

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina de la UNAM
Licenciatura en Investigación Biomédica Básica



Desensibilización del receptor LPA₁ mediada por el receptor GPR120

Tesis para obtener el título de
Licenciado en Investigación Biomédica Básica

Presenta:
Aldo Meizoso Huesca

Tutor:

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz
Instituto de Fisiología Celular
Departamento de Biología Celular y del Desarrollo

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 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.

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

Agradezco el apoyo del CONACyT como Ayudante de Investigador Nacional Nivel III.

Agradezco la asesoría técnica de las Dras. Ma. Teresa Romero Ávila y Rocío Alcántara Hernández. Los estudios de coinmunoprecipitaciones de los receptores y su fosforilación, actualmente en curso se realizan con apoyo del Dr. Sócrates Villegas Comonfort. Agradezco al personal de las Unidades de apoyo del Instituto de Fisiología Celular: Unidad de Imagenología, Unidad de Biología Molecular, Unidad de Cómputo, Taller Electromecánico, Biblioteca y Bioterio.

Índice general

1. Resumen	5
2. Introducción	
2.1 Transducción de señales.....	6
2.2 Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)	8
2.3 Clasificación de GPCRs.....	10
2.4 Desensibilización de GPCRs.....	12
2.5 Dimerización de GPCRs.....	14
2.6 Lípidos bioactivos: LPA y DHA.....	18
2.6.1 LPA.....	19
2.6.2 DHA.....	20
2.7 Desensibilización del LPA ₁ mediada por el GPR120.....	22
3. Planteamiento del problema	23
4. Hipótesis	23
5. Objetivos	24
6. Materiales y métodos	26
6.1 Reactivos.....	27
6.2 Cultivo celular.....	27
6.3 Transfección.....	27
6.4 Cuantificación de la concentración citosólica de calcio ($[Ca^{2+}]_i$).....	28
6.5 Coimmunoprecipitaciones.....	29
6.6 Microscopía confocal.....	30
6.7 Análisis de imágenes.....	31
6.8 Análisis estadístico.....	32

7. Resultados	33
7.1 Expresión transitoria de los receptores LPA ₁ -GFP y GPR120-mCherry en células HEK 293.....	34
7.2 Desensibilización de LPA ₁ mediada por GPR120.....	35
7.3 Reversibilidad de la desensibilización de LPA ₁ mediada por GPR120.....	36
7.4 Interacción del GPR120 con LPA ₁ dependiente de ligando.....	38
7.4.1 FRET.....	38
7.4.2 Coinmunoprecipitaciones.....	44
7.5. Internalización de los receptores.....	45
8. Discusión	48
9. Conclusiones	54
10. Perspectivas	55
11. Referencias	56

1. Resumen

La finalidad del presente proyecto es explorar la desensibilización del receptor LPA₁ mediada por el receptor GPR120, así como analizar si en el sentido opuesto, la activación del receptor LPA₁ tiene efectos sobre el receptor GPR120.

En un sistema de sobreexpresión transitoria de los dos receptores de interés, se evaluó la liberación intracelular de calcio en respuesta a estímulos de ácido lisofosfatídico (LPA) o ácido docosahexaenóico (DHA, ligando del receptor GPR120) como un indicativo de la activación de los receptores, observándose que el tratamiento con DHA abate el incremento de calcio intracelular inducido por LPA. En contraste, un pretratamiento con LPA no tiene repercusiones en la capacidad de respuesta de las células a DHA.

Diversos estudios sugieren que la dimerización u oligomerización de GPCRs puede resultar en modificaciones conformacionales que modifiquen propiedades farmacológicas de los receptores, alterando distintas características como la afinidad por su ligando o la afinidad por proteínas intracelulares con las que el receptor interacciona y que son indispensables para las cascadas de señalización activadas. Por métodos biofísicos y bioquímicos se determinó que la activación del GPR120 induce un incremento en la interacción con el receptor LPA₁ con respecto a una condición basal. Observamos que los receptores interaccionan de manera dependiente del tiempo del estímulo, así como de manera dosis-dependiente.

La internalización es un mecanismo de desensibilización ampliamente descrito en el que un receptor es transportado de la membrana al interior de la célula, privándolo del contacto con su ligando extracelular. A pesar de mostrarse una desensibilización a LPA inducida por DHA, el receptor LPA₁ no cambia su localización durante este evento de desensibilización, permaneciendo predominantemente en membrana.

Los datos obtenidos sugieren que durante la desensibilización del receptor LPA₁ mediada por el receptor GPR120 hay un incremento en la interacción entre los receptores y que la desensibilización es independiente a la internalización del receptor LPA₁.

2. Introducción

2.1. *Transducción de señales.*

La célula cuenta con mecanismos para adaptarse a su entorno a través del reconocimiento de moléculas como hormonas, neurotransmisores o nutrientes, por mencionar algunos ejemplos. Estas moléculas, en términos generales, se conocen como “estímulos”. Estos mecanismos son esenciales para la vida, de esta manera una célula puede adaptarse a las condiciones en las que se encuentra.

Al reconocimiento de un estímulo específico le sigue la activación de programas intracelulares que repercuten en la fisiología celular, por ejemplo aumentando la tasa de proliferación, induciendo diferenciación celular, activando programas de muerte celular programada, modulando la expresión de genes específicos, entre otros eventos.

En conjunto, al reconocimiento de un estímulo y la consecuente activación de programas intracelulares se le llama transducción de señales. En términos generales los componentes de un sistema de transducción de señales son: la señal, mensaje o estímulo, que puede ser de distinta naturaleza química y se conoce en forma genérica como ligando; un receptor, proteína encargada de interactuar con el ligando; y los componentes efectoros (proteínas) que son activados una vez que el receptor interactúa con su ligando.

Existen cuatro grandes familias de receptores: los receptores canal, los receptores con actividad enzimática, los receptores nucleares y los receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs). (Figura 1).

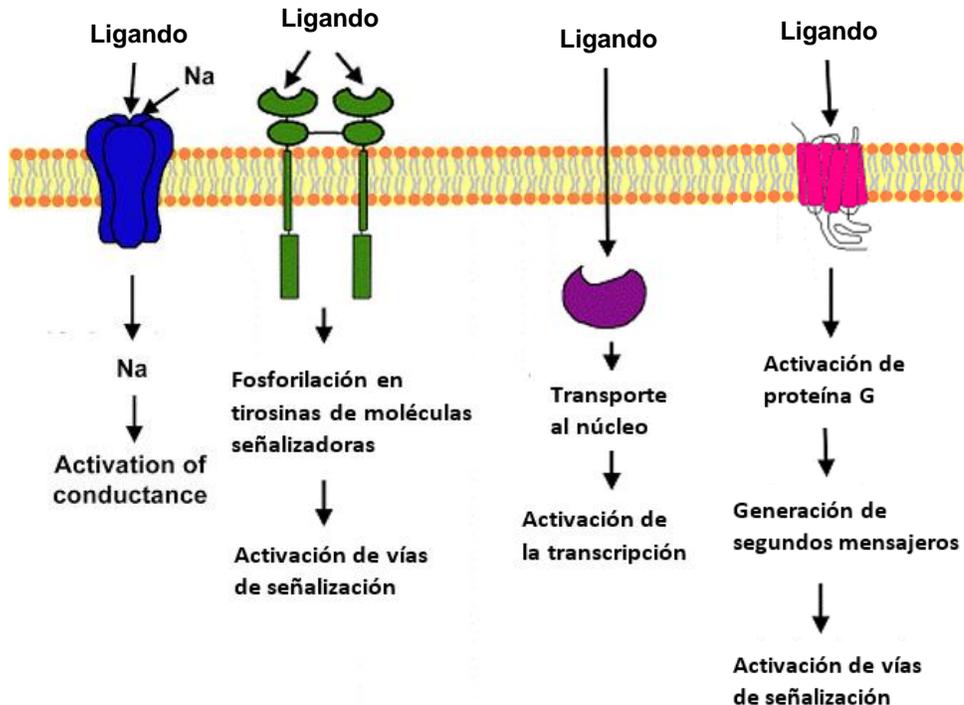


Figura 1. Familias de receptores. A través de la interacción con un ligando extracelular o intracelular receptor nuclear, los receptores activan vías de señalización, la movilización de iones a través de la membrana celular o la transcripción de genes. Imagen modificada de Molecular Biology of the Cell, 2002.

Los receptores canal también conocidos como canales modulados por ligando, son canales que pueden entrar en su estado activo y permitir el flujo de iones a través de la membrana al interactuar con un ligando. Un ejemplo de esta familia de receptores es el canal TRPV1, el cual es activado al interactuar en su extremo carboxilo terminal con el ácido lisofosfatídico, permitiendo el flujo de cationes a través de la membrana celular (Nieto-Posadas *et al.*, 2011).

Los receptores con actividad enzimática comúnmente son receptores para factores de crecimiento. La interacción con su ligando induce la dimerización de los monómeros del receptor, que resulta en una transfosforilación de tirosinas de sus dominios intracelulares. Los sitios fosforilados de los receptores funcionan como sitios de andamiaje para que proteínas se asocien e inicien cascadas de activación de enzimas, río abajo en la vía de señalización (Alberts B, *et al.* 2016).

Los receptores nucleares son proteínas que funcionan como factores de transcripción. Estos receptores se localizan en el citoplasma, donde son activados por ligandos capaces de atravesar la membrana celular (por ejemplo: progesterona o estrógenos). Una vez activados, estos receptores con dominios de unión a DNA migran al núcleo donde modulan la transcripción de genes blanco (Tata, 2002).

Los receptores estudiados en este trabajo son dos receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas, por lo que se le dará más atención a la descripción de esta familia de receptores que a las tres anteriores.

2.2. Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)

Los receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas constituyen una superfamilia de proteínas de siete dominios transmembranales que sensan estímulos extracelulares y transmiten una señal al interior de la célula. Los ligandos de esta familia de receptores son de diversa naturaleza, encontrando péptidos, aminas bioactivas, lípidos bioactivos, fotones, entre otros (Rotein, *et al* 2016).

Las proteínas G heterotriméricas están formadas por las subunidades α , β y γ . En su estado inactivo la subunidad α se encuentra unida a GDP. Existen cuatro familias de proteínas $G\alpha$: $\alpha_{12/13}$, $\alpha_{q/11}$, α_s y α_i . La activación de cada una resulta en la modulación de distintas proteínas efectoras y en consecuencia, la modulación positiva o negativa de distintas vías de señalización (Figura 2). Brevemente en la tabla 1 se describe el blanco canónico de cada una y su efecto intracelular directo.

Familia	Blanco canónico	Efecto intracelular
G $\alpha_{12/13}$	Activación de RhoA	Remodelamiento del citoesqueleto de actina (Hall and Hall, 2013)
G $\alpha_{q/11}$	Activación de la Fosfolipasa C (PLC)	Incremento de la concentración citosólica de calcio (Exton, 1996)
G α_s	Activación de la Adenilato ciclasa	Incremento de la concentración citosólica de AMP cíclico (Hill and Baker, 2003)
G α_i	Inhibición de la Adenilato ciclasa	Disminución de la concentración citosólica de AMP cíclico (Hill and Baker, 2003)

Tabla 1. Familia de proteínas G. La activación de la proteína G resulta en una modificación en la producción de segundos mensajeros intracelulares.

Al activarse por su ligando, el receptor sufre cambios conformacionales en sus regiones intracelulares que le permiten interactuar con la proteína G. Esto induce el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α y posteriormente la disociación de la misma del dímero $\beta\gamma$, llegando así a su estado activo en el que inicia las cascadas de señalización (Chen, 2005).

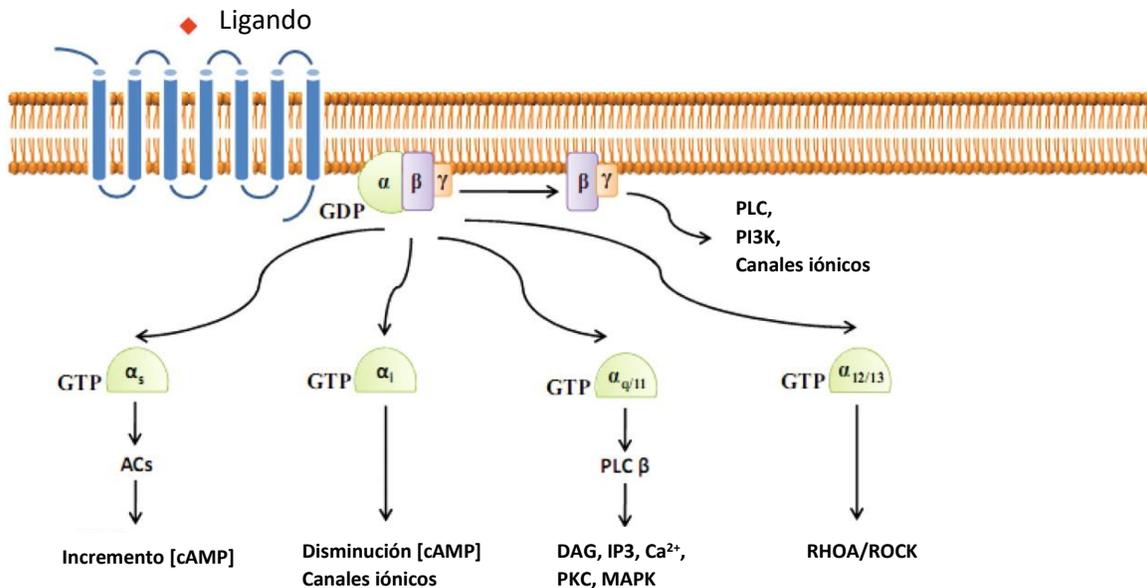


Figura 2. Vías de señalización mediadas por GPCRs. La activación de los GPCRs por ligandos extracelulares, regula distintos procesos celulares como proliferación, migración, supervivencia, entre otros. Existen 4 familias de proteínas G ($G_{\alpha_{12/13}}$, $G_{\alpha_{q/11}}$, G_{α_s} y G_{α_i}) que pueden modular estos procesos. Imagen modificada de Huang *et al.*, 2012.

2.3. Clasificación de GPCRs.

De acuerdo con características estructurales y funcionales, en términos generales los receptores acoplados a proteínas G se pueden dividir en seis clases: A, B, C, D, E y F. (Figura 3) (Alexander SPH, et al, 2015).

Los receptores de clase A o de la familia de rodopsina constituyen el grupo más abundante de GPCRs. Estructuralmente se caracterizan por tener un extremo amino terminal corto. Generalmente esta familia de receptores tiene como ligando moléculas pequeñas como lípidos bioactivos, catecolaminas, fotones, neurotransmisores, entre otros. Estudios estructurales y modelados computacionales han determinado que la interacción de estos receptores con su respectivo ligando puede ser a través de pequeños huecos (“pockets”) formados entre los dominios transmembranales en la frontera de la membrana con el espacio extracelular (Ballesteros, Shi y Javitch, 2001).

Los receptores clase B o de la familia de secretina son una familia de aproximadamente 20 miembros con distintas hormonas y neuropéptidos como ligandos. Durante la unión a ligando participa tanto su extremo amino terminal (más largo que los de un receptor clase A) como las asas extracelulares (Bortolato *et al.*, 2014).

Los receptores clase C o de la familia de receptores metabotrópicos de glutamato se caracterizan por tener un extremo amino terminal muy grande (de 300 a 600 residuos) que forma dos asas separadas por una cavidad que media la interacción ligando/receptor (Chun, Zhang and Liu, 2012)

Los miembros de las familias D y E no se expresan en organismos vertebrados. La clase D de receptores está agrupada por miembros participantes en la determinación del sexo en hongos, teniendo como ligandos a feromonas específicas, mientras que los receptores clase E son receptores de AMP cíclico.

Los receptores de clase F o *Frizzled* son proteínas activadas por lipoglicoproteínas de la familia Wnt. Estructuralmente esta familia se asemeja a los receptores clase A, sin embargo comparten menos del 10% de identidad, carecen residuos

conservados de esta familia y sus asas extracelulares son significativamente más grandes, por lo que se clasifican en otra familia (Wang *et al.*, 2014)

En la figura 3 se muestra una representación esquemática de las cuatro familias de GPCRs expresados en vertebrados.

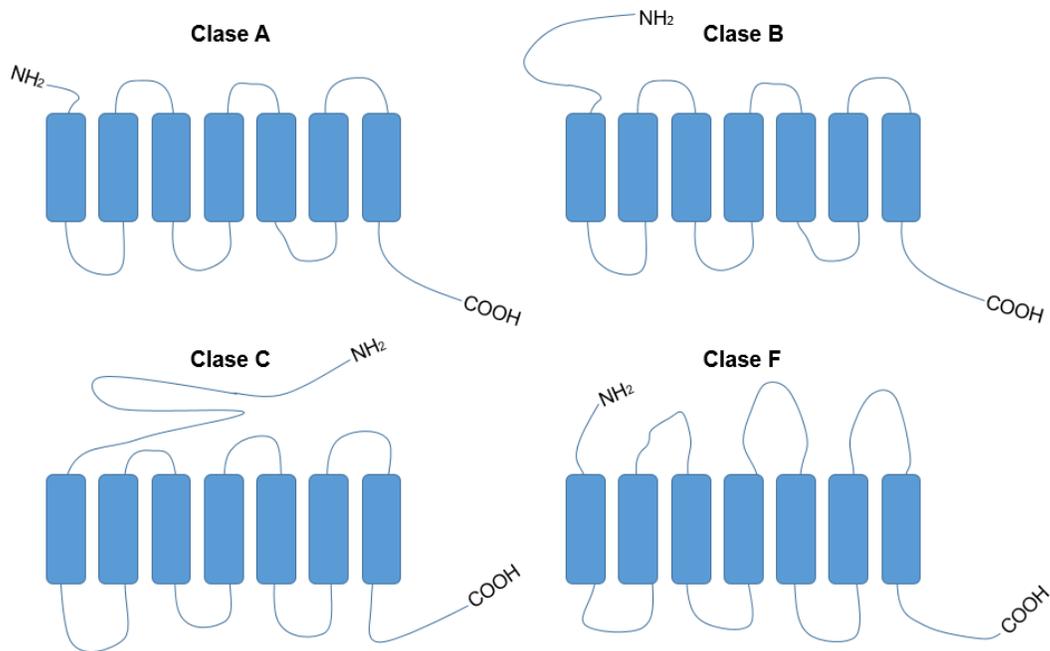


Figura 3. Clases de GPCRs en vertebrados. Representación esquemática de las 4 familias de GPCRs presentes en vertebrados. Imagen modificada de *The GPCR Handbook.*, 2005.

2.4. Desensibilización de GPCRs

Existen mecanismos para “apagar” la actividad de un receptor, de esta manera la célula previene respuestas exacerbadas que comprometan su homeostasis. A este fenómeno se le llama “desensibilización”.

El mecanismo canónico de desensibilización de un receptor consiste en su internalización al citosol donde deja de estar expuesto a su ligando. Para que este evento ocurra el receptor tiene que ser fosforilado, la fosforilación permite el reclutamiento de la β -arrestina que promueve su internalización en vesículas recubiertas de clatrina (Ferguson, 2001).

A grandes rasgos, la desensibilización de un receptor puede darse a través de dos vías: una en la que la fosforilación del receptor se dé a partir de la activación del mismo (desensibilización homóloga) y otra en la que la fosforilación del receptor es consecuencia de la activación de otros receptores (desensibilización heteróloga). (Kelly, Bailey y Henderson, 2009).

La fosforilación del receptor puede llevarse a cabo por distintas familias de cinasas de acuerdo al tipo de desensibilización:

Las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs, por sus siglas en inglés) son cinasas específicas para receptores activados por sus agonistas, participando de esta manera en la desensibilización homóloga. Estas cinasas fosforilan residuos de serina y treonina de la tercera asa intracelular, así como el extremo carboxilo. (Bünemann y Hosey, 1999).

Las cinasas dependientes de segundos mensajeros son cinasas activadas por el incremento en la concentración citosólica de segundos mensajeros como el calcio o el AMP cíclico a partir de la activación de diversos receptores. Algunos ejemplos son la PKA y la PKC. Esta familia de cinasas puede participar tanto en eventos de desensibilización homóloga como heteróloga (Benovic *et al.*, 1985).

Una vez internalizado el receptor puede tener dos destinos; en el primer escenario, la vesícula que contiene al receptor es reciclada a la membrana donde el receptor

vuelve a ser capaz de reconocer su ligando extracelular. En el segundo escenario el receptor es enviado a degradación vía proteasoma, disminuyendo el número total de receptores para un determinado ligando en la célula (Seachrist y Ferguson, 2003).

Por otra parte, se ha postulado que la fosforilación del receptor puede resultar en cambios conformacionales que hagan inaccesible su interacción con la proteína G, ejerciendo un mecanismo de desensibilización *per se* (Benovic *et al.*, 1985).

Un mecanismo menos estudiado es el de la dimerización/oligomerización de GPCRs. El tema central de este estudio consiste en este evento, por lo que a continuación se describirá con mayor detalle.

2.5. Dimerización de receptores acoplados a proteínas G.

Los primeros experimentos que pusieron sobre la mesa la idea de dímeros de GPCRs consistieron en ensayos de complementación de función. En 1993 el grupo del doctor Wess trabajó con mutantes de los receptores m3 para acetilcolina de tipo muscarínico y α_2 adrenérgico con sus dominios transmembranales 6 y 7 intercambiados de un receptor a otro. Los dos receptores mutantes resultaban ser incapaces de unir su ligando al ser expresados de manera independiente en la línea celular COS-7. Sin embargo, la coexpresión de dichos receptores mutantes resultaba en el rescate de la capacidad de unión a ligando de ambos, sugiriendo una cooperación entre receptores (Maggio, Vogel and Wess, 1993).

Otro caso de cooperatividad entre receptores lo reportó el grupo de Huhtaniemi (Rivero-Muller *et al.*, 2010). En este estudio se trabajó con ratones *knockout* del receptor de la hormona luteinizante (LHR) cuyo fenotipo característico es una deficiencia en el desarrollo testicular. Huhtaniemi y colaboradores expresaron en estos ratones dos construcciones mutantes del LHR: una incapaz de interaccionar con su ligando (LHR^{LH-}) y otra incapaz de activar a la proteína G luego de interactuar con su ligando (LHR^{cAMP-}). Se observó que mientras que la expresión independiente de los receptores mutantes en el ratón *knockout* no tenía efecto alguno en el pobre desarrollo de los testículos, la coexpresión de ambos receptores era capaz de revertir el defecto (Figura 4). Además de esto, en el mismo trabajo expresaron ambos receptores mutantes fusionados a etiquetas (FLAG y HA) en células HEK 293 y estudiaron la interacción de los receptores por medio de coinmunoprecipitaciones, encontrando que los receptores se encuentran interaccionando de manera basal (Rivero-Muller *et al.*, 2010).

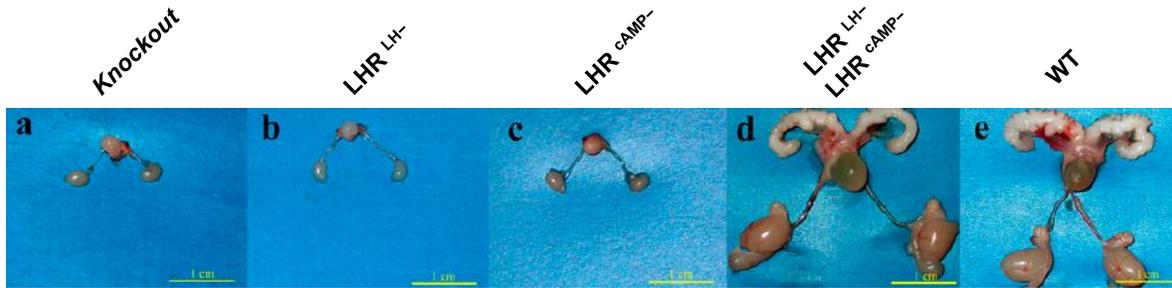


Figura 4. Fenotipo genital de ratones machos silvestres y mutantes. De izquierda a derecha: ratón LuRKO (A) ratón en el fondo genético LurKO expresando LHR^{LH-} (B), LHR^{cAMP-} (C), coexpresión de los transgenes LHR^{LH-}/cAMP⁻) (D) y ratón silvestre (E). Figura modificada de Huhtaniemi et al. 2009.

La primera demostración contundente de dimerización de receptores acoplados a proteínas G fue en 1998 cuando White y colaboradores demostraron que la correcta maduración y funcionalidad del receptor GABA_{B1} depende de su coexpresión con el receptor GABA_{B2}. En el mismo trabajo se demostró tanto por ensayos de doble híbrido en levadura como por coimmunoprecipitaciones que los receptores interactúan físicamente (White *et al.*, 1998).

A partir del desarrollo de técnicas biofísicas como el FRET o el BRET, la dimerización de GPCRs ha pasado a ser un fenómeno cada vez con mayor aceptación por parte de la comunidad científica. La gran ventaja de estas aproximaciones es la posibilidad de seguir *in vivo* la interacción de dos receptores en sistemas de expresión heteróloga, resolviendo así el problema que puede implicar la agregación inespecífica de proteínas de membrana al momento de solubilizarlas durante la obtención de lisados en los ensayos de coimmunoprecipitación.

Bouvier y colaboradores reportaron en 1999 a partir de estudios de coimmunoprecipitación y de BRET la homodimerización del receptor β2 adrenérgico en respuesta a su ligando, encontrando una dimerización dependiente de la dosis de isoproterenol como puede apreciarse en la figura 5 (Angers *et al.*, 1999).

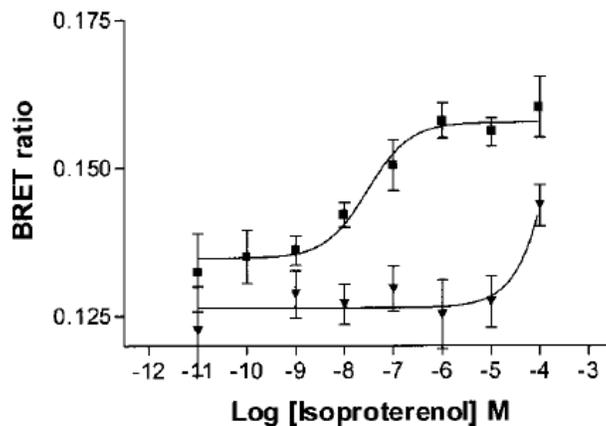


Figura 5. Dosis respuesta de la dimerización del receptor $\beta 2$ adrenérgico. Ensayos de BRET ante estímulos con distintas concentraciones de isoproterenol en presencia (▼) o ausencia (■) de 10 mM de propranolol, antagonista de receptores β adrenérgicos. Figura modificada de Angers *et al.* 1999.

Esto último trae un concepto interesante sobre la dimerización de GPCRs, si bien se sugiere que hay una cooperación de GPCRs a partir de interacciones físicas en condiciones basales, estas interacciones no son estáticas, pudiendo darse a partir de la activación de al menos una de las unidades que conforman el dímero.

A pesar de ser la familia de GPCRs de menor tamaño y en consecuencia con menos elementos estructurales posibles que medien interacciones entre sí, se ha identificado por métodos bioquímicos y biofísicos la dimerización de distintas parejas de GPCRs clase A, resumidos en la tabla 2.

Dímero	Método de detección	Efecto farmacológico
5-HT _{2A} -D ₂	co-IP, FRET	B \uparrow y S \downarrow (por agonista del D ₂)
5-HT ₄ -5-HT ₄	co-IP, BRET	Nd
$\alpha 1A$ - $\alpha 1B$	co-IP, tr-FRET	I, S \uparrow
$\alpha 1A$ -H ₁	FR	S \uparrow
$\alpha 1B/\beta 2$ - $\alpha 1D$	co-IP, LCM	E \uparrow , S \uparrow (del $\alpha 1D$)
$\alpha 2A$ - $\beta 1$	co-IP, LCM	I
$\alpha 2A$ - μOR	FRET	S \downarrow (de $\alpha 2A$ por morfina)
A ₁ -A _{2A}	co-IP, BRET, FRET	B \downarrow (agonista), S

A1-β2	nd	S↓ (of β2 tras coactivación)
A1-D1	co-IP	S↓ (of D1 tras coactivación)
A2A-CB1	BRET, IP	S (activación de CB ₁ requiere coactivación de A2A)
A2A-D2L	BiFC, BRET, co-IP	B↓ (agonista), I
AT1-B2	co-IP, BRET	B↑ and S↑ (of angiotensina II)
AT1-β1/β2	co-IP, LCM	S↓ (antagonista)
AT1-CB1	BRET, co-IP	S↑ (de angiotensina II), G (heterodímero acoplado a Gαq and Gαi, mediado por CB1)
β1-β1	BRET, FRAP	nd
β1-β2	co-IP	S↑ (agonista), B↓
β2-β2	co-IP, BRET, FRAP	nd
β2-δOR	co-IP	I
β2-OT	co-IP, BRET	S↓ (agonista)
CB1-D2	BiFC, FRET	B↓ (agonista), G (Gi/o to Gs)
CB1-δOR	BRET, co-IP	E (de CB1)↑, S↓ (de CB1), B↑ (de CB1)
CB1-μOR	BRET	S↓ (agonista)
D1/D2-H3	BRET	S↓ (por el agonista de H3)
CCR2b-CCR5	BRET, co-IP	B↓ (agonista)
CXCR2-δOR	BRET, co-IP, FR,	S↑ (of δOR por antagonista de CXCR2)
δOR-D1	FR	G (preferencia de Gi sobre Gs)
D2-D2	co-IP, CODA-RET	G (preferencia de Gq/11 sobre Gi), I
κOR-μOR	BRET, co-IP	Nd
M1-M1	TIRF	Nd
V1A-V2	BRET, co-IP	I, S (↑ unión a β arrestina)

Tabla 2. Dímeros de GPCRs clase A. Abreviaciones: B, unión a ligando; E, expresión en membrana; co-IP, coimmunoprecipitación; G, cambio de proteína G; I, Cointernalización tras el estímulo con el agonista; Nd, no determinado; LCM, Microscopía Confocal; S, actividad del receptor; ↑, aumento; ↓, disminución; FR, Reconstitución de función; 5-HT, receptor a serotonina; α, receptor α adrenérgico; A, receptor a adenosina; AT, receptor a angiotensina; β, receptor β adrenérgico; CB, receptor de cannabinoides; CXCR, receptor de quimiocina; D, receptor de dopamina; δOR, receptor δ-opioide; H, receptor a histamina; κOR, κ-opioid receptor; M, receptor muscarínico; NTS, receptor a neurotensina; OT, receptor a oxitocina; SSTR, receptor a somatostatina; V, receptor a vasopresina. Modificado de Gmeiner *et al.* 2013.

Si bien los primeros experimentos que propusieron la dimerización de GPCRs hablaban de cooperaciones positivas entre GPCRs, existen casos de dimerización de GPCRs que resultan en una regulación negativa de uno o los dos receptores.

Esta regulación negativa puede darse por distintos mecanismos: disminución de la afinidad del receptor por su ligando, incapacidad de activar a la proteína G o por un cambio de la proteína G a la que se acopla.

Un caso de regulación negativa tras la dimerización de receptores es el del receptor de oxitocina (OTR) y el β 2 adrenérgico. En el 2012 Hébert y colaboradores demostraron que la estimulación del OTR con distintos ligandos induce su dimerización con el β 2 adrenérgico. Además observaron que cuando las células eran pretratadas con los ligandos del OTR la activación de Erk 1/2 mediada por el β 2 adrenérgico era abatida, indicando una desensibilización del receptor β 2 adrenérgico mediada por el OTR. El hecho de que exista dimerización llevó a los autores a proponer este evento de desensibilización como una modulación alostérica entre receptores (Wrzal *et al.*, 2012).

De esta manera, la dimerización de GPCRs le da a la señalización un salto más de complejidad a la hora de intentar comprender los procesos que rigen la regulación de estas proteínas.

2.6. *Lípidos bioactivos: Ácido lisofosfatídico (LPA) y docosahexaenóico (DHA)*

Distintas moléculas de naturaleza lipídica, como pueden ser: derivados del colesterol, ácidos grasos libres, lípidos derivados de glicerol y esfingolípidos, son moduladoras de una amplia gama de acciones celulares. En general estas modulaciones se dan a partir de la activación de receptores membranales y/o nucleares (Chiurchi and Maccarrone, 2016).

Dos lípidos que en las últimas décadas han llamado la atención de la comunidad científica por las repercusiones fisiológicas que tienen son el ácido lisofosfatídico (LPA) y el ácido docosahexaenóico (DHA).

2.6.1. LPA

El LPA es un glicerofosfolípido simple sintetizado endógenamente a partir de fosfolípidos de membrana. Aunque existen distintas vías, su principal mecanismo de síntesis consiste en dos reacciones enzimáticas secuenciales. En la primera, la fosfolipasa A1 produce lisofosfolípidos (lisofosfatidilcolina, lisofosfatidilserina o lisofosfatidiletanolamina) que son sustratos de una segunda enzima, la autotaxina (ATX) o lisofosfolipasa D que produce el LPA (Valet and Jean, 2006)

El LPA se encuentra presente en suero sanguíneo a concentraciones de 2 a 20 μM , siendo uno de los principales componentes activos del suero (Koh, Lieberthal and Levine, 1997)

Las acciones que este lípido ejerce sobre la mayoría de los tipos celulares de mamífero son muy amplias, desde estimular proliferación, migración, promover la contracción de músculo liso, modular la liberación de algunos neurotransmisores, entre otras (Okudaira, Yukiura and Aoki, 2010). Se ha determinado que las células cancerígenas usan el LPA como un mensajero autocrino para retroalimentar positivamente la proliferación y migración. Así mismo, se ha observado que bloqueando la señalización autocrina de LPA se abaten considerablemente las características de malignidad de estos tipos celulares (Seo *et al.*, 2016).

Las acciones celulares que modula el LPA están mediadas por una familia de 6 GPCRs para LPA, llamados LPA₁₋₆ (Chun *et al.*, 2008). Resulta difícil encontrar un tejido que no exprese al menos uno de los seis receptores para LPA, dado que este glicerofosfolípido tiene implicaciones fisiológicas en la mayoría de los tejidos del cuerpo.

El receptor LPA₁ fue el primer receptor para LPA en ser descrito. Fue encontrado mientras se buscaban receptores participantes en la neurogénesis cortical. El gen fue clonado proveniente de una línea celular de neuroblastos corticales de la zona ventricular, de ahí que su primer nombre fuera *vzg-1* (Ventricular Zone Gene-1). Luego de ensayos *in silico*, funcionales y estructurales, se determinó que codifica

para una proteína de siete dominios transmembranales y que es sensible a LPA, activándose desde concentraciones nanomolares de este glicerofosfolípido, de ahí que su nombre se cambiara a LPA₁ (Fukushima, Kimura and Chun, 1998).

El receptor LPA₁ puede activar distintas vías de señalización debido en parte a que se acopla a distintas proteínas G α : G i , G $12/13$ y G $q/11$ (Okudaira, Yukiura and Aoki, 2010).

2.6.2 DHA

El estudio de ácidos grasos poliinsaturados ha tomado gran relevancia en los últimos años debido a los beneficios que presentan para la salud. Uno de estos ácidos grasos es el DHA, un ácido graso de 22 carbonos y 6 insaturaciones, miembro de la familia de los ácidos grasos omega-3 (Lagarde, 2008).

Su precursor es el ácido α linolénico, ácido graso obtenido a partir de la dieta o por suplementos. Sobre el α linolénico actúan una serie de desaturasas y elongasas que llevan a la síntesis de DHA (Domenichiello *et al.*, 2014).

Diversos estudios han demostrado que el DHA es capaz de ejercer varias funciones en el organismo, tales como mantener la fluidez de la membrana, inhibir procesos inflamatorios, inhibir la agregación de plaquetas, reducir la síntesis de triglicéridos en el hígado, disminuir la susceptibilidad a padecer desórdenes cardiacos, entre otros (Calder, 2012).

El receptor GPR120, que junto con el GPR40 tiene al DHA como ligando endógeno, se caracterizó por primera vez como receptor de ácidos grasos libres de cadena larga en el 2005 (Hirasawa *et al.*, 2005). Hirasawa y colaboradores demostraron que es un receptor altamente expresado en células intestinales, además de tener efectos antiinflamatorios, al disminuir la respuesta exacerbada de macrófagos, y antidiabéticos, promoviendo la secreción de distintas incretinas (Talukdar *et al.*, 2011).

Este receptor es activado por ácidos grasos de cadena mediana y larga a concentraciones micromolares. Otros de sus ligandos endógenos son el ácido linolénico, el eicosapentanóico y el araquidónico (Villegas-Comonfort *et al.*, 2017).

De manera interesante, el GPR120 no forma parte de la subfamilia de GPCRs activados por ácidos grasos conformada por el GPR40, GPR41 y GPR43 (los últimos dos son receptores activados por ácidos grasos de cadena corta). A pesar de activarse por ácidos grasos de cadena larga al igual que el GPR40, sólo comparte un 19% de identidad con éste, perteneciendo, de acuerdo al porcentaje de identidad, a una familia de GPCRs que en su mayoría permanecen huérfanos hasta el momento. (Talukdar *et al.*, 2011).

2.7. Desensibilización del receptor LPA₁ mediada por el receptor GPR120.

En 2016 Meier y colaboradores reportaron que el efecto proliferativo inducido por LPA en células DU145 y PC 3 de cáncer de próstata se abatía al coestimularlas con ligandos naturales (EPA 20 μ M) o sintéticos (TUG 891 1 μ M) del receptor GPR120 (Hopkins, Liu and Meier, 2016). En la figura 6 se muestra el resultado del ensayo de proliferación de este trabajo.

En el mismo estudio se determinó que el receptor LPA₁ es el responsable de los efectos proliferativos del LPA sobre este tipo celular. Para esto se inhibió selectivamente al LPA₁ con el compuesto AM 966, observando que la inhibición con este compuesto reprime la proliferación inducida por LPA.

En un estudio previo del mismo grupo se analizó la expresión de los receptores para para ácidos grasos libres, encontrando que en células DU 145 solamente se expresa el GPR120 (Liu *et al.*, 2015).

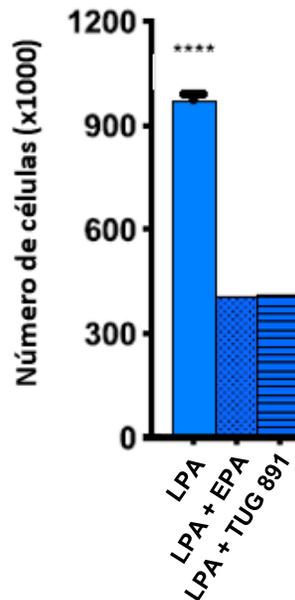


Figura 6. Proliferación de células DU145 ante estímulos de LPA y coestímulos de LPA con agonistas del GPR120. El cotratamiento de LPA con ligandos naturales y sintéticos del GPR120 abate la proliferación inducida por LPA. Figura modificada de Hopkins *et al.* 2016

3. Planteamiento del problema

Los mecanismos implicados en la desensibilización del receptor LPA₁ mediada por el receptor GPR120 se desconocen en su totalidad.

4. Hipótesis

La activación del receptor GPR120 por DHA induce una dimerización con el receptor LPA₁. Además, el tratamiento con DHA puede inducir la internalización del LPA₁ como parte de su desensibilización.

5. Objetivos

Objetivo general

Estudiar la desensibilización del receptor LPA₁ a partir de la activación del receptor GPR120.

Objetivos particulares

1. Sobreexpresar de manera transitoria los receptores LPA₁-GFP y GPR120-mCherry en células HEK 293.
2. Determinar la desensibilización de LPA₁ mediada por el receptor GPR120 mediante mediciones del incremento de calcio intracelular en respuesta a ligando.
3. Estudiar por técnicas bioquímicas y biofísicas la interacción entre los receptores en respuesta a sus ligandos.
4. Estudiar la internalización de los receptores en respuesta a sus ligandos.

6. Materiales y métodos

6.1 Reactivos

El medio de cultivo Dulbecco's Eagle Medium (DMEM) y otros reactivos para cultivo celular se obtuvieron de Gibco Life Technologies. El suero fetal bovino se obtuvo de Multicell. Agonistas e inhibidores como el LPA, DHA y AH1476 se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. De Millipore se obtuvo la proteína A-agarosa. El Fura-2/ AM fue obtenido de Molecular Probes. Los anticuerpos policlonales para reconocer a la proteína mCherry y GFP fueron generados en el laboratorio por la Dra. María Teresa Romero Ávila. El anticuerpo monoclonal contra GFP se obtuvo de Sigma-Aldrich Chemical Co. Los plásmidos pReceiver m56 que contiene la secuencia codificante para el receptor LPA₁ fusionado en su extremo carboxilo terminal a la proteína verde fluorescente (GFP) y pReceiver m98 con la secuencia codificante para el receptor GPR120 fusionado a mCherry en su carboxilo se obtuvieron de Genecopoeia.

6.2 Cultivo Celular

Se utilizó la línea celular HEK 293 de embrión de riñón humano obtenida de ATCC. Es importante destacar que esta línea expresa de manera endógena los receptores de interés. La línea celular transitoria generada para este trabajo se cultivó en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, adicionado con los antibióticos: estreptomina 100 µg/mL, penicilina 100 U/mL y anfotericina 0.25 µg/mL. Las células se incubaron a 37°C, con humedad saturante y 5% de CO₂.

6.3 Transfección

Con el objetivo de estudiar la regulación cruzada entre los receptores LPA₁ y GPR120, se indujo la expresión transitoria en células HEK 293 de los receptores LPA₁-GFP / GPR120-mCherry. La cotransfección se llevó a cabo mediante el uso de polietilenimina, polímero catiónico capaz de desestabilizar la membrana, permeabilizándola suavemente.

Para las transfecciones se sembraron células en cajas de 10 cm de diámetro. La transfección se realizó en una confluencia de aproximadamente 80%.

En el proceso de transfección se retiró el medio DMEM suplementado con suero al 10% y los antibióticos mencionados anteriormente y se agregó medio de transfección Opti-MEM.

Se prepararon dos mezclas: la primera contiene 20 μL de polietilenimina y 230 μL de Opti-MEM. En la segunda mezcla se agregaron 3 μg del plásmido pReceiver m98 (GPR120-mCherry) y 10 μg del pReceiver m56 (LPA₁-GFP). Además de los plásmidos se agregó Opti-MEM hasta llevar esta mezcla a 250 μL . Las soluciones se agitaron en vortex 5 seg y se incubaron a temperatura ambiente por 5 min.

Luego se agregó la mezcla con polietilenimina a la que contiene los plásmidos. Esta mezcla de polietilenimina y plásmidos se agitó en vortex 5 min y se incubó a temperatura ambiente 30 min. Finalmente se agregó la mezcla a las cajas de 10 cm de diámetro con 4 mL de Opti-MEM. Las células con la mezcla y Opti-MEM se incubaron a 37°C, humedad saturante y 5% CO₂ por 4 horas. Pasadas las 4 h se removió el medio y se agregó DMEM suplementado, dejándolas reposando bajo las mismas condiciones de incubación toda la noche. Al día siguiente las células se resuspendieron suavemente despegándolas con tripsina y se sembraron de acuerdo al experimento a realizar ya sea en placas de 6 pozos, cajas de 6 o 10 cm de diámetro.

6.4 Cuantificación de la concentración citosólica de calcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)

Para la cuantificación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se incubaron células con 24 h de transfección y una confluencia del 90% con el fluoróforo Fura 2-AM (2.5 μM) en solución Krebs-Ringer-HEPES durante 1 h a 37°C, 5% CO₂ y humedad saturante. Después se lavaron con buffer de fosfatos salino (PBS, por sus siglas en inglés) para remover el Fura no incorporado. Las células se despegaron de la caja con tripsina por 1 min a 37°C. Posteriormente se transfirieron a un tubo Falcon de 15 mL, se centrifugaron a 3000

revoluciones por minuto. Se realizaron 3 lavados y finalmente se resuspendieron en 6 mL de Krebs-Ringer-HEPES sin albúmina.

Se utilizó un espectrofluorómetro AMINCO-Bowman serie 2 (Rochester, NY, USA), con excitación a longitudes de onda de 340 y 380 nanómetros (nm) y detectando la emisión a 510 nm. Las diferencias en la fluorescencia se cuantificaron utilizando el software AB2 luminiscence 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 la k_d representa la constante de disociación del fluoróforo por el calcio (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 calcio EGTA 50 mM, S_{f2} es el coeficiente de proporcionalidad del fluoróforo libre y S_{b2} el coeficiente de proporcionalidad del fluoróforo unido a calcio.

6.5 Coimmunoprecipitaciones

Las células HEK 293 LPA₁-GFP / GPR120-mCherry se sembraron en placas de 6 pozos, a las 24 h de transfección se ayunaron con DMEM sin suero por 2 h. Posteriormente se realizaron los tratamientos correspondientes. Los tratamientos se detuvieron removiendo el medio del pozo. Las células se lisaron a 4°C por 1 h con buffer de lisis RIPA (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Colato de sodio 1%, Nonident P40 1%) con inhibidores de proteasas (PMSF 100 ug/mL, bacitracina 5 mg/mL, inhibidor de tripsina 100 ug/mL). Los lisados se centrifugaron a 12000 rpm a 4°C por 15 minutos. El sobrenadante se recuperó en un tubo con 10 µL de anticuerpo

policlonal anti-mCherry y 15 μ L de proteína A-agarosa. Esta mezcla se incubó en agitación a 4°C toda la noche.

Posteriormente las muestras se centrifugaron 15 min a 12000 rpm y se realizaron 3 lavados. Las perlas de agarosa se resuspendieron en 50 μ L de buffer Laemli (25 μ L Laemli 2X, 25 μ L SDS 10% UREA 8 M, DTT 15.35 mg/mL) y se hirvieron a 96°C por 5 minutos.

Se realizó electroforesis desnaturalizante de las muestras en geles de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por 1 hora a 120 mAmps por gel. La membrana se bloqueó con leche al 5% durante la noche. Al día siguiente las membranas se incubaron con anticuerpo primario AntiGFP por 4 horas a 4°C; se realizaron 5 lavados de 5 minutos con TBS Tween y se incubaron con anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa de rábano por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 5 lavados de 5 minutos con TBS Tween y la membrana se incubó por 5 min con luminol (reactivo sensible a la oxidación de la peroxidasa que emite luz al ser oxidado), las membranas se expusieron a placas fotográficas para detectar la señal.

6.6 Microscopía Confocal

Para los ensayos de microscopía confocal se sembraron en cajas de fondo de vidrio células con 24 horas de transfección. A las 48 horas se retiró el medio DMEM suplementado para sustituirlo por DMEM sin suero para ayunar a las células por dos horas. Posterior a esto se realizaron los estímulos correspondientes al experimento.

Las células se fijaron mediante una solución de PBS con paraformaldehído al 4% por 25 minutos. Se realizaron 5 lavados con PBS para remover el paraformaldehído libre de la caja. Los ensayos de microscopía confocal se realizaron para estudiar tanto la internalización de los receptores como su interacción por transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). Las células fijas se observaron en un microscopio confocal Fluoview FV10i de Olympus. Se capturaron imágenes de al menos 12 campos con células de 3 experimentos independientes con un objetivo

60X de inmersión de agua, apertura confocal de 1, sensibilidad en promedio de 40% e intensidad de láser en 45%. La proteína eGFP se excitó a 480 nm y la emisión se detectó a 520 nm, mientras que la proteína mCherry se excitó a 580 nm y la fluorescencia emitida se detectó a 610 nm. El solapamiento de las longitudes de onda de emisión de la eGFP con el de excitación de la mCherry nos permitió hacer ensayos de FRET (Figura 7), para esto se apagó el láser correspondiente a la excitación de la mCherry, manteniendo la detección de su emisión y la excitación de la eGFP.

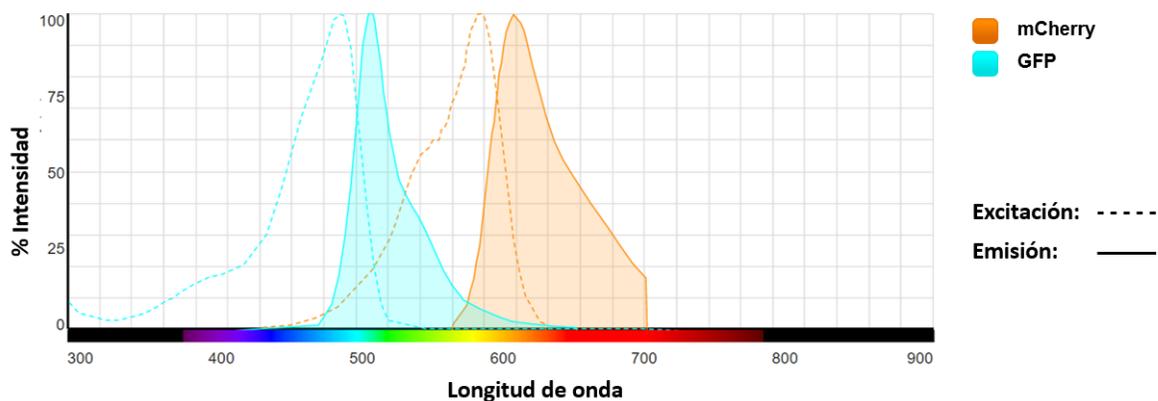


Figura 7. Espectros de excitación y emisión de los fluoróforos GFP y mCherry (Modificado de *SpectraViewer* de *ThermoFisher Scientific*).

6.7 Análisis de imágenes

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 del FRET INDEX por el método de pixel por pixel basándose en la fluorescencia por emisión sensibilizada.

Para el análisis de internalización de receptores se obtuvo el valor de fluorescencia intracelular y se obtuvo una relación con respecto a la fluorescencia total de la célula.

6.8 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism versión 5.0 para Windows. 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 grupos, pero utiliza la ANOVA para calcular el error estándar y recalculan el error α . Para todas las pruebas estadísticas un valor $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

7. Resultados

7.1. Expresión transitoria de GPR120-mCherry y LPA₁-GFP en células HEK 293

Con el objetivo de estudiar la desensibilización del receptor LPA₁ mediada por el receptor GPR120, se expresaron de manera transitoria los receptores fusionados a las proteínas fluorescentes eGFP y mCherry respectivamente en células HEK 293. La expresión de estas construcciones (LPA₁-GFP y GPR120-mCherry) permitió analizar la distribución celular de ambas proteínas, realizar ensayos de FRET (Förster resonance energy transfer), así como utilizar las proteínas de fusión como antígenos para la detección de los receptores por inmunoensayos.

La figura 8 muestra una imagen representativa de microscopía confocal 60x de las células HEK 293 cotransfectadas con los receptores GPR120-mCherry y LPA₁-GFP. Ambos receptores se localizan predominantemente en la membrana celular en condiciones basales. Al empalmar las micrografías del GPR120-mCherry y del LPA₁-GFP se observa que las proteínas colocalizan (cambio de color de rojo y verde a amarillo).

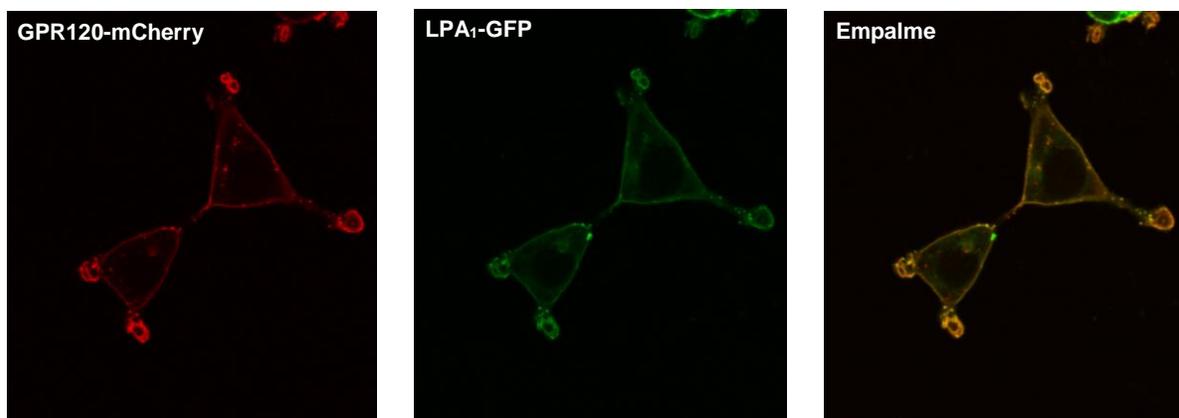


Figura 8. Expresión transitoria de las proteínas GPR120-mCherry y LPA₁-GFP en células HEK 293. Micrografía a las 48 horas de transfección, Objetivo 60x.

7.2. Desensibilización de LPA₁ mediada por GPR120.

La pérdida de la capacidad proliferativa en células de cáncer de próstata inducida por LPA al ser coestimuladas con agonistas naturales y sintéticos del receptor GPR120 denota una desensibilización a LPA (Hopkins, Liu, Meier, 2016). Con el fin de corroborar que la desensibilización previamente descrita se presenta en nuestro sistema, se realizaron mediciones del incremento citosólico de calcio en respuesta a los agonistas de los receptores de interés como un indicativo de su activación.

Primero, las células cotransfectadas fueron estimuladas con LPA 1 μ M, observándose un incremento de calcio citosólico inmediato de 300 nM, regresando a niveles basales aproximadamente 50 segundos luego del estímulo. Una vez estabilizadas en el nivel basal, las células fueron capaces de liberar calcio al citosol en respuesta a DHA 30 μ M (agonista del GPR120); este incremento fue de 200 nM, alcanzando el valor máximo en aproximadamente 50 segundos y regresando a niveles basales tras aproximadamente 150 segundos de estímulo (Figura 9A).

En el caso contrario, donde primero se estimuló con DHA y luego con LPA a las concentraciones mencionadas anteriormente, las células respondieron a DHA, mostrando una cinética de liberación similar a la anterior. Sin embargo, luego de estabilizarse en niveles basales de calcio citosólico, no fueron capaces de responder a LPA (Figura 9B).

Para corroborar que el efecto de desensibilización a LPA por el estímulo previo con DHA era mediado por el receptor GPR120, se realizó el mismo experimento de estímulos secuenciales DHA-LPA habiendo pretratado las células por 30 minutos con AH 1476, un inhibidor alostérico del GPR120 (Watterson *et al.*, 2017). En dicha medición de calcio se observó una pobre respuesta a DHA 30 μ M (casi nula) y posteriormente una respuesta de 200 nM al ser estimuladas con LPA 1 μ M (Figura 9C).

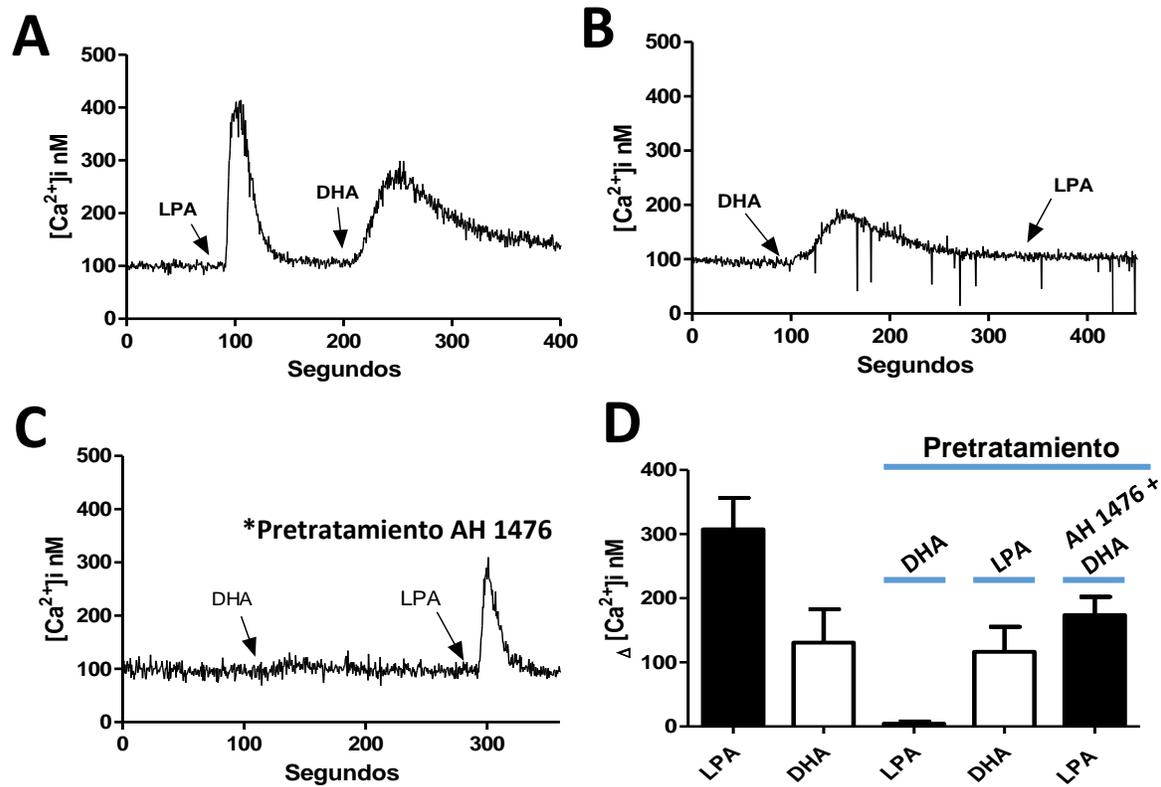


Figura 9. Desensibilización de LPA₁ dependiente de DHA. A. Efecto de los tratamientos consecutivos de LPA 1 μ M y DHA 30 μ M en la concentración intracelular de Ca²⁺ en células HEK 293 cotransfectadas con los receptores LPA₁-GFP y GPR120-mCherry. B. Efecto de los tratamientos consecutivos de LPA 1 μ M y DHA 30 μ M en la concentración intracelular de Ca²⁺ en células HEK 293 cotransfectadas con los receptores LPA₁-GFP y GPR120-mCherry. C. Incremento intracelular de calcio inducido por LPA 1 μ M en células pretratadas con AH 1476 (antagonista del GPR120). D. Cuantificación de los cambios en la concentración intracelular de calcio con los distintos estímulos.

7.3. Reversibilidad de la desensibilización de LPA mediada por el receptor GPR120

Con la finalidad de corroborar que esta desensibilización observada no era consecuencia de una pérdida de la capacidad de respuesta de las células a cualquier estímulo externo, se realizó un experimento para corroborar que las células eran capaces de responder a un estímulo posterior a DHA.

Al probar distintos ligandos luego de estimular con DHA (LPA, S1P, ATP, carbamilcolina), ninguno indujo un incremento de calcio citosólico (Figura 10). Las razones sobre por qué no se observó efecto con los distintos ligandos luego del

estímulo de DHA no se exploraron en este trabajo y está siendo estudiado en el laboratorio.

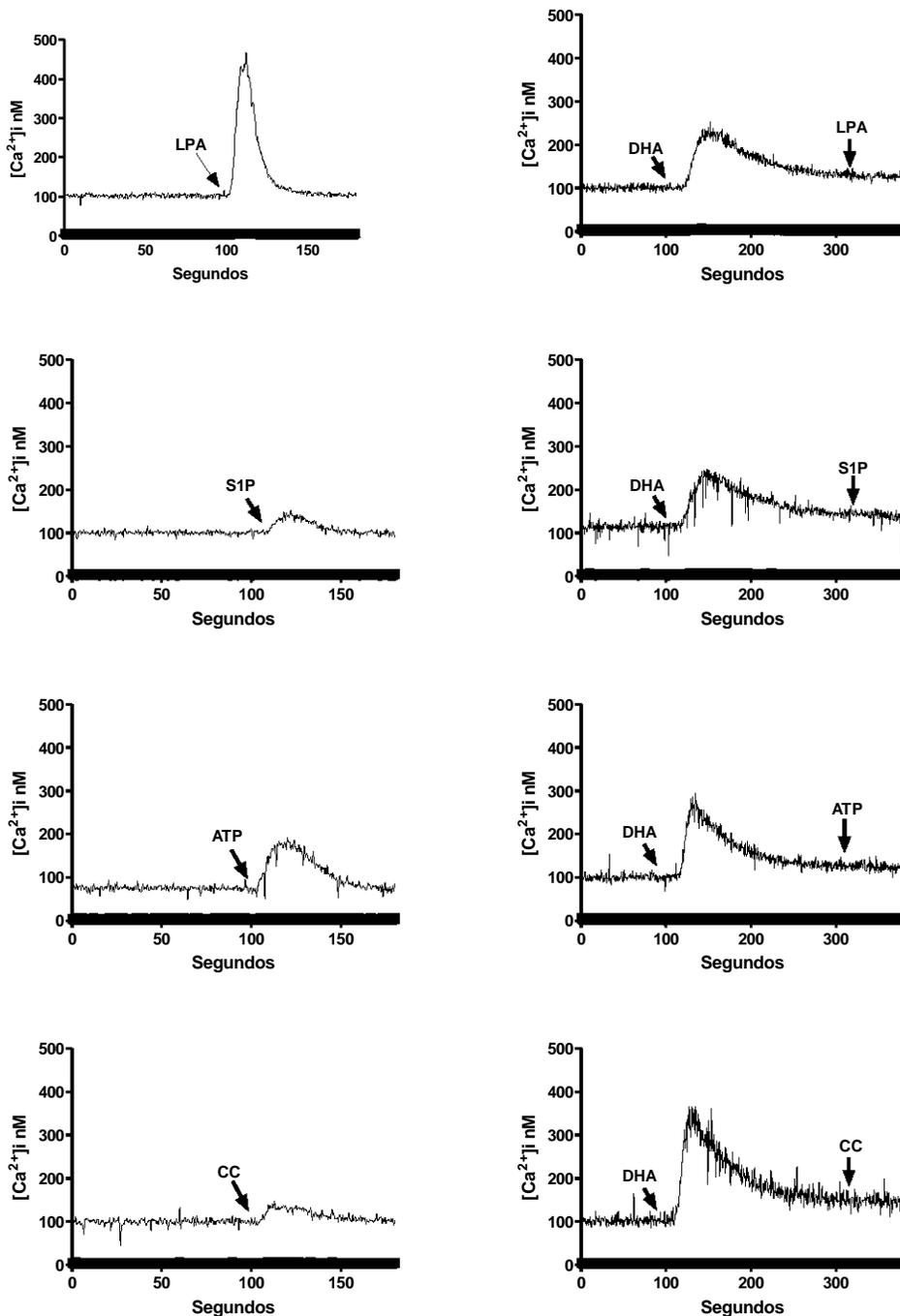


Figura 11. Efecto del DHA en la desensibilización a distintos ligandos en células HEK 293 LPA₁-GFP / GPR120-mCherry. Primer columna: trazos representativos del incremento de calcio intracelular inducido por distintos ligandos de GPCRs (LPA 1 μ M, S1P 1 μ M, ATP 10 μ M y CC 10 μ M). La segunda columna presenta trazos representativos con los mismos ligandos con un estímulo previo de DHA 30 μ M. Abreviaturas: LPA, Acido Lisofosfatídico. S1P, Esfingosina 1 Fosfato. ATP, Adenosín Trifosfato. CC, Carbamilcolina.

La remoción del DHA del medio con tres lavados luego de estimular a las células recuperó su capacidad para responder a un estímulo de LPA 1 μM (Figura 12).

Con esto se concluyó que en este sistema la desensibilización de LPA mediada por el receptor GPR120 depende de la presencia constante de DHA y que puede ser reversible.

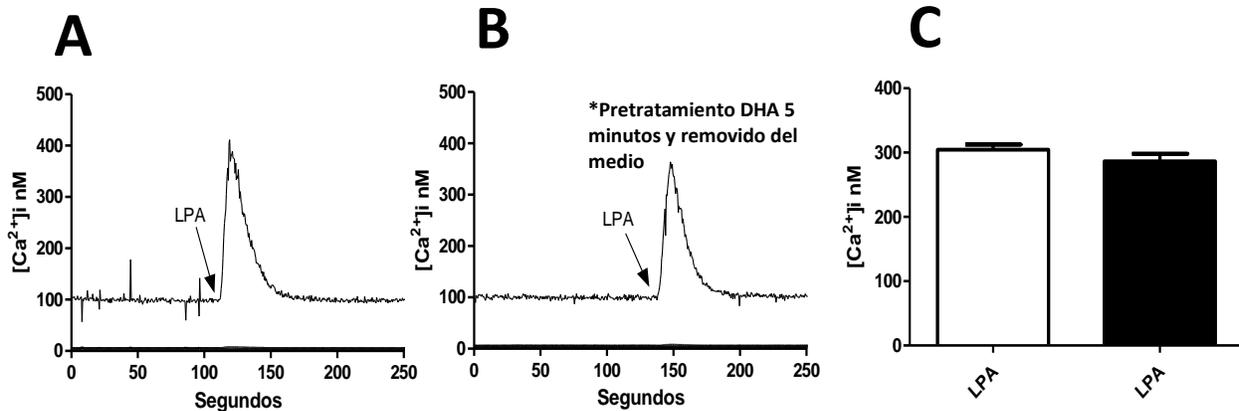


Figura 12. La desensibilización de LPA mediada por DHA es reversible. A. Incremento intracelular de calcio inducido por LPA 1 μM . B. Incremento intracelular de calcio inducido por LPA 1 μM en células pretratadas con DHA 30 μM y lavadas posteriormente para removerlo del medio. C. Cuantificación del incremento intracelular de calcio dependiente de LPA sin (blanco) y con pretratamiento de DHA removido del medio (negro).

Con la finalidad de comprobar que el efecto inhibitorio del DHA sobre la señalización por LPA se debiera a un efecto a nivel de membrana y no a un mecanismo que comprometiera el sistema intracelular de liberación de calcio, se verificó con estímulos de tapsigargina, inhibidor no competitivo de la ATPasa de calcio del retículo endoplásmico (SERCA, por sus siglas en inglés) encargada de bombear calcio del citosol al interior del retículo que las células tratadas con DHA seguían siendo capaces de liberar calcio del retículo al citosol (Figura 13).

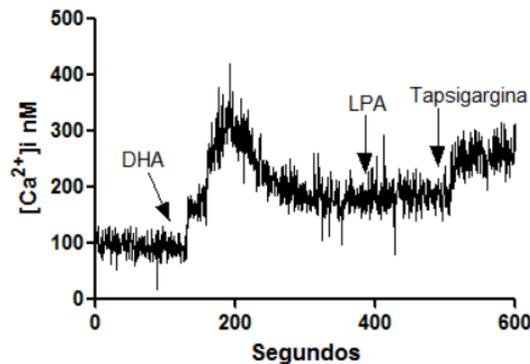


Figura 13. Durante la desensibilización de LPA dependiente de DHA, no se comprometen los sistemas intracelulares de liberación de calcio. Efecto de la inhibición de la SERCA con tapsigargina 1 μ M en la concentración citosólica de calcio tras un estímulo de DHA 30 μ M.

7.4. Interacción de GPR120 con LPA₁ dependiente de ligando

7.4.1 Ensayos de FRET

Distintos reportes sugieren que la dimerización de GPCRs en respuesta a ligando puede funcionar como un mecanismo de modulación de la actividad de los receptores. Es por esto que se analizó por medio de FRET la interacción de los receptores GPR120-mCherry y LPA₁-GFP a través de un curso temporal de 5, 15, 30 y 60 minutos de estímulos independientes de DHA 30 μ M y LPA 1 μ M, comparando los resultados con una condición basal. (Figuras 14 y 15).

Al estimular con DHA se observó un aumento en la interacción de ambas proteínas a los 5 minutos, llegando a su punto máximo a los 15 minutos, la cual fue el doble de la interacción basal. A los 30 minutos los niveles de interacción regresaron a los observados a los 5 minutos, regresando a valores basales de interacción a los 60 minutos. Cabe destacar que se observó una interacción basal de los receptores que más adelante se discutirá.

En la cinética de interacción tras el estímulo con LPA no se observó un aumento en la interacción a los distintos tiempos con respecto al basal. Es importante destacar

que los valores basales en este experimento coincidieron con los valores basales del experimento anterior con estímulos a distintos tiempos con DHA.

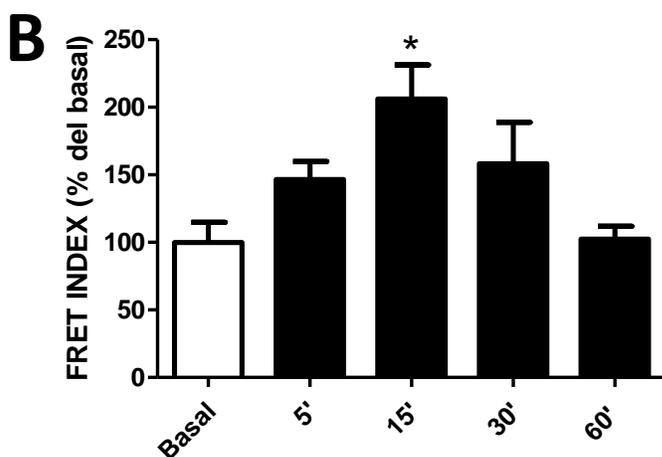
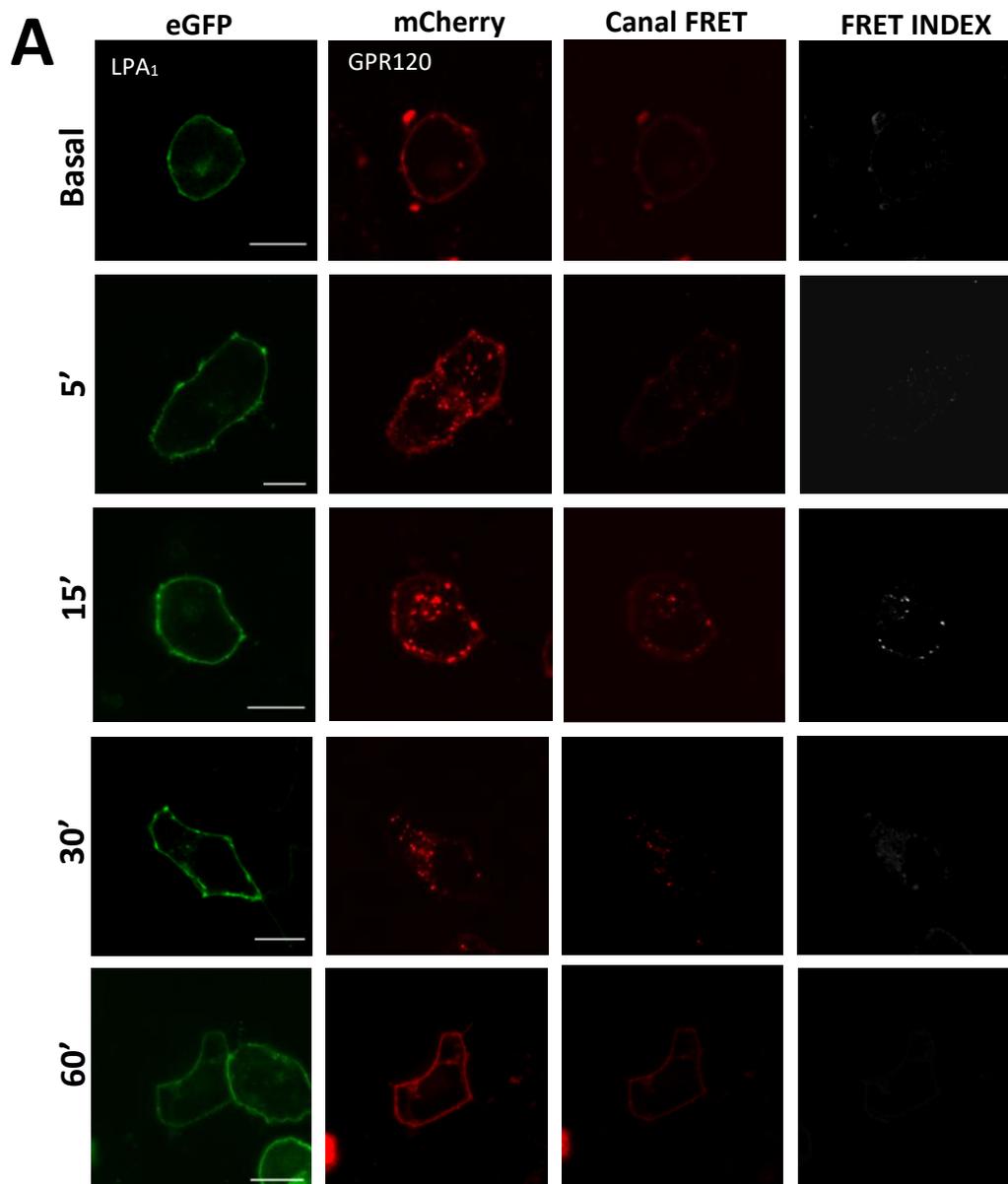


Figura 14. Cinética de interacción de los receptores LPA₁-GFP y GPR120-mCherry dependiente de DHA. A. Micrografías de células HEK 293 cotransfectadas con los receptores LPA₁-GFP y GPR120-mCherry estimuladas con DHA 30 uM. (Escala: 10 micras). **B.** Cuantificación de la señal de FRET en los distintos tiempos.

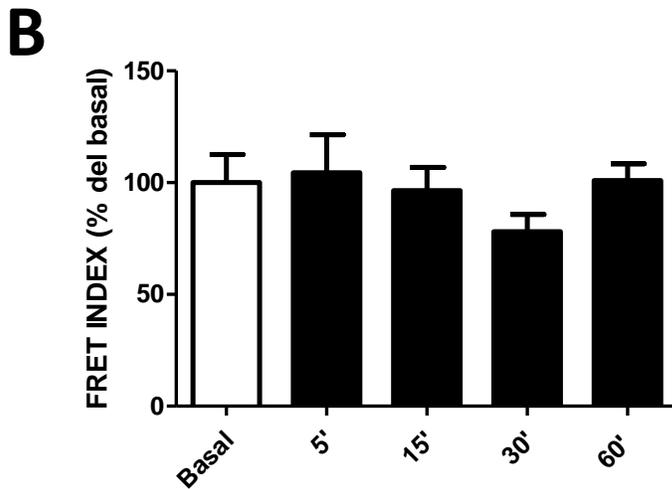
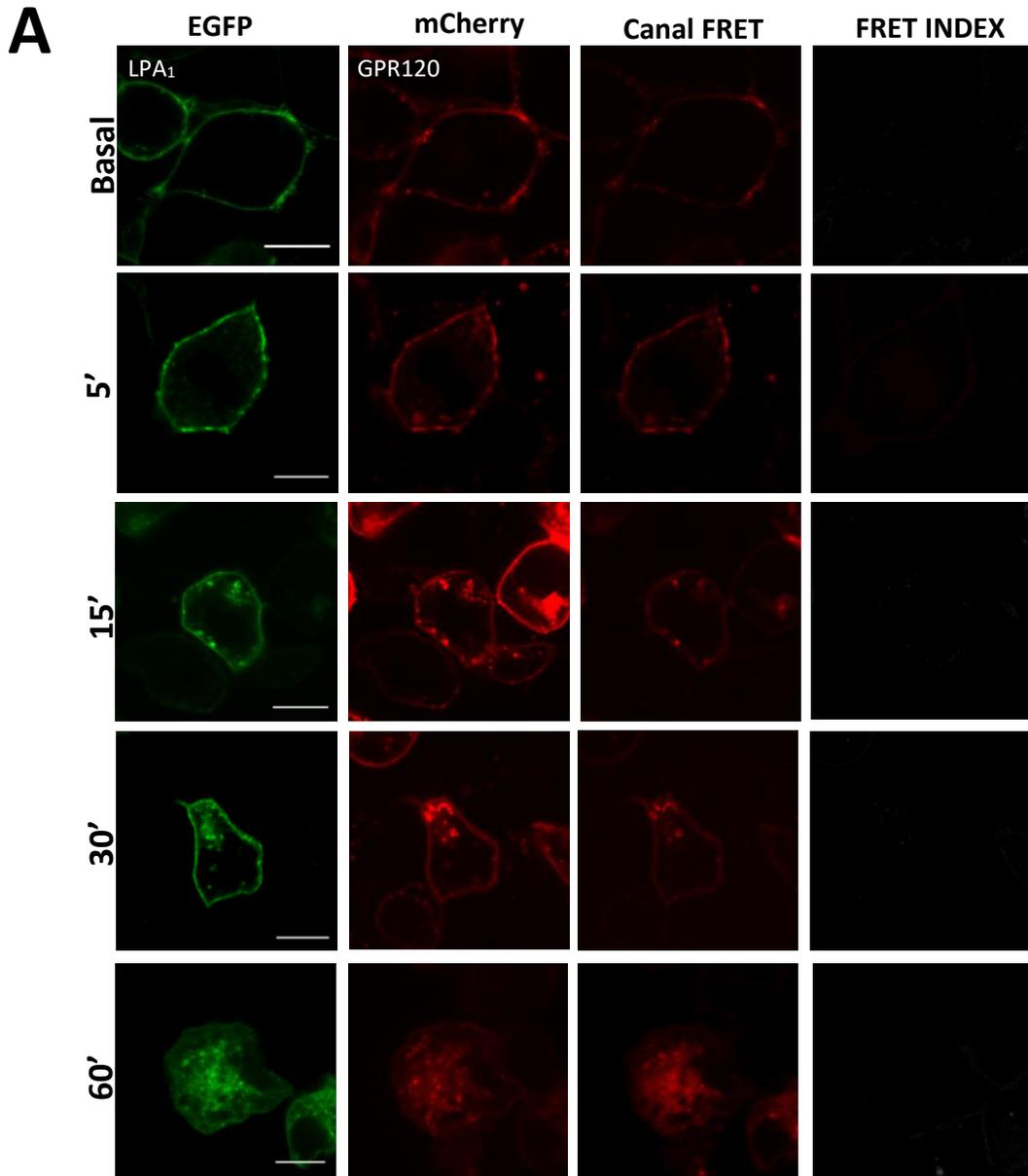


Figura 15. Cinética de interacción de los receptores LPA₁-GFP y GPR120-mCherry dependiente de LPA. A. Micrografías de células HEK 293 cotransfectadas con los receptores LPA₁-GFP y GPR120-mCherry estimuladas con LPA 1 μ M. (Escala: 10 micras). **B.** Cuantificación de la señal de FRET en los distintos tiempos.

En la figura 16 se representa con una línea continua el comportamiento de la interacción de ambos receptores dependiente de sus ligandos a través del tiempo. Los datos graficados son los obtenidos a partir de los experimentos de FRET. Esto con la finalidad de hacer más ilustrativa la diferencia de cinética de asociación dada por los dos ligandos.

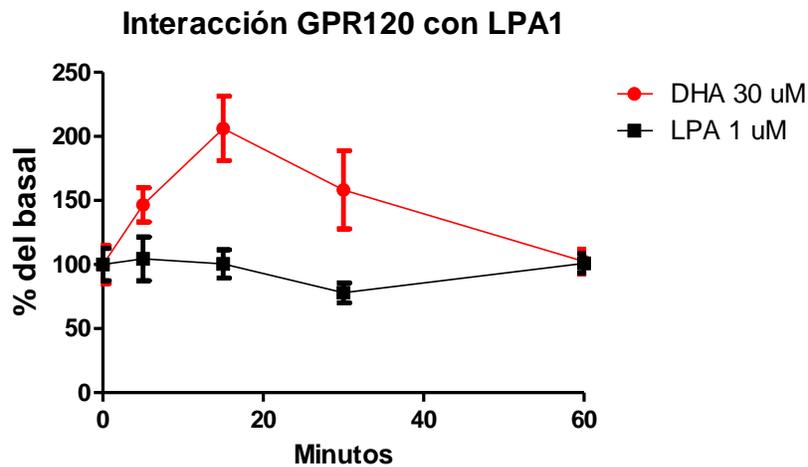


Figura 16. Comparación de la interacción del GPR120 con LPA1 a través del tiempo inducida por DHA (rojo) y LPA (negro).

Posteriormente se realizó un ensayo dosis-respuesta con DHA de la interacción de los receptores a 15 minutos de estímulo, debido que a este tiempo se detectó mayor interacción.

Como puede apreciarse en la figura 17, la interacción de los receptores se comporta de manera dosis-dependiente. No se detectó interacción significativamente mayor a la basal utilizando concentraciones inferiores a 30 μM , mientras que se observó un incremento en la interacción al estimular con DHA 100 μM con respecto a los tratamientos de DHA 30 μM . La curva de interacción no llegó a un punto de saturación porque en experimentos previos en el laboratorio hemos visto que realizar tratamientos de DHA a concentraciones mayores de 100 μM compromete la integridad celular.

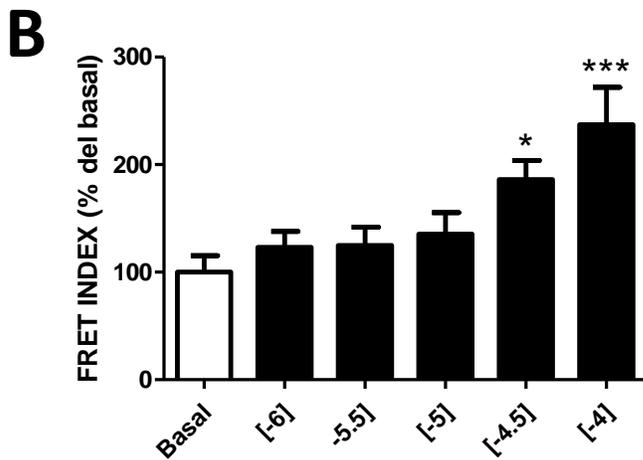
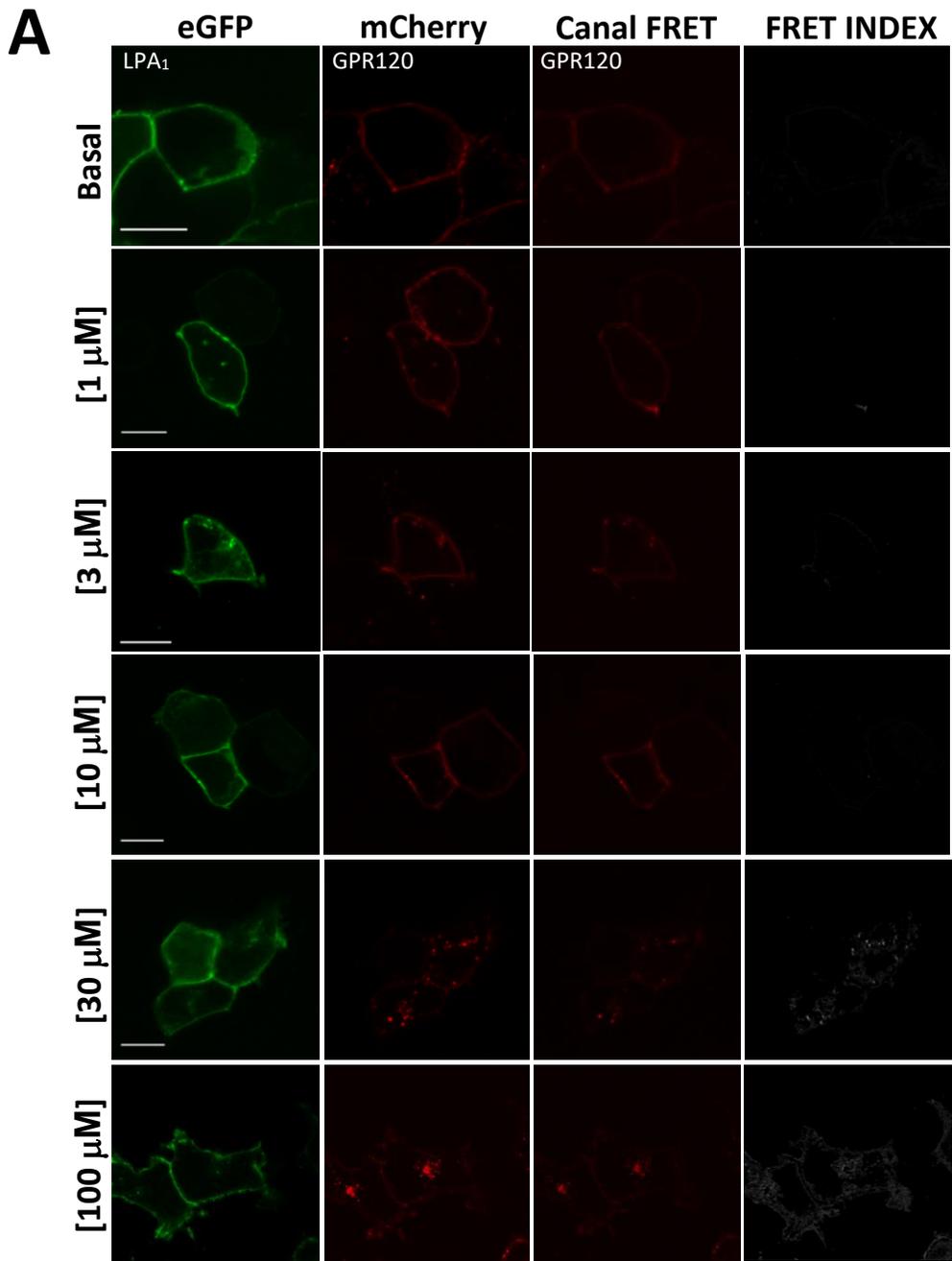


Figura 17. Dosis respuesta de interacción de los receptores LPA₁-GFP y GPR120-mCherry dependiente de DHA. A. Micrografías de células HEK 293 cotransfectadas con los receptores LPA₁-GFP y GPR120-mCherry estimuladas con DHA por 15' a distintas concentraciones. (Escala: 10 micras). B. Cuantificación de la señal de FRET en las distintas concentraciones.

7.4.2. Coinmunoprecipitaciones

Con la finalidad de corroborar los datos de interacción observados por FRET, se decidió estudiar la interacción desde una aproximación bioquímica. La coinmunoprecipitación es una técnica ampliamente utilizada para el estudio de la dimerización de GPCRs, por lo que decidimos hacer ensayos de coinmunoprecipitación de extractos de células estimuladas con DHA a los distintos tiempos probados previamente (5, 15, 30 y 60 minutos).

Los resultados de dichos experimentos, como podemos observar en la figura 18, coinciden con los resultados de FRET. El DHA induce una asociación de los receptores a partir de los 5 minutos, con una interacción máxima a los 15. A los 60 minutos la interacción parece darse a los mismos niveles que en condiciones basales.

Las coinmunoprecipitaciones de extractos de células estimuladas a distintos tiempos con LPA 1 μ M se encuentran actualmente realizándose.

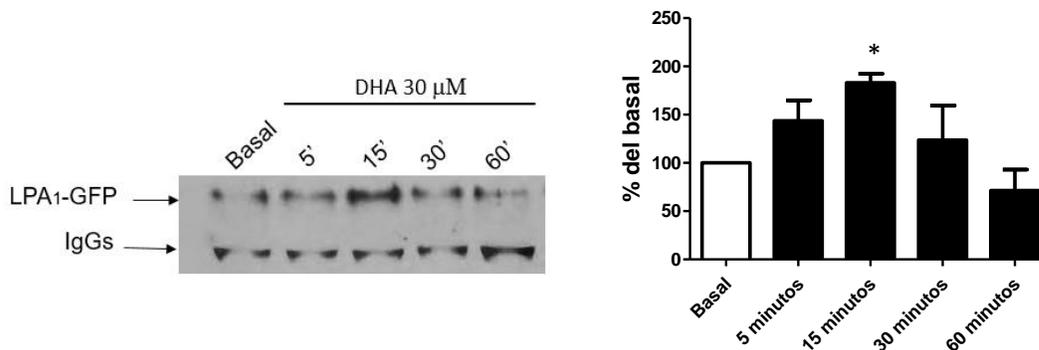


Figura 18. Coinmunoprecipitación de los receptores GPR120-mCherry y LPA₁-GFP. Inmunoprecipitación realizada con el anticuerpo policlonal anti-mCherry (GPR120) y Western Blot contra GFP (LPA₁).

7.5. Internalización de los receptores

La internalización de los GPCRs es un mecanismo de desensibilización con el que la célula evita activaciones prolongadas y en consecuencia respuestas celulares exacerbadas. Por esta razón, con el objetivo de estudiar si durante la desensibilización del receptor LPA₁ mediada por el GPR120 ocurren eventos de internalización de los receptores, se analizó la localización celular de los mismos a distintos tiempos de estímulo con DHA 30 μ M y con LPA 1 μ M.

Primero se describirán los resultados del estímulo con DHA a distintos tiempos (5, 15, 30 y 60 minutos). Como se observó al establecerse el sistema de coexpresión transitoria, en condiciones basales ambos receptores se localizan predominantemente en la membrana celular. El tratamiento con DHA induce una internalización del GPR120-mCherry a partir de los 5 minutos, con un punto máximo de internalización a los 15 y 30 minutos. A los 60 minutos el receptor se observa predominantemente en membrana, probablemente debido a un evento de resensibilización que se discutirá más adelante.

Es interesante que el tratamiento con DHA por distintos tiempos no afectó la localización del receptor LPA₁-GFP, el cual se localiza predominantemente en la membrana a través de todo el tiempo que se estimula con DHA.

Para corroborar que la falta de internalización del LPA₁-GFP bajo los estímulos de DHA no se tratara de un artificio, se analizó la internalización del mismo bajo su ligando, el LPA. Dicha internalización está reportada por trabajo previo de nuestro laboratorio (Alcántara-Hernández *et al.*, 2015). Como era de esperarse, se observó internalización del receptor LPA₁-GFP inducida por LPA 1 μ M. A diferencia de la internalización del GPR120-mCherry inducida por su ligando (DHA), la cinética de internalización del LPA₁-GFP por LPA fue más lenta, comenzando a observarse ligeramente a los 15 minutos e incrementando progresivamente a los 30 y a los 60 minutos, tiempo en el que se observa la mayoría en vesículas intracelulares.

El receptor GPR120-mCherry sufrió internalización tras los estímulos con LPA, siguiendo una cinética muy parecida a la observada con el receptor LPA₁-GFP.

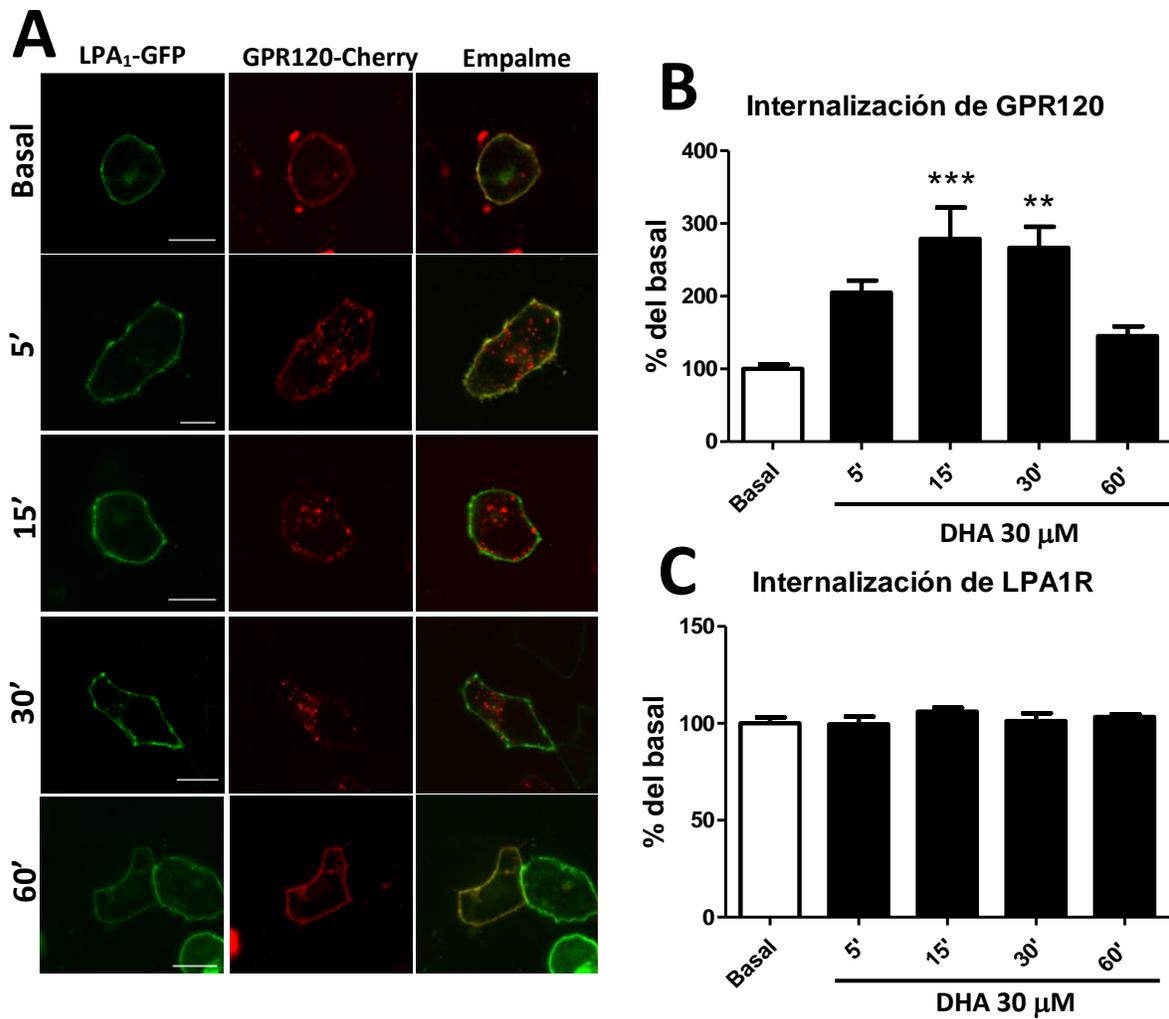


Figura 19. Cinética de internalización de los receptores LPA₁-GFP y GPR120-mCherry dependiente de DHA. A. Micrografías de células HEK 293 cotransfectadas con los receptores GPR120-mCherry y LPA₁-GFP estimuladas con DHA 30 μ M. (Escala: 10 micras). B. Cuantificación de fluorescencia intracelular del receptor GPR120-mCherry. C. Cuantificación de fluorescencia intracelular del receptor LPA₁-GFP.

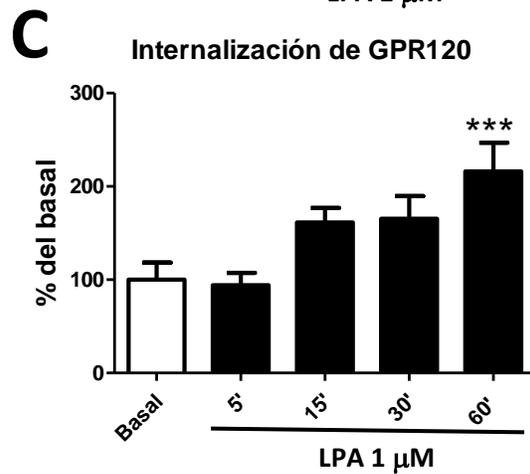
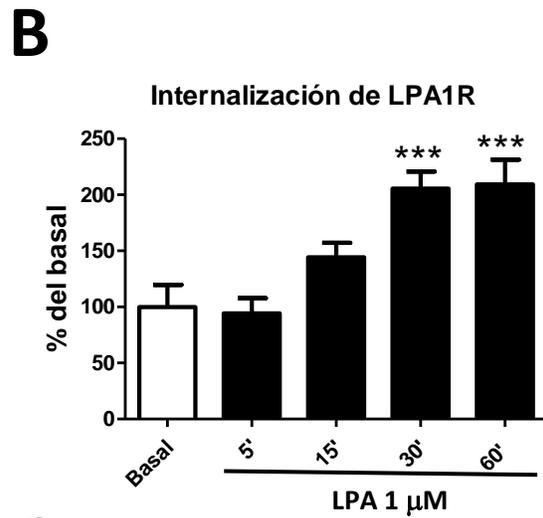
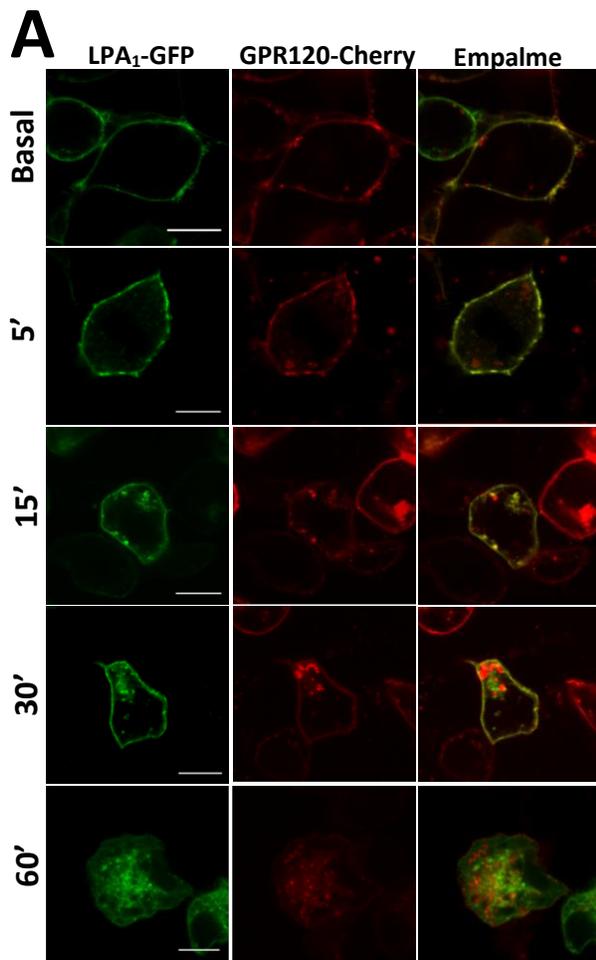


Figura 20. Cinética de internalización de los receptores LPA₁-GFP y GPR120-mCherry dependiente de LPA. A. Micrografías de células HEK 293 cotransfectadas con los receptores GPR120-mCherry y LPA₁-GFP estimuladas con LPA 1 μ M. (Escala: 10 micras). B. Cuantificación de fluorescencia intracelular del receptor LPA₁-GFP. C. Cuantificación de fluorescencia intracelular del receptor GPR120-mCherry.

8. Discusión

La desensibilización del LPA₁ mediada por el receptor GPR120 se ha reportado tanto en células de cáncer de próstata como de cáncer de mama (Hopkins, Liu y Meier, 2016), sin embargo, la relevancia de este trabajo radica en que, hasta donde se tiene conocimiento, este es el primer reporte que aporta evidencia experimental acerca del comportamiento de los receptores durante este evento de desensibilización.

Las células HEK 293 expresan de manera endógena receptores para LPA (LPA₁₋₃) y receptores de ácidos grasos de cadena larga (GPR120 y GPR40) (Atwood *et al.*, 2011). Esto implica que el incremento citosólico de calcio observado en los experimentos de espectrofluorometría puede deberse a la activación tanto de receptores endógenos como de los expresados heterológamente. Sin embargo, los fines de este trabajo no son los de estudiar repercusiones fisiológicas en este sistema de coexpresión transitoria, sino estudiar qué pasa particularmente con los dos receptores de interés. Las mediciones de calcio citosólico se realizaron con la finalidad de corroborar que el sistema se comporta tal como lo reportado en otros sistemas en la literatura (Hopkins, Liu and Meier, 2016).

Datos no mostrados del laboratorio indican que el DHA en células HEK 293 transfectadas con el GPR120-mCherry induce la movilización de calcio desde concentraciones menores a 30 μ M, no obstante el efecto de dimerización no se observa a concentraciones menores. Esto puede explicarse viendo los dos fenómenos como independientes; además, en la observación de movilización de calcio se tiene una cantidad endógena de receptores que contribuyen a este efecto observado, mientras que contrario a lo anterior, la presencia de receptores endógenos para el análisis de dimerización puede subestimar el efecto generado, ya que puede darse el caso en el que receptores endógenos estén dimerizados con el LPA₁-GFP y que esta fracción de dímeros LPA₁-GFP/GPR120 endógeno no la podamos medir, generando el receptor endógeno una competencia con nuestro receptor GPR120-mCherry expresado heterológamente.

Al día de hoy existen dos modelos propuestos para la dimerización de GPCRs. El primero es conocido como “intercambio de dominios” (*domain swapping*). En este

modelo uno o más dominios transmembranales de un receptor se entrecruzan con uno o más dominios transmembranales del otro (Kundu and Jernigan, 2004). Un experimento que apoya este modelo es el descrito en la introducción sobre la reconstitución de la unión a ligando de los receptores m₃ muscarínico y β₂ adrenérgico con sus cruces transmembranales 6 y 7 intercambiados de un receptor al otro. Los autores justifican que el hecho de que sólo la coexpresión de ambos receptores mutantes resulte en la reconstitución de la capacidad de unión a sus ligandos hace pensar que la proximidad de los receptores, particularmente los dominios transmembranales 6 y 7 de un receptor con los del otro, reestablecen el sitio de unión a ligando de los dos receptores (Maggio, Vogel and Wess, 1993).

Recientemente distintos laboratorios han publicado datos que se oponen a este modelo. Un ejemplo lo encontramos con el receptor a vasopresina: Se han coexpresado distintas mutantes no funcionales de este receptor con uno silvestre para el mismo ligando, observando que a pesar de haber interacción entre ambos receptores, la función no se recupera en ninguna de las mutantes probadas (Schulz *et al.*, 2000).

De esta manera se ha llegado a la conclusión de que el intercambio de dominios es un mecanismo de interacción que puede existir, pero que no necesariamente es el mecanismo de interacción preferencial entre GPCRs.

El segundo modelo se llama “dimerización por contacto”, en el que los protómeros de un dímero interaccionan a partir de las caras de las hélices transmembranales que estarían interactuando con lípidos de la membrana si se encontraran como monómeros.

Estas interacciones por contacto entre hélices transmembranales podrían tener como resultado modificaciones en la conformación de las hélices en cuestión.

La dimerización por contacto de hélices es una teoría apoyada por estudios de microscopía de fuerza atómica donde se observa a la rodopsina dispuesta espacialmente en forma de dímeros alineados uno al lado del otro. (Fotiadis *et al.*, 2003).

Desconocemos cómo se da la interacción entre el LPA₁ y el GPR120, no obstante sabemos que las propiedades farmacológicas del receptor LPA₁ se están viendo alteradas. La desensibilización observada del LPA₁ tras la activación del GPR120 puede explicarse de distintas maneras a partir de esta dimerización. Un escenario es que la dimerización modifique el sitio de unión a ligando del LPA₁, convirtiéndolo en un sitio incapaz de interactuar con LPA. Otra posibilidad es que el sitio permanezca intacto, pero que los dominios de unión a la proteína G se vean alterados y dejen de ser funcionales, pudiendo interactuar con su ligando pero no activar a la proteína G. Finalmente, no podemos descartar que ambas cosas ocurran.

A partir de modelados computacionales y evidencia experimental se han propuesto a las hélices transmembranales 1 y 4 como los dominios más probables para estar involucrados en interacciones entre GPCRs (Liang *et al.*, 2003). Esto es interesante porque, como se mencionó anteriormente, los receptores clase A generalmente interactúan con su ligando a través de la formación de sitios de unión en las hélices transmembranales localizados en la frontera con el espacio extracelular. Un elemento estructural importante para la formación de estos “huecos” y potenciales sitios de unión a ligando son las prolina (Ballesteros, Shi y Javitch, 2001), las cuales desestabilizan la α hélice, generando un quiebre (von Heijne, 1991). El receptor LPA₁ cuenta con una prolina en su cuarto segmento transmembranal, muy cerca de la frontera con el espacio extracelular. Al día de hoy desconocemos qué elementos estructurales están involucrados en el reconocimiento del LPA₁ hacia su ligando; sin embargo, una posibilidad es que esta prolina participe. De darse el caso, si durante la heterodimerización de los receptores, el GPR120 interactúa con la cuarta hélice del LPA₁ tal como las predicciones para esta familia de GPCRs sugieren (Liang *et al.*, 2003), pudiera darse el caso en el que la prolina de esa hélice modifique su disposición espacial y no se induzca la formación del sitio de unión a ligando.

Ensayos biofísicos han ayudado a determinar que en sistemas de expresión heteróloga, un receptor puede encontrarse predominantemente en dímeros. Tal es

el caso del receptor β_2 adrenérgico, que puede encontrarse dimerizado u oligomerizado hasta en un 80% del total de receptores. (Mercier *et al.*, 2002). No obstante hay que tener en cuenta que este resultado se observó en un sistema forzado con una sobreexpresión del receptor, no en cantidades endógenas.

Por estudios en células en cultivo empleando un método de reconstitución de actividad de galactosidasa sabemos que el LPA₁ en condiciones basales forma homodímeros y heterodímeros con el receptor de Esfingosina 1 Fosfato (S1P₁) (Zaslavsky *et al.*, 2006). Quizás la heterodimerización del GPR120 con el LPA₁ pudiera estar compitiendo con monómeros de LPA₁ e impidiendo que el homodímero se forme y funcione adecuadamente. En este fenómeno no podemos evitar considerar que otros receptores puedan también ser afectados por esta heterodimerización GPR120 - LPA₁, como el caso del receptor de S1P₁, que sabemos que también que en condiciones basales forma heterodímeros con el LPA₁.

Resulta muy interesante que la activación del GPR120 no induzca en ningún tiempo la internalización del LPA₁. El hecho de que durante la desensibilización no haya internalización del receptor apoya más la idea de que la dimerización puede estar jugando un papel importante en este fenómeno debido a que la internalización constituye un mecanismo canónico de la desensibilización de receptores.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, la internalización del GPR120 por su ligando se da desde tiempos cortos, no obstante a pesar de observarse una clara internalización, continuamos observando una población de receptores en membrana. Considerando que el LPA₁ no se internaliza en ningún momento por DHA, es factible pensar que la población de GPR120 que permanece en membrana es la que interacciona con el receptor LPA₁. Incluso no es descabellado pensar que esta interacción, además de bloquear el reconocimiento de LPA₁ por su ligando, también esté modificando los sitios de interacción del GPR120 con proteínas involucradas en su internalización como la β -arrestina y que debido a ello observemos una población no internalizada.

Por otro lado, resulta interesante haber observado internalización del GPR120 al estimular con LPA. En conjunto, nuestros datos indican que tratar a las células con LPA no desensibiliza al GPR120, sin embargo sí induce una internalización del receptor. Para explicar esto hay que tener en cuenta algunas consideraciones: la internalización del GPR120 es parcial, a pesar del tiempo de estímulo, una población de receptores parece mantenerse en membrana. Esta población puede activarse por DHA. Además de esto, en 2013 Von Zastrow y colaboradores demostraron que un receptor internalizado puede seguir señalizando dentro de la célula (Irannejad *et al.*, 2013). Detalles estructurales y mecánicos de este evento se conocieron en 2016 cuando el grupo de Lefkowitz demostró que una proteína G podía activarse uniéndose a un receptor internalizado, formándose un súper complejo Receptor-Proteína G- β arrestina (Thomsen *et al.*, 2016). Es posible que la falta de desensibilización del GPR120 por LPA a pesar de su internalización parcial sea producto de una combinación de los dos escenarios descritos.

9. Conclusiones

1. El receptor GPR120 media la desensibilización del LPA₁.
2. La desensibilización de LPA₁ por GPR120 es reversible retirando DHA del medio.
3. El DHA no compromete los sistemas intracelulares de liberación de calcio del retículo endoplásmico al citosol.
4. El DHA induce una dimerización de los receptores LPA₁ y GPR120 de manera dependiente del tiempo y la dosis.
5. El estímulo de LPA no induce dimerización de los mismos receptores.
6. La desensibilización del receptor LPA₁ mediada por el GPR120 es independiente a su internalización.
7. LPA induce la internalización del GPR120 con una cinética similar a la ocurrida con el LPA₁ internalizado por su ligando.
8. La internalización del GPR120 por LPA no resulta en una desensibilización de este receptor.

10. Perspectivas

1. Analizar la fosforilación de los receptores por su ligando y por el ligando del otro receptor.
2. Estudiar qué elementos estructurales de los receptores están implicados en la dimerización.
3. Estudiar qué alteración farmacológica sufre el receptor LPA₁ a raíz de su interacción con el GPR120 (disminución de la afinidad por LPA o por la proteína G).
4. Corroborar la posible funcionalidad del receptor GPR120 internalizado por LPA.

11. Referencias

- Alcántara-Hernández, R. *et al.* (2015) 'Phosphorylation and internalization of lysophosphatidic acid receptors LPA1, LPA2, and LPA3', *PLoS ONE*, 10(10), pp. 1–28. doi: 10.1371/journal.pone.0140583.
- Angers, S. *et al.* (1999) 'Detection of β_2 -adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)', *PNAS*, pp. 3–8.
- Atwood, B. K. *et al.* (2011) 'Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis', *BMC Genomics*. BioMed Central Ltd, 12(1), p. 14. doi: 10.1186/1471-2164-12-14.
- Ballesteros, J. a, Shi, L. y Javitch, J. a (2001) 'Structural mimicry in G protein-coupled receptors: implications of the high-resolution structure of rhodopsin for structure-function analysis of rhodopsin-like receptors.', *Molecular pharmacology*, 60(1), pp. 1–19. doi: 10.1124/mol.60.1.1.
- Benovic, J. L. *et al.* (1985) 'Phosphorylation of the mammalian β -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', *Journal of Biological Chemistry*, 260(11), pp. 7094–7101. doi: 10.1038/333370a0.
- Bortolato, A. *et al.* (2014) 'Structure of Class B GPCRs : new horizons for drug discovery'. doi: 10.1111/bph.12689.
- Bünemann, M. y Hosey, M. M. (1999) 'G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling', *Journal of Physiology*, 517(1), pp. 5–23. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0005z.x.
- Calder, P. C. P. (2012) 'Mechanisms of action of (n-3) fatty acids', *The Journal of nutrition*, 142(3), p. 592S–599S. doi: 10.3945/jn.111.155259.desaturase.
- Chiurchi, V. y Maccarrone, M. (2016) 'Bioactive lipids as modulators of immunity,

inflammation and emotions', *Current Opinion in Pharmacology*, 29, pp. 54–62. doi: 10.1016/j.coph.2016.06.005.

Chun, L., Zhang, W. y Liu, J. (2012) 'Structure and ligand recognition of class C GPCRs', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 33(3), pp. 312–323. doi: 10.1038/aps.2011.186.

Domenichiello, A. F. *et al.* (2014) 'Whole body synthesis rates of DHA from - linolenic acid are greater than brain DHA accretion and uptake rates in adult rats', *The Journal of Lipid Research*, 55(1), pp. 62–74. doi: 10.1194/jlr.M042275.

Exton, J. H. (1996) 'REGULATION OF PHOSPHOINOSITIDE PHOSPHOLIPASES BY HORMONES , NEUROTRANSMITTERS , AND OTHER AGONISTS LINKED TO G PROTEINS'.

Ferguson, S. S. G. (2001) 'Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling', *Pharmacological Reviews*, 53(1), pp. 1–24.

Fukushima, N., Kimura, Y. y Chun, J. (1998) 'A single receptor encoded by *vzg-1/lpA1/edg-2* couples to G proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), pp. 6151–6156. doi: 10.1073/pnas.95.11.6151.

Hall, A. y Hall, A. (2013) 'Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton', 509(1998). doi: 10.1126/science.279.5350.509.

von Heijne, G. (1991) 'Proline kinks in transmembrane α -helices', *Journal of Molecular Biology*, 218(3), pp. 499–503. doi: 10.1016/0022-2836(91)90695-3.

Hill, S. J. y Baker, J. G. (2003) 'The ups and downs of Gs- to Gi-protein switching', pp. 1188–1189. doi: 10.1038/sj.bjp.0705192.

Hirasawa, A. *et al.* (2005) 'Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120', *Nature Medicine*, 11(1), pp. 90–94. doi: 10.1038/nm1168.

Hopkins, M. M., Liu, Z. y Meier, K. E. (2016) 'Positive and Negative Cross-Talk between Lysophosphatidic Acid Receptor 1, Free Fatty Acid Receptor 4, and Epidermal Growth Factor Receptor in Human Prostate Cancer Cells.', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 359(1), pp. 124–133. doi: 10.1124/jpet.116.233379.

Irannejad, R. *et al.* (2013) 'Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes', *Nature*. Nature Publishing Group, 495(7442), pp. 534–538. doi: 10.1038/nature12000.

Kelly, E., Bailey, C. P. y Henderson, G. (2009) 'Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization', *British Journal of Pharmacology*, 153(S1), pp. S379–S388. doi: 10.1038/sj.bjp.0707604.

Koh, J. S., Lieberthal, W. y Levine, J. S. (1997) 'Lysophosphatidic acid (LPA): A major survival factor in serum that acts via the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway', *Journal of the American Society of Nephrology*, 8, pp. A1921–A1921.

Kundu, S. y Jernigan, R. L. (2004) 'Molecular mechanism of domain swapping in proteins: an analysis of slower motions.', *Biophysical journal*, 86(6), pp. 3846–3854. doi: 10.1529/biophysj.103.034736.

Lagarde, M. (2008) 'Docosahexaenoic acid: Nutrient and precursor of bioactive lipids', *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(8), pp. 673–678. doi: 10.1002/ejlt.200800087.

Liang, Y. *et al.* (2003) 'Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes', *Journal of Biological Chemistry*, 278(24), pp. 21655–21662. doi: 10.1074/jbc.M302536200.

Liu, Z. *et al.* (2015) 'Omega-3 Fatty Acids and Other FFA4 Agonists Inhibit Growth Factor Signaling in Human Prostate Cancer Cells', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 352(2), pp. 380–394. doi: 10.1124/jpet.114.218974.

Maggio, R., Vogel, Z. y Wess, J. (1993) 'Coexpression studies with mutant

muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular “cross-talk” between G-protein-linked receptors.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(7), pp. 3103–7. doi: 10.1073/pnas.90.7.3103.

Manuscript, A. y Nanostructures, S. P. C. (2008) ‘NIH Public Access’, *Nano*, 6(9), pp. 2166–2171. doi: 10.1021/nl061786n.Core-Shell.

Mercier, J. F. *et al.* (2002) ‘Quantitative assessment of β 1- and β 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer’, *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), pp. 44925–44931. doi: 10.1074/jbc.M205767200.

Nieto-Posadas, A. *et al.* (2011) ‘Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site’, *Nature Chemical Biology*, 8(1), pp. 78–85. doi: 10.1038/nchembio.712.

Okudaira, S., Yukiura, H. y Aoki, J. (2010) ‘Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin’, *Biochimie*. Elsevier Masson SAS, 92(6), pp. 698–706. doi: 10.1016/j.biochi.2010.04.015.

Rivero-Muller, A. *et al.* (2010) ‘Rescue of defective G protein-coupled receptor function in vivo by intermolecular cooperation’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), pp. 2319–2324. doi: 10.1073/pnas.0906695106.

Rotein, T. H. E. G. P. and Eceptors, O. R. (2016) ‘GPCR Handbook’, in.

Schulz, A. *et al.* (2000) ‘Structural implication for receptor oligomerization from functional reconstitution studies of mutant V2 vasopressin receptors’, *Journal of Biological Chemistry*, 275(4), pp. 2381–2389. doi: 10.1074/jbc.275.4.2381.

Seachrist, J. L. y Ferguson, S. S. G. (2003) ‘Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases’, *Life Sciences*, 74(2–3), pp. 225–235. doi: 10.1016/j.lfs.2003.09.009.

Seo, E. J. *et al.* (2016) ‘Autotaxin regulates maintenance of ovarian cancer stem cells through lysophosphatidic acid-mediated autocrine mechanism’, *Stem Cells*,

34(3), pp. 551–564. doi: 10.1002/stem.2279.

Talukdar, S. *et al.* (2011) 'GPR120 is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-Inflammatory and Insulin Sensitizing Effects', *Cell*, 142(5), pp. 687–698. doi: 10.1016/j.cell.2010.07.041.GPR120.

Tata, J. R. (2002) 'Signalling through nuclear receptors', 3(September), pp. 15–20.

Thomsen, A. R. B. *et al.* (2016) 'GPCR-G Protein- β -Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling', *Cell*. Elsevier Inc., 166(4), pp. 907–919. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.004.

Valet, P. and Jean, S. (2006) 'Lysophosphatidic acid synthesis and release".

Villegas-Comonfort, S. *et al.* (2017) 'Effects of arachidonic acid on FFA4 receptor: Signaling, phosphorylation and internalization', *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 117(November 2016), pp. 1–10. doi: 10.1016/j.plefa.2017.01.013.

Wang, C. *et al.* (2014) 'Structure of the human smoothed receptor 7TM bound to an antitumor agent', *Nature*, 497(7449), pp. 338–343. doi: 10.1038/nature12167.Structure.

Watterson, K. R. *et al.* (2017) 'Probe-Dependent Negative Allosteric Modulators of the Long-Chain Free Fatty Acid Receptor FFA4', *MOLECULAR PHARMACOLOGY Mol Pharmacol*, 91, pp. 630–641. doi: 10.1124/mol.116.107821.

White, J. H. *et al.* (1998) 'Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor.', *Nature*, 396(6712), pp. 679–682. doi: 10.1038/25354.

Wrzal, P. K. *et al.* (2012) 'Allosteric interactions between the oxytocin receptor and the β 2-adrenergic receptor in the modulation of ERK1/2 activation are mediated by heterodimerization', *Cellular Signalling*. Elsevier Inc., 24(1), pp. 342–350. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.09.020.

Zaslavsky, A. *et al.* (2006) 'Homo- and hetero-dimerization of LPA/S1P receptors, OGR1 and GPR4', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(10), pp. 1200–1212. doi: 10.1016/j.bbalip.2006.08.011.