



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CONTRIBUCIÓN DE LOS SITIOS DE FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR PARA  
ÁCIDOS GRASOS LIBRES 1 (FFA1) EN SU INTERACCIÓN CON BETA-ARRESTINA 2

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
EMMANUEL FLORES ESPINOZA

TUTOR PRINCIPAL  
DR. JESÚS ADOLFO GARCÍA SÁINZ  
Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Claudia González Espinosa  
CINVESTAV Sede Sur  
Dra. Guadalupe Reyes Cruz  
CINVESTAV Sede Sur

Ciudad Universitaria, CD. MX. Enero, 2024



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.

## Reconocimientos

El presente proyecto de investigación se desarrolló en el laboratorio del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, del Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Para la realización del presente, se contó con el apoyo institucional de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente de la Coordinación General de Estudios de Posgrado, la Coordinación del Posgrado en Ciencias Bioquímicas y del Instituto de Fisiología Celular.

### Financiamiento

Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT).

Ciencia Básica 253156; Fronteras de la ciencia 6676;

Beca para estudios de maestría CVU 997490

Dirección General de Asuntos del Personal Académico

Donativos IN200718 e IN201221

### Apoyo académico y tutoría

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz

Dra. Claudia González Espinosa

Dra. Guadalupe Reyes Cruz

### Jurado de examen para la obtención del grado

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez

Dra. Lilian González Segura

Dr. Carlos Leonardo Peraza Reyes

Dr. Enrique Rudiño Piñera

Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella

Asesoría Técnica

Dra. María Teresa Romero Ávila

Dra. Rocío Alcántara Hernández

M.C. Helivier Solís González

Unidades de apoyo del Instituto de Fisiología Celular

Unidad de Biología Molecular

Dra. Laura Ongay Larios

Biol. Guadalupe Códiz Huerta

Bio. Minerva Mora Cabrera

Unidad de Cómputo

Ing. Juan Barbosa Castillo

Biol. Gerardo Cuello Coutiño

Biblioteca

Dra. Sandra Moncada Hernández

Taller

Ing. Aurey Galván Lobato

Ing. Manuel Ortínez Benavides



## Agradecimientos personales

Como todo producto de creación humana, una tesis es un trabajo que nace y se desarrolla desde la colectividad, al ser el sustentante un individuo inmerso en una sociedad, y al ser la investigación científica una actividad que pretende generar conocimiento universal.

Esta tesis es el reflejo de un trabajo colectivo en un marco de tiempo estrictamente definido entre 2021 y 2023, sin embargo, es fruto de un largo proceso educativo, formativo y vivencial.

En el ámbito académico, agradezco profundamente la tutoría y el apoyo del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, el cual ha sido mi mayor mentor académico hasta ahora. Aprecio la fortuna de haber sido parte de su equipo de trabajo, ya que aprendí con su ejemplo lo que es un verdadero líder y el impacto que la amabilidad, la paciencia y la dedicación pueden lograr en el trabajo científico. Gracias Dr. Adolfo por todos sus consejos, sus pláticas siempre interesantes y su apoyo más allá de lo académico.

Sin duda una parte fundamental del funcionamiento del laboratorio 303-sur del IFC son la Dra. Ma. Teresa Romero Ávila y la Dra. Rocío Alcántara Hernández, las encargadas de que todo funcione; gracias por propiciar las condiciones necesarias para la realización de este trabajo, pero además estar siempre dispuestas a ayudar en los experimentos y a resolver cualquier problema emergente, son un ejemplo de dedicación y experiencia en la investigación.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio por haber sido grandes colaboradores y conformar un equipo sólido que ayudó en el día a día a sobrellevar nuestra labor de investigación. Gracias Helivier Solís por ser una excelente amiga y compañera, siempre dispuesta a ayudarme en los experimentos y a despejar dudas, así como compartir reactivos; las largas horas de trabajo fueron mejores teniéndote presente, te agradezco tu cálida amabilidad y todos esos panes y dulces que tantas veces me salvaron del hambre. Así mismo, David Hernández, Uriel Ávila, Juan Carlos, Víctor Urbieta y Raúl Isaías fueron un gran apoyo y recurso recurrente de ánimo, fue una grata experiencia haber realizado este trabajo conviviendo con ustedes. Gracias David por siempre estar dispuesto a resolver mis dudas sobre trámites, y siempre ser un ejemplo.

La realización de este proyecto de investigación también implicó en ciertos aspectos poner en práctica conocimientos técnicos, académicos y habilidades aprendidas anteriormente en las estancias que realicé en otros laboratorios. Al laboratorio de la Dra. Leticia Rocha Zavaleta del Instituto de Investigaciones Biomédicas y al laboratorio de la Dra. Paula Licona Limón, incluyendo a todos sus integrantes, les agradezco haber contribuido en mi formación en la ciencia, desde mis primeros pasos, sin ustedes no hubiera llegado al punto de inicio de mi maestría. Gracias Dra. Paula por haberme acogido como un amigo de su laboratorio aún antes de ser miembro, aprecio mucho su amistad, acompañamiento y la siempre atenta inclusión a su familia académica.

A mis amigos, porque su sola existencia es preciosa, por llenar de felicidad y buenos momentos mi estancia durante la maestría, por siempre demostrarme que la vida está llena de momentos increíbles. Ustedes tienen una dedicatoria especial en este proyecto.

Eugenio Contreras, gracias por ser mi mejor amigo y tan bella persona. Tu bondad es de lo más cálido que he conocido en esta vida. Gracias por todo el apoyo emocional, económico y académico que me has provisto desde que te conocí. Tu eres quien más has estado presente en mis peores y mejores momentos. Te tengo un cariño y admiración especiales y eternos. Platicar contigo, aunque sea de lo más burdo, se siente como un abracito al corazón, gracias. Me siento muy orgulloso de lo que logras con tu esfuerzo, si alguien es dedicado en la academia, ese eres tú y sé que te espera un futuro glorioso.

Andrés Sáenz, otro de mis mejores amigos, conocerte durante la maestría fue un enorme placer y de lo mejor que me dejó esta etapa. Gracias por siempre conectarme con la realidad que nos rodea fuera del laboratorio, por acompañarme en formas diversas de pensar y por ser un gran apoyo emocional. Fue muy grato aprender contigo cómo ejercitar y cuidar mejor mi cuerpo, sin duda eso constituyó un aspecto fundamental para mejorar mi bienestar en los últimos años, te debo mucho. Tantas aventuras que recordar, espero siempre volverlas a contar entre nosotros una y otra vez.

Fernando H. Real, otro de mis grandes amigos de la vida, eres todo un ejemplo de perseverancia y a la vez de tomarme las cosas con calma y paciencia, tu habilidad para ver con facilidad la salida a situaciones complejas me inspira. Fuiste el mejor compañero de generación por un año, gracias por mostrarme el espacio tan grande que tienes en tu corazón para la amistad.

Por seis años el Instituto de Fisiología Celular fue mi segundo hogar, y los amigos que hice ahí fueron como mi segunda familia. En el laboratorio de la Dra. Licona conocí a personas tan especiales que quiero tener presentes siempre: José Luis, gracias por tu generosidad, disposición de ayudar y todos esos planes, siempre es un gusto convivir contigo. Lups, eres una persona increíble y original, bondadosa como pocas y dedicada como nadie, sé que a ti y a tu familia les esperan puras cosas buenas. Ofe, gracias por tu confianza y por siempre hacerme reír, pero sobre todo por siempre estar, te aprecio muchísimo. Enrique, eres todo un ejemplo para seguir sobre cómo sobrellevar la vida en el ambiente académico y cómo luchar por lo que quieres. Ivonne, gracias por siempre demostrarme tu calidad de persona y por acompañarme siempre como “Licona honorífico”. Eric, aunque el tiempo conviviendo contigo fue menor, fue de muy buena calidad, tu sonrisa y carisma alegran siempre el ambiente. Diego y Aranzazú, aunque hace mucho nos dejaron por habitar en el país germánico siempre tengo presente los momentos especiales que vivimos. Los Licona un equipo maravilloso, ojalá el camino de la ciencia nos lleve a reunirnos todos de nuevo en algún momento.

Al laboratorio de la Dra. Chagoya, les agradezco por adoptarme a la hora del almuerzo y siempre contar con pláticas de sumo interés. Chendo, has sido un amigo increíble y tu bondad con la gente que te rodea es todo un ejemplo para mí a seguir, gracias por todas

las buenas aventuras vividas y los consejos atinados que siempre compartes. Sé que, aunque estamos condenados a nunca vivir en el mismo sitio, siempre cuento contigo y lo demuestras, eres único. Beto, te tengo un cariño especial y espero poder ser testigo de tu éxito, tu carisma y talento para unir a las personas son increíbles, vas a llegar muy lejos. Alex y Erick, siempre fue grato platicar con ustedes y vivir historias divertidas, gracias por ser buenos amigos. Enrique, eres de las personas más dulces y amigables que he conocido, siempre tienes algo interesante que contar, espero coincidir de nuevo contigo. Ana, Bibi y Gaby, gracias por siempre estar dispuestas a prestarme equipos, reactivos o simplemente ayudar, aprecio su gracia y generosidad. Tenerlos de vecinos de laboratorio me hizo volver a creer en la importancia de la cooperatividad en la ciencia.

A mi generación 44 de la LIBB: Mariana López, Damián García, Maru Contreras, Karla Soriano y María José Blanco, compartir el camino de ser biomédicos nos mantiene unidos de alguna manera especial a pesar de la distancia entre nosotros y lo poco que frecuentamos en los últimos años. Fueron grandes compañeros y agradezco haber compartido nuestros primeros pasos en este mundo de la investigación. Son la ejemplificación del talento y la creatividad, les aprecio.

Raful Navarro, tu fuiste un pilar importante en mi vida por varios años, gracias por acompañarme a conocer el mundo contenido en la Ciudad de México y demostrar cómo darle una buena cara a la vida, agradezco el tiempo y las enseñanzas compartidas.

Héctor Gurrola, el viaje por el mundo de los asuntos de la política académica en el cual nos inmiscuimos me dejó grandes vivencias y profundas enseñanzas, coincidir contigo en tantos proyectos, sueños y visiones para contribuir a la Universidad fue muy grato. Sé que siempre estaremos dispuestos a volver a colaborar en esas ideas locas e inocentes que sólo a nosotros se nos ocurren.

No sólo en el ámbito académico encontré buenas amistades que significaron un gran apoyo durante este proceso, sino también fuera de él. Javi Sánchez, hablar contigo siempre es como llegar a un refugio, gracias por compartir siempre tu perspicaz visión sobre asuntos sociales, pero sobre todo por siempre ayudarme a ver mi propio valor, eres uno de mis grandes amigos, gracias por guiarme siempre a la reivindicación. Chef Sahib Tentor, usted me dio una oportunidad cuando no encontraba salida, su talento es admirable y su ejemplo de vida aún más, gracias por ver en mí un gran futuro y ayudarme en algún momento a sostenerme en ese camino. Gracias por salvarme del hambre tantas veces.

Mención especial de agradecimiento a toda la familia van Wielink Ituarte, gracias por abrirme las puertas de su casa, darme un techo y sobre todo por abrirme las puertas de su familia. Mercaderes 122 fue un hogar por 8 años para mí, significó tener un refugio desde el cual pude iniciar y desarrollar mi carrera académica. Gracias, señora Viviana por creer en mí, confiar en mí y siempre incluirme en sus buenos deseos. Don Alberto Ituarte, me hubiera gustado que me viera avanzar más en mis sueños, usted siempre me hizo saber que mi dedicación me llevaría a un buen futuro, gracias por apoyarme tanto en la primera etapa de mi camino, las pláticas en el comedor entre sus ratos de sueño

me dejaron grandes lecciones. Le mando un gran abrazo hasta el más allá. Ricky van Wielink, tú eres una persona única en toda la extensión de la palabra, gracias por siempre integrarme, por siempre estar dispuesto a compartir tu conocimiento y experiencias, pero sobre todo por hacer de nuestro hogar un lugar cálido.

Andrés van Wielink, gracias por creer en mi desde que comenzamos a hablar sobre nuestros sueños y planes en las gradas de Bachilleres. Vivir juntos ocho años significó tener un hermano más, que confío será para toda la vida. Gracias por demostrar en extenso toda la generosidad que guardas en ese corazón, por mucho tiempo fuimos tú y yo bajo un techo, saliendo cada mañana a construir nuestro futuro para después saludarnos en la noche y tratar de contar un poco sobre nuestro día. Te quiero mucho y siempre te tendré un lugar especial en mi corazón. Gracias por confiar en mí una y otra vez, aún cuando eso implicó confiar desde cero varias veces. Sé que siempre has estado orgulloso de mí, y eso es mutuo. Lo estamos logrando, estamos logrando esos sueños que tantas veces nos contamos.

Mis amigos de Cancún, siempre cuento en mi mente con ustedes, gracias por su cariño y por siempre hacerme saber que los sigo teniendo: Jaime, Mariana, Brenda, Olivia, Ludvika, Jatzibe, Luis, Guadalupe, Janete, Yesenia, Sebastián; les agradezco que su amistad traspase el tiempo y el espacio, significan mucho para mí.

Especialmente quiero dedicar mi agradecimiento en este escrito a mi familia. Abuela Luci, gracias por ser mi fuente eterna de cariño. Abuela Lucha, gracias por siempre demostrarme tu cariño, siempre mereciste más. Abuelo Santos, qué decir de todo el apoyo que he recibido de ti, tú has sido mi mayor referente moral en la vida, cuando me siento perdido siempre me encuentro a mí mismo y a la voz de la razón al platicar contigo, no sólo te quiero, te amo y espero tenerte mucho más tiempo para demostrártelo.

A la familia Torres Hernández, gracias por ser otro hogar para mí, por demostrar tanta generosidad conmigo y por ser un punto de apoyo importante. Tía Neva, tío Andrés, David, Liliana, Toño, Karen y Gabriel: ustedes son el ejemplo de cómo una familia por más problemas que afrente puede solucionar juntos cualquier problema, gracias por darme la calidez familiar que tanto busqué en estos últimos años. Fueron fuente de tranquilidad y paz en muchos momentos complicados.

Mis hermanos, todo lo que hago, aunque implica estar lejos de ustedes, lo hago pensando también en ustedes y en el bienestar que quiero construir para nosotros. Lisset, siempre me alegra el alma, aún en los días más complicados, platicar contigo y saber de tu vida, siempre has sido una de mis mayores alegrías. Isaac, tú eres siempre mi mayor fuente de fortaleza, aún siendo menor que yo siempre encuentro en ti uno de mis puntos principales de apoyo, gracias por ser los dos los mejores hermanos que he podido tener. Hannia, gracias por ser parte de la familia y por ayudar tanto a mi hermano. Pequeña Regina, tú representas nuestro futuro y has llegado para recordarnos la importancia de mantenernos unidos.



A mi mamá, Erica Espinoza Hernández, gracias por ser el mayor ejemplo de lucha, de fortaleza y perseverancia en mi vida. Has sido mi mamá desde que eras muy joven, pero desde el principio desempeñaste un papel impecable en mi proceso de crianza. Tú eres la persona que más quiero en este mundo y por quien cada día deseo mejorar. Sé que muchas veces no entiendes a lo que me dedico, pero sé que te llena de orgullo y que eres feliz de mis logros. Esta tesis representa mucho para ti, tu representas todo para mí.

Por último, a la persona que más le dedico esta tesis es a mi padre, Raúl Flores Castillo. Tomar la decisión de hacer esta maestría me costó mucho porque tu ya no estabas, pero sé que tu siempre quisiste que la hiciera. Sé que estas orgulloso de mi desde donde quiera que estés, si es en este mundo o algún lugar más allá. Gracias, por tanto, te amo por siempre.

Esta sección es la última que escribo de esta tesis, lo hago en medio de unos días gélidos en Nueva York, entro en confort recordando todo lo que ustedes significan para mí, lo que esta maestría ha representado y todo lo recorrido. Gracias.

# 1. Contenido

2.	Resumen.....	10
3.	Introducción.....	11
4.	Antecedentes .....	28
5.	Justificación.....	30
6.	Pregunta principal de investigación.....	30
7.	Hipótesis. ....	31
8.	Objetivo general .....	31
9.	Objetivos específicos .....	31
10.	Metodología .....	31
11.	Resultados.....	34
12.	Discusión .....	44
13.	Conclusiones .....	49
14.	Perspectivas .....	49
15.	Referencias.....	51
16.	Anexos.....	62

## 2. Resumen

La fosforilación de residuos de serina y treonina es un evento regulatorio clave en la función de los receptores acoplados a proteínas G, ya que define la interacción molecular con sus principales transductores como lo son las  $\beta$ -arrestinas y las proteínas G, y a su vez, impacta en procesos posteriores como la internalización, tráfico vesicular y la actividad de los receptores en espacios intracelulares. En el caso del receptor para ácidos grasos libres 1 (FFA1), se ha identificado a los residuos T215, T287, T293, y S298 en el receptor como blancos de fosforilación, así como su participación en el proceso de internalización y modulación de la activación de ERK (cinasa efectora río abajo de la señalización de FFA1).

Dado que estos procesos son dependientes de la interacción de  $\beta$ -arrestina con los GPCRs, en este trabajo se estudió la interacción de FFA1 con  $\beta$ -arrestina 2 en células HEK293 expresando variantes de FFA1 con mutaciones en los sitios de fosforilación previamente identificados, los cuales fueron cambiados a residuos no fosforilables. Mediante el uso de la imagenología de FRET, se detectaron diferencias en el nivel de interacción de las variantes de FFA1 en sitios de fosforilación con  $\beta$ -arrestina 2, en respuesta a estímulos de DHA y PMA, los cuales promueven la fosforilación de dicho receptor.

Al evaluar la interacción de las variantes de FFA1 con Rab5 mediante la misma estrategia, se encontró un patrón similar al observado con  $\beta$ -arrestina 2, lo cual apoya la hipótesis de que la fosforilación en sitios específicos del receptor y  $\beta$ -arrestina 2 juegan un papel importante en la regulación de la internalización y tráfico de FFA1. Por último, para entender si la regulación de la internalización de este receptor impacta en su señalización, evaluamos la respuesta de fosforilación de ERK dependiente de la activación del FFA1 con DHA, en presencia o ausencia de un Pit-Stop 2, compuesto que inhibe la internalización dependiente de clatrina. Los resultados de estos experimentos muestran que la internalización del receptor promueve la actividad de la vía de ERK a tiempos tardíos.

Nuestros resultados en conjunto sugieren que el residuo T215 en la tercera asa intracelular de FFA1 tiene una contribución importante en el proceso de reclutamiento de  $\beta$ -arrestina 2 al receptor, mientras que los residuos T287, T293 y S298 en el extremo C-terminal podrían tener un papel secundario que debe estudiarse con mayor detalle. A su vez, la dinámica de interacción de FFA1 con  $\beta$ -arrestina 2 impacta en el proceso de internalización, tráfico y señalización del receptor.

### 3. Introducción

La comunicación es un proceso fundamental en los sistemas biológicos, ya que les permite mantener, coordinar o adecuar sus funciones de acuerdo con el estado de otros constituyentes del propio sistema y del exterior (Bich et al., 2019). A nivel celular, existen diversos mecanismos de comunicación, que incluyen el contacto directo entre membranas, vesículas extracelulares y la mediada a través de señales químicas (Armingol et al., 2021; Bich et al., 2019; X. Zhou et al., 2018).

La señalización celular es un componente esencial de la comunicación celular. Se refiere al proceso mediante el cual una célula detecta y responde a señales provenientes de su entorno. Las señales pueden ser químicas, eléctricas o mecánicas, y que desencadenan una serie de eventos intracelulares que regulan funciones celulares específicas (Changeux & Christopoulos, 2016; Wu, 2013).

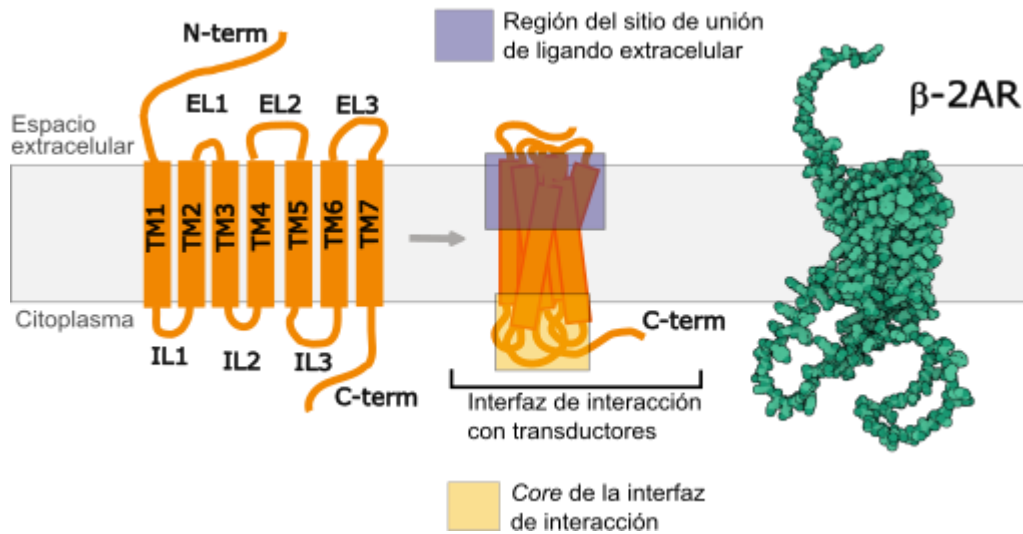
Los receptores de superficie celular desempeñan un papel crucial en la detección de las señales extracelulares denominadas de manera genérica como moléculas ligadas, o simplemente ligandos. La unión de estos ligandos a sus receptores conduce a la activación de vías de señalización intracelulares, que a su vez regulan diversos procesos como la proliferación celular, la diferenciación, la supervivencia y la respuesta inmunitaria (Lemmon et al., 2016). La señalización celular es un proceso altamente regulado y preciso que asegura la correcta comunicación y coordinación de las células en un organismo.

#### 2.1 Receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), también conocidos como receptores de siete dominios transmembranales, son una super familia de proteínas con funciones de señalización que constituyen el grupo más grande y diverso de receptores en eucariotas (Lefkowitz, 2004; Yang et al., 2021). Tan sólo en el ser humano, se han identificado alrededor de 800 genes que codifican para miembros de esta familia (aproximadamente el 4% del genoma) (Fredriksson & Schiöth, 2005). Además, están involucrados virtualmente en todos los procesos biológicos que ocurren en nuestro organismo, un reflejo de esto es que aproximadamente el 40% de los compuestos farmacéuticos tienen como blanco un receptor de esta familia.

Los GPCRs son considerados receptores membranales, debido a su localización predominante en la membrana plasmática, donde entran en contacto con su ligando extracelular. La topología característica de estas proteínas es de un extremo amino-terminal (N-term) en el lado extracelular y el extremo carboxilo-terminal (C-term) en el citoplasma, entre estas regiones se despliegan a manera de serpentín los siete dominios transmembranales (Fig. 1). En dichos dominios predominan estructuras de hélices que se encuentran conectadas por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares que, al igual que los extremos N-term y C-term, se encuentran altamente desordenados. No obstante, en algunos receptores bajo ciertas condiciones, se pueden manifestar

estructuras secundarias en las asas o regiones terminales (Bockaert and Pin, 1999, Fredriksson et al., 2003, Lefkowitz, 2004).



**Fig. 1. Generalidades de la estructura de los GPCRs**

Esquema de la estructura tipo serpiente de los GPCRs. Se puede apreciar la topología de estos y el arreglo de sus regiones en un modelo extendido y uno que simula el plegamiento nativo de estos receptores en la membrana. La estructura verde corresponde a un modelo generado por AlphaFold del receptor  $\beta$ -2 adrenérgico\* ( $\beta$ -2AR), el cual predice la estructura de las asas intracelulares y del extremo carboxilo terminal que pocas veces logran estructurarse en modelos generados a partir de datos experimentales.

N-term: dominio amino-terminal. C-term: dominio carboxilo-terminal. IL: asa intracelular. EL: asa extracelular. TM: segmento transmembranal. \* <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P07550>

Al ser una familia de proteínas muy numerosa, existen grandes variaciones estructurales y funcionales entre los miembros de este grupo (Fredriksson et al., 2003). Lo anterior, permite que en conjunto los GPCRs sean capaces de responder a un repertorio amplio de ligandos o estímulos de diferente naturaleza, que van desde la exposición a la luz, hasta la interacción con odorantes, compuestos gustativos (sabores), neurotransmisores, quimiocinas, nucleótidos, carbohidratos, lípidos, péptidos secretados o procesados desde la membrana plasmática. Incluso, la región N-term de ciertos receptores puede actuar como su propio ligando, particularmente los del grupo PAR (receptores activados por proteasa, por sus siglas en inglés, como el receptor de trombina) y los receptores de adhesión (W. Thomsen et al., 2005; Yang et al., 2021).

Existen diversas clasificaciones de los GPCRs basándose en su estructura, secuencia, ligandos y función, de todas ellas la más utilizada es la que divide a los receptores en siete clases de acuerdo a parámetros de secuencia y función: clase A o de los receptores similares a rodopsina, clase B o familia de la secretina, clase C o de los receptores metabotrópicos de glutamato, clase D o receptores de feromonas de apareamiento fúngicas, clase E o receptores de cAMP (adenosín monofosfato cíclico),

clase F o de los receptores Frizzled y Smoothed, y la clase T o receptores Taste (responden a compuestos gustativos) (Yang et al., 2021).

Como su nombre lo indica, estos receptores se acoplan en su interfaz intracelular con proteínas G heterotriméricas, compuestas por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  es una proteína de unión a nucleótidos de guanina con actividad intrínseca de GTPasa, mientras que las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ , que comúnmente forman un dímero estable al cual se une y desune la subunidad  $\alpha$  según se estado de activación, contienen dominios de interacción con diversas moléculas señalizadoras y sitios de anclaje a membranas (Lefkowitz, 2004; Weis & Kobilka, 2018; Yang et al., 2021).

En el modelo canónico de señalización de GPCRs, el receptor en estado inactivo se encuentra sin interaccionar con proteínas G. El complejo heterotrimérico se encuentra ensamblado y anclado en la membrana plasmática, donde una molécula de GDP (guanosín difosfato) se mantiene unida a la subunidad  $\alpha$  (Weis & Kobilka, 2018; Wootten et al., 2018.). Cuando el ligando se une al receptor, ocurren una serie de cambios conformacionales que son transmitidos a la región del receptor orientada del lado intracelular, compuesta por las asas intracelulares, la región C-term y algunos segmentos de las hélices transmembranales cercanos a esta interfaz. Todo lo anterior, en conjunto promueve un movimiento conocido como *outward*, el cual expone a los residuos de aminoácidos del receptor que interaccionan con la proteína G (Farrens, 1996). Derivado de este conjunto de cambios conformacionales, los GPCRs pueden interaccionar con proteínas G en función del estado de activación determinado por la unión de ligando (Fig. 2) (Kumari et al., 2023; Wootten et al., 2018.).

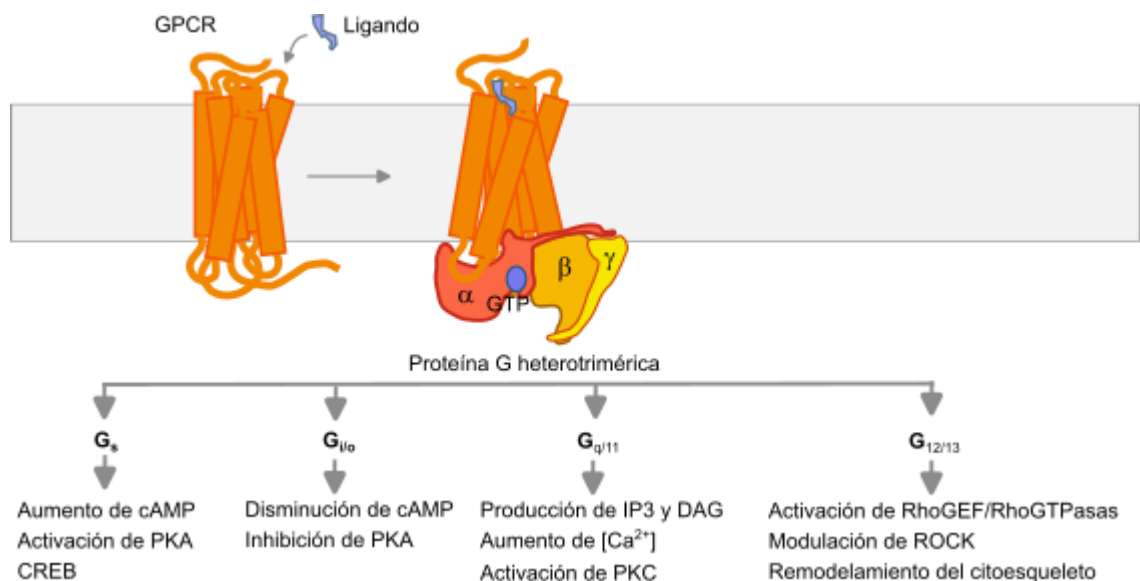
En el estado activo, los GPCRs actúan como factores intercambiadores de nucleótido de guanina (GEFs, por sus siglas en inglés), promoviendo que el GDP en la subunidad  $G\alpha$  sea liberado e intercambiado por una molécula de GTP. La unión de este último nucleótido determina el estado activo de las proteínas G, en el que la subunidad  $G\alpha$  se libera del dímero  $G\beta\gamma$  y, tanto  $G\alpha$  como  $G\beta\gamma$ , modulan enzimas y canales iónicos que impactan el funcionamiento de la célula a través de diferentes redes de señalización. Este sistema vuelve a su estado basal cuando  $G\alpha$  lleva a cabo su actividad de GTPasa, formando GDP y pudiendo unirse de nuevo a un dímero  $G\beta\gamma$ . En cuanto al receptor, este puede mantenerse unido a la subunidad  $G\alpha$  en el estado activo o liberarse de ella, en ambos casos un conjunto de reguladores actúa sobre éste para activar vías alternas de señalización, desensibilizar al receptor o llevarlo de vuelta a un estado inactivo (Cabrera-Vera et al., 2003).

La determinación de las vías de señalización inducidas por el sistema GPCR-proteína G depende en parte del tipo de proteínas G a las que se acople el receptor. Existen 16 tipos de proteínas  $G\alpha$  agrupadas en cuatro subfamilias:  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_{q/11}$  y  $G\alpha_{12/13}$  (Fig. 2) (Cabrera-Vera et al., 2003, Kawakami et al., 2022; Yang et al., 2021).  $G\alpha_s$  se caracteriza por promover la activación de la enzima adenilato ciclasa, la cual convierte el AMP en cAMP (Fig. 2). El cAMP es un segundo mensajero que activa la función de la

proteína cinasa A (PKA) mediante la liberación de sus subunidades catalíticas, lo cual permite que estas fosforilen a sus proteínas efectoras blanco entre las que se encuentran factores de transcripción, canales iónicos y enzimas.  $G_{\alpha_{i/o}}$  tiene un efecto totalmente opuesto al de  $G_{\alpha_s}$ , ya que al ser activada por un GPCR inhibe la actividad de la enzima adenilato ciclasa, por lo que disminuye los niveles de cAMP en la célula; por otro lado, también modula el estado de apertura de diversos canales iónicos (Lefkowitz, 2004; Neer, 1995).

Por su parte  $G_{\alpha_{q/11}}$  tiene como blanco a la fosfolipasa C (PLC), que al ser activada por dicha proteína G cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) en diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3), los cuales actúan como segundos mensajeros en este sistema. El DAG permanece en la membrana plasmática, donde activa a la proteína cinasa C (PKC), la cual fosforila a diversos blancos de señalización, incluyendo a algunos GPCRs. El IP3 es difundido en el citoplasma y se une a los receptores canal de IP3 que se localizan en la membrana del retículo endoplasmático, los cuales transportan el  $Ca^{2+}$  almacenado en el lumen del retículo hacia el citoplasma. El aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  en el citoplasma desencadena múltiples vías de señalización y cambios fisiológicos de la célula dependientes de este ion, que constituyen los efectos de la señalización iniciada por un GPCR que se acopla a  $G_{\alpha_{q/11}}$  (Fig. 2) (Neer, 1995; Wright et al., 2021)

En cuanto a  $G_{\alpha_{12/13}}$ , esta activa a las proteínas RhoGEF, las cuales intercambian el GDP por GTP en las Rho-GTPasas. Una de ellas es RhoA, la cual al tener unido GTP activa a las proteínas cinasas asociadas a Rho (ROCKs), relacionadas con la contracción celular, la movilidad y remodelación del citoesqueleto (Fig. 2) (Wootten et al., 2018). En conjunto, la señalización dependiente de la proteína  $G_{\alpha_{12/13}}$  modula la expresión de algunos genes y regula procesos como la migración celular, la adhesión y la proliferación. (Weis & Kobilka, 2018; Wootten et al., 2018).



### Fig. 2. Transducción de la señal de GPCRs por proteínas G.

La unión de un ligando genera un cambio conformacional en el receptor, el cual expone sitios de la interfaz de interacción intracelular para el reclutamiento de proteínas G (conformación *outward*). Las proteínas G heterotriméricas se acoplan en dicha interfaz, permitiendo que el receptor actúe como un GEF y promueva el intercambio de nucleótido en la subunidad  $G\alpha$ . La subfamilia de proteínas G que interacciona con determinado GPCR, define la señalización del sistema, los segundos mensajeros a producirse y los efectos en la célula.

## 2.2 Arrestinas, el segundo camino

Aunado a las proteínas G, el otro gran sistema de transducción de la señal generada por la activación de los GPCRs es el constituido por las arrestinas (Sanchez et al., 2021; Smith et al., 2018). En mamíferos se han identificado cuatro miembros de este grupo, las arrestinas 1 y 4 que se expresan exclusivamente en el sistema visual (de ahí que comúnmente se les denomine arrestinas visuales) y las arrestinas 2 y 3 que se expresan en el resto de los tejidos (Gurevich & Gurevich, 2019a; X. E. Zhou et al., 2017).

La arrestina 1 fue la primera en ser descubierta y caracterizada. Esta arrestina se acopla a rodopsina cuando dicho receptor es activado por estímulos lumínicos. Ralph Zuckerman y sus colegas acuñaron el término *arrestina* debido a que esta proteína “arresta” la señalización dependiente de rodopsina y las proteínas G (Zuckerman & Cheasty, 1988.). Ahora se sabe que este efecto se debe a que las arrestinas pueden adquirir una conformación de interacción estrecha con la interfaz intracelular de los GPCRs que también participa en su interacción con las proteínas G, por lo tanto, ocurre un desplazamiento de estas últimas cuando se promueve el reclutamiento de las arrestinas a los receptores (X. E. Zhou et al., 2017).

Las arrestinas 2 y 3 son similares en secuencia y estructura a la arrestina 1, pero no se expresan en el sistema visual y tampoco interaccionan con la rodopsina ni con otras opsinas, por lo que se les denomina arrestinas no visuales (Kawakami et al., 2022; Rosenthal et al., 2014). Los primeros estudios en los que se relacionó a estas proteínas con los GPCRs describieron su rol inhibitorio en la actividad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, lo que llevó a que en el campo comúnmente se les denomine  $\beta$ -arrestina 1 y  $\beta$ -arrestina 2 a las arrestinas 2 y 3 respectivamente (Rosenthal et al., 2014; Smith et al., 2018).

Además de promover el desacoplamiento de las proteínas G de los GPCRs, las arrestinas al interaccionar con estos receptores sufren un cambio conformacional de un estado inactivo a uno activo, mediante el cual se exponen dominios de interacción que les permite promover diversas vías de señalización (Fig. 3), además del reclutamiento de proteínas de andamiaje y la maquinaria necesaria para el proceso de endocitosis de receptores (Gurevich & Gurevich, 2019a; X. E. Zhou et al., 2017). De esta manera, las arrestinas no sólo pueden inhibir la señalización mediada por proteínas G, sino que



también promueven la internalización de los GPCRs y promueven sus propias vías de señalización (Gurevich & Gurevich, 2019b; Moo et al., 2021).

### 2.3 $\beta$ -arrestina 2

La  $\beta$ -arrestina 2, también conocida como arrestina 3 no visual, es una proteína de 46.3 kDa y 410 aminoácidos de expresión ubicua en diversos tejidos (Butcher et al., 2014; Cahill et al., 2017). La  $\beta$ -arrestina 2 es tanto un transductor clave de la señalización de los GPCRs independiente de proteínas G, como un regulador de este tipo de receptores.

Como ocurre con las proteínas G, existen preferencias endógenas de ciertos GPCRs por una  $\beta$ -arrestina sobre otra, existiendo receptores para los cuales se han identificado interacciones sólo con una de estas, aunque la gran mayoría interacciona con ambas  $\beta$ -arrestinas con distinta afinidad, la cual puede a su vez ser modulada por el ligando y por el contexto en el que se lleva a cabo la señalización.

Algunos ejemplos de receptores en los que se ha identificado interacción con  $\beta$ -arrestina 2 son el  $\beta$ -adrenérgico 2 (X. E. Zhou et al., 2017), receptor de hormona paratiroidea tipo 1, receptor de angiotensina II tipo 1A (X. E. Zhou et al., 2017), receptores de quimiocinas como CCR5, CCR7, y CXCR7 (Cahill et al., 2017; Hahn et al., 2022.; Maharana, et al., 2023), y receptores de ácidos grasos como FFA1 (Mancini et al., 2015a) y FFA4 (Senatorov et al., 2020; Villegas-Comonfort et al., 2019), entre muchos otros.

La estructura tridimensional de la  $\beta$ -arrestina 2 es similar a la del resto de las arrestinas, la cual se compone de dos partes globulares con forma arqueada que se despliegan de manera casi simétrica y unidas mediante un eje central que compone el núcleo (*core*) de la proteína (Zhan et al., 2011). En relación con la función, comúnmente se identifican 3 dominios principales: N-terminal, dominio central y C-terminal. El dominio N-terminal está formado por varias láminas  $\beta$  antiparalelas que definen la parte globular de la proteína, esta región es la encargada del reconocimiento e interacción con los residuos fosforilados de los GPCRs. El dominio central (también llamado interdominio) es el que provee estabilidad estructural a la proteína y actúa como andamiaje para la interacción con la interfaz del conjunto de asas intracelulares de los GPCRs, así como la interacción con efectores de la señalización, facilitando la formación de complejos moleculares. En tanto el dominio C-terminal es una región flexible y altamente desordenada que en el estado inactivo se mantiene pegado al dominio central, mientras que, al activarse la arrestina por unión a los GPCRs, esta región se extiende fuera del centro, lo que habilita la interacción de los residuos en este dominio con proteínas que participan en el proceso de internalización y señalización río abajo (Fig.3) (Cahill et al., 2017; Pandey et al., 2021; Rosenthal et al., 2014; Tian et al., 2016; Zhan et al., 2011).

Algunas interacciones clave de la  $\beta$ -arrestina 2, son la interacción con la proteína adaptadora 2 (AP-2) y clatrina, ambas esenciales para la internalización de receptores en vesículas recubiertas de clatrina; así como el motivo de interacción con c-Sarc y ERK

que le permiten activar la señalización de MAP cinasas (T. L. Ma et al., 2021; Rosenthal et al., 2014).

## 2.4 Fosforilación, un proceso clave en los GPCRs

Los GPCRs son blanco de diversas cinasas que ejercen regulación sobre estos mediante el proceso de fosforilación, el cual consiste en la transferencia de un grupo fosfato, mayormente proveniente del ATP y GTP, a aminoácidos fosforilables en una proteína (Tobin, 2008). En el caso de esta familia de receptores, es la fosforilación en serinas y treoninas la que tiene mayor peso en el aspecto regulatorio.

La fosforilación de GPCRs es catalizada por dos grandes grupos de cinasas: las cinasas de GPCRs (GRKs) y las cinasas activadas por segundos mensajeros (principalmente PKC, Akt y PKD) (Drube et al., 2022; Gurevich & Gurevich, 2019b; Kawakami et al., 2022; Tobin, 2008).

La familia de las GRKs está compuesta por siete miembros en humanos, nombradas GRK1-7 (Gurevich & Gurevich, 2019a). Las primeras en ser identificadas fueron GRK1 en su función de fosforilación de la rodopsina, y GRK2 que corresponde a la cinasa identificada como responsable de la fosforilación del receptor  $\beta$ -2 adrenérgico activado. Tanto GRK 1 como GRK7 se expresan únicamente en la retina (por lo que se les considera como GRKs visuales). La expresión de GRK4 también está restringida a tejidos específicos, como el corazón y los testículos. El resto de las GRKs, las GRK2,3,5 y 6, tienen una expresión ubicua y participan en la regulación de los GPCRs que se encuentran en todo el resto del cuerpo humano. Estas se agrupan en dos subfamilias, GRK2/3 y GRK5/6. La acción de las GRKs sobre los GPCRs está mediada tanto por las proteínas G activas, como por segundos mensajeros producidos por la señalización de proteínas (Drube et al., 2022; Gurevich & Gurevich, 2019a; Tobin, 2008).

Por otro lado, los GPCRs también son susceptibles a la fosforilación de cinasas como PKC (Luo et al., 2017; Villegas-Comonfort et al., 2019) y Akt (Lee et al., 2001), ambas cinasas se activan tanto por segundos mensajeros (ej.  $\text{Ca}^{2+}$  y DAG en el caso de PKC), como por la señalización dependiente de  $\beta$ -arrestinas (por ejemplo,  $\beta$ -arrestina 2 activa a PI3K/Akt). Aunado a lo anterior, la actividad de cinasa de estas proteínas también puede ser activada por componentes de otros sistemas de señalización ajenos al GPCR sobre el que actúan, es decir, mediante mecanismos de señalización cruzada (Villegas-Comonfort et al., 2019; X. E. Zhou et al., 2017). A este último mecanismo se le denomina fosforilación heteróloga, y es una de las características de este tipo de cinasas, a diferencia de las GRKs que, hasta donde se conoce actualmente, ejercen sólo fosforilación homóloga, como se le denomina a la promovida por el propio sistema de señalización (Burns et al., 2014; Gurevich & Gurevich, 2019).

En todos los casos, se reconoce que la fosforilación es un mecanismo de regulación esencial en GPCRs, ya que permite el reclutamiento de arrestinas al receptor, lo cual, como se mencionó anteriormente, desacopla por impedimento estérico a las proteínas G y activa a la propia arrestina. En otras palabras, la fosforilación es el proceso central que

promueve el cambio de etapa en la actividad de los GPCRs, cambiando la fase de señalización por proteínas G a la fase mediada por arrestinas en las que se promueven las vías de señalización independientes de proteínas G y se induce la internalización de los receptores (Pandey et al., 2021; Smith et al., 2018; Wootten et al., 2018).

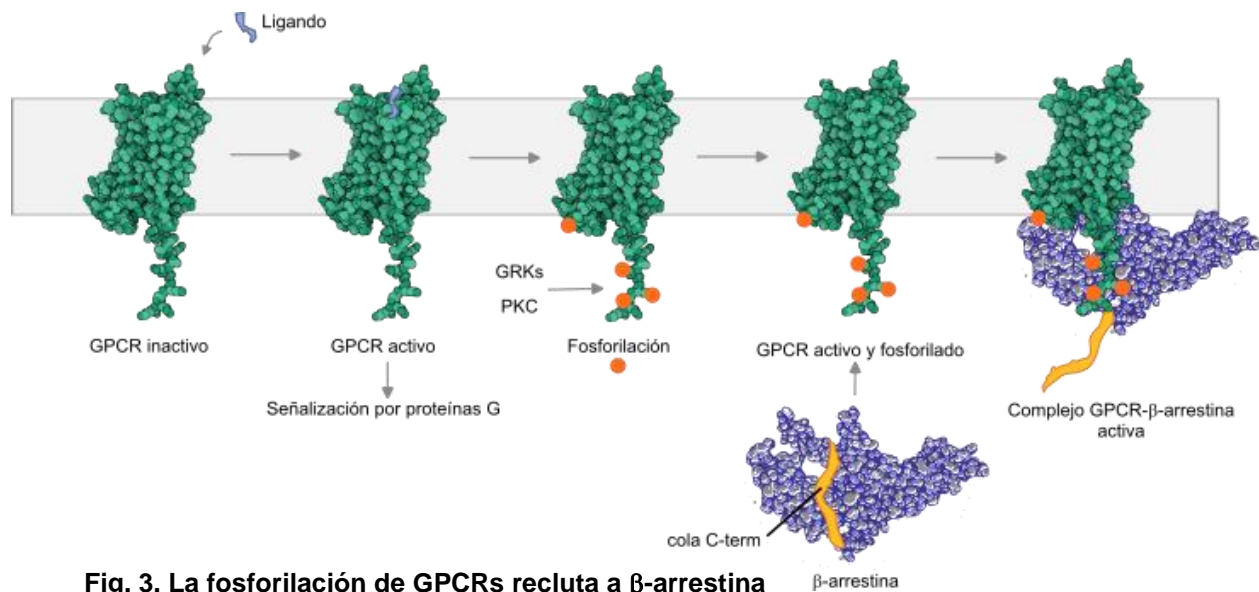
El reclutamiento de las  $\beta$ -arrestinas a los receptores se da cuando estas detectan residuos fosforilados de serina y treonina en el C-term y la tercera asa intracelular (IL3) de los GPCRs (Fig. 3) (Cahill et al., 2017; H. Kang et al., 2019; Li et al., 2022; Maharana, Sarma, et al., 2023; Rosenthal et al., 2014). Algunos motivos encontrados en el C-term de receptores como rodopsina,  $\beta$ 2-adrenérgico y receptor 2 de vasopresina, son PXPXXP y PXXPXXP (P corresponde a serina o treonina fosforilada y X corresponde a cualquier aminoácido) (X. E. Zhou et al., 2017); recientemente se reportó que el motivo PXPP que se encuentra en tanto en IL3 como en C-term de diversos GPCRs, interacciona con el motivo KKRRKK de  $\beta$ -arrestina1/2, y es importante para el reclutamiento y activación de arrestina en los receptores donde se encuentra el motivo (Maharana, Sarma, et al., 2023).

El grupo fosfato en residuos de serina y treonina fosforilados, al contar con una carga negativa, interacciona con residuos de arginina y lisina con carga positiva presentes en el dominio N-terminal de  $\beta$ -arrestina1/2 (H. Kang et al., 2019; Maharana, Sarma, et al., 2023; X. E. Zhou et al., 2017). En condiciones basales, el sitio de reconocimiento de residuos fosforilados de las arrestinas se encuentra cubierto por su propio extremo C-terminal, en una conformación denominada candado N-C (Latorraca et al., 2018; Maharana, Sarma, et al., 2023); mientras que al activarse y ser fosforilado un GPCR, el extremo C-term fosforilado del receptor desplaza el C-term de arrestina lejos de su propio N-term (Fig. 3) (Asher et al., 2022; Latorraca et al., 2018). Este mecanismo permite en el mismo paso tanto el reconocimiento arrestina-receptor activo y fosforilado, así como la liberación del C-term de arrestina que es donde se encuentran los sitios de interacción con AP-2 y clatrina, por lo que activa su función de promoción de la endocitosis (Asher et al., 2022). Otro cambio conformacional significativo en el interdominio es un giro de 21-25° en un eje diagonal de  $\beta$ -arrestina 2, rotación que expone los motivos de interacción con diversas proteínas con función de señalización (Latorraca et al., 2018; Zhan et al., 2011; X. E. Zhou et al., 2017).

Gracias a la resolución de estructura de complejos receptor-arrestina, se ha determinado dos conformaciones activas, una en la que ocurre sólo lo descrito en el párrafo anterior y otro en el que ciertas asas (denominadas en conjunto como “asas críticas”) localizadas en el pico central del interdominio de la  $\beta$ -arrestina1/2 se extienden e incluso forman algunas hélices, las cuales se “insertan” en la interfaz compuesta por la cara intracelular del racimo de hélices transmembranales y asas intracelulares. Esta segunda conformación se considera más “estrecha” debido a que aumenta la superficie de interacción entre ambas proteínas, a tal grado que desplaza a la proteína G del receptor (Cahill et al., 2017; Dwivedi-Agnihotri et al., 2020; Kumari et al., 2016, 2017). Por otro lado, se ha observado que en receptores con un asa intracelular 3 de mayor

tamaño, como el receptor muscarínico M2 (que tiene un extremo C-term muy pequeño y sin sitios potenciales de fosforilación), ésta asa fosforilada sostiene la interacción con  $\beta$ -arrestina 1/2 de la misma manera que lo hace el extremo C-term de otros receptores, promoviendo una interacción del tipo “colgado de la cola” (*hang tailing*) (Maharana, Sano, et al., 2023). Esto sugiere que en algunos GPCRs el asa intracelular 3 (IL3) puede jugar un papel equivalente al del extremo C-term, aunque no se ha elucidado qué interacción prevalece en receptores que contienen sitios fosforilados en ambas regiones.

Recientemente se identificó la asociación espontánea de  $\beta$ -arrestina 2 a la membrana plasmática vía su dominio c-terminal (que es altamente dinámico) en estado basal, es decir, previo a la unión de ligando a los GPCRs. Esta asociación con la membrana da paso a la difusión lateral de  $\beta$ -arrestina 2, lo que permite la formación transitoria de complejos arrestina-receptor inactivo no fosforilado. Este mecanismo aumenta la probabilidad de que, al activarse y fosforilarse el receptor, el proceso de reclutamiento y activación de  $\beta$ -arrestina 2 sea más rápido (Grimes et al., 2023).



**Fig. 3. La fosforilación de GPCRs recluta a  $\beta$ -arrestina**

La transición a un estado activo de los GPCRs en respuesta a ligando, además de señalar mediante proteínas G, vuelve al receptor susceptible de ser blanco de cinasas como GRKs y PKC que lo fosforilan en sitios específicos, dependiendo de la estructura del receptor, el subtipo de cinasa y la conformación adquirida por el GPCR en estado activo. La  $\beta$ -arrestina, que en estado basal tiene a su cola C-term bloqueando el sitio de interacción con GPCRs, tiene afinidad por la C-term e IL3 fosforilada de los receptores, la cual desplaza a la cola C-term de arrestina, lo que le permite interactuar con el GPCR y a su vez exponer los sitios de reclutamiento de efectores de arrestina (pasa a un estado activo).

Hasta hace pocos años, se consideraba a la fosforilación en residuos de serina y treonina de GPCRs como un proceso de regulación negativa sobre los receptores; ya que desde un punto de vista *proteína G-centrista*, la señalización canónica de los GPCRs es la ejercida por estas, mientras que la acción de las arrestinas se identificaba únicamente como antagonista a la actividad de los receptores transducida mediante las

proteínas G. Sin embargo, este modelo clásico ha sido actualizado por uno en el que ambos brazos de señalización (proteínas G y arrestinas) tienen la misma jerarquía, y la regulación se ejerce de manera dinámica intercambiando entre una y otra (Smith et al., 2018).

Incluso, se ha observado en ciertos receptores, como el  $\beta_2$ -adrenérgico, la formación de mega-complejos GPCR-proteína G- $\beta$ -arrestina, en los cuales están activas tanto las proteínas G como las arrestinas (Nguyen et al., 2019; Thomsen et al., 2016), lo cual sugiere la coexistencia de un modelo cooperativista aunado al modelo antagonista clásico entre dichos sistemas de señalización. La existencia de los mega-complejos es posible estéricamente hablando si tomamos en cuenta que la conformación de  $\beta$ -arrestina1/2 interaccionando sólo con la región C-term de los GPCRs, no es sólo un paso intermedio en el proceso de acoplamiento de las  $\beta$ -arrestinas, sino que es un complejo estable y activo que permite que el receptor aún pueda interaccionar con las proteínas G mediante *core* compuesto por las asas intracelulares (Grimes et al., 2023; Kumari et al., 2016, 2017; Maharana, Sarma, et al., 2023; Martinez-Morales et al., 2022).

Dada la diversidad de respuestas celulares que pueden obtenerse a partir de un solo GPCR dependiendo del ligando, ya sea agonista o antagonista, que se una a éste, su concentración y el contexto celular, resulta interesante la identificación de los mecanismos celulares que determinan dichas variaciones. El concepto de señalización sesgada ha sido acuñado para designar a los eventos de señalización que se ejercen favoreciendo ciertas vías sobre otras (Kawakami et al., 2022; Pandey et al., 2021; Wootten et al., 2018). Este concepto se ha estudiado más ampliamente a nivel transductor, en el que se busca entender el mecanismo que permite que un receptor señalice preferencialmente mediante las proteínas G o  $\beta$ -arrestinas ante determinado estímulo (Gurevich & Gurevich, 2019a; Kawakami et al., 2022; Latorraca et al., 2018). La fosforilación, al ser un *switch* que permite cambiar la etapa o fase de señalización entre ambos transductores, ha sido propuesto como el mecanismo modulador de la señalización sesgada entre ambos ramos (Eiger et al., 2023; Kaya et al., 2019).

La hipótesis de “códigos de barra de fosforilación” es un tema de amplio interés en la actualidad en el campo de los GPCRs. Hace referencia a que, en respuesta a un estímulo *A*, las cinasas ejercen fosforilación en ciertos residuos específicos de serina y treonina de la IL y C-term de los receptores, y que el arreglo resultante de serinas y/o treoninas fosforiladas es “leído” por las arrestinas de manera que ejercen una respuesta específica *A* y vinculante al arreglo de residuos fosforilados en cuestión (T. L. Ma et al., 2021; Smith et al., 2018; X. E. Zhou et al., 2017). Es decir, que un estímulo distinto, *B*, sobre el GPCR resultaría en un arreglo de pS y/o pT (serina y treonina fosforilada, respectivamente) *B*, y que dicho arreglo provocaría que la arrestina se reclute con diferente cinética, interactúe de manera diferencial con el receptor y por lo tanto que transduzca una señalización que resulte en un efecto *B* por parte de la célula (Dwivedi-Agnihotri et al., 2020; Maharana, Sarma, et al., 2023; Smith et al., 2018).

Por lo tanto, la propuesta de códigos de barra de fosforilación en los GPCRs, la diversidad de GRKs y otras cinasas que pueden actuar sobre un receptor, así como las variaciones encontradas a nivel estructural en conformaciones activas de  $\beta$ -arrestina, podrían explicar en conjunto la base de la señalización sesgada y ayudarnos a vincular a detalle las respuestas celulares que se pueden esperar de un ligando (natural o sintético) que actúa sobre determinado GPCR y cómo se podría intervenir para modularlas a detalle.

## 2.5 Internalización de GPCRs

Aunado a promover sus propias vías de señalización, la interacción de  $\beta$ -arrestina1/2 con receptores fosforilados da paso al principal mecanismo de endocitosis o internalización de GPCRs (Cahill et al., 2017; Kumari et al., 2017). El extremo C-term libre de las  $\beta$ -arrestina1/2 activas comprende una plataforma de andamiaje para el reclutamiento de AP-2 y clatrina (Asher et al., 2022); dado que la gran mayoría de los GPCRs no tienen sitios de interacción con estas proteínas en su secuencia (algunos pueden interactuar con  $\mu$ 2-adaptina de AP-2), el acoplamiento de  $\beta$ -arrestina es un paso importante para que los receptores se internalicen en vesículas recubiertas de clatrina.

Al activarse la  $\beta$ -arrestina por un receptor fosforilado, se extiende su dominio C-term y se expone el motivo RXR de unión a la subunidad  $\beta$ 2-adaptina de AP-2 y el motivo LIELD/LIEFE de unión a clatrina (D. S. Kang et al., 2009; Moo et al., 2021). AP-2 es una proteína heterotetramérica compuesta por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ 2,  $\mu$ 2 y  $\sigma$ 2, y se le considera una proteína adaptadora ya que constituye una plataforma de reclutamiento de los trímeros de clatrina para el ensamblaje de la cobertura y del cargamento a endocitar (Traub et al., 1999).

El proceso de endocitosis mediada por clatrina consiste en manera general de cuatro pasos: la formación de pozos de clatrina (CCP), el reclutamiento del cargo, la escisión de la vesícula y el desarmado de la cubierta de clatrina y la maquinaria de endocitosis para dejar la vesícula libre (Kaksonen & Roux, 2018). Evidencia reciente sugiere que los CCP son formados de manera previa e independiente del estado de activación de determinado GPCR, y la  $\beta$ -arrestina es encargada mediante su interacción tanto con AP-2 como con clatrina, de transportar a los receptores fosforilados a los CCP, donde también se puede acumular  $\beta$ -arrestina activada y desacoplada de los receptores para ayudar en el ensamblaje del pozo (Grimes et al., 2023).

Por años se consideraba a la internalización como un proceso esencialmente de desensibilización de los GPCRs, debido a que reduce la densidad de receptores activos en la membrana plasmática y colateralmente el proceso que lleva a la internalización tiende a desacoplar a las proteínas G (Laporte et al., 2002). La internalización en ese sentido constituye un evento necesario para regresar el sistema a su estado basal, ya que en las vesículas intracelulares los receptores son procesados, desacoplados de su ligando y de las proteínas asociadas que transducen su señal, de manera que, al regresar



a la membrana plasmática por vías de transporte de reciclaje, los GPCRs están listos para futuras rondas de exposición al ligando (Cahill et al., 2017; Lefkowitz, 2004).

No obstante, en años recientes, una serie de descubrimientos han retado esta visión clásica. El primero de ellos es la identificación de complejos GPCR-proteína G y GPCR-proteína G- $\beta$ -arrestina activos promoviendo sus respectivas vías de señalización, localizados en endosomas tempranos (Thomsen et al., 2016), esto implica que la internalización de un GPCR activado por ligando no necesariamente se traduce en la desensibilización de dicho receptor, aunque si es una posibilidad. Otro descubrimiento clave es el hecho de que la señalización ejercida por receptores localizados en espacios intracelulares como el endosoma temprano, presenta diferencias respecto a la que ocurre por el mismo complejo receptor-transductor en la membrana plasmática, es fuente de sesgo y su modulación o variación promueve efectos celulares diferentes (Eiger et al., 2022, 2023). Esto sugiere que la señalización intracelular de receptores no es un evento artefactual sin significado biológico, sino que es un proceso que permite la regulación espacial de la señalización, aumentando la complejidad de los sistemas de señalización de GPCRs (Ali et al., 2020).

La internalización es entonces sólo el comienzo y no el objetivo final, la entrada de los GPCRs a un viaje en el que no sólo puede ser inhibida su actividad, sino que puede, a través del tráfico intracelular, modular y cambiar su perfil de señalización de acuerdo con la localización subcelular en la que se encuentre en determinado momento.

## 2.6 Rab GTPasas

El tráfico intracelular vesicular comprende todo un conjunto de sucesos que permiten la comunicación entre membranas al transportar el cargo entre ellas. Para las proteínas de membrana este proceso es esencial, ya que este medio de movilización a través de la célula las mantiene plegadas en su contexto membranal. El transporte a través de vesículas no es azaroso, es un proceso altamente regulado en tiempo, especificidad del cargo y direccionalidad, por lo que las vesículas que salen de una membrana cuentan con toda una maquinaria molecular que las dirige hacia un organelo o espacio membranal específico (Kim et al., 2021; Martínez-Morales et al., 2022; York et al., 2020).

Un componente esencial de la maquinaria molecular que regula el tráfico vesicular es el compuesto por la superfamilia de las Rab GTPasas (Magalhaes et al., 2011;). Ésta comprende un conjunto de 66 proteínas identificadas hasta ahora en humanos, que comparten algunas características estructurales, la más obvia es la presencia de un dominio de GTPasa, el cual al igual que en las proteínas G heterotriméricas, regula su estado de activación (Schwartz et al., 2008). Ubicado en dirección C-term al dominio GTPasa se encuentra una región hipervariable donde residen los motivos que le permiten a cada proteína Rab interactuar con efectores específicos que determinan en últimas cuentas el compartimento membranal al que se asociarán (Stenmark, 2009). Seguido de la región hipervariable se encuentran una serie de cajas CAAX, esta secuencia con cisteínas es blanco de la modificación postraduccional geranilgeranilación, la cual

permite la asociación de las Rab con las membranas (Shen & Seabra, 1996; Stenmark, 2009).

Un papel primordial de las Rab-GTPasas es conferir especificidad al proceso de tráfico vesicular, esto debido a que cada proteína Rab se asocia a la membrana de un organelo o tipo de vesícula en específico y a su vez tiene interacciones con proteínas cargo, proteínas de andamiaje y con efectores (Chavrier et al., 1990; Schwartz et al., 2008). La función de las Rab-GTPasas fluctúa entre dos estados: el de unión a GDP (estado inactivo) y GTP (estado activo). Una vez sintetizadas, las Rab interaccionan con proteínas escort de Rab (REPs), las cuales presentan a las Rab con la transferasa de geranilgeranilo, lo que permite que se asocien a las membranas desde el citosol (Stenmark, 2009). Una vez asociadas a una membrana, las Rab con ayuda de proteínas GEF intercambian su nucleótido de GDP por GTP. Al unirse el GTP, existen cambios conformacionales que determinan el estado activo y permiten la unión de efectores a las proteínas Rab. Se consideran efectores los motores moleculares, proteínas de andamiaje, receptores de cargo, cargo y demás moléculas que ayudan a ejercer las diferentes funciones asociadas a determinada Rab (Kim et al., 2021; Stenmark, 2009).

Las vesículas de transporte intracelular reclutan una serie de proteínas que constituyen una capa alrededor de las moléculas cargo, la composición de dicha capa depende de la identidad del cargo, por lo que este representa el primer filtro de especificidad. El segundo es donde entran en juego las Rab, ya que estas interaccionan con moléculas específicas de la capa, por lo que ayudan en la determinación de la identidad de esta capa y de la vesícula como tal (Semerdjieva et al., 2008; Sönnichsen et al., 2000). Un ejemplo es Rab5, que participa en el ensamblaje de la clatrina en los pozos recubiertos de clatrina (Schwartz et al., 2008). Dado este papel fundamental en la definición de la identidad de las vesículas, las Rab han servido como blanco para estudiar la identidad de compartimentos membranales, así, al estudiar su interacción con determinado cargo, se puede inferir la localización subcelular de este.

En este trabajo se estudia el tráfico regulado por Rab5, por lo que se ahondará en diversas características de esta proteína.

Rab5 juega un papel clave en el proceso de internalización de receptores de membrana, ya que se asocia en dominios destinados a formar pozos recubiertos de clatrina, complementando el proceso de ensamblaje de la cubierta de clatrina alrededor de estos; así mismo asiste el proceso de desacoplamiento de AP-2 de la cubierta de la vesícula de internalización durante el proceso de constricción y escisión de la membrana plasmática, lo cual desestabiliza la cubierta de clatrina y permite la maduración a una vesícula de endocitosis desnuda (Semerdjieva et al., 2008; Stenmark, 2009). La tercera función efectora de Rab5 consiste en promover la fusión de vesículas desnudas de clatrina para la conformación del endosoma temprano, compartimento donde se reúnen los cargos provenientes de la membrana plasmática y se define su destino posterior mediante procesos de clasificación y separación (Gorvel et al., 1991). Es debido a esto que cuando una proteína cargo interacciona con Rab5, se infiere que esta se encuentra



en un endosoma temprano, en vesículas provenientes de la membrana plasmática en proceso de formar un endosoma temprano o en pozos cubiertos de clatrina destinados a internalización (Flores-Espinoza et al., 2020; Martínez-Morales et al., 2022; Stenmark, 2009).

Cada Rab-GTPasa se asocia a membranas específicas, lo que determina su función de control de la dirección del flujo y destino del cargo en la inmensa red del tráfico intracelular vesicular (Martínez-Morales et al., 2022). Por ejemplo, Rab 4, que tal como Rab5 tiene un papel primordial en las principales vías de tráfico vesicular de GPCRs, se acumula en ciertas regiones de la membrana de los endosomas tempranos, regiones en donde asiste en la clasificación y separación de receptores que serán transportados de nuevo a la membrana plasmática. Estas regiones de membrana marcadas con Rab4 sufren una distorsión y subsecuente formación de vesículas que se escinden del endosoma temprano, conformando lo que se conoce como vesículas de reciclaje rápido, estas llevan al cargo directamente de dicho compartimento a la membrana plasmática (Sönnichsen et al., 2000). Cuando un GPCR interacciona con Rab4, se puede sugerir que se encuentra en proceso de reciclaje a la membrana plasmática luego de haber transitado por un endosoma temprano (Binda et al., 2019; Flores-Espinoza et al., 2020).

Por lo tanto, el análisis de la interacción de GPCRs con determinadas proteínas Rab, constituye una estrategia para conocer la localización subcelular de los receptores ante determinadas condiciones; si a esto se le suma la variable del tiempo, se puede ahondar en la dinámica de transporte vesicular y en la concepción de la regulación espacio-temporal de GPCRs.

## 2.7 Receptores para ácidos grasos libres.

Los ácidos grasos libres son moléculas fundamentales en el metabolismo de los organismos y estructuralmente al incorporarse a diversos lípidos de membrana. Además de esto, se les considera lípidos bioactivos debido a que funcionan como moléculas mensajeras que ejercen señalización en las células (Blad et al., 2012; Kimura et al., 2020). Esta función de los ácidos grasos se ejerce a través de proteínas intracelulares con capacidad de unión a los ácidos grasos (FABP), como los receptores tipo PPAR y los GPCRs que conforman la familia de receptores para ácidos grasos libres (FFAs) (Kimura et al., 2020). Esta familia comprende a FFA1 (anteriormente denominado GPR40), FFA2 (GPR43), FFA3 (GPR41) y FFA4 (GPR120) (Briscoe et al., 2003; Brown et al., 2003; Hirasawa et al., 2005); existe un debate respecto a la posible inclusión de GPR84 en esta familia (Liu et al., 2023). Sin embargo, la mayoría de los autores consideran sólo a los cuatro miembros formalmente no huérfanos. FFA1 y FFA4 tienen como ligando a ácidos grasos de cadena media (6-12 carbonos) y larga (12 en adelante carbonos). FFA2 y FFA3 son activados por ácidos grasos de cadena corta (menos de 6 carbonos) (Briscoe et al., 2003; Itoh et al., 2003; Kimura et al., 2020).

Los FFAs se expresan en diversos tejidos en los cuales entran en contacto con ácidos grasos circulantes provenientes de la dieta y el metabolismo, así como los

sintetizados en las células (Kimura et al., 2020). Los procesos fisiológicos en los que están relacionados estos receptores son amplios y dependen del receptor en cuestión, de los ligandos y del tejido o tipo celular en el que se expresen, aunque de manera general se relacionan con la homeostasis energética y regulación del sistema inmunológico (Brown et al., 2003; Edfalk et al., 2008; Hirasawa et al., 2005; Itoh et al., 2003).

## 2.8 FFA1

El receptor para ácidos grasos libres 1 (FFA1) es un GPCR de 300 aminoácidos y 31.4 kDa, con una estructura y topología en membrana típica de esta superfamilia de receptores (UniprotID: O14842, Consortium, 2023). El estudio estructural de este receptor ha permitido identificar dos sitios de interacción con agonistas, uno ortostérico en la parte superior del ramo de hélices transmembranales del receptor en el que los ligandos acceden de manera casi-lateral entre los segmentos transmembranales 3 y 4; y otro alostérico en la parte inferior del ramo de hélices transmembranales (Fig. 4) (Kumari et al., 2023). El extremo C-term de este receptor, a diferencia de otros es muy corto y no se ha identificado la formación de una octava hélice en esta región ni en el estado inactivo ni en el activo, como si ocurre con otros receptores. Las asas intracelulares de este receptor son cortas y carecen de motivos altamente conservados en los GPCRs de la clase A, como el motivo DRY y NPXXY; tampoco presenta en sus segmentos intracelulares los motivos de fosforilación PXXPXXP, PXPXXP y PXPP propuestos hasta ahora como elementos partícipes de la interacción de los GPCRs con las  $\beta$ -arrestinas 1/2 (Kumari et al., 2023).

Los ácidos grasos de cadena media y larga fueron identificados como ligandos naturales de FFA1 en 2003 (fue el primer receptor dentro de la familia de FFAs en tener ligandos naturales identificados) (Briscoe et al., 2003; Itoh et al., 2003). FFA1 responde tanto a ácidos grasos saturados como a los insaturados, siendo los segundos los que actúan con mayor potencia sobre este receptor (Briscoe et al., 2003; Edfalk et al., 2008).

El ácido docosahexaenoico (DHA) es un ácido graso insaturado omega-3 de 22 carbonos que tiene la mayor potencia de activación sobre FFA1 dentro del conjunto de ácidos grasos insaturados ( $EC_{50}= 1.1 \mu\text{M}$ ), mientras que el ácido palmítico es su ligando más potente dentro del grupo de ácidos grasos saturados ( $EC_{50}= 5 \mu\text{M}$ ) (Briscoe et al., 2003). El DHA es un ácido graso esencial, debido a que en nuestro organismo se produce a niveles insignificantes y lo adquirimos por la dieta, principalmente de pescados blancos, que a su vez lo adquieren de algas que son los mayores productores de este ácido graso. En décadas recientes el DHA ha recibido gran atención en el ámbito nutricional debido a sus propiedades antiinflamatorias en el organismo y a que se le ha relacionado con efectos positivos en el desarrollo del sistema nervioso (Coniglio et al., 2023; Moniri, 2016).

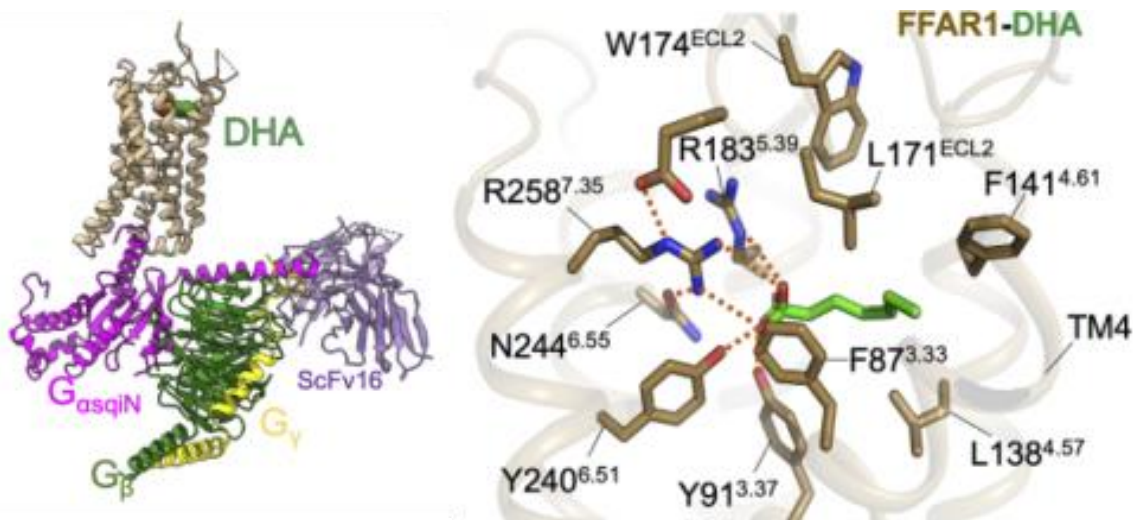
Recientemente se logró obtener un modelo estructural de FFA1 activado unido a DHA, esto mediante microscopía electrónica en condiciones criogénicas (Fig. 4) (Kumari

et al., 2023). El análisis de la estructura develó que DHA se une al sitio ortostérico, orientando su extremo carboxilo al interior, donde se producen interacciones iónicas con argininas y asparaginas, mientras que su cola, orientada hacia la cavidad de entrada y la membrana plasmática, es estabilizada por medio de las interacciones hidrofóbicas a lo largo del bolsillo de unión (Fig. 4). La unión de DHA genera tensión en el empaquetamiento de la zona central de las hélices transmembranales 4, 5 y 6, lo que provoca el movimiento de la región citoplásmica de la hélice 6 hacia “afuera” (posicionamiento conocido como *outward*). Esta conformación en el estado activo promueve la exposición de aminoácidos hidrofóbicos en la región citoplásmica de las hélices 5 y 6, que sostienen las interacciones con la hélice  $\alpha 5$  de la proteína Gq (Fig. 4). Además, una serie de aminoácidos polares de la IL2 de FFA1 interacciona con la otra cara de la hélice  $\alpha 5$  de Gq, interacciones que se consideran, confieren la selectividad del receptor por esta proteína G (Kumari et al., 2023; Latorraca et al., 2018).

FFA1 se expresa en diversos tejidos, principalmente en las células enteroendócrinas tipo I, K y L del intestino delgado (Hirasawa et al., 2005), en diversas regiones del cerebro como la corteza, el hipocampo, la amígdala y el hipotálamo (D. Ma et al., 2007); así mismo en el páncreas se encuentra en células  $\beta$  y  $\alpha$  (Itoh et al., 2003). En cuanto al sistema inmunológico, se expresan principalmente en macrófagos (Kimura et al., 2020).

Debido a esta amplia expresión, FFA1 participa en diversos procesos fisiológicos dependientes del tejido donde se encuentre; por ejemplo, al ser activado por ácidos grasos provenientes de la ingesta dietética, en células enteroendócrinas del duodeno, FFA1 promueve la secreción de incretinas que potencian la liberación de insulina dependiente de glucosa (Itoh et al., 2003; Kebede et al., 2012). Derivado de este rol, se ha propuesto a FFA1 como un blanco terapéutico para personas con síndrome metabólico y diabetes tipo 2 (Ichimura et al., 2014).

Los esfuerzos en el ámbito farmacológico entorno al receptor FFA1 han dado paso al desarrollo de algunos agonistas sintéticos, como TAK-875 y TUG.770 (Christiansen et al., 2013; Ito et al., 2013; Kaku et al., 2016), el primero prometía buenos resultados en ensayos clínicos para el tratamiento de la diabetes tipo 2, sin embargo, se encontró un alto riesgo de toxicidad hepática por lo que se ha suspendido su uso (Kaku et al., 2016). La existencia de efectos secundarios en el uso de GPCRs como blancos terapéuticos se debe principalmente a la amplitud de la activación de diversos segundos mensajeros que activan vías de señalización alternas en respuesta a ciertos ligandos (Milligan et al., 2015; Smith et al., 2018).



**Fig. 4. Estructura de FFA1 activado por DHA.**

Modelo estructural publicado por Kumari, et al. 2023, que muestra al FFA1 en estado activo, unido a DHA en su sitio ortostérico e interactuando con la proteína Gq. A la derecha se muestra a detalle el sitio ortostérico, donde se pueden observar las interacciones intermoleculares que determinan la unión del ligando. PDB: 8EIT.

El receptor FFA1 pertenece a la familia A de GPCRs (familia de receptores parecidos a la rodopsina) y señala tanto por proteínas G como por  $\beta$ -arrestina (Kimura et al., 2020; Mancini et al., 2015b). Al ser activado por agonistas, este receptor se acopla preferencialmente a la familia  $G_{q/11}$  de proteínas G (Itoh et al., 2003; Stoddart et al., 2007), sin embargo, se ha reportado su interacción funcional con  $G_s$  y  $G_{i/o}$  (Schröder et al., 2011). En el caso del acoplamiento de la proteína  $G_q$ , cuyos efectos de la señalización han sido los más estudiados para este receptor, se ha observado el aumento intracelular de  $Ca^{2+}$  (Guzmán-Silva et al., 2022; Stoddart et al., 2007), activación de PKC y aumento en la fosforilación de ERK1/2 (Guzmán-Silva et al., 2022; Sosa-Alvarado et al., 2015).

La activación de FFA1 promueve el reclutamiento de  $\beta$ -arrestina1 y 2, aunque al usar TAK-875, un ligando sesgado hacia ese transductor existe una interacción preferencial del receptor con  $\beta$ -arrestina 2 sobre  $\beta$ -arrestina 1 ( $EC_{50}=55$  nM vs  $EC_{50}=64$  nM, respectivamente) (Mancini et al., 2015b). Aunado a eso, se ha identificado que la actividad insulínica de FFA1 activado por TAK-875 se reduce al inhibir la expresión de  $\beta$ -arrestina 2, lo que resalta el papel funcional de esta arrestina en los efectos de la señalización de FFA1 en la regulación de la secreción de insulina estimulada por glucosa.

## 4. Antecedentes

El estudio de las interacciones moleculares de FFA1 y los mecanismos de su regulación han permitido construir modelos cada vez más amplios de la red de señalización en la que participa este receptor. El primer avance en ese sentido fue la caracterización de su señalización mediada por proteínas G y los principales efectores de esta vía que están detrás de las respuestas fisiológicas observadas al estimular este receptor (Itoh et al., 2003).

En 2014, Qian y colaboradores dieron a conocer los primeros aportes sobre el proceso de fosforilación e internalización de FFA1, al identificar a GRK2 como responsable de la fosforilación del receptor inducida por la activación por unión de ligando, así como el rol preponderante de la  $\beta$ -arrestina 2 en la endocitosis de FFA1 inducida por ligando y la activación de ERK1/2 (Qian et al., 2014).

Posteriormente, en 2015 se describió que ambas arrestinas interaccionan con el receptor en respuesta a ligandos naturales y sintéticos, aunque la  $\beta$ -arrestina 2 con una potencia mayor. Este trabajo reportó por primera vez la existencia de señalización sesgada en FFA1, por parte de TAK-875 que mostraba una preferencia por la señalización de la  $\beta$ -arrestina1/2 sobre la de proteínas G; además, cada ligando puede ejercer regulación sobre el mismo proceso mediante diferentes mecanismos: mientras el ácido palmítico necesita la señalización de proteínas G para promover los efectos insulíntrópicos de FFA1 en islotes pancreáticos, TAK-875 requiere el reclutamiento de la  $\beta$ -arrestina 2. (Mancini et al., 2015)

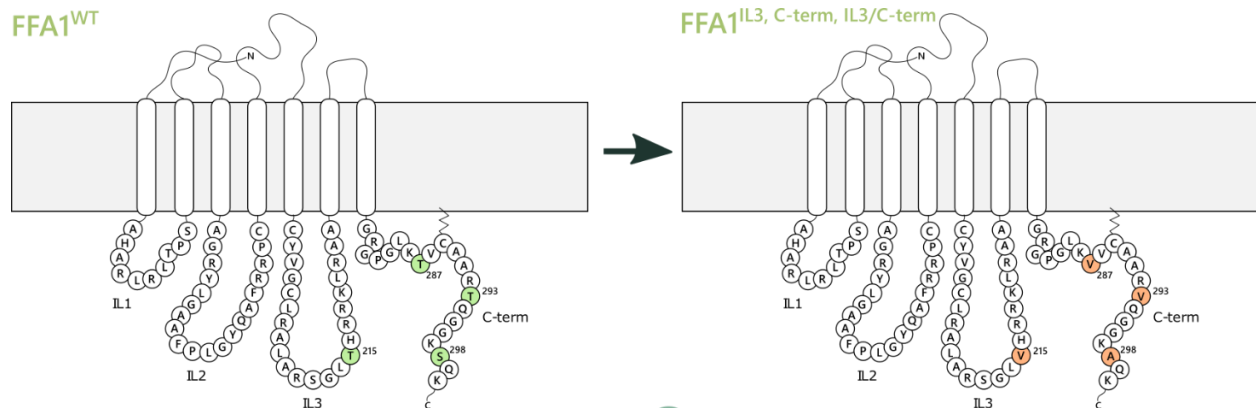
Como se mencionó anteriormente, el estado de fosforilación de un receptor tiene un rol importante en el control de la dinámica de interacción de un GPCR con las proteínas G o las  $\beta$ -arrestinas. Por tal motivo, nuestro grupo de trabajo ha ahondado en aspectos que permiten ampliar el conocimiento de la fosforilación de este receptor y su repercusión en la señalización. En ese sentido, en 2015 se descubrió que tanto la unión de ligandos como DHA y ácido  $\alpha$ -linolénico ( $\alpha$ -LA), como la activación de PKC por forbol 12-miristato, 13- acetato (PMA, por sus siglas en inglés), promueven la fosforilación de FFA1 (Sosa-Alvarado et al., 2015); esto sugiere que el receptor además de ser fosforilado por GRK2 en respuesta a sus ligandos, es fosforilado por PKC, una cinasa que puede activarse tanto por mecanismos homólogos como heterólogos. Esto quedó demostrado en el caso de FFA1, ya que al inhibirse PKC disminuye la fosforilación en respuesta a DHA y PMA. Vinculadamente, estos mismos estímulos inducen la internalización del receptor (Sosa-Alvarado et al., 2015).

Posteriormente, en otro trabajo de nuestro grupo, se caracterizaron los efectos en la señalización de la mutación de diversos sitios de fosforilación de serinas y treoninas encontrados *in-silico* en la tercera asa intracelular (IL3; T215) y el carboxilo terminal (C-term; T287, T293 y S298) del receptor FFA1. Al evaluar las cuatro variantes de FFA1, FFA1<sup>WT</sup>, FFA1<sup>T215V</sup>, FFA1<sup>T287V/T293V/S298A</sup> y FFA1<sup>T215V/T287V/T293V/S298A</sup> (Fig. 5), bajo un sistema de expresión heteróloga en células Flp-In T-Rex HEK923, no se encontraron

diferencias en la cinética de aumento de calcio intracelular (respuesta mediada por  $G\alpha_q$ ) por efecto de la estimulación de los receptores con DHA [30 $\mu$ M], mientras que sí se afectó el nivel de fosforilación en las mutantes respecto a la variante WT. Además, se observó una reducción en la internalización de estos receptores, así como una menor duración del estado de fosforilación de ERK (Guzmán-Silva et al., 2022).

Respecto al tráfico vesicular de FFA1 posterior a su internalización, se ha observado su colocalización con Rab5 y Rab4, pero no con *lysotracker*, compuesto que marca fluorescentemente a los lisosomas, en respuesta a ligando (Qian et al., 2014). Así mismo, sobreexpresión de mutantes dominantes negativas de Rab5 y Rab4 disminuyen tanto la internalización como el reciclaje del receptor, respectivamente.

En conjunto, estos resultados señalan la existencia de una interacción de FFA1 con  $\beta$ -arrestina 2 en respuesta a ligando (ácido linoleico), así como la existencia de sitios blancos de fosforilación en el receptor y el impacto de la mutación de estos en la internalización de FFA1. No obstante, hasta ahora no se ha integrado el mecanismo de regulación de  $\beta$ -arrestina 2 sobre la actividad y localización de FFA1 en función de la fosforilación de dichos residuos.



**Fig. 5. Esquema de los sitios de fosforilación de interés en FFA1.**

En este diagrama donde se representa al receptor FFA1 en forma de serpentina, se detallan los aminoácidos que componen las asas intracelulares y el extremo C-term. Del lado izquierdo, se muestran coloreados en verde claro los residuos de interés identificados en el trabajo de Guzmán Silva, et al., 2022; mismos que en el lado derecho se muestran coloreados en naranja y mutados por A y V, que no son fosforilables.



## 5. Justificación

El receptor FFA1 desempeña un papel importante en el control del metabolismo energético, los procesos antiinflamatorios y el desarrollo de estructuras cerebrales específicas. Debido a su implicación en estos procesos, existe un interés en el desarrollo de estrategias terapéuticas y preventivas que involucren la manipulación farmacológica de este receptor. Sin embargo, el ejemplo del desarrollo de TAK-875, un fármaco prometedor para el tratamiento de la diabetes tipo 2, que fue detenido debido a su efecto hepatotóxico identificado en estudios clínicos de fase 2, resalta la necesidad de investigar los mecanismos de regulación fina de la actividad de este receptor.

La fosforilación es un evento crucial que regula la señalización mediada por los transductores principales de GPCRs, ya que determina la activación de la  $\beta$ -arrestina, tanto inhibiendo como manteniendo la señalización de las proteínas G. Por lo tanto, es importante identificar los elementos clave en el control de la fosforilación de FFA1, tanto aquellos presentes en el propio receptor (residuos de serina/treonina y la formación de códigos de barras de fosforilación) como las cinasas específicas que establecen los patrones de sitios fosforilados en respuesta a estímulos y contextos celulares específicos.

En este proyecto, nos enfocamos en el papel de los sitios de serina y treonina que pueden ser potenciales blancos de fosforilación ubicados en la región IL3 y en el extremo C-terminal de FFA1. También examinamos la interacción del receptor con la  $\beta$ -arrestina 2 y los procesos derivados de esta interacción, como la internalización de FFA1 en endosomas tempranos (analizando su interacción con Rab5) y la activación de ERK1/2. Nuestro enfoque busca integrar el conocimiento previo sobre la inducción de la fosforilación de FFA1 promovida por ligandos y por PMA, así como su influencia en la internalización del receptor y la señalización de ERK1/2. Además, buscamos identificar los elementos críticos para la fosforilación funcional de FFA1.

Con este estudio, se pretende avanzar en la comprensión de la regulación de la actividad de FFA1 a través de la fosforilación, lo que podría proporcionar información puntual para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas más efectivas, y con menores efectos secundarios, centradas en este receptor.

## 6. Pregunta principal de investigación

¿Los sitios de fosforilación T215, T287, T293 y S298 en la tercera asa intracelular y carboxilo terminal de FFA1 tienen un papel en la interacción de este receptor con la  $\beta$ -arrestina 2 y en su subsecuente tráfico intracelular?

## 7. Hipótesis.

Los sitios de fosforilación T215, T287, T293, S298 tienen un papel en la interacción de FFA1 con  $\beta$ -arrestina 2, dicha interacción a su vez impacta en eventos posteriores a la internalización del receptor, como el tráfico a endosomas tempranos y la señalización desde esta localización subcelular.

## 8. Objetivo general

- Evaluar la participación de los sitios de fosforilación T215, T287, T293 y S298 de FFA1 en la interacción de este receptor con  $\beta$ -arrestina 2 y en su tráfico a endosomas tempranos, así como la importancia de este proceso en la señalización de ERK1/2.

## 9. Objetivos específicos

- Analizar la interacción de FFA1 y sus mutantes en sitios de fosforilación con  $\beta$ -arrestina 2 en respuesta a estímulos de DHA y PMA.
- Evaluar la asociación de FFA1 y sus mutantes en sitios de fosforilación con Rab5 mediante imagenología de FRET en células estimuladas con el ligando DHA.
- Estudiar el efecto de la inhibición de la internalización de receptores en la dinámica de activación de ERK inducida por la actividad de FFA1 en respuesta a DHA.

## 10. Metodología

### 10.1 Materiales

*Para ver la información sobre los reactivos, anticuerpos y soluciones utilizadas en este trabajo, ver la tabla del anexo 1.*

### 10.2 Líneas celulares y mutantes del receptor FFA1

Se utilizaron líneas celulares Flp-In T-Rex HEK293 generadas en un trabajo previo (Guzmán-Silva et al., 2022), las cuales contienen alguna de las siguientes construcciones del receptor: FFA1<sup>WT</sup> (secuencia original reportada del receptor FFA1 humano), FFA1 T215V (denominado FFA1<sup>IL3</sup> por simplicidad), FFA1 T287V/T293V/S298A (FFA1<sup>C-term</sup>) y FFA1 T215V/T287V/T293V/S298A (FFA1<sup>IL3/C-term</sup>). Las cuatro líneas mutantes portadoras de las variantes de FFA1, que se encuentran fusionadas con la proteína GFP en su extremo C-terminal, contienen al promotor CMV/TetO, por lo que la expresión de cada variante de FFA1 se encuentra regulada negativamente por el represor TetR.



Los cultivos celulares fueron mantenidos con medio DMEM suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) y antibiótico-antimicótico, incubándose a 37°C y una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Se realizó la inducción de la expresión de cada variante de FFA1 añadiendo doxiciclina al medio de los cultivos celulares (1 µg/mL) de 12 a 18 horas antes de la realización de cada experimento. La doxiciclina induce la expresión en este sistema al unirse a TetR, lo cual interrumpe su actividad represora sobre su operador, permitiendo la transcripción del gen río abajo.

### 10.3 Transfección de cultivos celulares

Las líneas celulares descritas en el párrafo anterior fueron transfectadas de manera transitoria con un plásmido codificante para la construcción β-arrestina 2- mCherry o Rab5- DsRed (ambas rojo-fluorescentes). Se utilizó el método de transfección policatiónica con polietilenimina y Optimem. La eficiencia de cada transfección fue evaluada 12 horas después mediante la observación de la fluorescencia en los cultivos. Estas transfecciones fueron realizadas 48-72 horas antes de la inducción de la expresión de las variantes de FFA1 con doxiciclina y al menos 96 horas antes de la realización de los experimentos.

### 10.4 Cursos temporales de estimulación

Los cultivos generados con las transfecciones transitorias fueron sembrados en cajas Petri de fondo de vidrio (para los ensayos de imagenología de FRET) o en placas de 6 pozos (para las co-inmunoprecipitaciones). Se incubaron con doxiciclina como se describe en el párrafo previo y 12 horas después de corroboró la fluorescencia de FFA1-eGFP en cada cultivo. Las células fueron incubadas con medio DMEM sin SFB por 4 horas para posteriormente ser estimuladas con DHA o PMA durante 2, 5, 15, 30 o 60 minutos. En el caso de los experimentos de microscopía, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y lavadas con PBS para su posterior observación al microscopio; mientras que las sembradas en placas de cultivo de 6 pozos para los experimentos de inmunodetección de ERK1/2 y pERK1/2, se sometieron a 3 lavados con PBS frío antes de proseguir con el respectivo protocolo.

### 10.5 Imagenología de FRET

La transferencia de energía por resonancia Förster (FRET) es un fenómeno físico que ocurre entre dos fluoróforos cuando están en proximidad cercana (~10 nm de distancia). Se basa en la transferencia de energía no radiante desde un fluoróforo excitado, llamado donador, hacia otro fluoróforo cercano, llamado aceptor, que puede emitir fluorescencia. Este fenómeno es altamente dependiente de la distancia y la orientación relativa entre los fluoróforos.

Existen varios métodos para la detección de FRET, en este trabajo utilizamos el método de *bleed through*, que consiste en medir y corregir el solapamiento de la emisión del donador (GFP) y la emisión directa del aceptor (mCherry/ Ds-Red) en los canales de detección respectivos capturados por un microscopio confocal (Olympus FV10i). Por

cada campo capturado (objetivo de 60x) se obtuvieron dos imágenes: una en la que se excita a la muestra con ambos láseres (eGFP: 489 nm; mCherry/Ds-Red: 580 nm), para obtener los canales de emisión correspondientes para eGFP y mCherry/Ds-Red y otra con el láser de excitación de mCherry/Ds-Red apagado. En esta segunda imagen la fluorescencia capturada en el espectro de emisión de mCherry/Ds-Red corresponde directamente a la excitación de esta proteína por la emisión de eGFP, por lo que este tipo de imagen constituye un reportero del fenómeno físico de FRET.

#### 10.6 Análisis de imágenes

Las imágenes obtenidas por microscopía confocal fueron analizadas en el programa Image J (1.49v) complementado con el plugin “FRET analyzer” el cual integra una corrección de *bleed through*, que “limpia” las imágenes del solapamiento no específico y los artefactos de fluorescencia. Posterior a esta corrección, se realiza el análisis de índice de FRET no normalizado correlacionado con la colocación contrastando las imágenes de los canales: GFP, mCherry/Ds-Red, FRET channel (señal capturada a 610 nm con el láser de excitación de la proteína rojo fluorescente apagado y el láser de excitación de GFP encendido). Este segundo paso del análisis genera una imagen construida con los valores de *FRET index* asignados para cada píxel correspondiente al solapamiento de los tres canales. En esta última imagen se mide directamente los valores de *FRET Index* en el área ocupada por células individuales, que corresponden a la variable de interés.

#### 10.7 SDS-PAGE Western Blot.

Los cultivos de células estimulados fueron lavados 3 veces con PBS frío y lisados con medio RIPA. Después de una hora de lisis, se colectaron los extractos y se centrifugaron a 15,000 rpm por 5 min para separar la fracción de proteínas solubles de los componentes no solubilizados. La fracción de extracto proteico se desnaturalizó con buffer Laemli y se calentaron las muestras a 96°C por 5 minutos antes de ser sometidas de nuevo a centrifugación. Estos se cargaron en geles SDS-PAGE al 10% y se hizo su transferencia a membranas de nitrocelulosa. Se detectó la fracción total y fosforilada de ERK1/2 en las membranas con anticuerpos que reconocen cada una. Se utilizó la quimioluminiscencia enzimática de la HRP con luminol. Entre cada inmunodetección se realizó un proceso de *stripping* incubando las membranas con glicina 25 mM a un pH de 2.4 por 1 hora.

#### 10.8 Análisis estadístico.

Los datos obtenidos fueron graficados y analizados por ANOVA de una vía y prueba *post-test* de Bonferroni en GraphPad Prism (8.3).

## 11. Resultados

### 11.1 Interacción de FFA1 con $\beta$ -arrestina 2

Para evaluar la contribución de los sitios de fosforilación T215, T287, T293 y S298 en el proceso de interacción de FFA1 con  $\beta$ -arrestina 2, se realizó la expresión heteróloga de una construcción  $\beta$ -arrestina 2-mCherry en cuatro distintas líneas celulares, cada una expresando una variante de FFA1 bajo el control de TetO (Flp-In-TREx-HEK293), con los cambios en los sitios fosforilables mencionados de tipo T>V y S>A, unidas en el extremo carboxilo-terminal a GFP (Tabla 1). Los cultivos resultantes fueron sometidos a cursos temporales de estimulación con DHA [30  $\mu$ M] y PMA [1  $\mu$ M] para inducir el proceso de fosforilación de FFA1 (Guzmán-Silva et al., 2022). Esta modificación post-traduccional funciona como señal de reclutamiento de  $\beta$ -arrestina 2 en la mayoría de GPCRs.

Como se puede observar en la Fig. 6, la adición de DHA a los cultivos de células expresando la variante silvestre del receptor (FFA1<sup>WT</sup>-GFP), promueve su interacción con  $\beta$ -arrestina 2 de manera significativa, en comparación con los niveles basales, desde los 2 minutos y hasta los 15 minutos posteriores al inicio de la estimulación, según los datos de índice de FRET por imagenología. Esta interacción detectada, disminuye a los 30 minutos a un nivel similar al observado al tiempo 0. De esta manera, nuestro sistema reporta una interacción receptor-arrestina transitoria durante los primeros minutos posteriores a la adición del estímulo.

Variante de FFA1	Modificaciones
WT	IL3: T215. C-term: T287, T293, S298
IL3	IL3: T215V. C-term: T287, T293, S298
C-term	IL3: T215. C-term: T287V, T293V, S298A
IL3/C-term	IL3: T215V. C-term: T287V, T293V, S298A

**Tabla 1. Mutantes en sitios de serina y treonina catalogados como susceptibles a fosforilación.** Cambios puntuales en sitios de serina (S) mutados a alanina (A) y treonina (T) mutados a valina (V) en la región de la tercera asa intracelular (IL3) y/o extremo carboxilo-terminal (C-term) presentes en las variantes de FFA1 utilizadas en este trabajo. En rojo se remarca la(s) mutación(es) realizada(s) en cada variante.

En cambio, para la variante FFA1<sup>IL3</sup> (T215V), no se detecta un aumento en la interacción con  $\beta$ -arrestina 2, que se observa con FFA1<sup>WT</sup>, en respuesta al estímulo con DHA a ningún tiempo (Fig. 6 y S1). Mientras que la mutación del conjunto de residuos fosforilables encontrados en la región carboxilo terminal de FFA1 mantiene un comportamiento similar al de la versión FFA1<sup>WT</sup>, aumentando la interacción con  $\beta$ -arrestina 2 desde los 2 a los 15 minutos de estimulación. No obstante, la variante que contiene todas las mutaciones de interés en sitios de fosforilación, FFA1<sup>IL3/C-term</sup>, no

presenta dicho aumento de interacción y mantiene una respuesta similar a la basal en todos los tiempos del estímulo (Fig. 6 y S1).

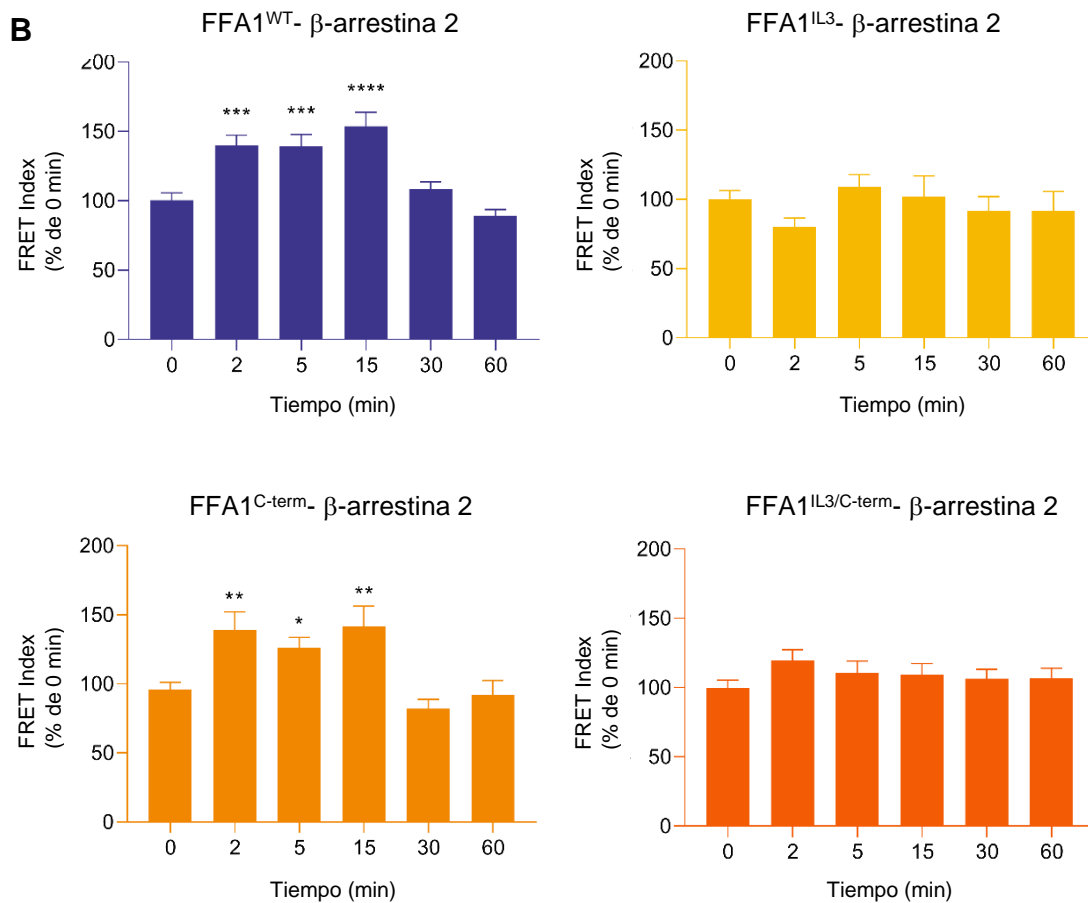
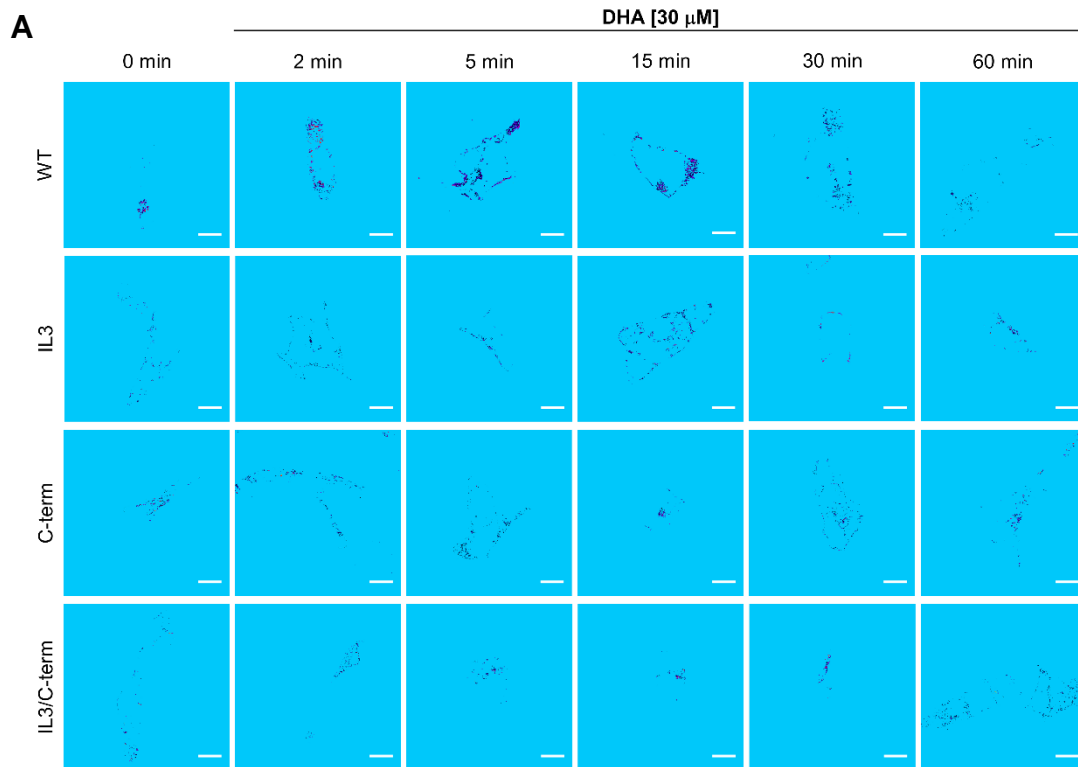
Dado que en un trabajo anterior se probó que además del ligando DHA, la activación de la PKC por medio de PMA (que representa un modelo de desensibilización heteróloga de receptores) también induce la fosforilación e internalización de FFA1, evaluamos si el reclutamiento de  $\beta$ -arrestina 2 al receptor también ocurría en respuesta a este estímulo, y si este proceso se veía alterado en algunas de las variantes de sitios de fosforilación de FFA1 generadas.

Los datos obtenidos de índice de FRET muestran un aumento en la interacción de la versión silvestre del receptor con  $\beta$ -arrestina 2, el cual aumenta significativamente a los 2, 15 y 30 minutos, presentándose el valor máximo de índice de FRET en este último tiempo, el cual es incluso mayor al obtenido con DHA (Fig. 7). A los 60 minutos se puede ver un nivel de interacción similar al de 0 minutos, por lo que FFA1 muestra un comportamiento de Clase A de GPCRs tanto en respuesta a la desensibilización homóloga como con la heteróloga.

En cuanto a las mutantes en las que se sustituyeron los sitios de fosforilación de serina y treonina por residuos no fosforilables, la variante FFA1<sup>IL3</sup> no presenta un aumento de índice de FRET en respuesta a PMA en ningún momento del curso temporal. Para el caso de la variante FFA1<sup>C-term</sup>, PMA es capaz de inducir un aumento en la interacción del receptor con  $\beta$ -arrestina 2, aunque a diferencia a lo observado con DHA para esta variante, hay un aumento significativo de índice de FRET sólo a los 2 y 5 minutos, disminuyendo a los 15 minutos a niveles similares a los basales (Fig. 7).

A diferencia de lo obtenido con DHA, cuando se estimula a las células con PMA sí se observa un aumento en el índice de FRET entre FFA1<sup>IL3/C-term</sup> y  $\beta$ -arrestina 2, en comparación con el nivel basal, a los 5, 15 y 30 minutos del curso de estimulación, aunque el valor máximo que se obtiene a los 30 minutos es menor al obtenido con FFA1<sup>WT</sup> (Fig. 7).

Dado que en las asas intracelulares hay otros residuos de serina, como la S40 en la primera asa intracelular y la S212 en la tercera asa intracelular, no se puede descartar la participación de la fosforilación de algunos de estos sitios en las interacciones inducidas por PMA. Además, existe la posibilidad que PMA esté promoviendo interacciones moleculares que promueven el reclutamiento de la  $\beta$ -arrestina 2 al receptor independiente a la fosforilación. Estas posibilidades, que permitirían ahondar en la interpretación de los datos obtenidos para el caso de PMA, no fueron estudiadas en este proyecto.



**Fig. 6. Interacción de FFA1-GFP con  $\beta$ -arrestina 2 en respuesta a DHA.**

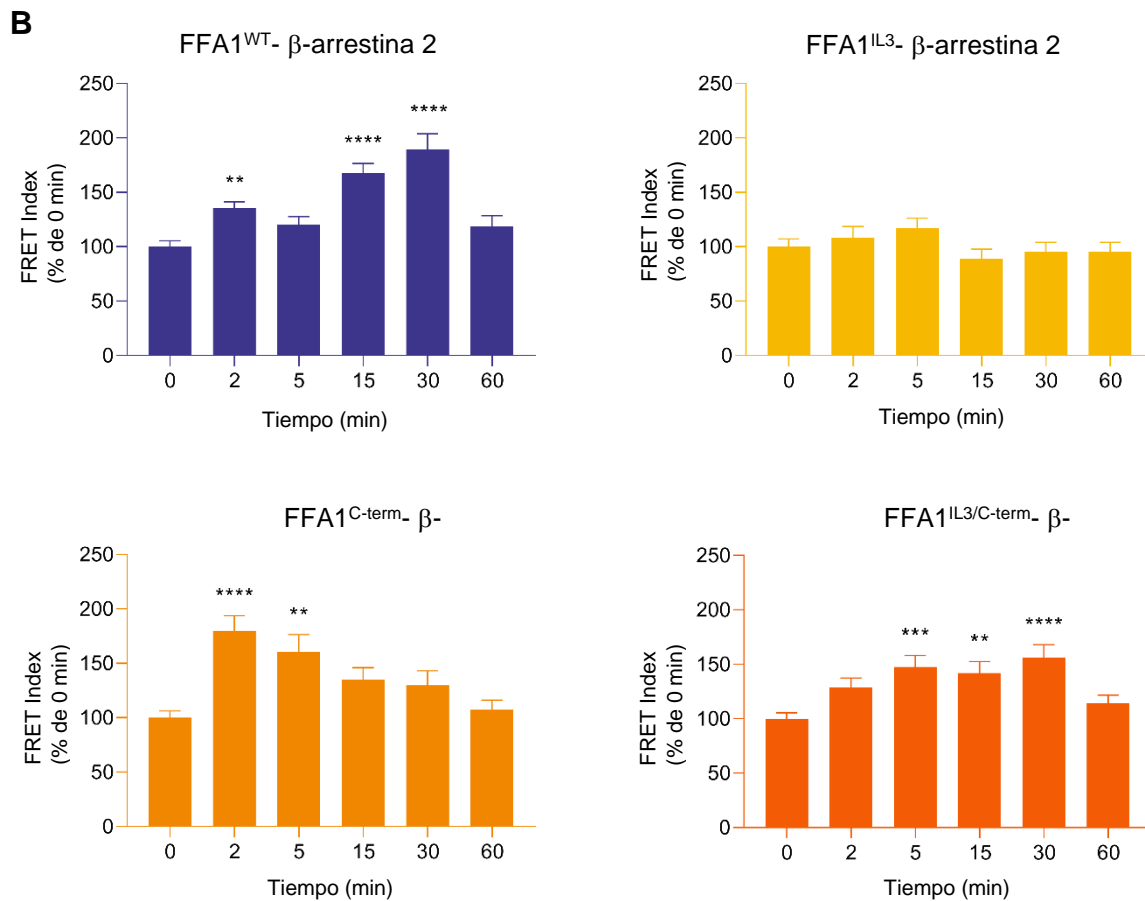
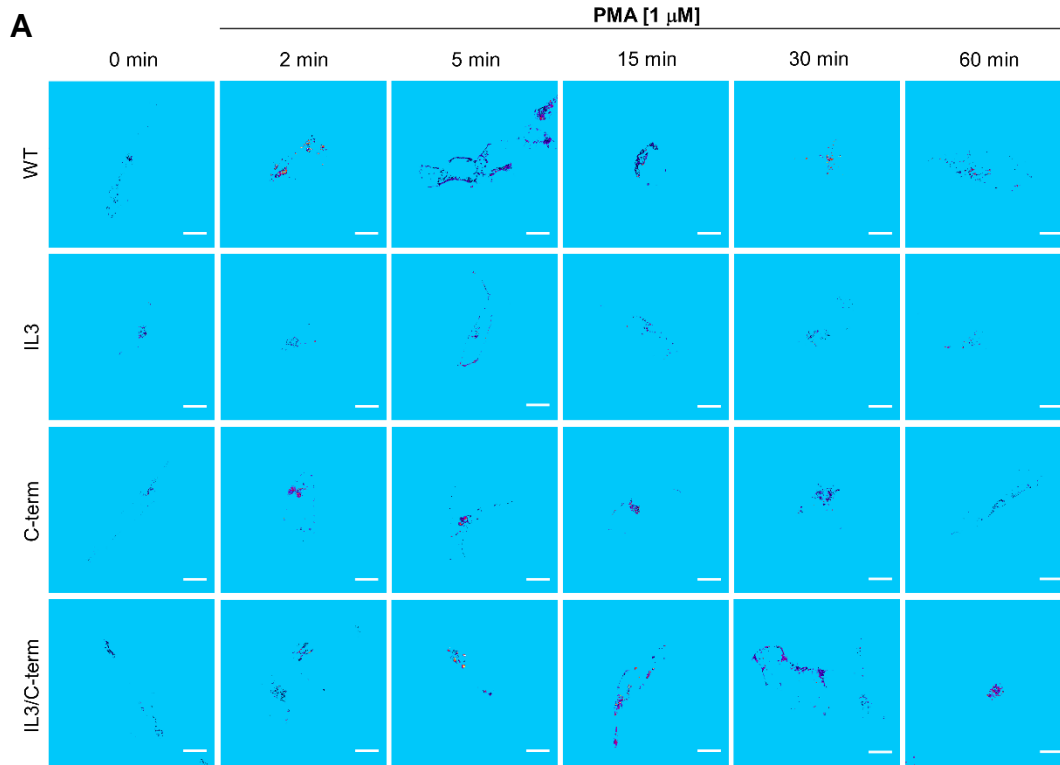
Análisis de índice de FRET (FRET Index) entre las variantes FFA1<sup>WT</sup>, FFA1<sup>IL3</sup>, FFA1<sup>C-term</sup> o FFA1<sup>IL3/C-term</sup> y  $\beta$ -arrestina 2-mCherry, en células HEK293 a diferentes tiempos de estimulación con DHA [30  $\mu$ M]. **A.** Se muestran imágenes de índice de FRET, en las que cada píxel se colorea de acuerdo con su valor de índice de FRET en la célula: el color cian corresponde a un valor de 0, mientras que los valores de índice de FRET que van de 1 a 250 se muestran en una escala que va del morado oscuro al blanco, pasando por tonalidades cálidas (indicando el grado de interacción en determinado píxel). Las imágenes de microscopía confocal a partir de las cuales se hizo este análisis, se pueden observar en la Fig. S1). Barras blancas: escala de 10 micrómetros **B.** Cuantificación del índice de FRET de imágenes como las presentadas en A. Se muestra la media de los valores de índice de FRET por condición, normalizados a la media del tiempo 0, y sus respectivos errores estándar, de 3 experimentos

### 11.2 Interacción de FFA1 con Rab5

Debido a que nuestra hipótesis es que el eje de regulación sostenido por los eventos de fosforilación en FFA1, que define las interacciones de este receptor con  $\beta$ -arrestina 2, se manifiesta también en la modulación del tráfico vesicular del receptor; analizamos la interacción de FFA1 con Rab5 y las posibles variaciones de este al mutarse los sitios de fosforilación de interés.

En trabajos previos de nuestro grupo, hemos hecho uso del análisis de índice de FRET de receptores con Rab-GTPasas que se encuentran asociadas a las membranas de compartimentos celulares específicos. Rab5 se asocia tanto a proteínas en proceso de internalización como a la membrana de los endosomas tempranos, el cual reúne el cargo proveniente de la membrana plasmática; también es en este compartimento donde se establece mediante diversos mecanismos, el destino posterior de los receptores internalizados (por ejemplo, reciclaje, degradación vía lisosoma, o tráfico a la red trans-Golgi). Por lo tanto, el estudiar la interacción de FFA1 con Rab5 constituye una aproximación al entendimiento de la dinámica de transporte del receptor a este compartimento clave para el tráfico intracelular, y el impacto que pueden tener sobre dicha dinámica procesos previos como la fosforilación y la actividad de las arrestinas.

Dado que en el caso del efecto de la mutación de los sitios de fosforilación de interés en la interacción con  $\beta$ -arrestina 2, los datos obtenidos con DHA permiten una interpretación más concreta (la fosforilación de T215 en IL3 de FFA1 es necesaria para el reclutamiento de  $\beta$ -arrestina 2, pero no la de los sitios de la región carboxilo-terminal), decidimos centrar el estudio de la interacción de las variantes de FFA1-GFP con Rab5-DsRed, utilizando DHA como estímulo inductor de la fosforilación e internalización del receptor.



**Fig. 7. Reclutamiento de  $\beta$ -arrestina 2 por las variantes de FFA1-GFP en respuesta a PMA.**

Análisis de índice de FRET (FRET Index) entre las variantes FFA1<sup>WT</sup>, FFA1<sup>IL3</sup>, FFA1<sup>C-term</sup> o FFA1<sup>IL3/C-term</sup> y  $\beta$ -arrestina 2-mCherry, en células HEK293 a diferentes tiempos de estimulación con PMA [1  $\mu$ M]. **A.** Imágenes representativas del análisis de índice de FRET realizado. Las imágenes de microscopía confocal a partir de las cuales se hizo este análisis, se pueden observar en la Fig. S2). Barras blancas: escala de 10 micrómetros **B.** Cuantificación del índice de FRET de imágenes como las presentadas en A. Se muestra la media de los valores de índice de FRET por condición, normalizados a la media del tiempo 0, y sus respectivos errores estándar, de 3 experimentos independientes. \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; \*\*\*\*p<0.0001.

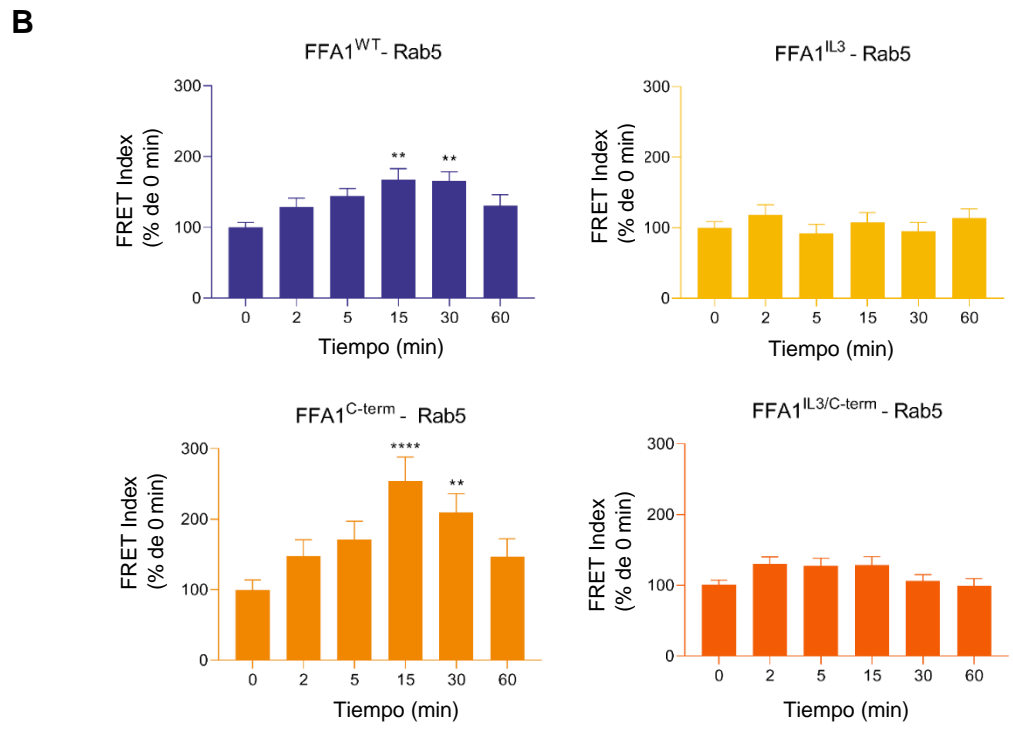
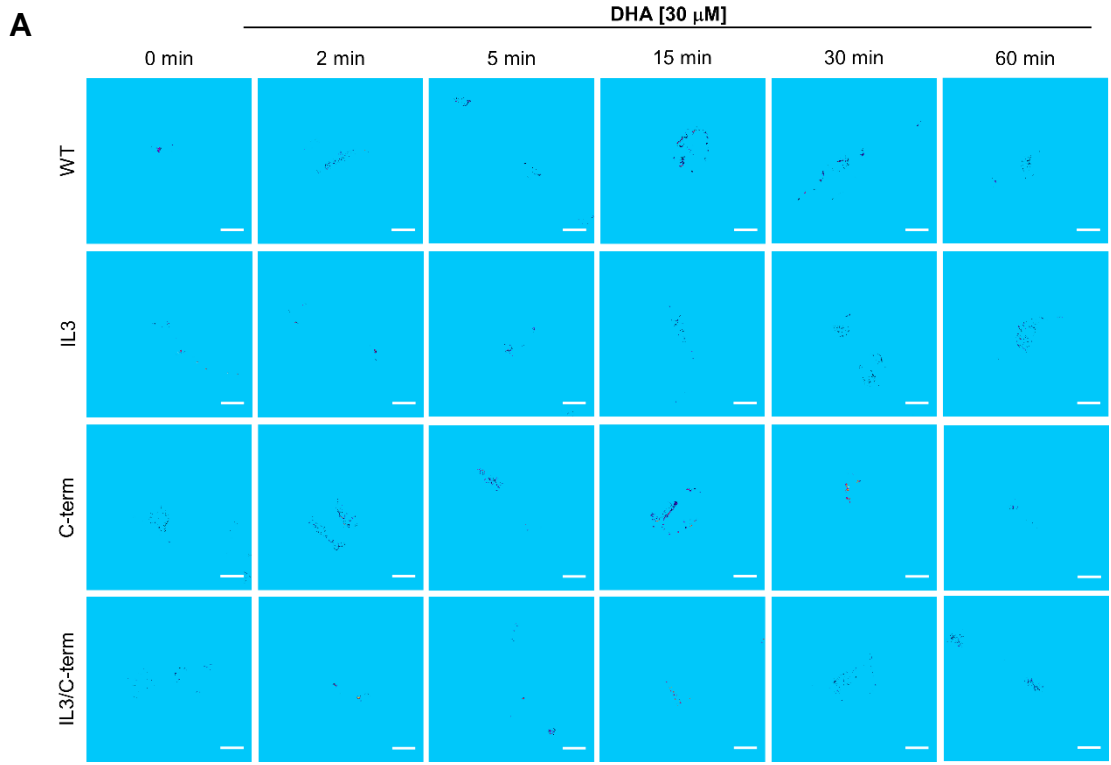
Los datos de FRET obtenidos indican que DHA promueve un aumento en la interacción de FFA1 con Rab5 en células expresando FFA1<sup>WT</sup> y FFA1<sup>C-term</sup>, pero no con las que expresan las variantes FFA1<sup>IL3</sup> y FFA1<sup>IL3/C-term</sup> (Fig. 8). Tanto en la variante silvestre como en la que presenta mutaciones en la región carboxilo-terminal, existe un aumento a los 15 y 30 minutos de estimulación con DHA, disminuyendo a los 60 minutos. De manera peculiar, el aumento en índice de FRET en FFA1<sup>C-term</sup> es de mayor magnitud que el de FFA1<sup>WT</sup> (Fig. 8), lo cual sugiere que, aunque en ambas variantes ocurre una respuesta similar de reclutamiento de  $\beta$ -arrestina 2, la ausencia de fosforilación en los sitios del carboxilo-terminal del receptor podría estar modulando su tráfico a endosomas tempranos, por mecanismos dependientes o independientes de la  $\beta$ -arrestina 2.

Los datos obtenidos de FRET entre FFA1<sup>IL3</sup> y FFA1<sup>IL3/C-term</sup> con Rab5 en respuesta a DHA concuerdan con lo observado entre dichas mutantes y  $\beta$ -arrestina 2 (Fig. 6), lo cual aunado a que en la mutante FFA1<sup>C-term</sup> que mantiene su interacción con arrestina, también interacciona con Rab5, denota una correlación entre el reclutamiento de  $\beta$ -arrestina 2 y la movilización de FFA1 hacia endosomas tempranos. Por lo tanto, el eje de regulación fosforilación- reclutamiento de la  $\beta$ -arrestina 2- internalización, y la temporalidad en la que estos sucesos ocurren, podrían tener un impacto clave en el destino intracelular del receptor.

### 11.3 Contribución de la internalización de FFA1 en la señalización de ERK mediada por el receptor.

Una de las principales vías de señalización inducidas por la interacción de  $\beta$ -arrestina 2 con FFA1 es la vía de las MAP cinasas que produce la fosforilación (activación) de ERK1/2. Por lo tanto, el grado de fosforilación de ERK en una célula puede dar pauta del estado de señalización río debajo de la interacción  $\beta$ -arrestina 2-FFA1. En un proyecto realizado previamente en nuestro grupo de investigación, se encontró que las células que expresan las mutantes FFA1<sup>IL3</sup>, FFA1<sup>C-term</sup> y FFA1<sup>IL3/C-term</sup> presentan una deficiencia en la fosforilación de ERK1/2 en respuesta al ligando DHA. Así mismo, todas las mutantes presentaron deficiencias en su internalización inducida por DHA, manteniendo una proporción de receptores al interior de la célula similar durante todo el curso de estimulación con dicho ligando (Guzmán-Silva et al., 2022).





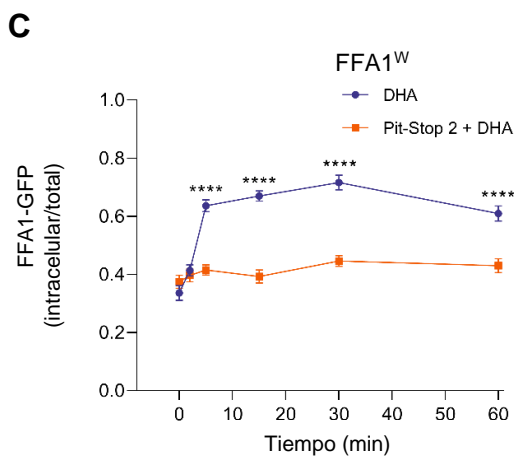
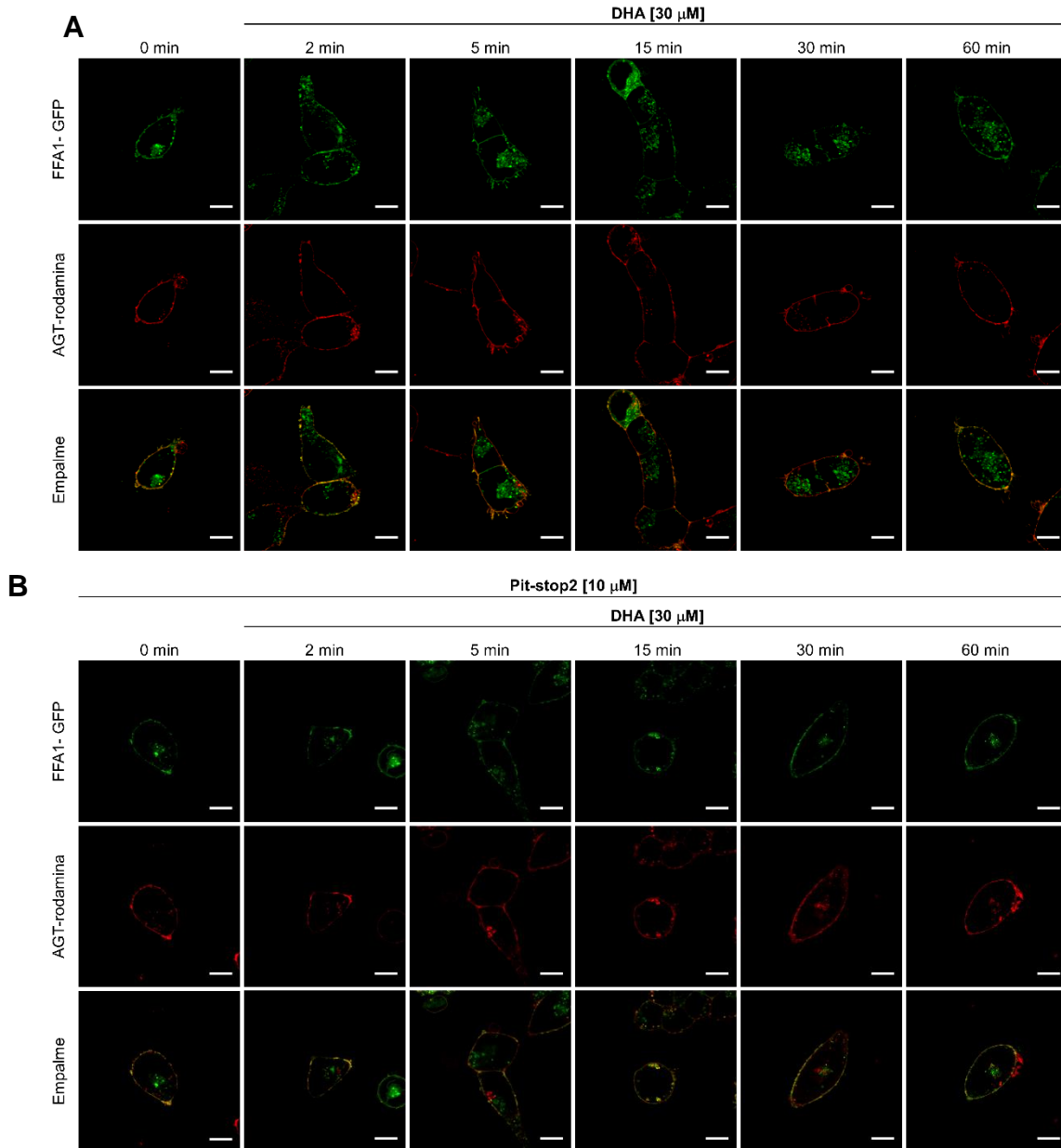
**Fig. 8. Interacción de FFA1-GFP con Rab 5 en respuesta a DHA.**

Análisis de índice de FRET (FRET Index) en células HEK293 entre las variantes de FFA1-GFP y Rab5-DsRed, a diferentes tiempos de estimulación con DHA [30  $\mu$ M]. **A.** Imágenes representativas del análisis de índice de FRET realizado. Las imágenes de microscopía confocal a partir de las cuales se hizo este análisis, se pueden observar en la Fig. S3). Barras blancas: escala de 10 micrómetros. **B.** Cuantificación del índice de FRET de imágenes como las presentadas en A. Se muestra la media de los valores de índice de FRET por condición, normalizados a la media del tiempo 0, y sus respectivos errores estándar, de 3 experimentos independientes. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Dado que la internalización de FFA1 y la fosforilación de ERK1/2, ambos en respuesta a DHA, son los únicos dos parámetros que son inhibidos en todas las mutantes, comparando con FFA1WT (la interacción con  $\beta$ -arrestina 2 y Rab5 si se mantiene en la mutante FFA1<sup>C-term</sup>), nos preguntamos si la dinámica de internalización de FFA1, es un evento que regula la cinética de fosforilación (estado activado) de ERK1/2.

Para evaluar dicha posibilidad, primero corroboramos la habilidad de pit-stop 2, un compuesto que inhibe la endocitosis dependiente de clatrina, de alterar la dinámica de internalización de FFA1. Al estimular los cultivos de células expresando FFA1WT con DHA [30  $\mu$ M], se observa un aumento considerable en la proporción de receptores internalizados (respecto al total de señal, incluyendo el área de la membrana plasmática, de FFA1WT-GFP por célula) a partir de los 5 minutos, llegando a un máximo a los 30 minutos y un ligero declive a los 60 minutos (Fig. 9). Esta cinética de internalización de FFA1 es alterada al incubar a las células con pit-stop 2 [10  $\mu$ M] por 15 minutos previos a la adición de DHA (Fig. 9). La presencia de pit-stop 2 mantiene la localización de receptores FFA1<sup>WT</sup>-GFP en la membrana plasmática aun cuando se aplica el mismo estímulo de DHA que si internaliza los receptores, desde los 5 hasta los 60 minutos del curso de estimulación con el agonista (Fig. 9).

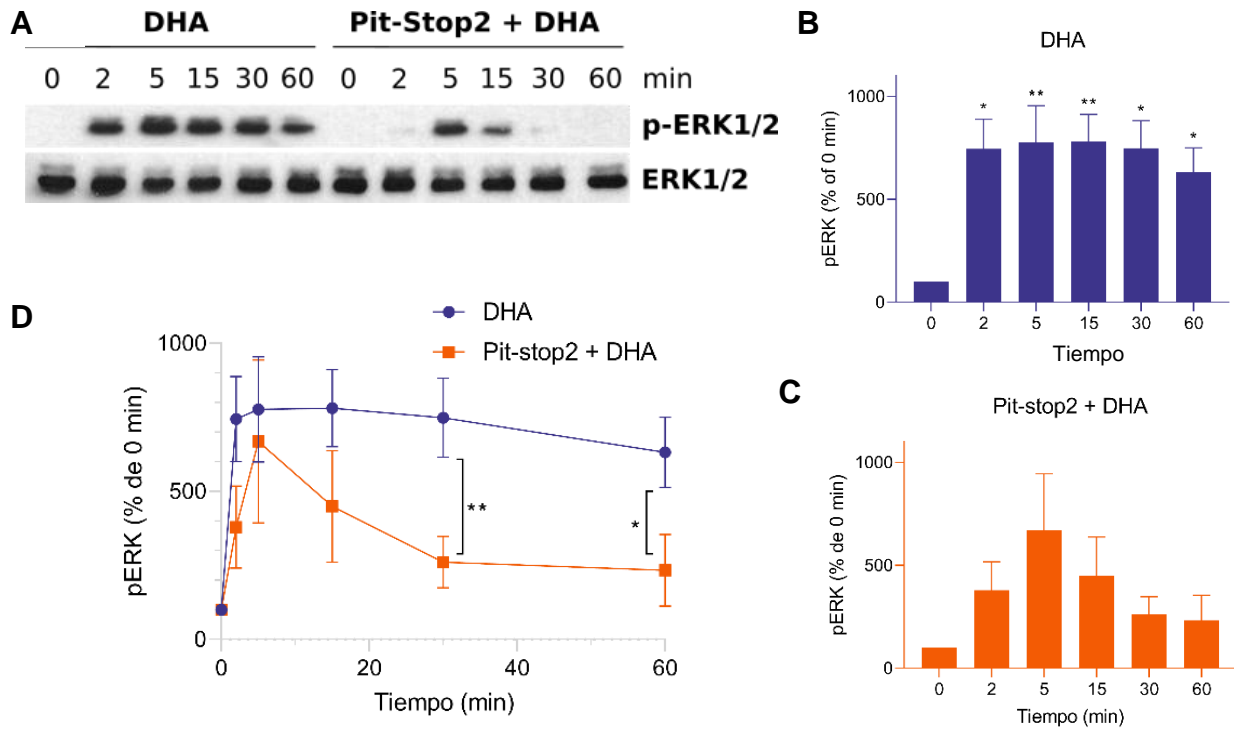
Una vez identificada una condición en la que se inhibe la internalización de FFA1 mediada por DHA, se evaluó el efecto de la inhibición de la internalización del receptor por pit-stop 2, en la activación de ERK1/2 inducida por el propio DHA. Se realizó la inmuno-detección de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2; usando un anticuerpo que detecta la fosforilación en T202 y Y204 de la proteína) y ERK1/2 total (anticuerpo que detecta de manera general a la proteína) en lisados totales de células HEK293 Flpn-TREx expresando FFA1<sup>WT</sup>, sometidos a electroforesis en geles de poli-acrilamida. La estimulación con DHA promueve el incremento de pERK1/2 con respecto a la cantidad total de ERK1/2 establemente desde los 2 minutos de estimulación y se mantiene con poca variación hasta los 60 minutos donde comienza a desaparecer ligeramente (Fig. 10).



**Fig. 9. Efecto de Pit-Stop 2 en la internalización de FFA1 inducida por DHA.**

**A-B.** Localización subcelular de FFA1<sup>WT</sup>-GFP en células HEK293 estimuladas con DHA [30mM]. **B.** Los cultivos fueron incubados con Pit-Stop 2 [10  $\mu$ M] durante 15 minutos antes de añadir DHA al medio en cada tiempo analizado. Se utilizó AGT-rodamina para marcar la membrana plasmática en todas las células. Barras blancas: 10  $\mu$ m. **C.** Cuantificación de la proporción de FFA1-GFP presente en el espacio intracelular (delimitado por AGT-rodamina, pero sin incluir los pixeles ocupados por esta), entre el total por célula. Se muestra la media y error estándar en cada condición. Las líneas representan la conexión entre puntos. AGT: aglutinina de germen de trigo. \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

No obstante, en extractos proteicos de células incubadas con pit-stop 2 en las mismas condiciones que inhiben la internalización de FFA1, disminuye la fracción de pERK1/2 inducida por DHA (Fig. 10). Esta diferencia respecto a la condición control sin pit-stop 2 es más abrupta, y estadísticamente significativa a los 30 y 60 minutos de estimulación con DHA, lo cual es consistente con lo observado previamente con las mutantes de sitios de fosforilación de FFA1 que no se internalizan en respuesta al mismo estímulo y no mantienen la actividad de ERK1/2 por tiempo prolongado.



**Fig. 10 Contribución de la inhibición de la internalización de FFA1<sup>WT</sup> en el estado de activación de ERK1/2.**

Imunodetección de pERK1/2 (proteína fosforilada, activa) y ERK1/2 (proteína total) en extractos proteicos de células HEK293 Flpn-TREx expresando FFA1<sup>WT</sup> y separados por electroforesis en geles de poliácridamida-SDS

**A.** Resultado representativo de un experimento, se muestra en el mismo gel los extractos proteicos provenientes de células estimuladas con DHA [30  $\mu$ M] solamente por el tiempo indicado en cada carril, así como de células incubadas con pit-stop 2 [10  $\mu$ M] durante 15 minutos previos al inicio del estímulo de DHA por el tiempo indicado. Se muestra para cada carril en la parte superior la señal correspondiente a pERK1/2 y en la parte inferior la de ERK1/2. **B-C.** Cuantificación por densitometría de la señal de pERK1/2 obtenida en cada tiempo de estimulación con DHA (B) y pit-stop+DHA (C) en geles como el mostrado en A. Las barras muestran la media, normalizada respecto a la media del tiempo 0 en cada experimento, y el error estándar asociado. N= 4 experimentos independientes. **D.** Integración de los datos mostrados en B y C para comparación entre condiciones. Los puntos corresponden a la media, mostrando el error estándar asociado a cada uno. Las líneas horizontales representan la conexión entre puntos. Se sometieron los datos al análisis estadístico *T de Student* de una cola, comparando en cada tiempo entre ambas condiciones (DHA vs pit-stop2+DHA). En todas las gráficas, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

## 12. Discusión

En los últimos años se han dado avances considerables en el estudio integral de la señalización, modificaciones postraduccionales, interacciones moleculares y regulación espaciotemporal de GPCRs. Con el objetivo de tener un abordaje más completo y detallado en las estrategias farmacológicas generadas en torno a este tipo de receptores.

En este proyecto de investigación se estudió la dinámica de reclutamiento e interacción de FFA1 con  $\beta$ -arrestina 2, como consecuencia de la fosforilación promovida por la activación del propio receptor con su ligando DHA (homóloga). Así como la fosforilación mediada por la activación de PKC con PMA (heteróloga). Al comparar entre el efecto de estos dos estímulos en la variante silvestre FFA1<sup>WT</sup>, se observa un aumento en la interacción de esta arrestina con FFA1 desde los 2 minutos con ambos tratamientos. No obstante, el pico de interacción con DHA se da a los 15 minutos de aplicar el estímulo mientras que con PMA esto ocurre a los 30 minutos y con una magnitud mayor.

Las diferencias en las dinámicas de interacción de  $\beta$ -arrestina 2 con FFA1 registradas entre DHA y PMA pueden constituir una fuente de variación para las señales y fenómenos inducidos por esos estímulos y dependientes de dicha interacción. Por ejemplo, las diferencias observadas previamente en la cinética de internalización de FFA1 por la acción de DHA y PMA, que en el caso del último provoca una internalización del receptor más rápida y sostenida, podría relacionarse con la dinámica de reclutamiento y mantenimiento de la interacción con  $\beta$ -arrestina 2, comprendiendo a su vez la posibilidad de variaciones en la conformación y activación de la arrestina. De hecho, existe suficiente evidencia que indica que diferentes mecanismos de desensibilización (como lo son los ejercidos por la acción derivada de DHA y PMA), que promueven el establecimiento de códigos de fosforilación diferenciales en la tercera asa y la región carboxilo terminal de varios GPCRs, generan variaciones en el modo de interacción entre determinado receptor y las arrestinas, que a su vez impactan en la señalización río debajo de este sistema (Chen et al., 2022; Eiger et al., 2023; Latorraca et al., 2020; Maharana, Sarma, et al., 2023; Martínez-Morales et al., 2022; Wootten et al., 2018)

Un artículo recientemente publicado sugiere que en el caso de FFA4, un receptor de la misma familia de FFA1, pequeñas variaciones en los ácidos grasos que actúan como ligandos de este receptor determinan el modo de unión a FFA4, y esto a su vez determina el grado y modo de interacción del receptor con las proteínas G y las  $\beta$ -arrestinas (Mao et al., 2023). Ese mismo escenario podría ocurrir en el caso de FFA1, que comparte varios ligandos con FFA1, como DHA y  $\alpha$ LA, por lo que además de explorar las diferencias en la fosforilación inducida por medio de desensibilización homóloga (ej. DHA) y heteróloga (ej. PMA). Sería valioso estudiar el posible establecimiento de códigos de fosforilación específicos asociados a cada ligando y al contexto en el que cada uno se une a los receptores.

En este trabajo nos enfocamos en la variación generada por las mutaciones en distintos sitios de fosforilación (IL3, C-term o ambos), por lo que en un futuro sería atractivo estudiar a detalle la existencia de firmas o códigos de fosforilación específicos asociados a cada estímulo (e incluso a la concentración de estos), que expliquen la conexión entre el estímulo que promueve la fosforilación de FFA1 y la generación de diferencias en la conformación de la  $\beta$ -arrestina 2 asociada al receptor, que en conjunto constituyen un mecanismo central en la señalización y procesamiento de los GPCRs (Drube et al., 2022; Gurevich & Gurevich, 2019a; Maharana, Sarma, et al., 2023; Smith et al., 2018; X. E. Zhou et al., 2017).

FFA1 es un receptor que no presenta ninguno de los motivos de fosforilación identificados hasta ahora como claves para la unión de  $\beta$ -arrestina1/2 y su activación, conservados en diversos GPCRs: PXPXXP, PXXPXXP y PXPP (Kumari et al., 2023; Maharana, Sano, et al., 2023; X. E. Zhou et al., 2017). Además, tampoco contiene otros dominios importantes para la regulación del receptor y promoción de su interacción con proteínas G, por lo que estudios como este representan un avance en la caracterización de los elementos críticos de regulación en este receptor divergente.

El efecto observado con la mutante FFA1<sup>IL3</sup> sugiere un rol fundamental de la fosforilación de la T215 para el reclutamiento de  $\beta$ -arrestina 2; en el caso de la fosforilación inducida por DHA en las dos variantes en las que se presenta esta mutación se abate la interacción con  $\beta$ -arrestina 2, independientemente del estado de los sitios en C-term (Fig. 11). La interacción observada de  $\beta$ -arrestina 2 con FFA1<sup>IL3/C-term</sup> en respuesta a PMA, que no se observa con la mutante FFA1<sup>IL3</sup>, sugiere que la activación de PKC puede promover el reclutamiento de la arrestina por un mecanismo independiente de estos sitios de fosforilación, que al parecer sólo ocurre si no se fosforilan dichos sitios. Una explicación a esto podría ser que otros sitios como la S212, que en condiciones silvestres no tienen un papel preponderante en la fosforilación del receptor, se vuelven blanco de PKC debido a la imposibilidad de fosforilar a los sitios principales. Aunado a esto, la mutación simultánea en IL3 y C-term podría generar alteraciones en la conformación del receptor en estado activo que podrían favorecer el acoplamiento de  $\beta$ -arrestina 2 en respuesta a PMA.

Por otro lado, el hecho de que la mutante FFA1C<sup>-term</sup> mantenga interacciones con  $\beta$ -arrestina 2 en respuesta a DHA y PMA, pero la cinética varíe con respecto a la de FFA1<sup>WT</sup>, sugiere que la fosforilación del extremo C-term, al menos de los tres sitios T287, T293 y S 298, no es esencial para el reclutamiento de  $\beta$ -arrestina 2, pero puede tener un papel más modulador en dicha interacción. Estos datos en conjunto sugieren la existencia de jerarquías entre los sitios de fosforilación de FFA1, siendo la fosforilación en T215 de IL3 determinante para que ocurra la interacción con  $\beta$ -arrestina 2, y en menor jerarquía los del C-term que ayudan a modular la dinámica de dicha interacción. El estudio estructural de la conformación de FFA1 activo y fosforilado en los sitios T215, T297, T293 y S298, en complejo con  $\beta$ -arrestina 2, así como la comparación con la

estructura no fosforilada en dichos sitios, ayudaría a entender lo observado en estos experimentos de FRET (Fig. 11).

El uso de sensores que reconocen distintas conformaciones activas o inactivas de  $\beta$ -arrestina 2, como *intrabodies* o *nanobodies* diseñados (Grimes et al., 2023; Maharana et al., 2023), puede ser una herramienta útil para evaluar el efecto de las diferentes mutantes de FFA1 en la inducción de distintas conformaciones de  $\beta$ -arrestina 2 que se traduzcan en variaciones funcionales del complejo receptor-arrestina. Una metodología que permite este tipo de estudios es BRET, que tiene un fundamento similar al de FRET, sin embargo, el donador es la luciferasa que emite luminiscencia en presencia de su sustrato coelenteracina, el aceptor suele ser una proteína GFP o YFP que emite fluorescencia cuando se encuentra al menos 10 nm de distancia de la luciferasa activa (Wright et al., 2021). Esta técnica permite la evaluación de múltiples condiciones en placas multi-pozos con células vivas, a diferencia de FRET que se analiza en células fijadas, por lo que ofrece datos más precisos en tiempo real. La información recabada mediante estas aproximaciones metodológicas permitiría vincular el estado de fosforilación del receptor en cada sitio con conformaciones específicas de  $\beta$ -arrestina 2 que se vinculen a diferentes efectos celulares.

Posterior al reclutamiento de  $\beta$ -arrestina y su activación por parte del receptor fosforilado, se induce el proceso de internalización y tráfico vesicular. Se ha observado que ante distintos estímulos que inducen la fosforilación e internalización del receptor FFA4, este se transporta a distintas vías de tráfico vesicular que llevan al receptor a diferentes destinos: reciclaje, degradación o procesamiento; esto identificado mediante la interacción con proteínas Rab características de determinados compartimentos intracelulares (Flores-Espinoza et al., 2020).

En la actualidad se desconoce si es la fosforilación (códigos de fosforilación) la que produce los diferentes patrones de asociación con proteínas Rab o si es un proceso colateral promovido por las cinasas activadas por dichos estímulos. No obstante, dada la influencia directa que tiene la fosforilación en la generación de distintas conformaciones activas de  $\beta$ -arrestina y su dinámica de reclutamiento, y que esta proteína controla el proceso de internalización de estos receptores, existe una gran posibilidad de que la fosforilación además de regular el acoplamiento de sus transductores y por ende la señalización, regule la localización subcelular de los GPCRs en el tiempo.

En ese sentido, los resultados obtenidos por este proyecto muestran variaciones en el perfil de interacción de FFA1 con Rab5 inducida por DHA cuando se mutan los sitios de fosforilación (Fig. 11). La versión silvestre del receptor muestra un acoplamiento modesto pero sostenido de esta Rab al receptor, lo que significa que Rab5 puede participar en el proceso de endocitosis de FFA1 y su tráfico a endosomas tempranos. En las mutantes se observa un comportamiento reminiscente al observado con la  $\beta$ -arrestina 2 ante el mismo estímulo: ausencia de interacción de Rab5 con FFA1<sup>IL3</sup> y

FFA1<sup>IL3/C-term</sup> mientras un cambio en la cinética de interacción (que se mantiene) con FFA1<sup>C-term</sup>.

Debido a que Rab5 interacciona con los GPCRs en los pasos finales del proceso de internalización y en el primer compartimento vesicular al que llegan (endosomas tempranos), las diferencias observadas en las mutantes pueden estar directamente relacionadas con la cinética de internalización de FFA1 y a su vez con la dinámica de interacción de las variantes del receptor con  $\beta$ -arrestina 2 estudiada en este trabajo (Guzmán-Silva et al., 2022). Por lo tanto, en este caso, las diferencias observadas más que estar determinadas por el marcaje fosforilado de determinados residuos de FFA1, puede estar influenciado directamente por la internalización. Para evaluar la posibilidad de que la fosforilación diferencial en FFA1 genere un sesgo intrínseco que promueva el acoplamiento con ciertas Rab-GTPasas sobre otras y que esto provoque diferentes patrones de tráfico intracelular del receptor, se debe estudiar a futuro la interacción mediante FRET o BRET de las distintas mutantes de sitios de fosforilación de FFA1 con las Rab características de distintas vías de tráfico, como Rab 4 (reciclaje rápido), Rab11 (reciclaje lento), Rab9 y 7 (endosomas tardíos), y *lysotracker* (lisosomas), esto en respuesta a estímulos que promuevan distintos mecanismos de fosforilación, como DHA y PMA.

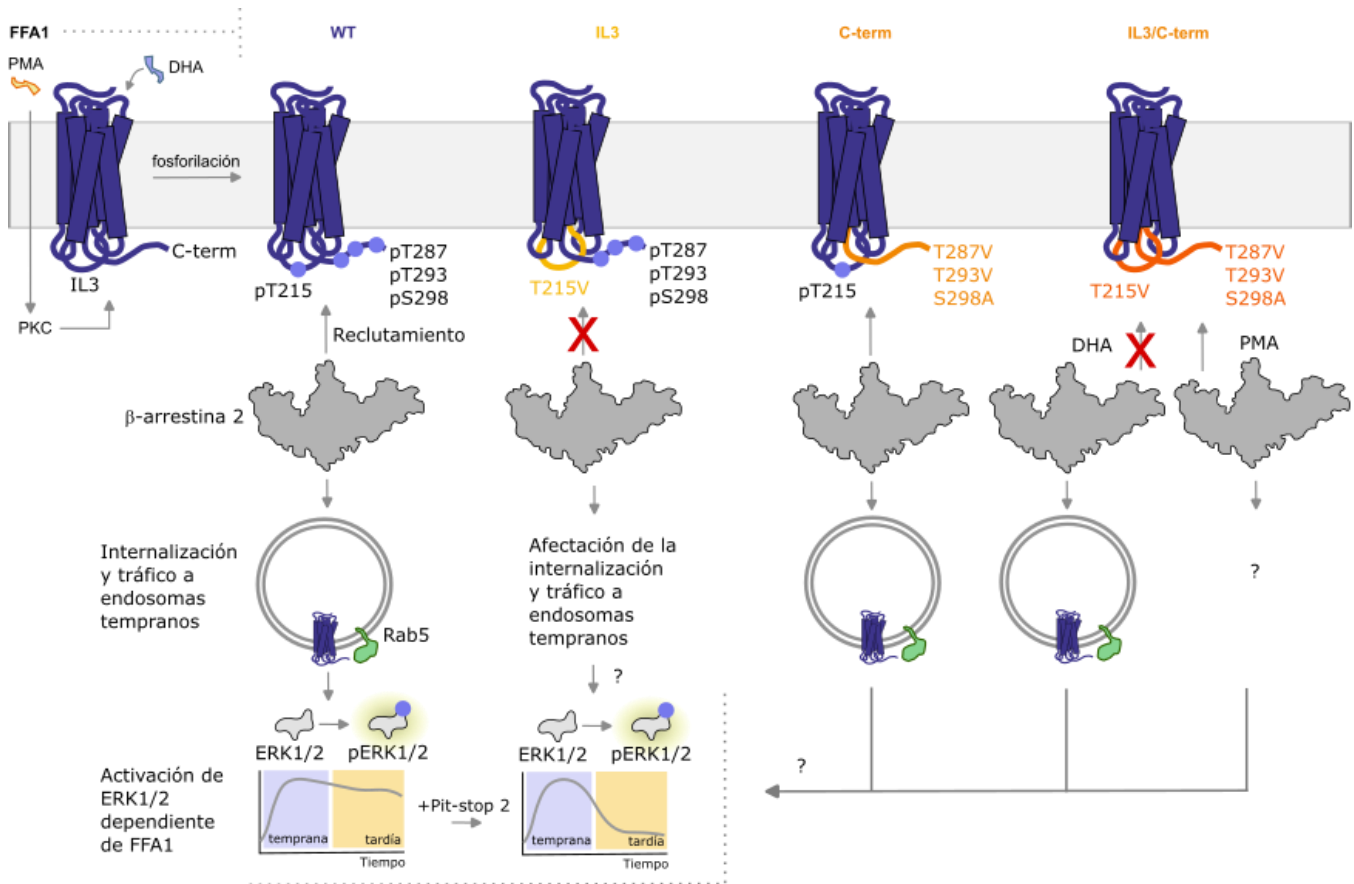
El tráfico intracelular de GPCRs es un proceso cuya consecuencia no es exclusivamente el cambio de localización, sino que durante esta movilización los receptores sufren modificaciones y procesos regulatorios que influyen en su actividad. La más caracterizada hasta ahora es la modulación de la señalización por  $\beta$ -arrestinas y proteínas G en los endosomas tempranos (Daly et al., 2023; Eiger et al., 2023; Hahn et al., 2022.; Nguyen et al., 2019; Tian et al., 2016). Por ejemplo, Eiger y colaboradores encontraron el año pasado que el receptor CXCR3 es reclutado a endosomas tempranos al igual que  $\beta$ -arrestina 2, de manera diferencial por sus ligandos naturales, y cada uno activa a ERK1/2 con distinta magnitud y temporalidad. Cuando se inhibe la internalización de este receptor, de manera que no llega a endosomas tempranos, disminuye drásticamente la actividad de ERK1/2 tanto en citoplasma como en núcleo (Eiger et al., 2022).

En nuestro caso, obtuvimos resultados que sugieren que la actividad de ERK1/2 a tiempos tardíos (15-60 min) está influenciada por la internalización del receptor. No obstante, se necesitan experimentos adicionales (por ejemplo, inhibir directamente la interacción con Rab5 mediante una versión dominante negativa de esta Rab) para determinar si en el caso de FFA1 es necesaria su localización específica en endosomas tempranos para sostener la señalización de ERK1/2 a tiempos tardíos.

Debido a que ERK1/2 es una cinasa que ejerce control sobre la expresión de diversos genes, como los relacionados con la proliferación, supervivencia y control del metabolismo de glucosa, resultaría interesante evaluar si el tiempo que se mantiene activo ERK1/2 determina el perfil de expresión génica resultante, ya que esto podría vincular todo el eje de regulación desde la fosforilación/ interacción con  $\beta$ -arrestinas/



internalización / tráfico/ ERK1/2, con repercusiones funcionales de largo plazo en las células.



**Fig. 11. Modelo en trabajo.**

Se muestra el eje de regulación propuesto en este proyecto centrado en el papel de los residuos fosforilables de FFA1 en su interacción con  $\beta$ -arrestina 2. La fosforilación de este receptor producida por la acción de su agonista DHA, así como la activación de PKC con PMA, inducen el reclutamiento de  $\beta$ -arrestina 2 a FFA1 en la versión silvestre (WT) del receptor. Esta interacción promueve el proceso de internalización y tráfico de FFA1 a endosomas tempranos, que se puede apreciar debido a su interacción con Rab5. A su vez, la internalización de FFA1 mantiene o promueve a ERK1/2 en su estado activo por tiempo prolongado.

La fosforilación del residuo T215 en el IL3 de FFA1 es necesaria para el reclutamiento de  $\beta$ -arrestina 2 dependiente de DHA y PMA, ya que cuando se tiene la mutación T215V, que no es fosforilable, no se detecta dicha interacción y se afectan los procesos regulados por  $\beta$ -arrestina 2. Por otro lado, la fosforilación de los residuos en el extremo C-term de FFA1 no es necesaria para el reclutamiento de  $\beta$ -arrestina 2 a FFA1 y los procesos dependientes de esto. No obstante, si se mutan los residuos fosforilables tanto en el IL3 como en C-term, PMA aún promueve el reclutamiento de  $\beta$ -arrestina 2 al receptor; mientras que, aunque no se detecta dicha interacción por acción de DHA, el receptor si se internaliza a endosomas tempranos. Por lo tanto, se debe estudiar con mayor detalle la contribución individual de cada residuo fosforilable, así como explorar el papel de otros residuos no incluidos en este trabajo.

## 13. Conclusiones

- Mediante imagenología de FRET se encontró que la fosforilación del residuo T215 en la IL3 de FFA1, promovida por DHA y PMA, contribuye en la interacción del receptor con  $\beta$ -arrestina 2.
- Los resultados obtenidos con las mutaciones de los residuos T287, T293 y S298 de la región carboxilo-terminal de este receptor sugieren que la fosforilación de estos residuos no es necesaria para la interacción de FFA1 con  $\beta$ -arrestina 2. No obstante, se debe estudiar a detalle la contribución individual de la fosforilación en cada residuo del extremo C-term para corroborar esta premisa y evaluar un posible rol secundario o modulador por parte de esta región del receptor y cómo varía esta contribución en respuesta al estímulo que induce la fosforilación.
- FFA1 interacciona con Rab5 como parte de su proceso de internalización y tráfico vesicular en respuesta a DHA.
- La interacción de FFA1 con Rab5 en respuesta a DHA es influenciada por la cinética de internalización del receptor mediada a su vez por la capacidad de reclutar a  $\beta$ -arrestina 2 mediante la fosforilación en T215 de FFA1. La ausencia de sitios fosforilados en C-term de FFA1 no disminuye la interacción con Rab5, sólo modula su cinética.
- La internalización de FFA1 contribuye a la activación de ERK1/2 en respuesta a DHA, lo que sugiere la existencia de activación de esta vía de señalización por parte de los receptores internalizados (no se desensibiliza para esta vía de señalización al internalizarse).

## 14. Perspectivas

- Estudiar a detalle la contribución individual de la fosforilación de los residuos de S y T en el extremo C-terminal, así como de la S212 en la IL3 (mutación en un solo residuo), en la interacción con  $\beta$ -arrestina 2 e internalización del receptor.
- Analizar aspectos estructurales de la interacción de FFA1 fosforilado y activado con  $\beta$ -arrestina 2, capturando las conformaciones de ambas proteínas acopladas en respuesta a la fosforilación inducida por DHA y PMA, mediante la técnica de microscopía electrónica en condiciones criogénicas. Identificar la posible existencia de diferentes conformaciones activas de la  $\beta$ -arrestina 2 reclutada a este receptor.
- Estudiar con mayor profundidad el tráfico intracelular de FFA1 en respuesta a la activación por su ligando y subsecuente internalización, así como por efecto de PMA. Para ello se podría analizar la interacción con proteínas enriquecidas en diferentes compartimentos de tráfico vesicular, como Rab7 (endosomas tardíos), Rab11 (endosomas de reciclaje rápido), Rab4 (endosomas de

reciclaje rápido), Rab9 (endosomas en maduración y red trans-Golgi) y LAMP-1 o *lysotracker* (marcaje de lisosomas). Lo anterior, mediante el uso de técnicas que permiten visualizar la interacción molecular in vivo en la célula, como BRET o NanoBiT; o bien el uso de imagenología de FRET como se realizó en este proyecto.

- Evaluar la posible existencia de señalización del receptor FFA1 desde endosomas tempranos, tanto para la vía de ERK como para otras vías de señalización.
- Analizar el acoplamiento de proteínas G y  $\beta$ -arrestina 2 a receptores FFA1 localizados en endosomas tempranos, tanto individualmente como en megacomplejos (receptor- proteína G-  $\beta$ -arrestina 2), tanto con el receptor WT como con las variantes en sitios de fosforilación.
- Estudiar efectos celulares río abajo dependientes de la señalización FFA1, así como en las funciones fisiológicas en modelos de mayor complejidad; vinculándolos con las diferencias observadas a nivel molecular en este proyecto por efecto de las mutaciones en sitios de fosforilación del receptor.
- Generar un modelo que permita integrar un eje de regulación basado en la fosforilación diferencial de FFA1 en determinados sitios por efecto de ligandos o compuestos que inducen la fosforilación del receptor, y cómo la fosforilación en ciertos residuos determina el modo y la dinámica de interacción de  $\beta$ -arrestina 2 con FFA1, vinculando este fenómeno con los efectos río abajo mediados por  $\beta$ -arrestina 2, como la internalización, localización subcelular y señalización intracelular de este GPCR.

## 15. Referencias

- Ali, M., Nezhady, M., Rivera, J. C., & Chemtob, S. (2020). Location Bias as Emerging Paradigm in GPCR Biology and Drug Discovery. *IScience*, 7;23(10):101643 <https://doi.org/10.1016/j.isci>
- Armingol, E., Officer, A., Harismendy, O., & Lewis, N. E. (2021). Deciphering cell–cell interactions and communication from gene expression. In *Nature Reviews Genetics*, 22, 2, pp. 71–88). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-00292-x>
- Asher, W. B., Terry, D. S., Gregorio, G. G. A., Kahsai, A. W., Borgia, A., Xie, B., Modak, A., Zhu, Y., Jang, W., Govindaraju, A., Huang, L. Y., Inoue, A., Lambert, N. A., Gurevich, V. V., Shi, L., Lefkowitz, R. J., Blanchard, S. C., & Javitch, J. A. (2022). GPCR-mediated  $\beta$ -arrestin activation deconvoluted with single-molecule precision. *Cell*, 185(10), 1661-1675.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.03.042>
- Bich, L., Pradeu, T., & Moreau, J. F. (2019). Understanding Multicellularity: The Functional Organization of the Intercellular Space. *Frontiers in Physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01170>
- Binda, C., Génier, S., Degrandmaison, J., Picard, S., Fréchette, L., Jean, S., Marsault, E., & Parent, J. L. (2019). L-type prostaglandin D synthase regulates the trafficking of the PGD<sub>2</sub> DP1 receptor by interacting with the GTPase Rab4. *Journal of Biological Chemistry*, 294(45), 1665–16883. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA119.008233>
- Blad, C. C., Tang, C., & Offermanns, S. (2012). G protein-coupled receptors for energy metabolites as new therapeutic targets. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 11, Issue 8, pp. 603–619). <https://doi.org/10.1038/nrd3777>
- Briscoe, C. P., Tadayyon, M., Andrews, J. L., Benson, W. G., Chambers, J. K., Eilert, M. M., Ellis, C., Elshourbagy, N. A., Goetz, A. S., Minnick, D. T., Murdock, P. R., Sauls, H. R., Shabon, U., Spinage, L. D., Strum, J. C., Szekeres, P. G., Tan, K. B., Way, J. M., Ignar, D. M., ... Muir, A. I. (2003). The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 11303–11311. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211495200>
- Brown, A. J., Goldsworthy, S. M., Barnes, A. A., Eilert, M. M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A. I., Wigglesworth, M. J., Kinghorn, I., Fraser, N. J., Pike, N. B., Strum, J. C., Steplewski, K. M., Murdock, P. R., Holder, J. C., Marshall, F. H., Szekeres, P. G., Wilson, S., Ignar, D. M., ... Dowell, S. J. (2003). The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 11312–11319. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211609200>
- Burns, R. N., Singh, M., Senatorov, I. S., & Moniri, N. H. (2014). Mechanisms of homologous and heterologous phosphorylation of FFA receptor 4 (GPR120): GRK6

- and PKC mediate phosphorylation of Thr 347 , Ser 350 , and Ser 357 in the C-terminal tail §. *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.016>
- Butcher, A. J., Hudson, B. D., Shimpukade, B., Alvarez-curto, E., Prihandoko, R., Ulven, T., Milligan, G., & Tobin, A. B. (2014). *Concomitant Action of Structural Elements and Receptor Phosphorylation Determines Arrestin-3 Interaction with the Free Fatty Acid Receptor FFA4* \*. 289(26), 18451–18465. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.568816>
- Cahill, T. J., Thomsen, A. R. B., Tarrasch, J. T., Plouffe, B., Nguyen, A. H., Yang, F., Huang, L. Y., Kahsai, A. W., Bassoni, D. L., Gavino, B. J., Lamerdin, J. E., Triest, S., Shukla, A. K., Berger, B., Little, J., Antar, A., Blanc, A., Qu, C. X., Chen, X., ... Lefkowitz, R. J. (2017). Distinct conformations of GPCR- $\beta$ -arrestin complexes mediate desensitization, signaling, and endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(10), 2562–2567. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701529114>
- Changeux, J. P., & Christopoulos, A. (2016). Allosteric Modulation as a Unifying Mechanism for Receptor Function and Regulation. In *Cell* (Vol. 166, Issue 5, pp. 1084–1102). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.015>
- Chavrier, P., Parton, R. G., Hauri, H. P., Simons, K., Zerial, M. (1990). Localization of Low Molecular Weight GTP Binding Proteins to Exocytic and Endocytic Compartments. *Sci Adv*. 2020 Sep 11;6(37): eabb8368. Doi: 10.1126/sciadv.abb8368.
- Chen, H., Zhang, S., Zhang, X., & Liu, H. (2022). QR code model: a new possibility for GPCR phosphorylation recognition. In *Cell Communication and Signaling* (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00832-4>
- Christiansen, E., Hansen, S. V. F., Urban, C., Hudson, B. D., Wargent, E. T., Grundmann, M., Jenkins, L., Zaibi, M., Stocker, C. J., Ullrich, S., Kostenis, E., Kassack, M. U., Milligan, G., Cawthorne, M. A., & Ulven, T. (2013). *Discovery of TUG-770: A Highly Potent Free Fatty Acid Receptor 1 (FFA1/GPR40) Agonist for Treatment of Type 2 Diabetes*. <https://doi.org/10.1021/ml4000673>
- Coniglio, S., Shumskaya, M., & Vassiliou, E. (2023). Unsaturated Fatty Acids and Their Immunomodulatory Properties. In *Biology* (Vol. 12, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biology12020279>
- Consortium, T. U. (2023). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
- Daly, C., Guseinov, A. A., Hahn, H., Tikhonova, I. G., Rojas, A., Thomsen, B., & Plouffe, B. (2023).  *$\beta$ -arrestin-dependent and-independent endosomal G protein activation by the vasopressin type 2 receptor*. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.04.01.535208>
- Drube, J., Haider, R. S., Matthees, E. S. F., Reichel, M., Zeiner, J., Fritzwanker, S., Ziegler, C., Barz, S., Klement, L., Filor, J., Weitzel, V., Kliewer, A., Miess-Tanneberg, E., Kostenis, E., Schulz, S., & Hoffmann, C. (2022). GPCR kinase knockout cells

- reveal the impact of individual GRKs on arrestin binding and GPCR regulation. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28152-8>
- Dwivedi-Agnihotri, H., Chaturvedi, M., Baidya, M., Maciej Stepniewski, T., Pandey, S., Maharana, J., Srivastava, A., Caengprasath, N., Hanyaloglu, A. C., Selent, J., & Shukla, A. K. (2020). Distinct phosphorylation sites in a prototypical GPCR differently orchestrate  $\beta$ -arrestin interaction, trafficking, and signaling. In *Sci. Adv* (Vol. 6).
- Edfalk, S., Steneberg, P., & Edlund, H. (2008). Gpr40 Is Expressed in Enteroendocrine Cells and Mediates Free Fatty Acid Stimulation of Incretin Secretion. *Diabetes*, 57(9), 2280–2287. <https://doi.org/10.2337/DB08-0307>
- Eiger, D. S., Boldizsar, N., Honeycutt, C. C., Gardner, J., Kirchner, S., Hicks, C., Choi, I., Uyen, P., Zheng, K., Warman, A., Smith, J. S., Zhang, J. Y., & Rajagopal, S. (2022). Location bias contributes to functionally selective responses of biased CXCR3 agonists. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33569-2>
- Eiger, D. S., Smith, J. S., Shi, T., Stepniewski, T. M., Tsai, C.-F., Honeycutt, C., Boldizsar, N., Gardner, J., Nicora, C. D., Moghieb, A. M., Kawakami, K., Choi, I., Hicks, C., Zheng, K., Warman, A., Alagesan, P., Knape, N. M., Huang, O., Silverman, J. D., ... Rajagopal, S. (2023). Phosphorylation barcodes direct biased chemokine signaling at CXCR3. *Cell Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2023.03.006>
- Flores-Espinoza, E., Meizoso-Huesca, A., Villegas-Comonfort, S., Reyes-Cruz, G., & García-Sáinz, J. A. (2020). Effect of docosahexaenoic acid, phorbol myristate acetate, and insulin on the interaction of the FFA4 (short isoform) receptor with Rab proteins. *European Journal of Pharmacology*, 889. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173595>
- Gorvel, J.-P., Chavrier, P., Zerial, M., & Gruenberg, J. (1991). *rab5 Controls Early Endosome Fusion In Vitro*. *Cell*. 1991 Mar 8;64(5):915-25. Doi: 10.1016/0092-8674(91)90316-q.
- Grimes, J., Koszegi, Z., Lanoiselée, Y., Miljus, T., O'Brien, S. L., Stepniewski, T. M., Medel-Lacruz, B., Baidya, M., Makarova, M., Mistry, R., Goulding, J., Drube, J., Hoffmann, C., Owen, D. M., Shukla, A. K., Selent, J., Hill, S. J., & Calebiro, D. (2023). Plasma membrane preassociation drives  $\beta$ -arrestin coupling to receptors and activation. *Cell*, 186(10), 2238-2255.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.04.018>
- Gurevich, V. V., & Gurevich, E. V. (2019a). *GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins*. 10(February), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00125>
- Gurevich, V. V., & Gurevich, E. V. (2019b). GPCR signaling regulation: The role of GRKs and arrestins. *Frontiers in Pharmacology*, 10(FEB). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00125>
- Guzmán-Silva, A., Martínez-Morales, J. C., Medina, L. del 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. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2022.111573>
- Hahn, H., Daly, C., Little, J., Perry-Hauser, N. A., Inoue, A., Plouffe, B., & Thomsen, A. R. B. (2022). *Endosomal Chemokine Receptor Signalosomes Regulate Central Mechanisms Underlying Cell Migration*. <https://doi.org/10.1101/2022.09.27.509755>
- Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S., & Tsujimoto, G. (2005). Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature Medicine*, 11(1), 90–94. <https://doi.org/10.1038/nm1168>
- Ichimura, A., Hasegawa, S., Kasubuchi, M., & Kimura, I. (2014). Free fatty acid receptors as therapeutic targets for the treatment of diabetes. *Frontiers in Pharmacology*, 5(NOV). <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00236>
- Ito, R., Tsujihata, Y., Matsuda-Nagasumi, K., Mori, I., Negoro, N., & Takeuchi, K. (2013). TAK-875, a GPR40/FFAR1 agonist, in combination with metformin prevents progression of diabetes and  $\beta$ -cell dysfunction in Zucker diabetic fatty rats. *British Journal of Pharmacology*, 170(3), 568. <https://doi.org/10.1111/BPH.12297>
- Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K., Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., Tanaka, H., Maruyama, M., Satoh, R., Okubo, S., Kizawa, H., Komatsu, H., Matsumura, F., Noguchi, Y., Shinohara, T., ... Fujino, M. (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic  $\beta$  cells through GPR40. *Nature*, 422(6928), 173–176. <https://doi.org/10.1038/nature01478>
- Kaksonen, M., & Roux, A. (2018). Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 19, Issue 5, pp. 313–326). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.132>
- Kaku, K., Enya, K., Nakaya, R., Ohira, T., & Matsuno, R. (2016). Long-term safety and efficacy of fasiglifam (TAK-875), a G-protein-coupled receptor 40 agonist, as monotherapy and combination therapy in Japanese patients with type 2 diabetes: a 52-week open-label phase III study. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 18(9), 925–929. <https://doi.org/10.1111/DOM.12693>
- Kang, D. S., Kern, R. C., Puthenveedu, M. A., von Zastrow, M., Williams, J. C., & Benovic, J. L. (2009). Structure of an arrestin2-clathrin complex reveals a novel clathrin binding domain that modulates receptor trafficking. *Journal of Biological Chemistry*, 284(43), 29860–29872. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.023366>
- Kang, H., Yang, H.-S., Ki, Y., Kim, K., Choi, H.-J., & Chung, K. Y. (2019). Conformational Dynamics and Functional Implications of Phosphorylated and beta-arrestins. *Structure/Folding and Design*, 28. <https://doi.org/10.1016/j.str.2019.12.008>

- Kawakami, K., Yanagawa, M., Hiratsuka, S., Yoshida, M., Ono, Y., Hiroshima, M., Ueda, M., Aoki, J., Sako, Y., & Inoue, A. (2022). Heterotrimeric Gq proteins act as a switch for GRK5/6 selectivity underlying  $\beta$ -arrestin transducer bias. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28056-7>
- Kaya, A. I., Perry, N. A., Gurevich, V. V., & Iverson, T. M. (2019). Phosphorylation barcode-dependent signal bias of the dopamine D1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918736117/-/DCSupplemental>
- Kebede, M., Ferdaoussi, M., Mancini, A., Alquier, T., Kulkarni, R. N., Walker, M. D., & Poitout, V. (2012). Glucose activates free fatty acid receptor 1 gene transcription via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent O-GlcNAcylation of pancreas-duodenum homeobox-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7), 2376–2381. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114350109>
- Kim, H., Lee, H. N., Choi, J., & Seong, J. (2021). Spatiotemporal Characterization of GPCR Activity and Function during Endosomal Trafficking Pathway. *Analytical Chemistry*, 93(4), 2010–2017. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03323>
- Kimura, I., Ichimura, A., Ohue-Kitano, R., & Igarashi, M. (2020). Free Fatty Acid Receptors in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 100(1), 171–210. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2018>
- Kumari, P., Inoue, A., Chapman, K., Lian, P., & Rosenbaum, D. M. (2023). Molecular mechanism of fatty acid activation of FFAR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(22). <https://doi.org/10.1073/pnas.2219569120>
- Kumari, P., Srivastava, A., Banerjee, R., Ghosh, E., Gupta, P., Ranjan, R., Chen, X., Gupta, B., Gupta, C., Jaiman, D., & Shukla, A. K. (2016). Functional competence of a partially engaged GPCR- $\beta$ -arrestin complex. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13416>
- Kumari, P., Srivastava, A., Ghosh, E., Ranjan, R., Dogra, S., Yadav, P. N., & Shukla, A. K. (2017). Core engagement with  $\beta$ -arrestin is dispensable for agonist-induced vasopressin receptor endocytosis and ERK activation. *Molecular Biology of the Cell*, 28(8), 1003–1010. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-12-0818>
- Laporte, S. A., Miller, W. E., Kim, K. M., & Caron, M. G. (2002).  $\beta$ -arrestin/AP-2 interaction in G protein-coupled receptor internalization. Identification of a  $\beta$ -arrestin binding site  $\beta$ 2-adaptin. *Journal of Biological Chemistry*, 277(11), 9247–9254. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108490200>
- Latorraca, N. R., Masureel, M., Hollingsworth, S. A., Heydenreich, F. M., Suomivuori, C. M., Brinton, C., Townshend, R. J. L., Bouvier, M., Kobilka, B. K., & Dror, R. O. (2020). How GPCR Phosphorylation Patterns Orchestrate Arrestin-Mediated Signaling. *Cell*, 183(7), 1813–1825.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.014>



- Latorraca, N. R., Wang, J. K., Bauer, B., Townshend, R. J. L., Hollingsworth, S. A., Olivieri, J. E., Xu, H. E., Sommer, M. E., & Dror, R. O. (2018). Molecular mechanism of GPCR-mediated arrestin activation. *Nature*, *557*(7705), 452–456. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0077-3>
- Lee, M.-J., Thangada, S., Paik, J.-H., Sapkota, G. P., Ancellin, N., Chae, S.-S., Wu, M., Morales-Ruiz, M., Sessa, W. C., Alessi, D. R., & Hla, T. (2001). Akt-Mediated Phosphorylation of the G Protein-Coupled Receptor EDG-1 Is Required for Endothelial Cell Chemotaxis The protein kinase Akt phosphorylates substrates with ERK phosphorylation, and transition into long-term. In *Molecular Cell* (Vol. 8). <http://www.molecule.org/cgi/content/>
- Lefkowitz, R. J. (2004). Historical review: A brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 25, Issue 8, pp. 413–422). <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.06.006>
- Lemmon, M. A., Freed, D. M., Schlessinger, J., & Kiyatkin, A. (2016). The Dark Side of Cell Signaling: Positive Roles for Negative Regulators. In *Cell* (Vol. 164, Issue 6, pp. 1172–1184). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.047>
- Li, J., Remington, J. M., Liao, C., Parsons, R. L., Schneebeli, S., Braas, K. M., May, V., & Brewer, M. (2022). GPCR Intracellular Loop Regulation of Beta-Arrestin-Mediated Endosomal Signaling Dynamics. *Journal of Molecular Neuroscience*, *72*(6), 1358–1373. <https://doi.org/10.1007/s12031-022-02016-8>
- Liu, H., Zhang, Q., He, X., Jiang, M., Wang, S., Yan, X., Cheng, X., Liu, Y., Nan, F.-J., Xu, H. E., Xie, X., & Yin, W. (2023). Structural insights into ligand recognition and activation of the medium-chain fatty acid-sensing receptor GPR84. *Nature Communications*, *14*(1), 3271. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38985-6>
- Luo, J., Busillo, J. M., Stumm, R., & Benovic, J. L. (2017). G protein-coupled receptor kinase 3 and protein kinase C phosphorylate the distal C-terminal tail of the chemokine receptor CXCR4 and mediate recruitment of  $\beta$ -arrestin. *Molecular Pharmacology*, *91*(6), 554–566. <https://doi.org/10.1124/mol.116.106468>
- Ma, D., Tao, B., Warashina, S., Kotani, S., Lu, L., Kaplamadzhiev, D. B., Mori, Y., Tonchev, A. B., & Yamashima, T. (2007). Expression of free fatty acid receptor GPR40 in the central nervous system of adult monkeys. *Neuroscience Research*, *58*(4), 394–401. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2007.05.001>
- Ma, T. L., Zhou, Y., Zhang, C. Y., Gao, Z. A., & Duan, J. X. (2021). The role and mechanism of  $\beta$ -arrestin2 in signal transduction. In *Life Sciences* (Vol. 275). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119364>
- Magalhaes, A. C., Dunn, H., Ferguson, S. S., Taylor, J. A., & Ferguson, S. (2011). *Regulation of GPCR activity, trafficking, and localization by GPCR-interacting proteins Correspondence*. <https://doi.org/10.1111/bph.2012.165.issue-6>

- Maharana, J., Sano, F. K., Sarma, P., Yadav, M. K., Stepniewski, T. M., Chaturvedi, M., Ranjan, A., Singh, V., Saha, S., Mahajan, G., Chami, M., Shihoya, W., Selent, J., Chung, Y., Banerjee, R., Nureki, O., & Shukla, A. K. (2023). Molecular insights into atypical modes of  $\beta$ -arrestin interaction with seven 1 transmembrane receptors 2. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.07.05.547776>
- Maharana, J., Sarma, P., Yadav, M. K., Saha, S., Singh, V., Saha, S., Chami, M., Banerjee, R., & Shukla, A. K. (2023). Structural snapshots uncover a key phosphorylation motif in GPCRs driving  $\beta$ -arrestin activation. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.04.025>
- Mancini, A. D., Bertrand, G., Vivot, K., Carpentier, É., Tremblay, C., Ghislain, J., Bouvier, M., & Poitout, V. (2015a).  $\beta$ -arrestin recruitment and biased agonism at free fatty acid receptor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 290(34), 21131–21140. <https://doi.org/10.1074/JBC.M115.644450>
- Mancini, A. D., Bertrand, G., Vivot, K., Carpentier, É., Tremblay, C., Ghislain, J., Bouvier, M., & Poitout, V. (2015b).  $\beta$ -arrestin recruitment and biased agonism at free fatty acid receptor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 290(34), 21131–21140. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.644450>
- Mao, C., Xiao, P., Tao, X.-N., Qin, J., He, Q.-T., Zhang, C., Guo, S.-C., Du, Y.-Q., Chen, L.-N., Shen, D.-D., Yang, Z.-S., Zhang, H.-Q., Huang, S.-M., He, Y.-H., Cheng, J., Zhong, Y.-N., Shang, P., Chen, J., Zhang, D.-L., ... Sun, J.-P. (2023). Unsaturated bond recognition leads to biased signal in a fatty acid receptor. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.add6220>
- Martínez-Morales, J. C., Solís, K. H., Romero-Ávila, M. T., Reyes-Cruz, G., & García-Sáinz, J. A. (2022). Cell Trafficking and Function of G Protein-coupled Receptors. In *Archives of Medical Research* (Vol. 53, Issue 5, pp. 451–460). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2022.06.008>
- Martinez-Morales, J. C., Teresa Romero-Avila, M., Reyes-Cruz, G., & Garcia-Sainz, J. A. (2022). Roles of Receptor Phosphorylation and Rab Proteins in G Protein-Coupled Receptor Function and Trafficking. In *Molecular Pharmacology* (Vol. 101, Issue 3, pp. 144–153). American Society for Pharmacology and Experimental Therapy (ASPET). <https://doi.org/10.1124/molpharm.121.000429>
- Milligan, G., Alvarez-Curto, E., Watterson, K. R., Ulven, T., & Hudson, B. D. (2015). Characterizing pharmacological ligands to study the long-chain fatty acid receptors GPR40/FFA1 and GPR120/FFA4. *British Journal of Pharmacology*, 172(13), 3254–3265. <https://doi.org/10.1111/bph.12879>
- Moniri, N. H. (2016). Free-fatty acid receptor-4 (GPR120): Cellular and molecular function and its role in metabolic disorders. *Biochemical Pharmacology*, 110–111, 1–15. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2016.01.021>

- Moo, E. Von, van Senten, J. R., Bräuner-Osborne, H., & Møller, T. C. (2021). Arrestin-Dependent and -Independent Internalization of G Protein–Coupled Receptors: Methods, Mechanisms, and Implications on Cell Signaling. *Molecular Pharmacology*, 99(4), 242 LP – 255. <https://doi.org/10.1124/molpharm.120.000192>
- Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G Proteins: Organizers of Transmembrane Signals Review. In *Cell* (Vol. 80).
- Nguyen, A. H., Thomsen, A. R. B., Cahill, T. J., Huang, R., Huang, L. Y., Marcink, T., Clarke, O. B., Heissel, S., Masoudi, A., Ben-Hail, D., Samaan, F., Dandey, V. P., Tan, Y. Z., Hong, C., Mahoney, J. P., Triest, S., Little, J., Chen, X., Sunahara, R., ... Lefkowitz, R. J. (2019). Structure of an endosomal signaling GPCR–G protein– $\beta$ -arrestin megacomplex. *Nature Structural and Molecular Biology*, 26(12), 1123–1131. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0330-y>
- Pandey, S., Kumari, P., Baidya, M., Kise, R., Cao, Y., Dwivedi-Agnihotri, H., Banerjee, R., Li, X. X., Cui, C. S., Lee, J. D., Kawakami, K., Maharana, J., Ranjan, A., Chaturvedi, M., Jhingan, G. D., Laporte, S. A., Woodruff, T. M., Inoue, A., & Shukla, A. K. (2021). Intrinsic bias at non-canonical,  $\beta$ -arrestin-coupled seven transmembrane receptors. *Molecular Cell*, 81(22), 4605-4621.e11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.09.007>
- Qian, J., Wu, C., Chen, X., Li, X., Ying, G., Jin, L., Ma, Q., Li, G., Shi, Y., Zhang, G., & Zhou, N. (2014). *Differential requirements of arrestin-3 and clathrin for ligand-dependent and-independent internalization of human G protein-coupled receptor 40* ☆. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.07.019>
- Rosenthal, W., Editorial Board Barrett, B. J., Buckingham, P. J., Flockerzi, U. V, Hofmann, H. F., Geppetti, M. P., Michel, F. M., Moore, I. P., & Page, S. C. (2014). *Arrestins - Pharmacology and Therapeutic Potential*. <http://www.springer.com/series/164>
- Sanchez, J. E., Kc, G. B., Franco, J., Allen, W. J., Garcia, J. D., & Sirimulla, S. (2021). BiasNet: A Model to Predict Ligand Bias Toward GPCR Signaling. *Cite This: J. Chem. Inf. Model*, 61, 4199. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00317>
- Schröder, R., Schmidt, J., Blättermann, S., Peters, L., Janssen, N., Grundmann, M., Seemann, W., Kaufel, D., Merten, N., Drewke, C., Gomeza, J., Milligan, G., Mohr, K., & Kostenis, E. (2011). Applying label-free dynamic mass redistribution technology to frame signaling of G protein-coupled receptors noninvasively in living cells. *Nature Protocols*, 6(11), 1748–1760. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.386>
- Schwartz, S. L., Cao, C., Pylypenko, O., Rak, A., & Wandinger-Ness, A. (2008). Erratum: Rab GTPases at a glance. *Journal of Cell Science* (Vol. 121, Issue 2, p. 246). <https://doi.org/10.1242/jcs.03495>
- Semerdjieva, S., Shortt, B., Maxwell, E., Singh, S., Fonarev, P., Hansen, J., Schiavo, G., Grant, B. D., & Smythe, E. (2008). Coordinated regulation of AP2 uncoating from

- clathrin-coated vesicles by rab5 and hRME-6. *Journal of Cell Biology*, 183(3), 499–511. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806016>
- Senatorov, I. S., Cheshmehkani, A., Burns, R. N., Singh, K., & Moniri, N. H. (2020). Carboxy-Terminal Phosphoregulation of the Long Splice Isoform of Free-Fatty Acid Receptor-4 Mediates  $\beta$ -Arrestin Recruitment and Signaling to ERK1/2. *Molecular Pharmacology*, 97(5), 304–313. <https://doi.org/10.1124/mol.119.117697>
- Shen, F., & Seabra, M. C. (1996). Mechanism of Digeranylgeranylation of Rab Proteins formation of a complex between monogeranylgeranyl-Rab and Rab escort protein. *J Biol Chem*. 1996 Feb 16;271(7):3692-8. Doi: 10.1074/jbc.271.7.3692.
- Smith, J. S., Lefkowitz, R. J., & Rajagopal, S. (2018). Biased signalling: from simple switches to allosteric microprocessors. *Nat Rev Drug Discov*. 2018 Apr;17(4):243-260. Doi: 10.1038/nrd.2017.229. Epub 2018 Jan 5.
- 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 7. *The Journal of Cell Biology* (Vol. 149, Issue 4). <http://www.jcb.org>
- Sosa-Alvarado, C., Hernández-Méndez, A., Romero-Ávila, M. T., Sánchez-Reyes, O. B., Takei, Y., Tsujimoto, G., Hirasawa, A., & García-Sáinz, J. A. (2015). Agonists and protein kinase C-activation induce phosphorylation and internalization of FFA1 receptors. *European Journal of Pharmacology*, 768, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.10.038>
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 10, Issue 8, pp. 513–525). <https://doi.org/10.1038/nrm2728>
- Stoddart, L. A., Brown, A. J., & Milligan, G. (2007). Uncovering the Pharmacology of the G Protein-Coupled Receptor GPR40: High Apparent Constitutive Activity in Guanosine 5'-&em>O&lt;/em>-(3-[&sup>35&lt;/sup>S]thio)triphosphate Binding Studies Reflects Binding of an Endogenous Agonist. *Molecular Pharmacology*, 71(4), 994. <https://doi.org/10.1124/mol.106.031534>
- Thomsen, A. R. B., Plouffe, B., Cahill, T. J., Shukla, A. K., Tarrasch, J. T., Dosey, A. M., Kahsai, A. W., Strachan, R. T., Pani, B., Mahoney, J. P., Huang, L., Breton, B., Heydenreich, F. M., Sunahara, R. K., Skiniotis, G., Bouvier, M., & Lefkowitz, R. J. (2016). GPCR-G Protein- $\beta$ -Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell*, 166(4), 907–919. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.004>
- Thomsen, W., Frazer, J., & Unett, D. (2005). Functional assays for screening GPCR targets. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 16, Issue 6, pp. 655–665). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.10.008>

- Tian, X., Irannejad, R., Bowman, S. L., Du, Y., Puthenveedu, M. A., Von Zastrow, M., & Benovic, J. L. (2016). The  $\alpha$ arrestin ARRDC3 regulates the endosomal residence time and intracellular signaling of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 291(28), 14510–14525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.716589>
- Tobin, A. B. (2008). G-protein-coupled receptor phosphorylation: Where, when and by whom. *British Journal of Pharmacology*, 153(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707662>
- Traub, L. M., Downs, M. A., Westrich, J. L., & Fremont, D. H. (1999). Crystal structure of the appendage of AP-2 reveals a recruitment platform for clathrin-coat assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 3;96(16):8907-12. Doi: 10.1073/pnas.96.16.8907.
- Villegas-Comonfort, S., Guzmán-Silva, A., Romero-Ávila, M. T., Takei, Y., Tsujimoto, G., Hirasawa, A., & García-Sáinz, J. A. (2019). Receptor tyrosine kinase activation induces free fatty acid 4 receptor phosphorylation,  $\beta$ -arrestin interaction, and internalization. *European Journal of Pharmacology*, 855(March), 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.05.018>
- Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2018). *The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation* Keywords. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem>
- Wooten, D., Christopoulos, A., Marti-Solano, M., Madan Babu, M., & Sexton, P. M. (2018). Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0049-3>
- Wright, S. C., Lukashcheva, V., Le Gouill, C., Kobayashi, H., Breton, B., Mailhot-Larouche, S., Blondel-Tepaz, É., Antunes Vieira, N., Costa-Neto, C., Héroux, M., Lambert, N. A., Tabajara Parreiras-e-Silva, L., & Bouvier, M. (2021). BRET-based effector membrane translocation assay monitors GPCR-promoted and endocytosis-mediated G q activation at early endosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025846118/-/DCSupplemental>
- Wu, H. (2013). Higher-order assemblies in a new paradigm of signal transduction. In *Cell* (Vol. 153, Issue 2, pp. 287–292). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.013>
- Yang, D., Zhou, Q., Labroska, V., Qin, S., Darbalaei, S., Wu, Y., Yuliantie, E., Xie, L., Tao, H., Cheng, J., Liu, Q., Zhao, S., Shui, W., Jiang, Y., & Wang, M. W. (2021). G protein-coupled receptors: structure- and function-based drug discovery. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 6, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00435-w>
- York, H. M., Coyle, J., & Arumugam, S. (2020). To be more precise: The role of intracellular trafficking in development and pattern formation. In *Biochemical Society*

*Transactions* (Vol. 48, Issue 5, pp. 2051–2066). Portland Press Ltd.  
<https://doi.org/10.1042/BST20200223>

- Zhan, X., Gimenez, L. E., Gurevich, V. V., & Spiller, B. W. (2011). Crystal structure of arrestin-3 reveals the basis of the difference in receptor binding between two non-visual subtypes. *Journal of Molecular Biology*, 406(3), 467–478.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.12.034>
- 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. (2017a). 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>
- 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. (2017b). 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>
- Zhou, X., Franklin, R. A., Adler, M., Jacox, J. B., Bailis, W., Shyer, J. A., Flavell, R. A., Mayo, A., Alon, U., & Medzhitov, R. (2018). Circuit Design Features of a Stable Two-Cell System. *Cell*, 172(4), 744-757.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.015>
- Zuckerman, R., & Cheasty, J. E. (1988). *Sites of arrestin action during the quench phenomenon in retinal rods*. *FEBS Lett.* 238(2):379-84. Doi: 10.1016/0014-5793(88)80516-7.

## 16. Anexos

### Anexo 1. Tabla de soluciones y reactivos comerciales utilizados.

Nombre	Compañía	Número de catálogo
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i>	Gibco	12100046
Suero Fetal Bovino (Origen Europa)	Biowest	S1400-500
Antibiótico-antimicótico (Anti-Anti 100X)	Gibco	15240062
Poly-D-lisina hidrobromuro	Merck	P7886
Opti-MEM I	Gibco	22600043
Poli-etilenimina	Sigma Aldrich	
Paraformaldehído	Sigma-Aldrich	158127
Ácido docosaheptaenoico (DHA)	Sigma-Aldrich	D2534
Forbol 12-miristato, 13-acetado (PMA)	Sigma-Aldrich	P8139
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich	
Pitstop 2	Sigma-Aldrich	SML1169
Cloruro de Sodio	J.T. Baker	3624-01
Cloruro de Potasio	J.T. Baker	3040-01
Fosfato de sodio dibásico	J.T. Baker	3828-01
Fosfato de potasio monobásico	J.T. Baker	3246-01
Medio LB	MPI	3002021
Ampicilina sal sódica	Sigma-Aldrich	A0166
Sulfato de kanamicina	Sigma-Aldrich	K4378
Trizma base	Sigma-Aldrich	T1503
Glicina	Sigma-Aldrich	410225
Urea	Sigma-Aldrich	U1250
Dodecilsulfato de sodio (SDS)	Sigma-Aldrich	L5750
TEMED	BIORAD	1610801
IGEPAL CA-630 (Nonidet P40)	Sigma-Aldrich	56741
Ortovanadato de sodio	Sigma-Aldrich	S65508
Persulfato de amonio	Sigma-Aldrich	215589
Acrilamida	Sigma-Aldrich	A8887
N, N'-metileno-bis-acrilamida	Sigma-Aldrich	M-7279
1-4 Ditiotreitól	Sigma-Aldrich	D8255
Tween-20	Sigma-Aldrich	P1379
Immobilon Western HRP sustrato quimioluminiscente	Millipore	WBKLS0500
Plasmid Miniprep Kit	Biomiga	PD1211-02
ZymoPURE II Plasmid Midiprep Kit	Zymo	D4200-A
Colato de Sodio	Sigma-Aldrich	27029
Fluoruro de Sodio	Sigma-Aldrich	201154
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	Thermo Scientific	36978

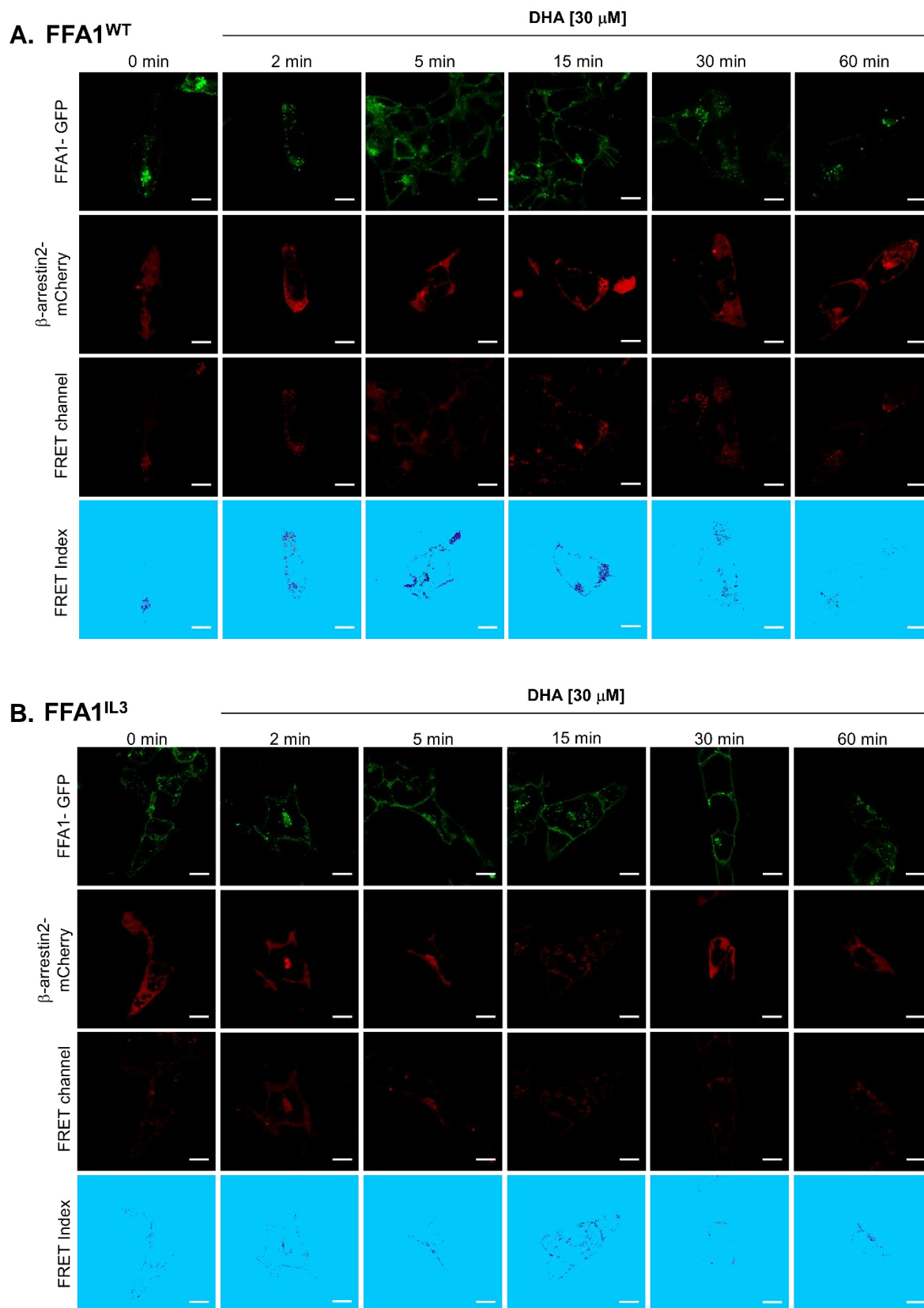
### Anexo 2. Tabla de anticuerpos comerciales utilizados

Nombre	Compañía	Número de catálogo
P44/42 MAPK (Erk1/2) 137F5 Rabbit	Cell Signaling Technology	4695
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology	9101

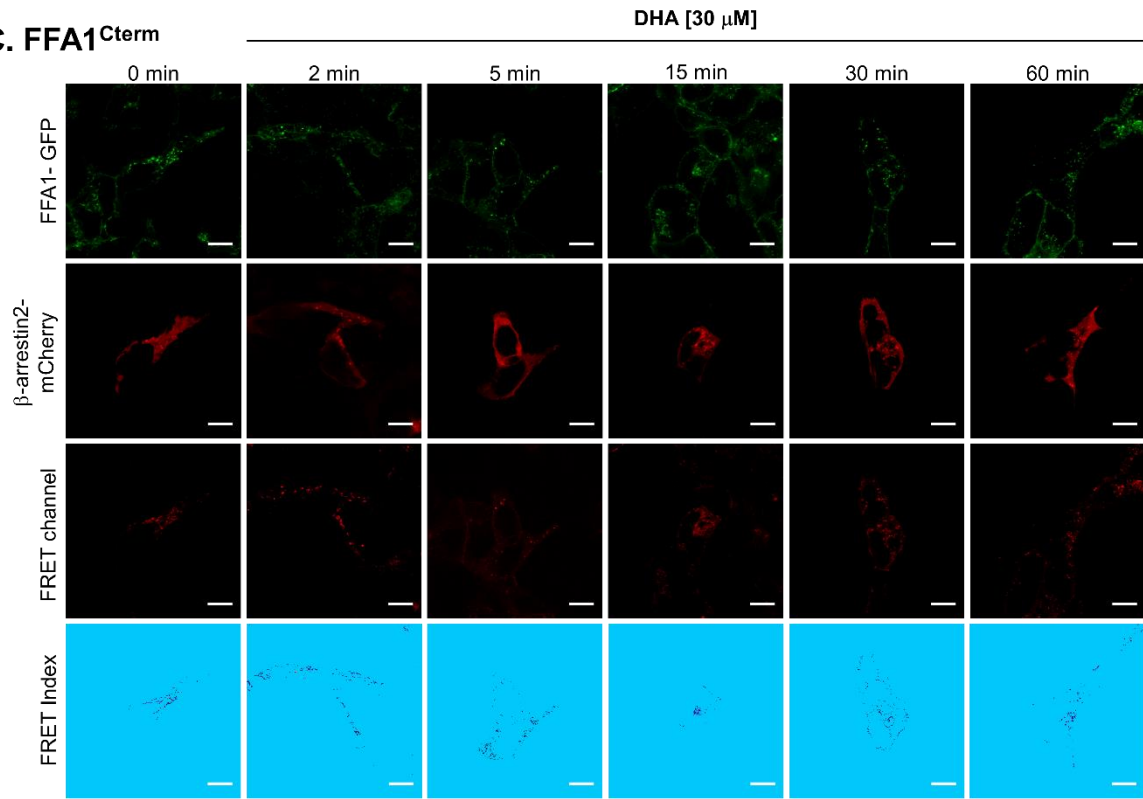
Gt anti-Rb IgG (H+L) Anticuerpo secundario, conjugado a HRP	Invitrogen	65-6120
---	------------	---------



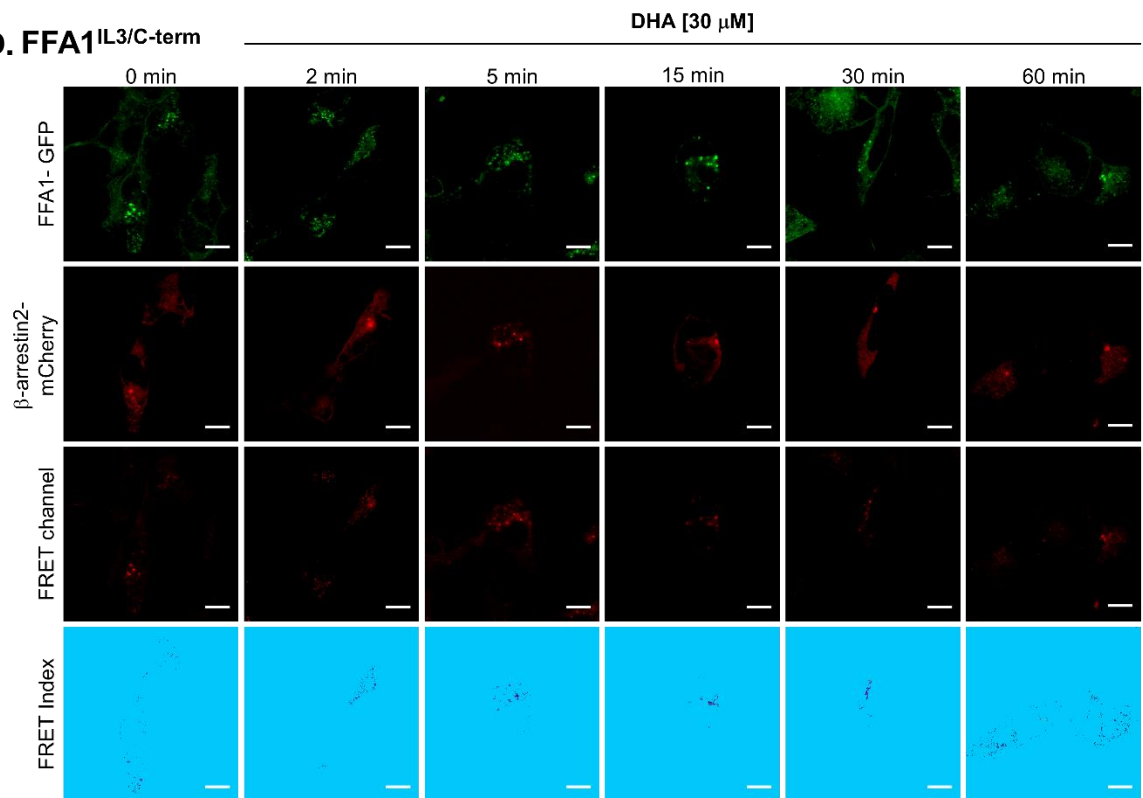
### Anexo 3. Figuras suplementarias



### C. FFA1<sup>Cterm</sup>

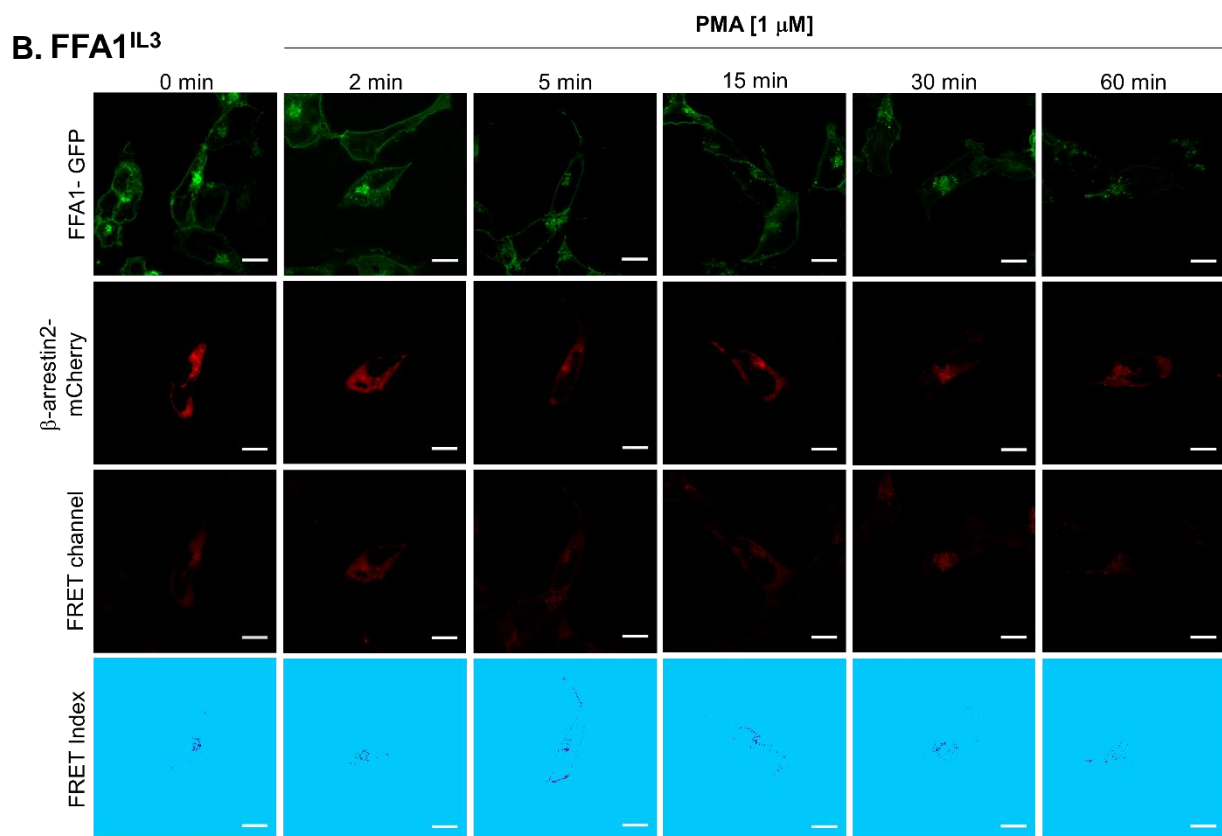
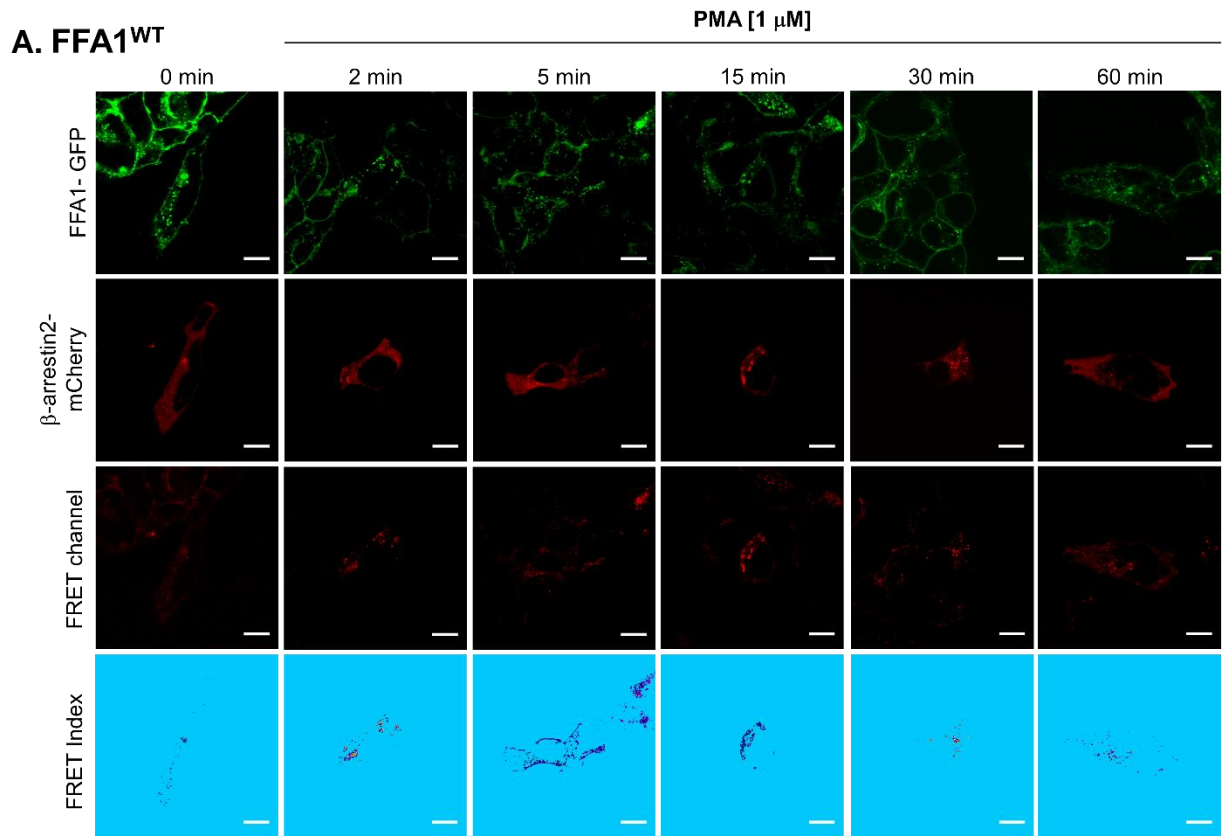


### D. FFA1<sup>IL3/C-term</sup>

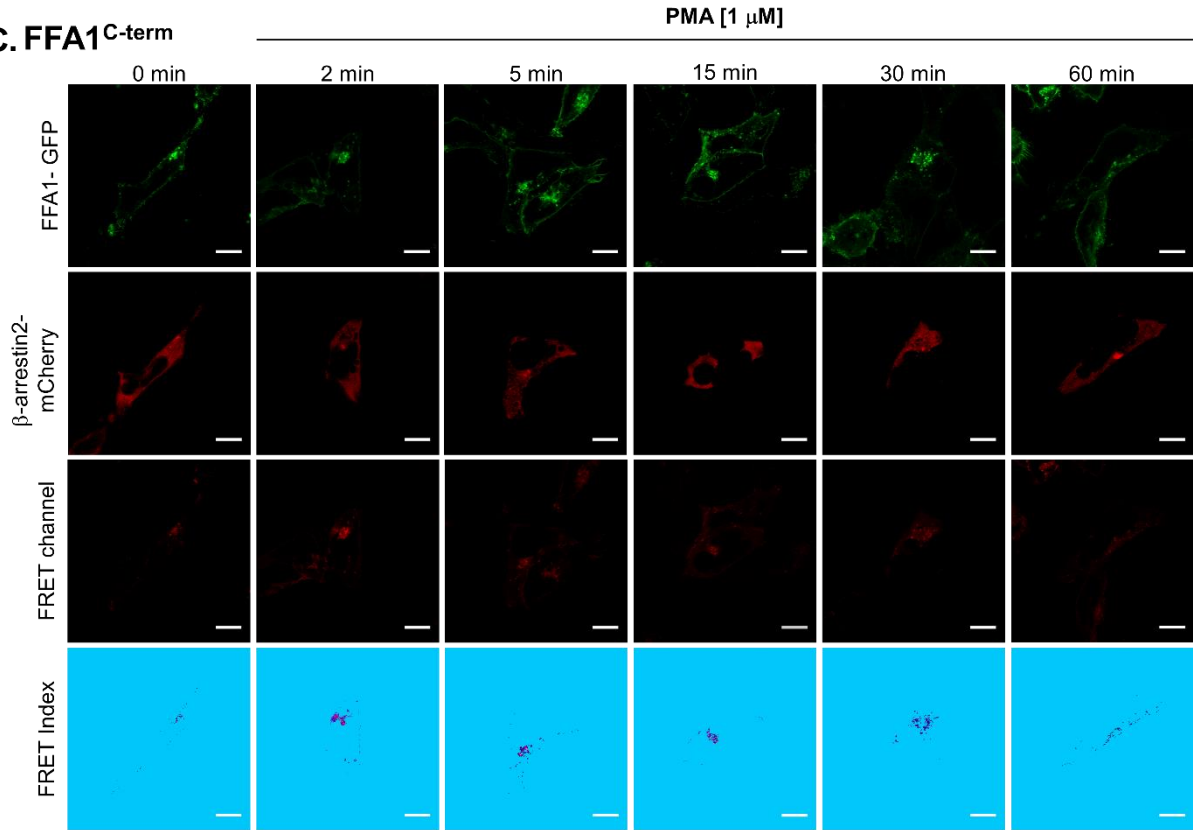


**Fig. S1. Imagenología de índice de FRET entre las variantes en sitios de fosforilación de FFA1-GFP y  $\beta$ -arrestina 2.**

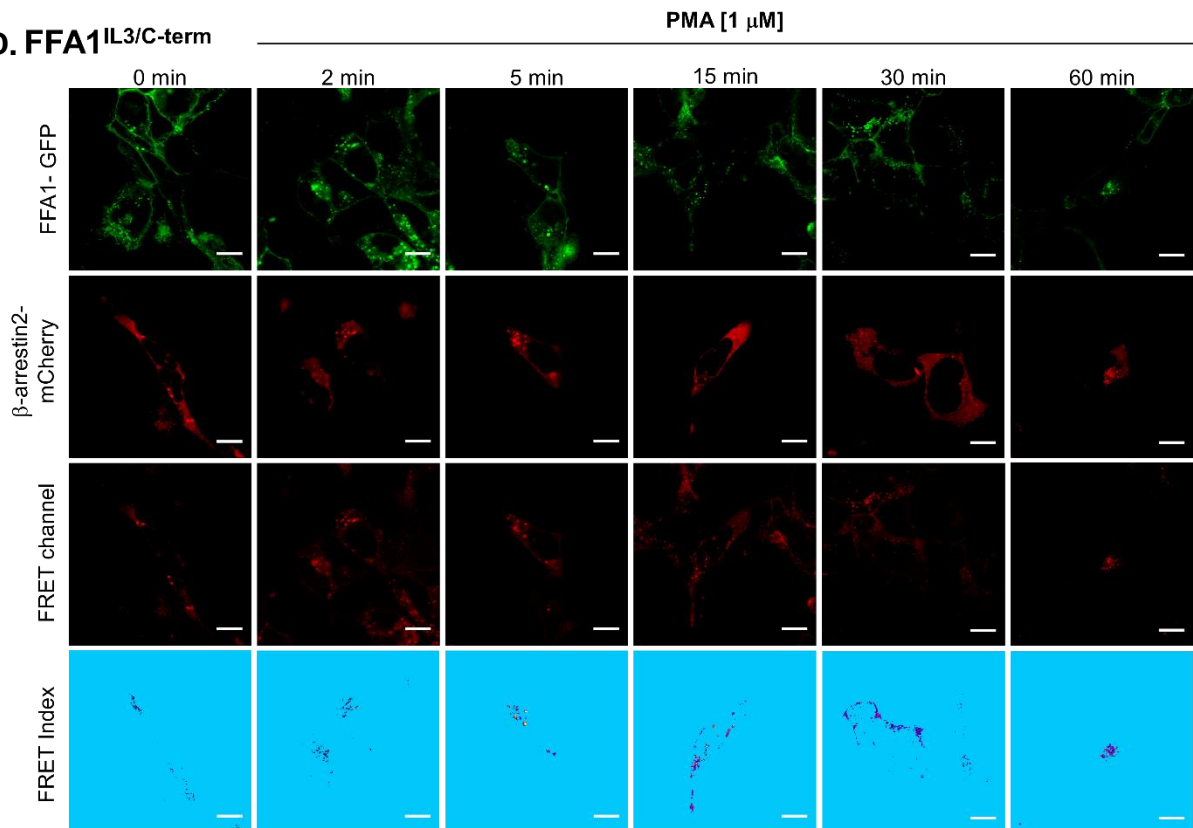
Se realizó el análisis de FRET a partir de imágenes de microscopía confocal para evaluar la interacción de **(A)** FFA1<sup>WT</sup>, **(B)** FFA1<sup>IL3</sup>, **(C)** FFA1<sup>C-term</sup> y **(D)** FFA1<sup>IL3/C-term</sup> (GFP, verde) con  $\beta$ -arrestina 2 (mCherry, rojo), en el espacio celular; en respuesta a cursos temporales de estimulación con DHA [30  $\mu$ M]. En ambos casos se muestra para cada condición las imágenes originales obtenidas por microscopía confocal a 510 nm (GFP), 610 nm (mCherry y *FRET channel*), este último corresponde a la emisión capturada de mCherry cuando sólo está habilitado el láser de excitación de GFP a 485 nm. El canal *FRET index* comprende las imágenes resultantes del análisis de imagenología de FRET descrito en métodos. Las barras de escala corresponden a 10  $\mu$ m. Las imágenes son representativas de 4 experimentos realizados en los que se adquirió al menos 10 imágenes por condición.



**C. FFA1<sup>C-term</sup>**

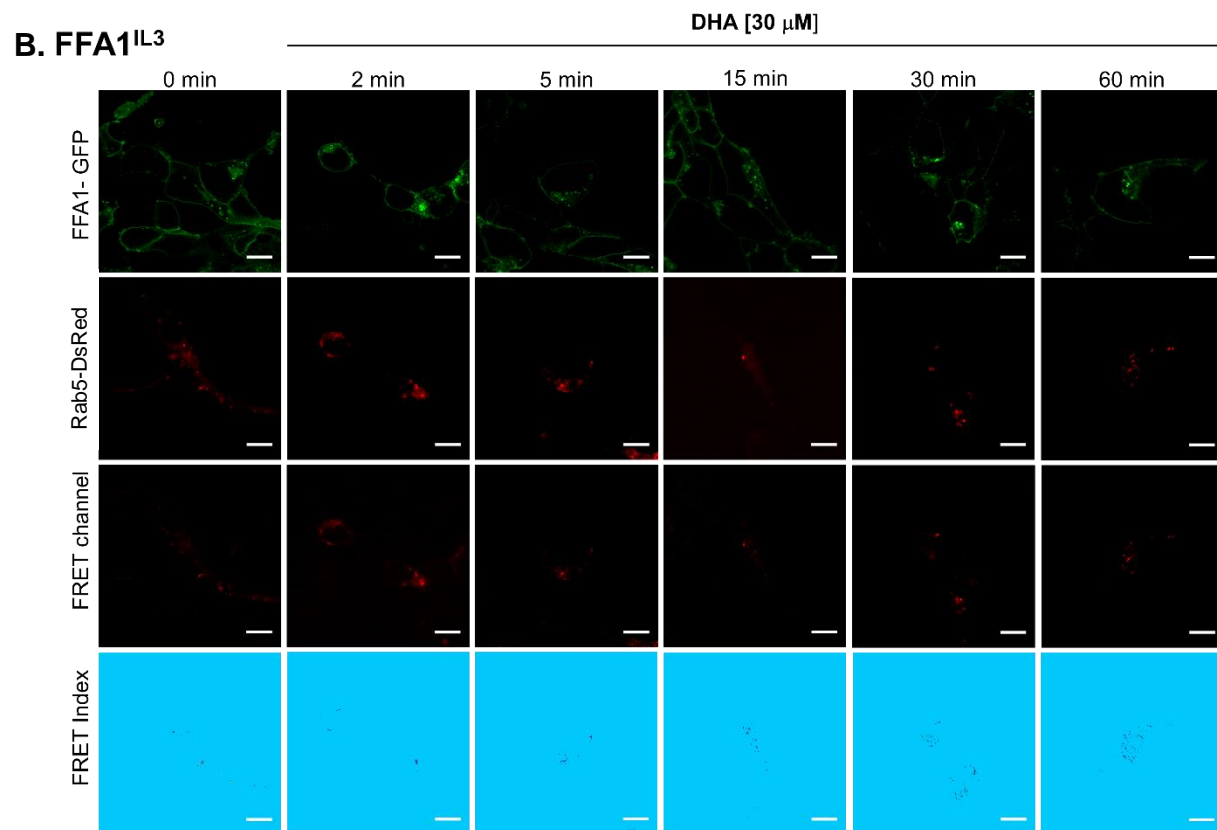
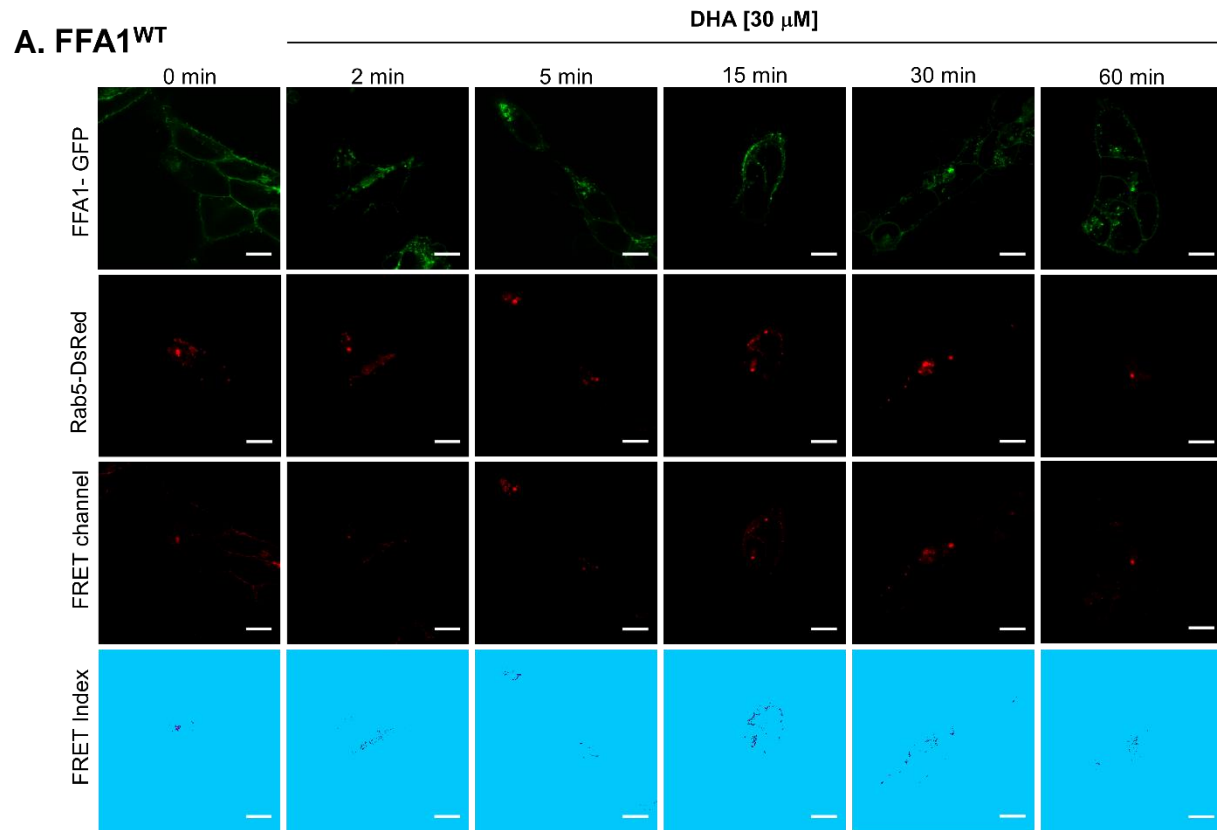


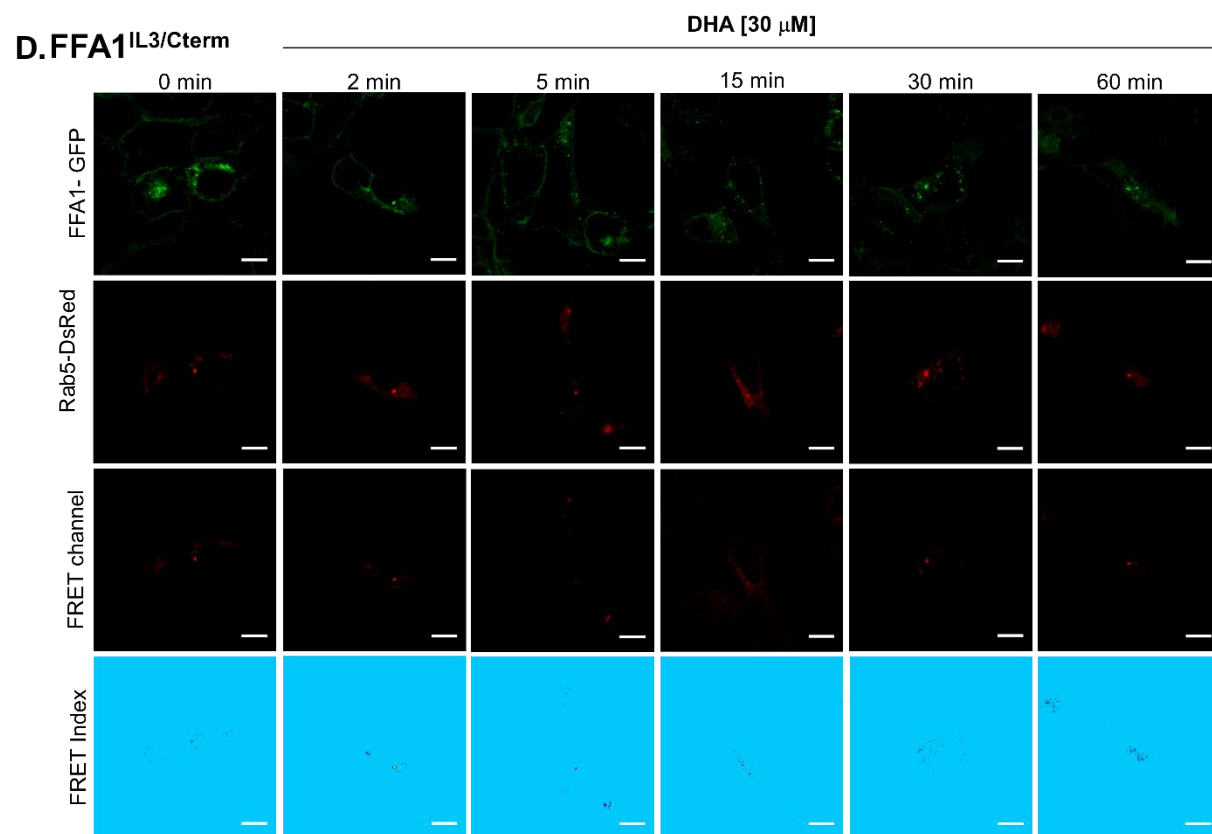
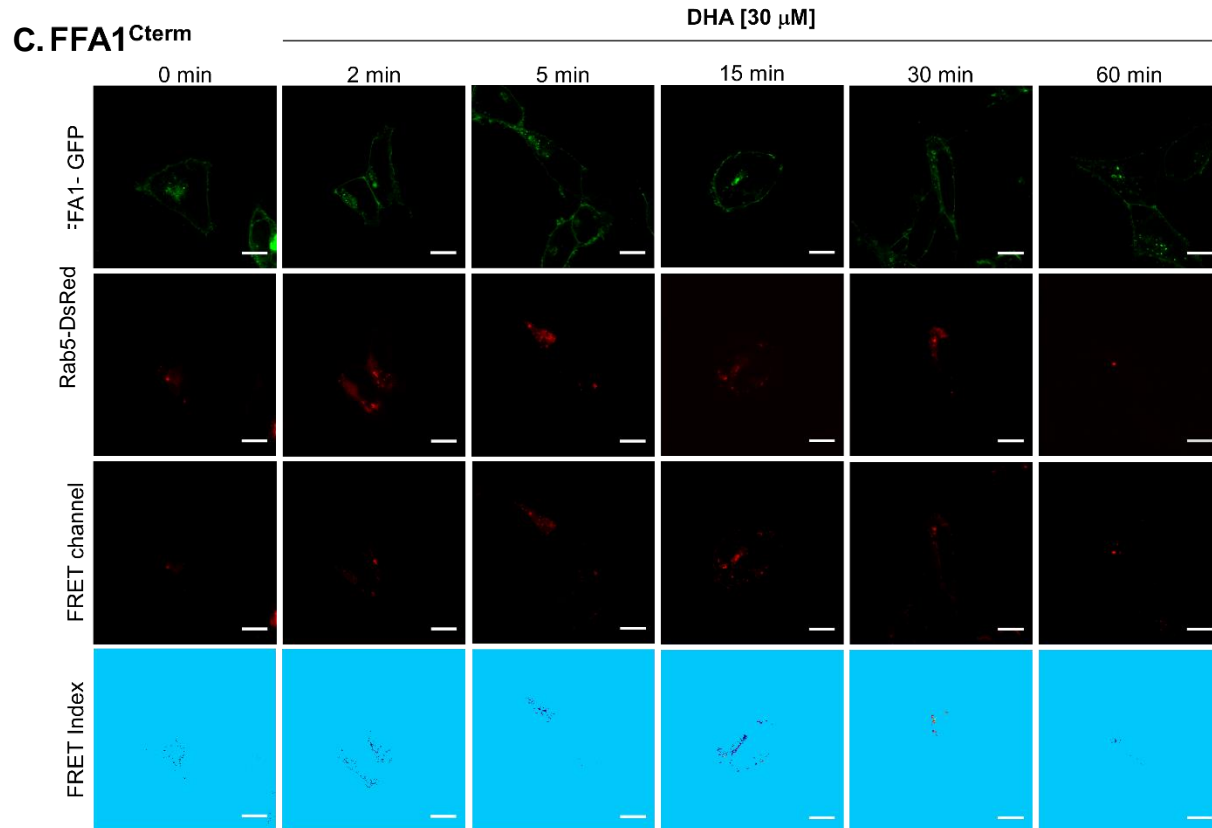
**D. FFA1<sup>IL3/C-term</sup>**



**Fig. S2. Imagenología de índice de FRET entre las variantes en sitios de fosforilación de FFA1-GFP y  $\beta$ -arrestina 2 en respuesta a PMA.**

Se realizó el análisis de FRET a partir de imágenes de microscopía confocal para evaluar la interacción de **(A)** FFA1<sup>WT</sup>, **(B)** FFA1<sup>IL3</sup>, **(C)** FFA1<sup>C-term</sup> y **(D)** FFA1<sup>IL3/C-term</sup> (GFP, verde) con  $\beta$ -arrestina 2 (mCherry, rojo), en el espacio celular; en respuesta a cursos temporales de estimulación con PMA [1  $\mu$ M]. En ambos casos se muestra para cada condición las imágenes originales obtenidas por microscopía confocal a 510 nm (GFP), 610 nm (mCherry y *FRET channel*), este último corresponde a la emisión capturada de mCherry cuando sólo está habilitado el láser de excitación de GFP a 485 nm. El canal *FRET index* comprende las imágenes resultantes del análisis de imagenología de FRET descrito en métodos. Las barras de escala corresponden a 10  $\mu$ m. Las imágenes son representativas de 4 experimentos realizados en los que se adquirió al menos 10 imágenes por condición.







**Fig. S3. Imagenología de índice de FRET entre las variantes en sitios de fosforilación de FFA1-GFP y Rab5-DsRed en respuesta a DHA.**

Se realizó el análisis de FRET a partir de imágenes de microscopía confocal para evaluar la interacción de **(A)** FFA1<sup>WT</sup>, **(B)** FFA1<sup>IL3</sup>, **(C)** FFA1<sup>C-term</sup> y **(D)** FFA1<sup>IL3/C-term</sup> (GFP, verde) con Rab5 (DsRed, rojo), en el espacio celular; en respuesta a cursos temporales de estimulación con DHA [30  $\mu$ M]. En ambos casos se muestra para cada condición las imágenes originales obtenidas por microscopía confocal a 510 nm (GFP), 610 nm (DsRed y *FRET channel*), este último corresponde a la emisión capturada de DsRed cuando sólo está habilitado el láser de excitación de GFP a 485 nm. El canal *FRET index* comprende las imágenes resultantes del análisis de imagenología de FRET descrito en métodos. Las barras de escala corresponden a 10  $\mu$ m. Las imágenes son representativas de 4 experimentos realizados en los que se adquirió al menos 10 imágenes por condición.