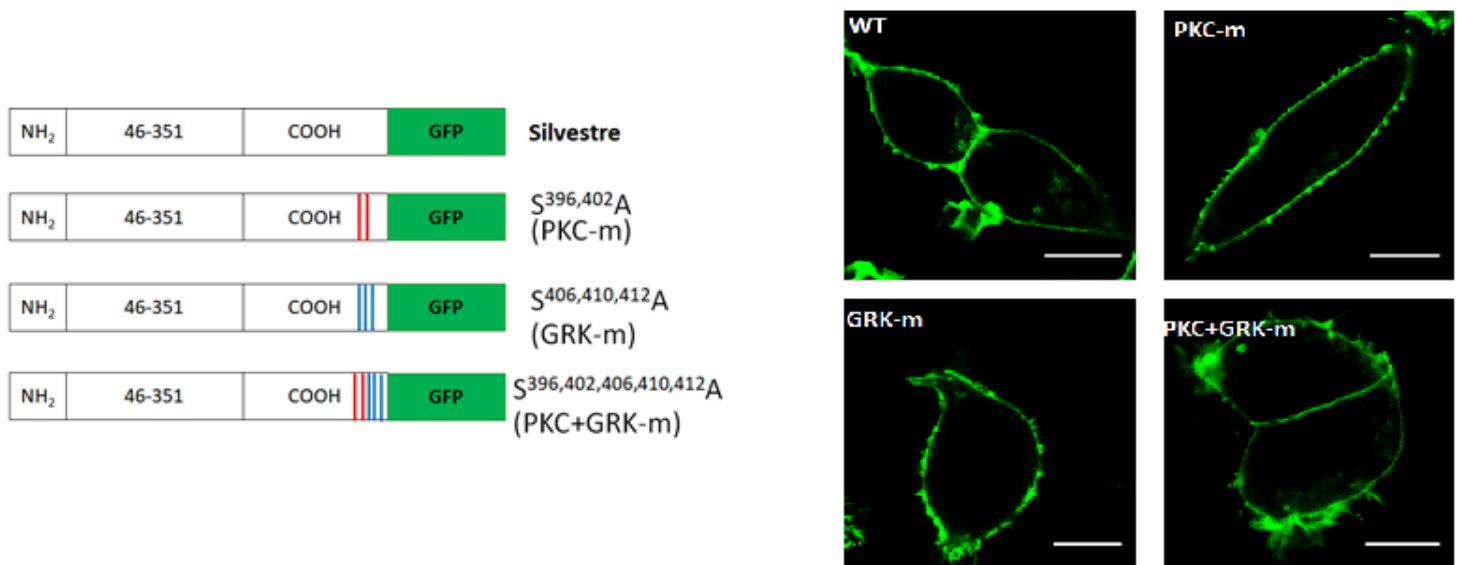


Figura 10. Representación esquemática e imágenes de microscopio de las construcciones α_{1B} -GFP-N1-TREx utilizadas Silvestre, receptor silvestre usado como control; las sustituciones para cada mutante se están indicadas y el nombre para cada variante se encuentra entre paréntesis. Las imágenes de microscopio demuestran la expresión de los receptores en la membrana en condiciones basales.

6.2. Movilización de calcio intracelular en la por las distintas variantes del receptor α_{1B} -AR.

Primero, evaluamos la repercusión funcional de las distintas variantes en la activación de la vía de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} . Para esto, estimulamos las células que expresan ya sea al receptor silvestre, PKC-m, GRK-m o PKC+GRK-m con su ligando natural, noradrenalina (NA), y posteriormente evaluamos la liberación del Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). En todos los experimentos las células se pretrataron con propranolol (10 μM) para bloquear el efecto que pudieran tener los receptores β_2 -AR que se expresan de manera endógena en las células HEK243. Las células que expresan al receptor silvestre o a cualquiera de las variantes aumentaron los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de una manera dependiente a la concentración de NA (Fig. 10A). La eficacia en la respuesta en las distintas variantes del receptor fue similar (es decir, se observó un aumento en el calcio intracelular de ~ 150-200 nM), excepto para la doble mutante (PKC+GRK-m) la cual mostró una respuesta menor a NA. Los picos de respuesta de calcio fueron similares entre el receptor silvestre y las distintas variantes (Fig. 11, paneles B y C). Sin embargo, el regreso

al estado basal fue considerablemente más lento en las variables con los sitios de GRK2 (GRK-m y PKC+GRK-m) cambiados, lo que dio como resultado valores residuales de $[Ca^{2+}]_i$ significativamente más alto (determinados a los 100 segundos después del estímulo por el agonista) (Fig. 11, paneles B y C). Estos datos son consistentes con la idea de que los receptores con las serinas modificadas presentan una menor desensibilización que el silvestre.

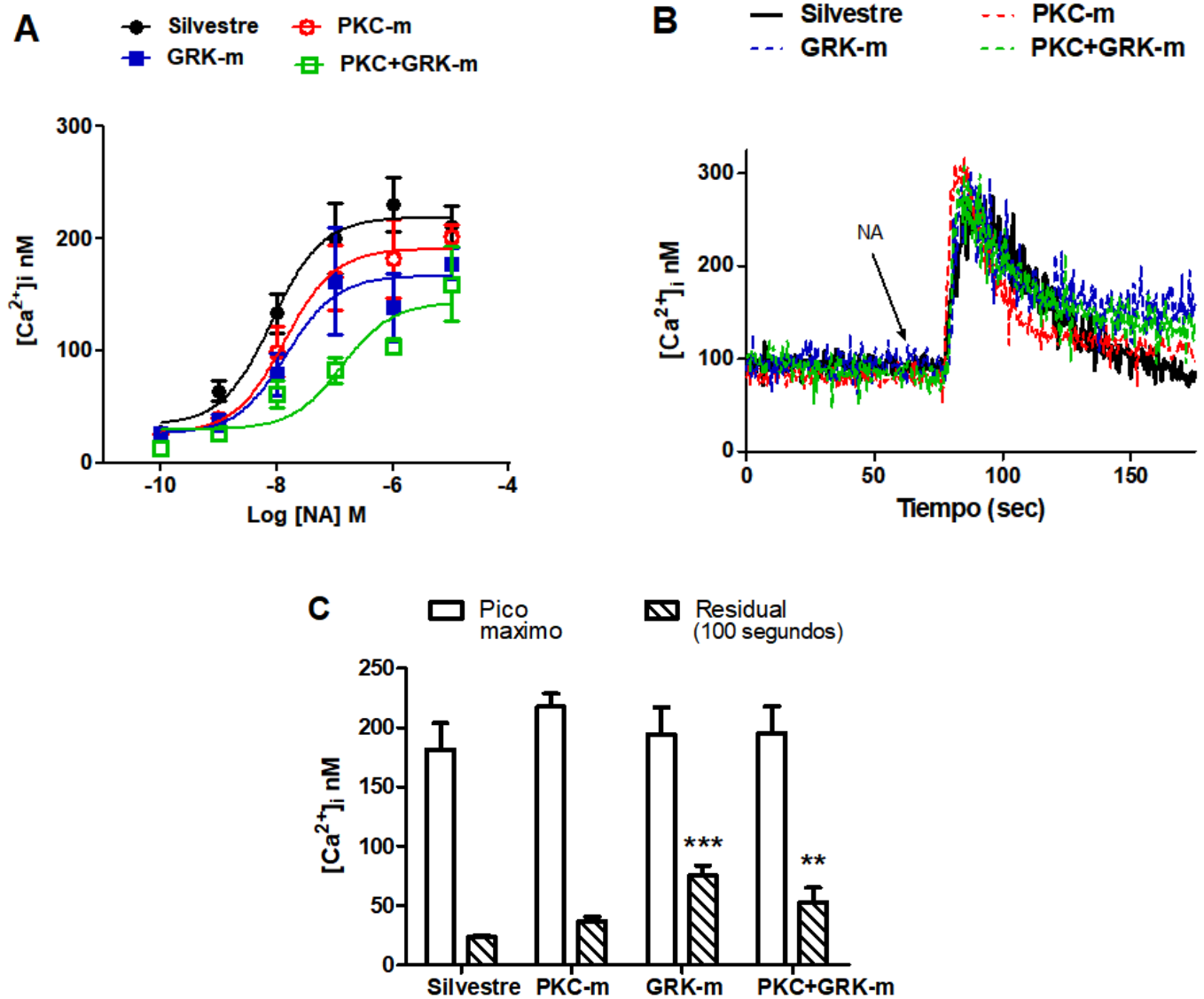


Figura 11. Respuesta de calcio inducida por NA en células que expresan las distintas variantes del α_{1B} -AR. **Panel A.** Las células que expresan las diferentes construcciones de α_{1B} -AR-GFP se estimularon con distintas concentraciones de NA (en presencia de propranolol) y se cuantificó los niveles de calcio intracelular. El receptor silvestre y las distintas variantes y las sustituciones indicadas entre paréntesis: (S396,402A), PKC-m; (S406,410,412A), GRK-m; y (S396,402,406,410,412A), PKC-GRK-m. Los puntos son los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M) de 7-9 experimentos usando diferentes preparaciones celulares (donde no se muestra una barra de error, está dentro del símbolo). **Panel B.** Trazos representativos de la liberación de calcio utilizando las diferentes variantes. **Panel C.** Las barras indican el aumento máximo (barras blancas) y el aumento restante sobre la línea basal después de 100 segundos del estímulo con NA (barras con líneas). Las gráficas representan los promedios mientras que las líneas verticales son el error estándar (S.E.M) de 7-9 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. ****p < 0.001 vs. Residual silvestre; ** p < 0.005 vs. Residual silvestre.

6.3. Participación de los cinco residuos de serina en la desensibilización heteróloga del receptor α_{1B} -AR.

Se probó la capacidad de PKC activada farmacológicamente con PMA, en la desensibilización de las distintas variantes del receptor. La activación de PKC provocó una disminución (~ 50 %) en los niveles de calcio intracelular después de estimular con NA y al preincubar a las células durante 5,10 y 15 minutos con PMA (1 mM) en células que expresaban al receptor silvestre (Fig. 12, panel A). Se observó un efecto en el receptor cuyos sitios de fosforilación por PKC habían sido mutado (PKC-m), pero el efecto del PMA disminuyó de manera dependiente del tiempo (Fig. 12, panel B). Curiosamente, las células que expresaban al receptor mutados en los sitios de fosforilación por GRK2 (GRK-m y PKC+GRK-m) no se vieron afectadas significativamente por el tratamiento con PMA (Fig. 12, panel C y D). Lo anterior pudiera sugerir un posible efecto sinérgico de los sitios de fosforilación.

Los intentos de estudiar la desensibilización homóloga no tuvieron éxito debido al hecho de que la acción de la NA atenuó la respuesta general de las células incluso después de realizar lavados exhaustivos (es decir, la respuesta, no solo de calcio sino también de otros agentes no relacionados como el ácido lisofosfatídico, fue notablemente atenuada o ausente). Esto podría implicar el agotamiento de las reservas de calcio.

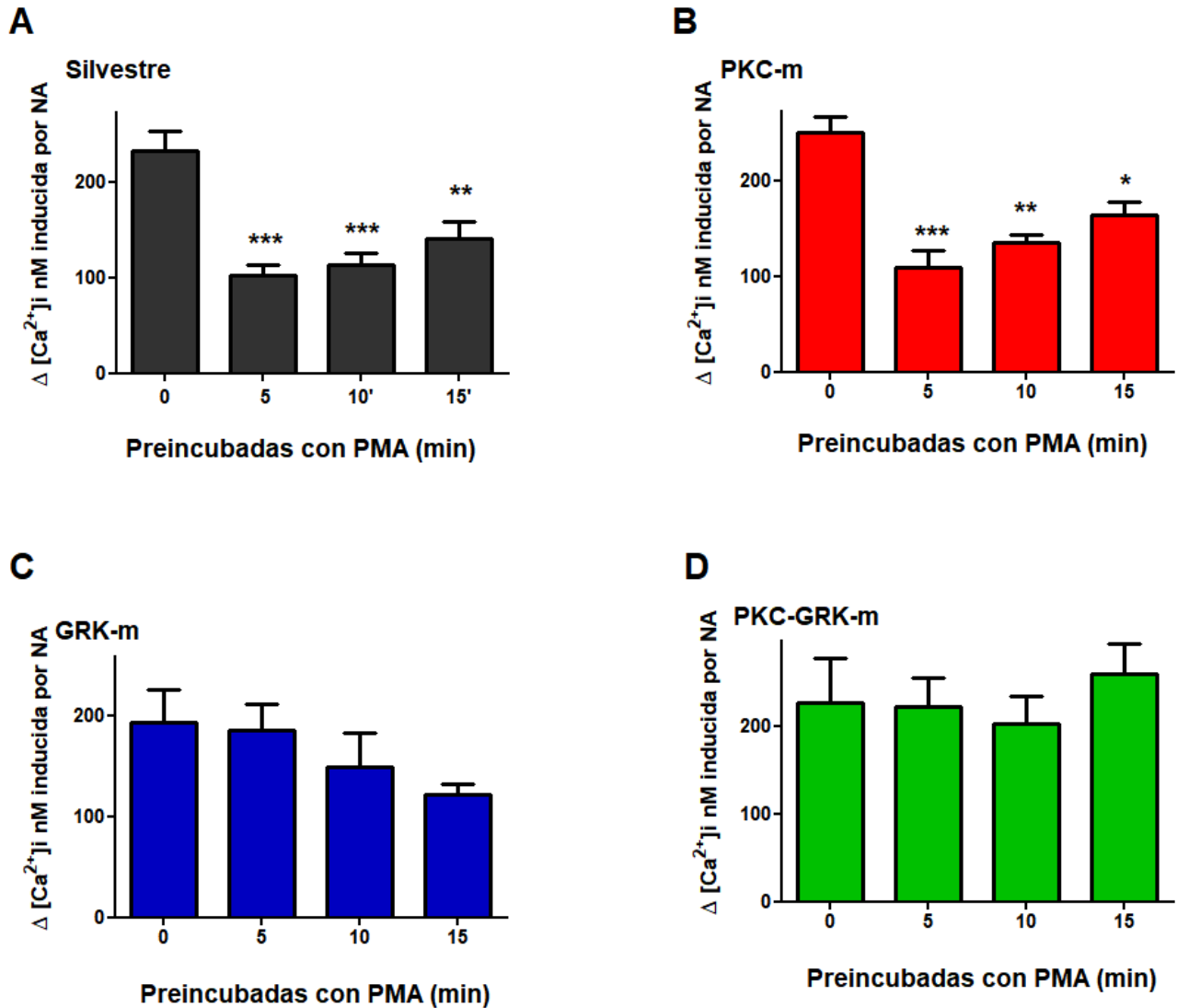


Figura 12. Efecto del PMA sobre la respuesta de calcio inducida por NA en células que expresan las distintas variantes del α_{1B} -AR. Las células se preincubaron con PMA (1 μ M) durante 0, 5, 10 y 15 minutos y luego se estimularon con NA (10 μ M) (más propanolol). Las gráficas representan los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M) de 6-7 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. *** $p < 0.001$ vs. tiempo 0; ** $p < 0.005$ vs. tiempo 0; * $p < 0.05$ vs. tiempo 0. Panel A son las células que expresan al receptor silvestre, panel B las que expresan la variante PKC-m, panel C las que expresan la variante GRK-m y panel D las que expresan la doble variante.

6.4. El cambio de serina por alanina en los residuos de fosforilación del receptor α_{1B} -AR tienen distinta cinética de fosforilación.

Se realizó la caracterización de la cinética de fosforilación de las distintas variantes del receptor α_{1B} -AR cuando las células se estimularon, ya sea, con NA o

con el PMA. Se observó que todos los receptores α_{1B} -AR (silvestre y las distintas variantes) mostraron fosforilación en condiciones basales y que esta fosforilación aumentó en respuesta a la NA (Fig. 13) y al PMA (Fig. 14).

En las células que expresaron al receptor silvestre, el estímulo con NA produjo un incremento rápido en la fosforilación (2-5 minutos) del receptor. Sin embargo, esta fosforilación se vio disminuida a tiempos más largos (15-60 minutos). Las distintas variantes del receptor también mostraron un incremento rápido en la fosforilación del receptor en respuesta a la NA y el efecto a tiempos largos fue similar al de la silvestre (Fig. 13).

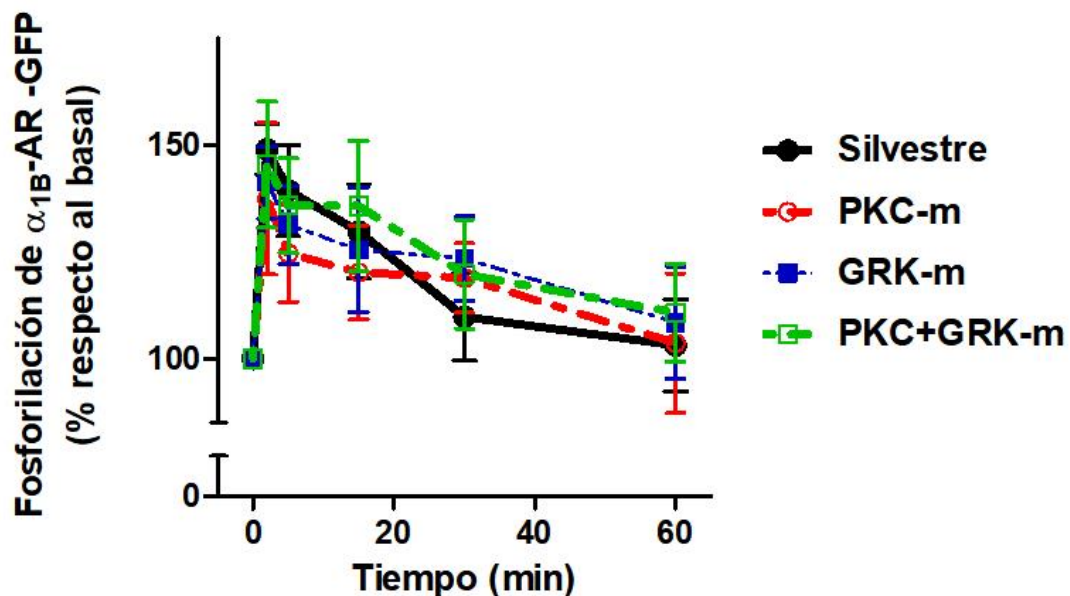
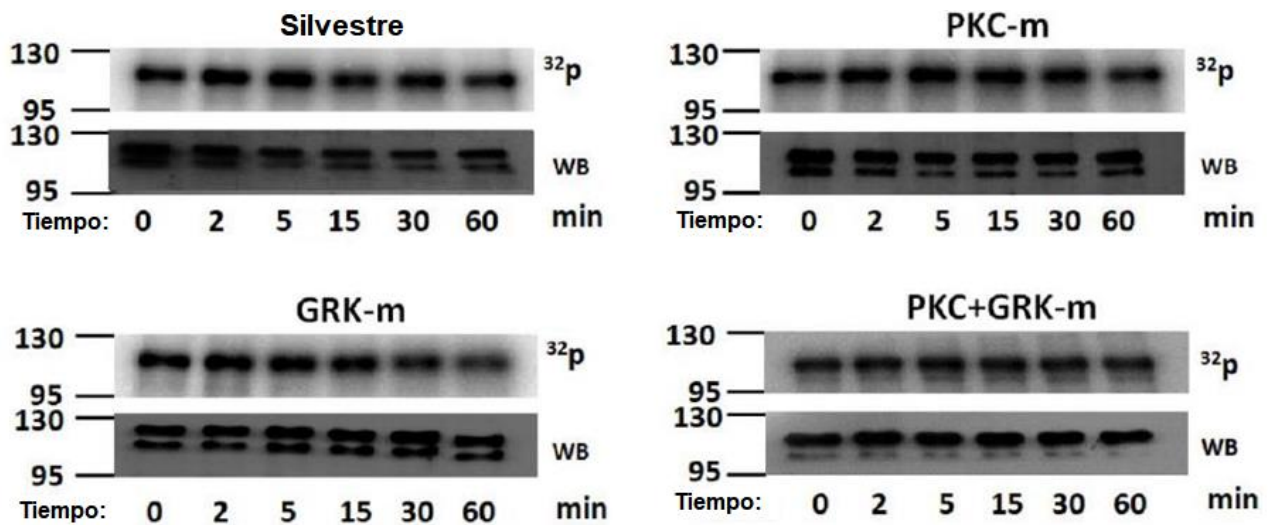


Figura 13. Cursos temporales de fosforilación de las variantes del receptor α_{1B} -AR en respuesta a NA. Las células que expresan las distintas variantes del receptor α_{1B} -AR se estimularon con NA (10 μ M) durante 2, 5, 15, 30 y 60 min. Las respuestas se normalizaron respecto al basal (tiempo cero) considerado como el 100%. Se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de por lo menos 6-9 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. Sobre la gráfica, se muestran las autorradiografías representativas (32 P) y los Western blots (WB).

En presencia de PMA el receptor incrementó su fosforilación a los 2 y 5 min de ser estimulado, pero a diferencia con la NA, el receptor se mantuvo fosforilado hasta los 30 min, disminuyendo la fosforilación significativamente a los 60 min (Fig. 14).

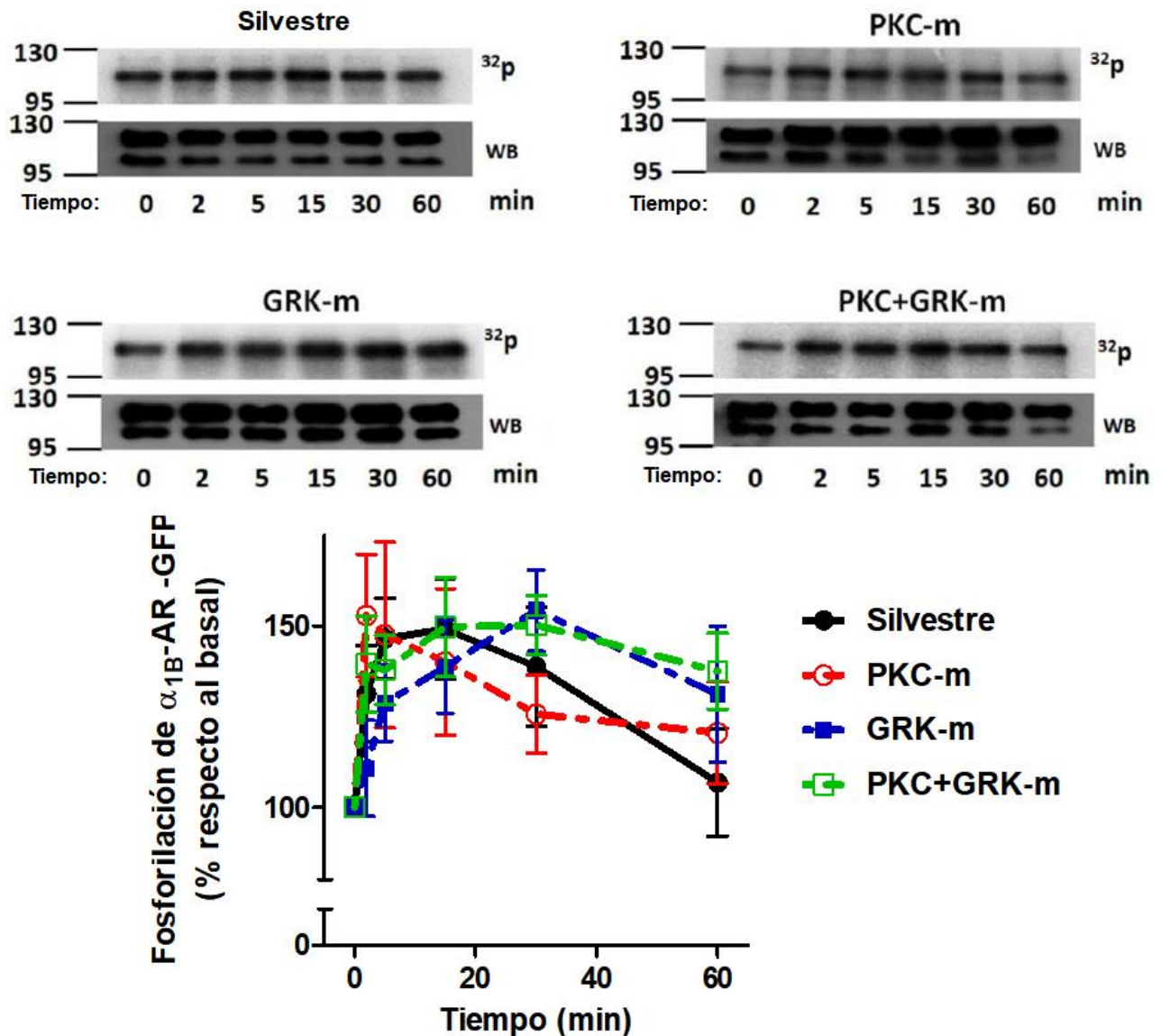


Figura 14. Cursos temporales de fosforilación de las variantes del receptor α_{1B} -AR en respuesta a PMA. Las células que expresaron las distintas variantes del receptor α_{1B} -AR se estimularon con PMA (1 mM) durante 2, 5, 15, 30 y 60 min. Las respuestas se normalizaron respecto al basal (tiempo cero) considerado como el 100%. Se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de por lo menos 6-9 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. Sobre la gráfica, se muestran las autorradiografías representativas (^{32}P) y los Western blots (WB).

En todos los casos, los inmunoprecipitados sometidos a Western blot presentaron dos bandas, una en la región de ~110 kD y otra en la región de ~100 kD. La mayor fosforilación se detectó en la banda de mayor peso molecular. Por otro lado, la banda de menor peso molecular podría representar el receptor que no se encuentra glicosilado o está parcialmente degradado. No se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó el receptor de tipo silvestre y las diferentes variantes (Fig. 13 y Fig.14).

Para obtener una vista general de este fenómeno y debido a que los experimentos anteriores se normalizaron y compararon con la fosforilación basal para cada uno de los receptores, las células que expresaron los distintos tipos de receptores se cultivaron y estimularon de manera simultánea, y las muestras se procesaron usando el mismo gel. El análisis se realizó comparando las distintas variantes usando al receptor silvestre como referencia (Fig. 15). Estos experimentos mostraron que la fosforilación de las distintas variantes del receptor disminuyó, ya sea en condiciones basales o cuando las células se estimularon con NA y PMA, al ser comparadas con el receptor silvestre. Se debe enfatizar que la fosforilación del receptor PKC+GRK-m disminuyó notablemente en comparación con el silvestre, y que los efectos de la NA y el PMA también se disminuyeron y solo fueron marginalmente estadísticamente significativos.

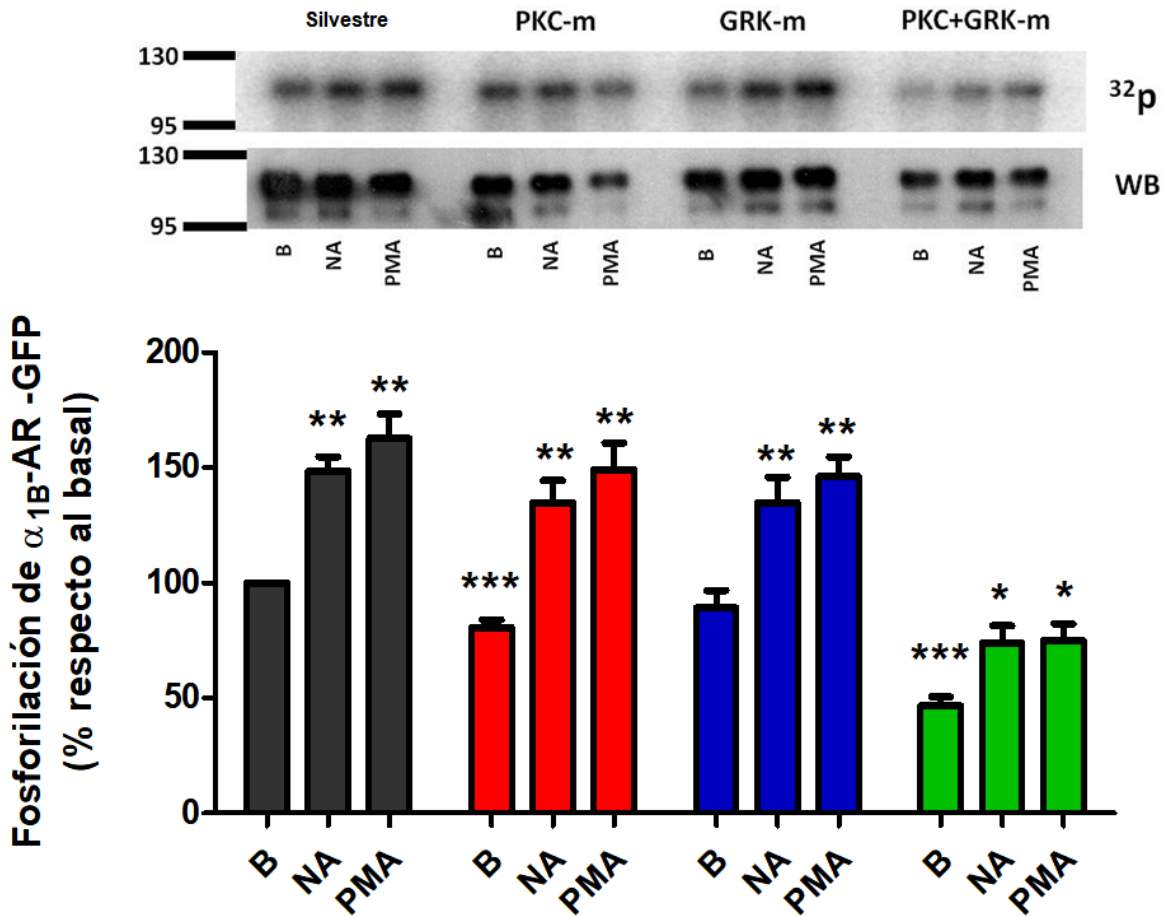


Figura 15. Fosforilaciones comparativas entre los distintos tipos de receptor α_{1B} -AR. Las células se trataron ya sea sin ningún agente (B, basal), NA 10 μ M por 2 minutos o PMA 1 mM por 15 minutos y se determinó la fosforilación del receptor. Las respuestas se normalizaron respecto al basal (tiempo cero) del receptor silvestre. Se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de por lo menos 6-9 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. ***p < 0.001 vs. basal (B) del Silvestre; **p < 0.001 vs. su respectivo basal (B); *p < 0.05 vs su respectivo basal (B).

6.5. La fosforilación del receptor α_{1B} -AR en los cinco residuos de serina regulan la vía de ERK.

Otra de las cascadas de señalización activadas por el receptor α_{1B} -AR es la vía de las cinasas activada por mitógenos (MAPK/ERK), por lo que también se analizó el efecto que pudieran tener las variantes del receptor en esta vía. Las células que expresaron las distintas variantes del receptor se estimularon con NA en un curso temporal de 2, 5, 15, 30 y 60 min, y se determinó la fosforilación de ERK1/2 como parámetro indicativo de su activación (Fig. 16). Observamos que las células que

expresan al receptor α_{1B} -AR silvestre mostraron un rápido incremento en la fosforilación de ERK1/2 (es decir, el máximo de fosforilación se registró a los 2 minutos) que disminuyó progresivamente después de 15, 30 y 60 minutos de incubación con el agonista. Curiosamente, la respuesta inicial de las células que expresaban a las distintas variantes del receptor fue idéntica a la respuesta obtenida en las células que expresaban al receptor silvestre. Sin embargo, la fosforilación de ERK1/2 disminuyó a un ritmo mucho más lento en las distintas variantes en comparación con la silvestre. Estos datos son consistentes con la idea de que las diferentes variantes reducen la inactivación del receptor.

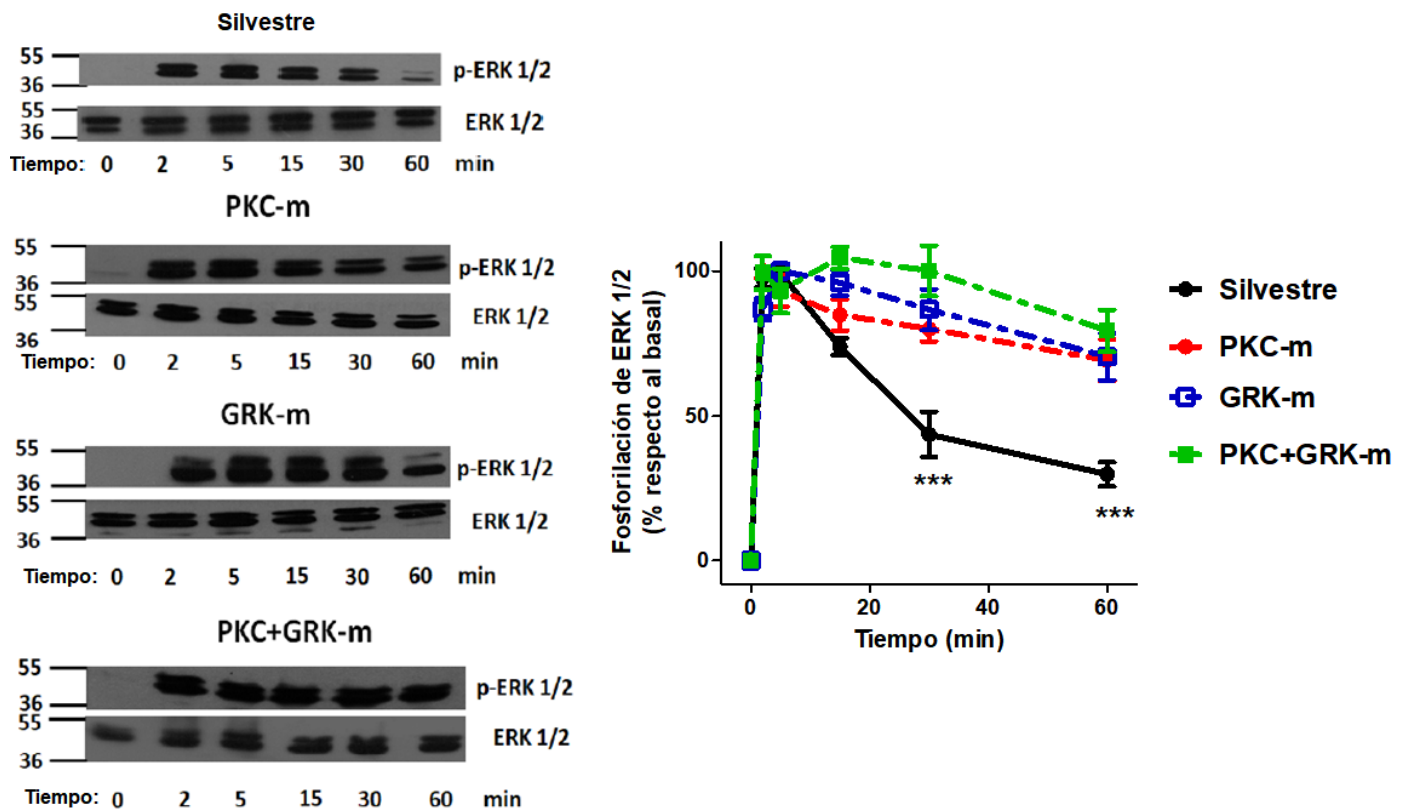


Figura 16. Efecto de la NA sobre la fosforilación de ERK1/2. Las células que expresaron las distintas variantes del receptor α_{1B} -AR se estimularon con NA 10 μ M por 2, 5, 15, 30 y 60 minutos. La fosforilación de ERK se detectó mediante Western blot. Sobre la gráfica se muestra los Inmunoblots representativos de la fosforilación de ERK (p-ERK). La grafica muestra el análisis densitométrico de la activación de ERK en células que expresaban al receptor α_{1B} -AR silvestre (círculos llenos, línea negra), PKC-m (círculos abiertos), GRK-m (cuadros llenos) y PKC+GRK-m (círculos abiertos). Se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M.) de 6-8 experimentos usando diferentes preparaciones celulares. ***p < 0.001 vs. las distintas variantes.

6.6. Participación de los sitios de fosforilación de GRK2 en el tráfico vesicular del receptor α_{1B} -AR.

Previamente nosotros habíamos reportado que la interacción entre el receptor y las proteínas Rab es dependiente de la fosforilación del receptor, ya que al inhibir su fosforilación por la PKC, se bloqueaba la asociación del receptor con la proteína Rab9 durante la desensibilización heteróloga. Por lo tanto, el receptor se asocia a diferentes tipos de proteínas Rab dependiendo de cuales de sus sitios se están fosforilando. De hecho, en el mismo trabajo encontramos que la variante PKC-m se asociaba menos con la Rab9, y por lo tanto se desensibilizaba menos, en comparación con el receptor silvestre (Alfonzo-Méndez et al., 2017).

A través de ensayos de FRET (Förster resonance energy transfer) en células que expresaban de manera transitoria al receptor α_{1B} -AR unido a la proteína rojo fluorescente (DsRed) y a la proteína Rab5 unida a la proteína verde fluorescente (GFP), se determinó el papel que tiene la cinasa GRK2 en la desensibilización del receptor mediada por Rab5. Para lograr esto se inhibió la función de la GRK2 de dos formas distintas: 1) inhibiendo la cinasa con paroxetina (antidepresivo), un inhibidor que muestra alta especificidad y afinidad para esta proteína cinasa; y 2) transfectando las células con una dominante negativa de esta cinasa. Lo que observamos fue que la interacción entre el receptor α_{1B} -AR y la Rab5 se veía inhibida cuando se bloqueaba la fosforilación del receptor por la cinasa GRK2 por el tratamiento con paroxetina (Fig. 17, panel A) y así como también cuando las células expresaban a la dominante negativa de GRK2 (Fig. 17, panel B). Se corroboró el efecto de ambas condiciones en la fosforilación del receptor α_{1B} -AR (Anexo III).

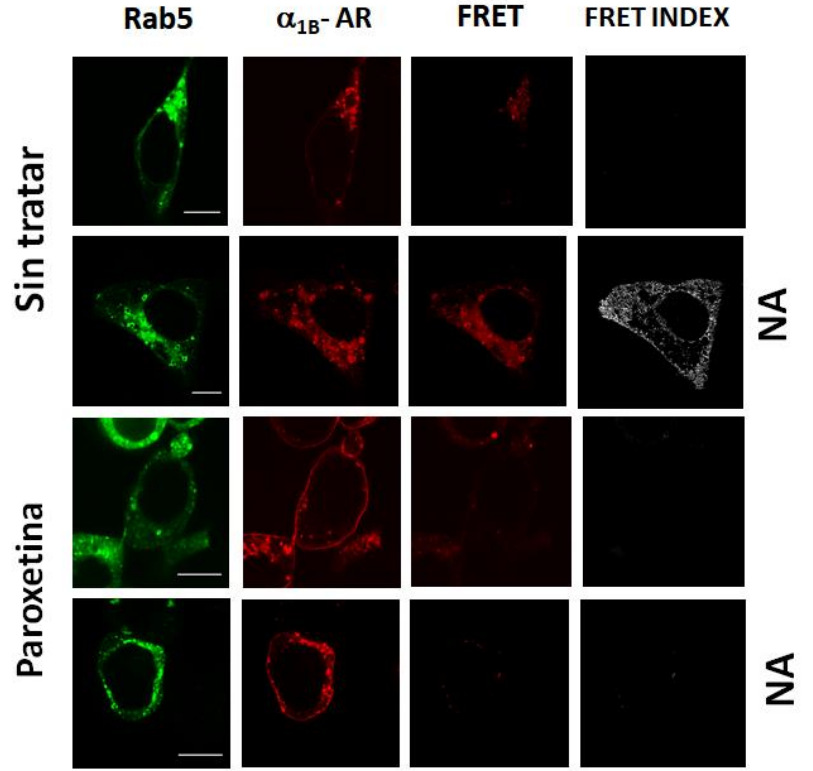
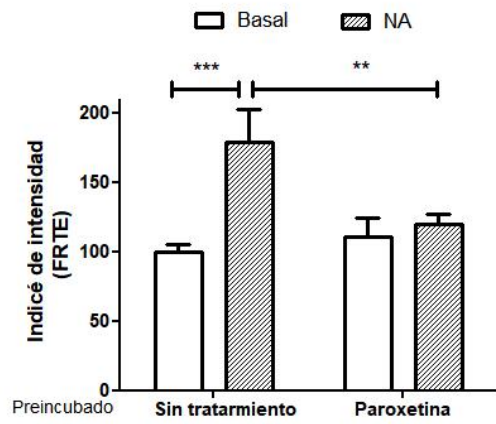
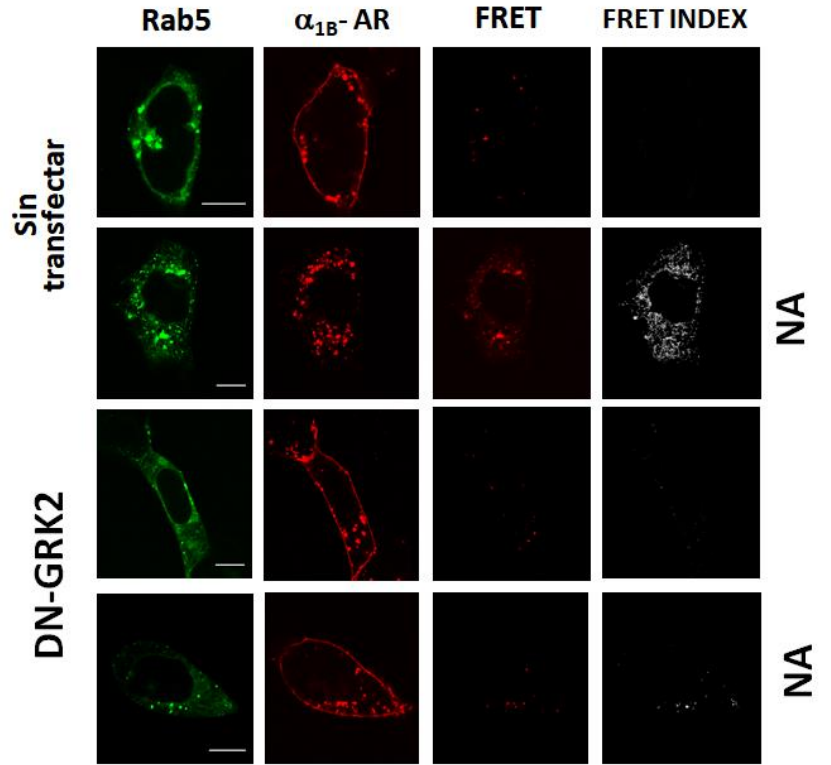
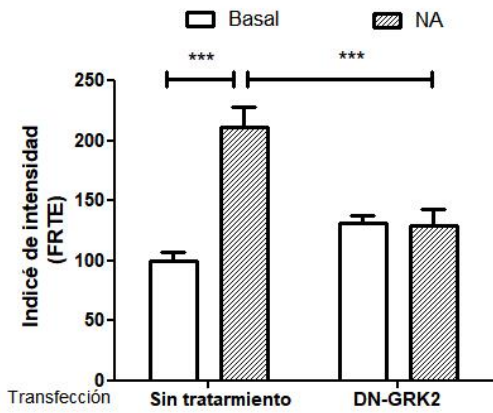
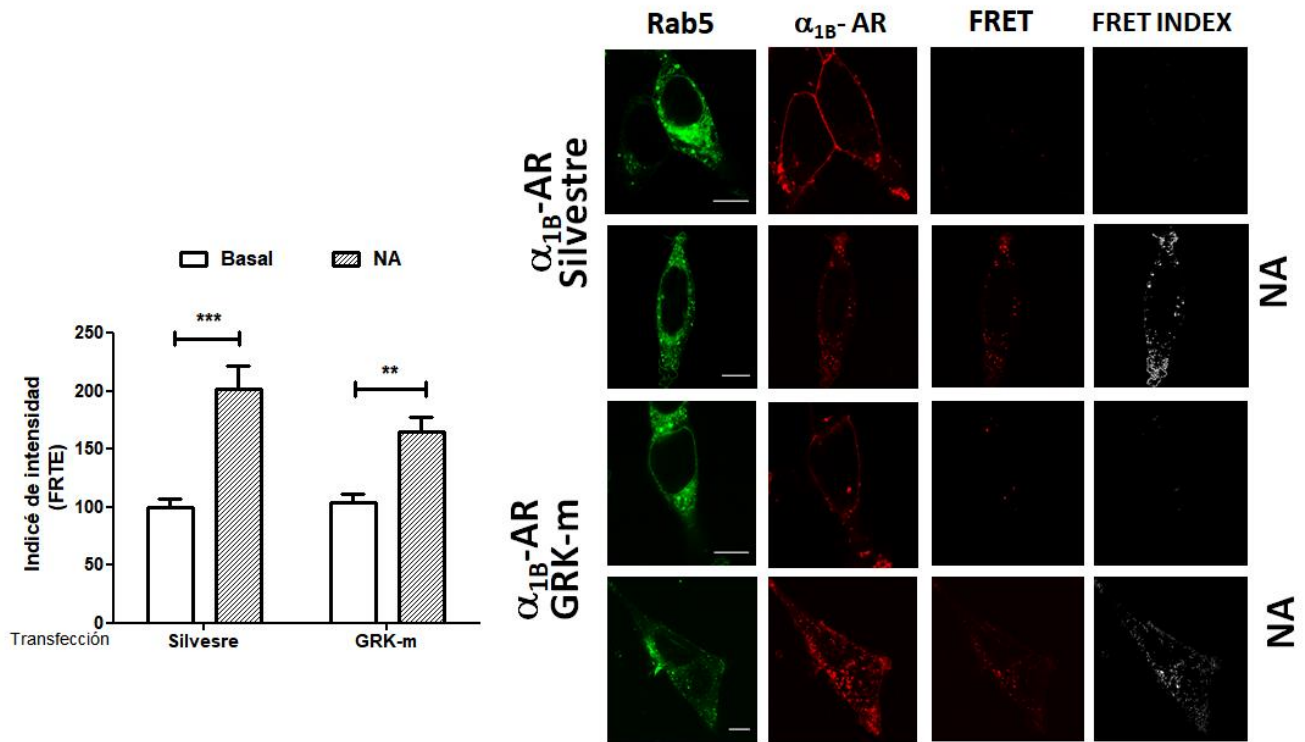
A**B**

Figura 17. Papel de la proteína GRK2 en la interacción del receptor α_{1B} -AR y la Rab5. Panel A. Las células que expresaban al receptor α_{1B} -AR unido a la DsRed y a la proteína Rab5 unida a la GFP se preincubaron 30 minutos sin ninguna agente o con 100 μ M de paroxetina. Después de la incubación con el inhibidor las células se estimularon sin ningún agente (basal) o con 10 μ M de NA por 15 minutos. **Panel B.** Las células que expresaban al receptor α_{1B} -AR unido a la DsRed, a la proteína Rab5 unida a la GFP y a la dominante negativa de GRK2 se estimularon sin ningún agente (basal) o con 10 μ M de NA por 15 minutos. Las gráficas representan los promedios mientras que las líneas verticales son el error estándar (S.E.M) de 18-20 imágenes para cada condición usando diferentes preparaciones celulares. *** $p < 0.001$; y ** $p < 0.01$. Imágenes representativas de: a) la primera columna: la fluorescencia de la GFP (Rab5); b) la segunda columna: la fluorescencia del DsRed (α_{1B} -AR); c) tercera columna: el FRET (la GFP permanece excitada, mientras la DsRed se mantiene apagada, registrándose solo la fluorescencia de la DsRed); y d) la cuarta columna: el FRET index (imágenes analizadas para FRET y colocalización).

Para determinar el papel que tienen las tres serinas identificadas que son fosforiladas por GRK2 en la interacción del receptor con la Rab5, se utilizaron células que expresaban a la variante del receptor α_{1B} -AR que tiene sustituidas las tres serinas fosforiladas por GRK2 por alaninas (S406/410/412A) (GRK-m) y a la Rab5 unida a la GFP. Observamos que cuando las células se estimulaban con NA se producía una disminución en la interacción entre ambas proteínas cuando se compara con la interacción con el receptor silvestre (Fig. 18). Estos datos sugieren que la fosforilación en los sitios S406, S410 y S412 participa en la asociación y en el tráfico vesicular del receptor mediada por la proteína Rab5, pero que hay otros sitios que regulan dicho proceso.

Figura 18. Interacción entre el receptor y Rab5 en células expresando al receptor α_{1B} -AR silvestre o al receptor α_{1B} -AR mutado en S406,410,412A. Las células que expresaban tanto al receptor α_{1B} -AR unido a la DsRed (silvestre o mutado) y a la proteína Rab5 unida a la GFP se estimularon sin ningún agente (basal) o con 10 μ M de NA por 15 minutos. Las células se fijaron y se observaron por microscopia confocal. En el panel A se presentan los valores de FRET normalizados al 100% respecto al basal. Las gráficas representan los promedios mientras que las líneas verticales son el error estándar (S.E.M) de 18-20 imágenes para cada condición usando diferentes preparaciones celulares. *** $p < 0.001$; y ** $p < 0.01$.



La localización subcelular del receptor cambió claramente cuando las células se trataron por 15 minutos con la NA; es decir, los receptores que se encontraban en la membrana celular disminuyeron notablemente y se observó una acumulación de la fluorescencia en vesículas (Fig. 18, primera columna). Sin embargo, cuando las células se preincubaron con la paroxetina o se transfectaron con la dominante negativa de GRK2, la fluorescencia del receptor permaneció en la membrana plasmática después del tratamiento con la NA (Fig. 19, segunda columna y tercera columna, respectivamente). Estos datos mostraron que la fosforilación del receptor por la GRK2 es importante para que se produzca la internalización del receptor α_{1B} -AR durante la desensibilización homóloga a través de su interacción con la proteína Rab5. Por ello se estudió el papel de los sitios de fosforilación por GRK2 en la internalización del receptor usando la variante GRK-m del receptor y transfectando con la proteína Rab5-WT. El receptor mutado se internalizó de igual manera que el silvestre en respuesta a la NA (Fig. 19, cuarta columna).

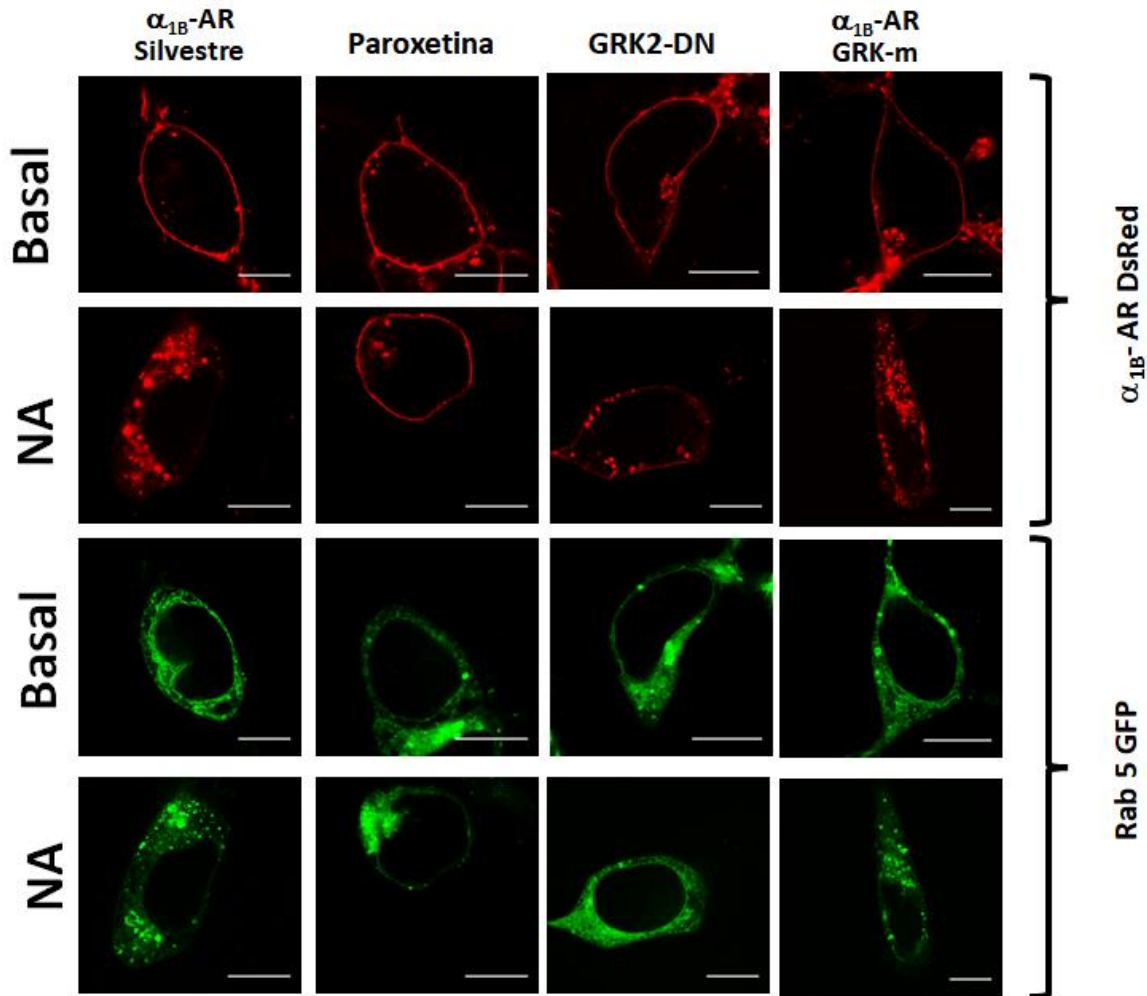


Figura 19. Internalización del receptor α_{1B} -AR. Imágenes representativas (canal DsRed) de las células expresando el receptor α_{1B} -AR silvestre (primeras tres columnas) y el receptor α_{1B} -AR mutado (S406A, S410A y S412A) (cuarta columna); las células además expresaron la proteína Rab5-silvestre unida a la GFP. Las células se incubaron con Paroxetina I (primera columna) o fueron transfectadas con la dominante negativa de GRK2 (GRK2-DN). Las células se estimularon por 15 minutos con NA (más propanolol); escala de barra 10 μ m.

Los niveles de fluorescencia intracelular fue un indicador de la internalización del receptor y su cuantificación se presenta en la Figura 19. En las células que expresaban al receptor α_{1B} -AR silvestre y a la proteína Rab5-silvestre, la NA incrementó casi dos veces la fluorescencia intracelular. Cuando las células se preincubaron con paroxetina, o eran transfectadas con la dominante negativa de GRK2, los niveles de la fluorescencia intracelular permanecían en niveles basales cuando se trataron con NA (Fig. 20, panel A y

panel B, respectivamente). Por otro lado, cuando las células expresaban a la variante GRK-m y a la proteína Rab5-silvestre, los niveles de fluorescencia intracelular incrementaron de manera similar a la silvestre cuando las células se trataron con NA (Fig. 20, panel C).

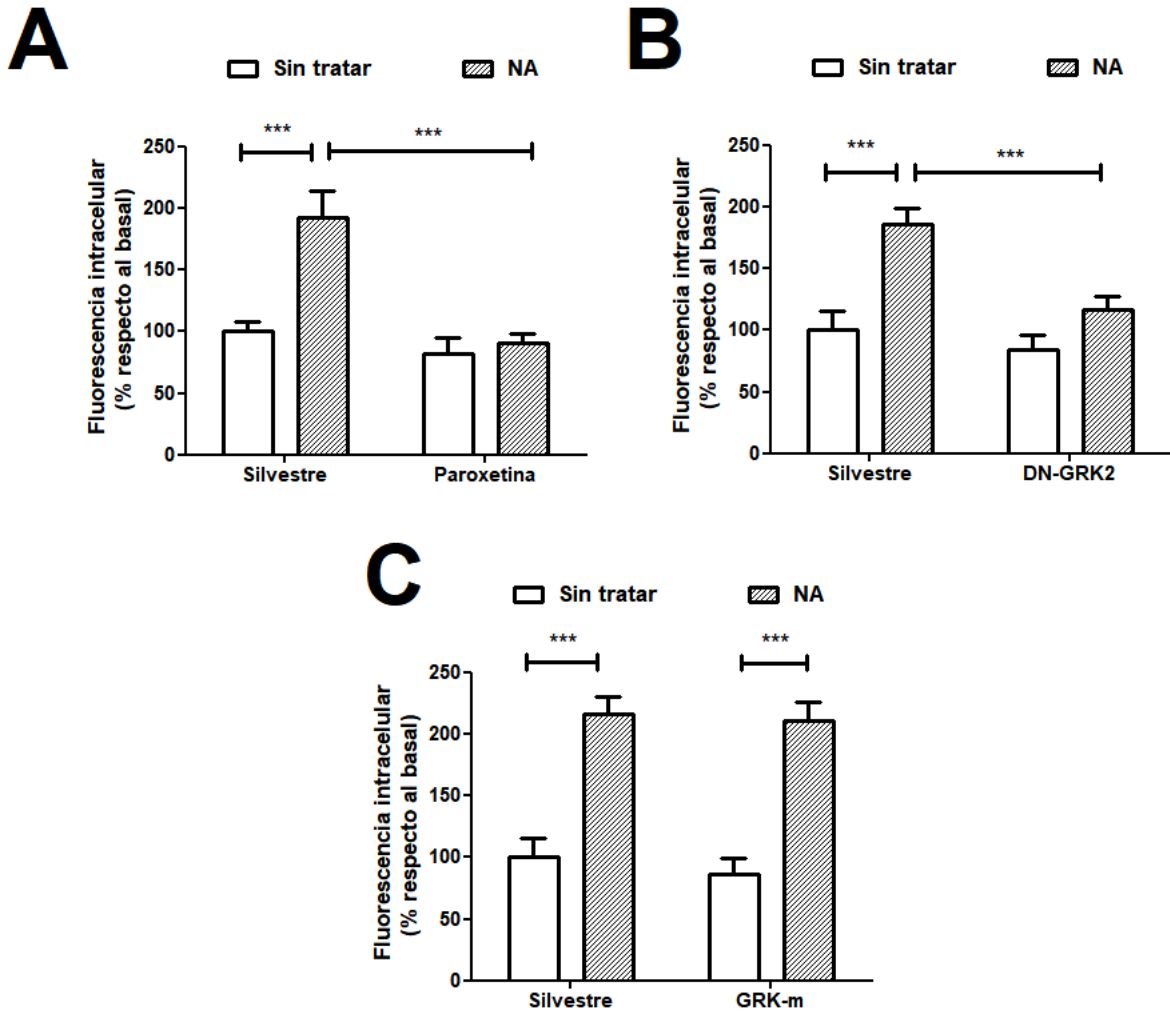


Figura 20. Cuantificación de la fluorescencia intracelular del receptor α_{1B} -AR como indicador de internalización. Datos obtenidos de células que expresaban al receptor α_{1B} -AR silvestre (A y B) o que expresaban la mutante para los sitios de fosforilación por GRK2 (C); las células también expresaron la proteína Rab5-silvestre. Las células se preincubaron con paroxetina por 15 minutos o se transfectaron con la dominante negativa de GRK2. En todos los paneles se graficaron los promedios y las líneas verticales representan el error estándar (S.E.M) de cuatro experimentos usando diferentes preparaciones celulares. ***p<0.001 vs Basal.

Los resultados mostrados en esta primera parte muestran que las cinco serinas fosforiladas (396, 400, 406, 410 y 412) participan, al igual que en el ortólogo del hámster, en el mecanismo de desensibilización (especialmente la heteróloga) y en la fosforilación del receptor α_{1B} -AR. Además, nuestros resultados demuestran claramente que la mutación en estos sitios favorece la activación de la vía de señalización de las MAP cinasas e inhibe la asociación del receptor con la proteína Rab5 impidiendo el tráfico vesicular del receptor.

7. Resultados

Parte II: Identificación de los sitios de fosforilación del receptor α_{1B} -AR

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

Los datos anteriores mostraron que los cinco sitios de fosforilación descritos en 1997 para el receptor α_{1B} -AR juegan un papel importante en la desensibilización heteróloga del receptor, en la activación de la vía de las MAP cinasas, en el tráfico vesicular del receptor y en su grado de fosforilación del receptor. Sin embargo, debido a que la variante del receptor PKC+GRK-m presentaba fosforilación y a que la variante del receptor GRK2-m seguía interaccionando con la proteína Rab5 durante la desensibilización homóloga, se decidió estudiar la posible presencia de otros sitios de fosforilación en el receptor, además de los ya reportados.

Para obtener información de los posibles residuos fosforilables del receptor α_{1B} -AR, se utilizaron dos programas de predicción de residuos fosforilados: Netphos 3.1 y GPS 3.0. Para llevar a cabo este análisis primero se introdujo la secuencia de residuos de aminoácidos del ortólogo de humano (Uniprot P35368) y de las predicciones obtenidas solo se consideraron aquellas que tuvieran un valor >0.75 para Netphos y >10 para GPS (Fig. 21). Con ambos programas, encontramos sitios probables de fosforilación tanto en la IL3 y en la región COOH terminal. Ambos programas predijeron residuos de serina y treonina, pero solo Netphos predijo dos residuos de tirosina en la región carboxilo terminal. Cabe mencionar que en ambos programas aparecieron algunas de las serinas reportadas en 1997 como probables sitios de fosforilación (Ser 396, 402, 406 y 410). Se compararon los resultados obtenidos con ambos programas con el fin de tener un consenso de los sitios de fosforilación. Los residuos que aparecieron en ambos programas están marcados en rojo en la Figura 21.

Tercera asa intracelular	Numero de residuo	227	233	234	246	248	252	257	264	266	267	268	277	278	287	295
	Residuo de a.a. Predicción consenso	Y	T	T	S	S	T	S	T	S	S	T	S	S	S	T
	Software	Netphos		GPS		S		S		S		S		S		T
Carboxilo terminal	Numero de residuo	362	386	387	388	392	396	400	402	406	410	412	415	417	420	423
	Residuo de a.a. Predicción consenso	S	Y	T	Y	T	S	S	S	S	S	S	S	S	T	S
	Software	Netphos		GPS		S		S		S		S		S		
	Numero de residuo	425	427	430	455	470	475	480	484	487	492	511				
	Residuo de a.a. Predicción consenso	S	S	Y	S	S	T	T	S	T	S	S				
	Software	Netphos		GPS		S		S		S		S		S		

Figura 21. Predicción de los sitios de fosforilación del receptor α_{1B} -AR. Se presentan los probables sitios de fosforilación para el receptor α_{1B} -AR. Se obtuvieron introduciendo la secuencia de aminoácidos del ortólogo humano en los programas Netphos 3.1 y GPS 3.0. Se indican el número y la clase de aminoácido, la región donde este se encuentra, los sitios obtenidos en los distintos programas y en rojo se presenta el consenso que se obtuvo al considerar los residuos predichos por ambos programas.

El programa de GPS, además de predecir los sitios probables de fosforilación de una proteína basándose en secuencias consenso reportadas experimentalmente, también hace la predicción de cual cinasa pudiera ser la que estaría provocando esta modificación postraduccional (Xue et al., 2008). Así que, mediante el uso de esta herramienta informática pudimos predecir las cinasas que pudieran estar participando en la fosforilación del receptor α_{1B} -AR. En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos indicando: el número de residuo, de que residuo se trata, la secuencia, la localización y la posible cinasa. Las predicciones de las posibles cinasas concuerdan con lo reportado en 1997, donde se encontró que los residuos Ser396 y Ser400 son fosforilados por PKC, mientras que los residuos de Serina 406 y Serina 410 son fosforilados por GRK2 (Diviani et al., 1997). Pero es destacable que el programa propuso más sitios, algunos de ellos en la IL3.

Tabla 1. Predicción de cinasas que fosforilan al receptor α_{1B} -AR

Posición	Residuo a.a.	Secuencia	Localización	Cinasa
248	S	VMKEMSN S KELTLRI	IL-3	GRK4
252	T	MSNSKEL T LRIHSKN	IL-3	PKC δ
257	S	ELTLRIH S KNFHEDT	IL-3	GRK2, PKC δ
264	T	SKNFHED T LSSTKAK	IL-3	PKB, GRK
266	S	NFHED T LSSTKAKG	IL-3	GRK2
267	S	FHED T LSSTKAKGHN	IL-3	AKT2, PKC ι , PKC ζ , GRK5, p38
268	T	HED T LSSTKAKGHNP	IL-3	GRK2
287	S	VKLFKF S REKKAA	IL-3	GRK2, PKC ι
396	S	RPWTRGG S LERSQSR	Ctail	AKT, PKA, PKC α , PKC δ ,
400	S	RGGSLER S QSRKDSL	Ctail	GRK2, PKC α
402	S	GSLERSQ S RKDSLDD	Ctail	AKT1, PKA, PKC α , PKC δ , PKC η , PKG
406	S	RSQSRK D SLDDSGSC	Ctail	GRK2, AKT1, PKA, PDK1, PKG, GSK3
410	S	RKDSLDD S GSCLSGS	Ctail	GRK2
415	S	DDSGSCL S GSQRTLTP	Ctail	GRK5
425	S	QRTLPSA S PSPGYLG	Ctail	ERK, JNK, GSK3, p38
427	S	TLPSAS P SPGYLGRG	Ctail	GSK3, p38,
470	S	GRRGRH D SGPLFTFK	Ctail	PKA, PKB, AKT2
484	S	KLLTEP E SPGTDGGA	Ctail	CDK5, JNK, p38, GRK2

7.2. Purificación del receptor α_{1B} -AR

Los datos obtenidos mediante el análisis *in silico* nos plantearon un acercamiento sobre la posible existencia de más sitios de fosforilación, además de los reportados en 1997, no solo en la región COOH terminal, sino también en la IL3 intracelular. Por ello, comprobamos experimentalmente las predicciones obtenidas en los análisis *in silico*. Para poder detectar los aminoácidos que se estuvieran fosforilando en el receptor empleamos la tecnología de espectrometría de masas (MS), ya que por su alta sensibilidad nos permite obtener la secuencia del receptor y los sitios de fosforilación de manera simultánea e inequívoca.

Para poder llevar a cabo el análisis de los sitios de fosforilación por MS, se requiere obtener una gran cantidad de proteína purificada (mínimo 100 ng de

proteína) que sea detectable en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomasie. Para lograr estos requisitos, decidimos utilizar el sistema de sobreexpresión de proteínas inducibles Flp-In TREx que se usó en la primera parte de este proyecto. Como se vio en los resultados anteriores, el receptor que se expresa en este sistema de inducción era funcional, ya que se observó un incremento de calcio intracelular de manera dependiente de la concentración de NA (Fig. 11). Así mismo, estos receptores se encontraban fosforilados en su estado basal y la fosforilación aumentaba cuando las células se incubaron con NA (Fig. 13) o con PMA (Fig. 14).

Debido a que en los ensayos de fosforilación presentados anteriormente fuimos capaces de inmunoprecipitar al receptor usando un anticuerpo anti GFP generado en nuestro laboratorio, entonces decidimos usar esta misma técnica para obtener una gran cantidad de receptor para el análisis por MS. Realizamos un protocolo de inmunoprecipitación a gran escala, lo que nos permitió observar una banda en el peso molecular esperado para el receptor α_{1B} -AR fusionado a la GFP. La inmunoprecipitación a gran escala se llevó a cabo en células inducidas por 18 horas con doxiciclina en condiciones no estimuladas (basal) o estimuladas con NA o con PMA por 15 minutos. De esta manera estudiamos los residuos de aminoácidos que se fosforilan durante la desensibilización homóloga y heteróloga del receptor para poderlos comparar entre ellos como también con el estado basal del receptor. En la Figura 22, en la izquierda se presenta un gel teñido con azul de Coomasie, donde podemos observar las bandas que representan al receptor purificado en las distintas condiciones mencionadas anteriormente (cuadro amarillo). De igual manera del lado derecho de la figura, podemos ver un Western blot con el cual se corroboró la identidad de las bandas mediante la inmunodetección de la GFP en las tres condiciones. Tanto en el gel como en la membrana, el peso esperado de la proteína purificada corresponde a la esperada (entre el 100-110 kDa).

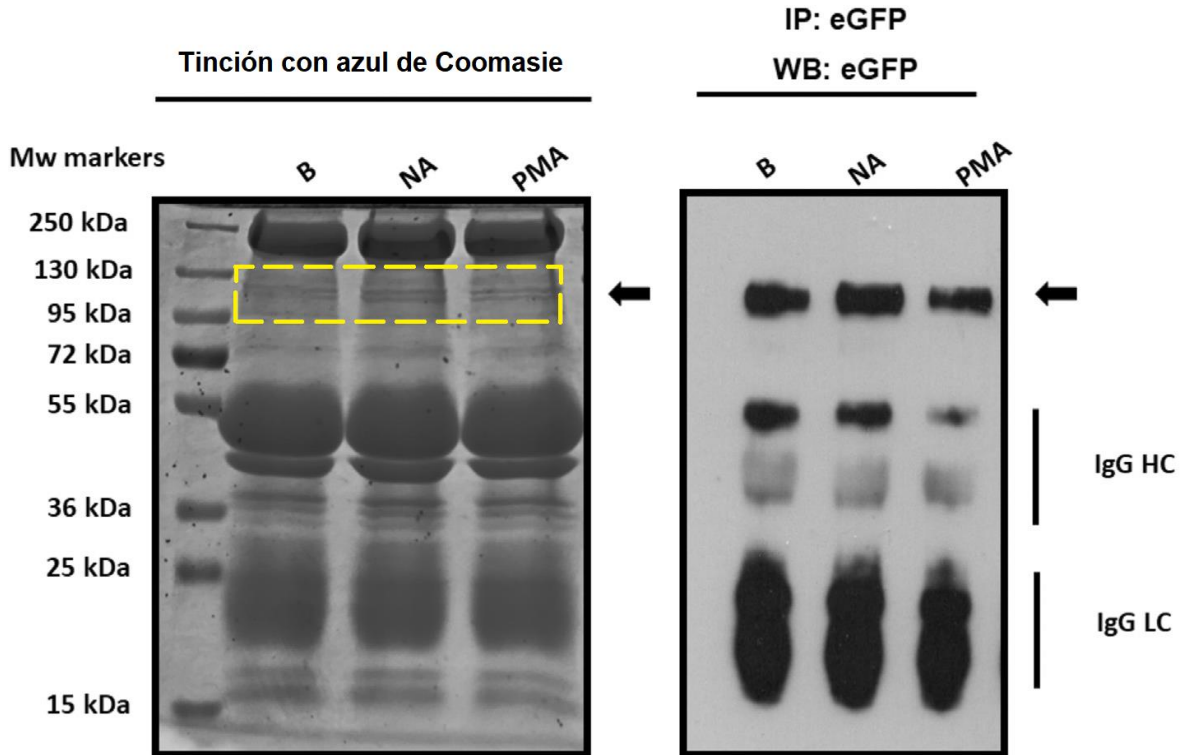


Figura 22. Purificación del receptor α_{1B} -AR para los estudios de espectrometría de masa. Las células que expresan la construcción α_{1B} -AR-GFP se trataron con: ningún agente (basal, B), noradrenalina (NA) y éster de forbol (PMA) durante 15 minutos; posteriormente se lisaron y se sometieron a una inmunopurificación. Las muestras se separaron mediante electroforesis en un gel de SDS-PAGE que se tiñó con azul de Coomassie (imagen de la izquierda); los marcadores de peso molecular se muestran en el primer carril. Un poco de muestra se corrió de forma paralela y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para corroborar, por medio de Western blot, la presencia del receptor utilizado un anticuerpo anti-GFP. Las flechas indican la localización del receptor.

7.3. Análisis de los resultados obtenidos por espectrometría de masas

Una vez corroborada la identidad de las bandas por Western blot, la región donde se encontraban las bandas en el gel se cortó y se enviaron a analizar a la Unidad de Espectrometría de Masas de la Universidad de Harvard (<https://talpin.med.harvard.edu>) a cargo del Dr. Ross Tomaino. Los experimentos se realizaron por cuatuplicado para comprobar la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Para la asignación de sitios fosforilados se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: 1) si ambos valores A score 1a y 1b fueron >19 se consideraba un sitio confiable; 2) si se detectaron dos o más sitios de fosforilación en el mismo péptido, el A score 1 corresponde al localizado hacia la región amino terminal, mientras que el A score 2 corresponde al péptido que va hacia el carboxilo

terminal; y 3) aquellos péptidos con un A score >1000 se consideraron como sitios inequívoco (Alfonzo-Méndez et al., 2018a; Beausoleil et al., 2006).

Los análisis, siguiendo los criterios mencionados anteriormente, arrojaron la presencia de más sitios de fosforilación de los reportados previamente en 1997. Estos nuevos sitios de fosforilación no solo se encuentran en la región carboxilo terminal, sino también en la IL3 como se predijo en el análisis *in silico*. Los resultados además demuestran que el receptor se encuentra fosforilado en su estado basal y que el patrón de fosforilación cambia cuando las células se estimularon con NA o con PMA (Tabla 2). Como se observa en la tabla 2, obtuvimos más sitios de fosforilación en comparación a los que de predijeron con el análisis *in silico*. También podemos observar que solo obtuvimos tres de los cinco de los sitios de fosforilación descritos previamente en el ortólogo de hámster.

Tabla 2. Sitios de fosforilación localizados por espectrometría de masas y representación del código de fosforilación.

<i>In silico</i>	#	a.a	Secuencias	Localización	Basal	NA	PMA	NA/PMA
X	246	S	EMSNKELTLR	IL-3				
X	248	S	EMSNKELTLR	IL-3				
✓	252	T	EMSNKELTLR	IL-3				
✓	257	S	IHSKNFHEDTSSSTK	IL-3				
✓	264	T	IHSKNFHEDTSSSTKAK	IL-3				
✓	267	S	NFHEDTSSSTKAK	IL-3				
✓	268	T	NFHEDTSSSTKAK	IL-3				
X	277	S	GHNPRSSIAVK	IL-3				
✓	387	T	LGGCAYTRPWTR	COOH - terminal				
X	392	T	LGGCAYTRPWTR	COOH - terminal				
✓	396	S	GGSLERSQSR	COOH - terminal				
✓	400	S	GGSLERSQSR	COOH - terminal				
✓	402	S	SQSRKDSLDDSGSCLSGSQR	COOH - terminal				
✓	406	S	KDSLDDSGSCLSGSQR	COOH - terminal				
✓	420	T	TLPSASPSPGYLGR	COOH - terminal				
✓	423	S	TLPSASPSPGYLGR	COOH - terminal				
X	425	S	TLPSASPSPGYLGR	COOH - terminal				
X	427	S	TLPSASPSPGYLGR	COOH - terminal				
X	455	S	APGALLSLPAPEPPGRR	COOH - terminal				
X	470	S	GRHDSGPLFTFK	COOH - terminal				
X	475	T	RGRHDSGPLFTFK	COOH - terminal				

El análisis de MS de las bandas purificadas, de los cuatro experimentos realizados detectó péptidos del 67% de la IL3 y el 74% de los péptidos de la secuencia del extremo COOH termina del receptor α_{1B} -AR (Fig. 23).

10	20	30	40	50
MNPDLDTGHN	TSAPAHWGEL	KNANFTGPNQ	TSSNSTLPQL	DITRAISVGL
60	70	80	90	100
VLGAFILFAI	VGNILVILSV	ACNRHLRTP	NYFIVNLAMA	DLLLSFTVLP
110	120	130	140	150
FSAALEVLGY	WVLGRIFCDI	WAAVDVLCCT	ASILSLCAIS	IDRYIGVRYS
160	170	180	190	200
LQYPTLVTRR	KAILALLSVW	VLSTVISIGP	LLGWKEPAPN	DDKECGVTEE
210	220	230	240	250
PFYALFSSLG	SFYIPLAVIL	VMYCRVYIVA	KRTTKNLEAG	VMKEMSNSKE
260	270	280	290	300
LTLRHNSKNF	HEDTLSSTKA	KGHNPRSSIA	VKLFKFSREK	KAAKTLGIVV
310	320	330	340	350
GMFILCWLPF	FIALPLGSLF	STLKPPDAVF	KVFWLGYFN	SCLNPIIYPC
360	370	380	390	400
S	ILGQCQRGR	RRRRRRRRR	LGGCAYTYRE	WTRGGSLERS
410	420	430	440	450
QSRKDSLDDS	GSCLSGSORT	LPSASPSPGY	LGRGAPPEVE	LCAFPEWKAH
460	470	480	490	500
GALLSLPAPE	PPGRRGRHDS	SPLFTFKLLT	EPESPQTDGG	ASNGGCEAAA
510	520			
IVANGQPGFK	SNMPLAPGQ			

Figura 23. Cobertura proteica obtenida en el análisis por espectrometría de masas. Se marcan los dominios IL-3 (azul) y el C terminal en la secuencia del receptor α_{1B} -AR. Los péptidos detectados están subrayados y remarcados con negritas

A través de MS también se identificó una lista de péptidos distinto al del receptor, las que pudieran considerarse como probables proteínas asociadas. En la tabla 3 se presenta una lista de las proteínas que se detectaron en los experimentos analizados por MS.

Tabla 3. Proteínas asociadas al receptor α_{1B} -AR encontradas por espectrometría de masas.

Función molecular	Proteína
Actividad dependiente de ATP	TERA, MYO1C, KINH, MYO1C, NSF
Unión	TERA, DYN1, DYN2, PFKAL, SAE2, HS90A, H90B3, MSH2, IRS4, PYGL, MYO1C, VPS52, STAT3, PYGB, ENPL, KINH, OPA1, TBA1A, GELS, CALX
Actividad catalítica	PRDX2, TERA, DYN1, DYN2, PFKAL, UBA1, MCM, PYGL, MYO1C, PYGB, KINH, OPA1, TIF1B, UBE4A, SAE2, NSF
Actividad motora	MYO1C, KINH
Estructura molecular	TBA1A
Transducción de señales	STAT1, STAT2, STAT3

La clasificación de las proteínas se realizó con base a su función molecular. Obtuvimos que de las posibles proteínas asociadas al receptor α_{1B} -AR, el 10% son proteínas con actividad dependiente de ATP, el 44% son proteínas de unión, el 35% son proteínas con actividad catalítica, el 6% tienen función motora en el citoesqueleto, el 2% están relacionadas en la estructura molecular y el 3% en la transducción de las señales (Fig. 24).

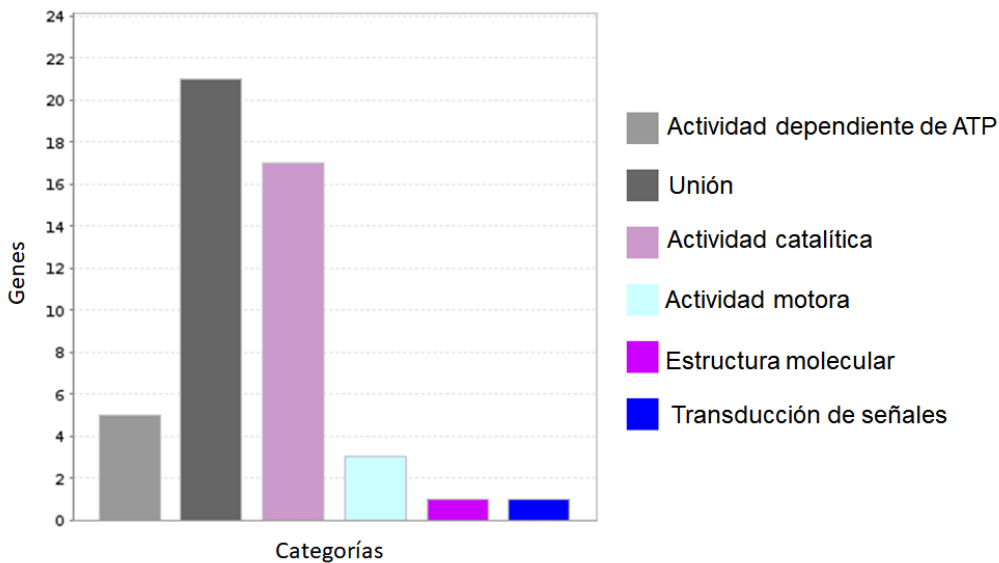


Figura 24. Genes asociados al receptor α_{1B} -AR. Los genes asociados al receptor α_{1B} -AR encontrados por masas se clasificaron usando la herramienta bioinformática PANTHER dependiendo de su función molecular.

7.4. Sitios de fosforilación del receptor α_{1B} -AR y código de fosforilación

Encontramos la presencia de varios sitios fosforilados en el receptor α_{1B} -AR en condiciones basales los cuales son S248, S268, T420 y T475. Los aminoácidos fosforilados detectados solo en respuesta a NA fueron S246, S277, S396, S400, S402 y S406. Los residuos fosforilados en respuesta a PMA fueron T387 y T392 mientras que S267 y S425 se detectaron fosforilados en condiciones basales y estimuladas con PMA (Tabla 2 y Fig. 25). Otros residuos se detectaron fosforilados en condiciones basales, estimuladas con NA y PMA. Estos fueron T252, S257, T264, S423, S427, S455 y S470 (Tabla 2 y Fig. 25). Cabe mencionar que el método de MS empleado en este estudio es solo cualitativo y, por lo tanto, no podemos estimar la proporción/magnitud-relativa de los receptores fosforilados en un residuo dado.

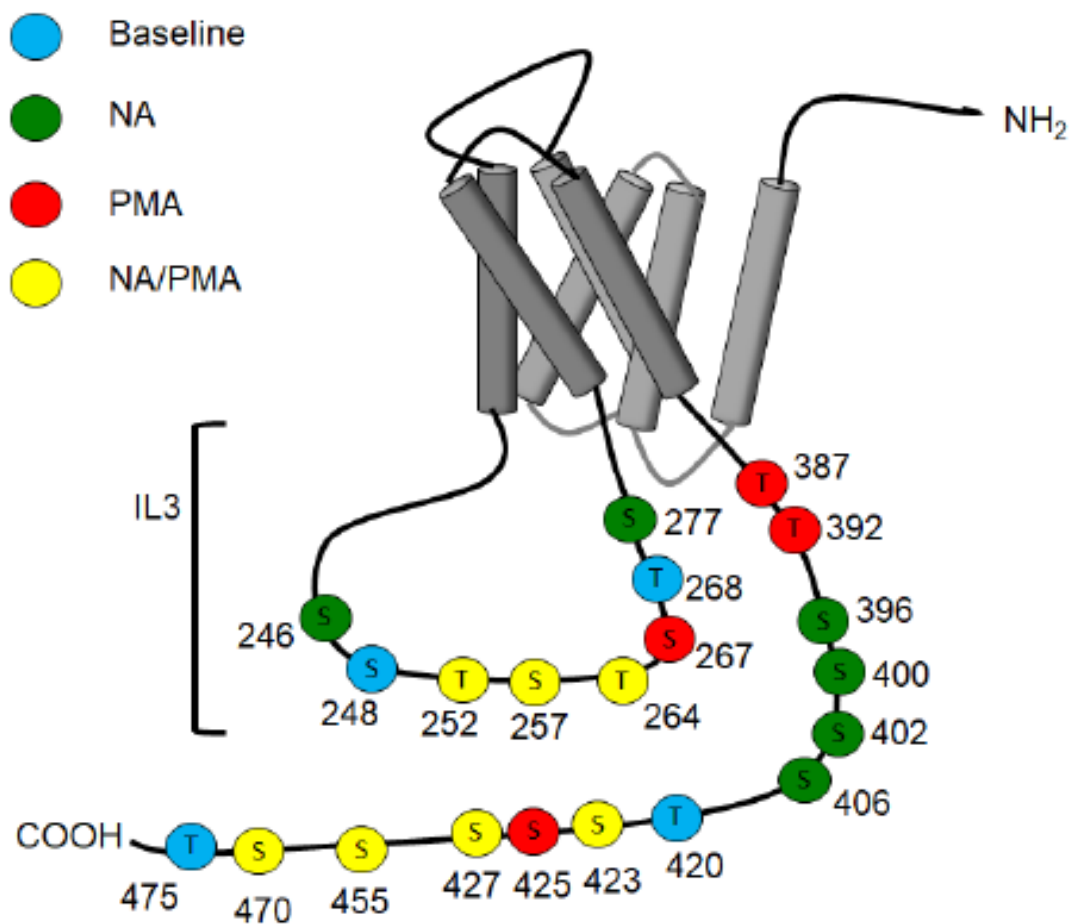


Figura 25. Sitios de fosforilación detectados por espectrometría de masas en muestras obtenidas de la construcción α_{1B} -AR-GFP silvestre. Diagrama del receptor α_{1B} -AR silvestre en el cual se indican los sitios de fosforilación observados en las diferentes condiciones empleadas. Los números indican la posición en la secuencia de los residuos, y las letras identifican el aminoácido. Se encuentran en azul aquellos sitios que se detectaron en condiciones basales; en verde se marcan aquellos sitios que solo se observaron fosforilados cuando las células se estimularon con NA; los sitios en rojo solo se observaron en células que se trataron con PMA; y los sitios en amarillos se observaron bajo las dos condiciones (NA/PMA).

Se analizó la conservación de los residuos detectados por MS en distintos ortólogos del receptor α_{1B} -AR. Esto se realizó con la finalidad de determinar la posible importancia de estos residuos en la regulación de la señalización del receptor α_{1B} -AR. Lo que observamos es que los sitios de fosforilación identificados por MS para el receptor α_{1B} -AR humano se encuentran conservados entre las cinco especies analizadas *in silico*, lo que denota una posible participación en la función y regulación de la señal del receptor (Fig. 26).

IL3

```

ADA1B_HUMAN  RVIYIVAKRRTTKNLEAGVMKEMSNKELTLRIHSKNFHEDTLSSTKAKGHNPRSSIAVKLKFKSREKKAAKT
ADA1B_RAT    RVIYIVAKRRTTKNLEAGVMKEMSNKELTLRIHSKNFHEDTLSSTKAKGHNPRSSIAVKLKFKSREKKAAKT
ADA1B_MOUSE  RVIYIVAKRRTTKNLEAGVMKEMSNKELTLRIHSKNFHEDTLSSTKAKGHNPRSSIAVKLKFKSREKKAAKT
ADA1B_MESAU  RVIYIVAKRRTTKNLEAGVMKEMSNKELTLRIHSKNFHEDTLSSTKAKGHNPRSSIAVKLKFKSREKKAAKT
FILMGA6_BOVIN RVIYIVAKRRTTKNLEAGVMKEMSNKELTLRIHSKNFHEDTLSSTKAKGHNPRSSIAVKLKFKSREKKAAKT

```

Ctail

```

ADA1B_HUMAN  SKEFKRAFVVRILGCQCRGRRRRRRRRRLGGCAYTYRPWTRGGSLERSQSRKDSLDDSGSCLSGSQRT
ADA1B_RAT    SKEFKRAFMRILGCQCRGGR--RRRRRRRLGACAYTYRPWTRGGSLERSQSRKDSLDDSGSCMSGTQRT
ADA1B_MOUSE  SKEFKRAFMRILGCQCRGGR--RRRRRRRLGACAYTYRPWTRGGSLERSQSRKDSLDDSGSCMSGSQRT
ADA1B_MESAU  SKEFKRAFMRILGCQCRSGR--RRRRRRRLGACAYTYRPWTRGGSLERSQSRKDSLDDSGSCMSGSQRT
FILMGA6_BOVIN SKEFKRAFVVRILGCQCRGRR--RRRRRRRLGGCGYTYRPWTRGGSLERSQSRKDSLDDSGSCLSGSQRT

```

```

ADA1B_HUMAN  LPSAEPSPGYLGRGAPPVVELCAFPWEWKAPGALLSLPAPEPPGRRGRHDSGPLFTFKLLTEPESPGTDG
ADA1B_RAT    LPSAEPSPGYLGRGTQPPVVELCAFPWEWK-PGALLSL--PEPPGRRGRLDGSPFLTFKLLGDPESPGTEG
ADA1B_MOUSE  LPSAEPSPGYLGRGTQPPVVELCAFPWEWK-PGALLSL--PEPPGRRGRLDGSPFLTFKLLGEPESPGTEG
ADA1B_MESAU  LPSAEPSPGYLGRGAQPPELCAFPWEWKS-GALLSL--PEPPGRRGRLDGSPFLTFKLLGEPESPGTEG
FILMGA6_BOVIN LPSAEPSPGYLGRGAPPVVELCAFPWEWKAPGALLSLPAPEPPGRRGRHDSGPLFTFKLLAEPESPGTDG

```

```

ADA1B_HUMAN  GASNGGCEAAADVANGQPGFKSNMPLAPGQF
ADA1B_RAT    DTSNGGCDTTTTDLANGQPGFKSNMPLAPGHF
ADA1B_MOUSE  DASNGGCDTTTTDLANGQPGFKSNMPLAPGHF
ADA1B_MESAU  DASNGGCDATTTDLANGQPGFKSNMPLAPGHF
FILMGA6_BOVIN DA---GHEAAADVANGQPGFKSNMPLAPGQF

```

Figura 26. Comparación de los sitios de fosforilación identificados por espectrometría de masas. Alineamiento de secuencias correspondientes a la tercera asa intracelular (IL3) y la región carboxilo terminal (Ctail) del receptor α_{1B} -AR (ortólogo de humano, rata, ratón, hámster y vaca). Las serinas identificadas por espectrometría de masas se encuentran coloreadas siguiendo el mismo código de colores utilizado previamente.

La identificación de estos nuevos posibles sitios de fosforilación, así como haber observado la fosforilación o desfosforilación de ciertos residuos de aminoácidos en estado basal y cuando las células eran estimuladas con NA o PMA, nos hace pensar que los receptores se encuentran fluctuando en distintas conformaciones estructurales, las cuales le pueden permitir o impedir asociarse a otras proteínas, tales como es el caso de las proteínas arrestinas, las cuales la probabilidad de unión estará determinada por la conformación que adopten los receptores. Por lo tanto, la fosforilación en los distintos residuos induce la formación de un sitio de unión de preferencia para efectores particulares.

8. Discusión

Parte 1: Papel de los cinco sitios de fosforilación en la función, señalización y desensibilización del receptor α_{1B} -AR

En la primera parte del proyecto se estudió la señalización y desensibilización del receptor α_{1B} -AR por su fosforilación en las serinas 396, 402, 406, 410 y 412, para determinar si estos residuos tenían un papel parecido a los reportados con el ortólogo de hámster. Nuestros datos indican que al igual que en el ortólogo de hámster, estas serinas participan en la desensibilización del receptor, así como también juegan un papel mayor en el estado fosforilado del receptor cuando es activado por NA o por factores no relacionados como el PMA. Al igual que lo reportado por Diviani y colaboradores en 1997, los cambios en las serinas no produjeron modificaciones en la capacidad de señalización del receptor (Diviani et al., 1997). Sin embargo, observamos variaciones en la liberación de calcio después del estímulo con la NA en las variantes GRK-m y PKC+GRK-m, por lo que la eliminación de los sitios de fosforilación pudiera potenciar la actividad del receptor o pudiera estar teniendo un efecto en la internalización de este, lo cual disminuye su señalización vía calcio (Segura et al., 2013). Sin embargo, no podemos saber con exactitud hasta qué punto la internalización podría tener un papel en nuestros experimentos, debido a que el aumento y la disminución de los picos de calcio intracelular, inducidos por la NA, ocurren en cuestión de segundos, mientras que los cambios en la internalización del receptor son imposibles de detectar en períodos cortos de tiempo con la metodología empleada.

Encontramos que la fosforilación del receptor en los residuos de serina 406, 410 y 412 por PMA contribuyen a la desensibilización heteróloga del receptor, mientras que los residuos de serina 396 y 402 no tienen un papel directo en este proceso, ya que al cambiar las cinco serinas mencionadas anteriormente se incrementa más la pérdida de desensibilización del receptor. Cabe mencionar que los residuos 406, 410 y 412 del ortólogo de hámster se reportaron como sitios que participan en la desensibilización homóloga, mientras que los residuos 396 y 402 se reportaron como sitios que participan en la desensibilización heteróloga, lo que sugiere una diferencia entre la función de estos sitios de fosforilación entre ambas especies.

Encontramos que el estímulo tanto con NA así como con el PMA, induce la fosforilación de las distintas variantes del receptor α_{1B} -AR humano. Las sustituciones en los cinco residuos de serina por alaninas provocaron una reducción parcial en la fosforilación del receptor cuando se estimulaba y bajo condiciones basales. Los datos mostraron que la fosforilación de estos residuos es independiente de las demás serinas, un efecto reportado en el ortólogo de hámster en el cual el cambio de un solo residuo era capaz de disminuir la fosforilación del receptor y la adición de más sustituciones producía una disminución mucho mayor en la fosforilación (Diviani et al., 1997). Este mismo efecto fue observado con la variante PKC+GRK-m la cual presento niveles de fosforilación menores al receptor silvestre y a las variantes PKC-m y GRK-m. En otros trabajos usando también el ortólogo de hámster, se encontró que el truncamiento de los últimos 147 residuos de aminoácidos, que comprenden el extremo carboxilo terminal de la proteína, y es donde se encuentran las cinco serinas estudiadas, abolía casi por completo la fosforilación del receptor, un efecto diferente a lo que nosotros observamos con el receptor humano (Lattion et al., 1994a). Las diferencias vistas en este trabajo y los de Cottechia y colaboradores (Diviani et al., 1997; Lattion et al., 1994b) podrían deberse a los distintos modelos de receptores estudiados o a diferencias en las condiciones experimentales empleadas, incluidos entre otros, los modelos celulares en los que se expresaron los receptores y el número de receptores que se expresaban en la célula.

La activación de la vía de las MAP cinasas por los GPCRs se ha estudiado previamente (Caunt et al., 2006; Goldsmith & Dhanasekaran, 2007; Jain et al., 2018). A la fecha, no se ha reportado ninguna mutación en GPCRs capaz de inhibir la vía MAP-ERK. Sin embargo, hay evidencias que demuestran que la activación y regulación de esta vía de señalización están estrechamente involucradas con la interacción de los receptores con proteínas de andamiaje, como es el caso de las proteínas β -arrestinas, cuya interacción y conformación que adopten estas proteínas están determinadas por los patrones de fosforilación de los receptores dando como resultado diferentes respuestas funcionales (Premont, 2020; Signaling et al., 2020).

Los datos presentados en este trabajo revelan que existió una activación sostenida de la vía MAP-ERK en todas las variantes del receptor, por lo que nuestros

datos indican que las sustituciones de las serinas por alaninas le confieren al receptor una actividad sesgada a esta vía de señalización. Este efecto puede deberse a que aun cuando en estas variantes del receptor no tienen estos sitios de fosforilación, estas siguen siendo capaces de interaccionar la β -arrestina, ya que anteriormente se había reportado la interacción entre la β -arrestina y un mutante del receptor constitutivamente activo el cual no tiene estas cinco serinas (Mhaouty-kodja et al., 1999). Así mismo, trabajos recientes de investigación de nuestro grupo han demostrado que las sustituciones por alanina de posibles sitios de fosforilación en el receptor α_{1D} adrenérgico producen una fosforilación sostenida de ERK1/2 (Alfonzo-Méndez et al., 2018b; Carmona-Rosas et al., 2019). Sin embargo, también por nuestro grupo de investigación se reportó un efecto adverso en el receptor de ácidos grasos 1, en el cual las sustituciones de posibles sitios de fosforilación provocan una disminución en la fosforilación de ERK1/2 (Guzmán-Silva et al., 2022). Por lo tanto, los diferentes complejos formados entre los GPCRs y las β -arrestinas, que pueden parecer muy similares, no necesariamente tienen las mismas respuestas funcionales.

Como se mencionó anteriormente, la fosforilación de los GPCRs está involucrada en procesos tales como la internalización y desensibilización de los receptores. Sin embargo, la fosforilación también juega un papel importante en el tráfico vesicular del receptor. En este trabajo encontramos que la interacción que se produce entre el receptor α_{1B} -AR y la proteína Rab5 es dependiente de la fosforilación del receptor por GRK2, ya que, al inhibir a GRK2 usando paroxetina (Homan et al., 2014; Thal et al., 2013) o con la dominante negativa de GRK2 (Komolov & Benovic, 2018; Moore et al., 2007; Ribas et al., 2007), se bloqueaba la interacción entre el receptor y la proteína Rab5, durante la desensibilización homóloga. Un efecto parecido se reportó para el receptor para esfingosina-1-fosfato, donde la inhibición de GRK2 por paroxetina bloquea la interacción entre el receptor y la proteína Rab5 (Martínez-Morales et al., 2018). Por otro lado, cuando se determinó la interacción entre la variante GRK-m del receptor y la proteína Rab5, solo se observó una disminución parcial en la interacción entre ambas proteínas, en comparación al receptor silvestre. Un efecto parecido reportó Alfonzo-Méndez y colaboradores, quienes encontraron que al usar la mutante PKC-m se bloqueaba parcialmente la interacción entre el receptor α_{1B} -AR y la proteína Rab9 inducida por la fosforilación del receptor por la PKC (2017).

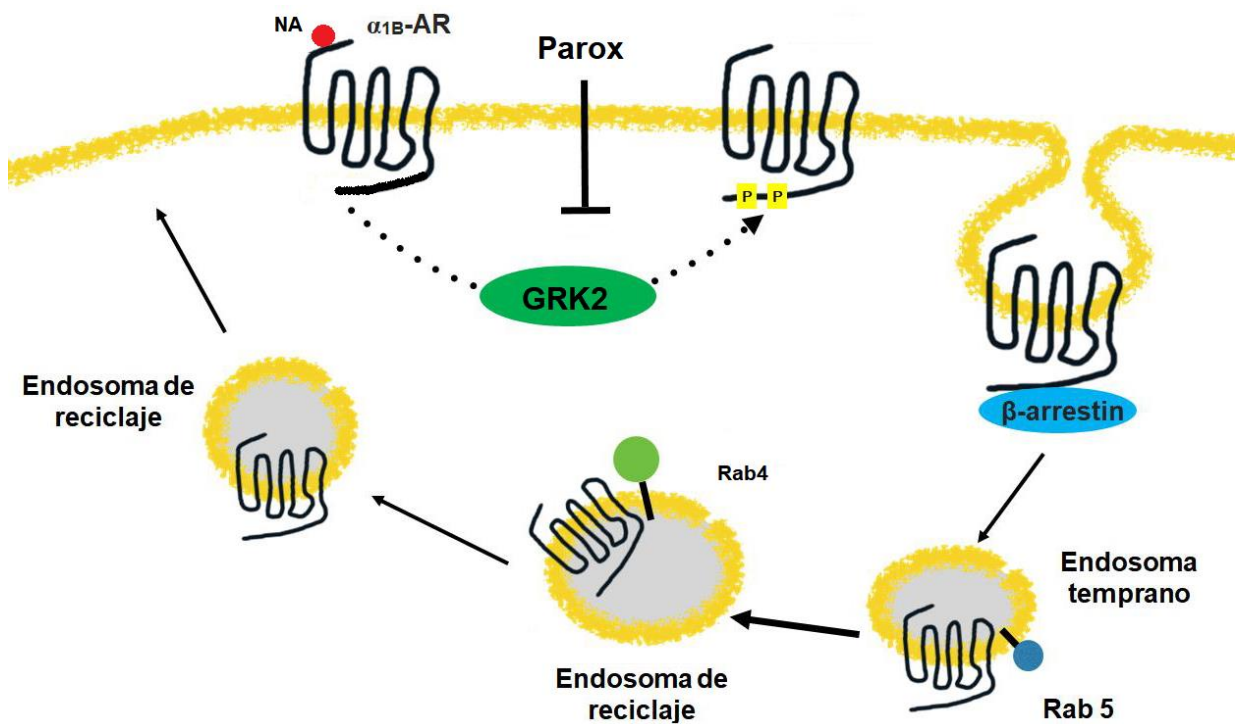


Figura 27. Modelo del tráfico vesicular del receptor α_{1B} -AR. Modelo del posible papel de la GRK2 y la proteína Rab5 en la internalización del receptor.

Parte II: Identificación de los sitios de fosforilación del receptor α_{1B} -AR

La contribución de la segunda parte de esta tesis fue identificar por primera vez los sitios de fosforilación del α_{1B} -AR. Específicamente, localizamos los sitios en la IL3 y en la región COOH terminal del receptor, los cuales tienen distintos patrones de fosforilación que cambian dependiendo del estímulo. Dentro de nuestros resultados encontramos muchos más sitios de fosforilación de los reportados por Diviani y colaboradores en 1997. Esto se debe a que en ese trabajo identificamos estos residuos a través de mutagénesis sitio-dirigida y por el truncamiento de los últimos 147 residuos del carboxilo terminal, lo que deja la posibilidad de la fosforilación de sitios adicionales, no solo en la región carboxilo, sino también en otras regiones intracelulares del receptor. Nosotros en este trabajo utilizamos la técnica de MS, la cual ha sido

ampliamente usada para buscar modificaciones postraduccionales de las proteínas y en los últimos años se ha empleado para detectar posibles sitios de fosforilación en los GPCRs.

Los obtenidos con las distintas del receptor α_{1B} -AR revelaron que las modificaciones realizadas en el receptor humano imitaron algunos de los efectos funcionales observados en el ortólogo de hámster mutado (Diviani et al., 1997). Sin embargo, se mantuvo la fosforilación del receptor α_{1B} -AR humano en respuesta a NA y PMA, e incluso en estado basal. Esta fosforilación remanente también se detectó en los experimentos de Diviani y colaboradores cuando usaron el ortólogo de hámster. Cabe mencionar que se identificaron las cinco serinas en la región carboxilo terminal del receptor α_{1B} -AR de hámster, utilizando mutagénesis sitio-dirigida. Por lo anterior, en este proyecto utilizamos una combinación de análisis *in silico* y de MS para detectar potenciales sitios de fosforilación (Bouzo-Lorenzo et al., 2016; Bray et al., 2014; Busillo et al., 2010; Butcher et al., 2011; C. Chen et al., 2016; X. Chen et al., 2014; Doronin et al., 2000; Gao et al., 2014; Homan et al., 2014; Lee, 2002; Moulédous et al., 2015; Nobles et al., 2011; Ohguro et al., 1995). El receptor mejor caracterizado usando esta herramienta es el β_2 -AR, ya que se describieron sus sitios de fosforilación usando fragmentos purificados del receptor en bacterias (Doronin et al., 2000). En este trabajo utilizamos extractos de células HEK293 con el sistema inducible Flp-In T-REx para lograr purificar una cantidad suficiente de α_{1B} -AR para el análisis por MS.

Los resultados arrojados por el análisis de MS revelaron un código de fosforilación del receptor α_{1B} -AR en su estado basal y este código cambió cuando las células se estimularon con NA o PMA. Este mismo efecto fue observado en nuestro grupo de trabajo, pero con los receptores α_{1A} -AR y α_{1D} -AR y es consistente con la hipótesis propuesta por Butcher y colaboradores en 2011 en el cual reportaron cambios en los patrones de fosforilación dependientes del estímulo en el receptor muscarínico M₃. (Butcher et al., 2011). Cabe mencionar que al comparar los sitios de fosforilación del receptor α_{1B} -AR obtenidos por MS con los predichos con dos herramientas bioinformáticas, encontramos una predicción acertada en un 60%. Estos resultados demuestran la validez, pero no certeza, de los análisis *in silico* para el estudio de la fosforilación de proteínas.

Las diferencias observadas entre los sitios reportados en el ortólogo de hámster y el presente trabajo podrían deberse al modelo del sistema celular empleado para la expresión del receptor, ya que esto también se ha demostrado en receptores muscarínicos, y parece ser de gran importancia para definir el código de barras de fosforilación y sus consecuencias funcionales (Tobin et al., 2008). Es posible que los sitios fosforilados reportados en el ortólogo de hámster tengan una mayor fosforilación en comparación de los demás residuos, pero que, al tener un sistema de sobreexpresión, hayamos obtenido una señal significativamente mayor que podría permitir la detección de residuos que en otras condiciones podrían estar fosforilados en mucha menor medida. Sin embargo, se observó una fosforilación significativa en las variantes del receptor.

Dentro de los nuevos residuos fosforilados detectados por MS podemos identificar motivos fosforilados que se conservan en otros GPCRs y que han sido señalados como secuencias claves para la unión y estabilidad de proteínas arrestinas (Mayer et al., 2019), y como regiones moduladoras que influyen en la conformación estructural de estos receptores (Zhou et al., 2017). Estos motivos de fosforilación se identificaron a través de análisis bioinformáticos en distintos GPCRs (incluyendo al receptor α_{1B} -AR). Estos motivos fosforilados consisten en dos regiones: la primera es el denominado “motivo de carga negativa”, el cual participa en la estabilidad conformacional de las β -arrestinas; y la segunda es el denominado “motivo clave de unión”, el cual es la región clave de unión de las β -arrestinas con el receptor y se encuentra a ocho residuos de aminoácidos del motivo de carga negativa (Mayer et al., 2019). Como podemos observar en la Figura 28, en nuestro modelo del receptor α_{1B} -AR marcado con los sitios de fosforilación detectados por MS, se encuentran ambos motivos de fosforilación. Cabe mencionar que también se identificó el motivo de fosforilación de unión a β -arrestinas por otro grupo de investigación, pero en el receptor de vasopresina 2 y el receptor de bradicinina (Baidya et al., 2020). En ese trabajo se reportó que la unión de las β -arrestinas con ambos receptores se da en la región del receptor que tenga el siguiente código de aminoácidos: PxPxxP (corto) o PxxPxxP (largo); donde “P” pudiera ser un residuo fosforilado, ya sea una serina o una treonina, y “x” cualquier otro residuo de aminoácido. Lo anterior es para cumplir los requisitos de una interacción de alta afinidad entre el receptor y las arrestinas, donde es necesario al menos la interacción

epiteliales (Strakova et al., 2018). Este trabajo proporciona evidencia de que las Ser³⁹⁶, 402, 406, 410 y 412 son los residuos predominantemente fosforilados y que participan en procesos de desensibilización, en la regulación de la señalización y en la fosforilación del receptor, pero también sugiere que la fosforilación y los patrones de fosforilación en el receptor son más complejos de lo que se había anticipado, ya que es un proceso que tiene lugar dentro de las dimensiones espacio-temporales. El hecho de que algunos sitios se detectaran fosforilados en condiciones basales, pero no estimulados, sugiere que, durante la activación del receptor, se podría estar llevando a cabo la acción de diferentes proteínas cinasas y fosfatasa. Estas proteínas actúan de manera dinámica, produciendo diferentes patrones de fosforilación en el receptor, los cuales pudieran estar coexistiendo en distintos momentos y en distintas localizaciones subcelulares. Lo anterior se reportó con el β_2 -adrenérgico; es decir, se encontraron receptores fosforilados en distintas partes de la célula, los cuales pueden o no estar presentes de manera simultánea en la misma célula. Esto significa que los receptores están presentes en diferentes compartimentos subcelulares participando en diferentes funciones (Shen et al., 2018). Es probable, por tanto, que el patrón de fosforilación que observamos sea la suma de una serie de estados de fosforilación diferentes presentes en las células.

El análisis por MS se ha convertido en una herramienta clave para identificar y caracterizar adecuadamente modificaciones postraduccionales en las proteínas, incluida la fosforilación, la ubiquitinación, la glicosilación, entre otras. Esta técnica altamente especializada permite obtener las secuencias de aminoácidos de las proteínas. Durante la última década, los análisis por MS han ganado interés debido a que permiten elucidar posibles interacciones proteína-proteína y ligando-proteína, por lo que ha contribuido en gran medida a identificar nuevos complejos celulares.

Previamente en otros trabajos ya se había reportado la asociación de otras proteínas con el receptor α_{1B} -AR, como es el caso de la subunidad μ_2 de la clatrina y la proteína ezrina (Stanasila et al., 2006). Nosotros a través de nuestros análisis por MS encontramos la secuencia de otras proteínas que pudieran estar asociando con el receptor. Entre las proteínas que encontramos están varias asociadas al tráfico membranal de proteínas, como es el caso de la dinamina 1 y 2, que son componentes

que regulan la fisión de la membrana celular como también la endocitosis y la secreción de vesículas; se han reportado a éstas como componentes clave en la internalización de algunos GPCRs como el β_2 -AR (Doherty & McMahon, 2009; Takei et al., 1999). Otras proteínas involucradas en el tráfico membranal son los ortólogos 35 y 52 de proteínas vacuolares (VPS35 y VPS52), los cuales regulan el tráfico de proteínas en la membrana celular y que, cuando forman un complejo con otros ortólogos de proteínas vacuolares, crean un complejo selectivo con propiedades parecidas a las proteínas arrestinas (Collins et al., 2005; Shi et al., 2006). Se ha reportado que este complejo tiene un papel en el reciclamiento y tráfico de algunos GPCRs, como es el caso del receptor β_2 -AR y el receptor para dopamina D1 (C. Wang et al., 2016). Se encontraron también las subunidades alfa y beta del complejo multi-proteico COPI (coat complex protein I) las cuales al ensamblarse forma una cubierta que recubre y da forma a vesículas transportadoras que reconocen proteínas con una secuencia "KKXX" (Béthune et al., 2006). Finalmente, también se identificaron las secuencias correspondientes a la proteína NFS la cual ha sido reportada que participa en la internalización de algunos GPCRs, en particular con el receptor β_2 -AR, cuando estos son estimulados con su agonista, ya que la proteína NFS se asocia con las proteínas β -arrestinas (McDonald et al., 1999). Cabe mencionar que, de las proteínas mencionadas anteriormente, y que participan en el tráfico de proteínas de membrana o en la internalización de proteínas. No se ha reportado que ninguna de éstas interactúe con el receptor α_{1B} -AR, por lo que estudios futuros pudieran considerar estas proteínas como posibles reguladores en la desensibilización del receptor.

En nuestro análisis de proteínas asociadas al receptor α_{1B} -AR encontramos a la 6-fosfofructocinasa, la principal enzima reguladora del glucolisis y la encargada de catalizar la fosforilación de la fructosa-6-fosfato para formar fructosa-1,6-bisfosfato. La interacción entre ambas proteínas puede deberse a que el receptor α_{1B} -AR está estrechamente involucrado en procesos metabólicos como es el control de la homeostasis. Se ha reportado que la activación del receptor produce un incremento en los niveles de RNA mensajero de esta enzima en cardiomiocitos mientras que en el hígado incrementa la glucogenólisis (Aggerbeck et al., 1980; Terzic et al., 1993). Sin embargo, no hay trabajos donde se estudie el posible papel que pudiera tener la asociación de estas dos proteínas. Por otro lado, en nuestros análisis también se

encontraron proteínas relacionadas a la señalización celular, como es el caso del receptor para el factor de crecimiento opioide y los miembros 1, 2 y 3 de la familia de las proteínas STAT. Anteriormente ya se había reportado la interacción entre el receptor para el factor de crecimiento opioide y el receptor adrenérgico α_2 y la cual tiene como papel la regulación de la señal de ambos receptores. Por lo que pensamos que la interacción entre este receptor y el α_{1B} -AR pudiera también estar relacionado en la regulación de la señal de ambos receptores (Jordan et al., 2003). Finalmente, la interacción entre el receptor y los miembros 1, 2 y 3 de la familia STAT que participan en la vía de señalización de JAK-STAT, involucrada en la transcripción del RNAm y en la síntesis de nuevas proteínas involucradas en la proliferación, inmunidad, apoptosis, y diferenciación celular. Al igual que la vía de señalización del receptor, la vía JAK-STAT también integra la vía de las MAP cinasas a través de la fosforilación de las proteínas STAT por la cinasa MAPK (cinasa que participa en la cascada de fosforilación de ERK), aumentando la transcripción de genes (Winston & Hunter, 1996). En trabajos de otros grupos de investigación se demostró que la vía de señalización JAK-STAT es activada por el estímulo de algunos GPCRs como el receptor de angiotensina II tipo I y los receptores α_1 adrenérgicos a través de su asociación de proteínas G ($G_{\alpha s}$ y $G_{\alpha i}$), la activación de GTPasas pequeñas, por su asociación entre las proteínas STAT y el receptor a través de proteínas de andamiaje y por la activación de cinasas dependientes de segundos mensajeros como la PKC (Gong et al., 2007).

9. Conclusiones

Los datos obtenidos en este trabajo indican que los cinco sitios de fosforilación para el receptor α_{1B} -AR humano comparten papeles funcionales similares a los descritos en el ortólogo de hámster. Esto se explica porque al igual del ortólogo de hámster estas serinas juegan un papel importante en la desensibilización del receptor, especialmente en la desensibilización heteróloga, es decir, por factores no relacionados con el agonista. En cuanto a la fosforilación del receptor, al cambiar estos residuos se produce una disminución en la fosforilación total del receptor, sobre todo cuando se modifican las cinco serinas. Sin embargo, en ambos casos aún se percibió fosforilación remanente tanto en el receptor en estado basal, así como también, bajo las distintas condiciones que provocan un incremento en la fosforilación del receptor. Otro papel que tienen estas cinco serinas es la de regular la señalización del receptor ya que las distintas variantes mostraron un incremento de la vía de señalización de las MAP cinasas, un efecto parecido al reportado con el receptor α_{1D} -AR.

Aunque no está del todo esclarecido el mecanismo del tráfico vesicular del receptor α_{1B} -AR, en este trabajo se demostró que la fosforilación del receptor por GRK2 es un paso crucial para que el receptor se asocie a endosomas tempranos a través de su interacción con Rab5 durante la desensibilización homóloga del receptor. Así mismo, demostramos que los tres residuos que se fosforilan por GRK2 participan en dicha interacción entre el receptor y la Rab5. Sin embargo, existe la posibilidad de la participación de más residuos fosforilados.

Finalmente, el mayor aporte de este trabajo fue la identificación de más sitios de fosforilación en el receptor α_{1B} -AR, los cuales se encontraron tanto en la región carboxilo terminal como también en la IL3. A través de nuestros experimentos pudimos establecer un “código de barras de fosforilación” el cual pudiera explicar la diversidad de respuestas celulares generadas por un receptor estimulado. Este código de fosforilación en las regiones intracelulares del receptor puede traducirse en diversas conformaciones estructurales que pudiera adoptar el receptor, las cuales pudieran permitirle unir y activar una gran variedad de proteínas.

10. Perspectivas

- Empleando la misma metodología usada en este trabajo, generar variantes del receptor α_{1B} -AR, pero de los sitios de fosforilación identificados por MS y estudiar el papel que tienen estos sitios en la regulación de la señal del receptor.
- Realizar ensayos de FRET para determinar en que regiones del receptor fosforilados interactúan las proteínas Rab 5 y 9 durante la desensibilización del receptor.
- Estudiar el motivo de fosforilación para la unión con β -arrestina y su implicación en la activación de la vía de señalización de las MAP cinasas.
- Estudiar el posible papel que pudieran tener las proteínas que se asocian al receptor α_{1B} -AR y que están involucradas en la internalización y en el tráfico vesicular.

11. Bibliografía

Aggerbeck, M., Guellaen, G., & Hanoune, J. (1980). Adrenergic receptor of the alpha 1-subtype mediates the activation of the glycogen phosphorylase in normal rat liver. *Biochemical Pharmacology*, 29(4), 643–645. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(80\)90389-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(80)90389-5)

Akinaga, J., García-Sáinz, J. A., & S. Pupo, A. (2019). Updates in the function and regulation of α 1-adrenoceptors. *British Journal of Pharmacology*, 176(14), 2343–2357. <https://doi.org/10.1111/bph.14617>

Alfonzo-Méndez, M. A., Carmona-Rosas, G., Hernández-Espinosa, D. A., Romero-Ávila, M. T., & García-Sáinz, J. A. (2018a). Different phosphorylation patterns regulate α 1D-adrenoceptor signaling and desensitization. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1865(6), 842–854. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.03.006>

Alfonzo-Méndez, M. A., Carmona-Rosas, G., Hernández-Espinosa, D. A., Romero-Ávila, M. T., & García-Sáinz, J. A. (2018b). Different phosphorylation patterns regulate α (1D)-adrenoceptor signaling and desensitization. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1865(6), 842–854. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.03.006>

Avendaño-Vázquez, S. E., García-Caballero, A., & García-Sáinz, J. A. (2005). Phosphorylation and desensitization of the lysophosphatidic acid receptor LPA1. *Biochemical Journal*, 385(3), 677–684. <https://doi.org/10.1042/BJ20040891>

Baidya, M., Kumari, P., Dwivedi-Agnihotri, H., Pandey, S., Chaturvedi, M., Stepniwski, T. M., Kawakami, K., Cao, Y., Laporte, S. A., Selent, J., Inoue, A., & Shukla, A. K. (2020). Key phosphorylation sites in GPCR s orchestrate the contribution of β -Arrestin 1 in ERK 1/2 activation . *EMBO Reports*, 21(9), 1–17. <https://doi.org/10.15252/embr.201949886>

Beausoleil, S. A., Villén, J., Gerber, S. A., Rush, J., & Gygi, S. P. (2006). A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization. *Nature Biotechnology*, 24(10), 1285–1292.

<https://doi.org/10.1038/nbt1240>

Béthune, J., Kol, M., Hoffmann, J., Reckmann, I., Brügger, B., & Wieland, F. (2006). Coatamer, the coat protein of COPI transport vesicles, discriminates endoplasmic reticulum residents from p24 proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 26(21), 8011–8021. <https://doi.org/10.1128/MCB.01055-06>

Björklöf, K., Lundström, K., Abuin, L., Greasley, P. J., & Cotecchia, S. (2002). Co- and posttranslational modification of the alpha(1B)-adrenergic receptor: effects on receptor expression and function. *Biochemistry*, 41(13), 4281–4291. <https://doi.org/10.1021/bi015790j>

Blumenthal, D. K. (2017). Pharmacodynamics: Molecular Mechanisms of Drug Action. In L. L. Brunton, R. Hilal-Dandan, & B. C. Knollmann (Eds.), *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13e. McGraw-Hill Education. <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1162532908>

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. <https://doi.org/10.1038/srep22495>

Bray, L., Froment, C., Pardo, P., Candotto, C., Burlet-Schiltz, O., Zajac, J. M., Mollereau, 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.612614>

Busillo, J. M., Armando, S., Sengupta, R., Meucci, O., Bouvier, M., & Benovic, J. L. (2010). Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 285(10), 7805–7817. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.091173>

Butcher, A. J., 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(13), 11506–11518. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.154526>

Carmona-Rosas, G., Hernández-Espinosa, D. A., Alcántara-Hernández, R., Alfonso-Méndez, M. A., & García-Sainz, J. A. (2019). Distinct phosphorylation sites/clusters in the carboxyl terminus regulate α 1D-adrenergic receptor subcellular localization and signaling. *Cellular Signalling*, *53*, 374–389.

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

Caunt, C. J., Finch, A. R., Sedgley, K. R., & McArdle, C. A. (2006). Seven-transmembrane receptor signalling and ERK compartmentalization. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *17*(7), 276–283.

<https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.07.008>

Chen, C., Chiu, Y.-T., Wu, W., Huang, P., Mann, A., Schulz, S., & Liu-Chen, L.-Y. (2016). Determination of sites of U50,488H-promoted phosphorylation of the mouse κ opioid receptor (KOPR): disconnect between KOPR phosphorylation and internalization. *The Biochemical Journal*, *473*(4), 497–508.

<https://doi.org/10.1042/BJ20141471>

Chen, X., Bai, B., Tian, Y., Du, H., & Chen, J. (2014). Identification of serine 348 on the apelin receptor as a novel regulatory phosphorylation site in apelin-13-induced G protein-independent biased signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(45), 31173–31187. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.574020>

Choudhury, A., Marks, D. L., & Pagano, R. E. (2005). Use of Rab GTPases to study lipid trafficking in normal and sphingolipid storage disease fibroblasts. *Methods in Enzymology*, *403*, 166–182. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)03014-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)03014-4)

Collins, B. M., Skinner, C. F., Watson, P. J., Seaman, M. N. J., & Owen, D. J. (2005). Vps29 has a phosphoesterase fold that acts as a protein interaction scaffold for retromer assembly. *Nature Structural & Molecular Biology*, *12*(7), 594–602.

<https://doi.org/10.1038/nsmb954>

Cotecchia, S. (2007). Constitutive activity and inverse agonism at the α 1adrenoceptors. *Biochemical Pharmacology*, *73*(8), 1076–1083.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.10.024>

Cotecchia, S., Björklöf, K., Rossier, O., Stanasila, L., Greasley, P., & Fanelli, F. (2002). The α 1b-adrenergic receptor subtype: Molecular properties and physiological

implications. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 22(1–4), 1–16.

<https://doi.org/10.1081/RRS-120014585>

Diviani, D., Lattion, A. L., & Cotecchia, S. (1997). Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein- coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the $\alpha(1B)$ -adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 272(45), 28712–28719. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28712>

Docherty, J. R. (2010). Subtypes of functional $\alpha 1$ -adrenoceptor. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(3), 405–417. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0174-4>

Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 857–902.

<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>

Doronin, S., Lin, F., Wang, H. Y., & Malbon, C. C. (2000). The full-length, cytoplasmic C-terminus of the $\beta 2$ -adrenergic receptor expressed in *E. coli* acts as a substrate for phosphorylation by protein kinase A, insulin receptor tyrosine kinase, GRK2, but not protein kinase C and suppresses desensitization when ex. *Protein Expression and Purification*, 20(3), 451–461. <https://doi.org/10.1006/prev.2000.1322>

Ferguson, S. S. G. (2007). Phosphorylation-independent attenuation of GPCR signalling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(4), 173–179.

<https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.02.008>

Fredriksson, R., & Schiöth, H. B. (2005). The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Molecular Pharmacology*, 67(5), 1414–1425.

<https://doi.org/10.1124/mol.104.009001>

Gao, S., Malbon, C., & Wang, H. Y. (2014). Probing the stoichiometry of $\beta 2$ -adrenergic receptor phosphorylation by targeted mass spectrometry. *Journal of Molecular Signaling*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1750-2187-9-3>

García-Sáinz, J. A., Gottfried-Blackmore, A., Vázquez-Prado, J., & Romero-Avila, M. T. (1999). Protein kinase C-mediated phosphorylation and desensitization of human $\alpha(1b)$ -adrenoceptors. *European Journal of Pharmacology*, 385(2–3), 263–271.

[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00629-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00629-9)

García-Sáinz, J. A., Hasler, A. K., & Fain, J. N. (1980). Alpha1-adrenergic activation of phosphatidylinositol labeling in isolated brown fat cells. *Biochemical Pharmacology*, 29(24), 3330–3333. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(80\)90313-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(80)90313-5)

GARCÍA-SÁINZ, J. A., VÁZQUEZ-CUEVAS, F. G., & ROMERO-ÁVILA, M. T. (2001). Phosphorylation and desensitization of α 1d-adrenergic receptors. *Biochemical Journal*, 353(3), 603–610. <https://doi.org/10.1042/bj3530603>

Gilman, A. G. (1987). *gilman1987 G PR.OTEINS TRANSDUCERS OF.*

Goldsmith, Z. G., & Dhanasekaran, D. N. (2007). G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene*, 26(22), 3122–3142. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210407>

Gong, K., Zhang, H., Du, J., & Zhang, Y. (2007). Crosstalk between signaling pathways of adrenoreceptors and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) in heart. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28(2), 153–165. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00525.x>

Goodman, O., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H., & Benovic, J. L. (1996). *P-Arrestin acts as a clathrin*. 383(October), 447–450.

Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, 260(6), 3440–3450. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)83641-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)83641-4)

Guzmán-Silva, A., Martínez-Morales, J. C., Medina, L. D. C., Romero-Ávila, M. T., Villegas-Comonfort, S., Solís, K. H., & García-Sáinz, J. A. (2022). Mutation of putative phosphorylation sites in the free fatty acid receptor 1: Effects on signaling, receptor phosphorylation, and internalization. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 545, 111573. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2022.111573>

Homan, K. T., Wu, E., Wilson, M. W., Singh, P., Larsen, S. D., & Tesmer, J. J. G. (2014). Structural and Functional Analysis of G Protein-Coupled Receptor Kinase Inhibition by Paroxetine and a Rationally Designed Analog. *Molecular Pharmacology*, 85(2), 237–248. <https://doi.org/10.1124/mol.113.089631>

Hopkins, A. L., & Groom, C. R. (2002). The druggable genome. In *Nature reviews*.

Drug discovery (Vol. 1, Issue 9, pp. 727–730). <https://doi.org/10.1038/nrd892>

Hunyady, L., Baukal, A. J., Gáborik, Z., Olivares-Reyes, J. A., Bor, M., Szaszák, M., Lodge, R., Catt, K. J., & Balla, T. (2002). Differential PI 3-kinase dependence of early and late phases of recycling of the internalized AT1 angiotensin receptor. *Journal of Cell Biology*, *157*(7), 1211–1222. <https://doi.org/10.1083/jcb.200111013>

Jain, R., Watson, U., Vasudevan, L., & Saini, D. K. (2018). ERK Activation Pathways Downstream of GPCRs. *International Review of Cell and Molecular Biology*, *338*, 79–109. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.02.003>

Jordan, B. A., Gomes, I., Rios, C., Filipovska, J., & Devi, L. A. (2003). Functional interactions between mu opioid and alpha 2A-adrenergic receptors. *Molecular Pharmacology*, *64*(6), 1317–1324. <https://doi.org/10.1124/mol.64.6.1317>

Jordens, I., Marsman, M., Kuijl, C., & Neefjes, J. (2005). Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic*, *6*(12), 1070–1077. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00336.x>

Keffel, S., Alexandrov, A., Goepel, M., & Michel, M. C. (2000). α 1-Adrenoceptor subtypes differentially couple to growth promotion and inhibition in Chinese hamster ovary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *272*(3), 906–911. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2850>

Kloer, D. P., Rojas, R., Ivan, V., Moriyama, K., Van Vlijmen, T., Murthy, N., Ghirlando, R., Van Der Sluijs, P., Hurley, J. H., & Bonifacino, J. S. (2010). Assembly of the biogenesis of lysosome-related organelles complex-3 (BLOC-3) and its interaction with Rab9. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(10), 7794–7804. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.069088>

Kobilka, B. (2013). The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (Nobel Lecture). In *Angewandte Chemie (International ed. in English)* (Vol. 52, Issue 25, pp. 6380–6388). <https://doi.org/10.1002/anie.201302116>

Kolakowski, L. F. (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors & Channels*, *2*(1), 1–7. <http://europepmc.org/abstract/MED/8081729>

Komolov, K. E., & Benovic, J. L. (2018). G protein-coupled receptor kinases: Past,

present and future. *Cellular Signalling*, 41, 17–24.

<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.07.004>

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), 13084–13087.

Krushkal, J., Xiong, M., Ferrell, R., Sing, C. F., Turner, S. T., & Boerwinkle, E. (1998). Linkage and association of adrenergic and dopamine receptor genes in the distal portion of the long arm of chromosome 5 with systolic blood pressure variation. *Human Molecular Genetics*, 7(9), 1379–1383. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.9.1379>

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Lattion, A. L., Diviani, D., & Cotecchia, S. (1994a). Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the $\alpha(1B)$ -adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 269(36), 22887–22893.

[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)31728-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)31728-3)

Lattion, A. L., Diviani, D., & Cotecchia, S. (1994b). Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the alpha 1B-adrenergic receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(36), 22887–22893.

Lee, K. A. (2002). Mass spectrometric analysis of the kinetics of in vivo rhodopsin phosphorylation. *Protein Science*, 11(4), 862–874. <https://doi.org/10.1110/ps.3870102>

Lefkowitz, R. J. (1998). G protein-coupled receptors: III. New roles for receptor kinases and β - arrestins in receptor signaling and desensitization. *Journal of Biological Chemistry*, 273(30), 18677–18680. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.30.18677>

Martínez-Morales, J. C., Romero-Ávila, M. T., Reyes-Cruz, G., & García-Sáinz, J. A. (2021). Roles of receptor phosphorylation and Rab proteins in G protein-coupled receptor function and trafficking. *Molecular Pharmacology*.

<https://doi.org/10.1124/molpharm.121.000429>

Martínez-Morales, J. C., Teresa Romero-Ávila, M., Reyes-Cruz, G., & Adolfo García-Sáinz, J. (2018). S1P1 receptor phosphorylation, internalization, and interaction with

Rab proteins: Effects of sphingosine 1-phosphate, FTY720-P, phorbol esters, and paroxetine. *Bioscience Reports*, 38(6), 11–17. <https://doi.org/10.1042/BSR20181612>

Mayer, D., Damberger, F. F., Samarasimhareddy, M., Feldmueller, M., Vuckovic, Z., Flock, T., Bauer, B., Mutt, E., Zosel, F., Allain, F. H. T., Standfuss, J., Schertler, G. F. X., Deupi, X., Sommer, M. E., Hurevich, M., Friedler, A., & Veprintsev, D. B. (2019). Distinct G protein-coupled receptor phosphorylation motifs modulate arrestin affinity and activation and global conformation. *Nature Communications*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09204-y>

McCune, D. F., Edelman, S. E., Olges, J. R., Post, G. R., Waldrop, B. A., Waugh, D. J. J., Perez, D. M., & Piascik, M. T. (2000). Regulation of the cellular localization and signaling properties of the $\alpha(1B)$ - and $\alpha(1D)$ -adrenoceptors by agonists and inverse agonists. *Molecular Pharmacology*, 57(4), 659–666. <https://doi.org/10.1124/mol.57.4.659>

McDonald, P. H., Cote, N. L., Lin, F. T., Premont, R. T., Pitcher, J. A., & Lefkowitz, R. J. (1999). Identification of NSF as a beta-arrestin1-binding protein. Implications for beta2-adrenergic receptor regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(16), 10677–10680. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.16.10677>

Mhaouty-kodja, S., Barak, L. S., Scheer, A., Abuin, L., Diviani, D., Caron, M. G., & Cotecchia, S. (1999). *Constitutively Active Alpha -1b Adrenergic Receptor Mutants Display Different Phosphorylation and Internalization Features*. 347, 339–347.

Moore, C. A. C., Milano, S. K., & Benovic, J. L. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annual Review of Physiology*, 69, 451–482. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154712>

Moulédous, L., Froment, C., Burlet-Schiltz, O., Schulz, S., & Mollereau, C. (2015). Phosphoproteomic analysis of the mouse brain mu-opioid (MOP) receptor. *FEBS Letters*, 589(18), 2401–2408. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.07.025>

Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*, 80(2), 249–257. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90407-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90407-7)

Nobles, K. N., Xiao, K., Ahn, S., Shukla, A. K., Lam, C. M., Rajagopal, S., Strachan, R.

T., Huang, T.-Y., Bressler, E. A., Hara, M. R., Shenoy, S. K., Gygi, S. P., & Lefkowitz, R. J. (2011). Distinct phosphorylation sites on the $\beta(2)$ -adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin. *Science Signaling*, *4*(185), ra51. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001707>

Nørskov-Lauritsen, L., & Bräuner-Osborne, H. (2015). Role of post-translational modifications on structure, function and pharmacology of class C G protein-coupled receptors. *European Journal of Pharmacology*, *763*, 233–240.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.05.015>

Ohguro, H., Van Hooser, J. P., Milam, A. H., & Palczewski, K. (1995). Rhodopsin phosphorylation and dephosphorylation in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(24), 14259–14262. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.24.14259>

Oldham, W. M., & Hamm, H. E. (2006). Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, *39*(2), 117–166.

<https://doi.org/10.1017/S0033583506004306>

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.

<https://doi.org/10.1038/nrm2299>

Paul, J., Bylund, B., Lefkowitz, J., Eikenburg, C., Ruffolo, R., Langer, Z., & Minneman, P. (1995). *of Pharmacology*. 1990, 267–270.

Perez, D. M., DeYoung, M. B., & Graham, R. M. (1993). Coupling of expressed alpha 1B- and alpha 1D-adrenergic receptor to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific. *Molecular Pharmacology*, *44*(4), 784–795.

Premont, R. T. (2020). *Keys to the Kingdom : GPCR phosphorylation patterns direct b-arrestin*. August, 2–4. <https://doi.org/10.15252/embr.202051249>

Rajagopal, S., Rajagopal, K., & Lefkowitz, R. J. (2010). Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *9*(5), 373–386. <https://doi.org/10.1038/nrd3024>

Ribas, C., Penela, P., Murga, C., Salcedo, A., García-Hoz, C., Jurado-Pueyo, M., Aymerich, I., & Mayor, F. (2007). The G protein-coupled receptor kinase (GRK)

interactome: Role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1768(4), 913–922.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.09.019>

Schwartz, S. L., Cao, C., Pylypenko, O., Rak, A., & Wandinger-Ness, A. (2007). Rab GTPases at a glance. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 22), 3905–3910.

<https://doi.org/10.1242/jcs.015909>

Segura, V., Pérez-Aso, M., Montó, F., Carceller, E., Noguera, M. A., Pediani, J., Milligan, G., McGrath, I. C., & D'Ocon, P. (2013). Differences in the Signaling Pathways of α 1A- and α 1B-Adrenoceptors Are Related to Different Endosomal Targeting. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064996>

Shaw, P. E., & Saxton, J. (2003). Ternary complex factors: Prime nuclear targets for mitogen-activated protein kinases. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 35(8), 1210–1226. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00031-1](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00031-1)

Shen, A., Nieves-Cintrón, M., Deng, Y., Shi, Q., Chowdhury, D., Qi, J., Hell, J. W., Navedo, M. F., & Xiang, Y. K. (2018). Functionally distinct and selectively phosphorylated GPCR subpopulations co-exist in a single cell. *Nature Communications*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03459-7>

Shi, H., Rojas, R., Bonifacino, J. S., & Hurley, J. H. (2006). The retromer subunit Vps26 has an arrestin fold and binds Vps35 through its C-terminal domain. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(6), 540–548. <https://doi.org/10.1038/nsmb1103>

Shukla, A. K., Manglik, A., Kruse, A. C., Xiao, K., Reis, R. I., Tseng, W., Staus, D. P., Hilger, D., Uysal, S., Huang, L., Tripathi-shukla, P., Koide, A., Koide, S., Weis, W. I., Kossiakoff, A., Kobilka, B. K., Lefkowitz, R. J., Carolina, N., Physiology, C., & Carolina, N. (2013). *HHS Public Access*. 497(7447), 137–141.

<https://doi.org/10.1038/nature12120>.Structure

Signaling, A., Latorraca, N. R., Masureel, M., Hollingsworth, S. A., Bouvier, M., Kobilka, B. K., & Dror, R. O. (2020). Article How GPCR Phosphorylation Patterns Orchestrate Arrestin-Mediated Signaling. *Cell*, 183(7), 1813-1825.e18.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.014>

Sönnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J., & Zerial, M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *Journal of Cell Biology*, *149*(4), 901–913.

<https://doi.org/10.1083/jcb.149.4.901>

Stanasila, L., Abuin, L., Diviani, D., & Cotecchia, S. (2006). Ezrin directly interacts with the alpha1b-adrenergic receptor and plays a role in receptor recycling. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(7), 4354–4363. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511989200>

Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *10*(8), 513–525. <https://doi.org/10.1038/nrm2728>

Stevens, P. A., Padiani, J., Carrillo, J. J., & Milligan, G. (2001). Coordinated agonist regulation of receptor and G protein palmitoylation and functional rescue of palmitoylation-deficient mutants of the G protein G11 α following fusion to the α 1b-adrenoreceptor: Palmitoylation of G11 α is not required for interaction with. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(38), 35883–35890. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103816200>

Strakova, K., Kowalski-Jahn, M., Gybel, T., Valnohova, J., Dhople, V. M., Harnos, J., Bernatik, O., Ganji, R. S., Zdrahal, Z., Mulder, J., Lindskog, C., Bryja, V., & Schulte, G. (2018). Dishevelled enables casein kinase 1–mediated phosphorylation of Frizzled 6 required for cell membrane localization. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(48), 18477–18493. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004656>

Takei, K., Slepnev, V. I., Haucke, V., & De Camilli, P. (1999). Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nature Cell Biology*, *1*(1), 33–39. <https://doi.org/10.1038/9004>

Terzic, A., Pucéat, M., Vassort, G., & Vogel, S. M. (1993). Cardiac alpha 1-adrenoceptors: an overview. *Pharmacological Reviews*, *45*(2), 147–175.

Thal, D. M., Homan, K. T., Chen, J., Wu, E. K., Hinkle, P. M., Huang, M., Chuprun, J. K., Song, J., Gao, E., Cheung, J. Y., Sklar, A., Koch, W. J., & Tesmer, J. J. G. (2013). *NIH Public Access*. *7*(11), 1830–1839. <https://doi.org/10.1021/cb3003013>. Paroxetine

Tobin, A. B., Butcher, A. J., & Kong, K. C. (2008). Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling.

Trends in Pharmacological Sciences, 29(8), 413–420.

<https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.05.006>

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. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(02\)00151-1](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(02)00151-1)

Vázquez-Prado, J., Medina, L. D. C., & García-Sáinz, J. A. (1997). Activation of endothelin ET(A) receptors induces phosphorylation of $\alpha(1b)$ -adrenoreceptors in rat-1 fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 272(43), 27330–27337.

<https://doi.org/10.1074/jbc.272.43.27330>

Villalobos-Molina, R, Vázquez-Cuevas, F. G., López-Guerrero, J. J., Figueroa-García, M. C., Gallardo-Ortiz, I. A., Ibarra, M., Rodríguez-Sosa, M., Gonzalez, F. J., & Elizondo, G. (2008). Vascular α -1D-adrenoceptors are overexpressed in aorta of the aryl hydrocarbon receptor null mouse: role of increased angiotensin II. *Autonomic & Autacoid Pharmacology*, 28(2–3), 61–67. <https://doi.org/10.1111/j.1474-8673.2008.00418.x>

Villalobos-Molina, Rafael, & Ibarra, M. (1999). Vascular $\alpha(1D)$ -adrenoceptors: Are they related to hypertension? *Archives of Medical Research*, 30(5), 347–352.

[https://doi.org/10.1016/S0188-0128\(99\)00047-0](https://doi.org/10.1016/S0188-0128(99)00047-0)

Waldrop, B. A., Mastalerz, D., Piascik, M. T., & Post, G. R. (2002). α 1B- and α 1D-adrenergic receptors exhibit different requirements for agonist and mitogen-activated protein kinase activation to regulate growth responses in Rat 1 fibroblasts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300(1), 83–90.

<https://doi.org/10.1124/jpet.300.1.83>

Wang, C., Niu, M., Zhou, Z., Zheng, X., Zhang, L., Tian, Y., Yu, X., Bu, G., Xu, H., Ma, Q., & Zhang, Y.-W. (2016). VPS35 regulates cell surface recycling and signaling of dopamine receptor D1. *Neurobiology of Aging*, 46, 22–31.

<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.05.016>

Wang, G., Wei, Z., & Wu, G. (2018). Role of Rab GTPases in the export trafficking of G protein-coupled receptors. *Small GTPases*, 9(1–2), 130–135.

<https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1277000>

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., & Johnson, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: Conservation of a three-kinase module from yeast to human.

Physiological Reviews, 79(1), 143–180. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.143>

Winston, L. A., & Hunter, T. (1996). Intracellular signalling: putting JAKs on the kinase MAP. *Current Biology: CB*, 6(6), 668–671. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(09\)00445-x](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(09)00445-x)

Zerial, M., & McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(2), 107–117. <https://doi.org/10.1038/35052055>

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., ... Xu, H. E. (2017). Identification of Phosphorylation Codes for Arrestin Recruitment by G Protein-Coupled Receptors. *Cell*, 170(3), 457-469.e13.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.002>

Zhu, G., Zhai, P., Liu, J., Terzyan, S., Li, G., & Zhang, X. C. (2004). Structural basis of Rab5-Rabaptin5 interaction in endocytosis. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(10), 975–983. <https://doi.org/10.1038/nsmb832>

11. Anexos

Anexo I: Plásmidos utilizados en este trabajo de tesis

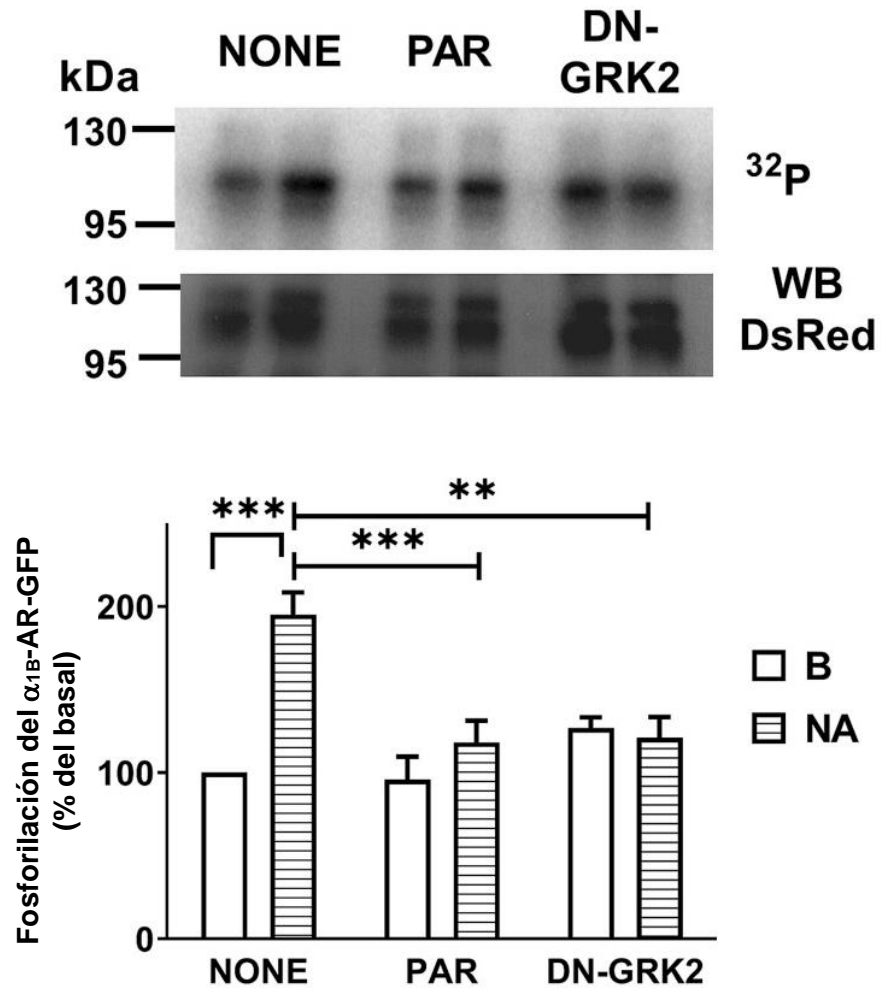
Plásmido	Descripción	Resistencia
p $\alpha_{1B}h$ -EGFP-N1-TREx	Fusión del receptor α_{1B} -AR humano – GFP. Sist. T-REx	Ampicilina
p $\alpha_{1B}h$ -EGFP-N1-TREx S396/400A	Fusión del receptor α_{1B} -AR humano – GFP con S396A y S400A en el carboxilo terminal. Sist. T-REx	Ampicilina
p $\alpha_{1B}h$ -EGFP-N1-TREx S406/410/412A	Fusión del receptor α_{1B} -AR humano – GFP con S406A, S410A y 412 en el carboxilo terminal. Sist. T-REx	Ampicilina
p $\alpha_{1B}h$ -EGFP-N1-TREx S396/400/406/410/412A	Fusión del receptor α_{1B} -AR humano – GFP con S396A, S400A, S406A, S410A y 412 en el carboxilo terminal. Sist. T-REx	Ampicilina
p $\alpha_{1B}h$ -DsRed-Monomero-N1	Fusión del receptor α_{1B} -AR humano - DsRed	Kanamicina
p $\alpha_{1B}h$ -DsRed-Monomero-N1 S406/410/412A	Fusión del receptor α_{1B} -AR humano – DsRed con S406A, S410A y 412 en el carboxilo terminal	Kanamicina

Anexo II: Líneas celulares generadas durante el trabajo de tesis

Plásmido	Línea celular	Descripción	Sistema
p $\alpha_{1B}h$ -EGFP-N1-TREx	HEK293	Expresa el receptor α_{1B} -AR humano – GFP	T-REx
p $\alpha_{1B}h$ -EGFP-N1-TREx S396/400A	HEK293	Expresa el receptor α_{1B} -AR humano – GFP con S396A y S400A en el carboxilo terminal	T-REx
p $\alpha_{1B}h$ -EGFP-N1-TREx S406/410/412A	HEK293	Expresa el receptor α_{1B} -AR humano – GFP con S406A, S410A y 412 en el carboxilo terminal	T-REx
p $\alpha_{1B}h$ -EGFP-N1-TREx S396/400/406/410/412A	HEK293	Expresa el receptor α_{1B} -AR humano – GFP con S396A, S400A, S406A, S410A y 412 en el carboxilo terminal.	T-REx
p $\alpha_{1B}h$ -DsRed-Monomero-N1	HEK293	Expresa el receptor α_{1B} -AR humano - DsRed	G418
p $\alpha_{1B}h$ -DsRed-Monomero-N1 S406/410/412A	HEK293	Expresa el receptor α_{1B} -AR humano – DsRed con S406A, S410A y 412 en el carboxilo terminal	G418

Anexo III: Inhibición de la fosforilación del receptor α_1B -AR por paroxetina y la expresión de la DN-GRK2

Efecto de las distintas condiciones experimentales en la fosforilación del receptor α_1B -AR, unida a la DsRed, por NA.



Anexo VI: Artículos publicados durante el desarrollo de este trabajo

El alumno contribuyó en los siguientes trabajos durante su doctorado en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Alcántara-Hernández, R., Carmona-Rosas, G., Hernández-Espinosa, D. A., & García-Sáinz, J. A. (2020). Glycogen Synthase Kinase-3 modulates $\alpha(1A)$ -adrenergic receptor action and regulation. *European Journal of Cell Biology*, 99(2–3), 151072. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151072>

Alfonzo-Méndez, M. A., Carmona-Rosas, G., Hernández-Espinosa, D. A., Romero-Ávila, M. T., & García-Sáinz, J. A. (2018a). Different phosphorylation patterns regulate $\alpha(1D)$ -adrenoceptor signaling and desensitization. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1865(6), 842–854. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.03.006>

Alfonzo-Méndez, M. A., Carmona-Rosas, G., Hernández-Espinosa, D. A., Romero-Ávila, M. T., & García-Sáinz, J. A. (2018b). Different phosphorylation patterns regulate $\alpha(1D)$ -adrenoceptor signaling and desensitization. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1865(6), 842–854. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.03.006>

Alfonzo-Méndez, M. A., Hernández-Espinosa, D. A., Carmona-Rosas, G., Romero-Ávila, M. T., Reyes-Cruz, G., & García-Sáinz, J. A. (2017). Protein kinase C activation promotes $\alpha(1B)$ -adrenoceptor internalization and late endosome trafficking through Rab9 interaction. Role in heterologous desensitization. *Molecular Pharmacology*, 91(4), 296–306. <https://doi.org/10.1124/mol.116.106583>

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. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2018.04.001>

Carmona-Rosas, G., Alcántara-Hernández, R., & Hernández-Espinosa, D. A. (2019). The role of β -arrestins in G protein-coupled receptor heterologous desensitization: A brief story. *Methods in Cell Biology*, 149, 195–204. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.08.004>

Carmona-Rosas, G., Hernández-Espinosa, D. A., Alcántara-Hernández, R., Alfonso-Méndez, M. A., & García-Sáinz, J. A. (2019a). Distinct phosphorylation sites/clusters in the carboxyl terminus regulate $\alpha(1D)$ -adrenergic receptor subcellular localization and signaling. *Cellular Signalling*, 53(September 2018), 374–389. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.11.003>

Carmona-Rosas, G., Hernández-Espinosa, D. A., Alcántara-Hernández, R., Alfonso-Méndez, M. A., & García-Sáinz, J. A. (2019b). Distinct phosphorylation sites/clusters in the carboxyl terminus regulate $\alpha(1D)$ -adrenergic receptor subcellular localization and signaling. *Cellular Signalling*, 53, 374–389. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.11.003>

Hernández-Espinosa, D. A., Carmona-Rosas, G., Alfonzo-Méndez, M. A., Alcántara-Hernández, R., & García-Sáinz, J. A. (2019). Sites phosphorylated in human $\alpha(1B)$ -adrenoceptors in response to noradrenaline and phorbol myristate acetate. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1866(10), 1509–1519. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.07.006>

Hernández-Espinosa, D. A., Reyes-Cruz, G., & García-Sáinz, J. A. (2020). Roles of the G protein-coupled receptor kinase 2 and Rab5 in $\alpha(1B)$ -adrenergic receptor function and internalization. *European Journal of Pharmacology*, 867, 172846. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172846>



Sites phosphorylated in human α_{1B} -adrenoceptors in response to noradrenaline and phorbol myristate acetate

David A. Hernández-Espinosa, Gabriel Carmona-Rosas, Marco A. Alfonzo-Méndez, Rocío Alcántara-Hernández, 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

Phosphorylation of the human α_{1B} -adrenergic receptor (fused with the green fluorescent protein) was studied employing the inducible Flp-In HEK293 T-Rex system for expression. Serine/alanine substitutions were performed in five sites corresponding to those previously identified as phosphorylation targets in the hamster ortholog. Desensitization was decreased in these mutants but receptor phosphorylation was still clearly detected. The protein phosphorylation of the wild-type receptor (fused to the green fluorescent protein) was studied, using mass spectrometry, under baseline and stimulated conditions (noradrenaline or phorbol myristate acetate). Basal phosphorylation was detected at sites located at the intracellular loop 3 and carboxyl terminus, and the number of sites detected increased under agonist activation and stimulation of protein kinase C. The phosphorylation patterns differed under the distinct conditions. Three of the phosphorylation sites detected in this work corresponded to those observed in the hamster receptor. The phosphorylation sites detected included the following: a) at the intracellular loop 3: serines 246, 248, 257, 267, and 277; and threonines 252, 264, and 268, and b) at the carboxyl terminus: serines 396, 400, 402, 406, 423, 425, 427, 455, and 470, and threonines 387, 392, 420, and 475. Our data indicate that complex phosphorylation patterns exist and suggest the possibility that such differences could be relevant in receptor function and subcellular localization.

1. Introduction

G protein-coupled receptors (GPCR) are involved in a plethora of actions that maintain homeostasis, mediating the physiological action of a large variety of hormones, local hormones (autacoids), neurotransmitters and growth factors and also participate in the pathogenesis of many diseases. As indicated by their name, GPCR interact with G proteins, which modulate the activity of enzymes and ionic channels to exert their actions [1,2]. These receptors exhibit a characteristic structure constituted of an extracellular amino terminus, an intracellular carboxyl terminus (Ctail), and seven transmembrane domains joined by intracellular and extracellular loops [1,2].

GPCR phosphorylation appears to be a very early event that regulates the function of this large family of receptors and it is associated with the attenuation of receptor activity (desensitization) and internalization [3–5]. However, there is evidence of desensitization in the absence of receptor phosphorylation [3,6], and recent data indicate a

role of GPCR phosphorylation in membrane targeting/localization [7,8]. In addition, there is clear evidence indicating that desensitization is not limited to a decrease in GPCR signaling through a particular pathway but that in fact it represents a “switch” in which a pathway is attenuated while another (others) is (are) activated [4,9]. Frequently, such a switch involves the decrease of G protein-mediated signaling and the triggering of additional molecular events including, in addition to post-translational modifications of receptors and the resulting conformational changes, interaction with other molecular entities, such as β -arrestins [9,10].

Current data also indicate that the sites at which the phosphorylation of GPCR takes place is of great importance, since these might vary depending on the cell type in which they are expressed or on the agents that lead to a such covalent modification and, more importantly, that phosphorylation at different sites can lead to distinct functional outcomes and receptor localizations [11,12]. These general proposals have been denominated the “phosphorylation barcode hypothesis” [11,12].

Abbreviations: α_1 -AR, α_1 -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.2019.07.006>

Received 26 April 2019; Received in revised form 27 June 2019; Accepted 14 July 2019

Available online 17 July 2019

0167-4889/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

In many cases, this involves receptor's phosphorylation at both Ctail and intracellular loop 3 (IL3) residues (see for example [7,13–21]).

α_1 -Adrenergic receptors (α_1 -AR) constitute a subfamily of GPCR composed of three members, the α_{1A} , the α_{1B} , and the α_{1D} -AR [22–24]. All of these couple to Gq and exert their actions mainly through the inositol trisphosphate/diacylglycerol/calcium signaling pathway [22,23], although other signaling processes also appear to participate in their actions [25]. It is well-known that the three receptor subtypes are phosphorylated in response to agonists and the pharmacological or physiological activation of protein kinase C (PKC) [7,19,20,23,26–33]. The α_{1B} -AR subtype was the first receptor of this subfamily to be cloned [34] and it has been extensively studied. Pioneer contributions by Cotecchia and coworkers, using receptor mutants with deletions and mutagenesis of specific sites, together with functional studies, identified that relevant phosphorylation sites for hamster α_{1B} -AR are located in a cluster at the Ctail, which seem to be targeted by G protein-coupled receptor kinases (GRK) and PKC [30,32]. In addition, the group of Toews [35,36] has observed that, in the hamster receptor, two domains play key roles in receptor internalization/down regulation. Using deletions and site-directed mutagenesis, these authors observed that some mutated receptors internalize but do not down-regulate, other mutants that down-regulate without internalization, and that there are also receptors defective in both internalization and down-regulation [35].

Using mass spectrometry of purified receptors, we recently reported phosphorylation sites detected in human α_{1A} - [19] and α_{1D} -AR [7,20]. Interestingly, we observed differential phosphorylation of these receptor subtypes under distinct conditions (baseline, agonist stimulation, and activation of PKC) and detected that phosphorylation sites were present both at the Ctail and at the intracellular loop 3 (IL3) [7,19,20]. In the present work, again utilizing mass spectrometry, we examined the phosphorylation sites of the α_{1B} -AR subtype human ortholog and observed the following: 1) a large amount of phosphorylation sites located at both the Ctail and IL3 and 2) that the phosphorylation pattern varies under the different conditions employed. Our data suggest that the regulation of this receptor subtype is likely more complex than anticipated.

2. Materials and methods

2.1. Materials

(–)-Noradrenaline (NA), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), phentolamine, and propranolol were obtained from Sigma-Aldrich Chemical. [32 P]Pi (8500–9120 Ci/mmol) was obtained from Perkin-Elmer Life Sciences. Dulbecco's modified Eagle's medium, fetal bovine serum, trypsin, streptomycin, penicillin, amphotericin B, blasticidin, hygromycin B, doxycycline hyclate and Fura-2AM were purchased from Invitrogen-Life Technologies. Polyethyleneimine was obtained from PolyScience and GenJet was obtained from SignaGen Laboratories. Nitrocellulose 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) antibodies (catalog number 4695S, lot: 21) 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, including the peroxidase affiniPure Goat anti-mouse IgG light chain antibody. Antibody dilutions were 1:1000 for primary antibodies and 1:10,000 for secondary antibodies. Parental Flp-In T-Rex HEK293 cells and the plasmid, pOG44, were obtained from Invitrogen.

2.2. Receptor mutants, cells, and transfections

The plasmid for the expression of the human α_{1B} -AR fused at the Ctail with the enhanced green fluorescent protein (eGFP) was previously described [38]. The receptor construct was subcloned into pCDNA5/FRT/TO to employ the inducible Flp-In T-Rex expression system (Invitrogen), and the construct is referred as wild-type α_{1B} -AR. This was used as a template to generate the different mutants used; mutagenesis was commercially performed by Mutagenex, Inc. and proper changes were confirmed by sequencing (Mutagenex, Inc.).

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 GenJet 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 for 14–24 h. Cells 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. In all experiments using NA, 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).

2.3. Intracellular calcium determinations

Intracellular calcium concentrations were assessed as previously described [41,42]. Briefly, cells were serum-starved for 2 h, and then loaded with 2.5 μ M Fura-2/AM for 1 h at 37 °C, and cells were washed 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. [43].

2.4. Receptor phosphorylation

Receptor phosphorylation was performed as previously described [42]. 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 μ 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, Na₂HPO₄ 10 mM; pH 7.4) (PBS) and solubilized for 1 h in the lysis buffer described previously. 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 onto nitrocellulose membranes, and exposed for 18–24 h. The amount of phosphorylated receptor was assessed by PhosphorImager analysis, using the ImageQuant program. The average of the baseline values obtained in these experiments was considered as 100% and the error bar of the baselines corresponds to the dispersion of these values. Western blotting for loading controls was performed using a commercial monoclonal anti-eGFP antibody.

2.5. 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 [44]. Lysates were centrifuged at 12,700 \times g for 5 min, and proteins in supernatants were separated by SDS-PAGE. Proteins were electrotransferred onto nitrocellulose membranes and immunoblotting was performed. Duplicate samples were run in parallel to determine total- and phospho-ERK 1/2 levels. For data normalization, maximal response was considered as 100%.

2.6. α_{1B} -AR purification and mass spectrometry analysis

The procedure employed was similar to those employed for α_{1A} - and α_{1D} -AR [7,19,20]. Ten 10 cm-diameter dishes (90% confluence) of HEK 293 cells expressing the wild-type α_{1B} -AR-eGFP construct, per condition, were used in each experiment. Control experiments employing 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, leupeptin 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 [44] 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 the other 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, Cambridge, MA, USA). The second gel was used to confirm the presence of eGFP-tagged receptors by Western blotting. Four different purification-mass spectrometry experiments were performed. Ascore [45], a probability-based score, was employed. The program measures the probability of correct phosphorylation site localization, based on the presence and intensity of site-determining ions in the mass spectrometry spectra. 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 [45].

2.7. *In silico* analysis

Receptor sequences were obtained from the UniProt Knowledgebase [46]. 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>) [47] and the Group-based Prediction System, GPS 2.1 (<http://gps.biocuckoo.org/>) [48] on-line services, employing cut-off values of 0.75 and 4, respectively. Prediction of the probable protein kinases involved was obtained using GPS 2.1 [48].

2.8. 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 of < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results and discussion

As previously indicated, in the experiments of Cottechia and coworkers [30,32] the hamster α_{1B} -AR was studied. We centered our work on the human ortholog, mainly for its medical interest and also in order to compare the findings with what has been observed in the phosphorylation of human α_{1A} - and α_{1D} -AR [7,19,20]. Human α_{1B} -AR are phosphorylated in response to agonists and activation of PKC in a

comparable way to what has been observed with the hamster receptor, and the functional consequences of such phosphorylations are also alike [26]. This is hardly surprising considering that these orthologs are remarkably similar; i.e. overall identity is ~94.6%, with the human ortholog five amino acids larger than that of the hamster (520 amino acids vs. 515 in the hamster receptor). Amino acids 1–351, which comprise the main cores of these receptors (amino termini, the seven transmembrane domains, and the intracellular and extracellular loops) show notable similarity, exhibiting only three conservative and two semi-conservative substitutions (Supplementary Fig. S1). The Ctail domains of these receptors have more differences: i.e., five additional residues are present in the human ortholog as compared to the hamster, and conservative (10), semi-conservative (3) and non-conservative (5) substitutions are present (Supplementary Fig. S2; please note that alternative alignments are possible). However, the phosphorylation sites detected in the hamster receptor [30] are all conserved in the human ortholog (S396, 402, 406, 410, and 412) (Supplementary Fig. S2).

As an initial step in our work, we examined the possible roles of the sites of the human α_{1B} -AR, equivalent to those observed as phosphorylated in the hamster ortholog [30]. To achieve this goal, mutations of the putative phosphorylation sites were performed to the wild-type human α_{1B} -AR, as depicted in Supplementary Fig. S3, as well as receptor phosphorylation and functional studies (intracellular calcium determination and ERK 1/2 phosphorylation). The following receptors were generated: a) wild-type (no modification other than fusion to the eGFP). b) S396,402A (altering putative PKC sites, named PKC-m), c) S406,410,412A (altering putative GRK sites; named GRK-m), and d) S396,402,406,410,412A, altering these five sites (named PKC + GRK-m). Receptor expression was similar as reflected by fluorescence confocal microscopy (Supplementary Fig. S4) and Western blotting (see later).

β_2 -AR are known to be endogenously expressed in HEK 293 cells and their activation mobilizes intracellular calcium [49]; therefore, in all experiments in which NA was employed, the cells were also incubated in the presence of 10 μ M propranolol. As shown in Fig. 1A, cells expressing the wild-type receptor or any of the mutants studied increased intracellular calcium in response to NA in concentration-dependent fashion. This effect was blocked by 10 μ M phentolamine, as anticipated (data not shown; prazosin was not used due to its intrinsic fluorescence). The efficacy of the different receptors was similar (i.e., an increase in intracellular calcium of ~150–200 nM was observed), with the exception of the PKC + GRK-m mutant, which was in some of the experiments less responsive to NA (statistically insignificant); the potencies of NA were also similar (EC_{50} ~ 20–60 nM). In Fig. 1B, calcium transients in response to 10 μ M NA are presented. As can be observed the calcium response peaks were very similar (see also Fig. 1C); however, return to baseline was considerably slower in mutants with the putative GRK sites mutated, which resulted in significantly higher residual intracellular calcium values (determined at 100 s after agonist addition) (Fig. 1, panels B and C). These data are consistent with the idea that the receptor mutants are less susceptible to desensitization than the wild-type; i.e., the mutant receptors did not appear to desensitize as fast as the wild-type, which is in accordance with the data of Diviani et al. [30]. It has been suggested that α_{1B} -AR internalization diminish calcium signaling [50]. To what extent this plays a role in our experiments is unknown; however, vanishing of the NA-induced free calcium increases occurs within seconds, and changes in receptor internalization are hard to detect in this time frame.

The ability of PKC activation with PMA to desensitize α_{1B} -AR action was also tested with the different mutants. As shown in Fig. 2A, NA-induced increase in intracellular calcium was reduced (~50%) by preincubation for 5, 10, or 15 min with 1 μ M PMA in cells expressing the wild-type receptor. A similar effect was observed in the receptor mutant in which the putative sites for this kinase family were mutated to alanine (PKC-m) but the effect of PMA decreased with the incubation time (Fig. 2B). Interestingly, cells expressing receptors in which the

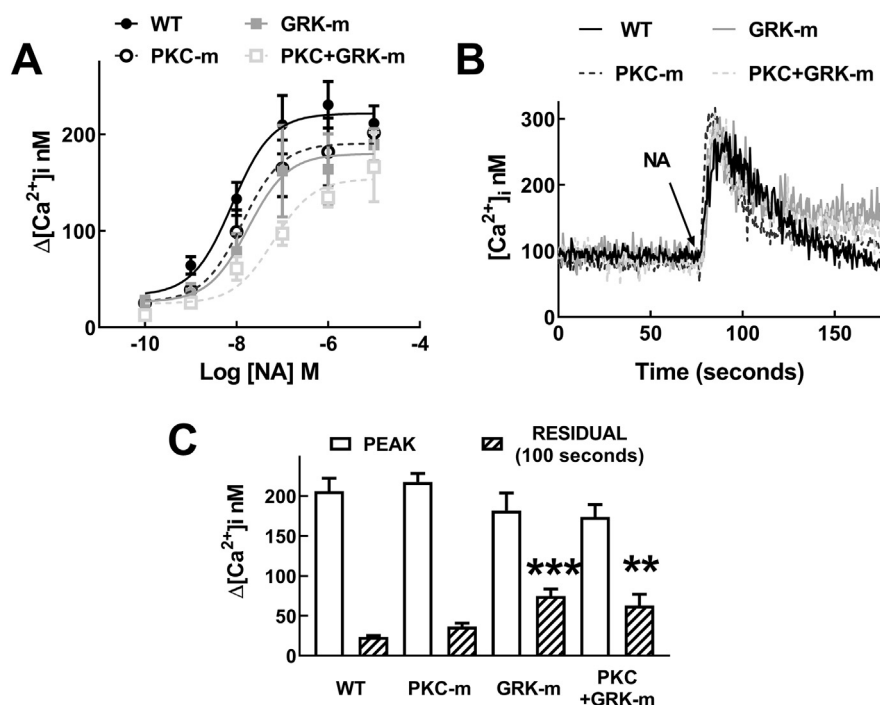


Fig. 1. NA-induced calcium response in cells expressing α_{1B} -AR mutants. Panel A. Cells expressing the different α_{1B} -AR-eGFP constructs were stimulated with the indicated concentrations of NA (in the presence of propranolol) and intracellular free calcium concentration was quantified. Wild-type (WT) receptor and the following mutants with the indicated substitutions in parenthesis: (S396,402A), PKC-m; (S406,410,412A), GRK-m; and (S396,402,406,410,412A), PKC-GRK-m. Plotted are the maximal increases as the means \pm S.E.M. of 7–9 experiments using different cell preparations (where no error bar is shown, it is within the symbol). Panel B. Representative free calcium tracings using the different mutants. Panel C. Bars indicate the maximal increases (PEAK, open bars) and the remaining increase over baseline observed 100 s after NA addition (RESIDUAL, dashed bars). Plotted are the means \pm S.E.M. of 7–9 experiments using different WT cell preparations. *** p < 0.001 vs. Residual WT; ** p < 0.005 vs. Residual WT.

putative GRK sites were changed to alanine (GRK-m and PKC + GRK-m) were not significantly affected by the treatment with PMA (Fig. 2, panels C and D). Attempts to study NA-induced desensitization (intracellular calcium response or inositol phosphate production) were unsuccessful due to that the action of the catecholamine decreased the general response of the cells even after extensive washing. This might involve depletion of calcium stores and/or changes in the metabolic pools of the phosphoinositides.

We examined receptor phosphorylation and observed that all of the receptors studied (wild-type α_{1B} -AR and the different mutants) were phosphorylated under baseline conditions and that this estate increased

in response to NA (Fig. 3) and PMA (Fig. 4). Western blotting of the immunoprecipitated receptors was performed and, in all cases, two bands were identified; a major band of \sim 110 kD and another of \sim 100 kD. Phosphorylation was mainly detected in the band with the higher Mr, although some radioactivity was also present in the lower Mr band. Signal in both bands was quantified together (the lower Mr band might represent the receptor being processed (glycosylated) or partially degraded). In cells expressing the wild-type receptor, 1 μ M NA rapidly increased receptor phosphorylation (at 2 and 5 min), which decreased at longer incubation times (15–60 min). The different mutants also augmented their phosphorylation state rapidly in response to

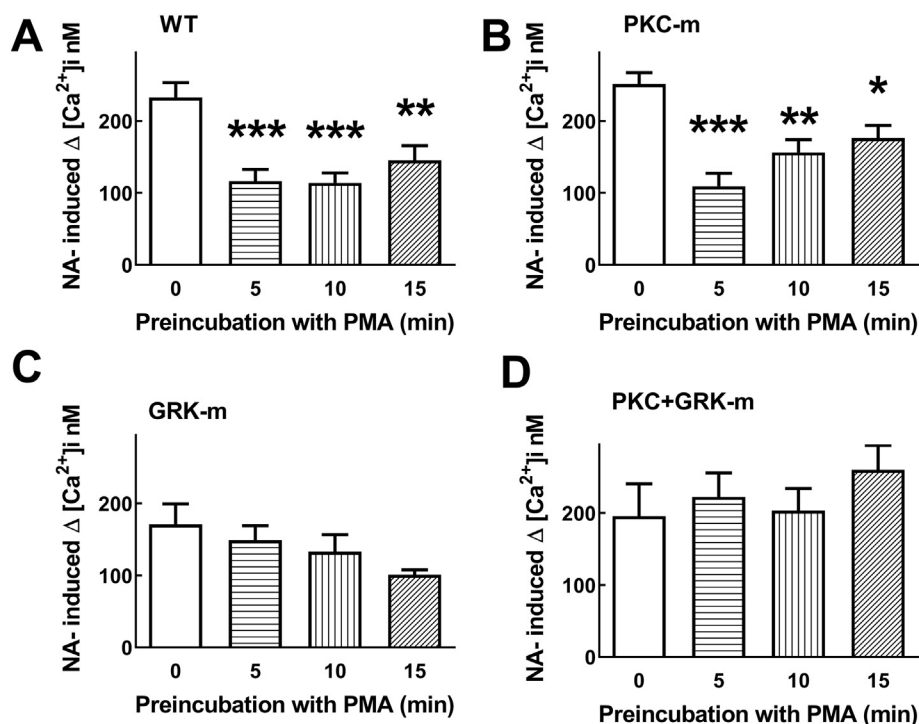


Fig. 2. Effect of PMA on NA-induced calcium response in cells expressing α_{1B} -AR mutants. Cells were preincubated for the times indicated in the presence of 1 μ M PMA and then they were challenged with 10 μ M NA (in the presence of propranolol). Plotted are the maximal increases in free calcium concentration as the means \pm S.E.M. of 6–7 experiments using different cell preparations. *** p < 0.001 vs. respective time 0; ** p < 0.005 vs. respective time 0; * p < 0.05 vs. respective time 0. Other indications as in Fig. 1.

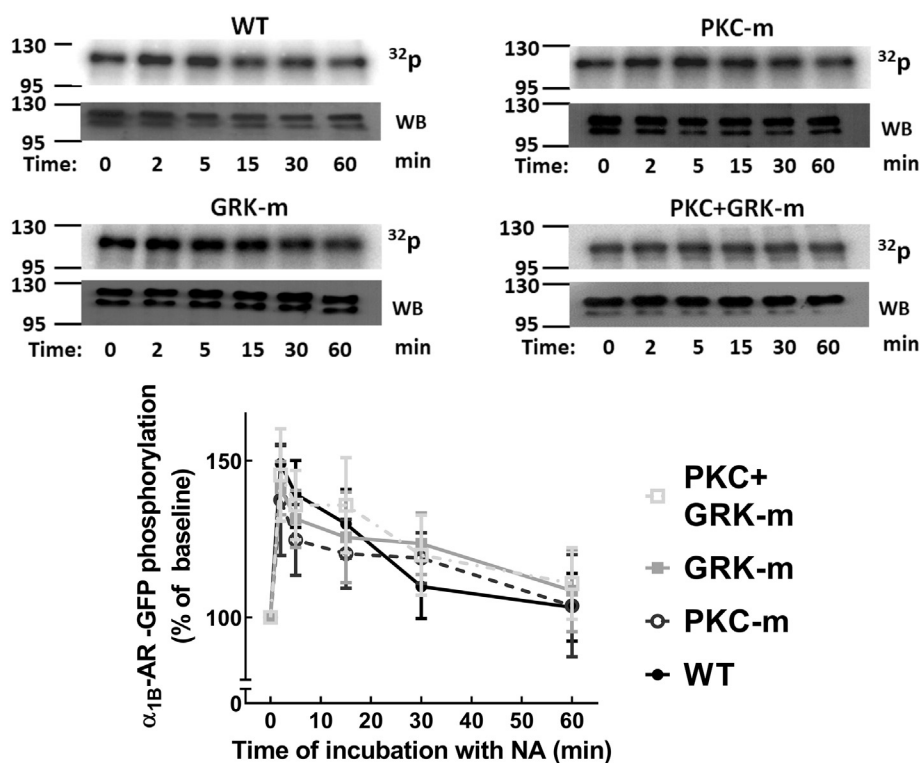


Fig. 3. Effect of NA on α_{1B} -AR phosphorylation. Cells were challenged with 10 μ M NA (in the presence of propranolol) for the times indicated and receptor phosphorylation was determined. Plotted are the means \pm S.E.M. of 6–9 experiments using different cell preparations. Above the graph, representative autoradiographs (32 P) and Western blots (WB) are shown. Other indications as in Fig. 1.

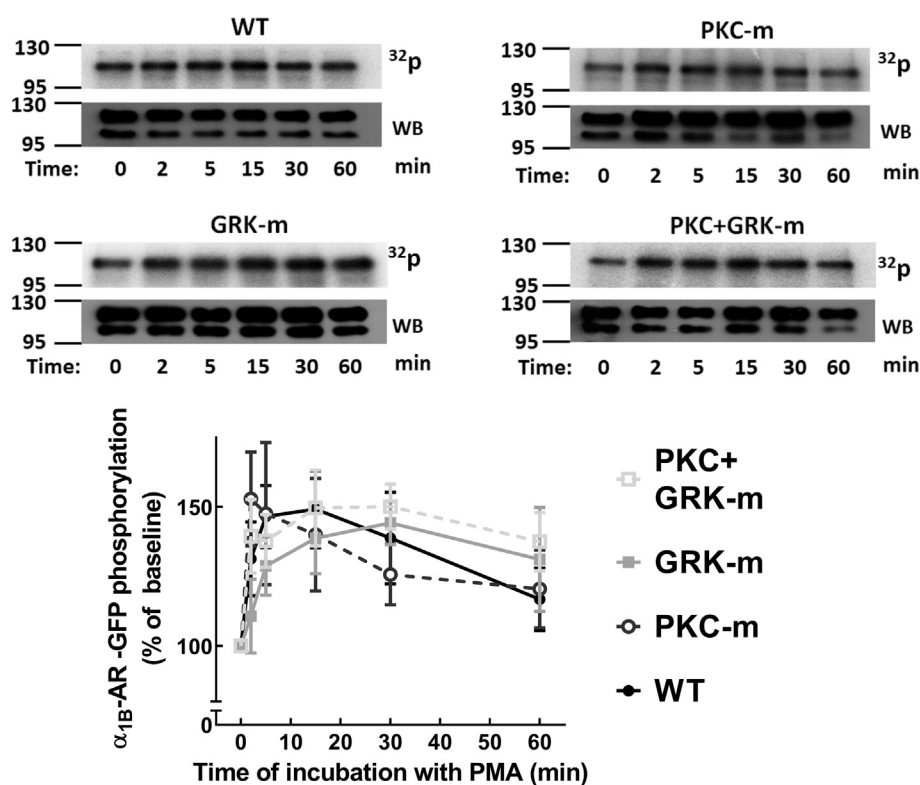


Fig. 4. Effect of PMA on α_{1B} -AR phosphorylation. Cells were challenged with 1 μ M PMA for the times indicated and receptor phosphorylation was determined. Plotted are the means \pm S.E.M. of 6–9 experiments using different cell preparations. Above the graph, representative autoradiographs (32 P) and Western blots (WB) are shown. Other indications as in Fig. 1.

NA and the effect diminished similarly (Fig. 3). In the presence of 1 μ M PMA, the receptors studied, increased their phosphorylation state at 2 and 5 min, which was maintained up to 30 min, decreasing slightly afterward (60 min); when the wild-type receptor and the different mutants were compared, no statistically significant difference, was observed (Fig. 4). Nevertheless, it should be emphasized that, in these experiments, data were always normalized to the baseline

phosphorylation of the receptor studied. In order to obtain a direct comparative view of the actions, cells expressing the different receptors were cultured and treated simultaneously, and samples were run using the same gels and analyzed using the baseline of the wild-type receptor as a reference (Fig. 5). These experiments evidenced that baseline phosphorylation was reduced in cells expressing the mutant receptors as compared to the wild-type even considering the relative expression,

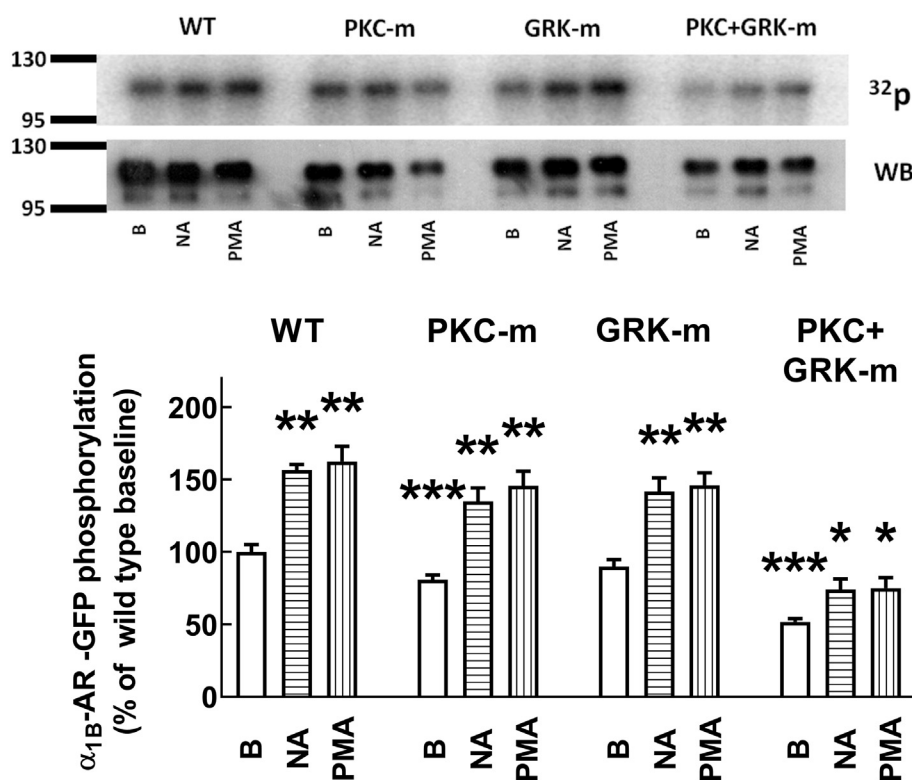


Fig. 5. Comparative α_{1B} -AR phosphorylation of the different mutants. Cells were challenged with no agent (B, baseline), 10 μ M NA (plus propranolol) for 2 min, or 1 μ M PMA for 15 min and receptor phosphorylation was determined. Data were normalized to the baseline phosphorylation observed in cell expressing the wild-type receptor. Plotted are the means \pm S.E.M. of 10–12 experiments using different cell preparations. *** p < 0.001 vs. wild-type baseline (B); ** p < 0.001 vs. respective baseline (B); * p < 0.05 vs. respective baseline (B). Above the graph, representative autoradiographs (32 P) and Western blots (WB) are shown. Other indications as in Fig. 1.

as evidenced by Western blotting, i.e., the PKC-m receptor to \sim 80%, the GRK-m to \sim 90%, and the PCK-GRK-m to \sim 50% of the wild-type receptor phosphorylation. These differences were reproducible and statistically significant. Similarly, decreases in phosphorylation were observed by Diviani et al. [30], which reported diminutions of 13–30% as compared to the wild-type receptor. In addition, our experiments showed that baseline and both NA- and PMA-induced phosphorylation, was present in these receptors. i.e. these mutations reduced but did not completely blocked receptor phosphorylation. Nevertheless, it should be emphasized that the phosphorylation state of the PKC + GRK-m receptor was markedly decreased, as compared to the wild-type, and that the effects of NA and PMA were reduced and were only marginally statistically significant. Work by Cotecchia and coworkers has shown that truncation of the hamster α_{1B} -AR Ctail (i.e., lacking the last 147 amino acids) nearly abolished NA- or PMA-induced receptor phosphorylation [32] as did truncation of the domain where the phosphorylation sites were detected (sites 393–414 of the hamster ortholog) [30]. The differences between our present work and those of Cotecchia and coworkers [30,32] could be due to the receptor orthologs studied or to differences in the experimental conditions employed including, but not limited to, the cellular models in which the receptors were expressed, the receptor densities, and/or the conformational changes induced by the receptor modifications performed.

The effect of NA on ERK 1/2 phosphorylation was also studied. It can be observed in Fig. 6, that when cells expressing the wild-type human α_{1B} -AR were stimulated by the agonist, ERK phosphorylation increased very rapidly (i.e., maximal phosphorylation was observed at 2 min; the earliest time of determination), which progressively decreased after 15, 30 and 60 min of incubation with the agonist (Fig. 6). Interestingly, the initial response was nearly identical in cells expressing the different receptors; however, ERK 1/2 phosphorylation decreased at a much slower rate in cells with the different mutants as compared to those expressing the wild-type receptor (Fig. 6). This difference was statistically significant (at 30 and 60 min), when the response of cells with the distinct mutants were compared to those expressing the wild-type receptor. These flatter decreases are consistent

with the idea that the different mutants reduce receptor turn off. It is possible that such differences could be related to changes in receptor trafficking/internalization [50]. A similar pattern was observed in cell expressing α_{1D} -AR mutants; i.e., NA-induced ERK phosphorylation decreased at a slower rate in cells expressing receptors with Ctail S/A substitutions than in those with unmodified carboxyl terminus [7,20].

The former data revealed that the modifications made to the human α_{1B} -AR mimicked some of the functional effects observed with the mutated hamster ortholog [30], but that remaining baseline, NA- and PMA-stimulated human α_{1B} -AR phosphorylation continued to be observed. Some remaining phosphorylation was also detected in the experiments using the hamster receptor [30]. Therefore, as a second step in our research, we decided to directly explore the phosphorylation sites directly present in human α_{1B} -AR under three different conditions: baseline, activation with 10 μ M NA (in the presence of propranolol), or 1 μ M PMA; cells were stimulated for 15 min on the basis of the previous experiments. To accomplish this, we performed receptor immunopurification experiments using a protocol similar to those employed previously to study the α_{1A} - and α_{1D} -AR [7,19,20], as described in Materials and Methods. In immunopurification studies for mass spectrometry analysis, two bands in the 110–100 kDa region were present in the Coomassie blue-stained gels which were identified as the α_{1B} -AR-eGFP construct by Western blotting using a primary antibody against the eGFP (Fig. 7). This is consistent with what was observed in the receptor phosphorylation experiments, using metabolic labeling with [32 P]Pi.

Mass spectrometry analysis of the immunopurified bands, obtained from four independent experiments, revealed peptides corresponding to 67% of the IL3 and 74% of the Ctail α_{1B} -AR sequences (Supplementary Fig. S5). The detected α_{1B} -AR phosphorylation sites present, under the different experimental conditions, are shown in Fig. 8, which includes the following: prediction in silico, amino acid number and peptide sequence in which it was detected, and domain localization. α_{1B} -AR phosphorylation is quite strong under baseline conditions [23,29–32,51–53] and a large number of amino acid residues present at the IL3 and also at the Ctail were phosphorylated under baseline/

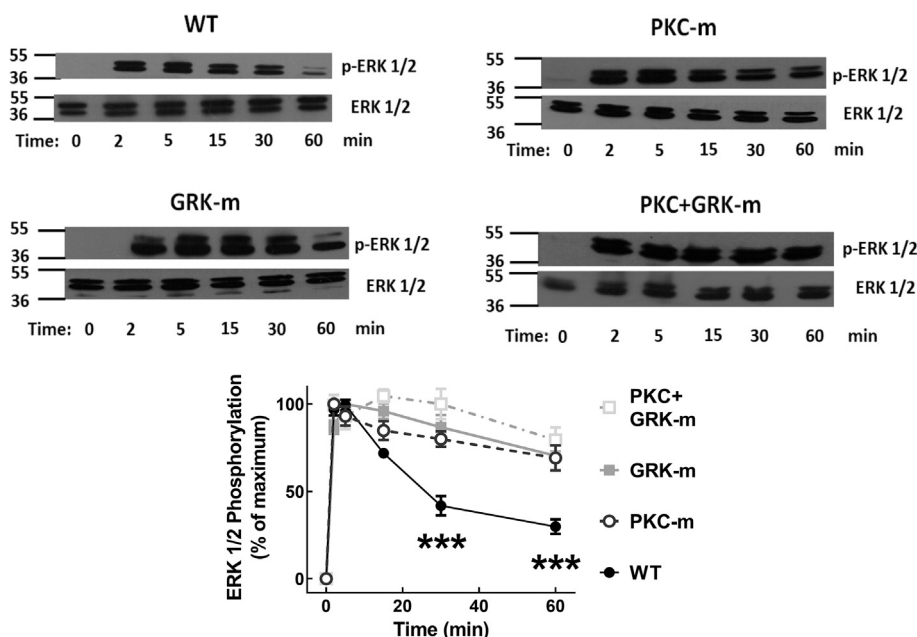


Fig. 6. Effect of NA on ERK 1/2 phosphorylation. Cells were challenged with 10 μM NA (in the presence of propranolol) for the times indicated and ERK 1/2 phosphorylation was determined. Plotted are the means ± S.E.M. of 6–8 experiments using different cell preparations. Above the graph, representative phospho-ERK 1/2 (p-ERK 1/2) and total ERK 1/2 (ERK 1/2) Western blots are shown. ****p* < 0.001 vs. the different mutants. Other indications as in Fig. 1.

unstimulated conditions (Fig. 8, panels A and B). Interestingly, some of these residues were not found phosphorylated under stimulation by NA or PMA; these include S248, S268, T420, and T475 (Fig. 8, panels A and B). Some amino acids were detected phosphorylated only in response to NA and include: S246, S277, S396, S400, S402, and S406. Residues phosphorylated in response to PMA include T387 and T392 whereas S267 and S425 were found phosphorylated under both baseline and PMA-stimulated conditions (Fig. 8, panels A and B). Other residues were detected phosphorylated under all studied conditions (baseline, NA- and PMA-stimulated) including: T252, S257, T264, S423, S427, S455, and S470 (Fig. 8, panel A and B). Other phosphorylation sites were detected but their Ascore value [45] was low. It should be mentioned, that the mass spectrometry method employed in this study is only qualitative and therefore, we cannot estimate the proportion/relative magnitude of receptors phosphorylated in a given residue. Phospho-amino acid analysis of experiment using the hamster ortholog have not detected p-tyrosine and either only p-serine (COS-7 cells) [30] or marked signal of phospho-serine with clear traces of p-threonine (Rat-1 fibroblasts) [29]. This latter finding is consistent with our

present data, in which some threonine residues were detected phosphorylated. This difference could be due to the cell system model employed for receptor expression, as this has been shown with muscarinic receptors and which seems to be of great importance in defining the so-called phosphorylation bar-code and its functional consequences [12].

The putative protein kinases involved in these phosphorylations were explored using the Group-based Prediction System, GPS 2.0. As it could have been anticipated on the bases of the previous work on this receptor [30,31], in many cases, several kinases, including members of the GRK and PKC families, were able to phosphorylate these sites (Supplementary Table 1); other protein kinases, such as PKA, AKT, GSK3, PDK-1, and p38, were also identified in the protein kinase prediction analysis (Supplementary Table S1).

Sequence alignment of the IL3 and Ctail domains of the α_{1B}-ARs of different species was subsequently performed (Supplementary Fig. S6). All of the phosphorylation sites were conserved among these orthologs. In contrast, when these domains of human α_{1A}-, α_{1B}- and α_{1D}-AR subtypes, were aligned, none of the identified phosphorylation sites were conserved among these three different subtypes and only a few

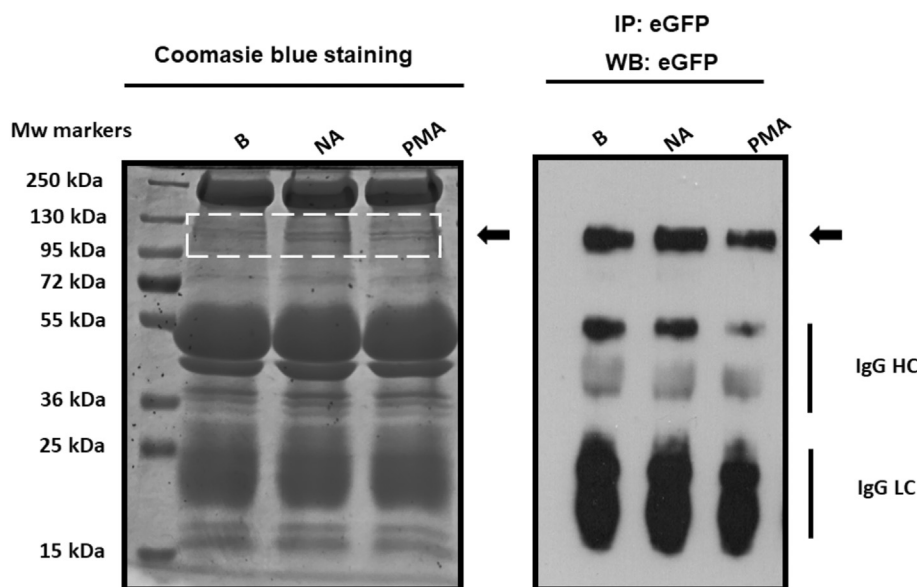
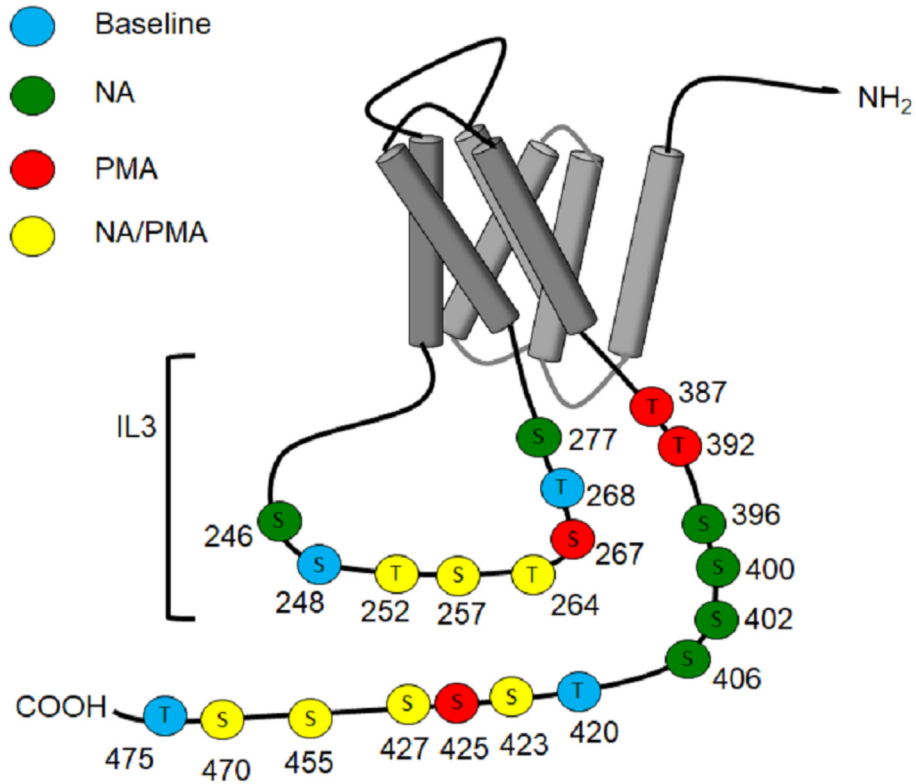


Fig. 7. Representative α_{1B}-AR immunopurification samples employed for the mass spectrometry studies. Cells expressing the α_{1B}-AR-eGFP construct were treated with: no agent (baseline, B), 10 μM NA (and propranolol), or 1 μM PMA, for 15 min; subsequently were lysed and subjected to immunopurification as described under Material and Methods. 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 onto a nitrocellulose membrane. Western blotting was performed using anti-GFP antibodies. The arrows indicate α_{1B}-AR-eGFP localization. Bands corresponding to IgG HC (heavy chains) and LC (light chains) are also indicated.

A



B

<i>In silico</i>	#	Residue	Sequence	Location	Baseline	NA	PMA	NA/PMA
X	246	S	EMSN S KELTLR	IL-3				
X	248	S	EMSN S KELTLR	IL-3				
✓	252	T	EMSN S KELTLR	IL-3				
✓	257	S	IHS K NFHEDT L SSTK	IL-3				
✓	264	T	IHSKNFHED T L S STKAK	IL-3				
✓	267	S	NFHEDT L S S T K AK	IL-3				
✓	268	T	NFHEDT L S T KAK	IL-3				
X	277	S	GHNPR S SI A VK	IL-3				
✓	387	T	LGGCAY T YR P WTR	Ctail				
X	392	T	LGGCAY T YR P WTR	Ctail				
✓	396	S	GG S LERSQSR	Ctail				
✓	400	S	GG S LERSQSR	Ctail				
✓	402	S	S S SRKDSLDDSG S CLSGSQR	Ctail				
✓	406	S	K S LDLDDSG S CLSGSQR	Ctail				
✓	420	T	T LPSAS P SPGYLGR	Ctail				
✓	423	S	T LPSAS P SPGYLGR	Ctail				
X	425	S	T LPSAS P SPGYLGR	Ctail				
X	427	S	T LPSAS P SPGYLGR	Ctail				
X	455	S	APGALL S LPAPEPPGRR	Ctail				
X	470	S	GRH S GPLFTFK	Ctail				
X	475	T	RGRH S GPLFTFK	Ctail				

(caption on next page)

Fig. 8. Phosphorylation sites detected by mass spectrometry in samples of the wild-type α_{1B} -AR-eGFP construct. Panel A. Diagram of the wild-type α_{1B} -AR indicating the observed phosphorylation sites under the different conditions employed. Numbers indicate the residue sequence position, and letters identify the amino acid. Blue (B, baseline); green (NA + propranolol) 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, α_{1B} -AR phosphorylated peptides detected by mass spectrometry. The first column indicates whether the site phosphorylated was or was not predicted by in silico analysis. The second and third columns indicate the amino acid detected and its position in the receptor's sequence. The next columns show the phosphopeptides detected and their domain location. The last column shows the cell-incubation conditions under which the modifications were detected, marked with the same color code employed in panel A.

were conserved between two of them (Supplementary Fig. S7).

Supplementary Fig. S8 presents comparative models of the human α_{1B} -AR putative phosphorylation sites (extrapolated from the mutational/functional data obtained with the human ortholog [30]) and the actual phosphorylation sites detected by mass spectroscopy. As can be observed, three of the sites were confirmed by the present data and a much more complex phosphorylation pattern was detected. Supplementary Fig. S9, presents models of the three human α_1 -AR with the phosphorylation patterns observed by mass spectrometry; these were obtained using the same cell-expression model and similar receptor constructions (i.e., receptors fused at the Ctail with the eGFP).

The pioneer work of Diviani, Lattion and Cotecchia [30] performed > 20 years ago, using mutagenesis and deletions in parallel with functional studies, defined a cluster of five serines as the major phosphorylation sites of the hamster α_{1B} -AR. Methodological advances over the past years allow now direct identification of phosphorylated sites. In the present work, we detected S396, S402 and S406 as phosphorylated, which correspond to three of the sites detected in the hamster receptor (Supplementary Fig. S8). The former two correspond to residues assigned as targets for PKC [30] and the kinase prediction performed is consistent with such an assignment (Supplementary Table S1). The third site, S406, was assigned as a GRK target [30]; however, kinase prediction failed to detect it as such, despite its being surrounded by acidic residues, suggesting the possible roles of other kinases (Supplementary Table S1). The remaining two serines, defined for hamster α_{1B} -AR (i.e., S410 and S412 in the human receptor), were covered by the mass spectrometry analysis (Supplementary Fig. S5) but no phosphorylation was detected. A series of possibilities might explain this, as follows: it could be due to the conformation of the human receptor ortholog, as due to availability or accessibility to GRK (namely GRK2 and GRK3 [30]); restrictions imposed by the eGFP tag, and/or the possibility that those (phospho)-ester bonds could be unstable during the mass spectrometry analysis, among others. In any case, the data obtained with the hamster receptor and the present findings define S396, S402, and S406 as major phosphorylation targets in the α_{1B} -AR of humans, hamsters, and likely, other species (Supplementary Fig. S6).

It is noteworthy that it has been observed that at least two domains at the hamster α_{1B} -AR Ctail of the, one including amino acids 403–425 and another in the 367–380 region, appear to play roles in internalization/down-regulation [35]. No phosphorylation was detected in the region corresponding to amino acids 367–380 of hamster α_{1B} -AR. However, in the region corresponding to the first domain, we detected phosphorylated S406, T420, S423, and S425. We have previously observed that human α_{1B} -AR internalize through different processes, i.e., processes involving interaction with different Rab proteins when stimulated by NA, or through the physiological or pharmacological activation of PKC [54,55]. It is possible that the phosphorylated sites might play a role in internalization/down-regulation, but this remains to be experimentally tested.

Detection of phosphorylated residues at the human α_{1B} -AR IL3 was unexpected, because it has been observed that deletion of the hamster Ctail or of the serine cluster (Δ 393–413) in this domain, nearly abolished receptor phosphorylation [30]. Consistent with this, work from our laboratory has shown, using Rat-1 fibroblast as expression model, that hamster α_{1B} -AR are markedly phosphorylated under baseline, NA- or PMA-stimulated conditions, whereas bovine α_{1A} -AR is also

phosphorylated, but to a much lesser degree [53]. Swapping the Ctail of these receptors demonstrated that this domain of the α_{1B} -AR comprises the main phosphorylation target, and that the intense phosphorylation pattern can be transplanted to the α_{1A} -AR [53,56] (although little correlation between receptor phosphorylation and function was detected [56]). It is possible that the three phosphorylated sites detected are those predominantly phosphorylated but that overexpression and strong stimulation, required to obtain significant signal in the mass spectrometry experiments, might permit detection of residues that under other conditions might be phosphorylated to a much lesser extent. However, significant α_{1B} -AR phosphorylation was observed in mutants with S/A substitutions (Figs. 3–6). It is also of interest that our studies on the three human α_1 -AR ([7,19,20] and the present work) showed phosphorylation at both the IL3 and Ctail domains (Supplementary Fig. S9), although such sites were poorly conserved (Supplementary Fig. S7).

The complexity of the phosphorylation patterns of the human α_1 -AR hampers the possibility of studying the functional significance of the different sites. Recently we obtained evidence that sites at the human α_{1B} -AR Ctail might control the plasma membrane location of this receptor subtype [7]. Similarly, in a recent and elegant study, Strakova and coworkers [8] reported that casein kinase 1-mediated phosphorylation of the Frizzled 6 receptor is required for its plasma membrane localization and that this contributes to its asymmetric distribution in epithelial cells. Our present work provides further evidence that three serine residues are important in human α_{1B} -AR phosphorylation and suggests that phosphorylation patterns are much more complex than previously anticipated. Receptor phosphorylation is an intricate process that takes place within space-temporal dimensions and, very likely, our phosphorylation data represent just a “frame” within the large “picture”. The fact that some sites were detected phosphorylated under baseline conditions, but not when stimulated (Fig. 8), suggest to us that, during cell activation, the action of different protein kinases and phosphatases might take place, and this could occur in a very dynamic manner, with different receptor phosphorylation patterns, coexisting at distinct times and receptor's cellular localizations. In addition, there is evidence showing that phosphorylated β_2 -adrenoceptor subpopulations (i.e., receptors phosphorylated at different sites) could be present simultaneously in a single cell; these might be present in different sub-cellular compartments and subserve in different functions [57]. It is likely, therefore, that the phosphorylation pattern we observed might be the addition of a series of different states present in the cells.

Funding information

This research was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) [grant number 253156] and Dirección General de Personal Académico-UNAM [PAPIIT, grant number IN200718].

Author contribution statement

Conceived and designed the experiments: DAH-E, GR-C, MAA-M, and JAG-S. Performed the experiments: DAH-E, GR-C, and RA-H. Analyzed the data: DAH-E, GR-C, MAA-M, RA-H, and JAG-S. Wrote the paper: DAH-E and JAG-S. All authors reviewed, corrected, and

approved the final manuscript.

Transparency document

The Transparency document associated this article can be found, in online version.

Declaration of Competing Interest

All authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Myron L. Toews for reading and commenting on the manuscript. They also thank Drs. Steven C. Prinster and Myron L. Toews for allowing us access to unpublished data on internalization and down-regulation of α_{1B} -AR. 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. 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); Juan Barbosa and Gerardo Coello (Cómputo); and Aurey Hernández and Manuel Ortín (Taller) for their advice and technical support. David A. Hernández-Espinosa is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and was the recipient of a doctoral fellowship (CVU: 706381) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

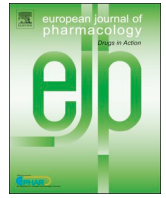
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.07.006>.

References

- [1] B. Kobilka, The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (nobel lecture), *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 52 (2013) 6380–6388.
- [2] R.J. Lefkowitz, A brief history of G-protein coupled receptors (nobel lecture), *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 52 (2013) 6366–6378.
- [3] S.S. Ferguson, Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling, *Pharmacol. Rev.* 53 (2001) 1–24.
- [4] R.J. Lefkowitz, G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization, *J. Biol. Chem.*, 273 (1998) 18677–18680.
- [5] S. Rajagopal, S.K. Shenoy, GPCR desensitization: acute and prolonged phases, *Cell. Signal.* 41 (2018) 9–16.
- [6] S.S. Ferguson, Phosphorylation-independent attenuation of GPCR signalling, *Trends Pharmacol. Sci.* 28 (2007) 173–179.
- [7] G. Carmona-Rosas, D.A. Hernández-Espinosa, R. Alcántara-Hernández, M.A. Alfonso-Méndez, J.A. García-Sáinz, Distinct phosphorylation sites/clusters in the carboxyl terminus regulate alpha1D-adrenergic receptor subcellular localization and signaling, *Cell. Signal.* 53 (2019) 374–389.
- [8] K. Strakova, M. Kowalski-Jahn, T. Gybel, J. Valnohova, V.M. Dhople, J. Harnos, O. Bernatik, R.S. Ganji, Z. Zdrahal, J. Mulder, C. Lindskog, V. Bryja, G. Schulte, Dishevelled enables casein kinase 1-mediated phosphorylation of Frizzled 6 required for cell membrane localization, *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 18477–18493.
- [9] S.K. Shenoy, R.J. Lefkowitz, Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin, *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 2005 (2005) cm10.
- [10] L.M. Luttrell, R.J. Lefkowitz, The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 455–465.
- [11] A.B. Tobin, G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom, *Br. J. Pharmacol.* 153 (Suppl. 1) (2008) S167–S176.
- [12] 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.
- [13] E. Alvarez-Curto, A. Inoue, L. Jenkins, S.Z. Raihan, R. Prihandoko, A.B. Tobin, G. Milligan, Targeted 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 (2016) 27174–27159.
- [14] 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.
- [15] S.J. Bradley, C.H. Wiegman, M.M. Iglesias, K.C. Kong, A.J. Butcher, B. Plouffe, E. Goupil, J.M. Bourgoignon, T. Macedo-Hatch, C. LeGouill, K. Russell, S.A. Laporte, G.M. König, E. Kostenis, M. Bouvier, K.F. Chung, Y. Amrani, A.B. Tobin, Mapping physiological G protein-coupled receptor signaling pathways reveals a role for receptor phosphorylation in airway contraction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 4524–4529.
- [16] 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 (2014) 18451–18465.
- [17] 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.
- [18] 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 PTHR that determine arrestin3 binding and fine-tune receptor signaling, *Biochem. J.* 473 (2016) 4173–4192.
- [19] 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.
- [20] 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 (2018) 842–854.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] J.A. García-Sáinz, J. Vázquez-Prado, L.C. Medina, Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation, *Eur. J. Pharmacol.* 389 (2000) 1–12.
- [24] 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.
- [25] D.M. Perez, M.B. DeYoung, R.M. Graham, Coupling of expressed alpha 1B- and alpha 1D-adrenergic receptor to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific, *Mol. Pharmacol.* 44 (1993) 784–795.
- [26] J.A. García-Sáinz, A. Gottfried-Blackmore, J. Vázquez-Prado, M.T. Romero-Ávila, Protein kinase C-mediated phosphorylation and desensitization of human alpha (1b)-adrenoceptors, *Eur. J. Pharmacol.* 385 (1999) 263–271.
- [27] 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.
- [28] J. Vázquez-Prado, J.A. García-Sáinz, Effect of phorbol myristate acetate on alpha 1-adrenergic action in cells expressing recombinant alpha 1-adrenoceptor subtypes, *Mol. Pharmacol.* 50 (1996) 17–22.
- [29] J. Vázquez-Prado, L.C. Medina, J.A. García-Sáinz, Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of alpha1b-adrenoreceptors in Rat-1 fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 27330–27337.
- [30] 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.
- [31] D. Diviani, A.L. Lattion, N. Larbi, P. Kunapuli, A. Pronin, J.L. Benovic, S. Cotecchia, Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensitization of the alpha1B-adrenergic receptor, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 5049–5058.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] S. Cotecchia, D.A. Schwinn, R.R. Randall, R.J. Lefkowitz, M.G. Caron, B.K. Kobilka, Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster alpha 1-adrenergic receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85 (1988) 7159–7163.
- [35] J. Wang, L. Wang, J. Zheng, J.L. Anderson, M.L. Toews, Identification of distinct carboxyl-terminal domains mediating internalization and down-regulation of the hamster alpha(1B)- adrenergic receptor, *Mol. Pharmacol.* 57 (2000) 687–694.
- [36] M.L. Toews, S.C. Prinster, N.A. Schulte, Regulation of alpha-1B adrenergic receptor localization, trafficking, function, and stability, *Life Sci.* 74 (2003) 379–389.
- [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] T. Molina-Muñoz, M.T. Romero-Ávila, S.E. Avendaño-Vázquez, J.A. García-Sáinz, Phosphorylation, desensitization and internalization of human alpha(1B)-adrenoceptors induced by insulin-like growth factor-I, *Eur. J. Pharmacol.* 578 (2008) 1–10.
- [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.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.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [45] 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.
- [46] C. UniProt, Activities at the Universal Protein Resource (UniProt), *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) D191–D198.
- [47] N. Blom, S. Gammeltoft, S. Brunak, Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites, *J. Mol. Biol.* 294 (1999) 1351–1362.
- [48] 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.
- [49] M. Galaz-Montoya, S.J. Wright, G.J. Rodriguez, O. Lichtarge, T.G. Wensel, Beta2-adrenergic receptor activation mobilizes intracellular calcium via a non-canonical cAMP-independent signaling pathway, *J. Biol. Chem.*, 292 (2017) 9967–9974.
- [50] V. Segura, M. Perez-Aso, F. Monto, E. Carceller, M.A. Noguera, J. Pediani, G. Milligan, I.C. McGrath, P. D'Ocon, Differences in the signaling pathways of alpha (1A)- and alpha(1B)-adrenoceptors are related to different endosomal targeting, *PLoS One* 8 (2013) e64996.
- [51] L.M. Leeb-Lundberg, S. Cotecchia, J.W. Lomasney, J.F. DeBernardis, R.J. Lefkowitz, M.G. Caron, Phorbol esters promote alpha 1-adrenergic receptor phosphorylation and receptor uncoupling from inositol phospholipid metabolism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82 (1985) 5651–5655.
- [52] L.C. Medina, J. Vázquez-Prado, M.E. Torres-Padilla, A. Mendoza-Mendoza, M.E. Cruz Muñoz, J.A. García-Sáinz, Crosstalk: phosphorylation of alpha1b-adrenoceptors induced through activation of bradykinin B2 receptors, *FEBS Lett.* 422 (1998) 141–145.
- [53] J. Vázquez-Prado, L.C. Medina, M.T. Romero-Ávila, C. González-Espinosa, J.A. García-Sáinz, Norepinephrine- and phorbol ester-induced phosphorylation of alpha (1a)-adrenergic receptors. Functional aspects, *J. Biol. Chem.*, 275 (2000) 6553–6559.
- [54] M.A. Alfonso-Méndez, D.A. Hernández-Espinosa, G. Carmona-Rosas, M.T. Romero-Ávila, G. Reyes-Cruz, J.A. García-Sáinz, Protein kinase C activation promotes alpha1B-adrenoceptor internalization and late endosome trafficking through Rab9 interaction. Role in heterologous desensitization, *Mol. Pharmacol.*, 91 (2017) 296–306.
- [55] 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 (2015) e0121165.
- [56] A. Cabrera-Wrooman, M.T. Romero-Ávila, J.A. García-Sáinz, Roles of the alpha1A-adrenergic receptor carboxyl tail in protein kinase C-induced phosphorylation and desensitization, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 382 (2010) 499–510.
- [57] A. Shen, M. Nieves-Cintrón, Y. Deng, Q. Shi, D. Chowdhury, J. Qi, J.W. Hell, M.F. Navedo, Y.K. Xiang, Functionally distinct and selectively phosphorylated GPCR subpopulations co-exist in a single cell, *Nat Commun*, 9 (2018) 1050, 1051–1012.



Full length article

Roles of the G protein-coupled receptor kinase 2 and Rab5 in α_{1B} -adrenergic receptor function and internalization

David A. Hernández-Espinosa^a, Guadalupe Reyes-Cruz^b, J. Adolfo García-Sáinz^{a,*}^a Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70-248, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 04510, Mexico^b Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, CINVESTAV-IPN, Col. Pedro Zacatenco, Ciudad de México, 07360, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

α_{1B} -adrenergic receptor
Rab5
Receptor internalization
Receptor phosphorylation
Desensitization

ABSTRACT

Cells expressing eGFP-tagged Rab5 (wild-type or the GDP-Rab5 mutant) and the DsRed-tagged α_{1B} -adrenergic receptors were employed and the roles of GRK2 were studied utilizing paroxetine and the dominant-negative mutant of GRK2 (DN-GRK2). The following parameters were studied: a) FRET (as an index of α_{1B} -adrenergic receptor-Rab5 interaction); b) intracellular accumulation of DsRed fluorescence (receptor internalization); c) α_{1B} -adrenergic receptor phosphorylation, and d) noradrenaline-induced increase in intracellular calcium concentration. Noradrenaline increased α_{1B} -adrenergic receptor-Rab5 interaction, which was blocked by paroxetine and by expression of the dominant-negative GRK2 mutant. Similarly, paroxetine and expression of the DN-GRK2 or the GDP-Rab5 mutants markedly decreased receptor internalization, α_{1B} -adrenergic receptor phosphorylation, and attenuated the ability of the adrenergic agonist to induce homologous desensitization (calcium signaling). The S406, 410,412A α_{1B} -adrenergic receptor mutant did not reproduce the actions of GRK2 inhibition. The data indicate that GRK2 and Rab5 play key roles in α_{1B} -adrenergic receptor phosphorylation, internalization, and desensitization. The possibility that Rab5 might form part of a signaling complex is suggested, as well as that GDP-Rab5 might interfere with the ability of GRK2 to catalyze α_{1B} -adrenergic receptor phosphorylation.

1. Introduction

G protein-coupled receptors constitute the most abundant type of receptors for hormones, local hormones (autacoids), neurotransmitters, and growth factors. These individual receptors exhibit a single-chain structure constituted of an extracellular amino terminus, an intracellular carboxyl terminus, and seven transmembrane domains joined by intracellular and extracellular loops (Kobilka, 2013; Lefkowitz, 2013). Phosphorylation appears to be a very early event that regulates their function, and it is associated with the attenuation of receptor activity (desensitization) and internalization (Ferguson, 2001; Lefkowitz, 1998; Rajagopal and Shenoy, 2018). The sites at which the phosphorylation of these receptors takes place might vary depending on the cell type in which they are expressed and on the agents that lead to such covalent modification. Additionally, phosphorylation at different sites can lead to distinct functional outcomes and receptor localization (Tobin, 2008; Tobin et al., 2008).

α_1 -Adrenergic receptors constitute a subfamily of G protein-coupled receptors composed of three members, the α_{1A} -, the α_{1B} -, and the α_{1D} -adrenergic receptor (García-Sáinz et al., 1999b, 2000; Hieble et al., 1995). All of these couple to Gq and exert their actions mainly through

the inositol trisphosphate/diacylglycerol/calcium signaling pathway (García-Sáinz et al., 1999b, 2000), although other signaling processes also appear to participate in their actions (Perez et al., 1993). It is well-known that the three receptor subtypes are phosphorylated in response to agonists and the pharmacological or physiological activation of protein kinase C (Alcántara-Hernández et al., 2017; Alfonso-Méndez et al., 2018; Carmona-Rosas et al., 2019; Diviani et al., 1996, 1997; García-Sáinz et al., 1999a, 2000, 2004; Hernández-Espinosa et al., 2019; Lattion et al., 1994; Price et al., 2002; Vázquez-Prado and García-Sáinz, 1996; Vázquez-Prado et al., 1997). Agonist-induced α_1 -adrenergic receptor phosphorylation appears to involve G protein-coupled receptor kinases (GRK), particularly the GRK2 and GRK3 isoforms (Diviani et al., 1996; Iacovelli et al., 1999). G protein-coupled receptor phosphorylation is associated to β -arrestin binding and Rab5, an early-endosome marker, seems to participate in early events during receptor internalization (Wang et al., 2018).

Recent work from our group has shown that α_{1B} -adrenergic receptors are differentially phosphorylated in response to the agonist, noradrenaline (NA), or to the activation of protein kinase C (Hernández-Espinosa et al., 2019). In addition, it has also been shown that the receptor internalization induced by agonists differ from that

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

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

induced via protein kinase C, as reflected by a differential interaction with Rab proteins (Alfonzo-Méndez et al., 2017; Castillo-Badillo et al., 2015). In particular, α_{1B} -adrenergic receptor activation is associated with a sustained interaction with Rab5, whereas under the action of protein kinase C activation, such an interaction is only transient. In the present work we explored the roles of GRK2 and Rab5 on the function and internalization of α_{1B} -adrenergic receptors; our data indicate that these proteins participate in the regulation of this receptor's subtype function and cellular localization.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), dl-propranolol, oleyl-L- α -lysophosphatidic acid (LPA), and DNA purification kits were purchased from Sigma Chemical Co. Polyethyleneimine was obtained from Polyscience and Lipofectamine from Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). Fura-2/AM, Dulbecco's modified Eagle's medium, fetal bovine serum albumin, trypsin, antibiotics, and other reagents employed for cell culture were from Life Technologies. [32 P]Pi (8500–9120 Ci/mmol) was obtained from PerkinElmer Life Sciences. Paroxetine was a generous gift from Psicofarma SA de CV (México) (<http://www.psicofarma.com.mx/>). Agarose-coupled protein A was obtained from Merck-Millipore. Primary antibodies against β -actin were from Santa Cruz Biotechnology; the polyclonal anti-DsRed protein, used for immunoprecipitation and Western blot, was generated and validated in our laboratory (Martínez-Morales et al., 2018; Meizoso-Huesca et al., 2018). Secondary antibodies were purchased from Zymed (Thermo Fisher Scientific) or Jackson ImmunoResearch, and chemiluminescence kits were from Pierce (Thermo Fisher Scientific). Nitrocellulose membranes were obtained from BioRad. Other reagents were from previously described sources (Alfonzo-Méndez et al., 2017; Castillo-Badillo et al., 2015; Hernández-Espinosa et al., 2019).

The plasmid employed for the expression of the α_{1B} -adrenergic receptors fused at the carboxyl terminus with the DsRed protein (*Discosoma* spp. red fluorescent protein) was previously described (Castillo-Badillo et al., 2015). This plasmid was used as a template to perform substitutions to generate the S406,410,412A mutant. Mutagenesis was performed by Mutagenex, Inc., and proper changes were confirmed by sequencing (Mutagenex, Inc.). Plasmids for expression of the (enhanced green fluorescent protein) eGFP-tagged constructs of Rab5 (wild-type and the GDP-bound, dominant-negative mutant) were generated by Dr. Robert Lodge (Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montreal, Canada) (Hunyady et al., 2002) and generously provided to us. All of these constructs are functional, as described previously (Alfonzo-Méndez et al., 2017; Castillo-Badillo et al., 2015).

2.2. Cells and transfection

HEK293 AD cells (American Type Culture Collection) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing glutamine and high-glucose supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 μ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 0.25 μ g/ml amphotericin B, at 37 °C, under a 95% air/5% CO₂ atmosphere. Plasmids for expression of the eGFP-tagged Rab5 wild-type or mutant proteins and the DsRed-tagged α_{1B} -adrenergic receptor were co-transfected employing polyethyleneimine (Hsu and Uludag, 2012); experiments were carried out 72 h post-transfection, as described (Alfonzo-Méndez et al., 2017; Castillo-Badillo et al., 2015). Intracellular calcium concentration was studied 48 h post-transfection.

2.3. Confocal immunofluorescence microscopy and Förster resonance energy transfer (FRET)

This procedure was described in detail previously (Alfonzo-Méndez

et al., 2017; Castillo-Badillo et al., 2015). Briefly, cells were cultured in glass-bottomed Petri dishes, treated with the agents and for the times indicated (based on previous observations (Alfonzo-Méndez et al., 2017; Castillo-Badillo et al., 2015)), and immediately fixed with 4% paraformaldehyde. When NA was employed, 0.1 μ M propranolol was added to block endogenous β -adrenergic receptors; this concentration of propranolol by itself did not alter the parameters studied (data not shown). Images were obtained employing a Fluoview Confocal model FV10i microscope (Olympus, LD laser, 405 nm [18 mW], 473 nm [12.5 mW], 635 nm [10 mW], 559 nm) with an oil-immersion objective (60 \times). The eGFP was excited at 480 nm, and the emitted fluorescence was detected at 515–540 nm; the red fluorescent protein, DsRed, was excited at 557 nm, and the fluorescence emitted was detected at 592 nm. (Alfonzo-Méndez et al., 2017; Castillo-Badillo et al., 2015). For FRET channel analysis, eGFP (but not DsRed) was excited, and fluorescence was detected at 592 nm.

For the determination of intracellular fluorescence (as an index of α_{1B} -adrenergic 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 (Rasband, 1997–2004). α_{1B} -Adrenergic receptor-Rab5 protein interaction was analyzed using FRET employing the sensitized-emission method, as described (Alfonzo-Méndez et al., 2017; Castillo-Badillo et al., 2015). Images of 4–6 independent experiments utilizing different cell cultures and at least five photographs per sample were captured to estimate the interaction of Rab proteins with α_{1B} -adrenergic receptors by the FRET index after treatment with either agent. The FRET index (that eliminates “bleed-through” and “false” FRET) was quantified using ImageJ software and the “FRET and Colocalization Analyzer” plug-in (Hachet-Haas et al., 2006), which allows supervised computation of the FRET index employing a “pixel by pixel” method. ImageJ version 1.47b software was obtained from the National Institutes of Health website (Rasband, 1997–2004) (Rasband, W.S., U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD).

2.4. α_{1B} -adrenergic receptor-DsRed phosphorylation

Receptor phosphorylation was performed essentially as previously described (Hernández-Espinosa et al., 2019), but using an anti-DsRed antiserum for immunoprecipitation (Martínez-Morales et al., 2018; Meizoso-Huesca et al., 2018). Briefly, cells cultured in six-well plates were incubated for 3 h in phosphate-free Dulbecco's Modified Eagle's media supplemented with 50 μ Ci/ml [32 P]Pi. Labelled cells were stimulated as indicated, washed with ice-cold phosphate-buffered saline, and solubilized for 1 h in the lysis buffer described previously (Hernández-Espinosa et al., 2019). The extracts were centrifuged, and supernatants were incubated overnight with protein A-agarose and the anti-DsRed antiserum generated in our laboratory (Martínez-Morales et al., 2018; Meizoso-Huesca et al., 2018). Samples were subjected to SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes, and exposed for 18–24 h. The amount of phosphorylated receptor was assessed by PhosphorImager analysis, using the ImageQuant program. Western blotting for loading controls was performed employing the anti-DsRed antibody, as described (Martínez-Morales et al., 2018; Meizoso-Huesca et al., 2018).

2.5. Intracellular calcium determinations

The intracellular calcium concentration was assessed as previously described (Hernández-Espinosa et al., 2019). Cells were serum-starved for 2 h, then loaded with 2.5 μ M of the fluorescent Ca²⁺ indicator, Fura-2/AM, in Krebs-Ringer-HEPES containing 0.05% bovine serum albumin, pH 7.4 for 1 h at 37 °C, and subsequently washed three times to eliminate unincorporated dye. Fluorescence measurements were carried out at 340- and 380-nm excitation wavelengths and at a 510-nm

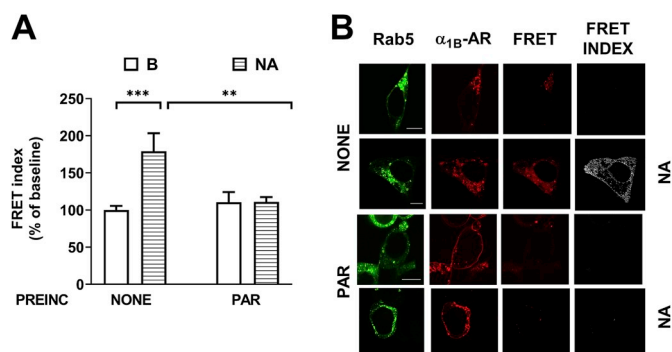


Fig. 1. Effect of paroxetine on α_{1B} -adrenergic receptor-Rab5 interaction. Cells co-expressing DsRed-tagged α_{1B} -adrenergic receptors and eGFP-tagged Rab5 were preincubated for 30 min in the absence of any agent (NONE) or the presence of 100 μ M paroxetine (PAR). After this preincubation, cells were challenged with no agent (B, baseline) or 10 μ M NA (with 0.1 μ M propranolol) for 15 min. Cells were fixed and observed in a fluorescence confocal microscope. In panel A, the FRET values, normalized to what was observed under baseline conditions (100%) are presented. Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of 18–20 images for each condition; four experiments were performed utilizing different cell preparations. $***P < 0.001$; and $**P < 0.01$. In panel B, representative images are presented: a) first column: eGFP fluorescence (Rab5); b) second column: DsRed fluorescence (α_{1B} -AR); c) third column “FRET” (eGFP was excited, the laser to excite DsRed remained off, and DsRed fluorescence was recorded), and d) fourth column “FRET index” (images processed with the “FRET and Colocalization Analyzer,“). Scale bars: 15 μ m.

emission wavelength, with a chopper interval set at 0.5 s, utilizing an Aminco-Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer (Rochester, NY). Intracellular calcium levels were calculated, according to Grynkiewicz et al. (1985).

2.6. Statistical analysis

When data were normalized, the average of the baseline values obtained in these experiments was considered as 100%; the error bars of the baseline corresponding to the dispersion of these values. Statistical comparison among the different conditions was performed using ANOVA with Bonferroni's post-test using the software included in the GraphPad Prism version 8 program.

3. Results

NA (10 μ M, in the presence of 0.1 μ M propranolol) induces α_{1B} -adrenergic receptor-Rab5 interaction, as reflected by FRET (Alfonzo-Méndez et al., 2017; Castillo-Badillo et al., 2015). This finding was confirmed in the present work, and it was observed that preincubation for 30 min with 100 μ M paroxetine, essentially blocked this interaction (Fig. 1, panels A and B). The preincubation period and the concentration of paroxetine were selected based on preliminary experiments and previous data with other receptors (β_2 -adrenergic receptors, α_{1D} -adrenergic receptors, and S1P1 receptors) (Alfonzo-Méndez et al., 2018; Guo et al., 2017; Martínez-Morales et al., 2018). Paroxetine is an antidepressant commonly used in clinical practice that has been found to inhibit GRK2 activity (Homan et al., 2014; Schumacher et al., 2015; Thal et al., 2011, 2012). Therefore, our pharmacological experiments suggested that GRK2 activity could be involved in the ability of NA to induce α_{1B} -adrenergic receptor-Rab5 interaction.

This possibility was tested employing a different approach. Cells were co-transfected with a mixture of plasmids to express the adrenergic receptor and Rab5 with or without a dominant-negative mutant of GRK2 (DN-GRK2). As shown in Fig. 2 (panels A and B), the mutant kinase was able to block α_{1B} -adrenergic receptor-Rab5 interaction. Expression of the GRK2 mutant was confirmed by Western blotting

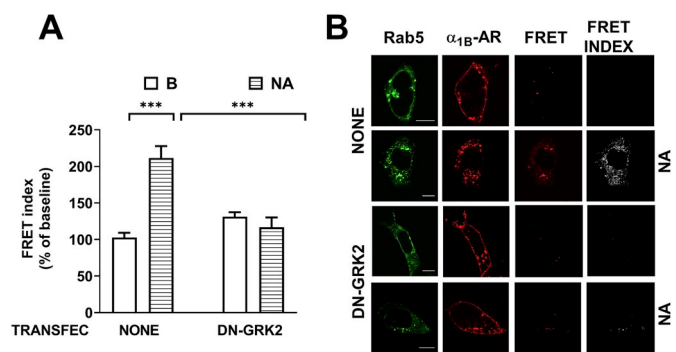


Fig. 2. Effect of expression of a dominant-negative GRK2 mutant on α_{1B} -adrenergic receptor-Rab5 interaction. Cells co-expressing DsRed-tagged α_{1B} -adrenergic receptors (α_{1B} -AR) and eGFP-tagged Rab5 were co-transfected with no additional plasmid (NONE) or a plasmid for expression of a dominant-negative GRK2 mutant (DN-GRK2). Cells were challenged with no agent (B, baseline) or 10 μ M NA (with 0.1 μ M propranolol) for 15 min. Cells were fixed and observed in a fluorescence confocal microscope. In panel A, the FRET values normalized to what was observed under baseline conditions (100%) is presented. Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of 18–20 images for each condition; four experiments were performed utilizing different cell preparations. $***P < 0.001$. In panel B, representative images are presented, other indications as in Fig. 1.

(Supplementary Fig. S1).

It was observed, using mutagenesis and functional experiments, that three serines at the carboxyl tail of the hamster α_{1B} -adrenergic receptor were targets of GRK2 (Diviani et al., 1997). Mutagenesis of the equivalent sites in the human ortholog only partially reproduced the observed effects (Hernández-Espinosa et al., 2019). Mass spectrometry analysis of the human α_{1B} -adrenergic receptors revealed that, under the action of the agonist, NA, many sites were phosphorylated and only one serine equivalent of those detected in the experiments with the hamster ortholog was found to be phosphorylated (i. e. S406 (Hernández-Espinosa et al., 2019)). These differences could be due to the receptor orthologs employed and the cells in which the receptors were expressed, among other factors, as already discussed (Hernández-Espinosa et al., 2019). We explored whether the S406, 410,412A mutant expresses an altered α_{1B} -adrenergic receptor-Rab5 interaction. Fig. 3

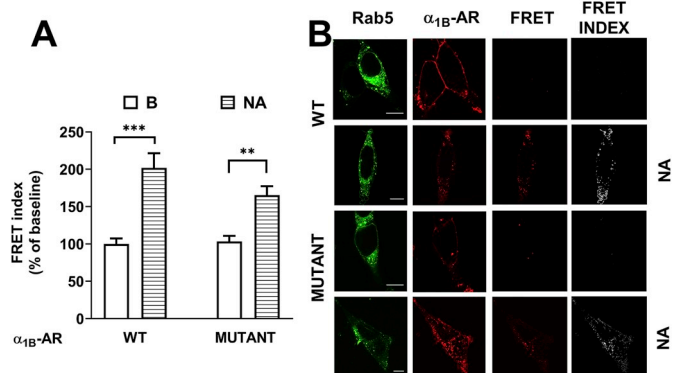


Fig. 3. α_{1B} -Adrenergic receptor-Rab5 interaction in cells expressing wild-type α_{1B} -adrenergic receptors or the S406, 410,412A receptor mutant. Cells co-expressing DsRed-tagged α_{1B} -adrenergic receptors (α_{1B} -AR) (wild-type or mutant receptors) and eGFP-tagged Rab5 were challenged with no agent (B, baseline) or 10 μ M NA (with 0.1 μ M propranolol) for 15 min. Cells were fixed and observed in a fluorescence confocal microscope. In panel A, the FRET values normalized to what was observed under baseline conditions (100%) is presented. Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of 18–20 images for each condition; four experiments were performed utilizing different cell preparations. $***P < 0.001$; and $**P < 0.01$. In panel B, representative images are presented, other indications as in Fig. 1.

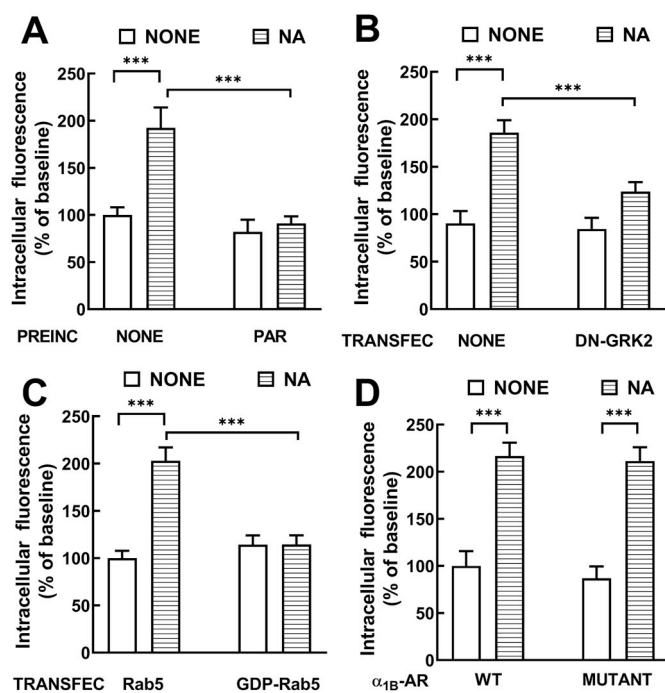


Fig. 4. Effect of the different experimental conditions on α_{1B} -adrenergic receptor internalization. Cells were co-expressing Rab5 (panels A, B, and D) or GDP-Rab5 (panel C) and the wild-type (panels A, B, and C) or the S406, 410,412A α_{1B} -adrenergic receptor (α_{1B} -AR) mutant (panel D). In panel A, cells were preincubated with 100 μ M paroxetine for 30 min. In all panels, cells were challenged with no agent (B, baseline) or 10 μ M NA (with 0.1 μ M propranolol) for 15 min; samples were fixed and observed using fluorescence confocal microscopy, and intracellular fluorescence was quantified. Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of 20–25 images for each condition; five experiments were performed utilizing different cell preparations. *** $P < 0.001$.

(panels A and B) depicts that NA was able to induce that the mutated- α_{1B} -adrenergic receptors interacted with Rab5, under the conditions employed. It should be mentioned that the FRET signal was smaller in cells expressing the S406, 410,412A mutant receptor as compared to that in cells expressing the wild-type receptor, but that difference was not statistically significant.

The impact of these conditions on α_{1B} -adrenergic receptor internalization was examined next; the quantitative data are presented in Fig. 4 and representative images in Fig. 5. The same conditions as those of the experiments presented previously, were maintained, and the cells were co-transfected with the plasmids for Rab5 expression. As shown in Fig. 4 (panels A–D), incubation for 15 min in the presence of 10 μ M NA (with 0.1 μ M propranolol) increased ~ 2 -fold α_{1B} -adrenergic receptor internalization, as reflected by intracellular fluorescence and a decrease in membrane delineation (Figs. 4 and 5). Interestingly, preincubation with paroxetine (Fig. 4, panel A; Fig. 5, second column of images) or co-transfection with plasmids for the expression of DN-GRK2 (Fig. 4, panel B; Fig. 5 third column of images) or GDP-Rab5 (Fig. 4, panel C; fourth column of images) markedly diminished NA-induced α_{1B} -adrenergic receptor internalization. NA-induced internalization of the α_{1B} -adrenergic receptor S406, 410,412A mutant, as reflected by the accumulation of intracellular fluorescence and decreased delineation of the plasma membrane (Fig. 4, panel D; Fig. 5, fifth column of images).

α_{1B} -Adrenergic receptor phosphorylation was studied next. Experiments were carried out the same day in parallel, and the samples were run together in the same gels to minimize variation and allow a clearer comparison of the effects. As depicted in Fig. 6, NA was able to induce a marked (2-fold) increase in receptor phosphorylation in cells preincubated without any agent and non-transfected with dominant-

negative mutants. Pre-treatment with paroxetine, or transfection with DN-GRK2 or GDP-Rab5, essentially abolished the effect of NA (Fig. 6). It was previously shown that phosphorylation of the α_{1B} -adrenergic receptor S406, 410,412A mutant is increased in response to NA (Hernández-Espinosa et al., 2019). Western blotting identified two bands, and the band with higher Mr was that which was mainly phosphorylated in response to NA, in agreement with previous data (Hernández-Espinosa et al., 2019).

The effect of the different treatments on NA-induced desensitization (homologous desensitization) was tested quantifying the intracellular calcium response. For these experiments, cells were incubated for 15 min in the absence (NONE) or the presence of 10 μ M NA (with 0.1 μ M propranolol): the cells were washed twice with buffer without agonist and then calcium tracings were recorded. Stimulation was performed with 10 μ M NA (with 0.1 μ M propranolol); as a control, the cells were also stimulated with 1 μ M LPA. As presented in Fig. 7 and in Supplementary Fig. S2, preincubation with NA essentially abolished the response to a second stimulation, even after extensive washing (Fig. 7 and Supplementary Fig. S2, panels A). However, these cells were able to respond to LPA, as shown in Fig. 7 (Fig. 7, panel A dashed columns, see representative tracings in Supplementary Fig. S3). Nevertheless, it was clear that the response was of a smaller magnitude than that of cells that were not preincubated with the adrenergic agonist (Fig. 7). Pre-treatment with paroxetine (Fig. 7, panel B) or expression by transfection of the DN-GRK2 (Fig. 7, panel C) or GDP-Rab5 mutants (Fig. 7, panel D) permitted a clear and consistent, although diminished, response to NA, after pre-treatment with the adrenergic amine. The data indicate that these treatments partially prevent homologous desensitization. The NA-induced calcium response of cells expressing the α_{1B} -adrenergic receptor S406, 410,412A mutant was markedly decreased (Fig. 7, panel E).

4. Discussion

Our present data confirm the ability of NA to induce α_{1B} -adrenergic receptor-Rab5 interaction, as reflected by FRET (Hernández-Espinosa et al., 2019). Such an interaction appears to require receptor phosphorylation by GRK2 because inhibition by paroxetine or expression of the DN-GRK2 mutant essentially abolished such interaction. The fact that NA was able to induce Rab5 interaction with the α_{1B} -adrenergic receptor S406, 410,412A mutant is consistent with the finding that the modification of such residues for non-phosphorylatable amino acids is insufficient to block GRK2 action and entails the suggested possibility that other sites might participate in such an action (Hernández-Espinosa et al., 2019).

Receptor internalization essentially paralleled the FRET data; i. e., paroxetine, and the expression of the DN-GRK2 mutant markedly decreased agonist-induced α_{1B} -adrenergic receptor internalization and the S406, 410,412A receptor mutant internalized, in response to the agonist, which was essentially identical to that of the wild-type receptor. Our group has previously shown that the GTPase activity of Rab5 is essential for its interaction with α_{1B} -adrenergic receptors (Alfonzo-Méndez et al., 2017; Castillo-Badillo et al., 2015). Therefore, it was not surprising that the GDP-Rab5 mutant blocked adrenoceptor internalization.

The functional consequences also appear to be consistent with the previous findings. Both the wild-type and the S406, 410,412A mutant of the α_{1B} -adrenergic receptors were markedly desensitized in response to the agonist, NA, exhibiting no response to the second stimulus. As shown, the response to the unrelated agent, LPA, was only marginally decreased. These data indicate that depletion of the calcium stores does not fully account for the observed effect; however, in that a decrease in response to the bioactive lipid was observed, in cells preincubated with NA, the possibility that depletion of the calcium stores might participate cannot be completely ruled out. As described under Results, preincubation with paroxetine or expression of the dominant-negative

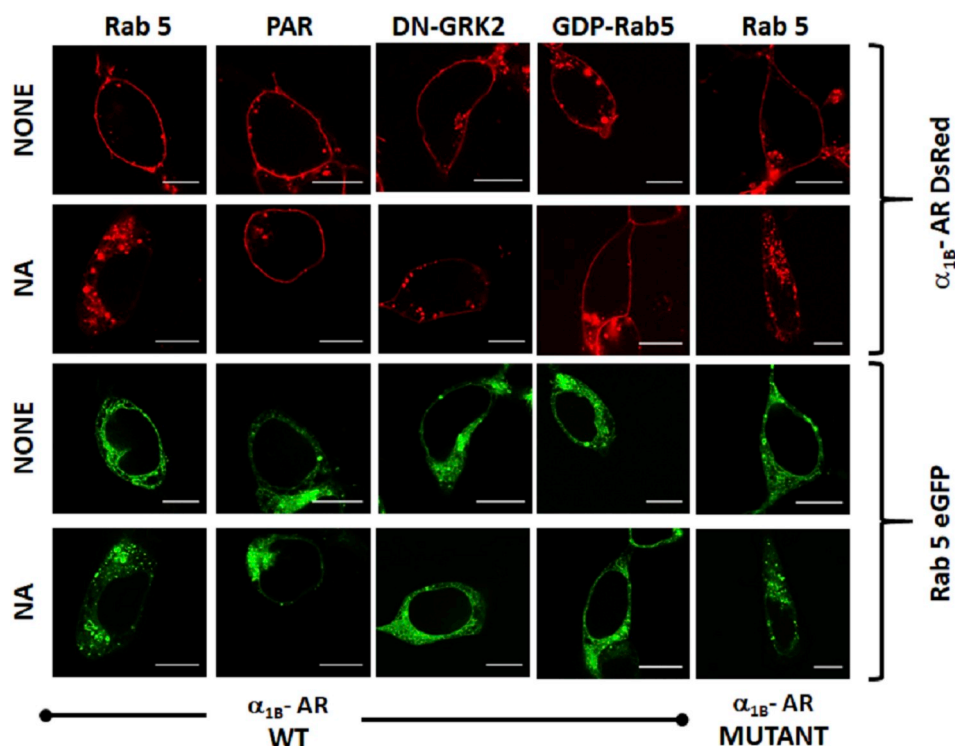


Fig. 5. Representative images of the α_{1B} -adrenergic receptor (α_{1B} -AR DsRed) internalization experiments; data analysis and other indications are shown in Fig. 4.

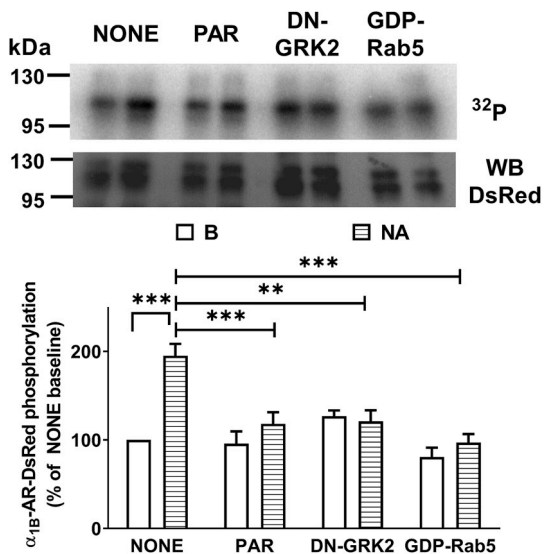


Fig. 6. Effect of the different experimental conditions on α_{1B} -adrenergic receptor phosphorylation. Cells were co-expressing Rab5 or GDP-Rab5 (indicated) and the wild-type α_{1B} -adrenergic receptor (α_{1B} -AR-DsRed). Where indicated, co-transfection with plasmids for expression of DN-GRK2 or GDP-Rab5 was performed. Preincubation with 100 μ M paroxetine (PAR) was for 30 min. Cells were challenged with no agent (B, baseline) or 10 μ M NA (with 0.1 μ M propranolol) for 15 min and processed as indicated under Materials and Methods. Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of ten experiments utilizing different cell preparations. *** $P < 0.001$; and ** $P < 0.01$. A representative autoradiograph (32 p) and a representative Western Blot are shown above the graph.

mutants of GRK2 or Rab5 allowed partial recovery of the response to NA. These data strongly indicate the role of these proteins in the functional desensitization of α_{1B} -adrenergic receptor responsiveness.

The ability of expression of DN-GRK2 to attenuate α_{1B} -adrenergic receptor phosphorylation markedly, was no surprise; this protein is

known to participate in agonist-induced phosphorylation and in the traffic of many G protein-coupled receptors (Komolov and Benovic, 2018; Moore et al., 2007; Ribas et al., 2007), including α_{1B} -adrenergic receptors (Diviani et al., 1996). The protein activity seems to be essential for this action. The ability of paroxetine to decrease α_{1B} -adrenergic receptor phosphorylation was also expected, because it has been shown that this antidepressant directly interacts with GRK2 and blocks its activity (Homan et al., 2014; Thal et al., 2012). It has been observed that paroxetine blocks agonist-induced desensitization and phosphorylation of β_2 -adrenergic receptors, and for both β_1 - and β_2 -adrenergic receptors, paroxetine decreases ligand-induced β -arrestin 2 recruitment and subsequent receptor internalization (Guo et al., 2017). This finding prompted the possibility of a new therapeutic niche for this antidepressant. It was observed that paroxetine-mediated GRK2 inhibition reverses cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction in mice (Schumacher et al., 2015). There is also some evidence suggesting that paroxetine is effective for improving cardiac function in patients with acute myocardial infarction (Tian et al., 2016). It has also been demonstrated that paroxetine can block the phosphorylation of other G protein-coupled receptors, including the sphingosine-1-phosphate S1P1 receptors (Martínez-Morales et al., 2018), the α_{1D} -adrenergic receptors (Alfonzo-Méndez et al., 2018), and the chemokine receptor CXCR4 (Dinkel et al., 2018). Our present findings add the α_{1B} -adrenergic receptors to this list.

The data also indicate that Rab5 plays a role in these events. The ability of the expression of the GDP-Rab5 mutant to decrease NA-induced α_{1B} -adrenergic receptor internalization and desensitization of the calcium response could have been anticipated. There is evidence that this Rab5 mutant decreases internalization of other GPCRs, such as dopamine D2 receptors (Iwata et al., 1999) or lysophosphatidic acid LPA₁ receptors (Murph et al., 2003); the roles of different Rab proteins, in receptor internalization, have been reviewed previously (Wang et al., 2018). However, the ability of the Rab5 mutant to diminish NA-mediated α_{1B} -adrenergic receptor phosphorylation was unexpected. A consistent, but statistically insignificant, decrease in baseline receptor phosphorylation was also observed when the GDP-Rab5 mutant was

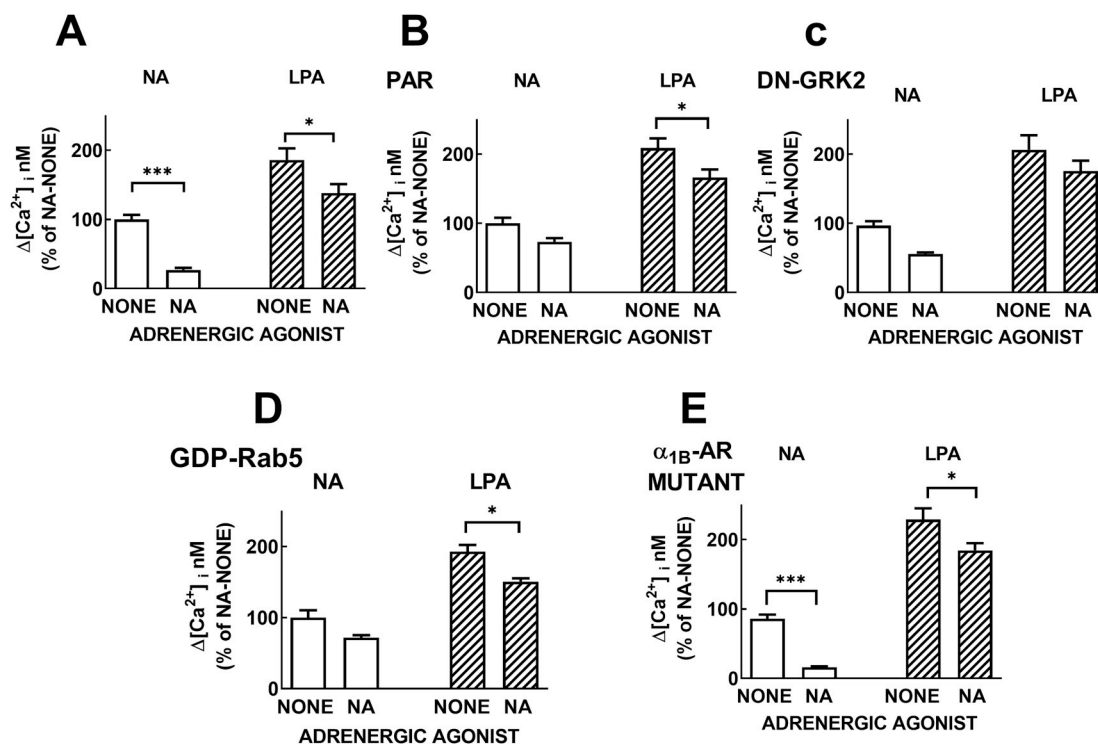


Fig. 7. Effect of the different experimental conditions on α_{1B} -adrenergic receptor desensitization. Cells were co-expressing Rab5 or GDP-Rab5 (where indicated) and the wild-type α_{1B} -adrenergic receptors or the receptor mutant (α_{1B} -AR MUTANT). Co-transfection with plasmids for the expression of DN-GRK2 or GDP-Rab proteins is indicated above the individual graphs. In panel B, an additional preincubation for 30 min with 100 μ M paroxetine (PAR), was performed. In all cases, cells were challenged with no agent (NONE) or 10 μ M NA (with 0.1 μ M propranolol) for 15 min (indicated in the abscissas), washed and intracellular calcium was recorded as indicated under Materials and Methods. Cells were challenged with 10 μ M NA (with 0.1 μ M propranolol) (open bars) or 1 μ M LPA (dashed bars). Data were normalized to the increase in intracellular calcium observed in response to NA under the NONE condition for each panel. Plotted are the means and vertical lines representing the S.E.M. of 6–8 experiments utilizing different cell preparations. *** $P < 0.001$; and * $P < 0.05$.

expressed. Our data indicate that NA triggers α_{1B} -adrenergic receptor-Rab5 interaction as reflected by FRET (Alfonzo-Méndez et al., 2017; Castillo-Badillo et al., 2015) and the present results), but no FRET is observed with the inactive GDP-Rab5 mutant (Castillo-Badillo et al., 2015). In previous work, α_{1B} -adrenergic receptor-Rab5 co-immunoprecipitation was observed, but this was not modified by receptor activation (Castillo-Badillo et al., 2015). In other words, the data on co-immunoprecipitation suggested that, in the absence of agonist, the α_{1B} -adrenergic receptors might be found in a signaling complex with Rab5, permitting co-immunoprecipitation, but not within the physical distance (10–100 Å) that allows FRET to occur; agonist-induced receptor activation might lead to a conformational change that permits α_{1B} -adrenergic receptor-Rab5 interaction. There is also evidence that some Rab proteins can directly interact with G protein-coupled receptor domains and that, in some cases, this occurs preferentially with the GDP-bound form (inactive, dominant negative) (Dong et al., 2010; Hamelin et al., 2005; Parent et al., 2009; Wang et al., 2018). Therefore, it seems possible that the GDP-Rab5 mutant might alter α_{1B} -adrenergic receptor phosphorylation by interfering with the action of GRK2 in the signaling complex, but this remains to be experimentally demonstrated.

Acknowledgments

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 authors express their gratitude for advice and technical support to Dr. María Teresa Romero-Ávila and Dr. Rocío Alcántara-Hernández from our laboratory and the following members of the indicated Service Units of our

Institute: Drs. Héctor Malagón and Claudia Rivera (Bioterio); Juan Barbosa and Gerardo Coello (Cómputo); and Aurey Hernández and Manuel Ortín (Taller). The authors express their gratitude to Maggie Brunner, M.A., for editorial/style corrections. This research was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) [Grants numbers 253156 and 6676] and Dirección General de Personal Académico-UNAM [PAPIIT, Grant number IN200718].

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172846>.

References

- 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 alpha1A-adrenergic receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1864, 2378–2388.
- Alfonzo-Méndez, M.A., Carmona-Rosas, G., Hernández-Espinosa, D.A., Romero-Ávila, M.T., García-Sáinz, J.A., 2018. Different phosphorylation patterns regulate alpha1D-adrenoceptor signaling and desensitization. *Biochim. Biophys. Acta* 1865, 842–854.
- Alfonzo-Méndez, M.A., Hernández-Espinosa, D.A., Carmona-Rosas, G., Romero-Ávila, M.T., Reyes-Cruz, G., García-Sáinz, J.A., 2017. Protein kinase C activation promotes alpha1B-adrenoceptor internalization and late endosome trafficking through Rab 9 interaction. Role in heterologous desensitization. *Mol. Pharmacol.* 91, 296–306.
- Carmona-Rosas, G., Hernández-Espinosa, D.A., Alcántara-Hernández, R., Alfonzo-Méndez, M.A., García-Sáinz, J.A., 2019. Distinct phosphorylation sites/clusters in the carboxyl terminus regulate alpha1D-adrenergic receptor subcellular localization and signaling. *Cell. Signal.* 53, 374–389.
- Castillo-Badillo, J.A., Sánchez-Reyes, O.B., Alfonzo-Méndez, M.A., Romero-Ávila, M.T., Reyes-Cruz, G., García-Sáinz, J.A., 2015. alpha1B-Adrenergic receptors differentially associate with rab proteins during homologous and heterologous desensitization. *PLoS One* 10, e0121165.
- Dinkel, B.A., Kremer, K.N., Rollins, M.R., Medlyn, M.J., Hedin, K.E., 2018. GRK2 mediates TCR-induced transactivation of CXCR4 and TCR-CXCR4 complex formation that

- drives PI3Kgamma/PREX1 signaling and T cell cytokine secretion. *J. Biol. Chem.* 293, 14022–14039.
- Diviani, D., Lattion, A.L., Cotecchia, S., 1997. 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, 28712–28719.
- 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. *J. Biol. Chem.* 271, 5049–5058.
- Dong, C., Yang, L., Zhang, X., Gu, H., Lam, M.L., Claycomb, W.C., Xia, H., Wu, G., 2010. Rab 8 interacts with distinct motifs in alpha2B- and beta2-adrenergic receptors and differentially modulates their transport. *J. Biol. Chem.* 285, 20369–20380.
- Ferguson, S.S., 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* 53, 1–24.
- García-Sáinz, J.A., Gottfried-Blackmore, A., Vázquez-Prado, J., Romero-Ávila, M.T., 1999a. Protein kinase C-mediated phosphorylation and desensitization of human alpha(1b)-adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 385, 263–271.
- García-Sáinz, J.A., Rodríguez-Pérez, C.E., Romero-Ávila, M.T., 2004. Human alpha-1D adrenoceptor phosphorylation and desensitization. *Biochem. Pharmacol.* 67, 1853–1858.
- García-Sáinz, J.A., Vázquez-Prado, J., Medina, L.C., 2000. Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.* 389, 1–12.
- García-Sáinz, J.A., Vázquez-Prado, J., Villalobos-Molina, R., 1999b. Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease. *Arch. Med. Res.* 30, 449–458.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440–3450.
- Guo, S., Carter, R.L., Grisanti, L.A., Koch, W.J., Tilley, D.G., 2017. Impact of paroxetine on proximal beta-adrenergic receptor signaling. *Cell. Signal.* 38, 127–133.
- Hachet-Haas, M., Converset, N., Marchal, O., Matthes, H., Gioria, S., Galzi, J.L., Lecat, S., 2006. 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, 941–956.
- Hamelin, E., Theriault, C., Laroche, G., Parent, J.L., 2005. The intracellular trafficking of the G protein-coupled receptor TPbeta depends on a direct interaction with Rab11. *J. Biol. Chem.* 280, 36195–36205.
- Hernández-Espinosa, D.A., Carmona-Rosas, G., Alfonso-Méndez, M.A., Alcántara-Hernández, R., García-Sáinz, J.A., 2019. Sites phosphorylated in human alpha1B-adrenoceptors in response to noradrenaline and phorbol myristate acetate. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1866, 1509–1519.
- Hieble, J.P., Bylund, D.B., Clarke, D.E., Eikenburg, D.C., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P., Ruffolo Jr., R.R., 1995. International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol. Rev.* 47, 267–270.
- Homan, K.T., Wu, E., Wilson, M.W., Singh, P., Larsen, S.D., Tesmer, J.J., 2014. Structural and functional analysis of g protein-coupled receptor kinase inhibition by paroxetine and a rationally designed analog. *Mol. Pharmacol.* 85, 237–248.
- Hsu, C.Y., Uludag, H., 2012. A simple and rapid nonviral approach to efficiently transfect primary tissue-derived cells using polyethylenimine. *Nat. Protoc.* 7, 935–945.
- Hunyady, L., Baukal, A.J., Gaborik, Z., Olivares-Reyes, J.A., Bor, M., Szaszak, M., Lodge, R., Catt, K.J., Balla, T., 2002. Differential PI 3-kinase dependence of early and late phases of recycling of the internalized AT1 angiotensin receptor. *J. Cell Biol.* 157, 1211–1222.
- Iacovelli, L., Franchetti, R., Grisolia, D., De Blasi, A., 1999. Selective regulation of G protein-coupled receptor-mediated signaling by G protein-coupled receptor kinase 2 in FRTL-5 cells: analysis of thyrotropin, alpha(1B)-adrenergic, and A(1) adenosine receptor-mediated responses. *Mol. Pharmacol.* 56, 316–324.
- Iwata, K., Ito, K., Fukuzaki, A., Inaki, K., Haga, T., 1999. Dynamin and rab5 regulate GRK2-dependent internalization of dopamine D2 receptors. *Eur. J. Biochem.* 263, 596–602.
- Kobilka, B., 2013. The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (Nobel Lecture). *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 52, 6380–6388.
- Komolov, K.E., Benovic, J.L., 2018. G protein-coupled receptor kinases: past, present and future. *Cell. Signal.* 41, 17–24.
- Lattion, A.L., Diviani, D., Cotecchia, S., 1994. Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the alpha 1B-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 22887–22893.
- Lefkowitz, R.J., 1998. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem.* 273, 18677–18680.
- Lefkowitz, R.J., 2013. A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture). *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 52, 6366–6378.
- Martínez-Morales, J.C., Romero-Ávila, M.T., Reyes-Cruz, G., García-Sáinz, J.A., 2018. S1P1 receptor phosphorylation, internalization, and interaction with Rab proteins: effects of sphingosine 1-phosphate, FTY720-P, phorbol esters, and paroxetine. *Biosci. Rep.* 38 BSR20181612.
- Meizoso-Huesca, A., Villegas-Comonfort, S., Romero-Ávila, M.T., García-Sáinz, J.A., 2018. Free fatty acid receptor 4 agonists induce lysophosphatidic acid receptor 1 (LPA1) desensitization independent of LPA1 internalization and heterodimerization. *FEBS Lett.* 592, 2612–2623.
- Moore, C.A., Milano, S.K., Benovic, J.L., 2007. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 451–482.
- Murphy, M.M., Scaccia, L.A., Volpicelli, L.A., Radhakrishna, H., 2003. Agonist-induced endocytosis of lysophosphatidic acid-coupled LPA1/EDG-2 receptors via a dynamin 2- and Rab5-dependent pathway. *J. Cell Sci.* 116, 1969–1980.
- Parent, A., Hamelin, E., Germain, P., Parent, J.L., 2009. Rab11 regulates the recycling of the beta2-adrenergic receptor through a direct interaction. *Biochem. J.* 418, 163–172.
- Perez, D.M., DeYoung, M.B., Graham, R.M., 1993. Coupling of expressed alpha 1B- and alpha 1D-adrenergic receptor to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific. *Mol. Pharmacol.* 44, 784–795.
- Price, R.R., Morris, D.P., Biswas, G., Smith, M.P., Schwinn, D.A., 2002. 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, 9570–9579.
- Rajagopal, S., Shenoy, S.K., 2018. GPCR desensitization: acute and prolonged phases. *Cell. Signal.* 41, 9–16.
- Rasband, W.S., 1997–2004. ImageJ. National Institutes of Health. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
- Ribas, C., Penela, P., Murga, C., Salcedo, A., García-Hoz, C., Jurado-Pueyo, M., Aymerich, I., Mayor Jr., F., 2007. The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 913–922.
- Schumacher, S.M., Gao, E., Zhu, W., Chen, X., Chuprun, J.K., Feldman, A.M., Tesmer, J.J., Koch, W.J., 2015. Paroxetine-mediated GRK2 inhibition reverses cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Sci. Transl. Med.* 7 277ra231.
- Thal, D.M., Homan, K.T., Chen, J., Wu, E.K., Hinkle, P.M., Huang, Z.M., Chuprun, J.K., Song, J., Gao, E., Cheung, J.Y., Sklar, L.A., Koch, W.J., Tesmer, J.J., 2012. Paroxetine is a direct inhibitor of g protein-coupled receptor kinase 2 and increases myocardial contractility. *ACS Chem. Biol.* 7, 1830–1839.
- Thal, D.M., Yeow, R.Y., Schoenau, C., Huber, J., Tesmer, J.J., 2011. Molecular mechanism of selectivity among G protein-coupled receptor kinase 2 inhibitors. *Mol. Pharmacol.* 80, 294–303.
- Tian, X., Wang, Q., Guo, R., Xu, L., Chen, Q.M., Hou, Y., 2016. Effects of paroxetine-mediated inhibition of GRK2 expression on depression and cardiovascular function in patients with myocardial infarction. *Neuropsychiatric Dis. Treat.* 12, 2333–2341.
- Tobin, A.B., 2008. G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom. *Br. J. Pharmacol.* 153 (Suppl. 1), S167–S176.
- 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 Pharmacol. Sci.* 29, 413–420.
- Vázquez-Prado, J., García-Sáinz, J.A., 1996. Effect of phorbol myristate acetate on alpha 1-adrenergic action in cells expressing recombinant alpha 1-adrenoceptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* 50, 17–22.
- Vázquez-Prado, J., Medina, L.C., García-Sáinz, J.A., 1997. Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of alpha1b-adrenoceptors in Rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 272, 27330–27337.
- Wang, G., Wei, Z., Wu, G., 2018. Role of Rab GTPases in the export trafficking of G protein-coupled receptors. *Small GTPases* 9, 130–135.