



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Tráfico vesicular del receptor de esfingosina-1-fosfato tipo 1 (S1P₁), durante la desensibilización homóloga y heteróloga”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Juan Carlos Martínez Morales

Tutor principal

Jesús Adolfo García-Sáinz

Instituto de Fisiología Celular

Miembros del comité tutor

Dra. Claudia González Espinosa

CINVESTAV

Dr. Fernando López Casillas

Instituto de Fisiología Celular

Ciudad de México. Febrero, 2017.



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.

Dedicatoria

A mis padres Hilaria Morales y Heladio Martínez por educarme y estar al pendiente de cualquier cosa día a día.

A mi hija Naomi por su inmenso amor, por los momentos de diversión maravillosos y por tu sonrisa hermosa.

A mis hermanos Maribel, Gregorio y José por compartir grandes momentos en esta vida.

A mi sobrina Isis por los momentos de diversión.

A mi novia Edith por hacer que conociera el amor, por ser mi amiga y estar siempre a mi lado.

A todos, gracias.

Reconocimientos

Esta tesis se realizó bajo la tutoría del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, en el Departamento de Biología Celular y Desarrollo, del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con financiamiento de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (IN200915) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (253156 y Fronteras 882).

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz (IFC, UNAM)

Dra. Claudia González Espinoza (CINVESTAV, IPN)

Dr. Fernando López Casillas (IFC, UNAM)

El jurado de examen de grado estuvo conformado por:

Presidente Dra. Chagoya Hazas Victoria Eugenia

Vocal Dr. Cifuentes Navarro Fredy Roberto

Vocal Dra. Maldonado Jiménez Perla Deyanira

Vocal Dra. Escalante Alcalde Diana María

Secretario Dra. Robles Flores Martha

Juan Carlos Martínez Morales fue alumno del programa de posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y fue apoyado con una beca de posgrado del CONACyT con número de CVU/Becario: **663139/576747** y por el Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado para la presentación de trabajos en congresos nacionales.

Durante el desarrollo del trabajo experimental se reconoce la asesoría técnica de la Dra. María Teresa Romero Ávila.

Durante el desarrollo del proyecto se reconoce la asesoría técnica en la generación del anticuerpo dirigido al receptor de S1P₁ por la Dra. Claudia González Espinosa, la Dra. María Teresa Romero Ávila y el Q.F.B. Alfredo Ibarra Sánchez.

Se utilizaron los servicios de lectura de membranas radiactivas que provee la Unidad de Biología Molecular y los servicios de microscopía de la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Agradecimientos

A mi madre Hilaria Morales y a mis hermanos José Alberto y Maribel que me acompañaron a lo largo de la maestría y me apoyaron de manera incondicional. A mi padre Heladio Martínez y a mi hermano Gregorio que a pesar de la distancia, nunca faltaron palabras de aliento en momentos difíciles durante la carrera. A mi novia quien me brinda palabras de ánimo, por su inmenso amor y por estar ahí en el momento y tiempos pertinentes.

Agradezco al Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, por brindarme la oportunidad de formar parte de su laboratorio y la confianza para poder desenvolverme en él, siendo una guía fundamental para la sistematización y aplicación del conocimiento. Su desempeño como tutor fue inigualable, gracias.

Agradezco a Tere, por tener el tiempo y la paciencia de instruirme durante cada experimento y por apoyarme en cada momento durante mi estancia en el laboratorio.

Agradezco a Rocío por su tiempo para ayudarme en cualquier duda referente al protocolo experimental, por las conversaciones de cada día.

Agradezco a todos mis compañeros del laboratorio 303-Sur. A Sócrates, David, Aldo, Marco, Alejandro, Gabriel, Gisele, Lupita y Aurelio por las horas de diversión y la compañía que me brindaron, gracias a todos por permitir que en el laboratorio exista un ambiente muy agradable de trabajo.

Agradezco al Dr. Fernando García Hernández por las horas de diversión y por su apoyo en la impresión de reporte de tutorial.

Agradezco a los miembros de mi jurado de examen de grado. A la Dra. Chagoya Hazas Victoria Eugenia, al Dr. Cifuentes Navarro Fredy Roberto, a la Dra. Maldonado Jiménez Perla Deyanira, a la Dra. Escalante Alcalde Diana María y a la Dra. Robles Flores Martha por las sugerencias y observaciones acertadas en esta tesis.

Índice general

Dedicatoria	I
Reconocimientos	II
Agradecimientos	III
Índice de figuras y tablas	VI
Abreviaturas	VII
Resumen	VIII
Abstract	IX
1. Introducción	
1.1. Transducción de señales	2
1.2. Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)	3
1.3. Regulación de GPCRs	5
1.4. Las GTPasas Rab	6
1.5. El receptor de esfingosina -1-fosfato tipo 1 (S1P ₁)	7
1.6. El receptor S1P ₁ y la esclerosis múltiple	9
1.7. El lípido bioactivo esfingosina- 1- fosfato (S1P)	10
1.8. Señalización activada por S1P	13
2. Planteamiento del problema	17
3. Objetivos	
3.1. Objetivos	19
4. Materiales y métodos	
4.1. Materiales	21
4.2. Cultivo celular	21
4.3. Transfecciones celulares	21
4.4. Cuantificación de la concentración de calcio libre intracelular ([Ca ²⁺] _i)	22
4.5. Ensayos de fosforilación	22
4.6. Microscopia confocal	23
4.7. Análisis de imágenes utilizando el software ImageJ	23
4.8. Análisis estadístico y presentación de resultados	24
5. Resultados y discusión	
5.1. Caracterización funcional del receptor de esfingosina-1-fosfato tipo 1 (S1P ₁)	26
5.2. Asociación del receptor de S1P ₁ a proteínas Rab durante la desensibilización homóloga y heteróloga	27

5.3. Efectos de S1P y el forbol miristoil acetato (PMA) y FTY720-P en la fosforilación del receptor de S1P ₁	30
6. Conclusiones y perspectivas.....	42
Soluciones utilizadas.....	43
Referencias.....	48

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Cuatro características de los sistemas de transducción de señales.	2
Figura 2. Estructura general de un GPCR.	3
Figura 3. Patrones de señalización activados por diferentes tipos de proteínas G.	5
Figura 4. Proceso de desensibilización homóloga y heteróloga.	6
Figura 5. Mapa de localización intracelular de diferentes GTPasas Rab.	7
Figura 6. Esquema del receptor de S1P ₁	8
Figura 7. Modelo propuesto para el papel del receptor de S1P ₁ en la esclerosis múltiple.	10
Figura 8. Fingolimod fosfato y esfingosina-1-fosfato.	10
Figura 9. Estructura de la esfingomielina.	11
Figura 10. Síntesis de esfingosina-1-fosfato (S1P)	13
Figura 11. Los esfingolípidos actúan como segundos mensajeros.	13
Figura 12. Efecto de esfingosina-1-fosfato (S1P) y FTY720-P en la concentración intracelular de calcio	26
Figura 13. Receptor de S1P ₁ y su internalización.	28
Figura 14. Asociación del receptor de S1P ₁ y las proteínas Rab5 y Rab9.	33
Figura 15. Asociación del receptor de S1P ₁ y las proteínas Rab5 y Rab7.	35
Figura 16. Asociación del receptor de S1P ₁ y las proteínas Rab5 y Rab9.	37
Figura 17. FRET INDEX del receptor de S1P ₁ con las proteínas Rab5, Rab9 y Rab7.	38
Figura 18. Efecto de esfingosin-1-fosfato (S1P) y el forbol miristoil acetato (PMA) en la fosforilación del receptor S1P ₁	39
Figura 19. Efecto de esfingosina-1-fosfato (S1P) y FTY720-P en la fosforilación del receptor S1P ₁	40
Figura 20. Modelo de tráfico vesicular del receptor de S1P ₁ durante la desensibilización homóloga y heteróloga.	43
Figura 21. Modelo de tráfico vesicular del receptor de S1P ₁ por FTY720-P.	44
Tabla I. Expresión de los receptores de S1P y vías de señalización.	15

Abreviaturas

CerS: Ceramida sintasa
cm: centímetros
DAG: Diacil glicerol
EM: Esclerosis múltiple
FRET: Transferencia de Energía de Resonancia de Förster
FTY720-P:FTY720 fosforilado
G418: Geneticina
GAP: Proteínas activadoras de GTPasas
GDP: Guanosín difosfato
GEF: Factores de intercambio de nucleótidos de guanina
GFP: Proteína verde fluorescente
GPCR: Receptor acoplado a proteína G
GRK: cinasas de receptores acoplados a proteínas G
GSI: Inhibidores de la disociación del GDP
GTP: Guanosín trifosfato
IP₃: Inositol 1, 4, 5 trifosfato
nm: nanómetro
PBS: Buffer de fosfatos salino
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PIP2: Fosfatidilinositol 4, 5 bifosfato
PKA: Proteína cinasa A
PKC: Proteína cinasa C
PLC: Fosfolipasa C
PMA: Forbol miristoil acetato
rpm: revoluciones por minuto
S1P: Esfingosina-1-fosfato
S1P₁: Receptor de esfingosina-1-fosfato tipo 1
SFB: Suero fetal bovino
SMasa: Esfingomielinasa
TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α
[Ca²⁺]_i: Cuantificación de la concentración de calcio intracelular

Resumen

El receptor $S1P_1$ es un GPCR que se caracteriza por poseer siete dominios transmembranales y regula muchas de las acciones de la esfingosina-1-fosfato (S1P). Este esfingolípido bioactivo actúa a nivel de células, tejidos y organismos individuales, además modula la proliferación, promueve la supervivencia y el tráfico vesicular entre muchos otros efectos celulares. También participa en procesos patológicos como la fibrosis, el cáncer y la esclerosis múltiple (EM). El receptor $S1P_1$ se expresa en las superficies de los linfocitos y es importante para regular la egresión de los ganglios linfáticos. La EM es una enfermedad crónica autoinmune y neurodegenerativa del sistema nervioso central (SNC) asociada con progresión irreversible y discapacidad. El Fingolimod (FTY720-P) inicialmente activa los receptores $S1P_1$ de linfocitos y posteriormente induce la regulación negativa de $S1P_1$ que impide la salida de los linfocitos de los tejidos linfoides, reduciendo de este modo la infiltración de linfocitos autoagresivos en el SNC. La internalización de los receptores acoplados a proteínas G puede ser desencadenada por agonistas o por otros estímulos. Las proteínas Rab son GTPasas que controlan la endocitosis, el tráfico vesicular y la fusión endosomal. En la vía endocítica, Rab 5 controla el tráfico de la membrana plasmática a los endosomas tempranos. Además, Rab 7 y Rab 9 regulan el tráfico de endosomas tardíos a lisosomas y el reciclaje al trans-Golgi.

Se sabe que la S1P, el PMA y el FTY720-P fosforilan al receptor de $S1P_1$. Sin embargo, los estudios centrados en el tráfico vesicular del receptor activado por la S1P, el FTY720-P y el PMA son muy limitados. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la cinética de la fosforilación y el tráfico vesicular de los receptores $S1P_1$. Hemos encontrado que la S1P es más potente y eficaz que el FTY720-P al medir la elevación de la concentración de calcio intracelular. Adicionalmente, encontramos una cinética de fosforilación diferencial del receptor sobre la activación de S1P en comparación con FTY720-P. Además, se observó que cuando el receptor $S1P_1$ se activa con S1P y PMA, el receptor interactuaba con proteínas presentes en endosomas tempranos, tales como Rab5 y con marcadores de endosomas tardíos, tales como Rab 9, pero no con Rab7. Al activar el receptor con FTY720-P, el receptor interactúa con Rab5 y con marcadores de endosomas tardíos, tales como Rab 7, pero no Rab9.

ABSTRACT

S1P₁ receptor is a seven transmembrane-spanning protein that mediates many of the actions of sphingosine 1-phosphate (S1P). This bioactive sphingolipid induces a plethora of actions at the levels of individual cells, tissues and organisms and modulates proliferation, promotes survival, and vesicular trafficking among many other cellular effects. It is also involved in pathological processes such as fibrosis, cancer and multiple sclerosis (MS). S1P₁ receptor is expressed on the surfaces of lymphocytes and is important in regulating egression from lymph nodes. MS is a chronic autoimmune and neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS) associated with irreversible progression and disability. Fingolimod (FTY720-P) initially activates lymphocyte S1P₁ receptors and subsequently induces S1P₁ down-regulation that prevents lymphocyte egress from lymphoid tissues, thereby reducing autoaggressive lymphocyte infiltration into the CNS.

Internalization of G protein-coupled receptors can be triggered by agonists or by other stimuli. The Rab GTPase family controls endocytosis, vesicular trafficking, and endosomal fusion. In the endocytic pathway, Rab 5 controls traffic from the plasma membrane to early endosomes. Moreover, Rab 7 and Rab 9 regulate the traffic from late endosomes to lysosomes and recycling to the trans-Golgi.

It is known that S1P, PMA and FTY720-P phosphorylate S1P₁. Nevertheless, studies focused on the receptor vesicular traffic elicited by S1P, PMA and FTY720-P are very limited. Therefore, the objective of this work was to characterize the kinetics of phosphorylation and vesicular traffic of S1P₁ receptors. We found S1P is more potent and effective than FTY720-P when measuring in elevating intracellular calcium concentration. Additionally, we found a differential receptor phosphorylation kinetics upon S1P activation as compared to FTY720-P. Furthermore it was observed that, when S1P₁ receptor was stimulated with S1P and PMA, the receptor interacted with proteins present in early endosomes, such Rab5 and with late endosome markers, such as Rab 9, but not Rab7. Upon FTY720-P, the receptor interacted with Rab5 and with late endosome markers, such as Rab 7, but not Rab9.

Introducción

1.1. Transducción de señales

En organismos multicelulares, las células que conforman tejidos especializados funcionan en forma coordinada por medio de numerosos mecanismos finamente regulados. Muchos de estos mecanismos dependen de la comunicación entre las células. Esta comunicación se produce cuando ciertas células emiten un “mensaje” a través de señales químicas que ejercen su efecto en otras células y éstas, como consecuencia, inician una respuesta biológica. Las respuestas son muy variadas: transformaciones morfológicas, modificación en rutas metabólicas o cambios en la expresión de ciertos genes que llevan a la división, a la diferenciación e incluso a la muerte celular (Curtis *et al.*, 2008). Las señales pueden ser autocrinas (actúan sobre la misma célula que las ha producido), paracrinas (actúan sobre células vecinas) y endocrinas (la señal es transportada a través del torrente sanguíneo hasta la célula diana distante) (Nelson & Cox, 2008).

Los sistemas de transducción de señales se caracterizan por ser **a) específicos**, debido a la complementariedad molecular entre la señal y el receptor; esta complementariedad se establece por interacciones no covalentes (figura 1a), **b) la amplificación** por cascadas enzimáticas tiene lugar cuando una enzima asociada a un receptor se activa y a su vez, cataliza la activación de muchas moléculas de una tercera enzima y así sucesivamente (figura 1b), **c) desensibilización** del sistema de receptor provocando una menor sensibilidad de la señal para el receptor, (figura 1c) y la **d) integración** que es la capacidad de la célula para recibir múltiples señales y producir una respuesta unificada apropiada de acuerdo a las condiciones fisiológicas en las que se encuentre (figura 1d) (Nelson & Cox, 2008).

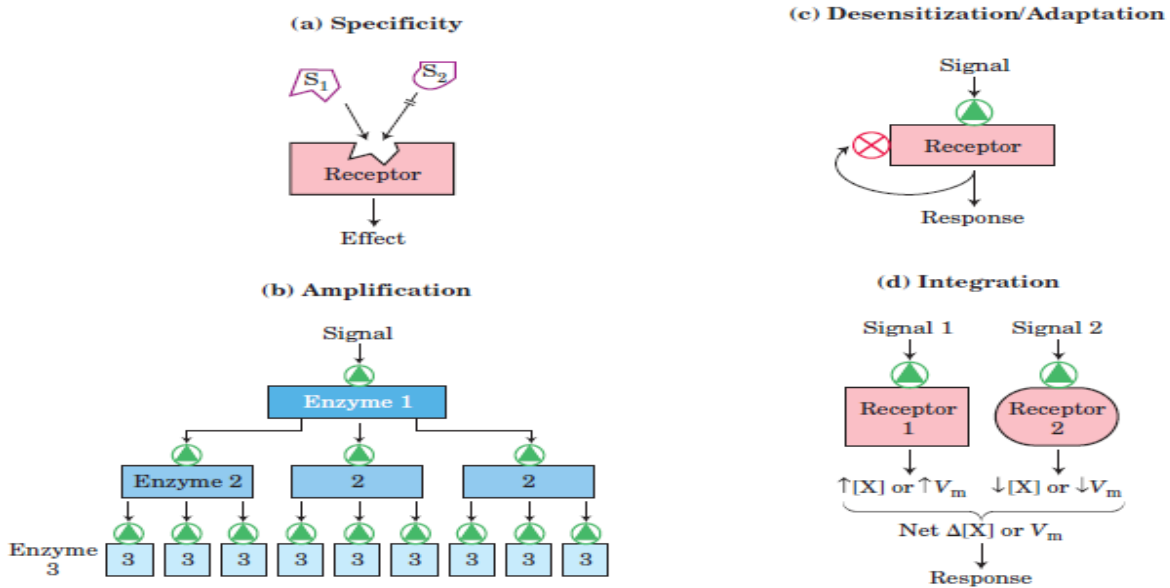


Figura 1. Cuatro características de los sistemas de transducción de señales. (a) Especificidad es la complementariedad del ligando y el receptor. (b) Amplificación ocurre cuando una enzima asociada a un receptor se activa y a su vez, cataliza la activación de muchas moléculas de una tercera enzima. (c) La activación del receptor genera mecanismos que desensibilización permitiendo que el receptor sea internalizado en la célula y (d) Integración que es la capacidad de la célula para recibir múltiples señales y producir una respuesta unificada (Imagen tomada de Nelson & Cox, 2008).

1.2. Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, por sus siglas en inglés) se caracterizan por tener 7 dominios transmembranales en forma de hélices α con aproximadamente 22 a 28 residuos de aminoácidos; estos dominios se conectan por asas intra y extracelulares, el extremo amino terminal (NH_2) se encuentra del lado extracelular (generalmente glucosilado) y el carboxilo terminal (COOH) se ubica del lado intracelular (figura 2) (Bahouth *et al.*, 1991).

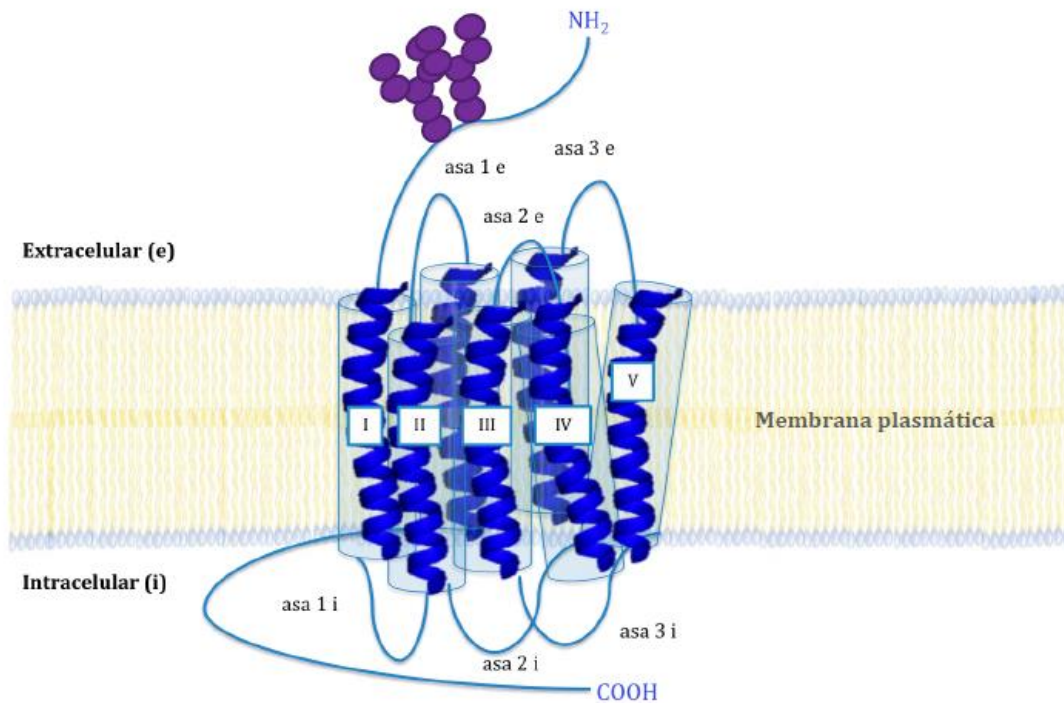


Figura 2. Estructura general de un GPCR. En azul oscuro se muestran los 7 dominios transmembranales (números romanos) en forma de hélice α . El NH_2 se encuentra en el lado extracelular y generalmente está glucosilado (círculos morados) y el COOH se ubica en el lado intracelular (Imagen modificada de Morris & Malbon, 1999).

La conformación activa del receptor permite la unión de proteínas G heterotriméricas que se caracterizan por un estado basal, donde el dímero β/γ está asociado a la subunidad α unido a un GDP. Al interactuar la proteína G heterotrimérica y el receptor se promueve el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α , permitiendo la disociación del dímero β/γ . La subunidad α activa o reprime la actividad de proteínas efectoras que modulan enzimas y canales iónicos generando segundos mensajeros obteniendo una respuesta celular (Wettschureck & Offermanns, 2005). La subunidad α tiene un dominio de GTPasa que le permite hidrolizar al GTP, causando su propia inactivación y su reasociación con el dímero β/γ , reconstituyendo la proteína G inactiva (Kleuss *et al.*, 1994).

De manera general las proteínas G se clasifican de acuerdo a su subunidad α , que está definida por su similitud en secuencia de aminoácidos (Neer, 1994). Existen 4 clases de proteínas G, denominadas como *s*, *q*, *12/13* e *i* (figura 3).

Clase $G\alpha_s$: Incluye a $G\alpha_s$ y $G\alpha_{olf}$ con un 88% de identidad (Morris & Malbon, 1999). Esta clase de proteína G se caracteriza por la activación de la Adenilato Ciclasa (AC) que genera adenosín monofosfato cíclico (AMPC) a partir de adenosín trifosfato (ATP). El AMPC actúa como segundo mensajero regulando la actividad de la proteína cinasa A (PKA). La forma inactiva de la PKA contiene 2 subunidades catalíticas y 2 subunidades regulatorias. Cuando 4 moléculas de AMPC se une a las subunidades regulatorias, sufren un cambio conformacional y se disocia la PKA activa (2 subunidades catalíticas) (Nelson y Cox, 2008; Neer, 1994).

Clase $G\alpha_q$: Incluye a $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$ y $G\alpha_{16}$. Esta clase de proteína G se caracteriza por capacidad de activar a la fosfolipasa C (PLC, por sus siglas en inglés), que cataliza la formación de dos segundos mensajeros: diacil glicerol (DAG) e inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP_3) a partir del fosfatidilinositol 4, 5 bifosfato (PIP2). El IP_3 difunde de la membrana plasmática al retículo endoplásmico y se une a receptores específicos para IP_3 causando la liberación de Ca^{2+} al citosol. El Ca^{2+} y el DAG activan a la proteína cinasa C (PKC) (Nelson y Cox, 2008).

Clase $G\alpha_{12/13}$: Incluye a $G\alpha_{12}$ y $G\alpha_{13}$. Esta clase de proteínas G se caracterizan por ser activadas mediante receptores que activan a proteínas $G\alpha_q$ (Wetschureck & Offermanns, 2005) y están involucradas en la remodelación del citoesqueleto, por la activación de GTPasas como Rho y Rac1 (Malbon, 2005).

Clase $G\alpha_i$: Incluye a $G\alpha_{i-12}$, $G\alpha_{i-2}$, $G\alpha_{i-3}$ y $G\alpha_o$. Esta clase de proteína G se caracteriza por inhibir a la AC (Sunahara *et al.*, 1996) y activar a la PLC y PI3K a través del dímero β/γ (Dongun *et al.*, 1993). La función de los miembros de esta clase han sido estudiados usando la toxina pertussis de la *Bordetella pertussis*, debido a que tienen un residuo de cisteína que es ADP-ribosilado en el COOH terminal por dicha toxina (García-Sáinz, 1981).

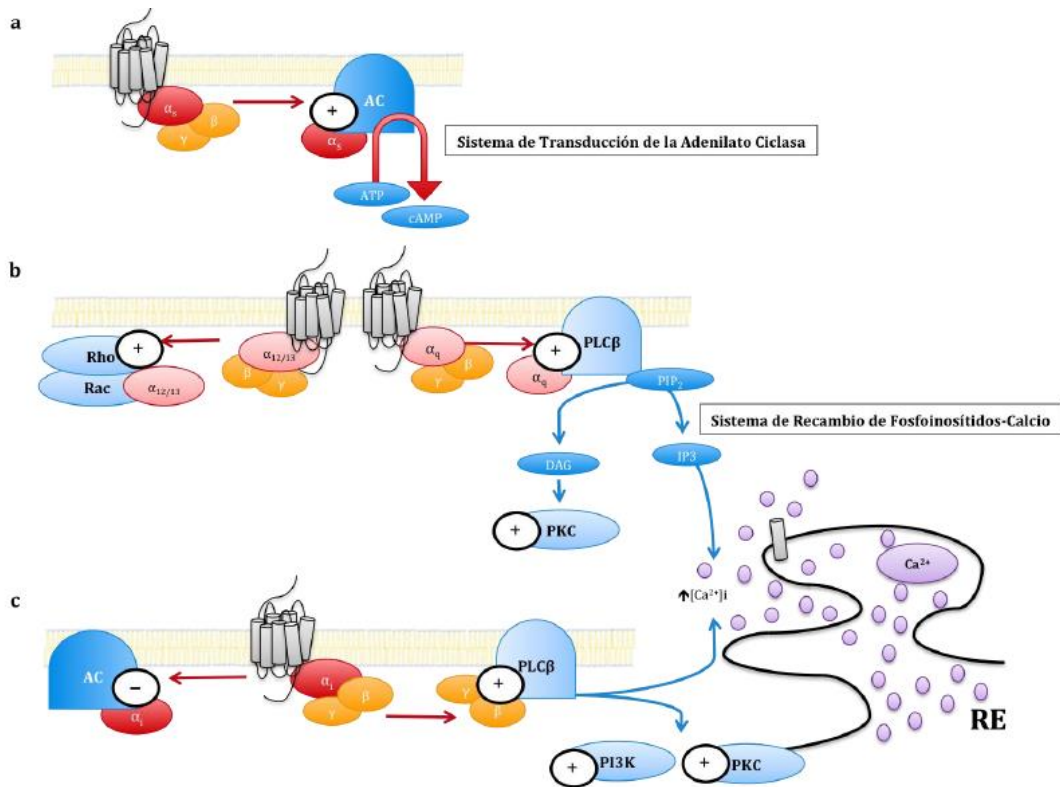


Figura 3. Patrones de señalización activados por diferentes tipos de proteínas G. (a) El principal efector de la señalización de G_{α_s} es la Adenilato Ciclasa (AC). (b) El principal efector de la señalización de G_{α_q} es la activación de la fosfolipasa C (PLC) que genera diacilglicerol (DAG) el cual activa a la PKC e IP $_3$ que promueve la apertura de canales dependientes de IP liberando Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE). Mientras que las proteínas $G_{\alpha_{12/13}}$ activa a Rho y Rac1. (c) La proteína G_{α_i} inhibe a la AC a través de la subunidad α y activa a PLC y PI3K a través del dímero β/γ (Imagen creada de Wettschurck & Offermanns, 2005).

1.3. Regulación de GPCRs

La actividad de un GPCR es el resultado del balance coordinado entre los mecanismos que regulan los procesos de señalización, desensibilización y resensibilización. La desensibilización es la atenuación o desaparición con el tiempo de la respuesta del GPCR al agonista (Hausdorff *et al.*, 1990) y representa un importante mecanismo de autorregulación. Existe un proceso de desensibilización, que se debe a la fosforilación de la proteína receptora provocada por la activación del propio receptor (desensibilización homóloga) y fosforilación del receptor provocada por la activación de otros receptores (desensibilización heteróloga) (Kelli *et al.*, 2008). La fosforilación de GPCRs puede deberse a la activación de:

- Cinasas específicas cuyo único sustrato es el GPCR activado por agonistas (desensibilización homóloga), y se llaman cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs, por sus siglas en inglés), la fosforilación ocurre en residuos de aminoácidos de serina y treonina de la tercera asa intracelular y en el COOH terminal (figura 4a) (Lohse *et al.*, 1990).

b) Cinasas dependientes de segundos mensajeros (por ejemplo, PKA y PKC) que pueden ser activadas por estímulos producidos por ligandos sobre otros receptores (desensibilización heteróloga), donde la fosforilación altera la conformación del receptor y su afinidad por la proteína G (figura 4b) (Benovic *et al.*, 1985).

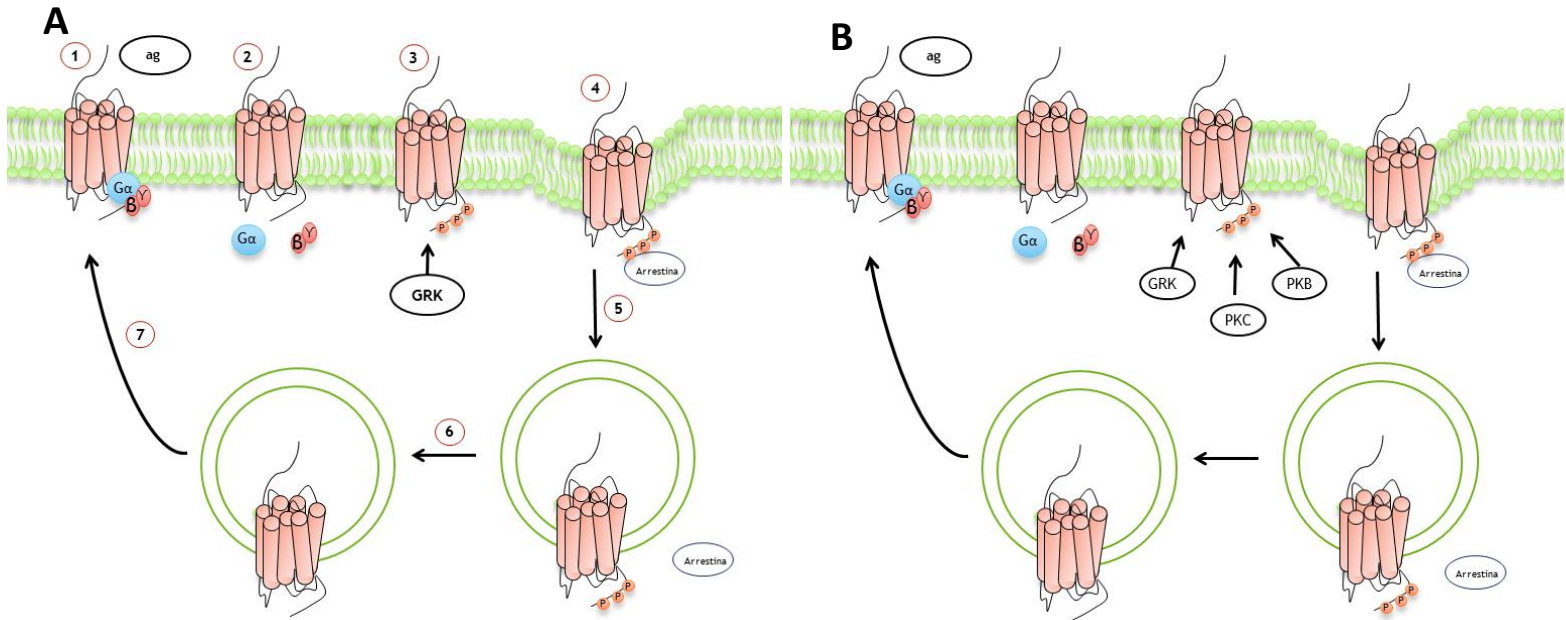


Figura 4. Proceso de desensibilización homóloga y heteróloga. (a) En la desensibilización homóloga el receptor es (1) activado por el agonista (ag) (2) provocando el acoplamiento a la proteína G y la (3) fosforilación por la GRK. La (4) arrestina se une a los sitios fosforilados provocando la desensibilización del receptor, (5) internalización, (6) re-sensibilización por el desacoplamiento de la arrestina, el ligando y la desfosforilación, por último (7) es reciclado a la membrana. (b) En la desensibilización heteróloga se activan PKB y PKC por segundos mensajeros. Estas cinasas (1) fosforilan al receptor no permitiendo la unión de la proteína G. (2) GRK y (3) proteínas reguladoras pueden ser activadas por PKC y regular al receptor (Imagen tomada y modificada de Kelli *et al.*, 2008).

La activación del GPCR por el ligando origina la fosforilación por parte de la GRK, esto facilita la unión de las β -arrestinas que reclutan el complejo de clatrina y AP-2 permitiendo que se fije el GPCR a las vesículas cubiertas de clatrina. Posteriormente, los GPCR incluidos en estas vesículas son internados en la célula donde se pueden sufrir procesos como la degradación en los lisosomas (regulación a la baja) o mantenimiento en los endosomas para su posterior reciclamiento a la membrana plasmática y recuperación de su función (resensibilización) (Voet & Voet, 2006).

1.4. Las GTPasas Rab

Las proteínas Rab son un subgrupo de la familia de las GTPasas Ras y están involucradas en múltiples etapas del tráfico vesicular. Al igual que los miembros de la familia Ras, las proteínas Rab tienen actividad de GTPasa y están reguladas por factores de intercambio de nucleótidos de

guanina (GEF's, por sus siglas en inglés) que regulan el intercambio del GDP por GTP, por las proteínas activadoras de GTPasas (GAP's, por sus siglas en inglés) que aceleran la tasa intrínseca de la hidrólisis de GTP a GDP, e inhibidores de la disociación del GDP (GDI's, por sus siglas en inglés). La adición de dos grupos geranilo en el COOH terminal les permite asociarse estrechamente a las membranas celulares (Googy *et al.*, 2005).

Se han identificado 60 proteínas Rab y cada una regula diferentes etapas del transporte intracelular en endocitosis, tráfico vesicular y exocitosis, esto se refleja en su distribución en la membrana de diferentes organelos celulares (figura 5) (Jordens *et al.*, 2005).

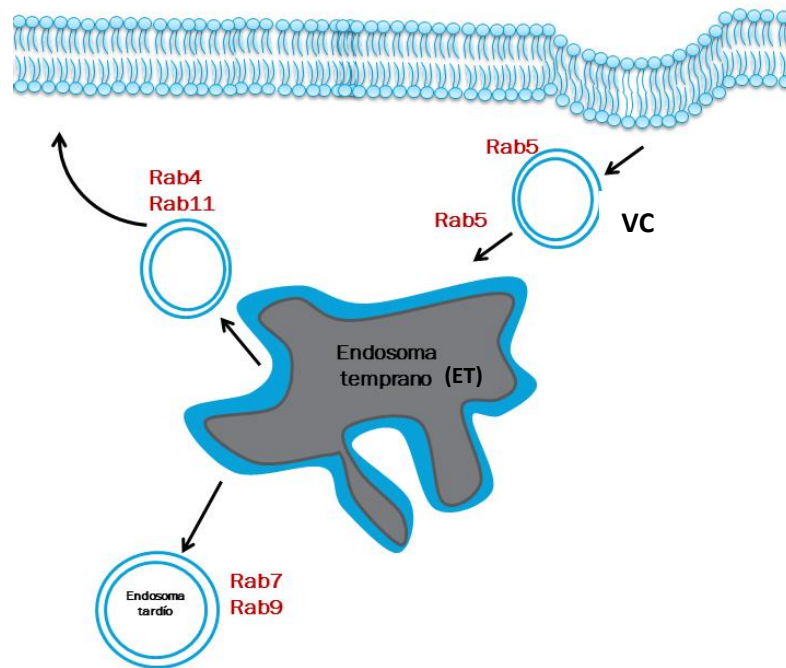


Figura 5. Mapa de localización intracelular de diferentes GTPasas Rab. Las flechas indican la dirección del transporte entre los compartimentos celulares. Rab5 controla la formación de las vesículas cubiertas de clatrina (VC), la endocitosis de VC, fusión de VC con endosomas tempranos (ET) y fusión "homotípica" entre ET y endosomas tardíos. Rab9 y Rab7 se encuentran en endosomas tardíos (Imagen tomada de Castillo, 2014).

1.5. El receptor de esfingosina-1-fosfato tipo 1 (S1P₁)

El receptor de S1P₁ fue descubierto en 1990 por Timothy Hla y colaboradores al caracterizar un receptor huérfano que se expresaba cuando se inducía la diferenciación endotelial con forbol miristrato acetato (PMA, por sus siglas en inglés), debido a esto en un principio al receptor se le denominó Gen de Diferenciación Endotelial 1 (EDG-1, por sus siglas en inglés) (Hla & Maciag, 1990), con el paso del tiempo adquirió el nombre de S1P₁ (Watterson *et al.*, 2001).

El receptor de S1P₁ tiene un tamaño de 380 residuos de aminoácidos, de los cuales 46 corresponden al NH₂ terminal y 68 al COOH terminal (figura 9). En el NH₂ terminal encontramos los aminoácidos N30 y N36 que son sustratos de N-glucosilación y la Y19 y Y22 que presentan

sulfatación y están implicadas en la afinidad por el ligando (figura 9) (Fieger *et al.*, 2005). Presenta 7 dominios hidrofóbicos compuesto entre 20-26 aminoácidos y 8 dominios hidrofílicos compuestos entre 7-33 aminoácidos. En el COOH presenta las C328, C329 y C331 que son susceptibles a palmitoilación, una modificación postraduccional importante para el anclaje de proteínas a la membrana (figura 9) (Ohno *et al.*, 2009), los residuos K330, K339, K341 y K354 son susceptibles a poliubiquitinación y los residuos de S351, S352 y S355 son fosforilados en presencia de FTY720P (un agonista del receptor S1P₁ utilizado como tratamiento en la esclerosis múltiple) (figura 9) (Oo *et al.*, 2011), la Y143 también se fosforila en presencia de S1P y es necesaria para la internalización del receptor (Chavez *et al.*, 2015), la T236 se fosforila por PKB/Akt regulando la activación de la proteína G pequeña Rac que está involucrada en procesos como la quimiotaxis y angiogénesis (figura 9) (Lee *et al.*, 2001; Spiegel & Milstein, 2002), por último los residuos T371, S374 y S375 son fosforilados por GRK2 y regulan el tráfico de linfocitos al torrente sanguíneo (Arnon *et al.*, 2011).

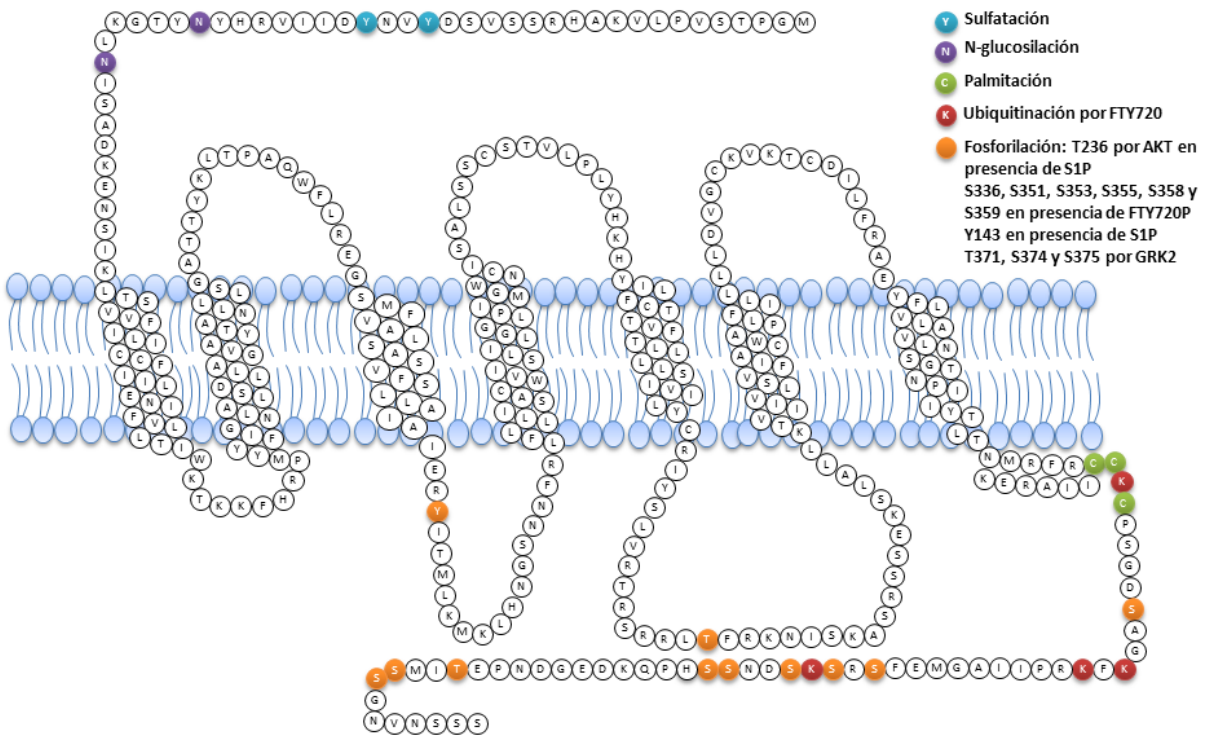


Figura 6. Esquema del receptor de S1P₁. Se representan las modificaciones postraduccionales reportadas para el receptor de S1P₁. El círculo color azul ejemplifica la sulfatación, el morado la N-glucosilación, el verde la palmitoilación, el rojo la ubiquitinación y el naranja la fosforilación.

1.6. El receptor S1P₁ y la esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune del sistema nervioso central y se caracteriza por una inflamación que provoca astrogliosis, desmielinización y pérdida de oligodendrocitos y neuronas (Compston & Coles, 2002). En la patofisiología de la EM son afectadas las células dendríticas inmaduras quienes son los actores centrales en la respuesta inmune innata y están involucradas en el mantenimiento de la tolerancia inmunitaria periférica. En pacientes con EM las células dendríticas presentan un antígeno (célula dendrítica madura) y la tolerancia inmunitaria está parcialmente perdida, esto favorece la expansión clonal de linfocitos T en los ganglios linfáticos. La naturaleza del antígeno, las señales estimuladoras y las citoquinas en los ganglios linfáticos dirige la diferenciación de las células T nativas en linfocitos T ayudadores 1, 2 y 17, linfocitos T reguladores y linfocitos T citotóxicos. Estas células inmunitarias entran al torrente sanguíneo, penetran la barrera hematoencefálica e invaden el sistema nervioso central (SNC). Se reactivan, se expanden clonalmente y se diferencian en células presentadoras de antígeno. La presencia de linfocitos T ayudadores 1 y 17, linfocitos T citotóxicos y células B en el SNC junto con los astrocitos y microglia anormalmente activados, conducen a un aumento de la producción de citoquinas inflamatorias, especies reactivas de oxígeno, producción de anticuerpos y la citotoxicidad directa, que están involucrados en la desmielinización, el daño axonal y neuronal que está presente en los pacientes con EM (Brinkmann *et al.*, 2010).

Como se mencionó anteriormente el receptor de S1P₁ está distribuido en células del sistema nervioso (tabla I) y se ha propuesto que los linfocitos T de memoria central (T_{CM}), salen del nodo linfático hacia el torrente sanguíneo por la expresión del receptor de S1P₁ y penetran la barrera hematoencefálica invadiendo el SNC (Matloubian *et al.*, 2004). En el SNC, las células T_{CM} se reactivan por el antígeno presentado en la microglía y células dendríticas causando proliferación y diferenciación local de células T efectoras (T_E) y probablemente células efectoras de la memoria (T_{EM}) (Kivisakk *et al.*, 2004). Las células T_E activan los astrocitos por la interleucina-17 (IL-17) (Kang *et al.*, 2010), destruyen células neuronales y secretan citocinas inflamatorias que activan a las SPHK's (Chalfant & Spiegel, 2005). Esto aumenta la producción de S1P, que es el agonista de los receptores de S1P y aumentan la neuroinflamación y gliosis (figura 10) (Nayak *et al.*, 2010).

Estudios recientes proponen que el receptor de S1P₁ al ser estimulado por la S1P y el FTY720-P se internaliza rápidamente por la ruta canónica de desensibilización de GPCRs. Al activar al S1P₁ por la S1P y el FTY720-P facilita la unión de las β-arrestinas tipo 2 que reclutan el complejo de clatrina y AP-2 permitiendo que se fije el receptor de S1P₁ a las vesículas cubiertas de clatrina (Reeves *et al.*, 2015).

1.7. El lípido bioactivo esfingosina- 1- fosfato (S1P)

Los lípidos no solo son los componentes principales de las membranas celulares, también se consideran como compuestos bioactivos al servir como mensajeros intracelulares. Los esfingolípidos son lípidos bioactivos que actúan como agonistas de GPCRs. Están involucrados en cascadas de transducción de señales que regulan procesos importantes como el crecimiento, la migración, la diferenciación y la muerte celular (Schuchardt *et al.*, 2011). Los esfingolípidos actúan de dos maneras como moléculas bioactivas, se consideran como segundos mensajeros en la transducción de señales extracelulares y regulan la dinámica de las membranas celulares siendo una estructura fundamental en las balsas lipídicas (Nelson y Cox, 2008). Actualmente se conoce que muchos procesos fisiológicos y patológicos son regulados por esfingolípidos y diversos estudios se han centrado en comprender el papel de la esfingosina-1-fosfato en dichos eventos celulares (Schuchardt *et al.*, 2011).

Se conocen más de 300 esfingolípidos diferentes (Merrill *et al.*, 1993). Los esfingolípidos están formados por tres motivos estructurales principales: un amino alcohol de cadena larga (comúnmente la esfingosina), un ácido graso de longitud variable unido al grupo amino que está anclado al carbono 2 del amino alcohol y diversas cabezas polares unidas al hidroxilo del carbono 1. En particular para la esfingomielina, su grupo hidrofílico es la fosfocolina. El ácido graso de 2-28 carbonos unido a la esfingosina forma la ceramida (figura 6) (Futerman & Hannun, 2004).

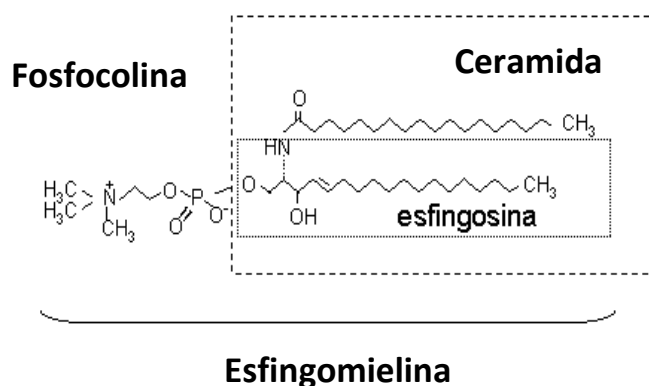


Figura 9. Estructura de la esfingomielina. La esfingomielina está constituida por una ceramida formada por la esfingosina como base de cadena larga y un ácido graso de longitud variable. La fosfocolina se considera como la cabeza polar (Imagen modificada de Voet & Voet, 2006).

La producción de esfingolípidos es compleja y representa una degradación reversible de la esfingomielina. Para la biosíntesis de la esfingosina-1-fosfato (S1P), el catabolismo de la ceramida es necesario ya que es la base estructural de los esfingolípidos. La ceramida puede ser obtenida a partir de la esfingomielina por su hidrólisis por la esfingomielinasa (SMasa) que genera ceramida y fosfocolina (figura 6) (Obinata & Hla, 2012).

Los sustratos iniciales para la síntesis de *novo* de la ceramida son una serina y una palmitoil coenzima A que se condensan por la serinpalmitoiltransferasa (SPT) formando una molécula de esfinganina. Posteriormente la ceramida sintasa (CerS) promueve la N-acilación de la esfinganina para generar dihidroceramida que es desaturada por la dihidroceramida desaturasa biosintetizando la ceramida. Para obtener la esfingosina, la ceramida se somete a una desacilación catalizada por la ceramidasa. La esfingosina se fosforila por la esfingosina cinasa (Sphk) para formar S1P y posteriormente es degradada irreversiblemente por la S1P liasa que genera etanolamina fosfato y hexadecenal. Además la S1P puede ser desfosforilada por fosfatasa de esfingosina (SPP) y fosfatasa de lípidos (PLPP), para obtener esfingosina (figura 7) (Hla *et al.*, 2008).

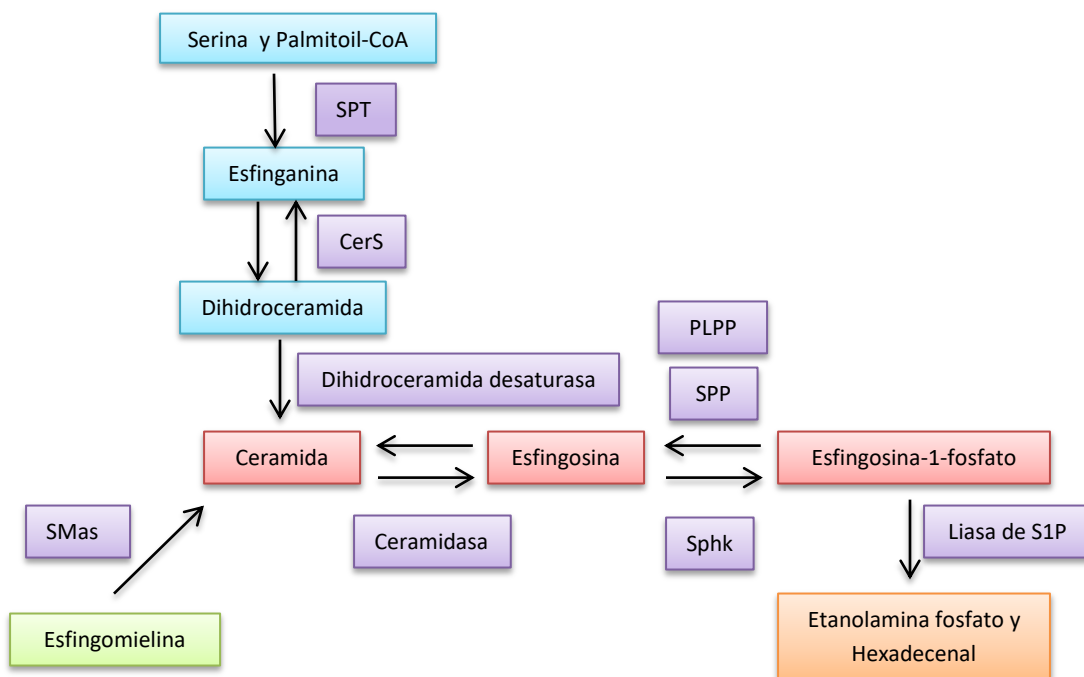


Figura 10. Síntesis de esfingosina-1-fosfato (S1P). La ceramida es el centro del metabolismo de la S1P. La síntesis de *novo* es a partir de la condensación de una serina y un palmitoil CoA por la serinpalmitoiltransferasa (SPT) que produce la esfinganina que es acilada por la ceramida sintasa (CerS) generando dihidroceramida que es desaturada para biosintetizar ceramida. La ceramida es desacilada por la ceramidasa obteniendo esfingosina que es fosforilada por la esfingosina cinasa (Sphk) para producir S1P (Imagen modificada de Obinata & Hla, 2012).

Como se mencionó anteriormente los esfingolípidos actúan como segundos mensajeros en la transducción de señales extracelulares, por ejemplo se conoce que el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés), induce la hidrólisis de la esfingomielina a ceramida que es metabolizada a S1P. En contraste el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α , por sus siglas en inglés) usualmente solo induce la acumulación de la ceramida. Estas diferencias tienen importantes efectos en la célula debido a que la S1P es un potente mitógeno y un inhibidor de la apoptosis (Cuvillier *et al.*, 1998; Olivera & Spiegel, 1993), mientras que la esfingosina y la ceramida inhiben el crecimiento e inducen la apoptosis (figura 8) (Hannun, 1994; Jayadev *et al.*, 1995).

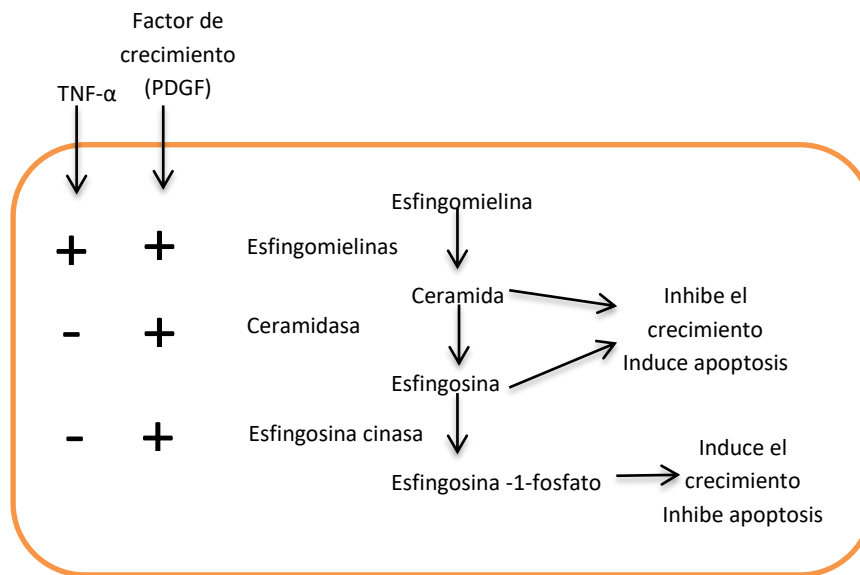


Figura 13. Los esfingolípidos actúan como segundos mensajeros. El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) induce la biosíntesis de la esfingosina-1-fosfato (S1P). En contraste el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), solo induce la acumulación de la ceramida. La S1P es un potente mitógeno y un inhibidor de la apoptosis mientras que la esfingosina y la ceramida inhiben el crecimiento e inducen la apoptosis (Imagen modificada de Vesper *et al.*, 1999).

1.8. Señalización activada por S1P

La S1P se genera a partir de la esfingosina por la acción de las esfingosina cinasa 1 y 2 (Sphk1 y Sphk2) y es exportada al espacio extracelular por un transportador de tipo ABC (Schuchardt *et al.*, 2011). La mayor fuente de S1P en el sistema vascular son las células hematopoyéticas como los eritrocitos, plaquetas y leucocitos (Pappu *et al.*, 2007). La concentración de S1P en sangre es alrededor de 0.5 μ M y está unida en un 30% a la albumina, 50-70% a lipoproteínas de alta densidad, 5-10% en lipoproteínas de baja densidad y 2-5% en lipoproteínas de muy baja densidad (Mutara *et al.*, 2000; Okajima, 2002).

Los receptores que unen a la S1P pertenecen a la familia de GPCRs, hasta el momento se han identificado cinco subtipos de receptores y se han denominado; S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1P₄ y S1P₅ (Lee *et al.*, 1998; Van Brocklyn *et al.*, 1999). Los receptores S1P₁₋₅ activan diferentes vías de señalización dependiendo del subtipo de proteína G acoplada (tabla 1). La vía de transducción de señales acoplada a G_q que está involucrada en el aumento de Ca²⁺ ha sido una de las vías más estudiadas. Además los receptores de S1P acoplados a G_{12/13} pueden activar a la GTPasa monomérica Rho que está involucrada en la regulación del citoesqueleto y la movilidad celular (Lepley *et al.*, 2005). Los receptores acoplados a G_i activan vías de señalización involucradas en la proliferación y supervivencia celular regulando las vías de PI3K/AKT y Ras/ERK (Takuwa *et al.*, 2008), además activa a la PLC a través del dímero β/γ (Dongun *et al.*, 1993).

Los receptores de S1P están implicados en muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, incluyendo el cáncer, la función del sistema nervioso y la esclerosis múltiple (Gardell *et al.*, 2006; Brinkmann, 2007). La caracterización de los ratones knock out (- / -) para este receptor a proporcionado una visión muy amplia del papel de los receptores de S1P (tabla 1): los ratones knock out de S1P₁ presentan defectos letales durante su desarrollo en el útero (Liu *et al.*, 2000), para S1P₂ desarrollan ataques epilépticos (MacLennan *et al.*, 2001) y también sordera (Kono *et al.*, 2007), para S1P₃ no presenta un fenotipo obvio (Ishii *et al.*, 2001), sin embargo, el triple knockout de S1P₁₋₃ tiene un importante papel en el desarrollo y función del sistema vascular durante la embriogénesis (Kono *et al.*, 2004).

Tabla I. Expresión de los receptores de S1P y vías de señalización.

Receptor	Expresión en tejidos	Fenotipo de ratón knock out	Proteína G acoplada	Vías de señalización	Referencias
S1P ₁	Cerebro, pulmón, bazo, corazón y riñón.	Letal, el receptor es muy importante para procesos como angiogénesis, neurogénesis, tráfico de células del sistema inmune y barrera endotelial.	G _i	(-): AC, (+): ERK, PI3K/Akt, eNOS, Rac	Takuwa <i>et al.</i> , 2008.
S1P ₂	Muchos tejidos.	Ataques epilépticos y sordera. Ocasionalmente letal entre 3 y 7 semanas de edad	G _i , G _s , G _q y G _{12/13}	(-): AC (+): AC, PLC, JNK, p38, Rho, Rac	Takuwa <i>et al.</i> , 2008.
S1P ₃	Corazón, pulmón, bazo, riñón, intestino, diafragma y cartílago.	No hay fenotipo obvio.	G _i , G _q y G _{12/13}	(-): AC (+): ERK, PLC, Akt, eNOS, Rac, Rho	Ishii <i>et al.</i> , 2001; Takuwa <i>et al.</i> , 2008
S1P ₄	Leucocitos y músculo liso de las vías respiratorias.	No hay datos.	G _i , G _q y G _{12/13}	(+): AC, ERK, PLC, Rho	

S1P₅	Células del sistema nervioso central, oligodendrocitos y células de Schwann	No hay defectos en la mielinización.	G _i y G _{12/13}	(-): AC, ERK (+): JNK, p54JNK	Jaillard <i>et al.</i> , 2005
------------------------	---	--------------------------------------	-------------------------------------	----------------------------------	-------------------------------

(+) Activación; (-) inhibición.

Planteamiento del problema

Los receptores de S1P están implicados en muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, incluyendo el cáncer, la función del sistema nervioso y la esclerosis múltiple. En particular para la esclerosis múltiple la modulación del receptor de S1P₁ por el FTY720-P ha sido una buena opción para el tratamiento de la enfermedad. Se conoce que la actividad del receptor de S1P₁ es el resultado del balance coordinado entre los mecanismos que regulan los procesos de señalización, desensibilización y resensibilización. La regulación a la baja o mantenimiento en los endosomas para su posterior reciclamiento y recuperación de los GPCRs están regulados por diversas proteínas Rab que están involucradas en diferentes etapas del transporte intracelular en endocitosis, tráfico vesicular y exocitosis, por ejemplo, en la ruta endocítica, Rab 5 controla el tráfico del receptor de la membrana plasmática a los endosomas tempranos, Rab9 regula el tráfico de endosomas tardíos a lisosomas y Rab7 regula el tráfico de los endosomas tardíos a la degradación vía proteosoma. Sin embargo, las proteínas Rab involucradas en la regulación del receptor de S1P₁ no han sido estudiadas. Analizar el papel de las proteínas Rab5, Rab9 y Rab7 en el tráfico vesicular del receptor de S1P₁, debida a la activación generada por la S1P, FTY720-P y PMA representa un buen modelo para determinar el papel de las proteínas Rab en la regulación del receptor.

Hipótesis

La desensibilización homóloga y heteróloga del receptor de esfingosina-1-fosfato tipo 1 (S1P₁) bajo la acción de S1P, FTY720-P y PMA presenta diferencias en el tráfico vesicular mediado por las proteínas Rab.

Objetivos

3.1. Objetivos

Objetivo principal

Estudiar las diferencias en el tráfico vesicular del receptor de S1P₁ durante la desensibilización homóloga (S1P y FTY720-P) y heteróloga (PMA).

Objetivos particulares

- 1.- Caracterizar farmacológica y funcionalmente el receptor de S1P₁-mCherry.
- 2.- Determinar la internalización del receptor de S1P₁ bajo la acción de S1P, FTY720-P y PMA.
- 3.- Estudiar el papel de las proteínas Rab5, Rab9 y Rab7 en el proceso de internalización al activar el receptor de S1P₁ con S1P, FTY720-P y PMA.
- 4.- Evaluar la cinética de fosforilación del receptor de S1P₁ bajo la acción de S1P y FTY720-P.

Materiales y métodos

4.1. Materiales

El medio de cultivo modificado Dulbecco's Eagle Medium (DMEM), el antibiótico geneticina (G418) y otros reactivos para el cultivo celular se obtuvieron de Gibco Life Technologies. El suero fetal bovino (SFB) de Multicell. La esfingosina-1-fosfato (S1P), el forbol 12-miristoil 13-acetato (PMA) e inhibidores de proteasas fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Chemical Co. La proteína A-agarosa se obtuvo de Millipore. El [³²P]Pi (8500-9120 Ci/mmol) se obtuvo de Perkin Elmer Life Sciences. El Fura-2/AM fue obtenido de Molecular Probes, Invitrogen. El anticuerpo policlonal que reconoce a la proteína mCherry fue generado en el laboratorio por la Dra. Claudia González Espinosa, la Dra. María Teresa Romero Ávila y el Q.F.B. Alfredo Ibarra Sánchez.

4.2. Cultivo celular

Se utilizó la línea celular HEK AD-293 derivada de embrión de riñón humano adquirida de Stratagene. Las líneas celulares generadas en este trabajo se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB, adicionado con los antibióticos estreptomycin 100 µg/mL, penicilina 100 U/mL y anfotericina 0.25 µg/mL. Se utilizó el antibiótico G418 (300 µg/mL) como marcador de selección. El cultivo se mantuvo en incubación a 37 °C, 95% de humedad y 5% de CO₂.

4.3. Transfecciones celulares

Con el objetivo de estudiar la regulación del receptor de S1P₁ se obtuvo la línea celular estable HEK AD-293 S1P₁-mCherry. La transfección se realizó mediante el uso de polímeros catiónicos que permeabilizan la membrana celular como la Lipofectamina® 2000 y Polietilenimina. Se adquirió el plásmido pReceiver-M56 de GeneCopoeia™ que contiene la secuencia del receptor de S1P₁ fusionado por la proteína fluorescente mCherry en el COOH terminal, este plásmido confiere resistencia al antibiótico G418, que se usó como marcador de selección.

Para realizar las transfecciones se sembraron células HEK AD-293 silvestres en cajas de 6 cm a una confluencia del 70% en medio DMEM suplementado. Al día siguiente se cambió el medio de crecimiento y se agregó Opti-MEM®, después se preparó un stock A que contenía Lipofectamina® 2000 y Opti-MEM® y el stock B que contenía el plásmido de S1P₁-mCherry (1 µM) y Opti-MEM®, se transfirió el stock A al B y se dejaron 15 minutos a temperatura ambiente, al terminar este tiempo, se agregó la mezcla de A y B a los pozos y se dejaron en la incubadora por 4 horas. Posteriormente se cambió el medio Opti-MEM® por DMEM suplementado. Después de 24 horas se seleccionaron las células con medio DMEM suplementado adicionado con el antibiótico G418.

Con el fin de estudiar el tráfico vesicular del receptor de S1P₁ se realizaron cotransfecciones transitorias por el mismo protocolo descrito anteriormente, pero se utilizaron los plásmidos que contienen Rab5-GFP (300 ng), Rab9-GFP (300 ng) y Rab7-GFP (300 ng), respectivamente, además las células no se incubaron en presencia de G418.

4.4. Cuantificación de la concentración de calcio libre intracelular ($[Ca^{2+}]_i$)

Para cuantificar la $[Ca^{2+}]_i$, la línea celular estable HEK AD-293 S1P₁-mCherry fueron cultivadas en cajas Petri de 10 cm de diámetro, con una confluencia del 90% y ayunadas 2 horas antes del experimento. Se cargaron las células con el fluoróforo Fura-2/AM (2.5 μ M) en solución Krebs-Ringer-HEPES durante 1 hora en la incubadora. Después, se lavaron con buffer de fosfatos salino (PBS, por sus siglas en inglés) para eliminar el exceso de albúmina y Fura-2/AM, se agregó 1 mL de tripsina/PBS (1:5) por 1 minuto a 37 °C, para desprender las células, posteriormente se transfirieron a un tubo falcon de 15 mL, se centrifugaron a 3000 revoluciones por minuto (rpm), se realizaron 3 lavados y por último el pellet celular se resuspendió en 6 mL de solución Krebs-Ringer-HEPES.

Se utilizó un espectrofluorómetro AMINCO-Bowman serie 2 (Rochester, NY, USA), que detecta la fluorescencia de excitación a una longitud de onda de 340 y 380 nanómetros (nm) y a una de emisión de 510 nm del Fura-2/AM. Las diferencias en la fluorescencia se cuantificaron utilizando el software AB2 luminescence spectrometer, que calcula la relación entre la fluorescencia máxima y mínima de acuerdo a la ecuación de Grynkiewicz *et al.*, 1985.

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \left[\frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \right] \left[\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right]$$

Donde k_d representa la constante de afinidad del fluoróforo por el Ca^{2+} (224 mM), R es la lectura de fluorescencia en unidades arbitrarias, R_{max} es la fluorescencia máxima obtenida al lisar las células con Tritón X-100 al 10%, R_{min} representa la fluorescencia mínima obtenida utilizando el quelante de Ca^{2+} EGTA 50 mM, S_{f2} es el coeficiente de proporcionalidad del fluoróforo libre y S_{b2} el coeficiente de proporcionalidad del fluoróforo unido al Ca^{2+} .

4.5. Ensayos de fosforilación

El protocolo se realizó de acuerdo a lo reportado previamente por el laboratorio (Vázquez-Prado *et al.*, 1996; García-Sáinz *et al.*, 2001). Con el propósito de observar la fosforilación del receptor S1P₁-mCherry con diferentes estímulos, se cultivaron las células en placas de 6 pozos a una confluencia del 90%. Una hora antes del experimento las células se incubaron en medio de ayuno sin fosfatos, al terminar este tiempo se mantuvieron en 1 mL del mismo medio conteniendo [³²P]Pi 50 (μ Ci/mL) por 3 horas, después las células se estimularon como se indica, se realizaron 3 lavados con solución PBS fría y se incubaron por una hora en hielo con 1 mL de solución de lisis.

Se recolectaron los lisados celulares, se transfirieron a tubos de polipropileno y se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se transfirieron a otros

tubos de polipropileno que contenían 10 μ L de anticuerpo policlonal (generado en el laboratorio) que reconoce a la proteína mCherry y 20 μ L de proteína A-agarosa. Para concluir los tubos se incubaron en agitación por toda la noche.

Después de la inmunoprecipitación se realizaron 3 lavados con solución de lavado a 3000 rpm por 5 minutos. Al terminar los lavados, las inmunoprecipitaciones se resuspendieron en SDS 10%/Urea 8M y con buffer de carga. Las muestras se colocaron a 96 °C por 15 minutos en el termoblock, se centrifugan a 12000 rpm por 10 minutos y se realizaron electroforesis desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. Por último los geles se secaron y se colocaron en un casete de exposición auto radiográfico.

4.6. Microscopia confocal

Con el propósito de estudiar el tráfico vesicular del receptor de S1P₁ se obtuvieron las transfecciones transitorias HEK AD-293 S1P₁-mCherry/Rab5-GFP, HEK AD-293 S1P₁-mCherry/Rab9-GFP y HEK AD-293 S1P₁-mCherry/Rab7-GFP. Las células se cultivaron en caja Petri con fondo de vidrio por 24 horas, se ayunaron por 3 horas antes del experimento, se estimularon como se indica y se fijaron con paraformadehído al 4% por 20 minutos. Se realizaron 7 lavados con PBS 1X, para eliminar el exceso de paraformadehído.

Para observar si en la desensibilización homóloga y heteróloga del receptor de S1P₁ están involucradas las proteínas Rab5, Rab9 y Rab7 se realizaron experimentos por Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (FRET, por sus siglas en inglés). Las células fijas se observaron en un microscopio confocal Fluoview FV10i de Olympus. Se capturaron imágenes de al menos 25 células de 3 experimentos independientes con un objetivo 60X de inmersión de agua, apertura focal de 1, sensibilidad en promedio de 40 e intensidad de láser en 25%. La proteína EGFP se excitó a 480 nm y la fluorescencia emitida se detectó a 515-540 nm y la proteína mCherry se excitó a 580 nm y la fluorescencia emitida se detectó a 610 nm. Para observar el FRET, se apagó el láser correspondiente a la mCherry, se apagó el “cross talk correction” y se adquirió una imagen.

4.7. Análisis de imágenes utilizando el software Image J

El software ImageJ versión 1.49v fue obtenido del sitio web del Instituto Nacional de Salud (ImageJ, Rasband,W.S., U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, <http://imagej.nih.gov/ij/>). Las imágenes fueron procesadas de acuerdo a la guía de usuario del plug-in “FRET analyzer” del software ImageJ. Este plug-in trabaja con imágenes en 8-bit y permite el cálculo de FRET INDEX por el método de pixel por pixel. Se requiere conjuntos de imágenes a ser adquiridas de acuerdo con el cálculo de FRET por el método de fluorescencia de emisión sensibilizada. Durante el análisis con este plugin, los controles se muestran al usuario con el fin de confirmar los resultados.

4.8. Análisis estadístico y presentación de resultados

Todos los datos se presentan como el promedio \pm el error estándar para un mínimo de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados con pruebas de ANOVA con corrección de Bonferroni, que compara las medias entre los diferentes pares de columnas, pero utiliza la ANOVA para calcular el error estándar y recalcula el error α . Para todas las pruebas estadísticas un valor p de < 0.05 se consideró estadísticamente significativo. En análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prim versión 5.0 para Windows.

Resultados y discusión

5.1. Caracterización funcional del receptor de esfingosina-1-fosfato tipo 1 (S1P₁)

Con la finalidad de caracterizar farmacológica y funcionalmente el receptor de S1P₁ expresado establemente en células HEK AD 293 se realizó un ensayo que mide la concentración intracelular de Ca²⁺ *in vivo*. En células HEK Wt, 1 μM de S1P induce un incremento de calcio intracelular de 100 nM, mientras que en la línea celular que expresa establemente el receptor de S1P₁-mCherry, 1μM de S1P induce un incremento de calcio intracelular de 200 nM (figura 12 A y B). El efecto de S1P en la liberación de calcio fue dosis-dependiente, alcanzando su máxima liberación con 10 μM de S1P (figura 12 C y D). De manera interesante en células Wt y la línea estable, 1μM de FTY720-P induce un incremento de calcio intracelular de 100 nM (figura 12 C y D), este efecto se puede deber a la expresión de los receptores endógenos de las células Wt, además no se logró obtener una curva dosis-respuesta saturante para FTY720-P en la línea estable (figura 12 C y D). La S1P es más potente respecto al FTY720-P en células Wt y la línea estable (figura 12 C y D).

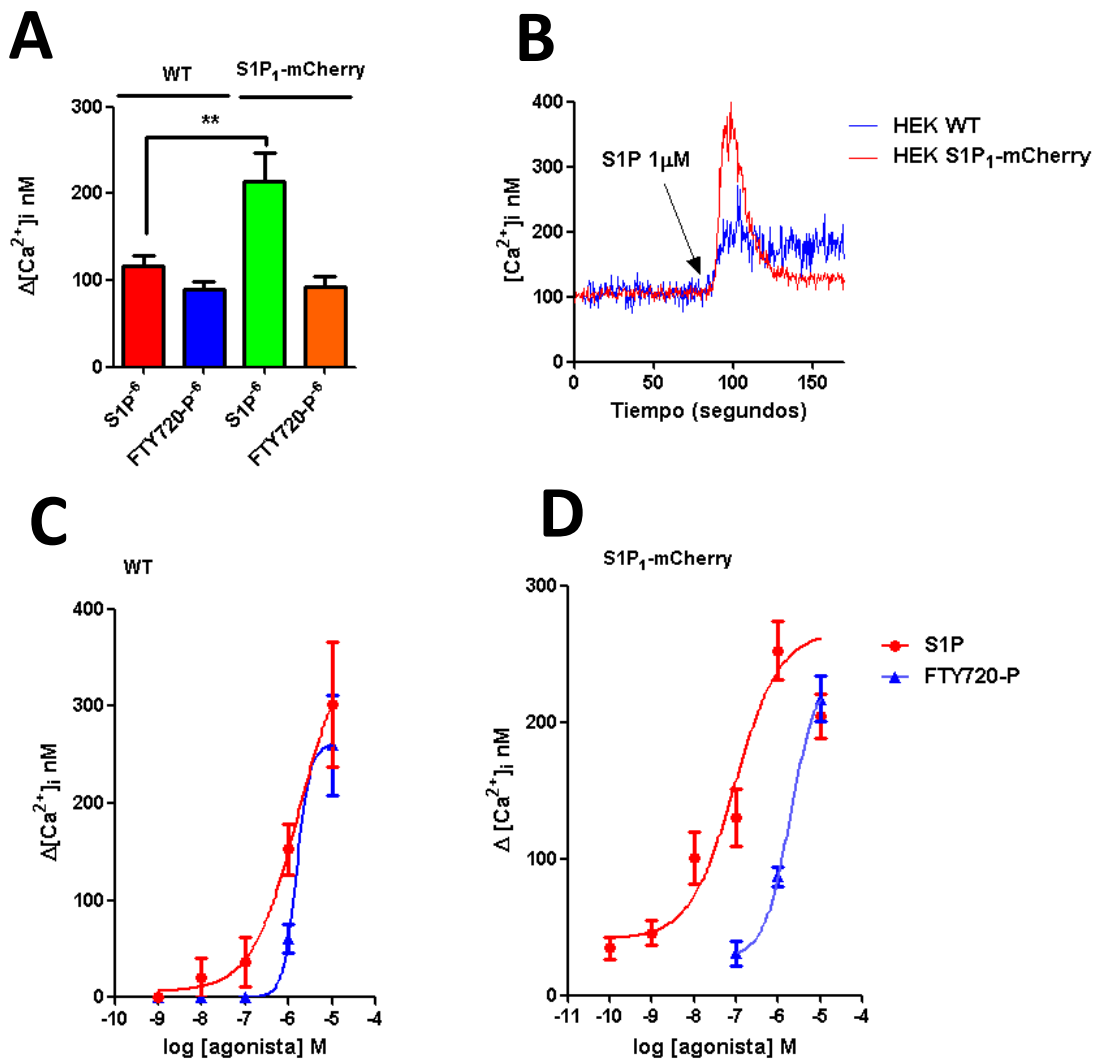


Figura 12. Efecto de esfingosina-1-fosfato (S1P) y FTY720-P en la concentración intracelular de calcio. A y B: incremento de concentración de calcio en células HEK WT y células HEK transfectadas con el receptor de S1P₁-mCherry con la concentración de S1P y FTY720-P indicada. C y D: efecto de la concentración de S1P y FTY720-P en la liberación de calcio es dosis-dependiente, mientras que el efecto de FTY720-P solo se observa en concentraciones altas del ligando. Los promedios son graficados con líneas verticales representando el error estándar de 4 a 7 determinaciones usando diferentes preparaciones celulares. Se muestran trazos representativos.

La cuantificación de calcio intracelular es una estrategia que refleja de manera directa la relación en el aumento del número de receptores en la membrana celular y su actividad acoplada a la proteína G. Como se mencionó anteriormente el receptor de S1P₁ esta acoplado a una proteína G_i (tabla I), sin embargo, en nuestros experimentos podemos observar un aumento en la liberación de calcio intracelular sugiriendo que se activa la PLC β. La proteína G está compuesta por la subunidad α y el dímero β/γ, este dímero puede activar a la PLC β que genera DAG e IP3, el IP3 se une a canales en el retículo endoplásmico y se libera calcio (Malbon, 2005).

5.2. Asociación del receptor de S1P₁ a proteínas Rab durante la desensibilización homóloga y heteróloga

La internalización de los GPCRs puede ser ocasionada por agonistas o por otros estímulos. El proceso comienza a tiempos cortos después de la activación del receptor y contribuye a la desensibilización del receptor, que representa un importante mecanismo de autorregulación. El receptor de S1P₁ al ser estimulado por el agonista S1P presenta una desensibilización homóloga y se fosforila por GRK2 (Pueyo *et al.*, 2008), esto facilita la unión de las β-arrestinas que reclutan el complejo de clatrina y AP-2 permitiendo que se fije el GPCR a las vesículas cubiertas de clatrina (Voet & Voet, 2006; Reeves *et al.*, 2015). Posteriormente, los GPCR incluidos en estas vesículas son internalizados en la célula donde pueden sufrir procesos como degradación en los lisosomas o mantenimiento en los endosomas para su posterior reciclamiento y recuperación. Se han identificado 60 proteínas Rab que regulan diferentes etapas del transporte intracelular en endocitosis, tráfico vesicular y exocitosis, esto se refleja en su distribución en la membrana de diferentes organelos celulares (Jordens *et al.*, 2005). Por ejemplo, en la ruta endocítica Rab5 controla el tráfico del receptor de la membrana plasmática a los endosomas tempranos, mientras que Rab4 y Rab11 regulan el reciclaje rápido y lento de endosomas tempranos a la membrana plasmática, respectivamente. Por otra parte Rab7 y Rab9 regulan el tráfico hacia la degradación vía proteosoma y de endosomas tardíos a lisosomas, respectivamente (Castillo *et al.*, 2015). Para observar si las proteínas Rab5, Rab9 y Rab7 están involucradas en la desensibilización homóloga y heteróloga del receptor de S1P₁ se realizaron experimentos por Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (FRET), usando células que coexpresan el receptor de S1P₁ etiquetado con la proteína fluorescente mCherry y las proteínas Rab5, Rab9 y Rab7, etiquetadas con la proteína verde fluorescente (EGFP, por sus siglas en inglés).

En la línea celular estable HEK AD-293 S1P₁-mCherry el lípido bioactivo S1P (1 μM), el FTY720-P (1 μM) y el PMA (1 μM) induce la internalización del receptor a partir de los 2 minutos de estimulación y se mantiene hasta los 30 minutos de estímulo (figura 13 A). La internalización fue evidente por una disminución en la delineación de la membrana plasmática por fluorescencia (figura 13 B) y un incremento en el número e intensidad de vesículas fluorescentes intracelulares (figura 13 C). Al comparar la internalización del receptor con los diferentes ligandos y el activador de PKC, podemos observar que la S1P y el PMA aumentan el número de vesículas de manera muy similar a los 5 minutos y se mantiene hasta los 30 minutos, por otra parte, el FTY720-P aumenta el número de vesículas de manera muy similar a la S1P y PMA durante los primeros 5 minutos, pero existe un mayor número de vesículas a los 30 minutos respecto a S1P y PMA a los al mismo tiempo.

Resulta interesante el aumento de vesículas al activar el receptor de S1P₁ con FTY720-P, esto se puede deber a que este ligando genera la poliubiquitinación del receptor y no permite el reciclamiento del GPCR.

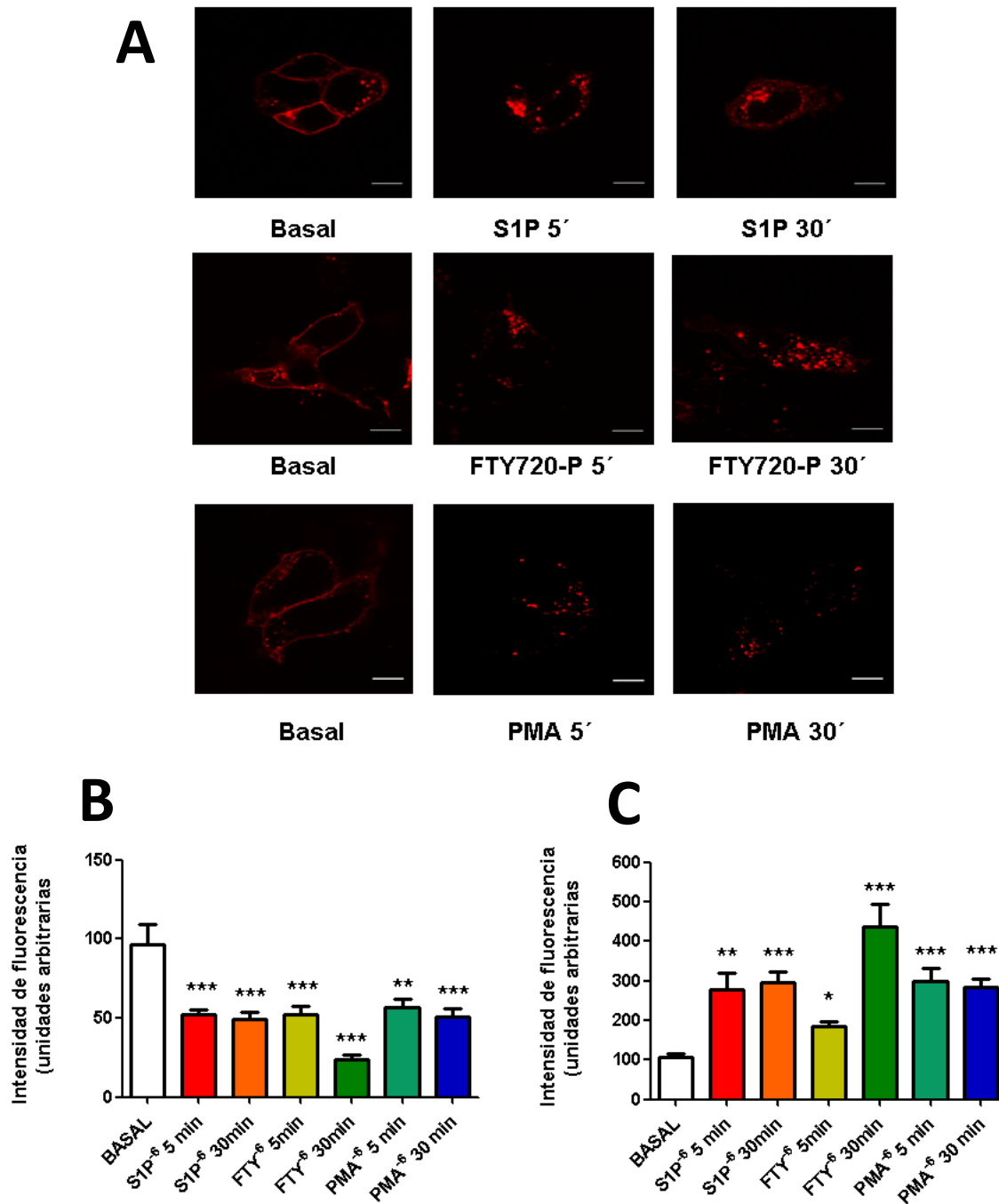


Figura 13. Receptor de S1P₁ y su internalización. A) Imágenes de microscopía confocal de células HEK AD que expresan de manera estable el receptor de S1P₁-mCherry en ausencia (basal) o presencia de S1P (1 µM), FTY720-P (1 µM) y PMA (1 µM) a los 5 y 30 minutos. B) Cuantificación de la pérdida de fluorescencia de la membrana plasmática y C) aumento de vesículas intracelulares en ausencia (basal) o presencia de S1P (1 µM), FTY720-P (1 µM) y PMA (1 µM) a los 5 y 30 minutos. Barras de escala: 10 µm.

La posibilidad de que el receptor de S1P₁ pueda interactuar de manera directa con diferentes proteínas Rab fue ensayado usando FRET. En nuestros experimentos de FRET la proteína EGFP trabaja como donadora y la proteína mCherry como aceptora. Las imágenes fueron analizadas utilizando el software ImageJ y el plug-in “FRET Analyzer” (Haas *et al.*, 2006). Es importante tener en cuenta que el fenómeno de FRET se produce a una distancia de 10 nm (100 Å) o menos (Sekar & Periasamy, 2003), sugiriendo una interacción molecular directa.

En la figura 14, 15 y 16 podemos observar la fluorescencia de la proteína EGFP (primera columna), mCherry (segunda columna), el canal de FRET (tercera columna) y el FRET INDEX (cuarta columna), para el canal de FRET la proteína EGFP fue excitada y el láser que excita a la proteína mCherry se apagó. En el basal, el receptor de S1P₁ se encuentra principalmente delineando la membrana plasmática y las proteínas Rab se localizan en el citosol (primera columna). Al estimular con S1P (1 μM), en diferentes tiempos se induce la internalización del receptor y no se observa FRET bajo condiciones basales (cuarta columna). Las imágenes de FRET INDEX (cuarta columna), sugieren que el receptor de S1P₁ interactúa con la proteína Rab5 a los 3 minutos y está interacción disminuye después de 5 minutos (figura 14 A y B). Para Rab9, podemos observar que la interacción con el receptor se da a los 5 minutos (figura 14 C y D), de manera interesante a los minutos en que disminuye la interacción del receptor de S1P₁ con Rab5, sugiriendo un cambio en la ruta de tráfico vesicular a endosomas tardíos y posiblemente degradación por lisosomas (se necesitan hacer experimentos para corroborar esta hipótesis). Para Rab7 no se presenta interacción en ninguno de los tiempos del estímulo (figura 14 E y F). Al estimular con FTY720-P (1 μM), las imágenes de FRET INDEX sugieren que el receptor de S1P₁ interactúa con la proteína Rab5 a partir de los 2 minutos y está interacción disminuye a los 3 minutos, pero se mantiene de manera significativa hasta los 30 minutos (figura 15 A y B). Para Rab9, podemos observar que no hay interacción en ninguno de los tiempos del estímulo (figura 15 C y D). Se ha reportado que el receptor de S1P₁ al ser estimulado con FTY720-P causa la ubiquitinación y degradación del receptor vía proteosoma (Oo *et al.*, 2007), se ha propuesto que la proteína Rab7 interactúa con una subunidad del proteosoma y se realizaron experimentos de FRET con Rab7 para explorar esta posibilidad. Al estimular con FTY720-P (1 μM), las imágenes de FRET INDEX sugieren que el receptor de S1P₁ interactúa con Rab7 a partir de los 5 minutos y está interacción se enriquece desde los 10 minutos hasta los 30 minutos (figura 15 E y F), esto respalda lo propuesto por Oo y colaboradores (2007). Finalmente al estimular con PMA (1 μM), las imágenes de FRET INDEX, sugieren que el receptor de S1P₁ interactúa con la proteína Rab5 a partir de los 2 minutos y esta interacción se enriquece a los 3 minutos y se mantiene significativamente hasta los 30 minutos (figura 16 A y B). Para Rab9, podemos observar que la interacción con el receptor se da a los 3 minutos, disminuye a los 5 minutos, pero se mantiene de manera significativa hasta los 30 minutos (figura 16 C y D). Para Rab7 no se presenta interacción en ninguno de los tiempos del estímulo (figura 16 E y F).

Estos resultados sugieren que el receptor de S1P₁ presenta una dinámica de tráfico vesicular diferente dependiendo del agonista (figura 17). Al estimular con S1P y PMA

(desensibilización homóloga y heteróloga, respectivamente), el receptor se asocia a Rab5 y Rab9, pero no a Rab7 mientras que con FTY720-P, el receptor se asocia con Rab5 y Rab7, pero no a Rab9.

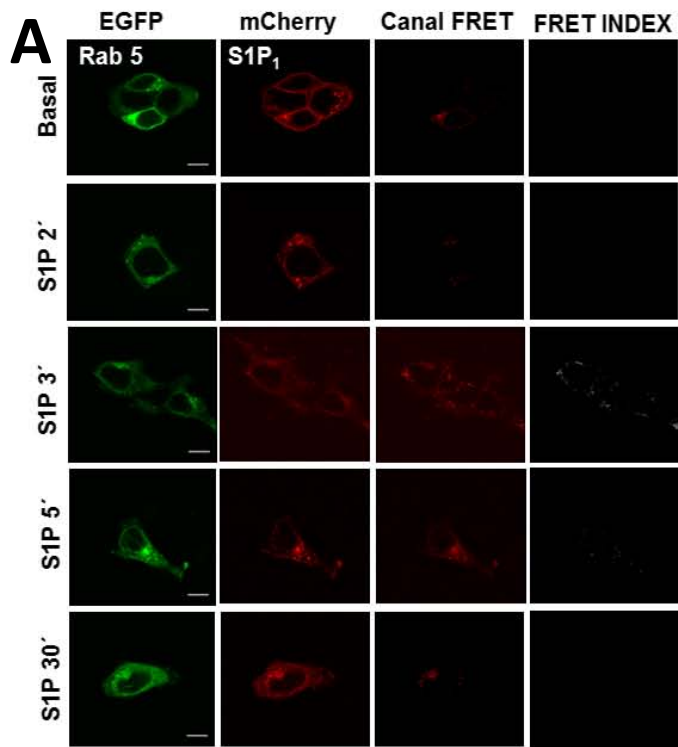
Rab5 es una proteína importante para la endocitosis a través de vesículas cubiertas de clatrina y su posterior fusión de vesículas con endosomas tempranos. La presencia de Rab5 en endosomas tempranos es esencial para la fusión homotípica, además Rab5 también se asocia con la membrana plasmática. Los endosomas tempranos contienen otros efectores y proteínas reguladoras, como el antígeno de endosoma temprano (EEA1, por sus siglas en inglés), rabaptina 5, rabenosina-5-PtdIns(3)P, etc, los cuales son importantes en la fusión de endosomas (Somsel y Wandinger, 2000). Los receptores en los endosomas tempranos pueden tener varios destinos celulares por diferentes vías de tráfico vesicular. Una vía directa de reciclaje rápido para receptores a la membrana plásmatica depende de Rab4 y se debe considerar que Rab5 y Rab4 pueden encontrarse al mismo tiempo en el endosoma, pero distribuidos de una manera específica. La presencia de una proteína Rab no excluye la presencia de otra(s) proteínas Rab(s) en el endosoma, a este fenómeno se le conoce como microdominios de las proteínas Rab (Pfeffer, 2013). Rab5 y Rab4 controlan la entrada y salida de los endosomas tempranos, debido a que estas dos proteínas exhiben unión al mismo efector (Gaborik y Hunyady, 2004; McCaffrey, *et al.*, 2001). Para las proteínas destinadas a degradación se entregan a endosomas tardíos posteriormente a lisosomas. El límite entre los endosomas tardíos y los lisosomas es difícil de determinar debido a que ambos compartimentos contienen enzimas lisosomales, su pH es ácido (aproximadamente de 5.5) y sus membranas se componen de los mismos lípidos y proteínas. El transporte del receptor a endosomas tardíos está fuertemente inhibido por la expresión de una dominante negativa Rab7, lo que indica que Rab7 es esencial para el transporte a endosomas tardíos (Rosenfeld *et al.*, 2001).

Es muy interesante que el receptor de S1P₁ siga la misma ruta de tráfico vesicular al estimular con S1P y PMA (desensibilización homóloga vs heteróloga) debido a que difiere en el tráfico vesicular con el receptor α_{1B} -adrenérgico. Estudios previos en nuestro laboratorio sugieren que los receptores α_{1B} -adrenérgicos al ser estimulados con noradrenalina interacciona con proteínas presentes en los endosomas tempranos, como el antígeno de endosomas tempranos (EEA1), Rab5, Rab4 y Rab11, pero no con proteínas de endosomas tardíos, como Rab9 y Rab7. Por otra parte, la estimulación por S1P induce una interacción rápida y transitoria del receptor α_{1B} -adrenérgico con Rab5 y una interacción más pronunciada y sostenida con Rab9. Además, la actividad de GTPasa de las proteínas Rab parece ser necesario porque no se observó FRET cuando se emplearon las mutantes dominantes negativas de las proteínas Rab. Estos datos indican que los receptores α_{1B} -adrenérgicos presentan un tráfico vesicular diferente dependiendo del tipo de desensibilización (homólogo vs. heterólogo) (Castillo-Badillo *et al.*, 2015).

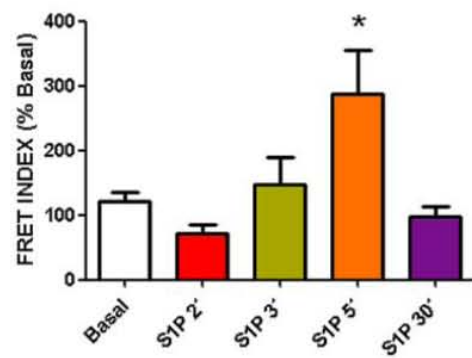
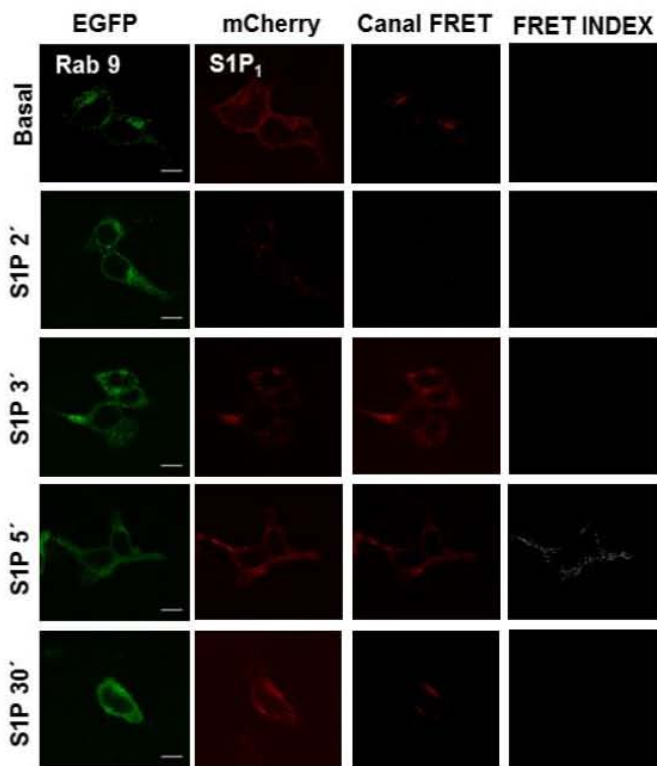
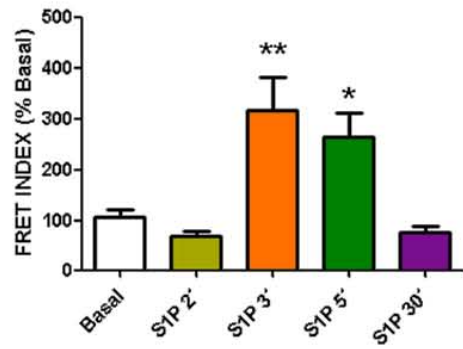
Se ha reportado la dinámica del tráfico vesicular de diversos receptores y sugieren que es muy diversa, por ejemplo el receptor β_2 -adrenérgico se internaliza y se recicla muy rápido (Shumay *et al.*, 2004), mientras que el receptor de angiotensina II tipo 1A (AT_{1A}R) se internaliza y se recicla más lento (Dale, 2004). Se conoce que Rab1 y Rab8 regulan la exportación de receptores a la membrana, Rab8 regula la exportación del receptor β_2 -adrenérgico y el receptor α_{2B} -adrenérgico, mientras que la inactividad de Rab1 solo afecta la exportación del receptor α_{2B} -

adrenérgico debido a las diferencias en los sitios de unión en los extremos carboxilo de los receptores (Dong, *et al.*, 2010). El tráfico vesicular de los receptores de somatostatina 3 (SSTR3) está regulado en los endosomas por Rab4, Rab21 y Rab11, pero no hay interacción con Rab5 y Rab7. El receptor SSTR3 se recicla rápidamente a través de Rab4, pero se mueve más lentamente a través de Rab21 y Rab11 (Tower-Gilchrist, *et al.*, 2011).

Se ha descrito el tráfico vesicular de algunos receptores y la asociación a diferentes proteínas Rab. En nuestro laboratorio proponemos que la unión de las diferentes proteínas Rab al receptor depende de su estado conformacional, cuando el receptor de S1P₁ se desensibiliza de manera homóloga y heteróloga el receptor adquiere un estado conformacional específico, mientras que cuando se activa el receptor por FTY720-P el receptor adquiere un estado conformacional distinto, esto le permite interactuar con diferentes proteínas Rab que favorece las diferencias en el tráfico vesicular anteriormente mencionadas (figura 14, 15, 16 y 17).



B



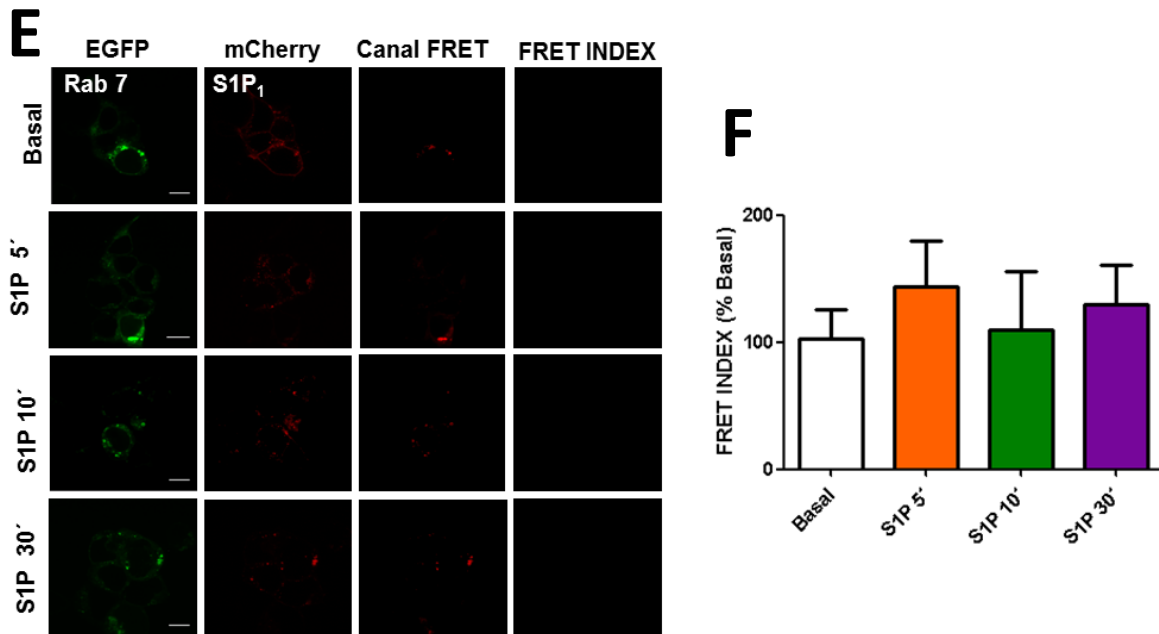
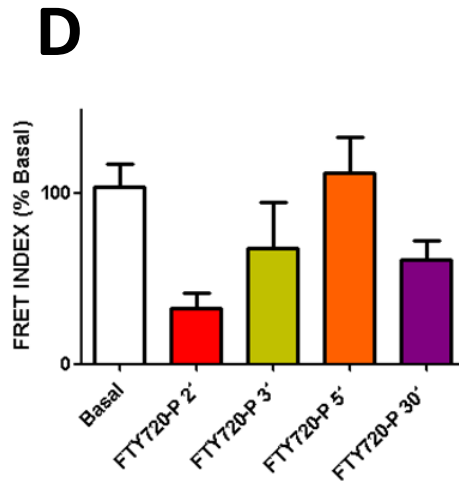
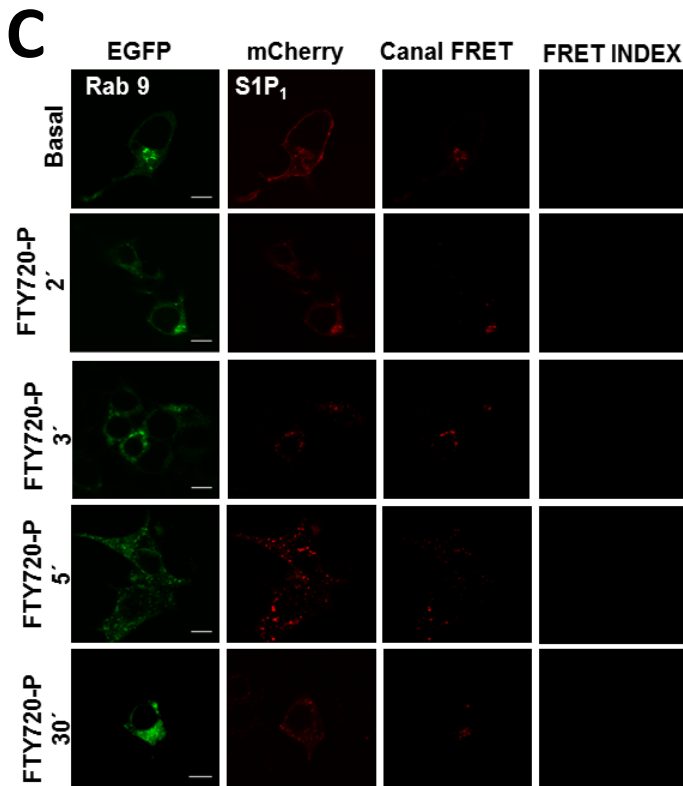
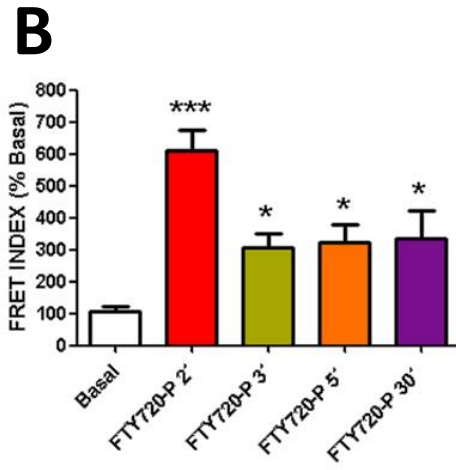
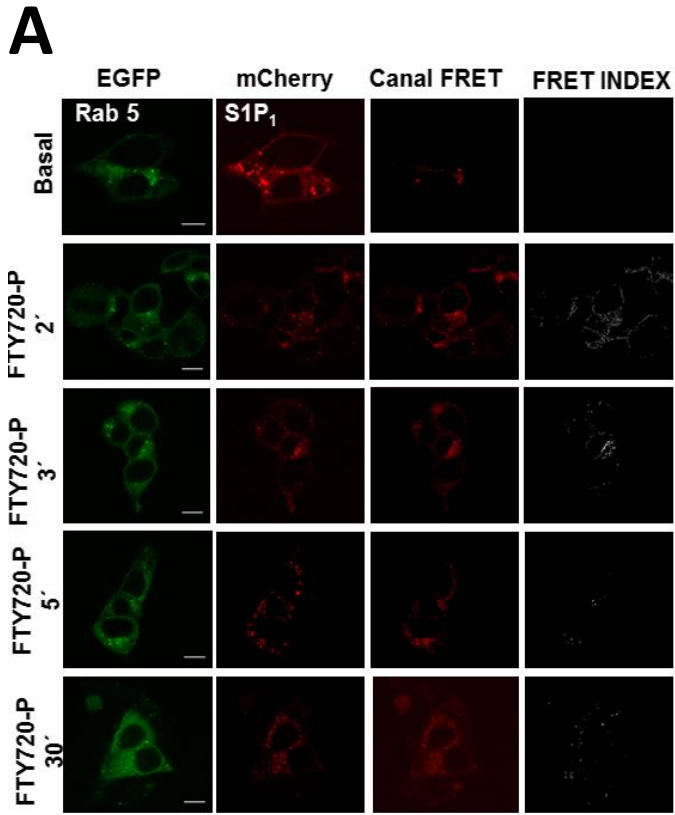


Figura 14. Asociación del receptor de S1P₁ y las proteínas Rab5 y Rab9. Imágenes de células coexpresando el receptor S1P₁-mCherry y Rab5, Rab9 y Rab7 etiquetadas con la proteína EGFP. En el basal el receptor de S1P₁ se encuentra principalmente delineando la membrana plasmática, las proteínas Rab se localiza en el citosol. A, C y E. Las células fueron incubadas a diferentes tiempos en ausencia (Basal) o presencia de S1P (1 μ M). Las células fueron fijadas y observadas en microscopia confocal. Las imágenes son presentadas como: Fluorescencia de EGFP (EGFP fue excitada y su fluorescencia fue adquirida; primer columna), fluorescencia de mCherry (mCherry fue excitada y su fluorescencia fue adquirida; segunda columna), Canal FRET (EGFP fue excitada y el láser que excita a la proteína mCherry se mantuvo apagado y la fluorescencia de mCherry fue adquirida; tercer columna) y FRET INDEX (imágenes procesadas con el plug-in "FRET Analyzer"; cuarta columna). B, D y F. Se presenta un análisis cuantitativo de FRET INDEX.



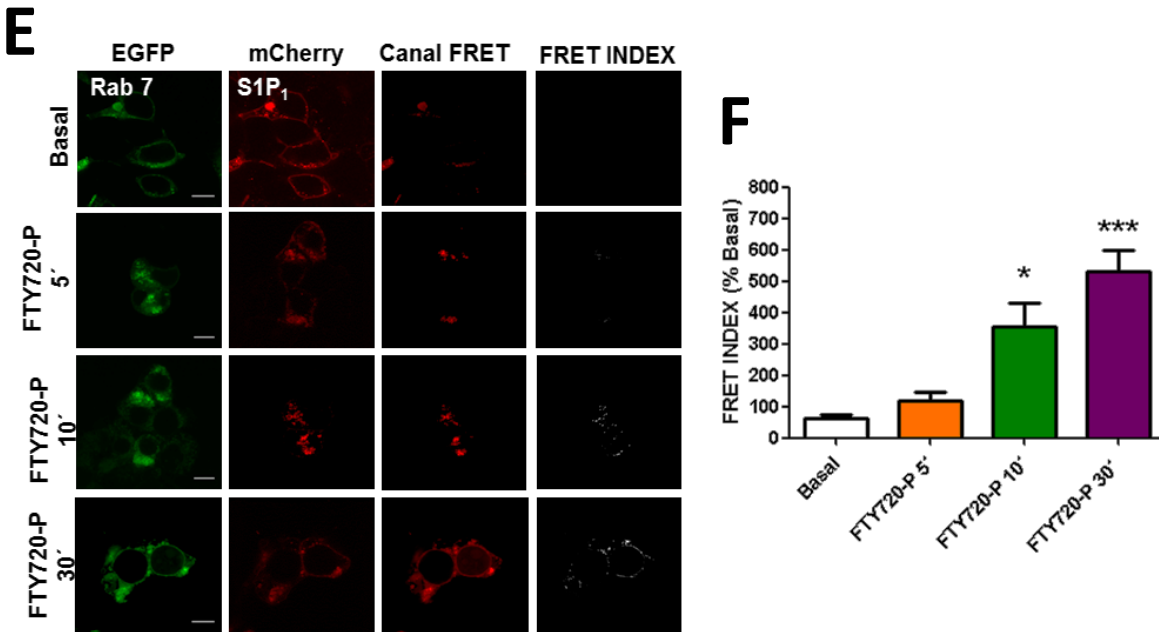
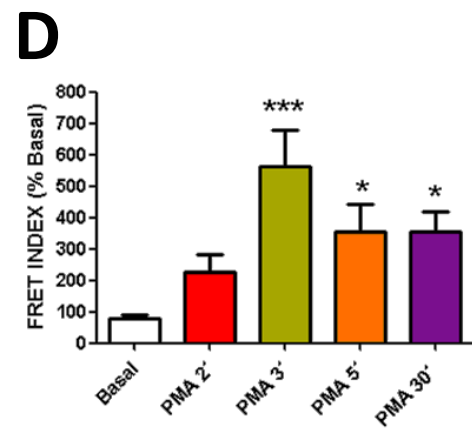
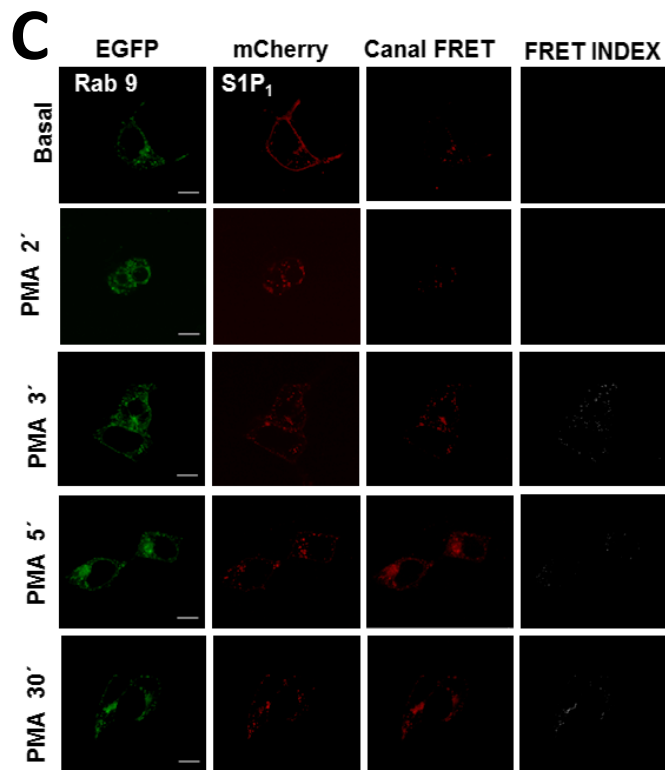
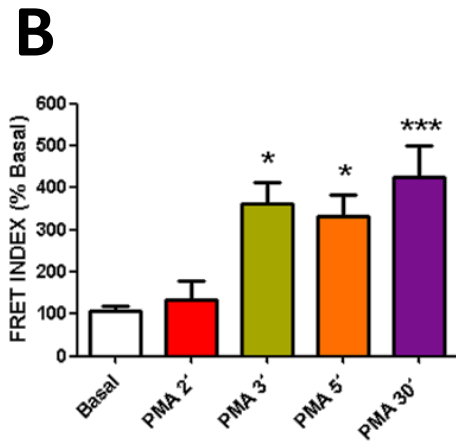
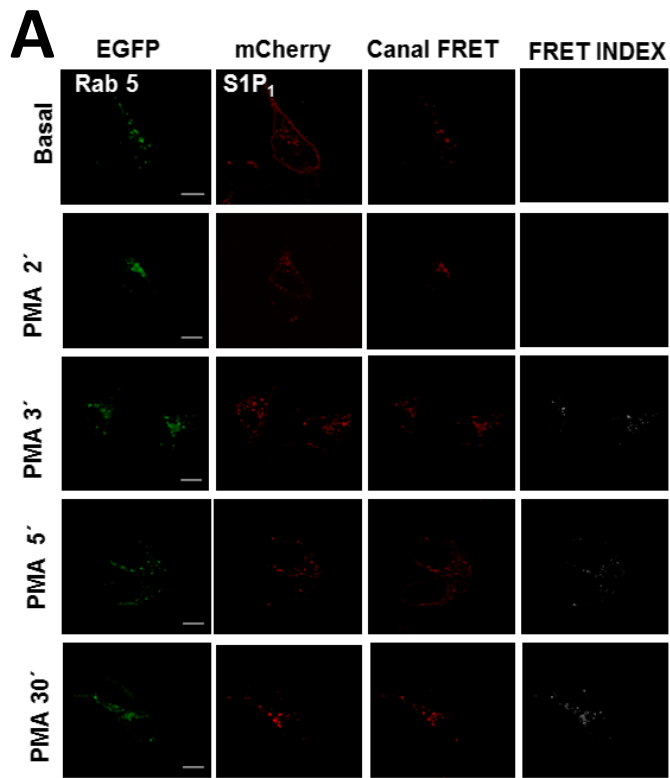


Figura 15. Asociación del receptor de S1P₁ y las proteínas Rab5 y Rab7. Imágenes de células coexpresando el receptor S1P₁-mCherry y Rab5, Rab9 y Rab7 etiquetadas con la proteína EGFP. En el basal el receptor de S1P₁ se encuentra principalmente delineando la membrana plasmática, las proteínas Rab se localizan en el citosol. A, C y E. Las células fueron incubadas a diferentes tiempos en ausencia (Basal) o presencia de FTY720-P (1 μ M). Las células fueron fijadas y observadas en microscopía confocal. Las imágenes son presentadas como: Fluorescencia de EGFP (EGFP fue excitada y su fluorescencia fue adquirida; primer columna), fluorescencia de mCherry (mCherry fue excitada y su fluorescencia fue adquirida; segunda columna), Canal FRET (EGFP fue excitada y el láser que excita a la proteína mCherry se mantuvo apagado y la fluorescencia de mCherry fue adquirida; tercer columna) y FRET INDEX (imágenes procesadas con el plug-in "FRET Analyzer"; cuarta columna). B, D y F. Se presenta un análisis cuantitativo de FRET INDEX.



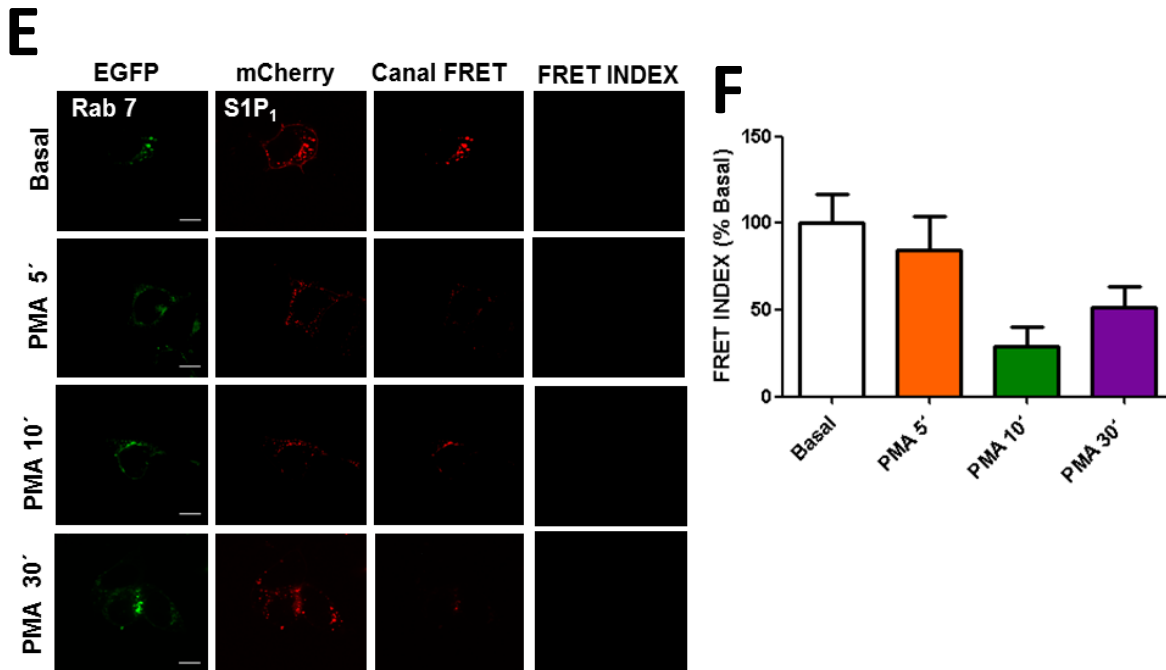


Figura 16. Asociación del receptor de S1P₁ y las proteínas Rab5 y Rab9. Imágenes de células coexpresando el receptor S1P₁-mCherry y Rab5, Rab9 y Rab7 etiquetadas con la proteína EGFP. En el basal el receptor de S1P₁ se encuentra principalmente delineando la membrana plasmática y las proteínas Rab se localizan en el citosol. A, C y E. Las células fueron incubadas a diferentes tiempos en ausencia (Basal) o presencia de PMA (1 μM). Las células fueron fijadas y observadas en microscopia confocal. Las imágenes son presentadas como: Fluorescencia de EGFP (EGFP fue excitada y su fluorescencia fue adquirida; primer columna), fluorescencia de mCherry mCherry (mCherry fue excitada y su fluorescencia fue adquirida; segunda columna), Canal FRET (EGFP fue excitada y el láser que excita a la proteína mCherry se mantuvo apagado y la fluorescencia de mCherry fue adquirida; tercer columna) y FRET INDEX (imágenes procesadas con el plug-in "FRET a Analyzer"; cuarta columna). B, D y F. Se presenta un análisis cuantitativo de FRET INDEX.

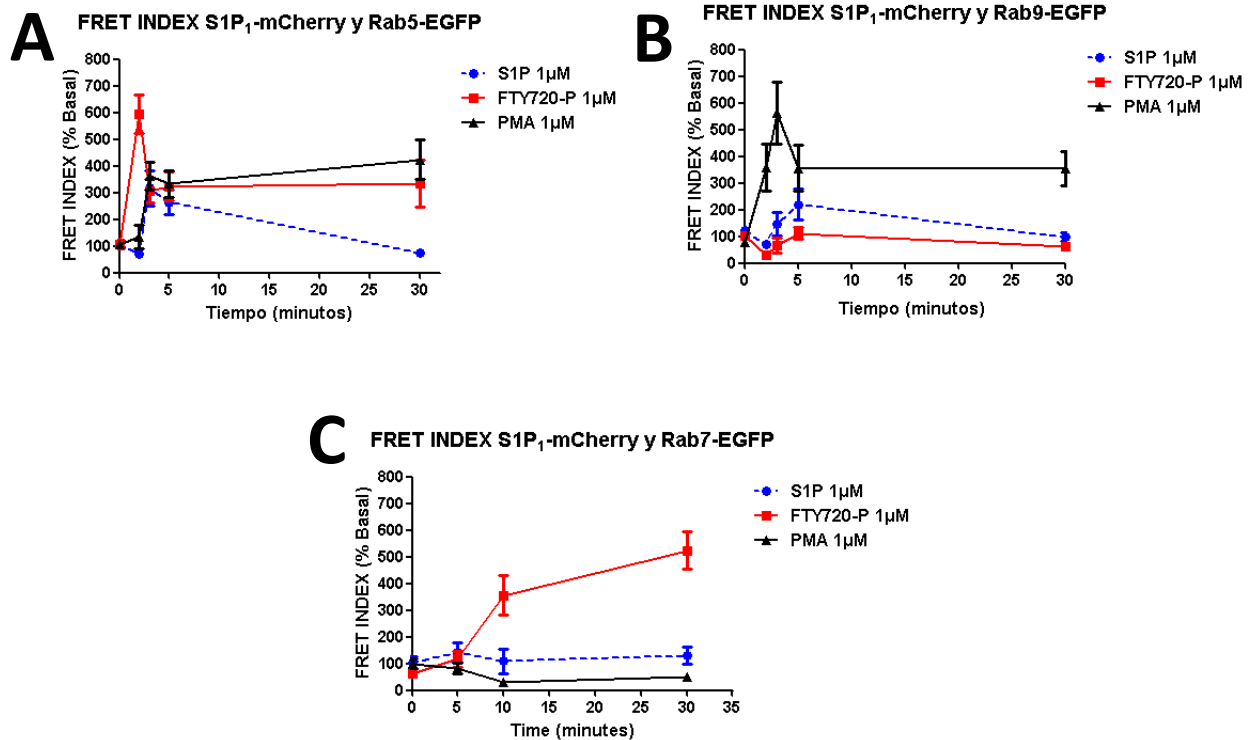


Figura 17. FRET INDEX del receptor de S1P₁ con las proteínas Rab5, Rab9 y Rab7. Asociación del receptor de S1P₁ con las proteínas Rab5, Rab9 y Rab7 por la activación de S1P (1 µM), FTY720-P (1 µM) y PMA (1 µM). En A) los 2 ligandos y el PMA permiten la asociación del receptor con Rab5. En B) solo S1P y PMA permite la asociación del receptor con Rab9 y C), solo FTY720-P permite la asociación del receptor con Rab7.

5.3. Efecto de esfingosina-1-fosfato (S1P), el forbol miristoil acetato (PMA) y FTY720-P en la fosforilación del receptor S1P₁

La internalización de los GPCRs puede ser ocasionada por agonistas o por otros estímulos. El proceso comienza a tiempos cortos después de la activación del receptor y contribuye a la desensibilización del receptor, que representa un importante mecanismo de autorregulación. El receptor de S1P₁ al ser estimulado por el agonista S1P presenta una desensibilización homóloga y se fosforila por GRK2 (Pueyo *et al.*, 2008), al utilizar el PMA (análogo del DAG) existe una desensibilización heteróloga y el receptor se fosforila por PKC (Watterson *et al.*, 2002). Por ensayos de fosforilación se observó que al estimular las células que expresan el receptor de S1P₁-mCherry con S1P (1 µM) por 15 minutos aumenta la fosforilación respecto a las células no estimuladas (basal) (figura 18) y con PMA (1 µM) por 15 minutos también aumenta la fosforilación respecto al basal (1 µM) (figura 18 A). Estos resultados confirman lo observado anteriormente por Watterson y colaboradores (2002), quienes establecen que la activación de PKC por PMA induce la fosforilación y desensibilización del receptor de S1P₁. Este efecto de desensibilización se observó en ensayos que mide la concentración intracelular de Ca²⁺ *in vivo*. Al preincubar las células con PMA (1 µM) por 10 minutos y al estimular las células se bloqueó de manera significativa la liberación de Ca²⁺ intracelular, respecto al control (figura 18 B). Estudios previos en nuestro

laboratorio sugieren que las isoformas clásicas de PKC α y β son las que regulan la fosforilación del receptor. Por experimentos de inhibición farmacológica para las isoformas de PKC α y β sugieren que el receptor de S1P₁ no se desensibiliza en presencia de PMA, además por ensayos de coimmunoprecipitación durante un curso temporal de PMA las isoformas α y β se encuentran asociadas independientemente del estímulo (basal). A pesar de esta asociación basal, las isoformas α y β comienzan a reclutarse a tiempos cortos y tiempos largos, respectivamente. Por último la fosforilación del receptor S1P₁ en mutantes negativas y utilizando shRNA de PKC α y β marcadamente disminuyen la fosforilación del receptor de S1P₁ (Morquecho-León *et al.*, 2013).

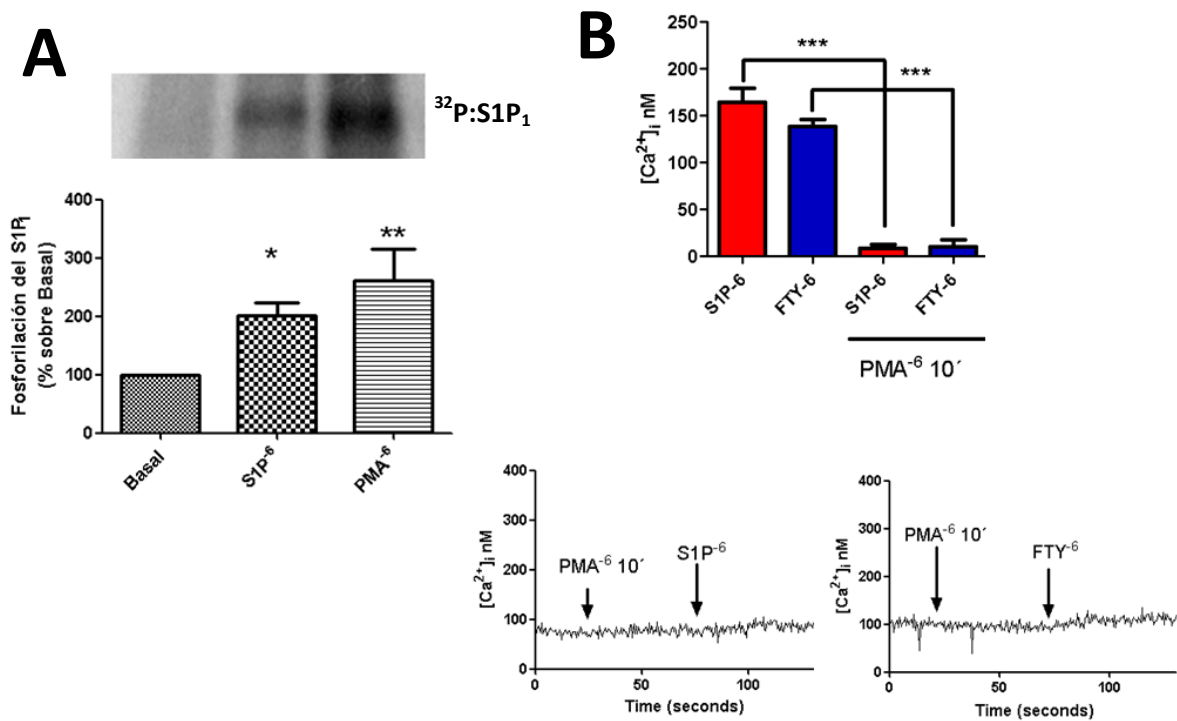


Figura 18. Efecto de esfingosin-1-fosfato (S1P) y el forbol miristoil acetato (PMA) en la fosforilación del receptor S1P₁. A. Las células fueron incubadas por 15 minutos con S1P y PMA a las concentraciones indicadas. B. Desensibilización del receptor de S1P₁ por PMA. Promedios son graficados, las líneas verticales el error estándar de 5 a 6 determinaciones usando diferentes preparaciones celulares.

También se determinó el estado de fosforilación del receptor al estimular con S1P (1 μM) y FTY720-P (10 μM) en un curso temporal. La fosforilación máxima se da a los 15 minutos y a los 30 minutos se nota una disminución, pero no llega a la fosforilación basal (figura 18 A y B). Algo muy interesante es que el antagonista FTY720-P fosforila más el receptor de S1P₁, respecto a S1P (figura 19 A y B). En la actualidad se ha propuesto que la fosforilación (desensibilización) de GPCRs es regulado como un código de barras en donde la proteína cinasa fosforila con una cinética diferente en la tercera asa intracelular y el COOH terminal de acuerdo al ligando. Como se comentó anteriormente el receptor de S1P₁ se fosforila en los residuos Ser₃₅₁, Ser₃₅₂ y Ser₃₅₅ en

presencia de FTY720P (figura 9) (Oo *et al.*, 2011) y la Tyr₁₄₃, T₃₇₁, S₃₇₄ y S₃₇₅ son fosforilados en presencia de S1P (Arnon *et al.*, 2011; Chavez *et al.*, 2015). Estas diferencias en la fosforilación de aminoácidos afectan a las proteínas Rab que se asocian durante el tráfico vesicular. Los experimentos de FRET sugieren que al estimular con S1P (1 μM) y PMA (1 μM) el receptor se fosforila, la internalización es mediada por Rab5 y el tráfico a endosomas tardíos es por Rab9 y no por Rab7. En presencia de FTY720-P (1 μM), el receptor se fosforila, la internalización es mediada por Rab5 y el tráfico a endosomas tardíos es regulada por Rab7 y no por Rab9.

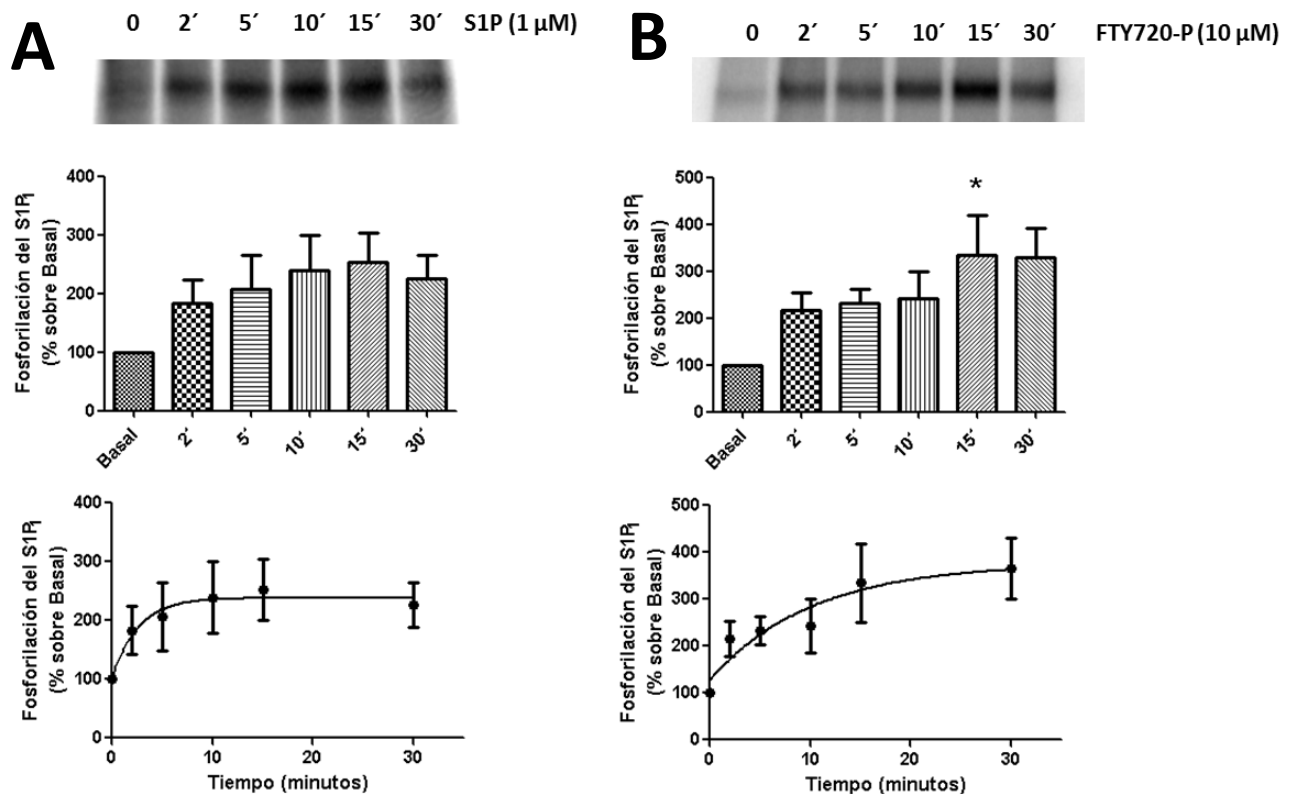


Figura 19. Efecto de esfingosina-1-fosfato (S1P) y FTY720-P en la fosforilación del receptor S1P₁. Curso temporal de la fosforilación del receptor de S1P1 bajo la acción de (A) S1P (1 μM) y (B) FTY720-P (10 μM). Se grafican los promedios, las líneas verticales representan el error estándar de 5 a 6 determinaciones usando diferentes preparaciones celulares.

Conclusiones y perspectivas

Conclusiones

El receptor de S1P₁ es fosforilado en respuesta a la S1P, el FTY720-P y por PMA, esta fosforilación es llevada a cabo por GRK2 al estimular con S1P y FTY720-P y por PKC al utilizar PMA. Los residuos de aminoácidos fosforilados permiten la asociación de diferentes proteínas que permiten la desensibilización e internalización del receptor. Cuando el receptor es activado por S1P y PMA (desensibilización homóloga y heteróloga, respectivamente) el receptor se asocia a Rab5 en los endosomas tempranos y a Rab9 en los endosomas tardíos, pero no se asocia a Rab7. Al activar con FTY720-P el receptor se asocia a Rab5 en los endosomas tempranos y a Rab7 en los endosomas tardíos, pero no se asocia a Rab9, esto refleja la existencia de diferencias en el tráfico vesicular del receptor de S1P₁ que es mediado por el agonista que active el receptor. Con base en los resultados obtenidos en el proyecto se proponen 2 modelos de tráfico vesicular (figura 20 y 21).

Perspectivas

- Realizar coinmunoprecipitación del receptor de S1P₁ con Rab5, Rab9 y Rab7 al activar el receptor con S1P, FTY720-P y PMA, para corroborar la interacción de las proteínas Rab con el receptor.
- Realizar estudios de FRET con las dominantes negativas de las proteínas Rab5, Rab9 y Rab7 al activar el receptor con S1P, FTY720-P y PMA, para corroborar el papel de estas proteínas Rab en la desensibilización del receptor.
- Realizar estudios de FRET del receptor de S1P₁ con las proteínas Rab11 y Rab4 al activar el receptor con S1P, FTY720-P y PMA, que están involucradas en el reciclaje a la membrana plasmática.
- Realizar experimentos con diferentes inhibidores de citoesqueleto para observar su papel en el tráfico vesicular de receptor para S1P₁.

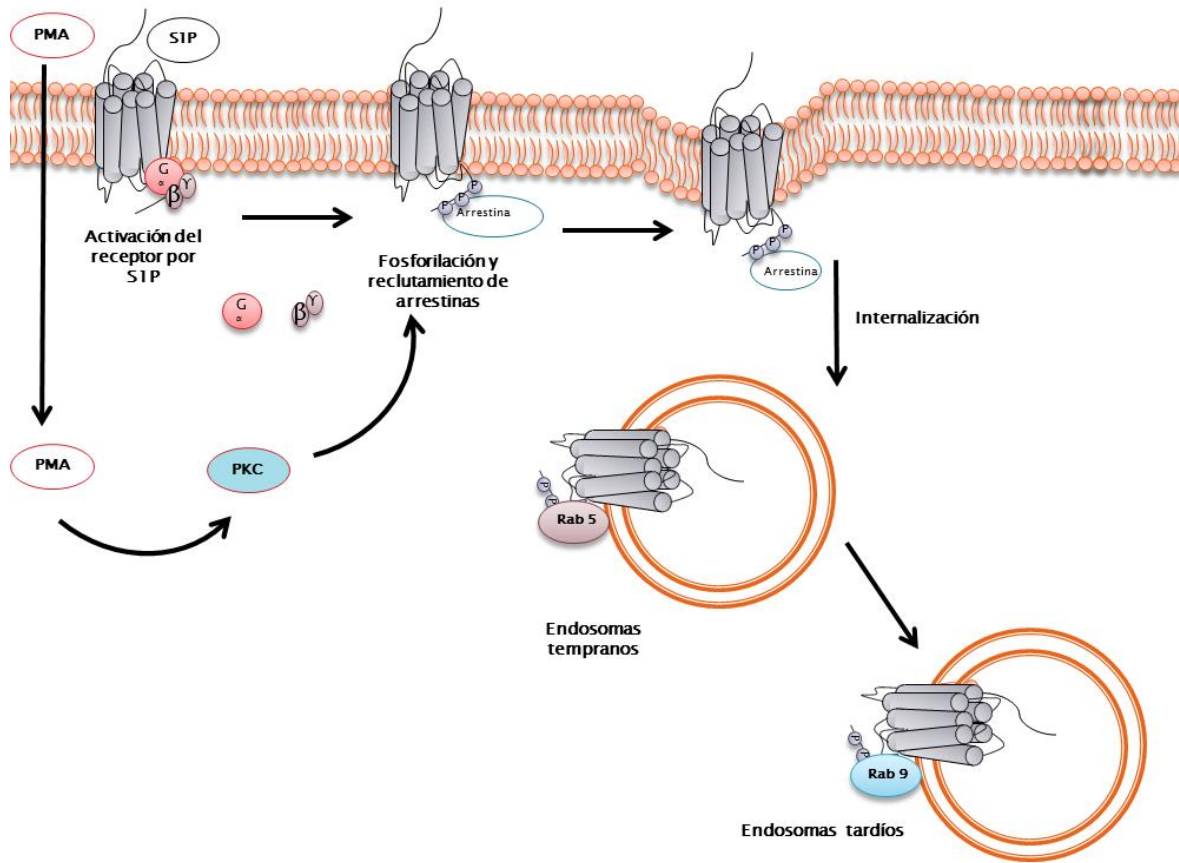


Figura 20. Modelo de tráfico vesicular del receptor de S1P₁ durante la desensibilización homóloga y heteróloga. En la desensibilización homóloga y heteróloga el receptor de S1P₁ se internaliza por efecto de su agonista, se asocia con Rab5 en los endosomas tempranos y con Rab9 en los endosomas tardíos.

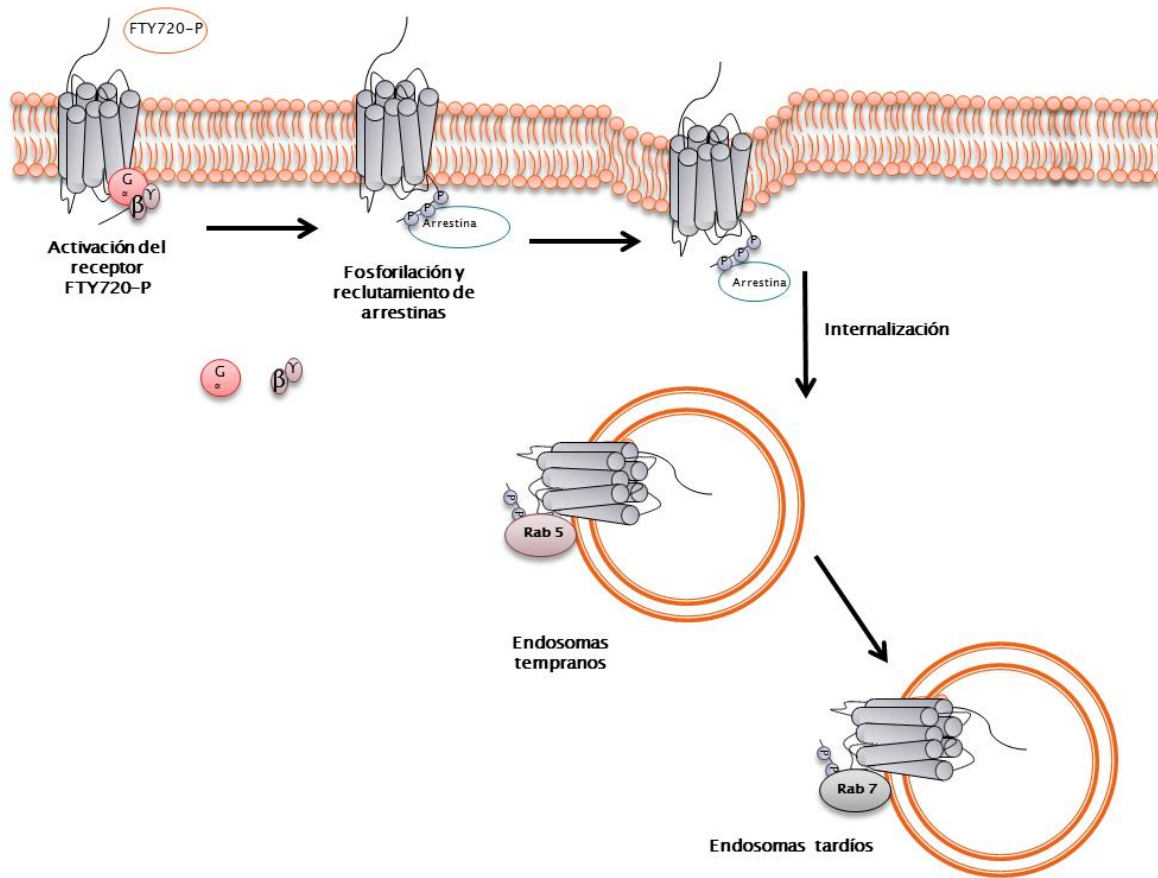


Figura 21. Modelo de tráfico vesicular del receptor de S1P₁ por FTY720-P. Al activar el receptor de S1P₁ con FTY720-P se internaliza por efecto de su agonista, se asocia con Rab5 en los endosomas tempranos y con Rab7 en los endosomas tardíos.

Soluciones utilizadas

Solución Krebs-Ringer-HEPES

NaCl 120 mM

KH_2PO_4 1.2 mM

MgSO_4 1.2 mM

KCl 4.75 mM

Dextrosa 10mM

Hepes 20 mM

CaCl_2 1.27 mM

BSA 0.05 %

Ajustar pH a 7.4

Buffer de Fosfatos Salino (PBS)

NaCl

$\text{Na}_2 \text{HPO}_4$

$\text{Na}_2 \text{H}_2\text{PO}_4$

Ajustar pH a 7.4

Buffer de lisis

Tris-HCl 50 mM

NaCl 150 mM

SDSD 0.1%

Tritón 1%

NaF 50 mM

Na_3VO_4 100 μM

β -glicerofosfato 10 mM

$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM

p-Serina 1mM

p-Tirosina 1 mM

p-Treonina 1 mM

EDTA 5 mM

Leupectina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$

PMSF 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Inhibidor de tripsina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Ajustar el pH a 7.5

Solución de lavado

Hepes 50 nM

NaCl 100 nM

NaHPO₄ 50 nM

NaF 10 nM

Tritón 1%

SDS 0.05 %

Ajustar el pH a 7.4

Buffer de carga

SDS 10%

Tris 1 M pH 6.8

Glicerol a una concentración final del 10%

β- mercaptoenol a una concentración final del 10%

Bromofenol a una concentración final de 0.01 %

Referencias

- Allende, M. L., Sasaki, T., kawai, H., Olivera, A., Mi, Y. van Echten-Deckert. 2004. Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720. *J. Biol. Chem.* 279: 52487-52492.
- Arnon, T. I., Xu, Y., Lo, C., Pham, J., An, S., Cyster, J. G. 2011. GRK2-dependent S1PR1 desensitization is required for lymphocytes to overcome their attraction to blood. *Science.* 333:1898-1903
- Bahouth, S. W., Wang, H. Y., y Malbon, D. C. C. 1991. Immunological approaches for probing receptor structure and function. *Trends Pharmacol. sci.* 12: 338–343.
- Benovic, J. L., Pike, L. J., Cerione, R. J., Staniszewski, C., Yoshimasa, T., Codina, J. 1985. Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 260: 7094–7101.
- Brinkmann, V., Davis, M. D., Heise, C. E., Albert, R., Cottens, S., Hof, R. 2002. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* 277: 21453–21457.
- Brinkmann, V. 2007. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol Ther.* 115: 84–105.
- Castillo-Badillo, J. A., Sánchez-Reyes, O. B., Alfonso-Méndez, M. A., Romero-Ávila, M. T., Reyes-Cruz, G., & García-Sáinz, J. A. 2015. α 1B- Adrenergic Receptors Differentially Associate with Rab Proteins during Homologous and Heterologous Desensitization. *PLoS ONE.* 10:1-27.
- Chalfant, C. E., & Spiegel, S. 2005. Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J. Cell Sci.* 118: 4605–4612.
- Chavez, A., Schmidt, T., Yazbeck, P., Rajput, C., Desai, B., Sukriti, S., Adams-Giantsos, K., Knezevic, N., Malik, B. A., & Mehta, D. 2015. S1P1 Tyr143 phosphorylation downregulates endothelial cell surface S1P1 expression and responsiveness. *J. Cell Sci.* 128: 878-887.
- Compston, A. & Coles, A. 2002. Multiple sclerosis. *Lancet.* 359:1221–1231.
- Curtis Helena, Aráoz Juan y Behrens Verónica. *Biología.* 7ª edición. Buenos Aires. Editorial Medica Panamericana. 2008.
- Cuviller, O., Rosenthal, D. S., Smulson, M. E., & Spiegel, S. 1998. Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas- and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 273: 2910-2916.
- Dale, L. B., Seachrist, J. L., Babwah, A. V., & Ferguson, S. S. G. 2004. Regulation of Angiotensin II Type 1A Receptor Intracellular Retention, Degradation, and Rab11 GTPases. *J. Biol. Chem.* 279:13110-13118.
- Dong, C., Lingling, Y., Xiaoping, Z., Hua, G., May, L., Lam, W., Claycomb, H. X. 2010. Rab8 interacts with distinct motifs in α 2B- and β 2-adrenergic receptors and differentially modulates their transport. *J. Biol. Chem.* 285:20369-20380.
- Dongeun, P., Deok-Young, J., Chang-Won, L., Kweon-Haenh, L., and Sue, Goo, R. 1993. Activation of Phospholipase C Isozymes by G Protein $\beta\gamma$ subunits. *J. Biol. Chem.* 268:4573-4576.
- Fieger, C. B., Huang, M. C., Van Brocklyn, J. R., & Goetzl, E. J. 2005. Type 1-phosphate G protein-coupled receptor signaling of lymphocyte functions requires sulfatation of its extracellular amino-terminal tyrosines. *FASEB journal:* 19: 1926-8.

- Fujino, M. *et al.* 2003. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by FTY720 treatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305: 70–77.
- Futerman, H. A., & Hannun, A. Y., 2004. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO*. 5: 777-1782.
- Gaborik, Z. & L. Hunyady. 2004. Intracellular trafficking of hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 15:286-293.
- García-Sáinz, J. A. 1981- Decreased Sensitivity to alpha2 Adrenergic Amines, Adenosine and Prostaglandins in White Fat Cells From Hamsters Treated with Pertussis Vaccine. *FEBS letters.* 126: 306-308.
- Garcia-Sainz, J. A., Vázquez-Cuevas, F. G., & Romero-Ávila, M. T. (2001). Phosphorylation and desensitization of α 1d-adrenergic receptors. *Biochem. J.* 353(3), 603–610.
- Gardell, S. E., Dubin, A. E., Chun J. 2006. Emerging medicinal roles for lysophospholipid signaling. *Trends Mol Med.* 12: 65–75.
- Goody, R. S., Rak, A. & Alexandrov, K. 2005. The structural and mechanistic basis for recycling of Rab proteins between membrane compartments. *Cell. Mol. Life Sci.* 62:1657-1670.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-50.
- Hachet-Haas, M., Converset, N., Marchal, O., Matthes, H., Gioria S., et al. 2006. FRET and colocalization analyzer—a method to validate measurements of sensitized emission FRET acquired by confocal microscopy and available as an ImageJ Plug-in. *Microsc. Res. Tech.* 69: 941–956.
- Hannun, Y. A. 1994. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J. Biol. Chem.* 269: 3125-3128.
- Hausdorff, W. P., Caron, M. G., Lefkowitz R. J. 1990. Turning off the signal desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEBJ* 4: 2881–2889.
- Hla, T., Venkataram., K. & Michaud, J. 2008. The vascular S1P gradient-cellular sources and biological significance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1781: 477-82.
- Hla, T., Maciag, T. 1990. An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 265: 9308-13.
- Ishii, I., Friedman, B., Ye, X., Kawamura, S., McGiffert, C., Contos, J. J., *et al.* 2001. Selective loss of sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LP(B3)/EDG-3. *J. Biol. Chem.* 276:33697–33704.
- Jayadev, S., Lui, B., Bielawska, A. E., Lee, J. Y., Nazaire, F., Pushkareva, M. Y., Obeid, L. M. & Hannun, Y. A. 1995. Role for ceramide in cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* 270: 2047:2052.
- Kang, Z. *et al.* 2010. Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *Immunity.* 32: 414–425.
- Kelly, E., Bailey, C. P., & Henderson, G. 2008. Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br. J. Pharmacol.* 153: S379-S388.
- Kivisakk, P. *et al.* 2004. Expression of CCR7 in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Ann. Neurol.* 55: 627–638 .
- Kleuss, C., Raw, a S., Lee, E., Sprang, R. R., & Gilman, a G. 1994. Mechanism of GTP hydrolysis by G proteins alpha subunits. *PNAS.* 91:9828-9831.
- Kono, M., Belyantseva, I. A., Skoura, A., Frolenkov, G. I., Starost, M. F., Dreier, J. L., *et al.* 2007. Deafness and stria vascularis defects in S1P2 receptor-null mice. *J. Biol. Chem.* 282: 10690–10696.

- Kono, M., Mi, Y., Liu, Y., Sasaki, T., Allende, M. L., Wu, Y. P., *et al.* 2004. The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 279: 29367–29373.
- Lee, M. J., Van Brocklyn J. R., Thangada, S., Liu, C. H., Hand, A. R., Menzeleev, R. *et al.* 1998. Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* 279: 1552–1555.
- Lee, M. J., Thangada, S., Paik, J., H., Sapkota, G., P., Ancellin, N., Chae, S., S., Wu, M. Morales Ruiz M, Sessa WC, Alessi D., R., & Hla T. 2001. Akt-Mediated Phosphorylation of the G Protein-Coupled Receptor EDG1 Is Required for Endothelial Cell Chemotaxis. *Mol. Cel.* 8: 693-704.
- Lepley, D., *et al.* 2005. The G protein –coupled receptor S1P2 regulates Rho/Rho kinase pathway to inhibit tumor cell migration. *Cancer Research.* 65: 3788-3795.
- Liu, Y., Wada, R., Yamashita, T., Mi, Y., Deng, C. X., Hobson JP *et al.* 2000. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J. Clin. Invest.* 106: 951–961.
- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Charon, M. G., Lefkowitz R. J., 1990. Beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science.* 248:1547-1550.
- MacLennan, A. J., Carney, P. R., Zhu, W. J., Chaves, A. H., Garcia, J., Grimes, J. R., *et al.* 2001. An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability. *Eur. J. Neurosci.* 14: 203–209.
- McCaffrey, M. W., Bielli, A., Cantalupo, G., Mora, S., Roberti, V., Santillo, M., Drummond, F., & Bucci C. 2001. Rab4 affects both recycling and degradative endosomal trafficking. *FEBS Letters.* 495:21-30.
- Malbon, Craig. C. 2005. G proteins in development. *Nature.* 6:689:701.
- Matloubian, M. *et al.* 2004. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature.* 427: 355–360.
- Merrill, A. H, Jr., Hannun, Y. A., Bell, R. M., 1993. Introduction: sphingolipids and their metabolites in cell regulation. *Adv. Lipid. Res.* 25: 1–24.
- Morquecho-León M. A., Bazúa-Valenti, S., Romero-Ávila M. T., & García-Sáinz A. 2013. Isoforms of protein Kinase C involved in phorbol ester-induced sphingosine 1-phosphate receptor 1 phosphorylation and desensitization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1843:327-334.
- Morris, A. J. & Malbon, C. 1999. Physiological Regulation of G Protein-Linked Signaling. *Physiol. Rev.* 79: 1333-1430.
- Murata, N., Sato, K., Kon, J., Tomura, H., Yanagita, M., Kuwabara, A. *et al.* 2000. Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem J.* 352: 809–815.
- Nayak, D. *et al.* 2010. Sphingosine kinase 1 regulates the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide in activated microglia. *Neuroscience.* 166: 132–144.
- Neer, J, Eva. 1994. G proteins: Critical control points for transmembrane signals. *Protein Science.* 3:3-14.
- Nelson, Davil. L., & Cox, Michael. M. Lehninger. Principles of Biochemistry. 4a edición. New York. Editorial Omega. 2008.
- Obinata, H. & Hla, T. 2012. Sphingosine 1-phosphate in coagulation and inflammation. *Semin. Immunopathol.* 34: 73-91.
- Ohno, T., Ito, A., Ogata, R., Hiraga, Y., Igarashi, Y., & Kihara, A. 2009. Palmitoylation of the sphingosine 1-phosphate receptor S1P is involved in its signaling functions and internalization. *Genes Cells.* 14:911-23.

- Okajima, F. 2002. Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator? *Biochim. Biophys. Acta.* 1582: 132–137.
- Olivera, A., & Spiegel, S. 1993. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature.* 365: 557-560.
- Oo, M. L., Thangada, S., Wu, M. T., Liu, C. H., Macdonald, T. L., Lynch, K. R., *et al.* 2007. Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. *J. Biol. Chem.* 282: 9082–9089.
- Oo, M. L., Chang, S., Thangada, S., Wu, M., Rezauk, K., Blaho, V. & Hwang, S. 2011. Engagement of S1P 1-degradative mechanisms leads vascular leak in mice. *The journal of clinical investigation.* 121: 2290-2300.
- Pappu, R., Schwab, S. R., Cornelissen, I., Pereira, J. P., Regard, J. B., Xu, Y. *et al.* 2007. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* 316: 295–298.
- Pfeffer, S. R. 2013. Rab GTPase regulation of membrane identity. *Current Opinion in Cell Biology.* 2013:414-419.
- Pueyo-Jurado M., Campos, M. P. & Murga, C. 2008. GRK2-Dependent Desensitization Downstream of G Proteins. *J. Recep. Sig. Transd.* 28: 59-70.
- Rosenfeld, J. L., B. J. Knoll, and R. H. Moore. 2002. Regulation of G-protein-coupled receptor activity by rab GTPases. *Receptors Channels.* 8:87-97.
- Schuchardt, M., Tolle, M., Prufer, J., & Van der Giet, M. 2011. Pharmacological relevance and potential of sphingosine 1-phosphate in the vascular system. *Br. J. Pharmacol.* 163:1140-1162.
- Sekar, R. B., & Periasamy, A. 2003. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J. Cell. Biol.* 160: 629-633.
- Shumay, E., Shai G., Hsien-yi, W., & Craig, C. M. 2004. Trafficking of beta 2-adrenergic receptors: insulin and beta-agonists regulate internalization by distinct cytoskeletal pathways. *J. Cell. Sci.* 117 (Pt 4): 593-600.
- Somsel, R., J. & A. Wandinger-Ness. 2000. Rab GTPases coordinate endocytosis. *J. Cell. Sci.* 113 (Pt 2):183-192.
- Spiegel, S., Milstien, S. 2002. Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J. Biol. Chem.* 277:25851-25854.
- Sunahara, R. K., Dessauer, C. W., & Gilman, A. G. 1996. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36: 461–480.
- Takuwa, Y., Okamoto, Y., Yoshioka, K., Takuwa, N. 2008. Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system. *Biochim. Biophys. Acta.* 1781: 483–488.
- Tower-Gilchrist, C., Lee, E., & Sztul, E. 2011. Endosomal trafficking of the G protein-coupled receptor somatostatin receptor 3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413:555-560.
- Van Brocklyn, J. R., Lee, M. J., Menzeleev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O. *et al.* (1998). Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J. Cell. Biol.* 142:229–240.
- Vázquez-Prado, J., & García-Sáinz, J. A. (1996). Effect of phorbol myristate acetate on α 1-adrenergic action in cells expressing recombinant α 1-adrenoceptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* 50(1), 17–22.

- Vesper, H., Schmelz, E., Nikolova-Karakashian, M. N., Dillehay, D. L., Lynch, D. V., & Merrill, J. R. A. 1999. Sphingolipids in food and the Emerging Importance of Sphingolipids to Nutrition. *J. Nutr.* 129: 1239-1250.
- Voet, Donald & Voet, G. Judith. Bioquímica. 3era edición. Buenos aires. Editorial Medica Panamericana. 2006.
- Watterson, K. R., Johnston, E., Chalmers, C., Pronin, A., Cook, S. J., Benovic, J. L., & Palmer T.M. 2001. Dual regulation of EDG1/S1P1 Receptor Phosphorylation and Internalization by Protein Kinase C and G-protein-coupled Receptor Kinase 2. *J. Biol. Chem.* 277: 5767-5777.
- Wetschreck, Nina., & Offermanns, Stefan. 2005. Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiol. Rev.* 85: 1159-1204.