



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Fosforilación, internalización e interacción con las proteínas Rab del receptor de esfingosina-1-fosfato tipo 1 (S1P₁): efectos de la esfingosina-1-fosfato, FTY720-P, ésteres de forbol y paroxetina”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Juan Carlos Martínez Morales

Tutor principal

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

[Miembros del comité tutor](#)

Dra. Claudia González Espinosa
[CINVESTAV](#)

Dra. Guadalupe Reyes Cruz
[CINVESTAV](#)

Ciudad de México. Julio, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reconocimientos

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 (IN200718 IN201221) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (253156 y Fronteras 6676).

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

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz (IFC, UNAM)

Dra. Claudia González Espinosa (CINVESTAV, IPN)

Dra. Guadalupe Reyes Cruz (CINVESTAV, IPN)

El jurado de examen de grado estuvo conformado por:

Presidente Dra. Marina Macías Silva

Vocal Dra. Diana María Escalante Alcalde

Vocal Dra. Aliesha González Arenas

Vocal Dr. Omar Pantoja Ayala

Secretario Dra. Erika Rendón Huerta

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 directa de la Dra. María Teresa Romero Ávila, y del apoyo técnico de la Dra. Rocío Alcántara y del Dr. Marco Alfonso Méndez. Se reconoce la asesoría técnica en la generación del anticuerpo dirigido al receptor de S1P₁ de la Dra. Claudia González Espinosa, la Dra. María Teresa Romero Ávila y del Q.F.B. Alfredo Ibarra Sánchez.

Se utilizaron los servicios de lectura de membranas radiactivas, cuantificación de ADN, síntesis de oligonucleótidos y secuenciación de ADN que provee la Unidad de Biología Molecular de la UNAM conformada por la Dra. Laura Ongay Larios, Bióloga Guadalupe Códiz Huerta y M. en C. Minerva Mora Cabrera. Se agradece el apoyo de las siguientes Unidades de Servicio y a su personal: Bioterio (Dra. Claudia Rivera y Dr. Héctor Malagón), Cómputo (Ing. Juan Barbosa y M. en C. Gerardo Coello). Taller (Ings. Aurey Galván y Manuel Ortíz).

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, por brindarme la oportunidad de formar parte de su laboratorio y el apoyo incondicional para poder desarrollarme como estudiante de ciencia y su importancia en la aplicación del método científico. Su desempeño como tutor fue inigualable, gracias.

Agradezco a la Dra. María Teresa Romero Ávila, por tener el tiempo y la paciencia de instruirme durante cada experimento, por apoyarme en cada momento durante mi estancia en el laboratorio y por dedicarme palabras de aliento en cada tropiezo de mi vida personal que se presentaba, gracias Tere por ser mi amiga.

Agradezco a la Dra. Rocío Alcántara Hernández por su tiempo para ayudarme en cualquier duda referente al protocolo experimental.

Agradezco a todos mis amigos y colegas del laboratorio 303-Sur. A Sócrates, David, Marco, Aldo, Alejandro, Emmanuel, Karla, Gustavo, Raúl y Lupita 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 a los miembros de mi jurado de examen de grado a la Dra. Marina Macías Silva, Dra. Diana María Escalante Alcalde, Dra. Aliesha González Arenas, Dr. Omar Pantoja Ayala y Dra. Erika Rendón Huerta por sus sugerencias en la redacción de esta tesis.

Índice general

Reconocimientos	I
Agradecimientos	II
Índice de figuras y tablas	V
Abreviaturas	VII
Resumen	VIII
Abstract	IX
1. Introducción	
1.1. Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).....	1
1.2. Regulación de GPCRs.....	2
1.3. Las GTPasas Rab.....	4
1.4. El lípido bioactivo esfingosina-1-fosfato (S1P).....	6
1.5. El receptor de esfingosina-1-fosfato tipo 1 (S1P ₁).....	7
1.6. El receptor S1P ₁ y la esclerosis múltiple.....	8
2. Planteamiento del problema	11
3. Objetivos	
3.1. Objetivos.....	12
4. Materiales y métodos	
4.1. Materiales.....	12
4.2. Cultivo celular.....	12
4.3. Transfecciones celulares.....	13
4.4. Cuantificación de la concentración de calcio libre intracelular ([Ca ²⁺] _i).....	13
4.5. Ensayos de fosforilación y Western blots.....	14
4.6. Microscopia confocal.....	15
4.7. Análisis de imágenes utilizando el software ImageJ.....	15
4.8. Análisis estadístico y presentación de resultados.....	15
5. Resultados	
5.1. Concentración de Ca ²⁺ intracelular por activación del receptor de S1P ₁	18
5.2. Fosforilación del receptor S1P ₁	19
5.3. Localización subcelular del receptor de S1P ₁	19
5.4. Interacción del receptor S1P ₁ con las proteínas Rab.....	21
5.5. Importancia de GRK2 en la fosforilación del receptor S1P ₁	33

6. Discusión	40
7. Conclusiones y perspectivas	45
8. Referencias	46
9. Anexos	
9.1. S1P ₁ receptor phosphorylation, internalization, and interaction with Rab proteins: effects of sphingosine-1-phosphate, FTY720-P, phospholipid esters, and paroxetine	53
9.2. Colaboraciones	68

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Estructura general de un GPCR.	1
Figura 2. Señalización por proteínas G.	3
Figura 3. Proceso de desensibilización homóloga y heteróloga.	4
Figura 4. Mapa de localización intracelular de diferentes GTPasas Rab.	5
Figura 5. Esquema del receptor S1P ₁	8
Figura 6. Modelo propuesto para el papel del receptor S1P ₁ en la esclerosis múltiple.	9
Figura 7. Efecto de S1P, FTY720-P y PMA en la concentración intracelular de calcio	18
Figura 8. Efecto de la S1P, FTY720-P y PMA en la fosforilación del receptor S1P ₁	20
Figura 9. Efecto de la S1P, FTY720-P y PMA en la internalización del receptor S1P ₁	21
Figura 10. Efecto de la S1P, FTY720-P o PMA en la asociación del receptor S1P ₁ y las proteínas Rab	23
Figura 11. Interacción del receptor S1P ₁ -mCherry y la proteína Rab5-eGFP identificada por FRET	24
Figura 12. Interacción del receptor S1P ₁ -mCherry y la proteína Rab5-eGFP identificada por FRET	25
Figura 13. Interacción del receptor S1P ₁ -mCherry y la proteína Rab5-eGFP identificada por FRET	26
Figura 14. Interacción del receptor S1P ₁ -mCherry y la proteína Rab9-eGFP identificada por FRET	27
Figura 15. Interacción del receptor S1P ₁ -mCherry y la proteína Rab9-eGFP identificada por FRET	28
Figura 16. Interacción del receptor S1P ₁ -mCherry y la proteína Rab9-eGFP identificada por FRET	29
Figura 17. Interacción del receptor S1P ₁ -mCherry y la proteína Rab7-eGFP identificada por FRET	30
Figura 18. Interacción del receptor S1P ₁ -mCherry y la proteína Rab7-eGFP identificada por FRET	31
Figura 19. Interacción del receptor S1P ₁ -mCherry y la proteína Rab7-eGFP identificada por FRET	32
Figura 20. Las dominantes negativas de las proteínas Rab no interactúan con el receptor S1P ₁	33
Figura 21. Efecto de la paroxetina en la fosforilación del receptor S1P ₁ por la S1P, FTY720-P y PMA	34
Figura 22. Efecto de la paroxetina en la internalización del receptor de S1P ₁ por la S1P, FTY720-P y PMA	35
Figura 23. Efecto de la paroxetina en la longitud y área de células que expresan el receptor S1P ₁	35

Figura 24. Efecto de la paroxetina en la asociación del receptor S1P ₁ y las proteínas Rab	36
Figura 25. Interacción del receptor S1P ₁ -mCherry y la proteína Rab5-eGFP identificada por FRET en presencia de paroxetina.	37
Figura 26. Interacción del receptor S1P ₁ -mCherry y la proteína Rab9-eGFP identificada por FRET en presencia de paroxetina.	38
Figura 27. Interacción del receptor S1P ₁ -mCherry y la proteína Rab7-eGFP identificada por FRET en presencia de paroxetina.	39
Tabla I. Expresión de los receptores de S1P y vías de señalización.	6

Abreviaturas

CerS: Sintasa de ceramida
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 salino de fosfatos
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PIP₂: Fosfatidilinositol 4, 5 bifosfato
PKA: Cinasas A de proteínas (proteína cinasa A)
PKC: Cinasas C de proteínas (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: Concentración de calcio intracelular

Resumen

El receptor S1P₁ es un miembro de la familia de Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), los GPCRs se caracterizan por poseer siete dominios transmembranales y regulan muchas acciones de diferentes ligandos. En particular el receptor S1P₁ regula los efectos de la esfingosina-1-fosfato, este esfingolípido bioactivo actúa a nivel de células, tejidos y organismos individuales, dado que 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. El receptor S1P₁ se expresa en las superficies de los linfocitos y es importante para regular la salida de dichas células de los ganglios linfáticos. La esclerosis múltiple es una enfermedad crónica autoinmune y neurodegenerativa del sistema nervioso central asociada con progresión irreversible y discapacidad. El Fingolimod (FTY720-P) inicialmente activa los receptores S1P₁ de linfocitos y posteriormente induce la desensibilización de los S1P₁, así el Fingolimod a largo plazo impide la salida de los linfocitos de los tejidos linfoides, reduciendo de este modo la infiltración de linfocitos en el sistema nervioso central y la reactividad de los astrocitos.

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, respectivamente.

Se sabe que la esfingosina-1-fosfato, el forbol miristato acetato y el agonista sintético, FTY720-P, inducen la fosforilación del receptor S1P₁. Sin embargo, los estudios centrados en el tráfico vesicular del receptor activado por estos agentes, son muy escasos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la cinética de la fosforilación y el tráfico vesicular de los receptores S1P₁. Hemos encontrado que la esfingosina-1-fosfato es más potente que el FTY720-P al medir la elevación de la concentración de calcio intracelular. Además, encontramos una cinética de fosforilación diferencial del receptor por la activación debida a la esfingosina-1-fosfato en comparación con la que induce el FTY720-P. También, se observó que cuando el receptor S1P₁ se activa con esfingosina-1-fosfato y al utilizar forbol miristato acetato, el receptor interacciona 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 interacciona con Rab5 y con marcadores de endosomas tardíos, tales como Rab 7, pero no con Rab9. El receptor S1P₁ presenta diferencias farmacológicas, en su cinética de fosforilación y tráfico vesicular durante su desensibilización por S1P, FTY720-P y PMA.

ABSTRACT

The S1P₁ receptor is a member of the family of G protein-coupled Receptors (GPCRs), GPCRs are characterized by having seven transmembrane domains and regulate many actions of different ligands. In particular, the S1P₁ receptor regulates the effects of sphingosine-1-phosphate, 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. The S1P₁ receptor is expressed on the lymphocyte's surface and is essential in regulating egression from lymph nodes. Multiple sclerosis is a chronic autoimmune and neurodegenerative disease of the central nervous system associated with irreversible progression and disability. Fingolimod (FTY720-P) initially activates the lymphocyte's S1P₁ receptors. Subsequently, it induces S1P₁ down-regulation that prevents lymphocyte egress from lymphoid tissues, reducing autoaggressive lymphocyte infiltration into the central nervous system and diminishing astrocyte activation.

Internalization of G protein-coupled receptors can be triggered by agonists and 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. In contrast, Rab 7 and Rab 9 regulate the traffic from late endosomes to lysosomes and recycling through the trans-Golgi network, respectively.

It is known that sphingosine 1-phosphate, phorbol myristate acetate, and the synthetic agonist, FTY720-P, induce phosphorylation of the S1P₁ receptor. Nevertheless, there are few studies focused on the S1P₁ receptor vesicular traffic elicited by these agents. Therefore, this work's objective was to characterize the kinetics of phosphorylation and vesicular traffic of S1P₁ receptors. We found that S1P is more potent and effective than FTY720-P in elevating intracellular calcium concentration. Additionally, we found a differential receptor phosphorylation kinetics upon activation with sphingosine 1-phosphate as compared to FTY720-P. Furthermore, it was observed that, when the S1P₁ receptor was stimulated with sphingosine 1-phosphate or phorbol myristate acetate, the receptor interacted with proteins present in early endosomes, such as Rab5, and with late endosome markers, such as Rab 9, but not with Rab7. Upon activation with FTY720-P, the receptor interacted with Rab5 and with late endosome markers, such as Rab 7, but not with Rab9. The S1P₁ receptor shows pharmacological differences in its phosphorylation kinetics and vesicular trafficking during its desensitization by S1P, FTY720-P and PMA.

Introducción

1.1. Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) se consideran la familia más grande de proteínas membranales y comprenden aproximadamente el 3-5% de los genes que codifican para proteínas en diferentes genomas secuenciados (Fredriksson, *et al.*, 2005). Esta familia se caracteriza por tener 7 dominios transmembranales en forma de hélices α ; 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 1) (Bahouth *et al.*, 1991).

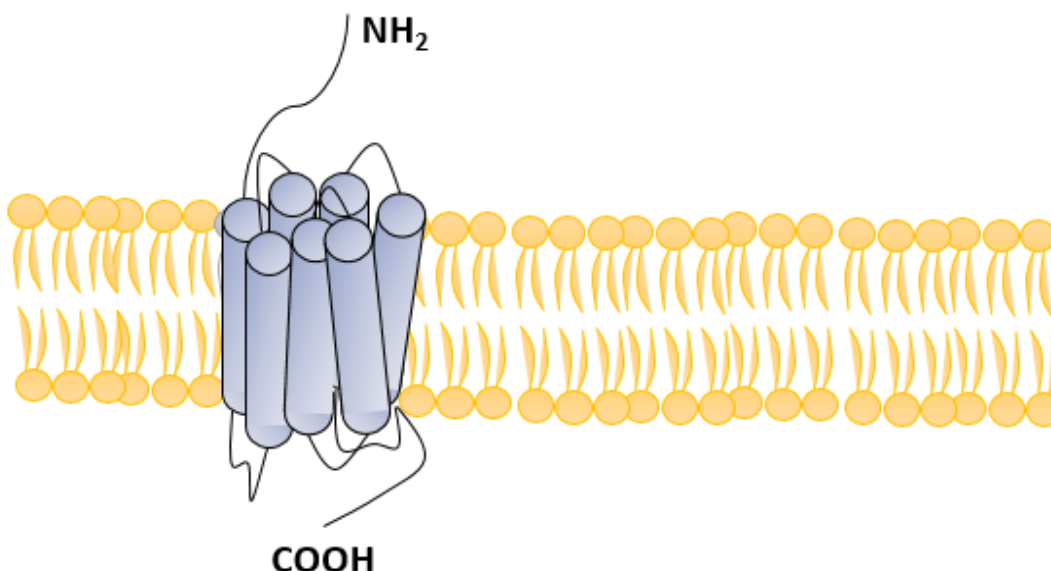


Figura 1. Estructura general de un GPCR. En azul oscuro se muestran los 7 dominios transmembranales en forma de hélice α . El amino terminal (NH_2) se encuentra en el lado extracelular y generalmente está glucosilado y el carboxilo terminal (COOH) se ubica en el lado intracelular (Imagen modificada de Morris & Malbon, 1999).

La conformación activa del receptor permite la transducción de señales por la unión de proteínas G heterotriméricas que se caracterizan por un estado basal, en donde el dímero β/γ está asociado a la subunidad α unida a un GDP (estado inactivo). Al interactuar la proteína G heterotrimérica y el receptor se favorece el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α , permitiendo la disociación del dímero β/γ . La subunidad α presenta 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). La función de la subunidad α y del dímero β/γ es estimular o reprimir la actividad de proteínas efectoras que modulan enzimas y canales iónicos generando segundos mensajeros (AMP cíclico, Ca^{2+} , diacil glicerol (DAG), inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP_3), entre otros) obteniendo una respuesta celular (Wettschureck & Offermanns,

2005). De manera general, las proteínas G se clasifican de acuerdo con su subunidad α , que está definida por su similitud en secuencia de aminoácidos y su función (Neer, 1994). Existen cuatro clases de proteínas G, denominadas como: *s*, *q*, *12/13* e *i* (figura 2). La Clase $G\alpha_s$, incluye a $G\alpha_s$ y $G\alpha_{olf}$ con un 88% de identidad (Morris & Malbon, 1999). Esta clase de proteínas G se caracteriza por conducir a la activación de la Adenilil Ciclasa (AC) que genera monofosfato de adenosina cíclica (AMPC), a partir de adenosín trifosfato (ATP). La función del AMPC es actuar como segundo mensajero que regula la actividad de la cinasa A de proteínas (PKA). (Nelson y Cox, 2008; Neer, 1994). La 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 proteínas G se caracteriza por activar a la fosfolipasa C (PLC), que cataliza la formación de dos segundos mensajeros: el diacil glicerol (DAG) y el inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP_3). El IP_3 difunde de la membrana plasmática al retículo endoplásmico y se une a receptores específicos causando la liberación de Ca^{2+} al citosol. El Ca^{2+} y el DAG activan a la cinasa C de proteínas (PKC) (Nelson y Cox, 2008). La clase $G\alpha_{12} / G\alpha_{13}$ están involucradas en la remodelación del citoesqueleto de actina, por la activación de GTPasas como Rho y Rac1 (Malbon, 2005). La clase $G\alpha_i$, incluye a $G\alpha_{i-1}$, $G\alpha_{i-2}$, $G\alpha_{i-3}$ y $G\alpha_o$. Esta clase de proteínas 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 importancia en la función de los miembros de esta clase de proteínas G han sido estudiadas usando a la toxina pertussis de la *Bordetella pertussis*, debido a que un residuo de cisteína es ADP-ribosilado en el COOH terminal por dicha toxina siendo parte del proceso que provoca la tosferina (García-Sáinz, 1981; Hazeki & Ui, 1981)

1.2. Regulación de GPCRs

La actividad o inactividad de un GPCR es el resultado de los mecanismos que regulan los procesos de señalización, desensibilización y resensibilización. La desensibilización es la atenuación o la pérdida de la capacidad de activación de los receptores y la resensibilización, la recuperación (Hausdorff *et al.*, 1990). Los conceptos más aceptados señalan que la desensibilización homóloga es el proceso que se debe por la fosforilación de la proteína receptora provocada por la activación del propio receptor. Esta fosforilación es por la activación de cinasas específicas cuyo único sustrato es el GPCR activado por sus agonistas y se conocen como cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) (figura 3A). La desensibilización heteróloga es el proceso que se debe a la fosforilación del receptor provocada por la activación de otros receptores (Kelli *et al.*, 2008) (Lohse *et al.*, 1990). Las cinasas involucradas en este proceso son aquellas activadas por segundos mensajeros (por ejemplo, PKA y PKC), la fosforilación altera la conformación del receptor y su interacción con la proteína G, al asociarse a las β -arrestinas (figura 3b) (Benovic *et al.*, 1985). En ambos procesos de desensibilización las cinasas fosforilan aminoácidos de serina o treonina localizados en la tercera asa intracelular o en el COOH terminal.

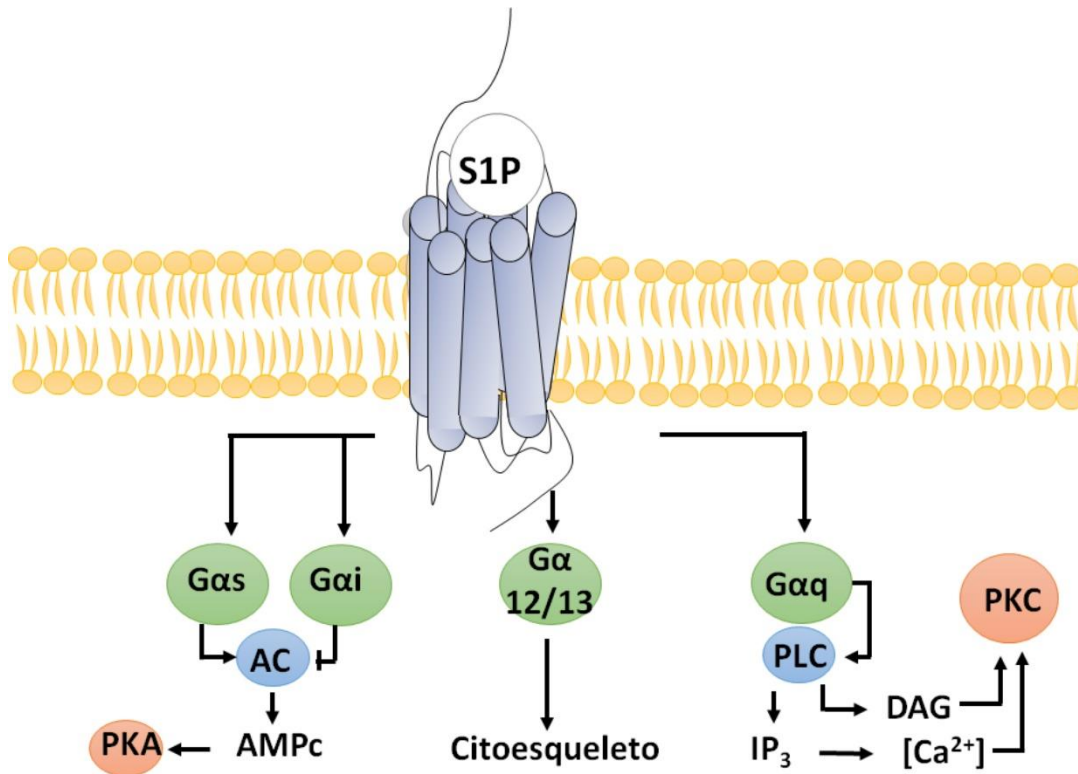


Figura 2. Señalización por proteínas G. El principal efector de la señalización de G α_s es la Adenilato Ciclasa (AC). El principal efector de la señalización de G α_q es la activación de la fosfolipasa C (PLC), generando diacilglicerol (DAG) e IP $_3$ para activar a la PKC y la liberación de Ca $^{2+}$ del retículo endoplásmico, respectivamente. Las proteínas G $\alpha_{12/13}$ activan a Rho y Rac1. La proteína G α_i inhibe a la AC a través de la subunidad α (Imagen tomada de Wettschureck & Offermanns, 2005).

La activación del GPCR por el ligando favorece la fosforilación por parte de la GRK y otras cinasas como PKA y PKC, esto facilita la unión de las β -arrestinas que impiden la asociación con las proteínas G y reclutan el complejo de clatrina y AP-2, permitiendo que se asocie el GPCR a las vesículas cubiertas de clatrina. Los GPCR que se encuentran en estas vesículas son inicialmente internalizados en la célula, en donde pueden degradarse en los lisosomas y/o el proteosoma (regulación a la baja), o bien, procesarse por desfosforilación, además se presenta el metabolismo del ligando para permitir el posterior reciclamiento del GPCR a la membrana plasmática y así recuperar su función (resensibilización) (Voet & Voet, 2006).

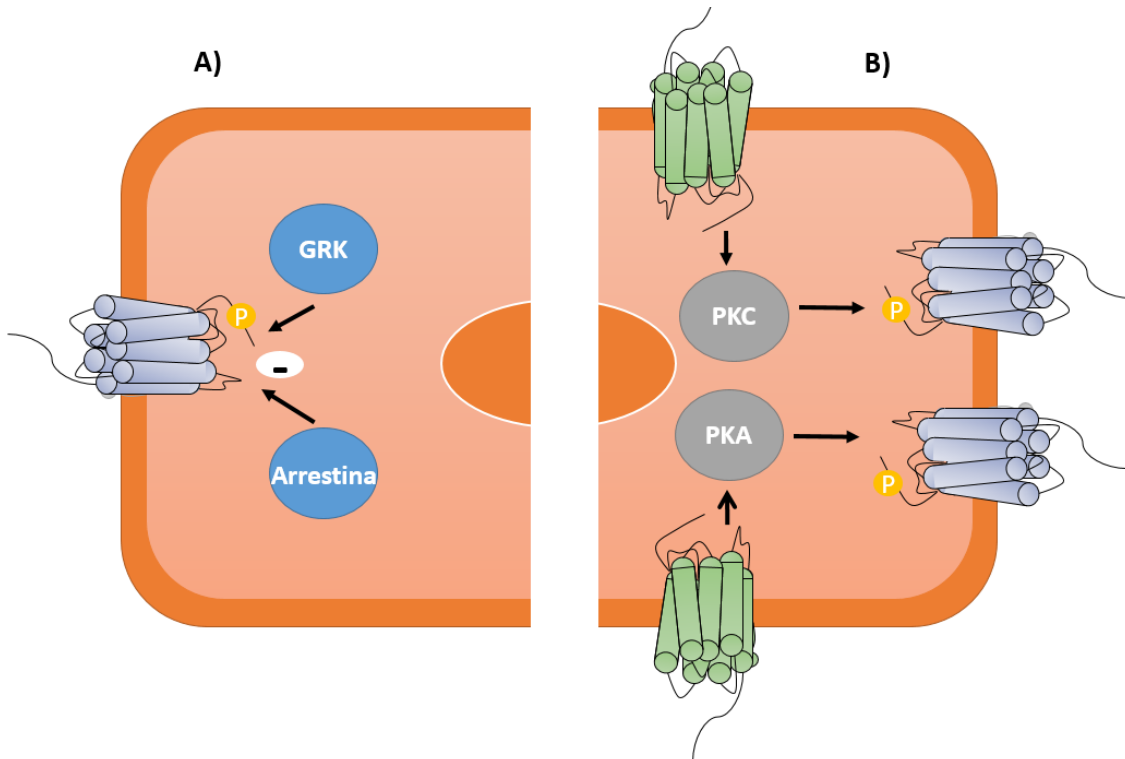


Figura 3. Procesos de desensibilización homóloga y heteróloga. (A) En la desensibilización homóloga, el receptor es activado por el agonista y es fosforilado por la GRK. La arrestina se une a los sitios fosforilados provocando la desensibilización del receptor. (B) En la desensibilización heteróloga, PKA y PKC son activadas por segundos mensajeros, para fosforilar al receptor, inhibiendo su unión con la proteína G. (Imagen tomada y modificada de Kelli *et al.*, 2008).

1.3. 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 de diversas proteínas de membrana. Las proteínas Rab tienen actividad de GTPasa y están reguladas por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF's) que favorecen el intercambio del GDP por GTP, por las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) que permiten la hidrólisis de GTP a GDP, e inhibidores de la disociación del GDP (GDIs). La modificación postraduccional de la adición de dos grupos geranilo en el extremo COOH terminal les permite asociarse 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 4) (Jordens *et al.*, 2005). De las 60 proteínas Rab se ha reportado que las proteínas Rab5 son fundamentales en el direccionamiento de los GPCRs en el tráfico vesicular dirigido a endosomas tempranos para su reciclamiento rápido hacia la membrana plasmática, además son consideradas un regulador esencial debido a que controlan la formación de vesículas cubiertas de clatrina (Zhu *et al.*, 2004) (figura 4). La proteína Rab9 dirige a las vesículas a endosomas tardíos, reciclaje lento y el transporte hacia el aparato de Golgi (figura 4) (Kloer *et al.*, 2010). Rab7 también se encuentra en endosomas tardíos y dirige la carga de estos a la

degradación por lisosomas (Schwasrtz, *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2004). Los endosomas tempranos contienen otros efectores y proteínas reguladoras, como el antígeno de endosoma temprano (EEA1), rabaptina 5, rabenosina-5-PtdIns(3)P, entre otros, 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). Para las proteínas destinadas a degradación se encuentran en 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).

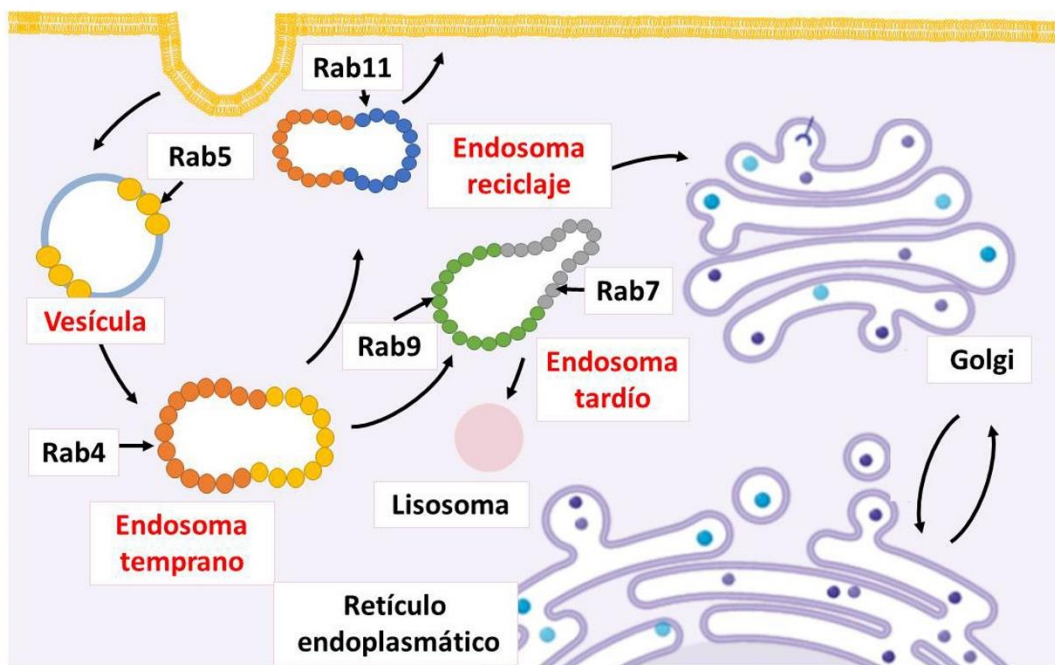


Figura 4. Mapa de localización intracelular de diferentes GTPasas Rab. Las flechas indican la dirección del transporte entre los compartimentos celulares. Rab5 controla la formación de las vesículas cubiertas de clatrina (VC), la endocitosis de VC, fusión de VC con endosomas tempranos (ET). Rab9 y Rab7 se encuentran en endosomas tardíos (Imagen modificada de Stendmark, 2009).

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

El lípido esfingosina-1-fosfato (S1P) se genera a partir de la esfingosina por la acción de las cinasas 1 y 2 de esfingosina (Sphk1 y Sphk2) (Schuchardt *et al.*, 2011). La mayor fuente de S1P en el sistema vascular se encuentra en células como los eritrocitos, plaquetas y leucocitos (Pappu *et al.*, 2007). La concentración de S1P en sangre es alrededor de 0.5 μ M (Mutara *et al.*, 2000; Okajima, 2002).

Los receptores para 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. El receptor S1P₁ está acoplado principalmente a G_i y activa 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 (Dongueun *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 estos receptores ha proporcionado una visión muy amplia del papel de los receptores de S1P (ver la Tabla 1) (Liu *et al.*, 2000; MacLennan *et al.*, 2001; Kono *et al.*, 2007; Ishii *et al.*, 2001, 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.	Problemas al generar plaquetas y alteraciones en procesos inflamatorios.	G _i , G _q y G _{12/13}	(+): AC, ERK, PLC, Rho	Golfier <i>et al.</i> , 2010.
S1P ₅	Células de SNC.	No hay defectos en la mielinización.	G _i y G _{12/13}	(-): AC, ERK (+): JNK, p54JNK	Jaillard <i>et al.</i> , 2005

(+) Activación; (-) inhibición.

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

El receptor S1P₁ fue descubierto en 1990 por Timothy Hla y colaboradores al caracterizar un receptor huérfano que se expresaba cuando se inducía la diferenciación endotelial bajo la acción del forbol miristrato acetato (PMA), debido a esto en un principio al receptor se le denominó Gen de Diferenciación Endotelial 1 (EDG-1) (Hla & Maciag, 1990), con el paso del tiempo adquirió el nombre de S1P₁ al descubrirse su ligando endógeno, la S1P (Watterson *et al.*, 2001). El receptor S1P₁ está constituido por 382 aminoácidos, de los cuales, 46 corresponden al NH₂ terminal y 68 al COOH terminal (figura 5). El S1P₁ presenta siete dominios hidrofóbicos compuesto entre 20-26 aminoácidos y 8 dominios hidrofílicos compuestos entre 7-33 aminoácidos. El receptor S1P₁ ha sido ampliamente estudiado, se conoce la estructura cristalográfica (Hanson *et al.*, 2012) y la importancia de algunos residuos de aminoácidos en las diferentes regiones del receptor. En el amino terminal encontramos los residuos de asparagina (N30 y N36) que son sustratos de N-glucosilación y las tirosinas (Y19 y Y22) que presentan sulfatación, involucradas en la afinidad por el ligando (Figura 5) (Fieger *et al.*, 2005). El carboxilo terminal presenta las cisteínas (C328, C329 y C331) que son susceptibles a palmitoilación, una modificación postraduccional importante para el anclaje de proteínas a la membrana plasmática (Figura 5) (Ohno *et al.*, 2009); además los residuos de lisina (K330, K339, K341 y K354) son susceptibles a poliubiquitinación en presencia de FTY720-P, un agonista sintético del receptor S1P₁ utilizado como tratamiento en la esclerosis múltiple y los residuos de serina (S351, S352 y S355) que son también fosforilados en presencia de FTY720-P (Figura 5) (Oo *et al.*, 2007); la tirosina (Y143) también se fosforila en presencia de S1P y es necesaria para la internalización del receptor (Chavez *et al.*, 2015); la treonina (T236) se fosforila por la proteína cinasa PKB/Akt regulando la activación de la proteína G pequeña, Rac, que está involucrada en procesos como la quimiotaxis y la angiogénesis (Figura 5) (Lee *et al.*, 2001; Spiegel & Milstein, 2002); por último, los residuos de treonina (T371) y serina (S374 y S375) son fosforilados por GRK2 y regulan el tráfico de linfocitos al torrente sanguíneo (Arnon *et al.*, 2011) (Figura 5).

Se conoce que el mecanismo de desensibilización para el receptor S1P₁ al ser estimulado por la S1P y el FTY720-P incluye la internalización rápida por la ruta canónica de desensibilización de GPCRs. Al activar al S1P₁, la S1P y el FTY720-P facilitan la unión de las β-arrestinas tipo 2 que reclutan el complejo de clatrina y AP-2, permitiendo que se fije el receptor S1P₁ a las vesículas cubiertas de clatrina (Reeves *et al.*, 2015).

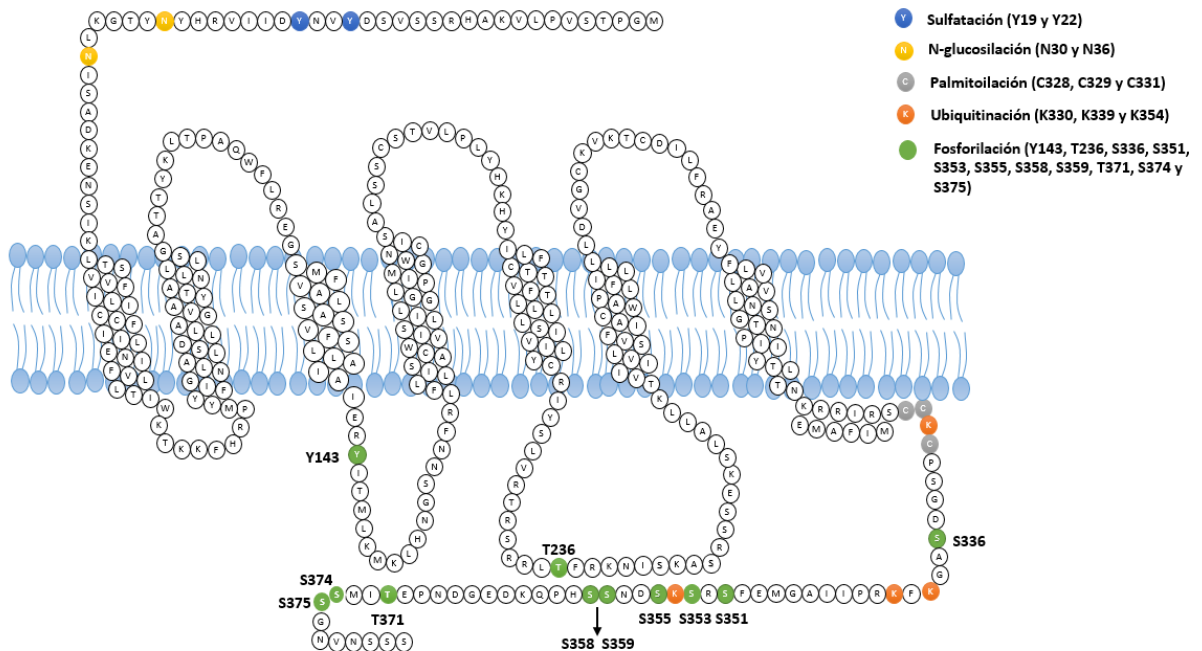


Figura 5. Esquema del receptor S1P₁. Se representan las modificaciones postraduccionales reportadas para el receptor S1P₁. El círculo color azul ejemplifica la sulfatación, el amarillo la N-glucosilación, el gris la palmitoilación, el naranja la ubiquitinación y el verde la fosforilación.

1.6. El receptor S1P₁ y la esclerosis múltiple

En condiciones fisiológicas el receptor S1P₁ se expresa en la superficie de los linfocitos T y regula la salida de dichas células de los ganglios linfáticos por quimiotaxis, para efectuar su función de células del sistema inmune. La esclerosis múltiple (EM) se considera una enfermedad autoinmune crónica del sistema nervioso central que se caracteriza por la formación de lesiones en el sistema nervioso central (astrogliosis), en las cuales hay inflamación y la destrucción de las vainas de mielina (desmielinización) que recubren los axones (Compston & Coles, 2002). Es una enfermedad inflamatoria idiopática (es decir con una causa no claramente definida) (Solomon *et al.*, 2005) y es una de las causas más importantes de discapacidad motora en adultos jóvenes, principalmente mujeres (Polman, 2000).

En la fisiopatología de la EM se desconocen los factores que afectan a las células dendríticas inmaduras, que son los actores centrales en la respuesta inmune innata y están involucradas en el mantenimiento de la tolerancia inmunitaria periférica. En pacientes con EM, la respuesta inmune es mediada principalmente por linfocitos T, activación de macrófagos y de la microglia. La activación de los linfocitos T ocurre por las células dendríticas presentadoras de antígeno (célula dendrítica madura) favoreciendo la expansión clonal de linfocitos T en los ganglios linfáticos. La naturaleza del

antígeno, las señales estimuladoras y las citocinas en los ganglios linfáticos dirige la diferenciación de las células T nativas en linfocitos T ayudadores 1, 2 y 17, (Th 1, 2 y 17) linfocitos T reguladores y linfocitos T citotóxicos (CD8). Estas células inmunitarias viajan por el torrente sanguíneo, penetran la barrera hematoencefálica e invaden el sistema nervioso central (SNC). Los Th1 liberan citocinas inflamatorias (IL10, IL2, γ -IFN y TNF- α) que activan los macrófagos favoreciendo la destrucción de la vaina de mielina. Los Th2 secretan citocinas antiinflamatorias y estimulan a los linfocitos B para la producción de anticuerpos favoreciendo 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 S1P₁ está distribuido en células del sistema nervioso (Tabla I), teniendo un papel muy importante en el desarrollo de la EM. Se propone que los linfocitos T de memoria central (T_{CM}), salen del nodo linfático hacia el torrente sanguíneo por la expresión del receptor S1P₁ y la S1P, que funciona como quimio atrayente presente en el torrente sanguíneo. Los T_{CM} 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 cinasas de esfingosina (SPHK's) (Chalfant & Spiegel, 2005). Esto aumenta la producción de S1P, que es el agonista de los receptores de S1P causando la neuroinflamación y la gliosis (figura 6) (Nayak *et al.*, 2010).

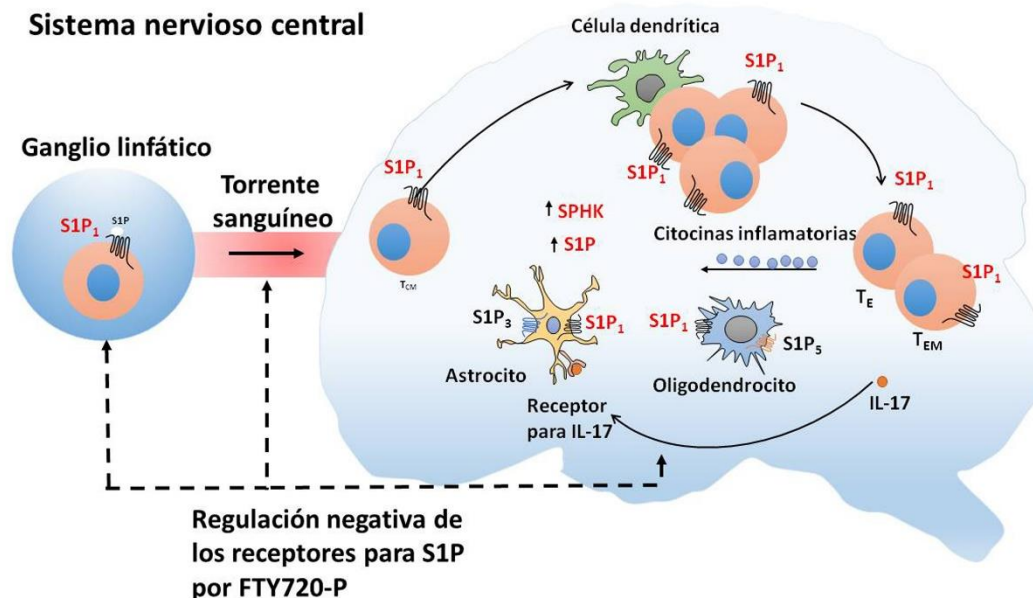


Figura 6. Modelo propuesto para el papel del receptor S1P₁ en la esclerosis múltiple. Los linfocitos T de memoria central (T_{CM}), salen del nodo linfático hacia el torrente sanguíneo por la expresión del receptor S1P₁ y penetran la barrera hematoencefálica invadiendo el sistema nervioso central (SNC). 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 células efectoras de la memoria (T_{EM}). Las células T_E activan los astrocitos por la interleucina-17 (IL-17) y activan a las SPHK's, aumentando la producción de S1P, que es el agonista de los receptores S1P para causar la neuroinflamación y gliosis. El FTY720-P se une al S1P₁ y favorece su internalización evitando la salida de los linfocitos T_{CM} previniendo la patología de la esclerosis múltiple (Imagen tomada de Brinkmann *et al.*, 2010).

El FTY720 (Novartis, Basel, Switzerland) es un modulador de los receptores de S1P, es la primera droga oral usada en el tratamiento de la EM y fue aprobada por la FDA en 2010 (Brinkmann et al., 2010; Choi *et al.*, 2011; Chun & Brinkmann, 2011; Cohen & Chun, 2011). EL FTY720 se sintetizó en 1992 por modificación estructural de un metabolito del hongo *Isaria sinclairii*, (Adachi & Chiba, 2007). Se considera al FTY720 como una prodroga y es fosforilado *in vivo* por la Sphk2, pero no por la Sphk1 (Allende *et al.*, 2004), generando al FTY720-fosfato (FTY720-P) que es un análogo estructural de la S1P y que se une a los receptores S1P₁₋₅, excepto al S1P₂ (Brinkmann *et al.*, 2002). Aunque el FTY720-P es un agonista del receptor S1P₁ debido a que lo activa, también se considera como un antagonista funcional ya que causa la ubiquitinación y la degradación del receptor (Oo *et al.*, 2007). La modulación del receptor S1P₁ por el FTY720-P conduce a la retención de las células T_{CM} en los nodos linfáticos y previene su invasión al SNC, su expansión clonal y su diferenciación en células T_E y T_{EM} (figura 6) (Fujino *et al.*, 2003), disminuyendo el daño del SNC, la desmielinización (Gasperini & Ruggieri, 2012; Mehling et al., 2008; Pinschewer et al., 2000) y disminuye la activación de los astrocitos (Chun & Hartung, 2010). Los pacientes con EM comúnmente presentan depresión, por esta razón se les indica la ingesta de paroxetina, un antidepresivo que inhibe la recaptura de la serotonina en el SNC (Dawn *et al.*, 2008).

Planteamiento del problema

Los receptores de S1P están implicados en la regulación de muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, incluyendo el cáncer, la función del sistema nervioso y la esclerosis múltiple. La epidemiología de la esclerosis múltiple en México es de 15 a 18 casos por cada 100,000 habitantes; existen más de 20,000 casos en todo el país. Como se mencionó anteriormente el receptor S1P₁ ha sido ampliamente estudiado, en diferentes aspectos, se conoce que la activación o inactivación del receptor S1P₁ es el resultado de diferentes mecanismos que regulan los procesos de señalización, desensibilización y resensibilización. En particular para la esclerosis múltiple la modulación del receptor S1P₁ por el FTY720-P ha sido una buena opción para el tratamiento de la enfermedad, sin embargo, no se ha estudiado el tráfico vesicular del receptor S1P₁, bajo la acción de la S1P, FTY720-P y el PMA.

Como ya se mencionó, el tráfico vesicular de los GPCRs está regulado por diversas proteínas Rab. Es conveniente reiterar que Rab5 es fundamental en el direccionamiento de los GPCRs dirigido a endosomas tempranos para su reciclamiento rápido hacia la membrana plasmática, además es considerado un regulador esencial debido a que controla la formación de vesículas cubiertas de clatrina. Rab9 dirige la carga, en este caso los GPCRs, a endosomas tardíos para un reciclaje lento y el transporte hacia el aparato de Golgi. Rab7 también se encuentra dirigiendo a endosomas tardíos y a la degradación a los GPCRs. Conocer qué proteínas Rab regulan el tráfico vesicular del receptor S1P₁ debida a la activación generada por la S1P, FTY720-P y PMA es muy importante debido a que no se conocen los efectos que tienen cada uno de estos ligandos y del PMA sobre el tráfico y la función del receptor S1P₁.

Hipótesis

La desensibilización del receptor de esfingosina-1-fosfato tipo 1 (S1P₁) bajo la acción de S1P, FTY720-P y PMA presentará diferencias en la función del receptor S1P₁ analizado por la caracterización farmacológica y funcional en la liberación de Ca²⁺ intracelular, en la cinética de fosforilación y en su tráfico vesicular mediado diferencialmente por las proteínas Rab.

Objetivos

3.1. Objetivos

Objetivo principal

Estudiar las diferencias farmacológicas y funcionales, la cinética de fosforilación y el tráfico vesicular del receptor S1P₁ durante su desensibilización por S1P, el FTY720-P y el PMA.

Objetivos particulares

- 1.- Caracterizar farmacológica y funcionalmente al receptor S1P₁ por la liberación de Ca²⁺ intracelular.
- 2.- Evaluar la cinética de fosforilación del receptor S1P₁ bajo la acción de S1P, FTY720-P y PMA.
- 3.- Determinar la internalización del receptor S1P₁ bajo la acción de S1P, FTY720-P y PMA.
- 4.- Estudiar el papel de las proteínas Rab5, Rab9 y Rab7 en el proceso de internalización del receptor S1P₁ en respuesta a S1P, FTY720-P y el PMA.

Materiales y métodos

4.1. Materiales

El medio de cultivo modificado de Dulbecco-Eagle (DMEM), el antibiótico G418 y otros reactivos para el cultivo celular se obtuvieron de Gibco Life Technologies. El suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) de Multicell. La esfingosina-1-fosfato (S1P), el forbol 12-miristoil 13-acetato (PMA) y los inhibidores de proteasas, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Chemical Co. El FTY720-P se obtuvo de Cayman Chemical. 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 en colaboración con el CINVESTAV-Sur por la Dra. Claudia González Espinosa, la Dra. María Teresa Romero Ávila y el Q.F.B. Alfredo Ibarra Sánchez.

4.2. Cultivo celular

La línea celular HEK AD-293, una versión de las células KEK-293 derivadas de riñón de embrión humano, fue adquirida de Stratagene. La línea celular estable HEK AD-293 S1P₁-mCherry generada en este trabajo se cultivó en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 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

Se obtuvo la línea celular estable HEK AD-293 S1P₁-mCherry. La transfección se realizó mediante el uso de Polietilenimina, un polímero catiónico que permeabiliza la membrana celular. Se adquirió el plásmido pReceiver-M56 de GeneCopoeia™ que contiene la secuencia de ADN del receptor S1P₁ fusionado por la proteína fluorescente mCherry en el COOH terminal.

Para generar la línea celular que expresara de manera estable el receptor S1P₁-mCherry se siguió el protocolo descrito por Hsu y Uludag, 2012. Se sembraron células HEK AD-293 WT en cajas Petri de 6 cm de diámetro a una confluencia aproximadamente del 70% en 3 mL de DMEM suplementado con suero y antibióticos. Para iniciar la transfección, se retiró el medio DMEM, se lavaron las células con DMEM no suplementado y se agregó 500 μ L de Opti-MEM[®], un medio que facilita la transfección por lípidos catiónicos, después se preparó una solución A que contenía 8 μ L de Polietilenimina (1 mg mL⁻¹) y 242 μ L de Opti-MEM[®] y la solución B que contenía el plásmido de S1P₁-mCherry (1 μ M) y Opti-MEM[®] con volumen final de 250 μ L. Las soluciones A y B permanecieron en una incubación a temperatura ambiente por 10 min, al concluir la incubación se transfirió el stock B al A y se incubaron 20 min a temperatura ambiente para formar los complejos Polietilenimina-ADN, al terminar este tiempo, se agregó la mezcla de A-B a las células en las cajas de 6 cm y se dejaron en la incubadora por 4 h. Posteriormente se cambió el medio Opti-MEM[®] por DMEM suplementado. Después de 24 h se seleccionaron las células con medio DMEM suplementado adicionado con el antibiótico G418.

Con el fin de estudiar el tráfico vesicular del receptor S1P₁ se realizaron cotransfecciones transitorias por el mismo protocolo descrito anteriormente. Se sembraron células HEK AD-293 WT en cajas Petri de 6 cm de diámetro a una confluencia aproximadamente del 70% en medio DMEM suplementado. Se cambió el medio DMEM por 500 μ L de Opti-MEM[®], después se preparó una solución A que contenía 8 μ L de Polietilenimina (1 mg mL⁻¹) y 242 μ L de Opti-MEM[®] y la solución B que contenían los plásmidos de S1P₁-mCherry (1 μ M), Rab5-GFP (300 ng) y Opti-MEM[®] con volumen final de 250 μ L. Las soluciones A y B permanecieron en una incubación a temperatura ambiente por 10 min, al concluir la incubación se transfirió el stock B al A y se incubaron 20 min a temperatura ambiente, al terminar este tiempo, se agregó la mezcla de A-B a las células en las cajas de 6 cm y se dejaron en la incubadora por 4 h. Posteriormente se cambió el medio Opti-MEM[®] por DMEM suplementado. Para las cotransfecciones S1P₁-mCherry (1 μ M)-Rab9-GFP (300 ng) o S1P₁-mCherry (1 μ M)-Rab7-GFP (300 ng), se realizaron de la misma manera que S1P₁-mCherry-Rab5-GFP. El plásmido que se utilizó para las construcciones de las proteínas Rab fue pEGFP-C1 (CLONTECH, Laboratories Inc.)

4.4. Cuantificación de la concentración de calcio libre intracelular ([Ca²⁺]_i)

Se cuantificó la liberación de [Ca²⁺]_i en la línea celular estable HEK AD-293 S1P₁-mCherry, las células fueron cultivadas en cajas Petri de 10 cm de diámetro, con una confluencia del 90% y se cambió el medio por DMEM no suplementado por 2 h antes del experimento. Se cargaron las células con el fluoróforo Fura-2/AM (2.5 μ M) en solución Krebs-Ringer-HEPES durante 1 h en la incubadora a 37 °C. Después se lavaron con buffer de fosfatos salino (PBS) para eliminar el exceso de albúmina y Fura-2/AM; se agregó 1 mL de tripsina/PBS (1:5) por 1 min a 37 °C, para desprender las células de la caja Petri. Posteriormente las células 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 la unión del Ca^{2+} al Fura-2/AM a las longitudes de onda, 340/510 nanómetros (nm), y el Ca^{2+} libre y Fura-2/AM a las longitudes de onda 380/510 nm. 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.

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

En esta ecuación la k_d representa la constante de afinidad del fluoróforo por el Ca^{2+} (224 nM), 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 y Western blots

El protocolo se realizó de acuerdo a lo reportado previamente por el laboratorio (Vázquez-Prado *et al.*, 1996; García-Sáinz *et al.*, 2001). 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 [^{32}P]Pi 50 ($\mu\text{Ci}/\text{mL}$) por 3 h (para marcar la poza de ATP y mantenerla en estado estacionario), después las células se estimularon como se indica en el apartado de resultados, se aspiró el ligando o el PMA, se realizó 1 lavado con solución PBS fría y las células se mantuvieron por una hora en cama de hielo con 1 mL de solución de lisis (Vázquez-Prado *et al.*, 1996; García-Sáinz *et al.*, 2001). Al concluir la hora de lisis celular los lisados se recolectaron y se transfirieron a tubos de polipropileno, se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes se transfirieron a otros tubos de polipropileno que contenían 10 μL de anticuerpo policlonal (generado en el laboratorio) que reconoce a la proteína mCherry y 10 μL de proteína A-agarosa. Para concluir los tubos se incubaron en agitación por toda la noche a 4 °C.

Después de la inmunoprecipitación se realizaron 4 lavados con solución de lisis a 3,000 rpm por 5 min. Al terminar los lavados, los inmunoprecipitados se resuspendieron en SDS 10%/Urea 8M y con buffer de carga (Laemmli, 1970). Las muestras se colocaron a 96 °C por 15 min en un termoblock, se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min y se realizaron electroforesis desnaturalizantes en geles de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) al 7.5%. Por último los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se colocaron en un casete de exposición auto radiográfico por 48 h.

Después de este tiempo se escaneó la placa auto radiográfica en un Typhoon Fla7000IP y las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con PBS 1X y leche al 0.5% por 12 h, al concluir este tiempo se incubó la membrana con un anticuerpo que reconoce a la proteína mCherry a una concentración 1:1000 para obtener los controles de carga por Western blot.

4.6. Microscopia confocal

Se realizaron tres diferentes transfecciones transitorias en células HEK AD-293. Estas transfecciones fueron S1P₁-mCherry/Rab5-GFP, S1P₁-mCherry/Rab9-GFP y S1P₁-mCherry/Rab7-GFP (ver apartado 4.3). Después de 24 h de la transfección transitoria, las células se cultivaron en cajas Petri con fondo de vidrio por 48 h a una confluencia aproximada del 50%, se mantuvieron en DMEM no suplementado por 3 h antes del experimento, se estimularon como se indica en el apartado de resultados, se retiró el medio DMEM con estímulo y las células se fijaron con paraformaldehído al 4% por 20 min, para concluir se realizaron 7 lavados con PBS 1X, para eliminar el exceso de paraformaldehído.

Para observar si en la desensibilización durante la activación del receptor S1P₁ por la S1P, el FTY720-P o el PMA (activador de PKC) están involucradas las proteínas Rab5, Rab9 y Rab7 se realizaron experimentos por Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (FRET). Las células fijadas 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 en agua, apertura focal de 1, sensibilidad promedio de 40 e intensidad de láser en 25%, además el "cross talk correction" permaneció activo. La proteína eGFP se excitó a 480 nm y la fluorescencia emitida se detectó a 515-540 nm. 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 y el "cross talk correction" y se adquirió la 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". 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 en el que adquiere 2 grupos de fotografías. En el primer grupo de fotografías el "cross talk correction" permaneció activo, la proteína eGFP se excitó a 480 nm y la fluorescencia emitida se detectó a 515-540 nm, para la proteína mCherry se excitó a 580 nm y la fluorescencia emitida se detectó a 610 nm. En el segundo grupo de fotografías, se inactivó el "cross talk correction", se apagó el láser que excita a la proteína mCherry y la proteína eGFP se excitó a 480 nm y la fluorescencia emitida se detectó a 515-540 nm.

4.8. Análisis estadístico y presentación de resultados

Todos los datos se presentan como el promedio \pm el error estándar de 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 ANOVA para calcular el error estándar y recalcula el error α . Para todas las pruebas estadísticas un valor $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. En análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prim versión 5.0 para Windows.

Resultados

5.1. Concentración de Ca^{2+} intracelular por activación del receptor S1P_1

El efecto de los diferentes agentes sobre la concentración de Ca^{2+} intracelular fue estudiado en células HEK 293 no transfectadas (WT). Se conoce que las células HEK 293 expresan de manera endógena el receptor S1P_1 . En células HEK WT al activar el receptor con S1P y el FTY720-P no se logró obtener curvas de saturación de liberación de Ca^{2+} (figura 7A). El Ca^{2+} intracelular en la línea que expresa de manera estable el receptor S1P_1 -mCherry se logró alcanzar la saturación de la curva con la concentración de 1-10 μM de S1P ($\text{EC}_{50} \sim 250 \text{ nM}$) (figura 7B), para FTY720-P no se logró alcanzar una curva de saturación con las concentraciones del ligando utilizadas; desafortunadamente concentraciones mayores de 10 μM de FTY720-P no permitían la determinación de liberación de Ca^{2+} intracelular al interferir con la técnica. Estos datos sugieren, más no demuestran, dado que no hay una clara saturación, que el FTY720-P es menos potente y eficaz respecto a la S1P (figura 7 A, B, C y D), además se observa que la liberación de Ca^{2+} por el FTY720-P es más lenta y se mantuvo por más tiempo respecto a la inducida por la S1P, su agonista natural (figura 7 C y D). El efecto de ambos agonistas fue bloqueado por la incubación de PMA, el activador de la PKC (figura 7E). La cuantificación de la liberación de calcio intracelular es una estrategia que refleja de manera indirecta 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 S1P_1 esta acoplado a una proteína G_i (tabla I), sugiriendo que se activa la PLC β , por el dímero β/γ de la proteína G, que genera DAG e IP_3 ; el IP_3 se une a canales en el retículo endoplásmico y se libera calcio al citoplasma (Malbon, 2005).

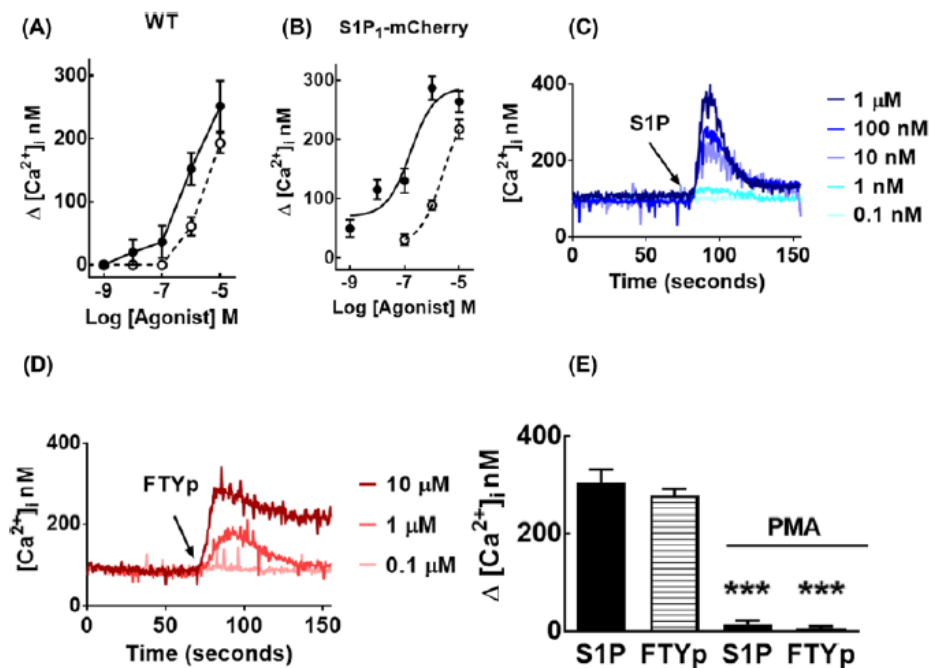


Figura 7. Efecto de S1P, FTY720-P y PMA en la concentración intracelular de calcio. Células WT (A) o la línea estable que expresa el receptor S1P_1 -mCherry (B). Las células fueron tratadas con las concentraciones de S1P (líneas solidas) y FTY720-P (líneas punteadas). Se muestran trazos representativos obtenidos a diferentes concentraciones de S1P (C) o FTY720-P (D). Las células fueron preincubadas en presencia o ausencia de 1 μM de PMA y fueron tratadas con 1 μM de S1P o 10 μM de FTY720-P (E). Los promedios son graficados representando el error estándar de 4 a 7 determinaciones usando diferentes preparaciones celulares. *** $P < 0.001$ comparado con la ausencia de PMA.

5.2. Fosforilación del receptor S1P₁

La fosforilación del receptor S1P₁ por su estimulación con S1P o FTY720-P o por la activación de la PKC por PMA, está asociada a su desensibilización. Se observó que la S1P, el FTY720-P y el PMA incrementan la fosforilación del receptor (figuras 8A, B y C). Se muestran los cursos temporales de la fosforilación del receptor por 1 μM de S1P (figura 8A) y 10 μM de FTY720-P (figura 8B), y la fosforilación del receptor S1P₁ por 15 min al utilizar 1 μM de PMA (figura 8C). La fosforilación del receptor S1P₁ fue rápida en respuesta a 1 μM de S1P, alcanzando su efecto máximo entre 2-5 min, esta fosforilación se mantiene hasta los 30 min y no regresa a su fosforilación basal (figura 8A). El efecto de 10 μM de FTY720-P fue similar, pero de una magnitud menor y alcanzando su efecto máximo entre los 5-10 min (figura 8 B). Nuestros datos indican que utilizar el inhibidor de la PKC, la bisindolilmaleimida I (BIM I) disminuye el efecto del PMA, sugiriendo que PKC es la cinasa que fosforila al receptor S1P₁ al utilizar PMA (figura 8D), por otra parte el BIM I no afecta la fosforilación del receptor S1P₁ al activarlo con S1P o FTY720-P (figura 8D), sugiriendo que PKC no es la cinasa que fosforila el S1P₁ al utilizar S1P o FTY720-P.

5.3. Localización subcelular del receptor S1P₁

La internalización de los GPCRs es un proceso de regulación que comienza a tiempos cortos después de la activación del receptor y contribuye a la desensibilización del receptor. El receptor S1P₁ al ser estimulado por el agonista S1P, es fosforilado por la 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 procesamiento en los endosomas para su posterior reciclaje a la membrana plasmática y recuperación de su función. Se logró observar que, en condiciones basales, la mayoría de la fluorescencia del receptor S1P₁-mCherry se encontraba en la membrana plasmática, sin embargo, cierta fluorescencia se encontraba en vesículas intracelulares (figura 9C). La incubación con S1P, FTY720-P o PMA por 5 min favoreció la internalización del receptor, esto se refleja al disminuir la fluorescencia en la membrana plasmática asociada a un incremento en la fluorescencia de las vesículas intracelulares (figuras 9A, B y C). Es muy interesante que la acumulación de vesículas fluorescentes del receptor era mayor con el FTY720-P, particularmente a los 30 min, que fue el tiempo máximo estudiado (figuras 9B y C).

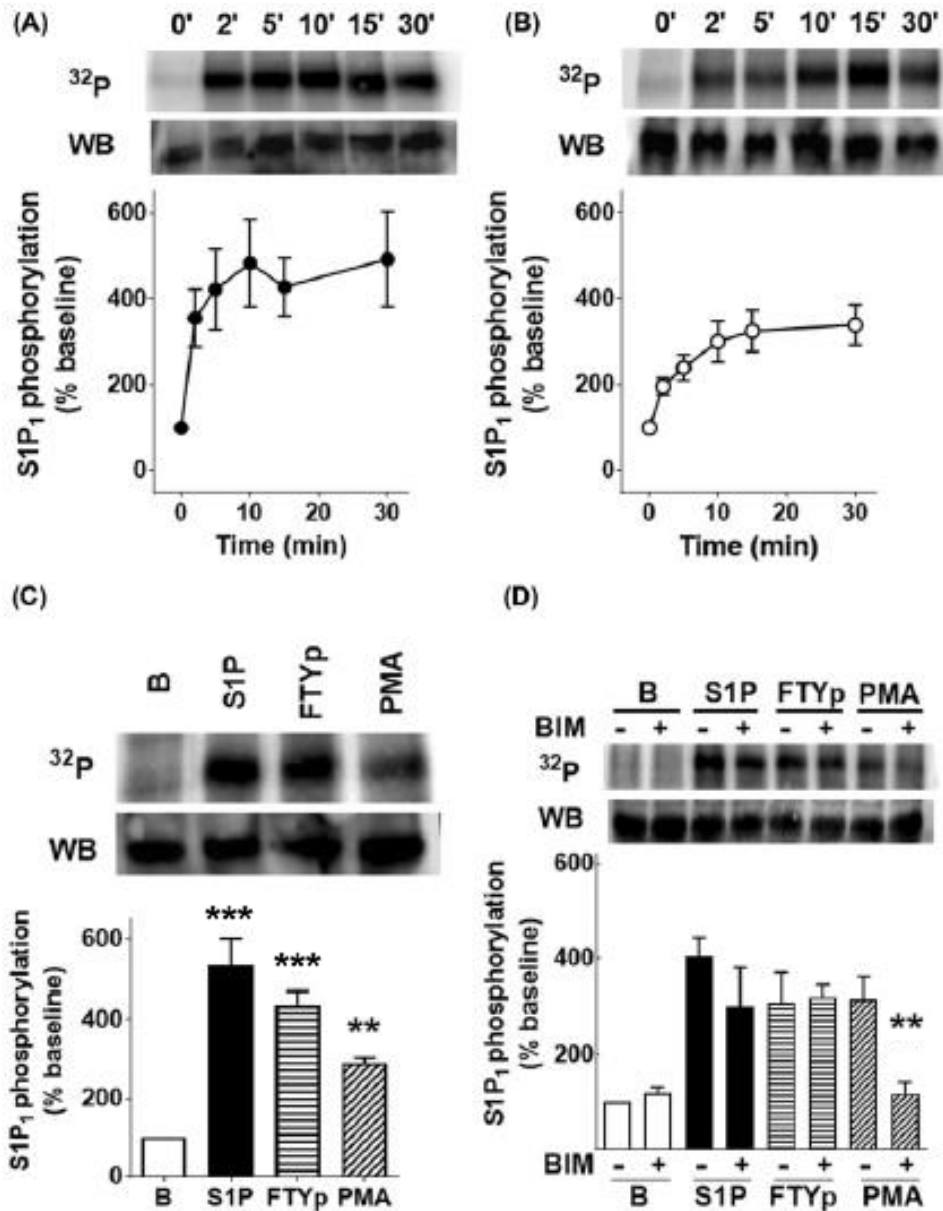


Figura 8. Efecto de la S1P, FTY720-P y PMA en la fosforilación del receptor S1P₁. Células expresando el receptor S1P₁-mCherry fueron incubados como se indica en materiales y métodos, para estudiar la fosforilación del receptor al utilizar 1 μ M de S1P (n=9) (A) o 10 μ M de FTY720-P (n=10) (B). Las células fueron estimuladas por 15 min con 1 μ M de S1P, 10 μ M de FTY720-P o 1 μ M de PMA (n=6) (C). Los promedios son graficados representando el error estándar del tamaño muestral de experimentos independientes. *** P <0.001 comparado con el basal. ** P <0.01 comparado con el basal. Las células fueron incubadas en ausencia (-) o presencia (+) de BIM I y se estimularon como se describe en C (D). Los promedios son graficados representando el error estándar de 5 experimentos independientes. ** P <0.01 comparado con la preincubación con BIM I. Se muestra una autoradiografía representativa (32 P) y un Western blot en cada histograma.

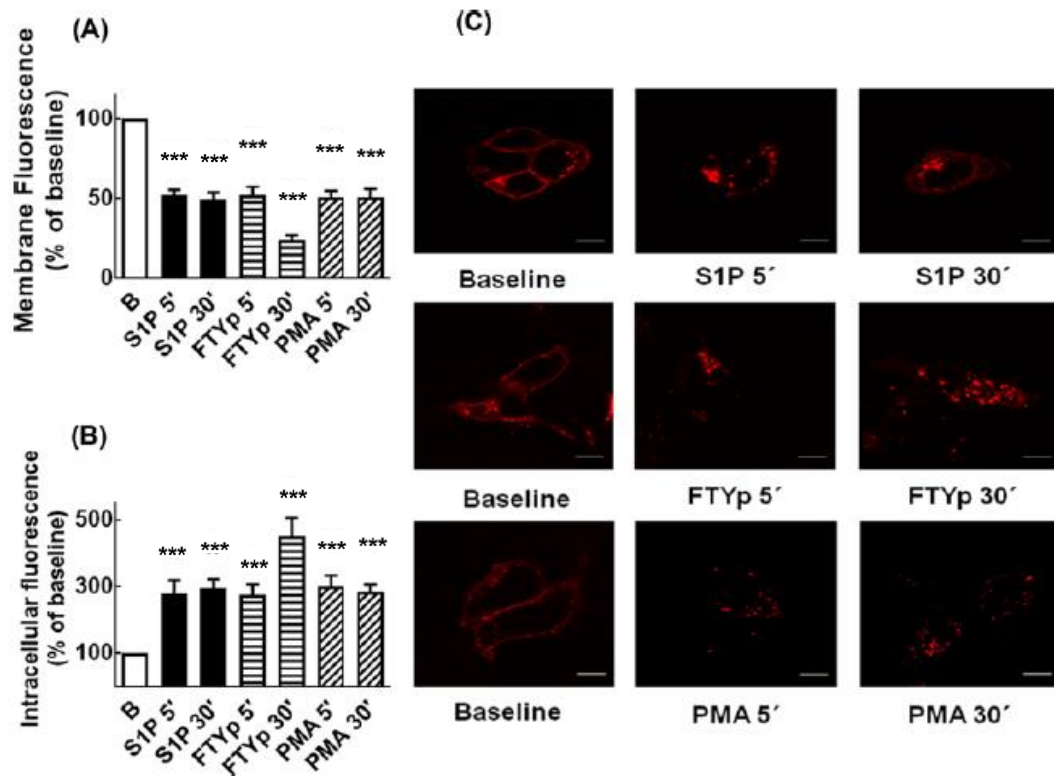


Figura 9. Efecto de la S1P, FTY720-P y PMA en la internalización del receptor S1P₁. Las células expresando el receptor de S1P₁-mCherry fueron tratadas por 5 o 30 min con 1 μ M de S1P, 10 μ M de FTY720-P o 1 μ M de PMA. El valor de fluorescencia de la membrana (A) o intracelular (B) fueron determinados y normalizados respecto a la ausencia de estímulo ((B) basal). Los promedios son graficados representando el error estándar de 24-30 muestras resultado de 4 o 5 experimentos independientes. *** P <0.001 comparado con el basal (B). Imágenes representativas son mostradas (C). Barras de escala:10 μ m.

5.4. Interacción del receptor S1P₁ con las proteínas Rab

La posibilidad de que el receptor S1P₁ pudiera interactuar de manera directa con diferentes proteínas Rab fue ensayado usando FRET. En nuestros experimentos usando esta metodología la proteína eGFP trabaja como donadora de longitud de onda de emisión y la proteína mCherry como aceptora de longitud de onda de excitación. Es importante tener en cuenta que el fenómeno de FRET se produce solamente a una distancia de 10 nm (100 Å) o menos (Sekar & Periasamy, 2003), sugiriendo una interacción molecular directa. Las transfecciones transitorias con los plásmidos para la expresión del receptor S1P₁-mCherry y las proteínas Rab etiquetadas con eGFP fueron realizadas 72 h antes del experimento. El curso temporal de la asociación del receptor S1P₁ y la proteína Rab5 al estimular con S1P, FTY720-P o PMA se presentan en la figura 10. Podemos observar que las proteínas Rab5 se encuentran distribuidas en el citoplasma durante el curso temporal, mientras que el receptor S1P₁ se localiza en la membrana plasmática antes de estimular con S1P, FTY720-P o PMA y se internaliza en respuesta al agonista o PMA (figuras 11-13). La S1P induce FRET con el receptor

S1P₁ y Rab5 en los 3, 5 y 15 min y esta interacción disminuye a los 30 min (figuras 10A y figura 11). El efecto de FTY720-P en la interacción del receptor S1P₁ y Rab5 fue más rápido y su efecto máximo fue a los 2 min y disminuyó en los tiempos posteriores (figura 10B y figura 12). El efecto de PMA en la asociación del receptor S1P₁ y Rab5 fue similar al inducido por S1P, pero la interacción se mantuvo después de 30 min (figura 10C y figura 13). Para la interacción del S1P₁ y Rab9 al estimular con S1P se observa una asociación a los 5 min (figura 10D y figura 14). No se observó asociación del S1P₁ y Rab9 al estimular con FTY720-P (figura 10E y figura 15). La asociación del S1P₁ y Rab9 al activar PKC por PMA fue clara durante los primeros 2-5 min, disminuyó a los 15 min, pero regresó la interacción a los 30 min (figura 10F y figura 16). De manera muy importante la interacción del S1P₁ y Rab7 al estimular a las células con S1P (figura 10G y figura 17) o al utilizar PMA (figura 10I y figura 19) no se presentó asociación, al evaluar la asociación del S1P₁ y Rab7 al estimular con FTY720-P induce una asociación a los 2 min, desaparece en los tiempos posteriores y a los 30 min regresó la interacción (figura 10H y figura 18). De manera adicional se realizaron experimentos de FRET con el receptor S1P₁ utilizando las dominancias negativas de las proteínas Rab5 GDP, Rab9 GDP y Rab7 GDP, estas proteínas Rab se caracterizan por que permanecen en su conformación inactiva, es decir no pueden intercambiar el GDP por GTP. Podemos observar que en ausencia de S1P, FTY720-P o PMA las proteínas Rab5 GDP, Rab9 GDP y Rab7 GDP se encuentran distribuidas en el citoplasma (figura 20B, C y D), mientras que el receptor S1P₁ se localiza en la membrana plasmática (figura 20B, C y D). Al activar el S1P₁ con S1P, FTY720-P o en presencia de PMA, el S1P₁ se internaliza, pero no existe una interacción de las proteínas Rab y el S1P₁ por FRET (figura 20A, B, C y D), estos datos sugieren que la conformación activa de las proteínas Rab es esencial para su interacción con el S1P₁.

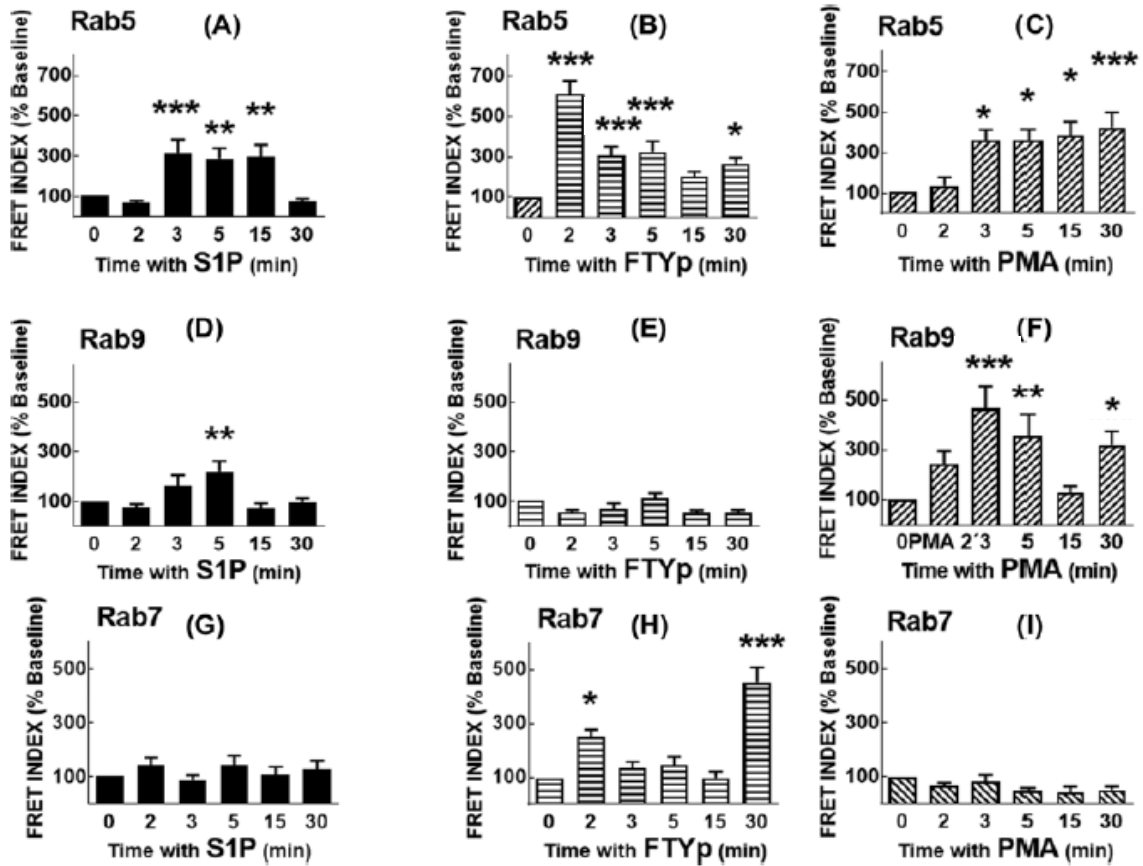


Figura 10. Efecto de la S1P, FTY720-P o PMA en la asociación del receptor S1P₁ y las proteínas Rab. Las transfecciones transitorias del receptor S1P₁-mCherry y las proteínas Rab-eGFP fueron incubadas con 1 μ M de S1P (Rab5 (A), Rab9 (D) y Rab7 (G)), 10 μ M de FTY720-P (Rab5 (B), Rab9 (E) y Rab7 (H)) o 1 μ M de PMA (Rab5 (C), [Rab9 (F) y Rab7 (I)). Los valores de FRET fueron determinados y normalizados en ausencia de estímulo (tiempo 0). Los promedios son graficados representando el error estándar de 24-30 muestras resultado de 4 o 5 experimentos independientes. *** P <0.005 comparado con el basal (tiempo 0), ** P <0.01 comparado con el basal (tiempo 0), * P <0.05 comparado con el basal (tiempo 0).

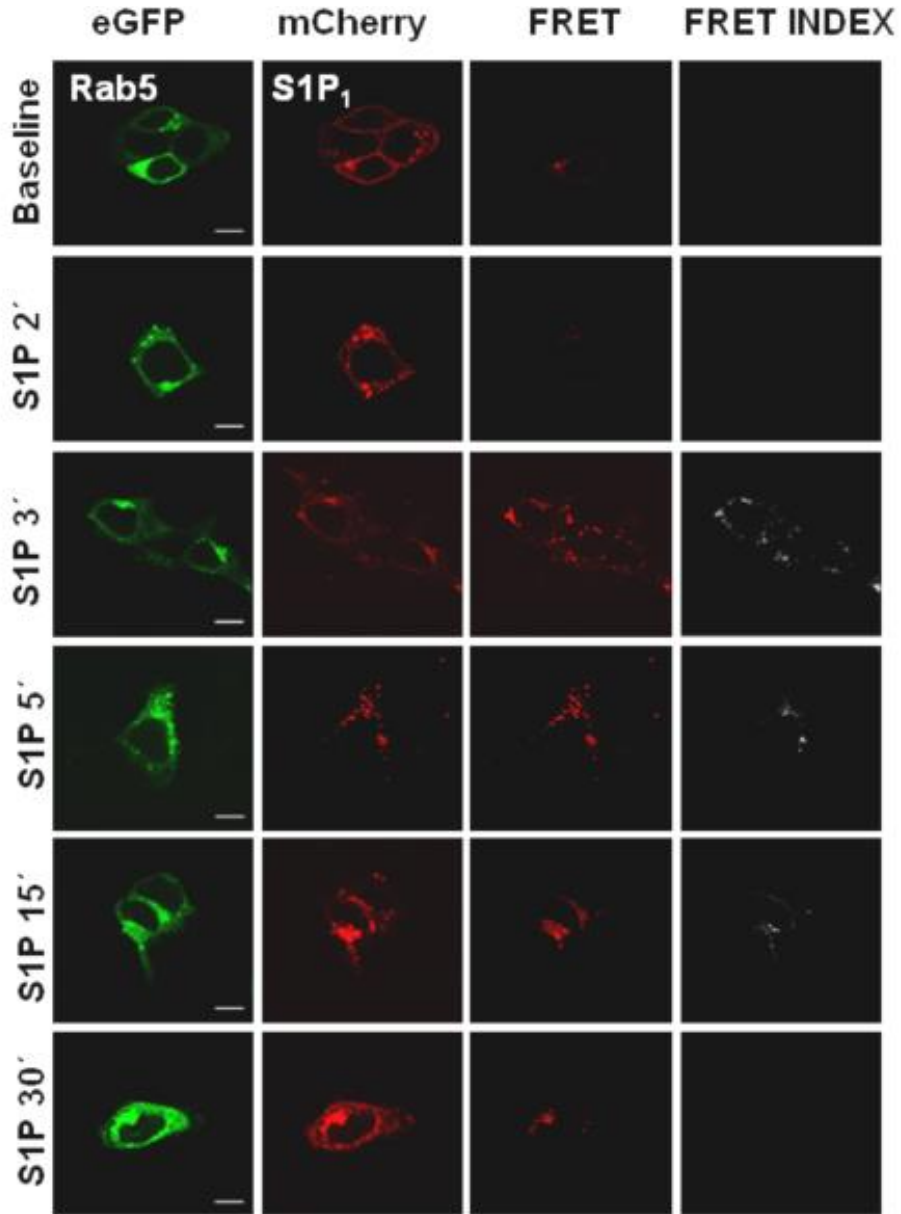
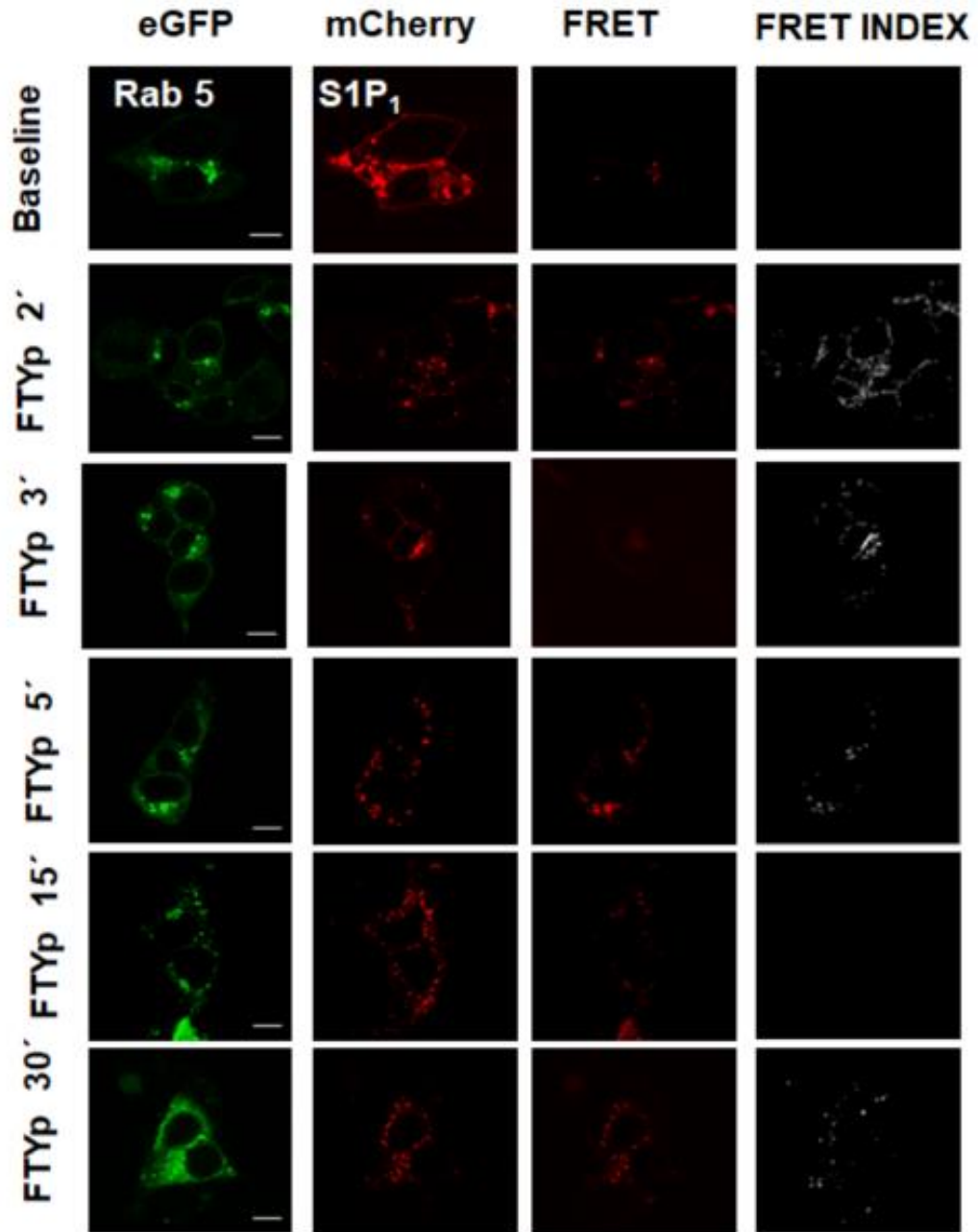


Figura 11. Interacción del receptor S1P₁-mCherry y la proteína Rab5-eGFP identificada por FRET. Las células fueron incubadas por los tiempos indicados en presencia de 1 μ M de S1P. Las imágenes son presentadas como: Fluorescencia de eGFP (primer columna), fluorescencia de mCherry (segunda columna), FRET (tercer columna) y FRET INDEX (imágenes procesadas con el plug-in "FRET Analyzer"; cuarta columna). Barras de escala: 10 μ m.



a por FRET. Las células
 otras indicaciones ver

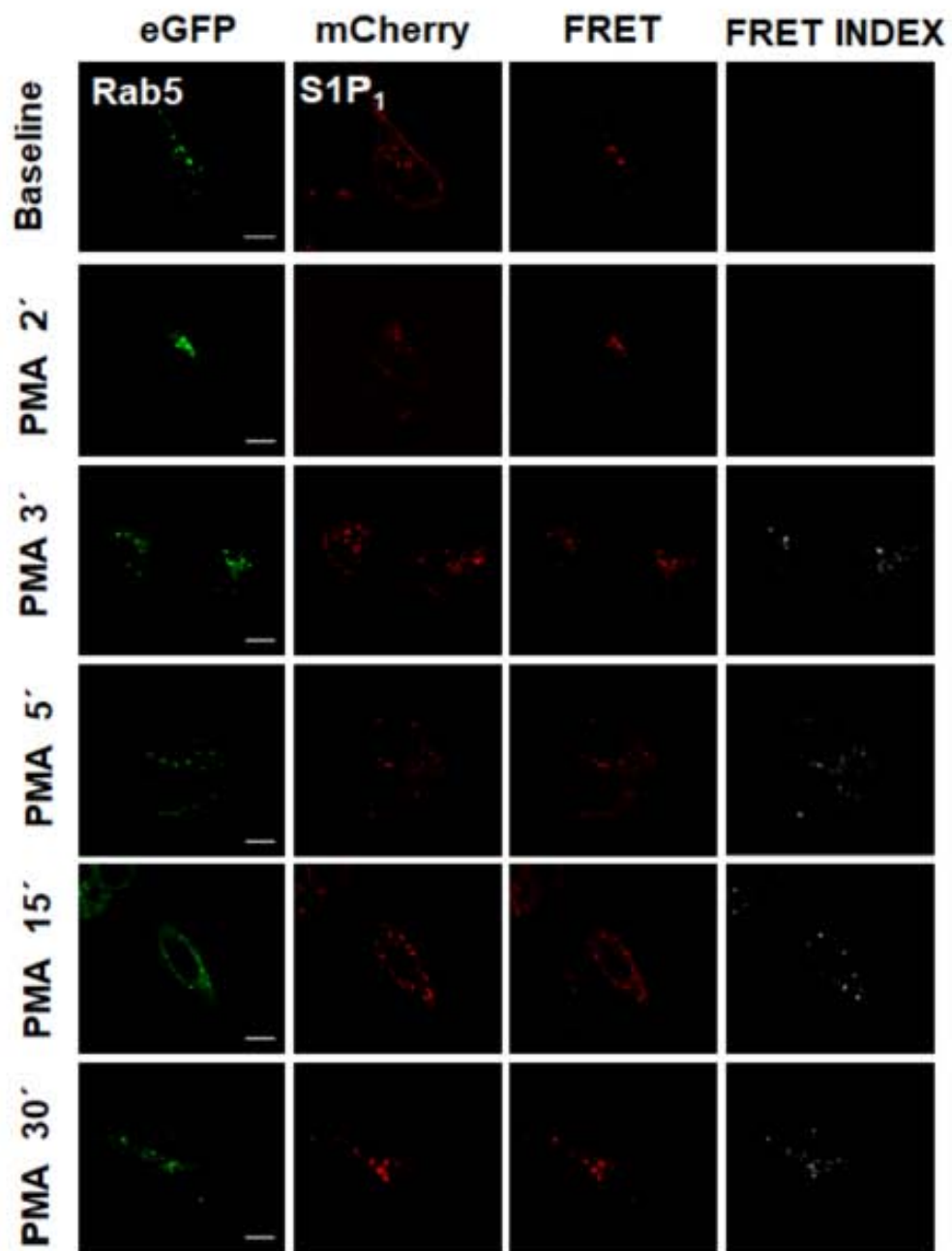


Figura 13. Interacción del receptor S1P₁-mCherry y la proteína Rab5-eGFP identificada por FRET. Las células fueron incubadas por los tiempos indicados en presencia de 1 μ M de PMA. Para otras indicaciones ver figura 11.

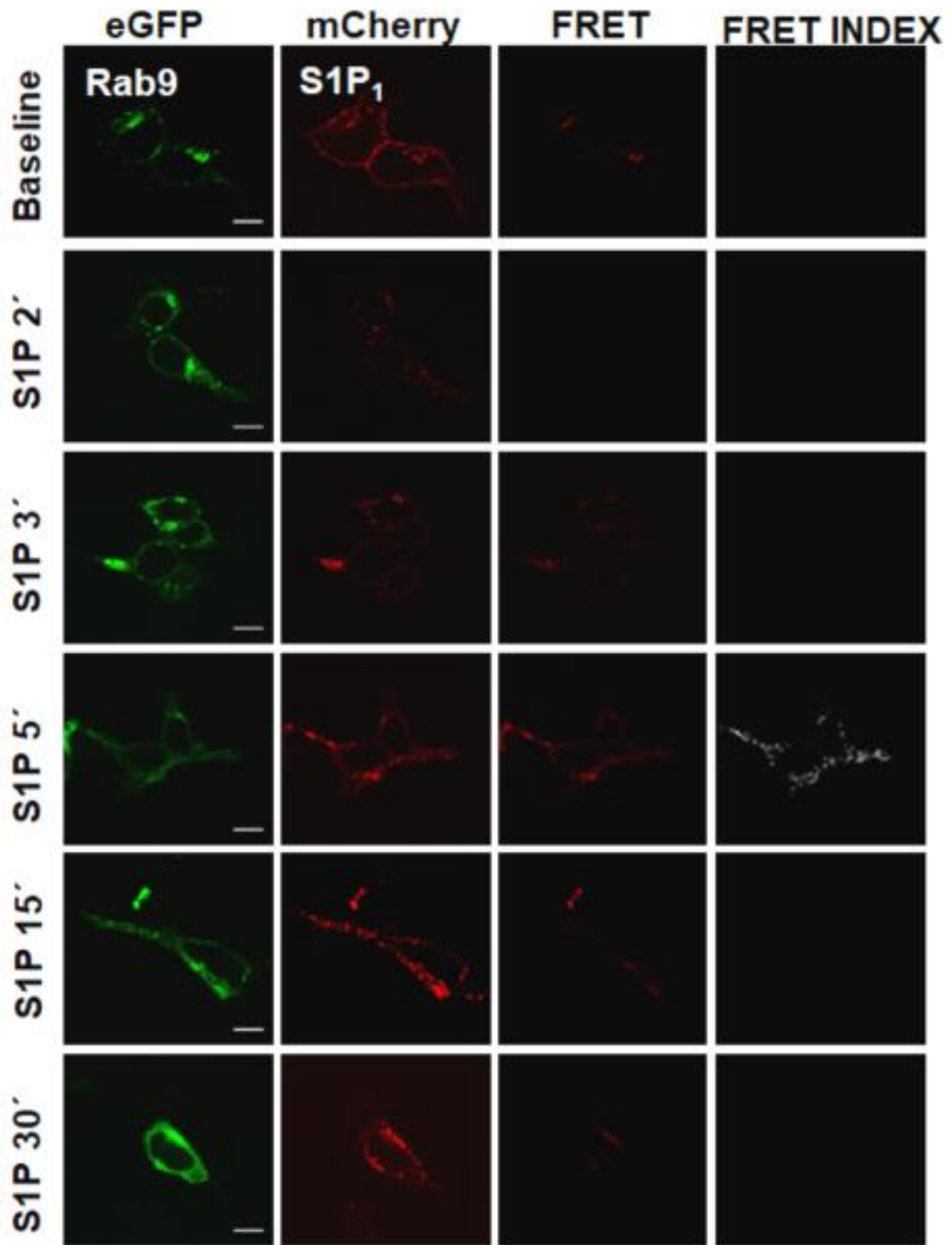


Figura 14. Interacción del receptor S1P₁-mCherry y la proteína Rab9-eGFP identificada por FRET. Las células fueron incubadas por los tiempos indicados en presencia de 1 μ M de S1P. Para otras indicaciones ver figura 11.

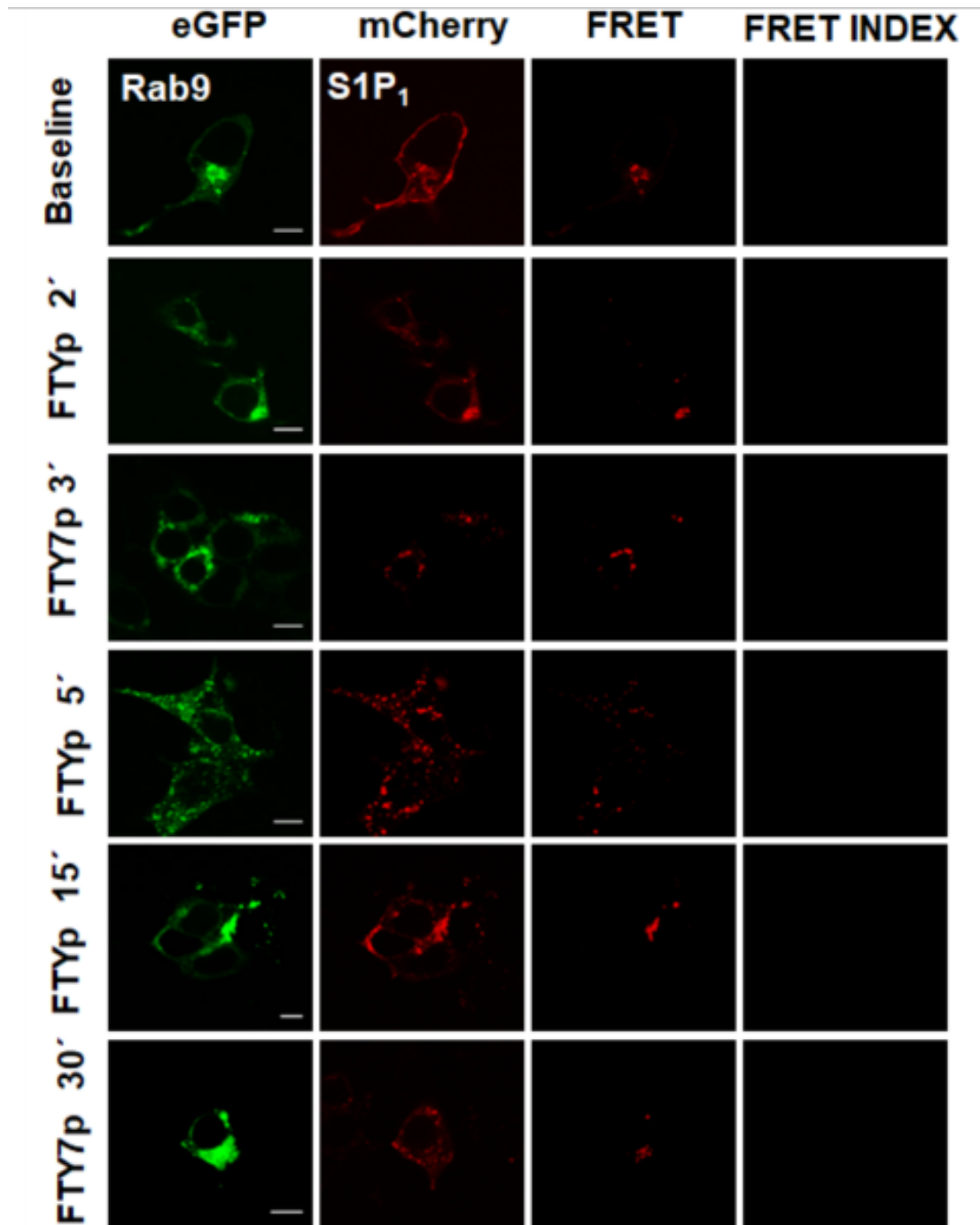


Figura 15. Interacción del receptor S1P₁-mCherry y la proteína Rab9-eGFP identificada por FRET. Las células fueron incubadas por los tiempos indicados en presencia de 10 μ M de FTY720-P. Para otras indicaciones ver figura 11.

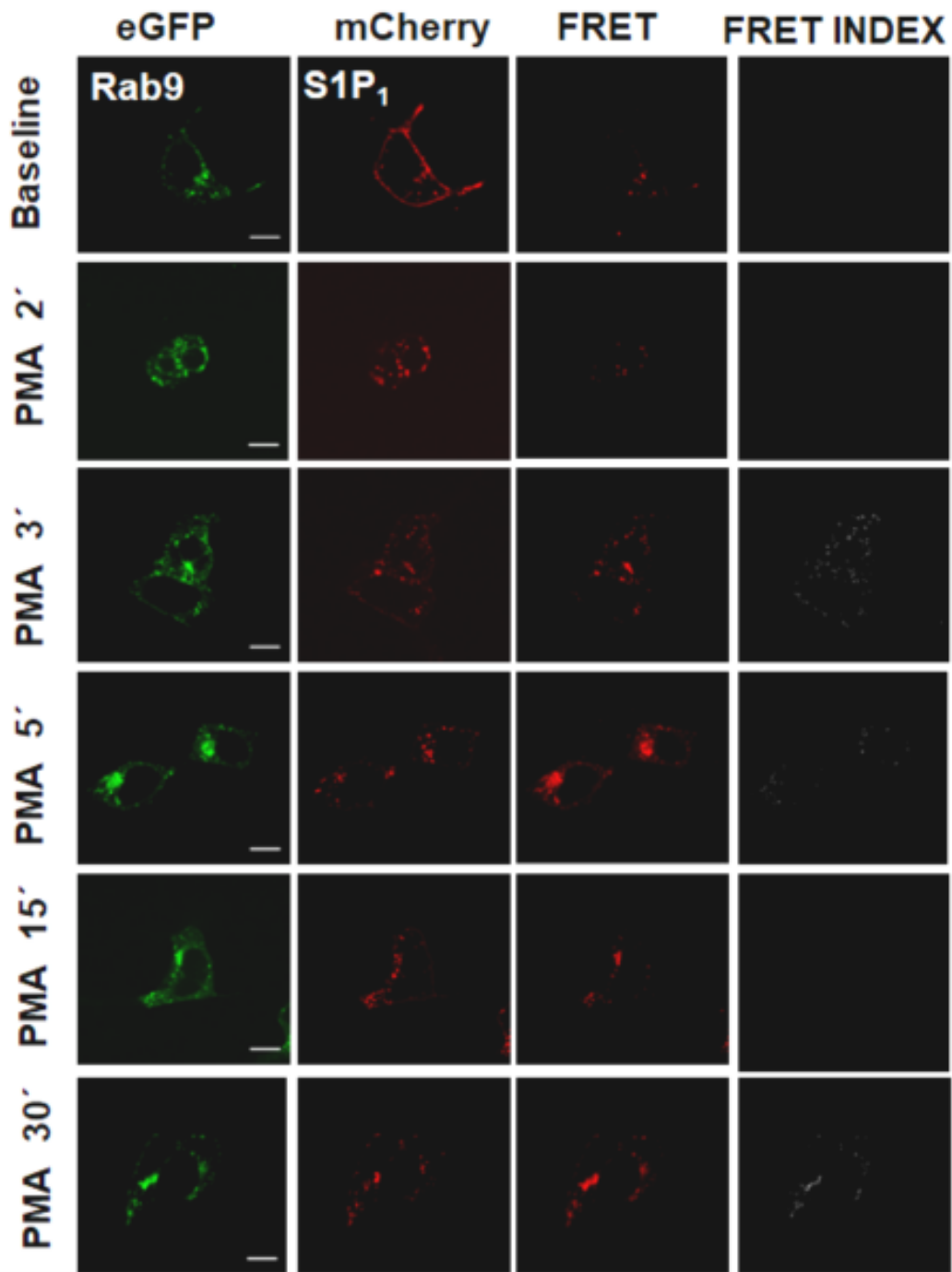


Figura 16. Interacción del receptor S1P₁-mCherry y la proteína Rab9-eGFP identificada por FRET. Las células fueron incubadas por los tiempos indicados en presencia de 1 μ M de PMA. Para otras indicaciones ver figura 11.

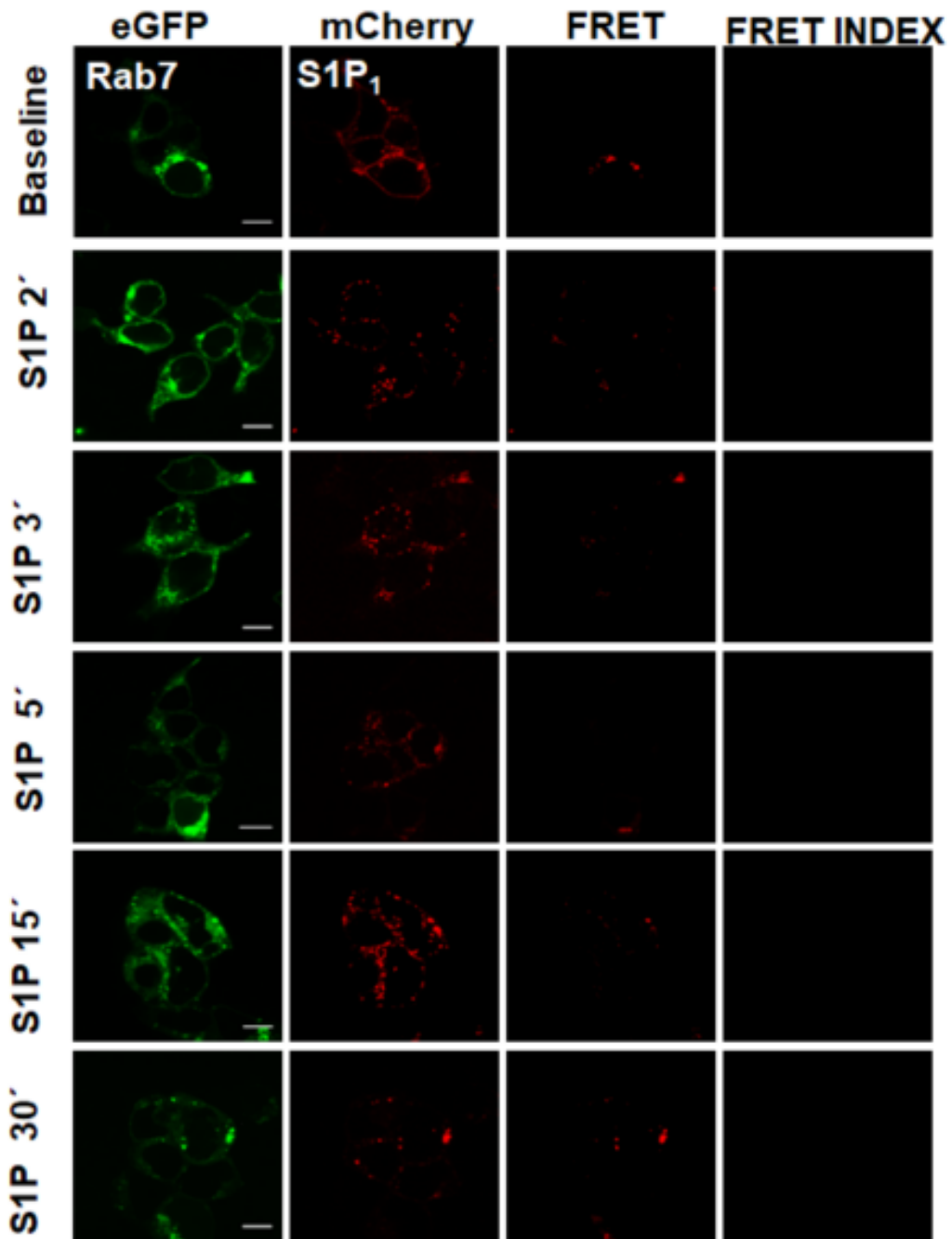


Figura 17. Interacción del receptor S1P₁-mCherry y la proteína Rab7-eGFP identificada por FRET .Las células fueron incubadas por los tiempos indicados en presencia de 1 μ M de S1P. Para otras indicaciones ver figura 11.

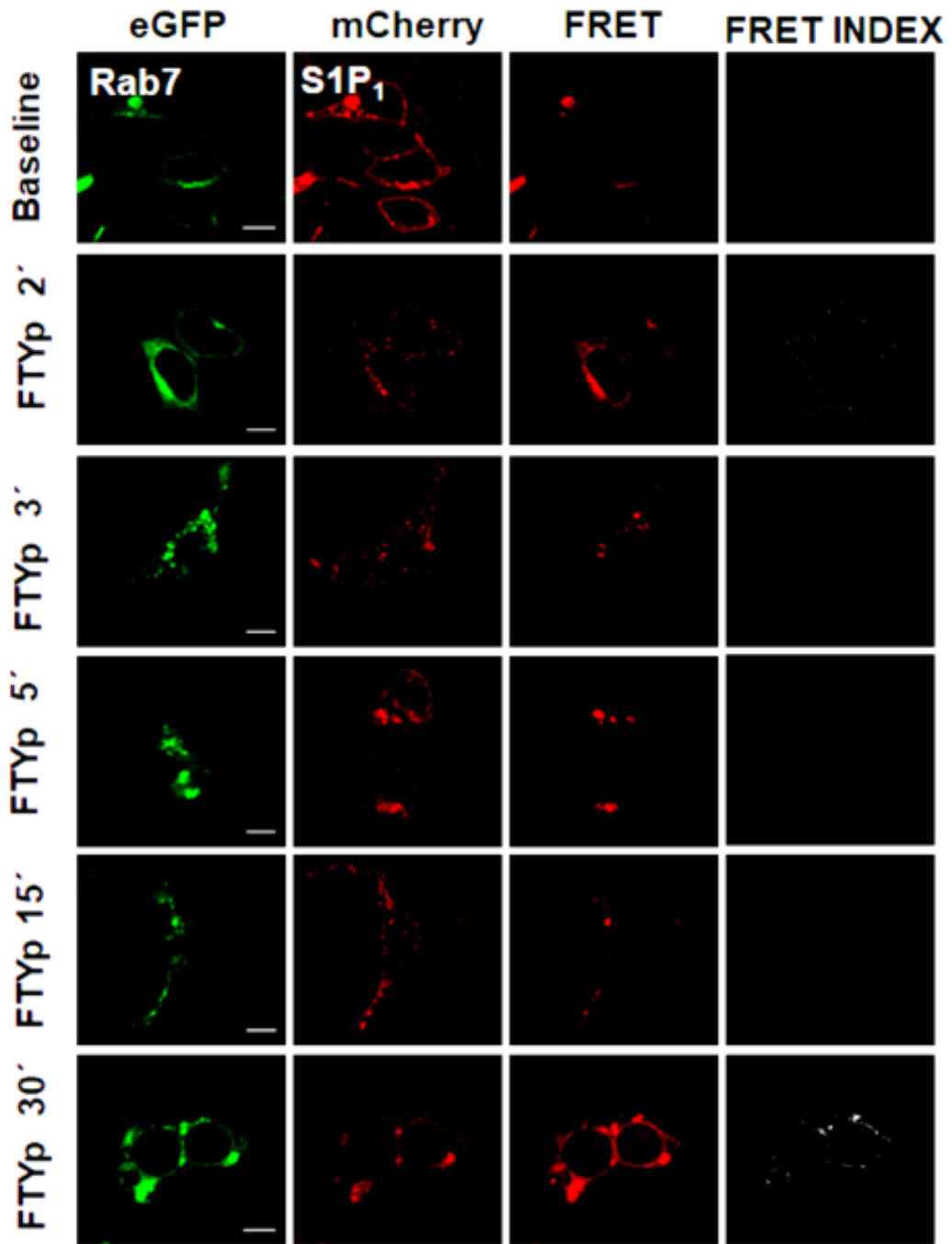


Figura 18. Interacción del receptor S1P₁-mCherry y la proteína Rab7-eGFP identificada por FRET. Las células fueron incubadas por los tiempos indicados en presencia de 10 μ M de FTY720-P. Para otras indicaciones ver figura 11.

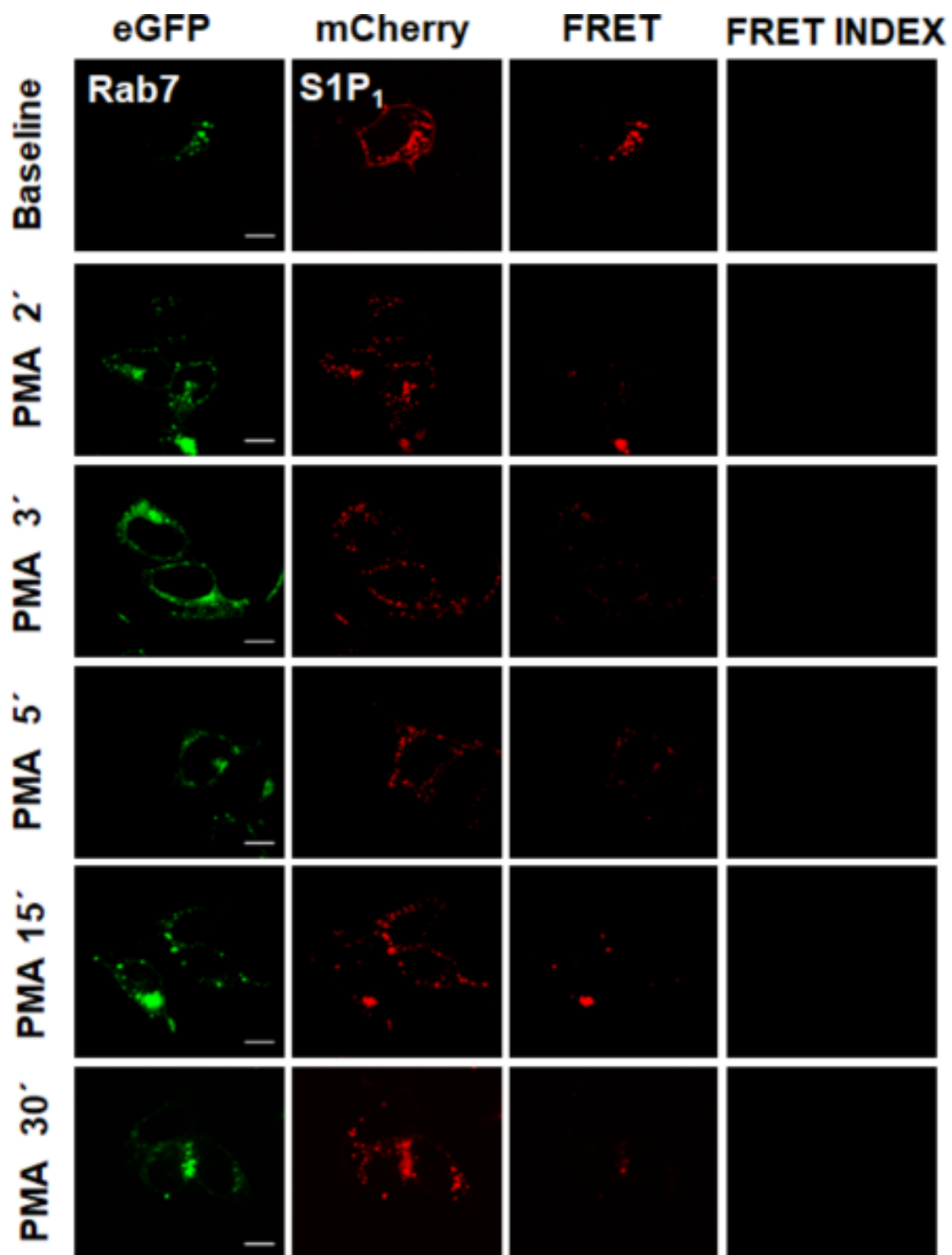


Figura 19. Interacción del receptor S1P₁-mCherry y la proteína Rab7-eGFP identificada por FRET. Las células fueron incubadas por los tiempos indicados en presencia de 10 μ M de FTY720-P. Para otras indicaciones ver figura 13.

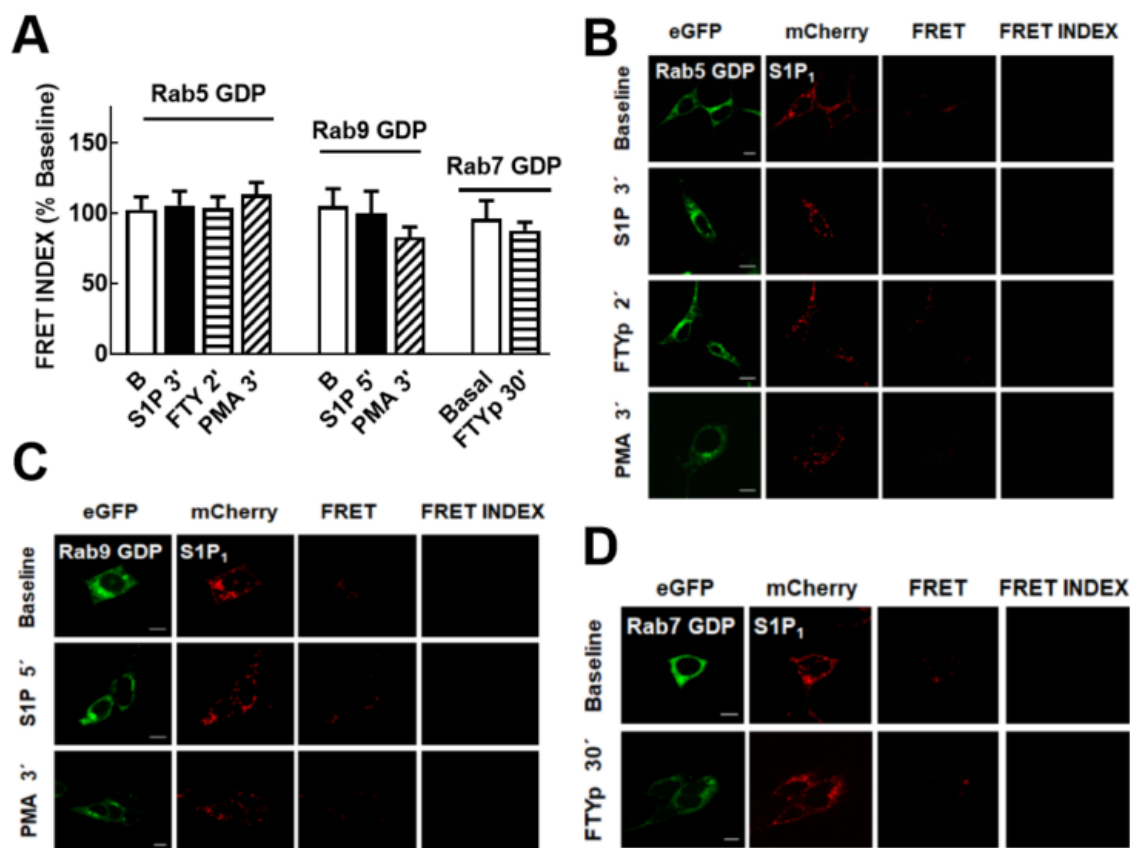


Figura 20. Las dominantes negativas de las proteínas Rab no interactúan con el receptor S1P₁. Las células fueron transfectadas para la expresión del receptor S1P₁-mCherry y la dominante negativa de la Rab-eGFP. Las células fueron tratadas con los tiempos indicados con 1 μM de S1P, 10 μM de FTY720-P o 1 μM de PMA. Los valores de FRET fueron determinados y normalizados respecto a la ausencia de estímulo (Tiempo 0). En panel A los promedios se grafican representando el error estándar de 24 imágenes obtenidas de 4 experimentos independientes. En los paneles B-D se muestran imágenes representativas de los experimentos expresando las diferentes dominantes negativas de las proteínas Rab. Para otras indicaciones ver figura 11.

5.5. La importancia de GRK2 en la fosforilación del receptor S1P₁

Los pacientes que presentan la EM comúnmente sufren de depresión, y se prescribe frecuentemente la paroxetina como antidepresivo. Ahora se sabe que la paroxetina es un inhibidor de la GRK2 (Homan *et al.*, 2014; Thal *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2017). Para el receptor S1P₁ observamos que la S1P, el FTY720-P y el PMA incrementan la fosforilación del S1P₁ (figura 21). La preincubación con la paroxetina bloquea la fosforilación del receptor S1P₁ al estimularlo con S1P o FTY720-P y parcialmente disminuye al utilizar PMA (figura 21). Estos datos sugieren que al utilizar la paroxetina disminuye el efecto de S1P y FTY720-P, sugiriendo que la GRK2 es la cinasa que fosforila al receptor S1P₁ al utilizar S1P o FTY720-P. Para el caso de la fosforilación del S1P₁ al activar PKC por PMA

nuestros datos indican que la preincubación con paroxetina disminuye parcialmente la fosforilación del S1P₁ sugiriendo que existe una relación entre la GRK2 y PKC.

Al evaluar el efecto de la paroxetina en la internalización del receptor S1P₁ observamos que en ausencia de paroxetina y sin la presencia de S1P, FTY720-P o PMA el S1P₁ se encuentra delimitando la membrana plasmática (figura 22B). En presencia de S1P, FTY720-P o PMA por 5 min disminuye la fluorescencia en la membrana plasmática e incrementa la fluorescencia intracelular sugiriendo que el receptor S1P₁ se internalizó (figura 22A, B y C). Al preincubar las células con paroxetina y sin presencia de S1P, FTY720-P o PMA podemos observar que el S1P₁ se encuentra delimitando la membrana plasmática (figura 22B) y se presenta contracción celular que afecta el tamaño de las células (figura 23). En presencia de paroxetina y S1P, FTY720-P o PMA la disminución de fluorescencia en la membrana plasmática fue bloqueada y no hay un incremento de la fluorescencia intracelular (figura 22A, B y C), también se observó contracción celular (figura 23).

Por otra parte se estudió el efecto del antidepresivo en la asociación del receptor S1P₁ y las proteínas Rab. En ausencia de paroxetina podemos observar que la proteína Rab5, Rab9 o Rab7 se encuentran distribuidas en el citoplasma, mientras que el receptor S1P₁ se localiza principalmente en la membrana plasmática (figuras 25, 26 y 27). La S1P, el FTY720-P o PMA induce FRET con el receptor S1P₁ y Rab5 (figuras 24 y 25), la S1P y el PMA induce FRET con el S1P₁ y Rab9 (figuras 25 y 26), por último el FTY720-P induce FRET con el receptor S1P₁ y Rab7. En presencia de paroxetina y S1P, FTY720-P o PMA el S1P₁ permanece en la membrana plasmática (figuras 25, 26 y 27), no se internaliza (figuras 25, 26 y 27) y no se presenta FRET con Rab5, Rab9 y Rab7 (figuras 24, 25, 26 y 27), además se observó contracción celular (figuras 25, 26 y 27). Nuestros datos sugieren que la GRK2 es bloqueada al utilizar paroxetina y no puede fosforilar el S1P₁ cuando se activa el receptor por la S1P, el FTY720-P o al activar PKC por PMA, afectando el proceso de internalización del receptor debido a que la fosforilación de diferentes aminoácidos del S1P₁ es un proceso clave para el reclutamiento de proteínas involucradas en la internalización del propio receptor y su tráfico vesicular regulado por las proteínas Rab.

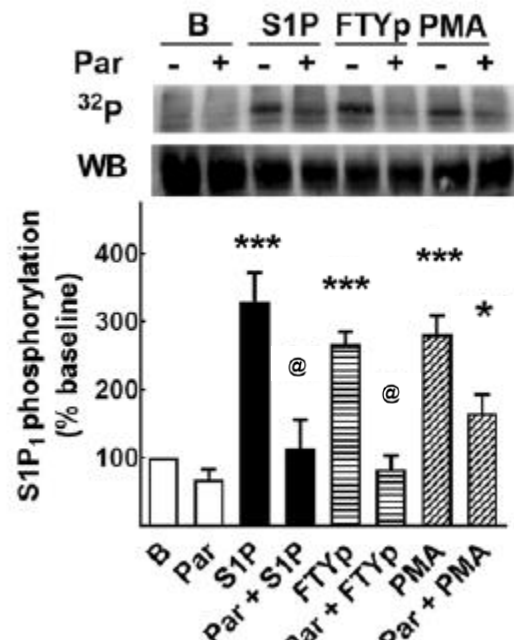


Figura 21. Efecto de la paroxetina en la fosforilación del receptor S1P₁ por la S1P, FTY720-P y PMA. Células expresando el receptor S1P₁-mCherry fueron incubados como se indica el materiales y métodos, para estudiar la fosforilación del receptor. Las células fueron incubadas en usencia (-) o presencia) de 100 μ M de paroxetina (Par +) y fueron tratadas por 15 min con 1 μ M de S1P, 10 μ M de FTY720-P y 1 μ M de PMA. Los promedios son graficados representando el error estándar de 6 experimentos independientes. *** P <0.001 comparado con el basal (B), @ P <0.001 comparado con la ausencia de paroxetina, * P <0.05 comparado con la ausencia de paroxetina. Se muestra una autoradiografía (³²P) y un Western blot representativos en el histograma.

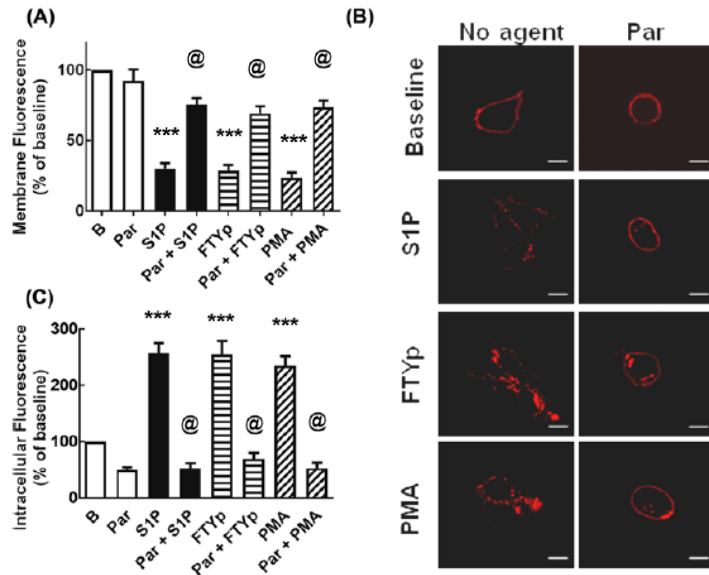


Figura 22 Efecto de la paroxetina en la internalización del receptor S1P₁ por S1P, FTY720-P y PMA. Las células expresando el receptor S1P₁-mCherry fueron preincubadas por 30 min con 100 μ M de paroxetina y fueron tratadas por 5 min con 1 μ M de S1P, 10 μ M de FTY720-P o 1 μ M de PMA. Los valores de fluorescencia en membrana plasmática (A) o fluorescencia intracelular (B) fueron determinados y normalizados respecto a la ausencia del estímulo (Basal, B). Los promedios son graficados representando el error estándar de 30 muestras resultado de 5 experimentos independientes. *** P <0.001 comparado con el basal (B). @ P <0.001 comparado con la ausencia de paroxetina. Imágenes representativas son representadas (C). Barras de escala: 10 μ M.

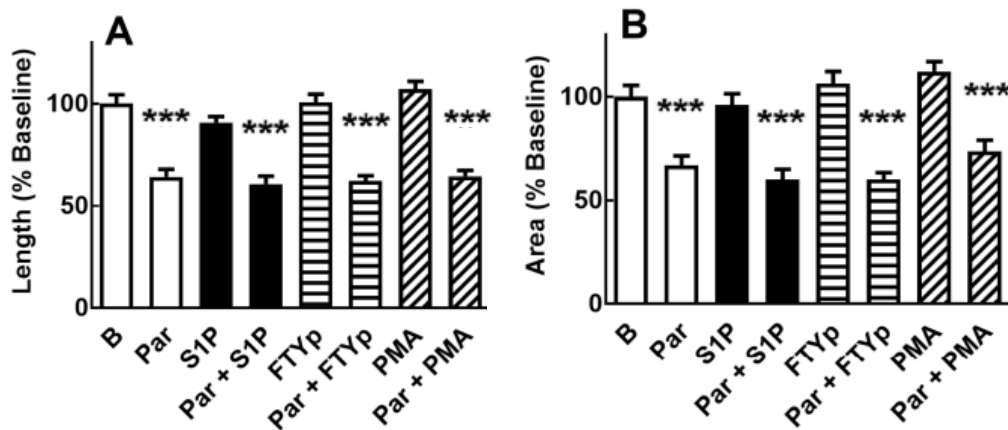


Figura 23. Efecto de la paroxetina en la longitud y área de células que expresan el receptor S1P₁. Las células transfectadas con el receptor S1P₁-mCherry fueron incubadas con 100 μ M de paroxetina por 30 min y estimuladas por 5 min con 1 μ M de S1P, 10 μ M de FTY720-P o 1 μ M de PMA. En panel A observamos la longitud celular y en B el área celular. Los promedios se grafican representando el error estándar de 30 imágenes obtenidas de 5 experimentos independientes. *** P <0.001 respecto a la preincubación sin paroxetina.

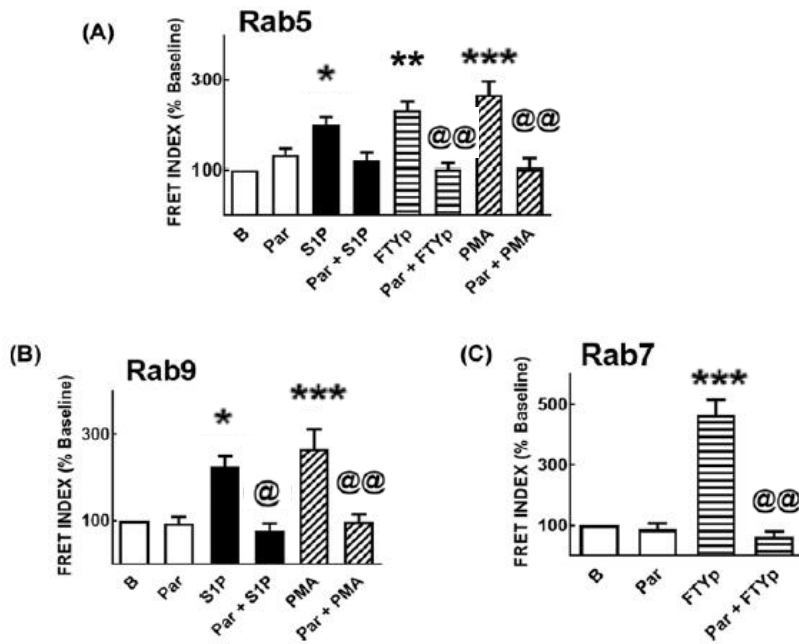


Figura 24. Efecto de la paroxetina en la asociación del receptor S1P₁ y las proteínas Rab. Las transfecciones transitorias del receptor S1P₁-mCherry y las proteínas Rab-eGFP fueron incubadas en la ausencia o presencia de 100 μ M de paroxetina y las células fueron tratadas con 1 μ M de S1P, 10 μ M de FTY720-P o 1 μ M de PMA. Para Rab5 (A) se utilizaron 3 min de tratamiento, para Rab9 (B) 5 min y Rab7 (C) 30 min. Los promedios son graficados representando el error estándar de 24-30 muestras resultado de 4 o 5 experimentos independientes. *** P <0.005 comparado con el basal, ** P <0.01 comparado con el basal * P <0.05 comparado con el basal. @@ P <0.001 comparado con la ausencia de paroxetina, @ P <0.05 comparado con la ausencia de paroxetina.

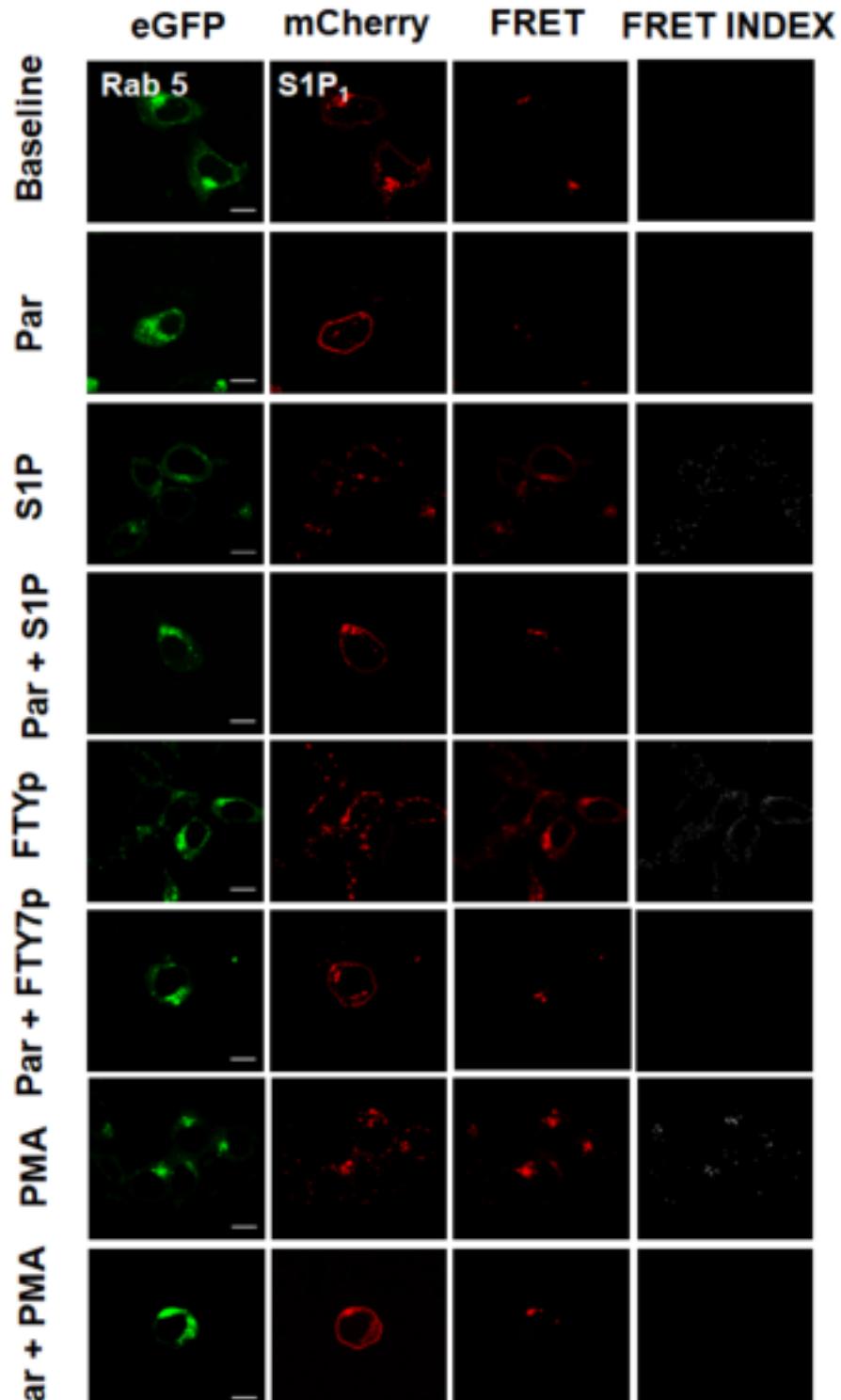


Figura 25. Interacción del receptor S1P₁-mCherry y la proteína Rab5-eGFP identificada por FRET en presencia de paroxetina. Las células fueron preincubadas por 30 min con 100 μ M de paroxetina y tratadas por 3 min en presencia de 1 μ M de S1P, 10 μ M de FTY720-P o 1 μ M de PMA. Para otras indicaciones ver figura 11.

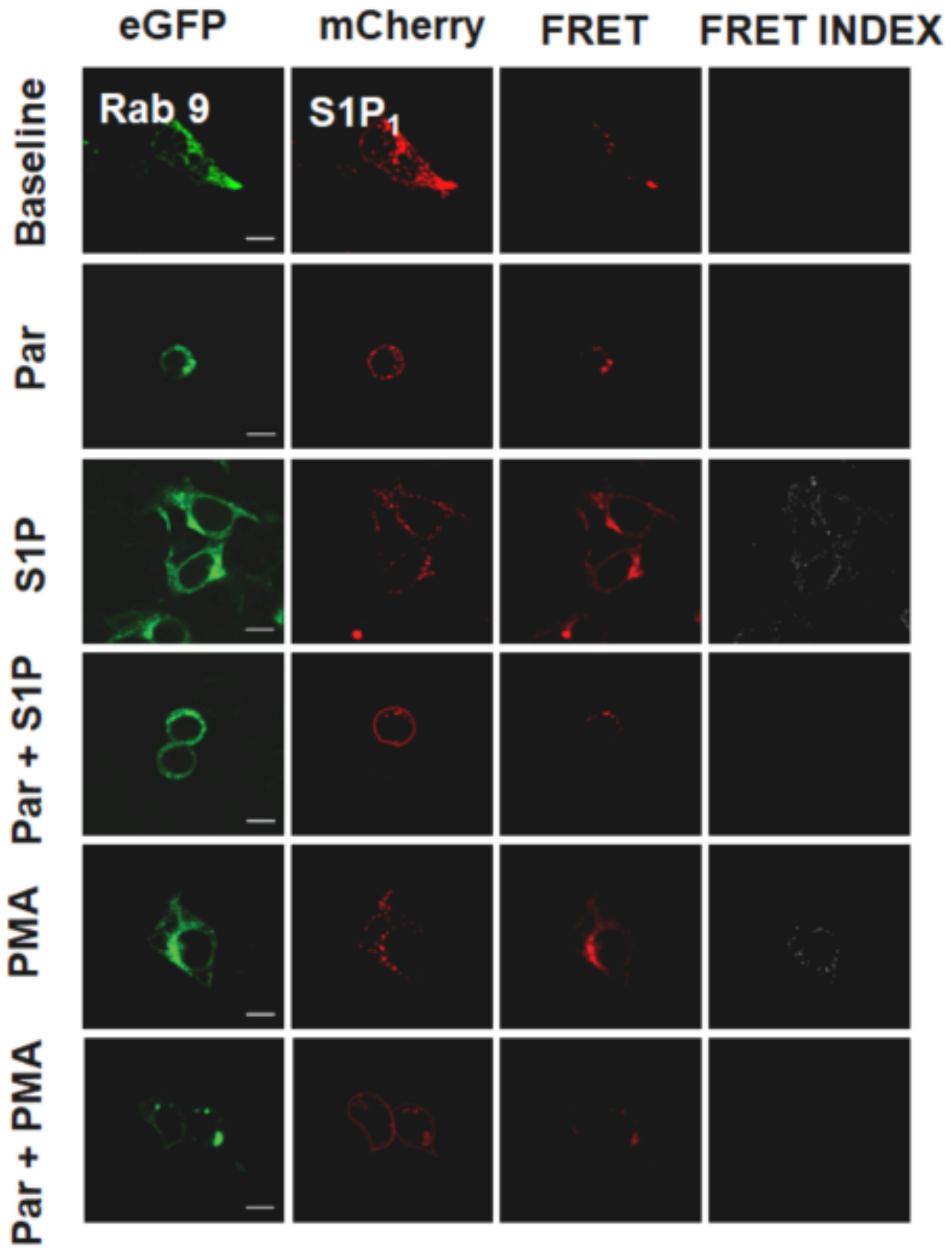


Figura 26. Interacción del receptor S1P₁-mCherry y la proteína Rab9-eGFP identificada por FRET en presencia de paroxetina. Las células fueron preincubadas por 30 min con 100 μ M de paroxetina y tratadas por 5 min en presencia de 1 μ M de S1P o 1 μ M de PMA. Para otras indicaciones ver figura 11.

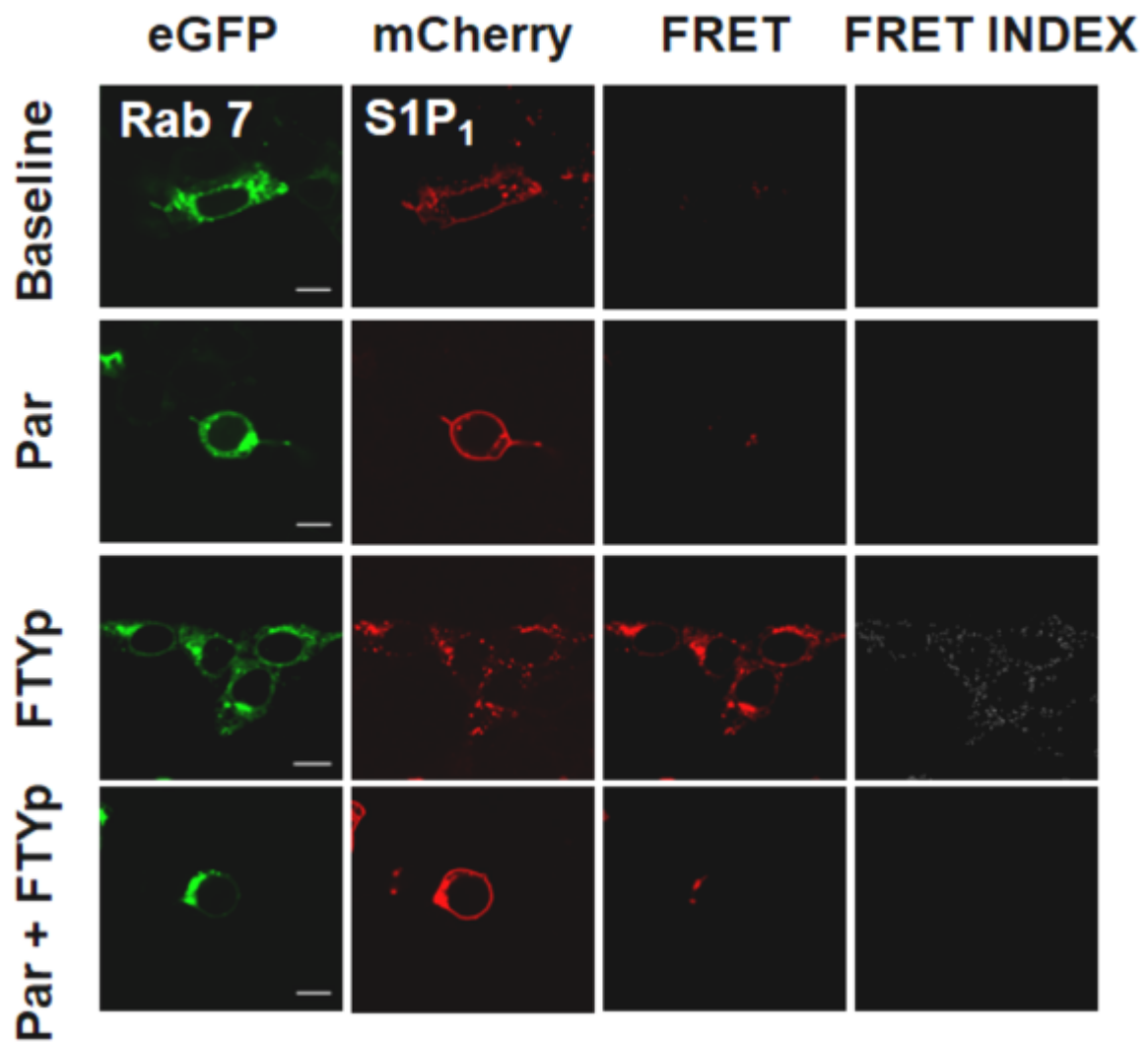


Figura 27. Interacción del receptor S1P₁-mCherry y la proteína Rab7-eGFP identificada por FRET en presencia de paroxetina. Las células fueron preincubadas por 30 min con 100 μ M de paroxetina y tratadas por 30 min en presencia de 10 μ M de FTY720-P. Para otras indicaciones ver figura 11.

Discusión

El objetivo principal del trabajo fue estudiar las diferencias farmacológicas, funcionales, cinéticas de fosforilación y el tráfico vesicular del receptor S1P₁ durante su desensibilización por la S1P, FTY720-P y PMA. Los resultados descritos anteriormente nos sugieren que el efecto de la S1P y el FTY720-P difieren, el FTY720-P fue aparentemente menos potente respecto a la S1P en la liberación de Ca²⁺ intracelular. Para la fosforilación del receptor con el FTY720-P fue menos intensa que por la S1P. De manera muy interesante, la internalización por el agonista sintético, FTY720-P, fue mayor que por la S1P, particularmente a los 30 min. En el caso del activador de PKC, el PMA desensibiliza el receptor debido a que es fosforilado por la PKC y se internaliza, por esta razón se bloquea la liberación de Ca²⁺ intracelular al estimular las células con S1P o FTY720-P, estos datos son consistentes de acuerdo a Watterson y colaboradores, quienes mencionan que la S1P y el PMA favorecen la fosforilación del S1P₁, además la fosforilación al utilizar S1P no es bloqueada en presencia de un inhibidor para PKC sugiriendo que la fosforilación al utilizar la S1P es por otra cinasa (Watterson *et al.*, 2001). Estudios previos de nuestro laboratorio sugieren que al utilizar un inhibidor de las isoformas de PKC α y β , el receptor S1P₁ no se desensibiliza por PMA. Además por ensayos de coinmunoprecipitación las isoformas α y β se encuentran asociadas desde condiciones basales, pero al estimularse con PMA las isoformas α y β se reclutan con mayor intensidad, bloqueos similares en la acción del PMA se observaron con la regulación a la baja (“down regulation”) por inhibición prolongada con ésteres de forbol, así como mediante el bloqueo de la expresión (knock down”) utilizando shRNA (Morquecho-León *et al.*, 2013). Se conoce el mecanismo de internalización para el receptor S1P₁ al ser estimulado por la S1P y el FTY720-P es la internalización rápida por la ruta canónica de desensibilización de GPCRs. La S1P o el FTY720-P facilitan la unión de las β -arrestinas tipo 2 que reclutan el complejo de clatrina y AP-2 favoreciendo el anclaje del receptor de S1P₁ a las vesículas cubiertas de clatrina (Reeves *et al.*, 2015).

Debido a la importancia médica que tiene el FTY720-P y la retención de los linfocitos T en los nódulos linfáticos de pacientes con EM, se ha estudiado ampliamente el mecanismo por el cual se produce este fenómeno. Como se mencionó anteriormente la presencia de FTY720-P favorece la fosforilación del S1P₁ por la GRK2, la fosforilación es una modificación postraduccional muy importante para iniciar el proceso de internalización por la ruta canónica de GPCRs, después el GPCR puede degradarse en los lisosomas y/o el proteosoma. Oo y colaboradores observaron que el FTY720-P es mucho más potente y efectivo que la S1P en favorecer la degradación del receptor S1P₁ por la vía proteosoma (Oo *et al.*, 2007). Este fenómeno es consistente con la idea que el FTY720-P es un agonista, pero se considera un antagonista funcional, debido a que induce la desensibilización, internalización y la degradación del receptor S1P₁ (Brinkmann *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2011), además el FTY720-P puede ser definido un agonista sesgado hacia la internalización y degradación del receptor S1P₁ (Kenakin, 2015).

Una parte crucial de este proyecto fue conocer las diferencias en la internalización y asociación de las proteínas Rab5, Rab7 y Rab9 con el receptor S1P₁. Nuestros datos sugieren que la interacción del receptor S1P₁ con las proteínas Rab inducida por la S1P (desensibilización homóloga) y por el PMA (desensibilización heteróloga) presentan algunas similitudes. La S1P y el PMA favorece la interacción del receptor con Rab5 y Rab9, la S1P ni el PMA permite la interacción del receptor con Rab7. Es probable que la S1P favorezca la interacción del receptor S1P₁ con Rab5, iniciando la endocitosis y el reciclaje del receptor en los endosomas tempranos; el activador de PKC favorece la interacción con Rab5 permitiendo la endocitosis y el tráfico vesicular a endosomas tardíos y reciclaje lento por la interacción con Rab9. La acción del FTY720-P tiene diferencias muy interesantes en la interacción del receptor con las proteínas Rab. Nuestros datos sugieren que el FTY720-P induce una asociación mayor con Rab5 respecto a la S1P, el FTY720-P no favorece una asociación con Rab9, pero a diferencia de la S1P y el PMA, el FTY720-P favorece la asociación con Rab7. Como se mencionó anteriormente Rab7 se encuentra dirigiendo las vesículas a endosomas tardíos y a la degradación de la carga como en este caso un GPCR por lisosomas o el proteosoma (Schwasartz, *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2004). Nuestros datos de fosforilación del S1P₁ en presencia de S1P o FTY720-P están de acuerdo con los publicados por Oo y colaboradores, además sugieren que el receptor S1P₁ al ser estimulado con FTY720-P es fosforilado, internalizado, ubiquitinado, y degradado vía proteosoma (Oo *et al.*, 2007). Nuestros datos presentan algunas diferencias respecto a los de Oo y colaboradores, ellos observan un poco de degradación del receptor a los 30 min, nosotros no pudimos detectar la degradación del receptor a este tiempo (ver Western blots, figura 8). En sus experimentos la degradación del receptor fue más clara a tiempos más largos de incubación como 4 y 8 h. No se estudiaron tiempos largos en nuestro trabajo.

Es muy interesante que el receptor S1P₁ siga la misma ruta de tráfico vesicular al estimular con S1P y PMA (desensibilización homóloga vs heteróloga) debido a que este caso difiere con otro GPCR que pertenece a la misma familia, el receptor α_{1B} -adrenérgico. Estudios previos en nuestro laboratorio sugieren que los receptores α_{1B} -adrenérgicos al ser estimulados con noradrenalina interaccionan con proteínas presentes en los endosomas tempranos, como EEA1, Rab5, Rab4 y Rab11, pero no con proteínas de endosomas tardíos, como Rab9 y Rab7 (Castillo-Badillo *et al.*, 2015). 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 es necesaria, porque no se observó interacción del receptor con las proteínas Rab cuando se emplearon las mutantes de las proteínas Rab. Estos datos indican que los receptores α_{1B} -adrenérgicos presentan un tráfico vesicular diferente a los S1P₁ dependiendo del tipo de desensibilización (homóloga vs. heteróloga) (Castillo-Badillo *et al.*, 2015) y difieren respecto al receptor S1P₁ en donde podemos observar que la desensibilización homóloga y heteróloga siguen la misma ruta de tráfico vesicular. La comparación cobra interés dado que nos señala que no podemos generalizar que la desensibilización homóloga se asocie con internalización a endosomas tempranos y la heteróloga a reciclaje tardío o degradación. Definir qué camino usa un receptor para internalizarse se convierte en un reto experimental. Existe la posibilidad de que la fosforilación en sitios específicos sean los que definan cómo se internalizan, ya sea directa o indirectamente, si nos apoyamos en la propuesta de los códigos de fosforilación (Tobin *et al.*, 2008).

Se ha reportado la dinámica del tráfico vesicular de diversos receptores y sugieren que es muy diversa respecto a nuestros resultados con el S1P₁, 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). Para Rab7 se conoce que está asociado a la internalización y degradación de otros GPCRs, por ejemplo los receptores para opioides κ (Li *et al.*, 2000), el receptor para PDGF con actividad de tirosina cinasa (Dupre *et al.*, 2003). Rab7 también participa en la degradación de receptores con actividad de tirosina cinasas, como los receptores de factor de crecimiento epidérmico (Ceresa & Bahr, 2006; Bakker *et al.*, 2017) y el receptor del factor de crecimiento endotelial tipo 2 (Ballmer-Hofer *et al.*, 2011; Jopling *et al.*, 2009). Los trabajos reportados de diversos receptores indican que el mecanismo de internalización, reciclaje y degradación es demasiado robusto y variado, por ello es muy importante estudiar los diferentes procesos que regulan el tráfico vesicular de los receptores. En nuestro laboratorio proponemos que la unión de las diferentes proteínas Rab al receptor S1P₁ depende de su estado conformacional, cuando el receptor S1P₁ se desensibiliza por la S1P o PMA (desensibilización homóloga vs heteróloga) el receptor adquiere un estado conformacional específico mientras que cuando se activa el receptor por FTY720-P postulamos que el receptor adquiere un estado conformacional distinto, que depende de los aminoácidos que son fosforilados por el efecto de la S1P, el FTY720-P o el PMA, esto le permite interactuar con diferentes proteínas Rab que favorece las diferencias en el tráfico vesicular anteriormente mencionadas (Hernández Espinosa David, *et al.*, 2019, Carmona-Rosas Gabriel, *et al.*, 2019).

La paroxetina inhibe directamente a la proteína cinasa GRK2 (Thal *et al.*, 2012). En nuestros experimentos la paroxetina bloqueó la fosforilación del receptor S1P₁ por la acción de S1P, FTY720-p y disminuye significativamente la fosforilación por el activador de PKC, además el antidepresivo bloqueó la internalización y la interacción del receptor S1P₁ con las proteínas Rab, estos datos sugieren que la proteína GRK2 es la principal cinasa involucrada en la fosforilación del receptor S1P₁ bajo la acción de la S1P, el FTY720-P y al utilizar PMA, la principal cinasa involucrada en la fosforilación del S1P₁ es la PKC. Trabajos de nuestro laboratorio mencionan que la paroxetina también bloquea la fosforilación e internalización del receptor adrenérgico α 1D al estimular con su ligando natural, la noradrenalina, además disminuye la fosforilación por PMA (Alfonzo-Mendez *et al.*, 2018). Es probable que exista una regulación entre la GRK2 y la PKC, porque se conoce que la PKC puede activar por fosforilación a la GRK2 (Krasel *et al.*, 2001).

La fosforilación es una de varias modificaciones postraduccionales más frecuentes que se ha reportado en aproximadamente 17,500 proteínas del proteoma humano (Pagel *et al.*, 2015). Para

los GPCRs, las modificaciones postraduccionales más comunes son la fosforilación, la palmitoilación, la acetilación, la glicosilación y la ubiquitinación, todas estas modificaciones covalentes repercuten en la regulación de la señalización de los GPCRs (Xin *et al.*, 2012). La adición de grupos fosfato a los GPCRs ocurre comúnmente en la tercera asa intracelular y en el extremo COOH terminal. Los aminoácidos fosforilados son importantes para la asociación de proteínas de andamiaje (Shukla *et al.*, 2013). La regulación de receptores acoplados a proteínas G es muy fina, un GPCR puede presentar un patrón diferencial de fosforilación, a esto se le conoce como “códigos de fosforilación” y determina la cascada de señalización y tráfico vesicular para el GPCR (Tobin, 2008; Butcher *et al.*, 2011). Los códigos de fosforilación pueden presentarse diferencialmente en un GPCR por su activación con agonistas, antagonistas, agonistas parciales, agonistas inversos y agonistas sesgados (Rajagopal *et al.*, 2010). La fosforilación del receptor S1P₁ ha sido ampliamente estudiada y se han reportado algunos aminoácidos fosforilados por la S1P y FTY720-P o PMA. La proteína AKT/PKB fosforila el residuo T236 en la tercera asa intracelular del receptor S1P₁ por la S1P (Lee *et al.*, 2001). La delección de los últimos 32 aminoácidos del COOH terminal elimina la fosforilación del receptor S1P₁ por la S1P o PMA y la delección de los últimos 12 aminoácidos de COOH terminal afecta la fosforilación por S1P, pero no para PMA (Watterson *et al.*, 2002). Una mutante del receptor S1P₁ que se caracteriza por la sustitución de una región rica en aminoácidos de serinas (351-359) por aminoácidos de alaninas se degradó por la acción del FTY720-P (Arnon *et al.*, 2011). La fosforilación del receptor en los aminoácidos S336, S351 y S353 fueron encontrados por el FTY720-P por espectrometría de masas (Oo *et al.*, 2011). La fosforilación de la Y143 inducida por la S1P regula la expresión del receptor S1P₁ (Chavez *et al.*, 2015). Desafortunadamente, a pesar de toda la información disponible sobre la regulación del receptor S1P₁ se desconoce la manera en que la maquinaria intracelular puede diferenciar la activación del receptor por la S1P o por el FTY720-P el cual favorece la ubiquitinación y degradación del receptor. Todos los aminoácidos que se han reportado como fosforilables para el receptor de S1P₁ nos permiten proponer que presenta varios códigos de fosforilación y que estos están regulados por el ligando que se una al receptor (S1P o el FTY720-P) y por el activador de PKC (PMA). Por último nuestros experimentos, sugieren que las personas que padecen de EM no es pertinente el tratamiento de FTY720-P con paroxetina debido a que el antidepresivo inhibe la cinasa GRK2 y potencialmente puede bloquear la fosforilación necesaria para la ubiquitinación del receptor y su degradación, este mecanismo es fundamental para evitar el egreso de los linfocitos T de los nódulos linfáticos y prevenir la fisiopatología de la EM.

Conclusiones y perspectivas

Conclusiones

El receptor de esfingosina tipo 1 (S1P₁) es fosforilado por la acción de la S1P, el FTY720-P y el PMA., las principales cinasas involucradas en la fosforilación del receptor son la GRK2 y la PKC. La fosforilación del receptor es una modificación postraduccional esencial para el anclaje de proteínas involucradas en la desensibilización e internalización del receptor. Respecto a la internalización del receptor S1P₁ se presentaron similitudes y diferencias por los tratamientos por la S1P, el FTY720-P o el PMA. 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. De manera importante al activar el receptor con FTY720-P se asocia a Rab5 en los endosomas tempranos y a Rab7 en los endosomas tardíos dirigidos a degradación, pero no se asocia a Rab9. Estas diferencias en el tráfico vesicular sugiere que el receptor S1P₁ presenta varios códigos de fosforilación que están regulados por el tipo de ligando que se une al receptor (S1P o FTY720-P) o por el activador de PKC (PMA). Por último, nuestros experimentos sugieren que en las personas que padecen de esclerosis múltiple no es pertinente el tratamiento combinado de FTY720-P con paroxetina debido a que afecta el tratamiento en la fisiopatología de la enfermedad.

Perspectivas

Las perspectivas principales del proyecto se centran en estudiar la importancia del COOH terminal y la segunda y tercera asas intracelulares en la regulación del receptor S1P₁. Con esta finalidad se propone:

- Realizar un análisis *in silico* del receptor S1P₁ para obtener:
 - Sitios probables de fosforilación.
 - Identificación de las cinasas participantes.
- Purificación del receptor y análisis por espectrometría de masas para:
 - Identificar nuevas proteínas asociadas.
 - Determinar los sitios de fosforilación del receptor S1P₁ en su estado basal, así como durante su desensibilización homóloga (S1P y FTY720-P) y heteróloga (PMA).
- Generar mutantes de los sitios de fosforilación del receptor S1P₁ y caracterizar su repercusión funcional a los siguientes niveles:
 - Desensibilización de la vía de recambio de fosfoinosítidos/Ca²⁺.
 - Perfil de fosforilación.
 - Localización subcelular.
 - Tráfico vesicular/internalización.

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.
- Carmona Rosas Gabriel, Hernández Espinosa David A. Alcántara Hernández Rocío, Alfonso Méndez Marco Alfonso & García Sáinz Jesús Adolfo. 2018. *Cell Signal.* 53:374-389
- 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.
- Chun Jerold & Hartung Hans Peter. 2010. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol.* 33: 91-101.
- 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.
- Dawn M. Ehde, George H. Kraft, Lydia Chwastiak, Mark D. Sullivan, Laura E. Gibbons, Charles H. Bombardier y Rohini Wadhvani. 2008. Efficacy of paroxetine in treating major depressive disorder in persons with multiple sclerosis. *Psychiatric Medical Comorbidity.* 30: 40-48.
- Efficacy of paroxetine in treating major depressive disorder in persons with multiple sclerosis,

- General Hospital Psychiatry,
- Dong, C., Lingling, Y., Xiaoping, Z., Hua, G., May, L., Lam, W., Claycomb, H. X. 2010. Rab8 interacts with distinct motifs in alpha2B- and beta2-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.
- Fredriksson Robert & Shioth Helgi. 2005. The grafts classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gem Com Endocrinol.* 15: 94-101.
- 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.
- Gryniewicz, 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.
- Hazeki, O., Uj, M. 1981 Moidicarion by islet-activating protein of receptor-mediated regulation of cyclic AMP accumulation in isolated rat heart cells. *J. Biol. Chem.* 256: 2856-2862.
- Hernández Espinosa David A. Carmona Rosas Gabriel, Alfonzo Mendez Marco A, Alcántara Hernández Rocío & García Sáinz J Adolfo. 2019. Sites phosphorylated in human α 1b-adrenoreceptors in response to noradrenaline and phorphol myristate acetate. *Biochim Biophys Acta Moll Cell Res.* 1866:1509-1519
- 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.
- Hsu, C. Y. M., & Uludağ, H. 2012. A simple and rapid nonviral approach to efficiently transfect primary tissue-derived cells using polyethylenimine. *Nature Protocols.* 7(5): 935–945.
- 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.
- Khono T., Igarashi Y., 2003. Truncation of the N-terminal ectodomain has implications in the N-glycosylation and transport to the cell surface of Edg-1/S1P1 receptor. *J Biochem.* 134: 667-673.
- 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.
- Kloer Daniel P., Rojas Raul, Ivan Viorica, Morivama Kengo, Vlijmen van Thijs, Murthy Namita, Ghirlando Rodolfo, van der Sluijs Peter, Hurley H James & Bonifacino S. Juan. 2010. Assembly of the Biogenesis of Lysosome-related Organelles Complex-3 (BLOC-3) and Its Interaction with Rab9. *J. Biol. Chem.* 285 (10): 7794-7804.
- 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.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685,
- 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.
- Pagel O, Loroch S, Sickmann A, Zahedi R. Current strategies and findings in clinically relevant post-translational modification-specific proteomics. *Expert Rev. Proteom.* 2015, 12, 235–253.

- 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.
- Polman CH. 2000. Drug treatment of multiple sclerosis. *BMJ*. 321 (7259): 490-494.
- Pueyo-Jurado M., Campos, M. P. & Murga, C. 2008. GRK2-Dependent Desensitization Downstream of G Proteins. *J. Recept. 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.
- Solomon, Andrew J., Dennis N. Bourdette, Anne H. Cross, Angela Applebee, Philip M. Skidd, Diantha B. Howard, Rebecca I. Spain, Michelle H. Cameron, Edward Kim, Michele K. Mass, Vijayshree Yadav, Ruth H. Whitham, Erin E. Longbrake, Robert T. Naismith, Gregory F. Wu, Becky J. Parks, Dean M. Wingerchuk, Brian L. Rabin, Michel Toledano, W. Oliver Tobin, Orhun H. Kantarci, Jonathan L. Carter, B. Mark Keegan & Brian G. Weinschenker. 2016. The contemporary spectrum of multiple sclerosis misdiagnosis. *Neurology*. 87 (13): 1393-1399
- 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.
- Tobin, A. B. Butcher, J. A. & Choi, K. K. 2008. Location, location, location. . . site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signaling. *Trends in Pharmacological Sciences*. 29, 413-420.
- 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 Emerginn 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.
- Zhu Guangyu, Zhai Peng, Liu Jian, Terzyan Simon, Li Guangpu & Zhang Xuejun. 2004. Structural basis of Rab5-Rabaptin5 interaction in endocytosis. *Nature Structural & Molecular Biology.* 11: 975-983.

Anexo I

Publicación para obtener el grado de Doctor en Ciencias

Research Article

S1P₁ receptor phosphorylation, internalization, and interaction with Rab proteins: effects of sphingosine 1-phosphate, FTY720-P, phorbol esters, and paroxetine

Juan Carlos Martínez-Morales¹, M. Teresa Romero-Ávila¹, Guadalupe Reyes-Cruz² and
J. Adolfo García-Sáinz¹

¹Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP 04510, Ap. Postal 70-248, Mexico City, Mexico; ²Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional-CINVESTAV, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Mexico City, Mexico

Correspondence: J. Adolfo García-Sáinz (jagarcia@ifc.unam.mx)



Sphingosine 1-phosphate (S1P) and FTY720-phosphate (FTYp) increased intracellular calcium in cells expressing S1P₁ mCherry-tagged receptors; the synthetic agonist was considerably less potent. Activation of protein kinase C by phorbol myristate acetate (PMA) blocked these effects. The three agents induced receptor phosphorylation and internalization, with the action of FTYp being more intense. S1P₁ receptor–Rab protein (GFP-tagged) interaction was studied using FRET. The three agents were able to induce S1P₁ receptor–Rab5 interaction, although with different time courses. S1P₁ receptor–Rab9 interaction was mainly increased by the phorbol ester, whereas S1P₁ receptor–Rab7 interaction was only increased by FTYp and after a 30-min incubation. These actions were not observed using dominant negative (GDP-bound) Rab protein mutants. The data suggested that the three agents induce interaction with early endosomes, but that the natural agonist induced rapid receptor recycling, whereas activation of protein kinase C favored interaction with late endosome and slow recycling and FTYp triggered receptor interaction with vesicles associated with proteasomal/lysosomal degradation. The ability of bisindolylmaleimide 1 and paroxetine to block some of these actions suggested the activation of protein kinase C was associated mainly with the action of PMA, whereas G protein-coupled receptor kinase (GRK) 2 (GRK2) was involved in the action of the three agents.

Received: 27 August 2018
Revised: 19 October 2018
Accepted: 26 October 2018

Accepted Manuscript Online:
26 October 2018
Version of Record published:
11 December 2018

Introduction

Sphingosine 1-phosphate (S1P) is a metabolite formed by the phosphorylation of sphingosine through the catalytic action of sphingosine kinase I. In addition to its metabolic role, S1P is capable of modulating a large number of physiological processes, such as development [1], bone remodeling [2], vascular development, maturation, and integrity [3], and immune cell traffic [4], amongst many others. Similarly, S1P plays roles in the pathogenesis of various diseases including cancer [5,6], fibrosis [6,7], and multiple sclerosis [8–10]. At the cellular level, S1P has been implicated in cell migration, proliferation, and survival [11]. For comprehensive reviews on these aspects, see [9,11–17]. S1P is considered a 'bioactive lipid' due to its capacity to induce this plethora of actions and the fact that the majority of these are mediated through a

family of G protein-coupled receptors [13,14]. The SIP receptor family is composed of five accepted receptors denoted as SIP₁₋₅, structurally related to lysophosphatidic acid receptors LPA₁₋₃, and an additional receptor, SIP₆, related to the purinergic G protein-coupled receptor subfamily [14,17].

The SIP₁ receptor was the first to be functionally characterized [18] and it is the best studied in the family; its crystal structure has already been reported [19]. This receptor is mainly coupled to Gi/o [14] and amongst its most important roles can be found the regulation of lymphocyte traffic [4,14,20]. SIP₁ receptors act as sensors and guide lymphocyte migration from lymph nodes that contain low levels of SIP, to the blood, where its concentration is higher; down-regulation or desensitization of SIP₁ receptors enables lymphocytes to migrate from the blood into tissues, where the SIP concentration is also relatively low [4,20]. Desensitization of SIP₁ receptors and receptor antagonists induce leukopenia [21], which has increased interest in academia and pharmaceutical industries, given the therapeutic potential for the treatment of autoimmune diseases and other pathologies [22,23]. Fingolimod (FTY720) is one of these agents and it has found its therapeutic niche in the treatment of relapsing multiples sclerosis; it has been already approved for its use in humans in many countries [9]. To exert its action, the pro-drug, Fingolimod, must be phosphorylated by sphingosine kinase 2, in order to generate the active agent, FTY720-phosphate (FTYp) [9]. The therapeutic action of this agent appears to involve not only lymphocytes, but also the resident macrophages of the central nervous system, microglia, and astrocytes [10,24]. Interestingly, FTYp is not an antagonist, but an agonist that targets SIP₁ receptors for internalization and degradation through complex processes. These appears to involve receptor phosphorylation by G protein-coupled receptor kinase (GRK) 2 (GRK2), interaction with β -arrestins, clathrin, the receptor internalization machinery, and the proteasome [25–29], which leads cells to a long-term SIP₁ receptor down-regulation rendering them refractory to agonist action.

Nevertheless, information on the receptor's internalization process is scarce. In particular, there is no information, to our knowledge, on the role(s) of the different Rab proteins in internalization. Rab proteins comprise a large family of more than 60 monomeric GTPases that interact with the cytoplasmic face of vesicles, favoring docking, fusion, cargo exchange, and vesicle transport along the cytoskeleton; therefore, they are considered key elements in vesicular transport [30–32]. In the present work, we comparatively studied the action of two agonists, SIP and FTYp, and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), a protein kinase C activator, on receptor phosphorylation and association with Rab proteins. We focus particularly on the interaction with Rab5, Rab9, and Rab7. Rab5 is an essential regulator of endocytosis, which localizes to the plasma membrane and the early endosome and mediates early membrane-fusion processes [32,33]. Rab9 is mainly involved in cargo transport amongst early endosomes, late endosomes, and the trans-Golgi network [32,34]. Rab7 appears to regulate intracellular trafficking of vesicular cargo from late endosomes to lysosomes [32,35] and with the proteasome [36]. The possible role of GRK2 in these events was also tested by using paroxetine, an antidepressant, which binds selectively to this kinase isoform compared with other GRKs, and which inhibits its activity [37,38].

Experimental procedures

Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium, trypsin, antibiotics, FBS, and other reagents used for cell culture were from Gibco Life Technologies. SIP, PMA, bisindolylmaleimide I, DNA purification kits, and protease inhibitors were purchased from Sigma Chemical Co. FTYp was obtained from Cayman Chemical. Paroxetine was a generous gift from Psicofarma SA de CV (Mexico) (<http://www.psicofarma.com.mx/>). [³²P]Pi (8500–9120 Ci/mmol) was obtained from PerkinElmer Life Sciences. Agarose-coupled protein A was purchased from Millipore. Lipofectamine 2000 and Fura 2-AM were obtained from Invitrogen. The plasmid for expression of the SIP₁ receptor fused to the mCherry red fluorescent protein (a variant of the *Discosoma* sp. [mushroom anemone, disc anemone] red fluorescent protein (DsRed)) (plasmid Z2508-M56) was obtained from Genecopoeia. Enhanced GFP (eGFP)-tagged wild-type and mutant Rab GTPases were generated by Dr Robert Lodge (Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montreal, Canada) [39] and generously provided to us. A plasmid for expression of DsRed in *Escherichia coli* was generously provided to us by Dr Stefan Jakobs (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Goettingen, Germany), and the protein was expressed and purified as described [40]. An anti-DsRed antiserum, suitable for Western blot analysis and immunoprecipitation, was generated in our laboratory and it has been characterized [41–43]. Secondary antibodies were from Zymed, nitrocellulose membranes from Bio-Rad, and chemiluminescence kits were purchased from Pierce.

Cell lines and transfections for stable and transient expression

HEK 293 cells (American Type Culture Collection) were cultured as described [41]. Transient co-expression was employed for FRET, as described later. For all the remaining experiments a cell line was generated as follows: cells were cultured in 6-cm diameter Petri dishes and, when 70% confluence was reached, they were transfected with 1 μ g of plasmid for expression of the mCherry-tagged S1P₁ receptor, following the provider's instructions. After 24 h, the medium was changed to DMEM containing geneticin (300 μ g/ml) for selection. Colonies were selected on the basis of receptor expression (fluorescence microscopy) and 1 μ M S1P-induced increases in intracellular calcium concentration; a clone with robust expression and response to S1P was employed for the experiments presented. To study the interaction of S1P₁-mCherry receptors with eGFP-Rab proteins, using FRET, transfection for transient expression was employed and it was performed essentially as described [41,42]. In brief, a mixture containing 300 ng of each plasmid for expression of the eGFP-tagged Rab proteins, and mCherry-tagged S1P₁ receptors was co-transfected employing polyethyleneimine [44], cells were maintained in culture, and experiments were carried out 72 h post-transfection.

Intracellular calcium determinations

Intracellular calcium was quantitated essentially as previously described [34]. In brief, cells were serum-starved overnight, loaded with 2.5 μ M Fura-2/AM, for 1 h at 37°C, and then washed three-times to eliminate unincorporated dye. Fluorescence measurements were carried out at 340- and 380-nm excitation wavelengths and at 510-nm emission wavelength, with a chopper interval set at 0.5 s, utilizing an AMINCO-Bowman Series 2 luminescence spectrometer. Intracellular calcium ([Ca²⁺]_i) was calculated according to Grynkiewicz et al. [45].

Phosphorylation of mCherry-tagged S1P₁ receptors

The procedure was similar to those employed to study eGFP-tagged S1P₁ receptors [46]. Briefly, cells were maintained for 1 h in phosphate-free medium without serum and then incubated in 1 ml of the same medium containing [³²P]Pi (100 μ Ci/ml) for 3 h at 37°C. Labeled cells were stimulated as indicated, washed with ice-cold PBS solution, and solubilized with 0.5 ml of ice-cold buffer containing detergents, and protease and phosphatase inhibitors [46]. Cell lysates were centrifuged at 12700 \times g for 15 min at 4°C and supernatants were incubated overnight at 4°C with protein A-agarose and anti-DsRed antiserum. After two washes, pellets containing the immune complexes were boiled for 5 min in SDS-sample buffer containing 10% β -mercaptoethanol, and subsequently subjected to SDS/PAGE. The gels were dried and the level of receptor phosphorylation was assessed with a Molecular Dynamics PhosphorImager and ImageQuant software. Data fell within the linear range of detection of the apparatus and were plotted using Prism6 from GraphPad software. Parallel samples were employed to determine loading of immunoprecipitated receptors by Western blotting, employing the anti-DsRed antiserum [41–43].

Confocal fluorescence microscopy

To study receptor internalization, cells were seeded at 60% confluence onto glass-bottomed Petri dishes coated with poly-D-lysine and cultured for 48 h at 37°C in medium containing 10% serum, and further incubated for additional 3 h in media without serum. Cells were stimulated with the agents and for the times indicated and were then washed with PBS solution, fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, and then washed five times again with PBS. Images of five to six independent experiments using different cell cultures were obtained employing a Fluoview Confocal microscope model FV10i (Olympus, LD laser, 405 nm (18 mW), 473 nm (12.5 mW), 635 nm (10 mW), 559 nm) with a water-immersion objective (60 \times). The mCherry protein was excited at 580 nm and the fluorescence emitted was detected at 610 nm. Fluorescence in both the plasma membrane region, and in intracellular vesicles was determined. To achieve this, the plasma membrane region was delineated and marked using the differential interference contrast image and fluorescence in plasma membrane and in intracellular regions was quantitated by employing ImageJ software [47–49].

S1P₁ receptor-Rab protein interaction

Interaction was analyzed using FRET by means of the sensitized-emission method, employing a confocal microscope equipped with an FV10i Olympus automated laser spectral scan, as described [42], with minor modifications. Expression of eGFP- and mCherry-tagged proteins was confirmed for each experiment. The eGFP protein was excited at 489 nm and the emitted fluorescence was detected at 510 nm, while the red fluorescent protein, mCherry, was excited at 580 nm and the fluorescence emitted was detected at 610 nm, as previously indicated. For FRET channel analysis, eGFP (but not mCherry) was excited and fluorescence was detected at 610 nm. The same images were employed to

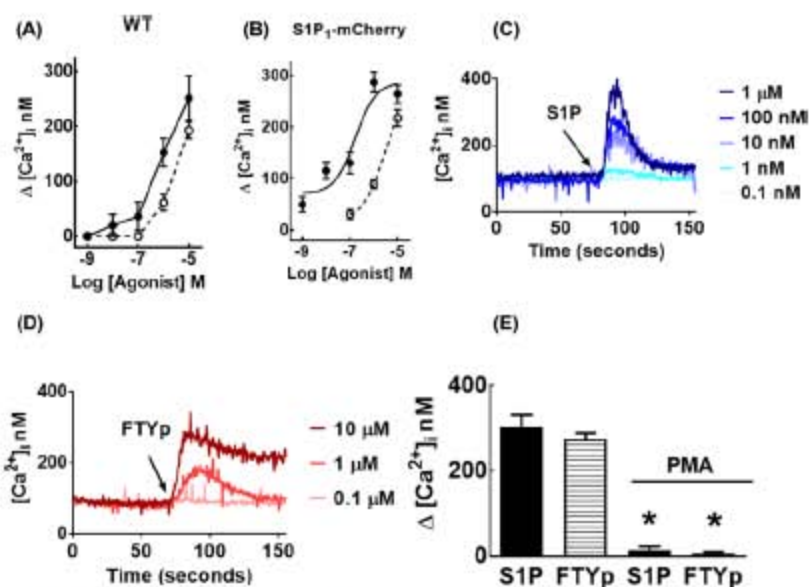


Figure 1. Effects of S1P, FTYp, and PMA on intracellular calcium concentration

Untransfected (wild-type, WT; (A)) or mCherry-tagged S1P₁ receptor-expressing (S1P₁-mCherry; (B)) HEK 293 cells were treated with the indicated concentrations of S1P (closed circles, solid lines) or FTYp (open circles, dotted lines) and the maximal calcium concentration was recorded. Plotted are the means with vertical lines indicating the S.E.M. of three (A) or five (B) experiments performed with different cell cultures. All the remaining panels correspond to experiments using mCherry-tagged S1P₁ receptor-expressing cells. Representative calcium tracings obtained in responses to different concentrations of S1P (C) or FTYp (D). In (E), cells were preincubated for 10 min in the absence or presence of 1 μ M PMA and then challenged with 1 μ M S1P or 10 μ M FTYp. Plotted are the means with vertical lines indicating the S.E.M. of eight experiments performed with different cell cultures. * $P < 0.001$ compared with absence of PMA.

quantitate receptor internalization. The FRET index (that eliminates 'bleed-through' and 'false' FRET) was quantitated utilizing ImageJ software and the 'FRET and Co-localization Analyzer' plug-in [50]. This plug-in functions with 8-bit images and allows supervised computation of the FRET index by means of a 'pixel-by-pixel' method.

Statistical analysis

Statistical analysis between comparable groups was performed using ANOVA with Bonferroni's post-test and was performed with the software included in the GraphPad Prism Program. In all statistical comparisons, $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Intracellular calcium concentration

The effect of S1P and FTYp on the intracellular concentration of calcium was tested in untransfected (wild-type) HEK 293 cells. HEK 293 cells are known to express S1P₁ receptors and other subtypes and also to generate S1P in response to different stimuli through the activation and membrane association of sphingosine kinases [51,52]. As anticipated, both agonists were able to increase intracellular calcium (Figure 1A); in neither case did the concentration-response curves reach saturation. This effect was also tested in the selected cell line transfected to stably express mCherry-tagged S1P₁ receptors. As can be observed (Figure 1B), in these cells the concentration-response curve for S1P was clearly shifted to the left and saturation was observed in the range of 1–10 μ M (EC_{50} value \sim 250

nM); no clear saturation was observed with FTYP within the range of concentrations employed, and higher concentrations interfered with the intracellular calcium determinations (data not shown). Nevertheless, the data showed that FTYP was less potent than SIP for this effect. In addition, the calcium traces also demonstrated that the action of FTYP was not as rapid as that of the natural agonists and that the intracellular calcium concentration remained relatively elevated for longer time periods in response to FTYP (compare Figure 1C and D). The effect of both agonists was blocked by preincubation with the PKC activator, PMA (Figure 1E).

S1P₁ receptor phosphorylation

Phosphorylation of this receptor takes place in response to receptor stimulation and the activation of PKC, and appears to be associated with receptor desensitization [46]. In agreement with this, it was observed that SIP, FTYP, and PMA increase S1P₁ phosphorylation (Figure 2). The time course of this effect for 1 μ M SIP (panel A) and 10 μ M FTYP (panel B), as well as the comparative effects of 1 μ M SIP, 10 μ M FTYP, and 1 μ M PMA on receptor phosphorylation (15 min incubation) are presented in Figure 2 (incubation time and agent concentrations were defined in preliminary experiments and previous findings using eGFP-tagged S1P₁ receptors [46]). S1P₁ receptor phosphorylation was rapid in response to 1 μ M SIP, reaching a near-maximal effect at 2–5 min; the action of 10 μ M FTYP was similar but of a smaller magnitude, reaching near-maximal receptor phosphorylation at 5–10 min (Figure 2A,B). It was previously shown that PMA-induced receptor desensitization and phosphorylation is mainly due to the activation of classical PKC α and β isoforms [46], whereas SIP-induced receptor phosphorylation occurs through a different process likely involving GRKs [27,46]. Consistent with this, the PKC inhibitor, bisindolylmaleimide I [53], clearly decreased the action of PMA, but did not alter baseline receptor phosphorylation or the effects of the agonists SIP and FTYP (Figure 2D).

S1P₁ receptor subcellular localization

This aspect was studied next. It can be observed that, under baseline conditions, a large proportion of the receptor's fluorescence delineated the plasma membrane; some fluorescence was also present in intracellular vesicles (Figure 3). Incubation with SIP, FTYP, or PMA for only 5 min clearly increased receptor internalization, as evidenced by decreased fluorescence at the level of the plasma membrane and a concomitant marked increase in intracellular fluorescence (Figure 3A–C). Interestingly, the intracellular fluorescence accumulation was more intense with the synthetic agonist, FTYP, at 30 min of incubation (Figure 3).

S1P₁ receptor–Rab protein interactions

FRET was employed to analyze S1P₁ receptor–Rab protein interactions. Transient co-transfection with plasmids for expression of mCherry-tagged receptor and eGFP-tagged Rab proteins was performed 72 h before the experiment; expression of the proteins was confirmed by confocal microscopy. Data are presented in Figure 4 histograms and representative images are exhibited in Supplementary Figures S1–S9. The time course of SIP action on S1P₁ receptor–Rab5 interaction is presented in Figure 4A and in Supplementary Figure S1. It can be observed that Rab5 is distributed along the cytoplasm during the whole time course, whereas the S1P₁ receptor is mainly plasma membrane-located before stimulation and internalizes in response to the agonist in a time-dependent fashion (Supplementary Figure S1). The FRET images reveal the fluorescence observed with eGFP excitation (but without mCherry excitation) and recording in the red channel; FRET INDEX images represent the remaining FRET after the elimination of false FRET using the pixel-by-pixel analysis of the ImageJ program. As it can be observed, SIP induced FRET at 3, 5, and 15 min and this essentially vanished at 30 min. The FTYP effect on S1P₁ receptor–Rab5 interaction was more rapid, being maximal at 2 min and progressively decreasing at later times (Figure 4B and Supplementary Figure S2). The PMA effect on S1P₁ receptor–Rab5 interaction was similar to that of SIP, but the interaction persisted after 30 min (Figure 4C and Supplementary Figure S3). SIP induced a modest S1P₁ receptor–Rab9 interaction that was clear at 5 min (Figure 4D and Supplementary Figure S4) and no effect of FTYP was detected on the receptor's interaction with Rab9 (Figure 4E and Supplementary Figure S5). In contrast, PMA triggered S1P₁ receptor–Rab9 interaction that was clear during the initial stimulation (2–5 min), vanished at 15 min but reappeared at 30 min (Figure 4F and Supplementary Figure S6). Essentially, no FRET due to S1P₁ receptor–Rab7 interaction was observed under the action of SIP (Figure 4G and Supplementary Figure S7) or PMA (Figure 4I and Supplementary Figure S9) but, in contrast, FTYP induced a rapid small increase at 2 min and a stronger one at 30 min (Figure 4H and Supplementary Figure S8). In experiments utilizing the GDP-bound (inactive) dominant-negative mutants of these Rab proteins, the effects described previously were not observed (Supplementary Figure S10).

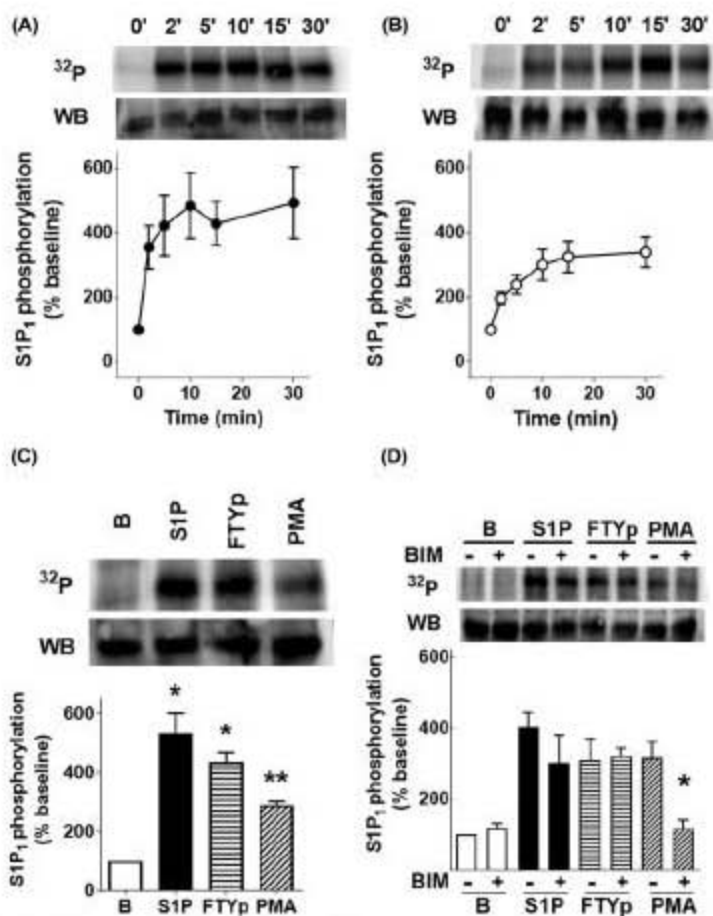


Figure 2. Effects of S1P, FTYp, and PMA on S1P₁ receptor phosphorylation

Cells expressing mCherry-tagged S1P₁ receptors were incubated as indicated under 'Experimental procedures' section to study receptor phosphorylation and were challenged for the times indicated with 1 μM S1P (closed circles, (A), *n* = 9) or 10 μM FTYp (open circles, (B), *n* = 10). Plotted are the means with vertical lines indicating the S.E.M. of the mentioned number (*n*) of independent experiments using different cell cultures. In (C), cells were challenged for 15 min with 1 μM S1P, 10 μM FTYp, or 1 μM PMA. Plotted are the means with vertical lines indicating the S.E.M. of six experiments performed with different cell cultures. **P* < 0.001 compared with Baseline (B). ***P* < 0.01 compared with Baseline (B). In (D), cells were preincubated for 30 min in the absence (-) or presence (+) of 1 μM bisindolylmaleimide I (BIM) and challenged as described for (C). Plotted are the means with vertical lines indicating the S.E.M. of five experiments performed with different cell cultures. **P* < 0.01 compared with preincubation without BIM. A representative autoradiograph (³²P) and a Western blot are presented above each histogram.

Downloaded from <http://portlandpress.com/bio-science-reports> on 05/05/2018 by University of Bath. See the Terms and Conditions (<http://www.portlandpress.com/terms-and-conditions>) on Portland Press website.

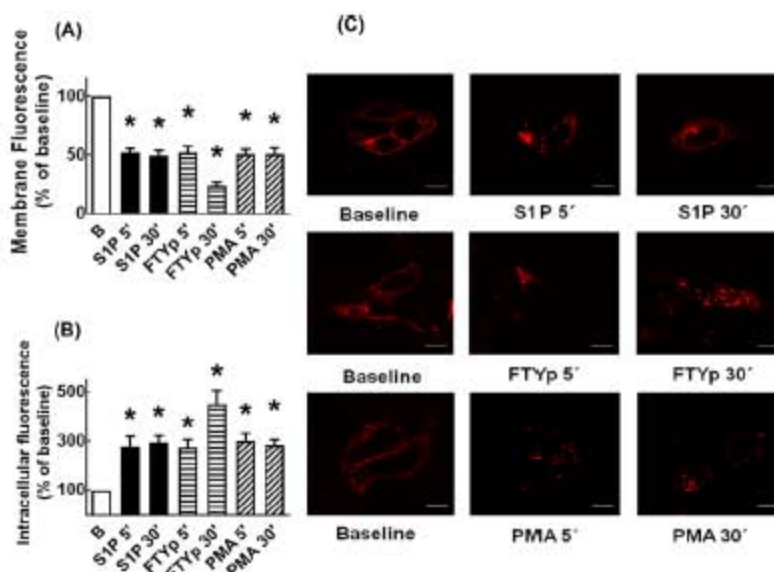


Figure 3. Effects of S1P, FTYp, and PMA on S1P₁ receptor internalization

Cells expressing mCherry-tagged S1P₁ receptors were challenged for 5 or 30 min with 1 μM S1P, 10 μM FTYp, or 1 μM PMA. Membrane (A) or intracellular (B) fluorescence values were determined and normalized to those observed in the absence of stimulus (B) Baseline; 100%). Plotted are the means with vertical lines indicating the S.E.M of 24–30 samples resulting from four or five independent experiments, in which six different images were obtained from each of these. *P < 0.001 compared with Baseline (B). Representative images are presented in (C). Bars 10 μm.

On the possible role of GRK2

This was studied by using paroxetine, an antidepressant (a serotonin-uptake inhibitor) that has been found to bind and inhibit GRK2 [37,38,54]. We have previously observed that paroxetine markedly blocks agonist-mediated α_{1D}-adrenergic phosphorylation and also diminishes the effect of PMA on this parameter [55]. Consistent with this, we observed that preincubation with the antidepressant nearly blocked S1P- and FTYp-mediated S1P₁ receptor phosphorylation, and also partially diminished PMA-induced action (Figure 5). Similarly, preincubation with paroxetine markedly reduced S1P-, FTYp-, and PMA-induced S1P₁ receptor internalization (Figure 6), i.e. in cells preincubated with the antidepressant, the agonist- and PMA-induced decreases in fluorescent plasma membrane delineation was essentially blocked (panels A,C) and the increase in intracellular fluorescence induced by these agents was also markedly reduced (panels B,C). It is noteworthy that preincubation with paroxetine induced cellular contraction as evidenced by marked roundness (Figure 6C). Paroxetine-induced decreases were estimated by determining the cells' major axes and their areas (Supplementary Figure S11A,B, respectively).

The effect of paroxetine on the previously described S1P₁ receptor-Rab protein associations was studied. It was observed that paroxetine essentially abolished all of these effects; i.e. it blocked S1P-, FTYp-, and PMA-induced interaction with Rab5 (Figure 7A and Supplementary Figure S12); the actions of S1P and PMA on receptor-Rab9 association (Figure 7B and Supplementary Figure S13); and FTYp-induced association with Rab7 (Figure 7C and Supplementary Figure S14).

Discussion

The actions of two agonists, S1P and FTYp, and an activator of PKC, PMA, on the function and subcellular localization of S1P₁ receptors were studied. Our data indicated that the actions of the two agonists differ, i.e. FTYp was

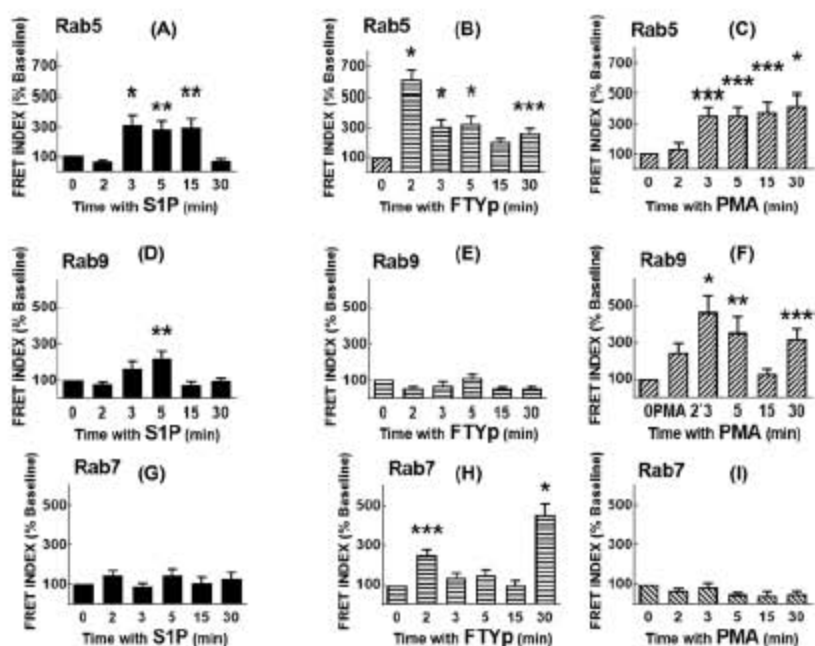


Figure 4. Effects of S1P, FTYp, and PMA on S1P₁ receptor-Rab protein interaction

HEK 293 cells were co-transfected with plasmids for transient expression of mCherry-tagged S1P₁ receptors and eGFP-tagged Rab proteins as described under 'Experimental procedures' section, and FRET was used as an index of protein-protein interaction. Cells were challenged for the times indicated with 1 μM S1P ((A) [Rab5], (D) [Rab9], and (G) [Rab7]), 10 μM FTYp ((B) [Rab5], (E) [Rab9], and (H) [Rab7]), or 1 μM PMA ((C) [Rab5], (F) [Rab9], and (I) [Rab7]). FRET values were determined and normalized to those observed in the absence of stimulus (Time 0, Baseline; 100%). Plotted are the means with vertical lines indicating the S.E.M of 24-30 samples resulting from four or five independent experiments, in which six different images were obtained in each of these. **P* <0.005 compared with Baseline, ***P* <0.01 compared with Baseline, ****P* <0.05 compared with Baseline.

less potent than S1P in increasing intracellular calcium and the S1P₁ receptor phosphorylation induced by the synthetic agonist was also less intense than that induced by S1P. In contrast, agonist-induced receptor internalization was more marked with FTYp than with S1P, particularly at 30 min. Consistent with previous data, PMA blocked the agonist-induced calcium response and induced receptor phosphorylation [27,46]. It has been elegantly shown by Kirchhausen et al. that S1P- and FTYp-mediated internalization of S1P₁ receptors involves the clathrin-mediated pathway [29]. Previously, Oo et al. [26] observed that FTYp was much more potent and effective than S1P in inducing receptor degradation. This is consistent with the idea that FTYp is an agonist but that it behaves as a functional antagonist, by virtue of its ability to induce receptor desensitization, internalization, and degradation/down-regulation [9,10,28]; in fact, FTYp could be considered as an agent with a clear bias toward receptor internalization/degradation (i. e., a biased agonist) [56].

A major interest of our work was to study comparatively the roles of Rab proteins in receptor internalization. As indicated before, Rab proteins are a large family of proteins, constituted by more than 60 members with different functions in vesicular traffic [30-32]; our work focussed on receptor internalization, and receptor interaction with only three of them was studied, i.e., Rab5, Rab9, and Rab7. Rab5 localizes to the plasma membrane and early endosomes [32,33], whereas Rab9 is involved in cargo transport amongst early endosomes, late endosomes, and the trans-Golgi network [32,34] and Rab7 that regulates vesicular cargo from late endosomes to lysosomes [32,35] and the proteasome [36]. In a previous work from our laboratory, we observed that agonist- (i.e. noradrenaline) and PMA-induced

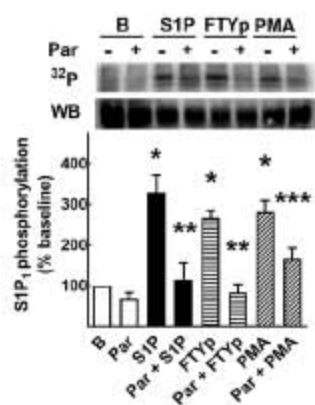


Figure 5. Effect of paroxetine on S1P-, FTYp-, and PMA-induced S1P₁ receptor phosphorylation

Cells expressing mCherry-tagged S1P₁ receptors were incubated as indicated under ‘Experimental procedures’ section to study receptor phosphorylation. Cells were preincubated in the absence (–) or presence of 100 μM paroxetine (+, Par) and then challenged for 15 min with 1 μM S1P, 10 μM FTYp, or 1 μM PMA. Plotted are the means with vertical lines indicating the S.E.M of six independent experiments, using different cell cultures. **P* < 0.001 compared with Baseline (B); ***P* < 0.001 compared with absence of paroxetine; ****P* < 0.05 compared with absence of paroxetine. A representative autoradiograph (³²P) and a Western blot are presented above the histogram.

α_{1B}-adrenoceptor internalization involved different Rab proteins [41,42]. Both stimuli were capable of inducing receptor phosphorylation, but noradrenaline-activated α_{1B}-adrenoceptors mainly interacted with proteins present in early endosomes, such as early endosomes antigen 1, Rab5, Rab4, and Rab11 but not with late endosome markers, such as Rab 9 and Rab 7 [41,42]. In contrast, activation of a non-adrenergic receptor (such as S1P receptors) or direct activation of PKC (heterologous desensitization in both cases) induced a relatively small and brief adrenoceptor–Rab5 interaction, a more pronounced and sustained one with Rab9, and some interaction with Rab7 [41,42]. Our present results with the S1P₁ receptors showed some similarities, but also some differences, with the pattern observed for the α_{1B}-adrenoceptors, and indicate that the findings cannot be generalized to different GPCRs.

In the present work, the patterns of S1P₁ receptor–Rab protein interaction, induced by the natural agonist, S1P (homologous desensitization) and PMA (heterologous desensitization) demonstrated some similarities. Both S1P and PMA, trigger receptor interaction with Rab5 (a marker of early endosomes) and even PMA action was more sustained. None of these stimuli induced any increase in S1P₁ receptor–Rab7 interaction, as reflected by FRET. Similar to what was observed with the α_{1B}-adrenoceptors [41,42], activation of PKC by PMA induced a stronger and more sustained interaction of Rab9 with the S1P₁ receptor. A possible interpretation of these data is that the natural agonist, S1P, promotes S1P₁ receptor–Rab5 interaction, triggering rapid endocytosis, and recycling through early endosomes. PMA also appears to induce this, but also promoted receptor interaction with Rab9, suggesting interaction with late endosomes and a slower recycling.

FTYp-induced S1P₁ receptor–Rab protein interactions differed from those observed with the other agents. This is interesting for several reasons. Amongst them, the data underscore the ability of the cell machinery to ‘sense’ and process when a receptor is activated by different agonists or modulated by a protein kinase. Additionally, the therapeutic value of FTYp is due to its ability to induce S1P₁ internalization and degradation [25–28]. Under the action of the synthetic agonist, the S1P₁ receptor exhibited a very strong and rapid interaction with Rab5, which decreased after 2 min but that remained above baseline up to 30 min. FTYp did not induce any increase in S1P₁ receptor–Rab9 interaction but, in contrast with the other agents, markedly increased receptor–Rab7 FRET at 30 min of incubation. Rab7 participates in the intracellular trafficking of vesicular cargo from late endosomes to lysosomes and to the proteasome [32,35,36]. Our data are in agreement with those of Oo et al. [25,26] who reported that FTYp-induced

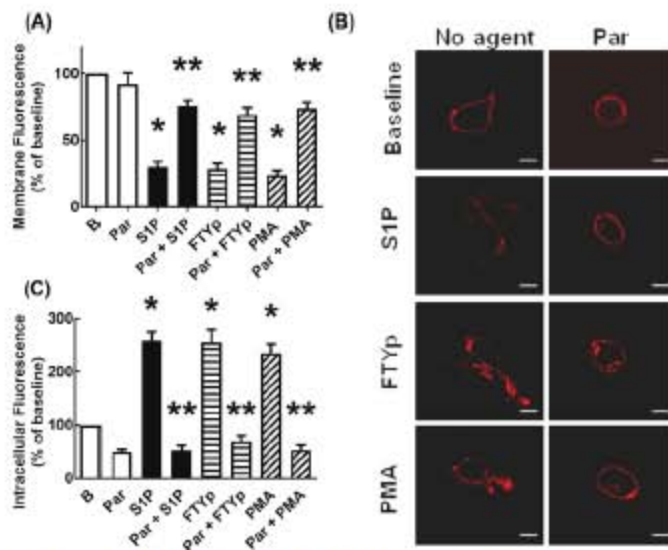


Figure 6. Effect of paroxetine on S1P-, FTYp-, and PMA-induced S1P₁ receptor internalization

Cells expressing mCherry-tagged S1P₁ receptors were preincubated for 30 min with 100 μ M paroxetine and then challenged for 5 min with 1 μ M S1P, 10 μ M FTYp, or 1 μ M PMA. Membrane (A) or intracellular (B) fluorescence values were determined and normalized to those observed in the absence of stimulus (B, Baseline; 100%). Plotted are the means with vertical lines indicating the S.E.M. of 30 samples resulting from five independent experiments, in which six different images were obtained from each of these. * $P < 0.001$ compared with Baseline (B); ** $P < 0.001$ compared with absence of paroxetine. Representative images are presented in (C). Bars 10 μ m.

phosphorylation, ubiquitination, internalization, and proteasomal degradation of S1P₁ receptors. It should be mentioned that some differences exist between the data of Oo et al. [25,26] and ours, i.e. those authors observed some receptor degradation at 30 min, but we were unable to detect receptor degradation at this time (see Western blots). In their experiments, receptor degradation was much more clearly observed at much longer incubation times (4 and 8 h) [25,26]. Such a difference could be attributed to several factors including different receptor constructions (eGFP-tagged compared with mCherry-tagged receptors) or levels of receptor expression, to mention a few; in fact these authors observed a more dramatic effect in vascular endothelial cells than in HEK 293 [26]. In our experiments we employed a higher concentration of FTYp (10 μ M as compared with 100 nM [25,26]) on the basis of data obtained in studies on intracellular calcium concentration and receptor phosphorylation. It should be noted that Rab7 was previously associated with internalization and degradation of other GPCRs such as the κ -opioid receptors [57], platelet-activating factor receptors [58], and angiotensin II AT₁ receptors [59,60], amongst others. Similarly, Rab7 participates in the degradation of receptor tyrosine kinases, such as the epidermal growth factor receptors [61,62] and the vascular endothelial growth factor receptor 2 [63,64].

It has been observed that receptor tyrosine kinases and G protein-coupled receptors can form complexes and signal jointly [5,65–69]. A complex between the platelet-derived growth factor β receptor and the S1P₁ has been observed to have functional relevance particularly in modulating the mitogen-activated protein kinase pathway [66,67]. Interestingly, an S1P₁ inverse agonist (SB649146) is capable of reducing endocytosis of the platelet-derived growth factor β receptor–S1P₁ receptor complexes and the stimulation of p42/p44 MAPK and cell migration in response to the peptide growth factor [67]. It has also been observed that FTY720 inhibits platelet-derived growth factor β receptor action by decreasing the plasma membrane level of S1P₁ [68,69].

As indicated, the antidepressant, paroxetine, directly binds and inhibits GRK2 [37,38]. In our experiments, this agent was able to block the S1P₁ receptor phosphorylation induced by S1P, FTYp and also to markedly reduce that

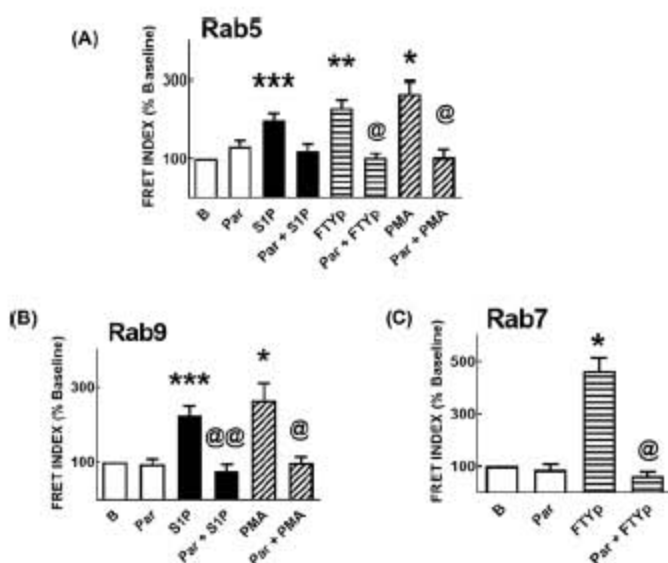


Figure 7. Effect of paroxetine on S1P-, FTYp-, and PMA-induced S1P₁ receptor-Rab protein interaction

HEK 293 cells were co-transfected with plasmids for transient expression of mCherry-tagged S1P₁ receptors and eGFP-tagged Rab proteins as described under 'Experimental procedures' section and FRET was used as an index of protein-protein interaction. Cells were preincubated for 30 min in the absence of any agent or presence of 100 μ M paroxetine and then challenged with 1 μ M S1P, 10 μ M FTYp, or 1 μ M PMA, as indicated, and for the following times: (a) 3 min, (A) [Rab5]; (b) 5 min, (B) [Rab9]; and (c) 30 min, (C) [Rab7]. FRET values were determined and normalized to those observed in the absence of stimulus (Time 0, Baseline; 100%). Plotted are the means with vertical lines indicating the S.E.M. of 24–30 samples resulting from four or five independent experiments, in which six different images were obtained in each of them. * P < 0.005 compared with Baseline, ** P < 0.01 compared with Baseline, *** P < 0.05 compared with Baseline; @ P < 0.001 compared with absence of paroxetine; @@ P < 0.05 compared with absence of paroxetine.

induced by PMA. Paroxetine also blocked receptor internalization and its interaction with Rab proteins. This is consistent with a major role of GRK2 in all these actions. We previously showed a similar action of the antidepressant on α_{1D} -adrenoceptors, i.e. paroxetine blocked agonist (noradrenaline)-induced receptor phosphorylation and internalization and also clearly reduced the actions of PMA [55]. The actions of paroxetine were mimicked by the expression of a GRK2 dominant-negative mutant [55]. It is known that PKC can phosphorylate and activate GRK2 [70,71]. This suggests that cross-talk between these protein kinases might participate in the observed effects and might explain the action of paroxetine on PMA-mediated effects.

Although receptor phosphorylation appears to be a very early event, it is becoming clear that the sole changes in the bulk and charge that phosphorylation causes do not fully explain the changes in subcellular location or their functional consequences. The specific sites that are modified appear to be crucial. There is evidence indicating that the type of cells in which the receptors are expressed (possibly reflecting the repertoire of proteins available in a given cell or tissue) and the stimuli (conformational changes, protein interactions, or modifications in response to different ligands) to which cells are subjected are crucial for defining the phosphorylation pattern and its consequences; this has been denominated the 'phosphorylation bar-code hypothesis' [72–78].

S1P₁ receptor phosphorylation has been studied by different groups and some specific sites have already been detected, as have the protein kinases involved [27,79]. Thus, it has been observed that Akt/PKB associates with and phosphorylates residue T236 at the third intracellular domain of the S1P₁ receptor [79]; this residue does not appear to participate in Gi-mediated signaling, but it is indispensable for Rac activation, cortical actin assembly, chemotaxis, and angiogenesis [79]. In an elegant study, Watterson et al. [27] showed that PMA and S1P were able to induce

SIP₁ receptor phosphorylation through different mechanisms, involving different protein kinases and different receptor target sites. In these experiments, SIP-induced receptor phosphorylation was essentially insensitive to PKC inhibition and GRK2 was able to phosphorylate SIP₁ receptors *in vitro* [27]. In addition, these authors observed that truncation of the last 32 amino acids of the carboxyl terminus abolished PMA- and SIP-induced phosphorylation, but that deletion of only the last 12 amino acids diminished SIP-mediated receptor phosphorylation without affecting the action of PMA [27]. The role of GRK2 in SIP₁ receptor desensitization was also demonstrated by Arnon et al. [28], who additionally showed that such action of the protein kinase is required in lymphocytes to overcome their attraction to the high concentrations of SIP present in blood. It has also been shown that cells expressing a SIP₁ receptor mutant, in which the serines in a serine-rich domain (351–359; SRSKSDNNS) were changed into alanines, are resistant to phosphorylation and FTYp-induced degradation [26]. Mice expressing this phosphorylation resistant receptor developed a more severe experimental encephalomyelitis than control mice [26]. Phosphorylation of SIP₁ receptor residues S336, S351, and S353, was detected by MS in HEK 293 cells overexpressing this receptor, and such phosphorylation increased after incubation with FTYp [25]. p-SIP₁ receptor residue S353 has been detected in autopsy brain samples obtained from patients with multiple sclerosis, which suggested a possible role of this residue in the pathogenesis of this disease [80]. It has also been reported that tyrosine phosphorylation of SIP₁ receptors (Y143) takes place in cells in response to SIP and that such phosphorylation regulates receptor's membrane expression [81]; similarly, a desensitization motif (T371, S374 and S375), whose phosphorylation controls lymphocyte's attraction to SIP has been reported [28].

Despite this wealth of information, it is currently unknown the manner in which the intracellular machinery differentiates the action of FTYp from that of the natural agonist, leading SIP₁ receptors to degradation (down-regulation) rendering the cells unresponsive to this bioactive lipid. It is noteworthy that phosphorylation is not the sole post-translational modification that has been detected in SIP₁ receptors; other covalent modifications include the following: sulphation of its extracellular amino-terminal tyrosines [82], and palmitoylation of three cysteines [83] and ubiquitination of four lysine residues [25,26], both at the carboxyl terminus. Modification of these lysines (K to R substitutions) also blocked receptor degradation, but not internalization, and it has been shown that phosphorylation precedes ubiquitination [25]. The differential receptor–Rab protein interaction adds information to this subject and might help to elucidate this question. Finally, our data suggest that caution should be exercised when patients are treated with Fingolimod (or related agents) and paroxetine.

Acknowledgements

We thank PsicoPharma SA de CV (México) for the generous gift of paroxetine and Dr Edith Zárate, Head of Academic Relations and Collaborations of this industry, for her kind help. The advice and technical support of Dr Rocío Alcántara-Hernández, Dr Héctor Malagón, Dr Claudia Rivera, Dr Fernando García, Dr Claudia González-Espinosa, Alfredo Ibarra, Juan Barbosa, and Aury Hernández is gratefully acknowledged. The authors also thank Mrs. Margaret Brunner, for editorial/style corrections.

Competing interests

The authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript.

Funding

This work was partially supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) [grant numbers 263156, FDC-882]; the Dirección General de Personal Académico-UNAM (PAPIIT) [grant number IN200915]; J.C.M.-M. is a Doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas of Universidad Nacional Autónoma de México. CONACYT provided a Doctoral Fellowship [grant number CVU: 663139 (to J.C.M.-M.)].

Author contribution

Conceived and designed the experiments: J.C.M.-M., G.R.-C., and J.A.G.-S. Performed the experiments: J.C.M.-M. and M.T.R.-A. Analyzed the data: J.C.M.-M., M.T.R.-A., and J.A.G.-S. Wrote the paper: J.C.M.-M., G.R.-C., and J.A.G.-S. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Abbreviations

DeRed, *Discosoma* sp. red fluorescent protein; eGFP, enhanced GFP; FTY720, Fingolimod; FTYp, FTY720-phosphate; GRK, G protein-coupled receptor kinase; SIP, sphingosine 1-phosphate.

References

- 1 Saba, J.D. (2004) Lysophospholipids in development: Miles apart and edging. *J. Cell. Biochem.* **92**, 967–992, <https://doi.org/10.1002/jcb.20128>
- 2 Ishii, M. and Kikuta, J. (2013) Sphingosine-1-phosphate signaling controlling osteoclasts and bone homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 223–227, <https://doi.org/10.1016/j.bbap.2012.06.002>
- 3 Takawa, Y., Okamoto, Y., Yoshioka, K. and Takawa, N. (2008) Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system. *Biochim. Biophys. Acta* **1781**, 483–488, <https://doi.org/10.1016/j.bbap.2008.04.003>
- 4 Rivera, J., Proia, R.L. and Oliveira, A. (2008) The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 753–763, <https://doi.org/10.1038/nri2400>
- 5 Pyne, N.J. and Pyne, S. (2010) Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **10**, 489–503, <https://doi.org/10.1038/nrc2975>
- 6 Graler, M.H. (2010) Targeting sphingosine 1-phosphate (S1P) levels and S1P receptor functions for therapeutic immune interventions. *Cell. Physiol. Biochem.* **26**, 79–86, <https://doi.org/10.1159/000315108>
- 7 Takawa, Y., Ikeda, H., Okamoto, Y., Takawa, N. and Yoshioka, K. (2013) Sphingosine-1-phosphate as a mediator involved in development of fibrotic diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 185–192, <https://doi.org/10.1016/j.bbap.2012.06.008>
- 8 Noguchi, K. and Chun, J. (2011) Roles for lysophospholipid S1P receptors in multiple sclerosis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **46**, 2–10, <https://doi.org/10.3109/10409238.2010.522975>
- 9 Brinkmann, V., Billich, A., Baumrucker, T., Heining, P., Schmouder, R., Francis, G. et al. (2010) Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 883–897, <https://doi.org/10.1038/nrd3248>
- 10 Choi, J.W., Gardell, S.E., Heit, D.R., Rivera, R., Lee, C.W., Noguchi, K. et al. (2011) FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 751–756, <https://doi.org/10.1073/pnas.1014154108>
- 11 Alvarez, S.E., Milsten, S. and Spiegel, S. (2007) Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends Endocrinol. Metab.* **18**, 300–307, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.07.005>
- 12 Choi, J.W., Lee, C.W. and Chun, J. (2008) Biological roles of lysophospholipid receptors revealed by genetic null mice: an update. *Biochim. Biophys. Acta* **1784**, 531–539, <https://doi.org/10.1016/j.bbap.2008.03.004>
- 13 Chun, J., Hla, T., Lynch, K.R., Spiegel, S. and Moolenaar, W.H. (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* **62**, 579–587, <https://doi.org/10.1124/pr.110.003111>
- 14 Kihara, Y., Macejko, M., Spiegel, S. and Chun, J. (2014) Lysophospholipid receptor nomenclature review. *IJPHAR Review B. Br. J. Pharmacol.* **174**, 3675–3694, <https://doi.org/10.1111/bjph.12678>
- 15 Spiegel, S. and Milsten, S. (2002) Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J. Biol. Chem.* **277**, 25851–25854, <https://doi.org/10.1074/jbc.R200007200>
- 16 Xiang, S.Y., Dasaban, S.S. and Brown, J.H. (2013) Lysophospholipid receptor activation of RhoA and lipid signaling pathways. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 213–222, <https://doi.org/10.1016/j.bbap.2012.09.004>
- 17 Chun, J., Hla, T., Moolenaar, W.H., Spiegel, S., Yung, Y.C. and Mpanhanga, C.P. (2018) IJPHAR/BPS guide to pharmacology. *IJPHAR*, <https://www.ijphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=36>
- 18 Lee, M.J., Van Brocklyn, J.R., Thangada, S., Liu, C.H., Hand, A.R., Merzolev, R. et al. (1998) Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* **279**, 1552–1555, <https://doi.org/10.1126/science.279.5356.1552>
- 19 Hanson, M.A., Roth, C.B., Jo, E., Griffith, M.T., Scott, F.L., Reinhart, G. et al. (2012) Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science* **335**, 851–855, <https://doi.org/10.1126/science.1215904>
- 20 Schwab, S.R. and Cyster, J.G. (2007) Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat. Immunol.* **8**, 1295–1301, <https://doi.org/10.1038/nri1545>
- 21 Tarrason, G., Audi, M., Mustafa, S., Dolgachev, V., Domenech, M.T., Prats, N. et al. (2011) The sphingosine-1-phosphate receptor-1 antagonist, W146, causes early and short-lasting peripheral blood lymphopenia in mice. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 1773–1779, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.07.004>
- 22 Dyckman, A.J. (2017) Modulators of sphingosine-1-phosphate pathway biology: recent advances of sphingosine-1-phosphate Receptor 1 (S1P1) agonists and future perspectives. *J. Med. Chem.* **60**, 5267–5289, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01575>
- 23 Im, D.S. (2010) Pharmacological tools for lysophospholipid GPCR: development of agonists and antagonists for LPA and S1P receptors. *Acta Pharmacol. Sin.* **31**, 1213–1222, <https://doi.org/10.1038/aps.2010.135>
- 24 Jackson, S.J., Giovannoni, G. and Baker, D. (2011) Fingolimod modulates microglial activation to augment markers of remyelination. *J. Neuroinflamm.* **8**, 76, <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-76>
- 25 Oo, M.L., Chang, S.H., Thangada, S., Wu, M.T., Rezaei, K., Blaho, V. et al. (2011) Engagement of S1P-degradative mechanisms leads to vascular leak in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 2290–2300, <https://doi.org/10.1172/JCI45403>
- 26 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 ubiquitination and proteasomal degradation of the receptor. *J. Biol. Chem.* **282**, 9082–9089, <https://doi.org/10.1074/jbc.M610318200>
- 27 Watterson, K.R., Johnston, E., Chalmers, C., Pronin, A., Cook, S.J., Benovic, J.L. et al. (2002) Dual regulation of EDG1/S1P(1) receptor phosphorylation and internalization by protein kinase C and G-protein-coupled receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.* **277**, 5767–5777, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110647200>
- 28 Amon, T.I., Xu, Y., Lu, C., Pham, T., An, J., Coughlin, S. et al. (2011) GPCR-dependent S1PR1 desensitization is required for lymphocytes to overcome their attraction to blood. *Science* **333**, 1898–1903, <https://doi.org/10.1126/science.1208248>

- 29 Reeves, P.M., Kang, Y.L. and Kirchhausen, T. (2016) Endocytosis of ligand-activated sphingosine 1-phosphate receptor 1 mediated by the clathrin-pathway. *Traffic* **17**, 40–52. <https://doi.org/10.1111/tra.12343>
- 30 Zerial, M. and McBride, H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107–117. <https://doi.org/10.1038/35052055>
- 31 Stenmark, H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 513–525. <https://doi.org/10.1038/nrm2728>
- 32 Schwartz, S.L., Cao, C., Pyllypenko, O., Raik, A. and Wandinger-Ness, A. (2007) Rab GTPases at a glance. *J. Cell Sci.* **120**, 3905–3910. <https://doi.org/10.1242/jcs.015909>
- 33 Zhu, G., Zhai, P., Liu, J., Terzyan, S., Li, G. and Zhang, X.C. (2004) Structural basis of Rab5-Rabaptin5 interaction in endocytosis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 975–983. <https://doi.org/10.1038/nmsb832>
- 34 Ng, E.L., Gan, B.Q., Ng, F. and Tang, B.L. (2012) Rab GTPases regulating receptor trafficking at the late endosome-lysosome membranes. *Cell Biochem. Funct.* **30**, 515–523. <https://doi.org/10.1002/cbf.2827>
- 35 Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J. and van Deurs, B. (2000) Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol. Biol. Cell.* **11**, 467–480. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.2.467>
- 36 Dong, J., Chen, W., Wolford, A. and Wandinger-Ness, A. (2004) The proteasome alpha-subunit XAPC7 interacts specifically with Rab7 and late endosomes. *J. Biol. Chem.* **279**, 21334–21342. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401022000>
- 37 Homan, K.T., Wu, E., Wilson, M.W., Singh, P., Larsen, S.D. and Tesmer, J.J. (2014) Structural and functional analysis of G protein-coupled receptor kinase inhibition by paroxetine and a rationally designed analog. *Mol. Pharmacol.* **85**, 237–248. <https://doi.org/10.1124/mol.113.089631>
- 38 Thal, D.M., Homan, K.T., Chen, J., Wu, E.K., Hinkle, P.M., Huang, Z.M. et al. (2012) Paroxetine is a direct inhibitor of g protein-coupled receptor kinase 2 and increases myocardial contractility. *ACS Chem. Biol.* **7**, 1830–1838. <https://doi.org/10.1021/cb3003013>
- 39 Hunyady, L., Baulok, A.J., Gabonik, Z., Olivares-Reyes, J.A., Bor, M., Szaszak, M. et al. (2002) Differential PI 3-kinase dependence of early and late phases of recycling of the internalized AT1 angiotensin receptor. *J. Cell Biol.* **157**, 1211–1222. <https://doi.org/10.1083/jcb.200111013>
- 40 Jakobs, S., Subramaniam, V., Schone, A., Jovin, T.M. and Hell, S.W. (2000) EGFP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy. *FEBS Lett.* **479**, 131–135. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01890-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01890-2)
- 41 Alfonso-Méndez, M.A., Hernández-Espinoza, D.A., Carmona-Rosas, G., Romero-Ávila, M.T., Reyes-Cruz, G. and García-Sáinz, J.A. (2017) Protein kinase C activation promotes alpha1B-adrenoceptor internalization and late endosome trafficking through Rab9 interaction. Role in heterologous desensitization. *Mol. Pharmacol.* **91**, 296–306
- 42 Castillo-Badillo, J.A., Sánchez-Reyes, O.B., Alfonso-Méndez, M.A., Romero-Ávila, M.T., Reyes-Cruz, G. and García-Sáinz, J.A. (2015) alpha1B-adrenergic receptors differentially associate with Rab proteins during homologous and heterologous desensitization. *PLoS ONE* **10**, e0121165. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121165>
- 43 Meizoso-Huesca, A., Villegas-Coronfort, S., Romero-Ávila, M.T. and García-Sáinz, J.A. (2018) Free fatty acid receptor 4 agonists induce lysophosphatidic acid receptor 1 (LPA1) desensitization independent of LPA1 internalization and heterodimerization. *FEBS Lett.* **592**, 2612–2623. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13179>
- 44 Riss, C.Y. and Uludag, H. (2012) A simple and rapid nonviral approach to efficiently transfect primary tissue-derived cells using polyethylenimine. *Nat. Protoc.* **7**, 935–945. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.038>
- 45 Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440–3450
- 46 Morquecho-León, M.A., Bazúa-Valentí, S., Romero-Ávila, M.T. and García-Sáinz, J.A. (2014) Isoforms of protein kinase C involved in phorbol ester-induced sphingosine 1-phosphate receptor 1 phosphorylation and desensitization. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 327–334. <https://doi.org/10.1016/j.bbmr.2013.11.002>
- 47 Collins, T.J. (2007) ImageJ for microscopy. *BioTechniques* **43**, 25–30. <https://doi.org/10.2144/000112517>
- 48 Hartig, S.M. (2013) Basic image analysis and manipulation in ImageJ. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **Chapter 14**, 15.11–15.12
- 49 Rasband, W.S. (1997–2004) National Institutes of Health. ImageJ, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- 50 Hachet-Haas, M., Converset, N., Marchal, O., Matthes, H., Gioria, S., Galzi, J.L. 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. <https://doi.org/10.1002/jemt.20376>
- 51 ter Braak, M., Danneberg, K., Lichte, K., Liphardt, K., Klistakis, N.T., Pison, S.M. et al. (2009) Gαq-mediated plasma membrane translocation of sphingosine kinase-1 and cross-activation of S1P receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**, 367–370. <https://doi.org/10.1016/j.bbrelp.2009.01.019>
- 52 Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Kuchar, I., Lipinski, M., Nemany, R., Flumenapp, U. et al. (2001) Stimulation of intracellular sphingosine-1-phosphate production by G-protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **414**, 145–154. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)00789-0](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)00789-0)
- 53 Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M. et al. (1991) The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **266**, 15771–15781
- 54 Gao, S., Carter, R.L., Grisanti, L.A., Koch, W.J. and Tilley, D.G. (2017) Impact of paroxetine on proximal beta-adrenergic receptor signaling. *Cell. Signal.* **38**, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.07.006>
- 55 Alfonso-Méndez, M.A., Carmona-Rosas, G., Hernández-Espinoza, D.A., Romero-Ávila, M.T. and García-Sáinz, J.A. (2018) Different phosphorylation patterns regulate alpha1D-adrenoceptor signaling and desensitization. *Biochim. Biophys. Acta* **1865**, 842–854. <https://doi.org/10.1016/j.bbmr.2018.03.006>
- 56 Kenakin, T. (2015) The effective application of biased signaling to new drug discovery. *Mol. Pharmacol.* **88**, 1055–1061. <https://doi.org/10.1124/mol.115.099770>
- 57 Li, J.G., Benovic, J.L. and Liu-Chen, L.Y. (2000) Mechanisms of agonist-induced down-regulation of the human kappa-opioid receptor: internalization is required for down-regulation. *Mol. Pharmacol.* **58**, 795–801. <https://doi.org/10.1124/mol.58.4.795>

- 58 Dupre, D.J., Chen, Z., Le Goull, C., Theriault, C., Parent, J.L., Rola-Pleszczynski, M. et al. (2003) Trafficking, ubiquitination, and down-regulation of the human platelet-activating factor receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 48228–48235, <https://doi.org/10.1074/jbc.M304082200>
- 59 Li, H., Yu, P., Sun, Y., Felder, R.A., Periasamy, A. and Jose, P.A. (2010) Actin cytoskeleton-dependent Rab GTPase-regulated angiotensin type I receptor lysosomal degradation studied by fluorescence lifetime imaging microscopy. *J. Biomed. Opt.* **15**, 056003, <https://doi.org/10.1117/1.3484751>
- 60 Dale, L.B., Seachrist, J.L., Babwah, A.V. and Ferguson, S.S. (2004) Regulation of angiotensin II type 1A receptor intracellular retention, degradation, and recycling by Rab5, Rab7, and Rab11 GTPases. *J. Biol. Chem.* **279**, 13110–13118, <https://doi.org/10.1074/jbc.M313333200>
- 61 Ceresa, B.P. and Bahr, S.J. (2006) rab7 activity affects epidermal growth factor:epidermal growth factor receptor degradation by regulating endocytic trafficking from the late endosome. *J. Biol. Chem.* **281**, 1099–1106, <https://doi.org/10.1074/jbc.M504175200>
- 62 Bakker, J., Spits, M., Neefjes, J. and Berlin, I. (2017) The EGFR odyssey – from activation to destruction in space and time. *J. Cell Sci.* **130**, 4087–4096, <https://doi.org/10.1242/jcs.209197>
- 63 Balmer-Hofer, K., Andersson, A.E., Ratcliffe, L.E. and Berger, P. (2011) Neupilin-1 promotes VEGFR-2 trafficking through Rab11 vesicles thereby specifying signal output. *Blood* **118**, 816–826, <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-328773>
- 64 Jopling, H.M., Odell, A.F., Hooper, N.M., Zachary, I.C., Walker, J.H. and Ponnambalam, S. (2009) Rab GTPase regulation of VEGFR2 trafficking and signaling in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1119–1124, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.186239>
- 65 Pyne, N.J., Waters, C.M., Long, J.S., Moughal, N.A., Tiggi, G. and Pyne, S. (2007) Receptor tyrosine kinase-G protein coupled receptor complex signaling in mammalian cells. *Adv. Enzyme Regul.* **47**, 271–280, <https://doi.org/10.1016/j.adveng.2006.12.011>
- 66 Waters, C., Sambhi, B., Kong, K.C., Thompson, D., Pison, S.M., Pyne, S. et al. (2003) Sphingosine 1-phosphate and platelet-derived growth factor (PDGF) act via PDGF beta receptor-sphingosine 1-phosphate receptor complexes in airway smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 6282–6290, <https://doi.org/10.1074/jbc.M208560200>
- 67 Waters, C.M., Long, J., Gornikova, I., Fujiwara, Y., Connell, M., Belmonte, K.E. et al. (2006) Cell migration activated by platelet-derived growth factor receptor is blocked by an inverse agonist of the sphingosine 1-phosphate receptor-1. *FASEB J.* **20**, 509–511, <https://doi.org/10.1096/fj.05-4810fj>
- 68 Brunetti, A.M., Tibaldi, E., Carraro, A., Gringeri, E., D'Amico, Jr, F., Toninello, A. et al. (2008) Cross-talk between PDGF and S1P signaling elucidates the inhibitory effect and potential antifibrotic action of the immunomodulator FY720 in activated HSC-cultures. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 347–359, <https://doi.org/10.1016/j.bbamec.2007.11.008>
- 69 Mousseau, Y., Mollard, S., Richard, L., Nizou, A., Faucher-Durand, K., Cook-Moreau, J. et al. (2012) Fingolimod inhibits PDGF-B-induced migration of vascular smooth muscle cell by down-regulating the S1PR1/S1PR3 pathway. *Biochimie* **94**, 2523–2531, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.07.002>
- 70 Kari, C., Dammeier, S., Winstel, R., Brockmann, J., Mischak, H. and Lohse, M.J. (2001) Phosphorylation of GPR2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin. *J. Biol. Chem.* **276**, 1911–1915, <https://doi.org/10.1074/jbc.M008773200>
- 71 Winstel, R., Freund, S., Krauel, C., Hoppe, E. and Lohse, M.J. (1996) Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 2105–2109, <https://doi.org/10.1073/pnas.93.5.2105>
- 72 Tobin, A.B. (2008) G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom. *Br. J. Pharmacol.* **153**, S167–S176, <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707662>
- 73 Tobin, A.B., Butcher, A.J. and Kong, K.C. (2008) Location, location, location... site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 413–420, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.05.006>
- 74 Alvarez-Curto, E., Inoue, A., Jenkins, L., Raihan, S.Z., Prihantoko, R., Tobin, A.B. et al. (2016) Targeted elimination of G proteins and arrestins defines their specific contributions to both intensity and duration of G protein-coupled receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **291**, 27147–27159, <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.754887>
- 75 Butcher, A.J., Hudson, B.D., Shimpukade, B., Alvarez-Curto, E., Prihantoko, R., Ullen, T. et al. (2014) Concomitant action of structural elements and receptor phosphorylation determine arrestin-3 interaction with the free fatty acid receptor FFAM. *J. Biol. Chem.* **289**, 18451–18465, <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.568816>
- 76 Watterson, K.R., Hansen, S.V.F., Hudson, B.D., Alvarez-Curto, E., Raihan, S.Z., Azevedo, C.M.G. et al. (2017) Probe-dependent negative allosteric modulators of the long-chain free fatty acid receptor FFAM. *Mol. Pharmacol.* **91**, 630–641, <https://doi.org/10.1124/mol.116.107821>
- 77 Akinaga, J., Lima, V., Kiguti, L.R., Hebel-Barbosa, F., Alcántara-Hernández, R., García-Sáinz, J.A. et al. (2013) Differential phosphorylation, desensitization, and internalization of alpha1A-adrenoceptors activated by norepinephrine and oxymetazoline. *Mol. Pharmacol.* **83**, 870–881, <https://doi.org/10.1124/mol.112.082313>
- 78 Alcántara-Hernández, R., Hernández-Méndez, A., Romero-Ávila, M.T., Alonzo-Méndez, M.A., Pupo, A.S. and García-Sáinz, J.A. (2017) Noradrenaline, oxymetazoline and phorbol myristate acetate induce distinct functional actions and phosphorylation patterns of alpha1A-adrenergic receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1864**, 2378–2388, <https://doi.org/10.1016/j.bbamec.2017.09.002>
- 79 Lee, M.J., Thangada, S., Paik, J.H., Sapkota, G.P., Ancellin, N., Chae, S.S. et al. (2001) Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Mol. Cell* **8**, 693–704, [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00324-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00324-0)
- 80 Garra, C.S., Wu, L., Acharya, S., Arac, A., Blaho, V.A., Huang, Y. et al. (2013) Defective sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P) phosphorylation exacerbates T17-mediated autoimmune neuroinflammation. *Nat. Immunol.* **14**, 1166–1172, <https://doi.org/10.1038/ni.2730>
- 81 Chavez, A., Schmidt, T.T., Zarbeck, P., Rajput, C., Desai, B., Sukriti, S. et al. (2015) S1PR1 Tyr143 phosphorylation downregulates endothelial cell surface S1PR1 expression and responsiveness. *J. Cell Sci.* **128**, 878–887, <https://doi.org/10.1242/jcs.154476>
- 82 Fieger, C.B., Huang, M.C., Van Brocklyn, J.R. and Goetzl, E.J. (2005) Type 1 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor signaling of lymphocyte functions requires sulfation of its extracellular amino-terminal tyrosines. *FASEB J.* **19**, 1926–1928, <https://doi.org/10.1096/fj.05-4476fj>
- 83 Ono, Y., Ito, A., Ogata, R., Hiraga, Y., Igarashi, Y. and Kohara, A. (2009) Palmitoylation of the sphingosine 1-phosphate receptor S1P is involved in its signaling functions and internalization. *Genes Cells* **14**, 911–923, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2009.01319.x>

Anexo II

Colaboraciones

De los Santos Cocotle Gustavo, Martínez Morales Juan Carlos, Romero Ávila M. Teresa, Reyes Cruz Guadalupe & García Sáinz J. Adolfo. 2020. Effects of agonists and phorphol esters on α_{1a} -adrenergic receptor-Rab protein interactions. *Eur J Pharmacol.* 15: 885-893.



Full length article

Effects of agonists and phorbol esters on α_{1A} -adrenergic receptor-Rab protein interactionsGustavo de-los-Santos-Cocotle^a, Juan Carlos Martínez-Morales^a, M. Teresa Romero-Ávila^a, Guadalupe Reyes-Cruz^b, J. Adolfo García-Sáinz^{a,*}^a Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México^b Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional-CINVESTAV, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Cd. San Pedro Zacamaco, México City, México

ARTICLE INFO

Keywords:

 α_1 -Adrenergic receptors

Rab proteins

Rab5

Rab7

Rab9

ABSTRACT

In a cell line, stably expressing α_{1A} -adrenoceptors fused to the mCherry red fluorescent protein, noradrenaline, methoxamine, and oxymetazoline induced concentration-dependent increases in intracellular calcium. All of these agents increase α_{1A} -adrenoceptor phosphorylation and internalization. Transient co-expression of these receptors with Rab proteins tagged with the enhanced Green Fluorescent Protein was employed to estimate α_{1A} -adrenoceptor-Rab interaction using Förster Resonance Energy Transfer. Noradrenaline and methoxamine increased α_{1A} -adrenoceptor interaction with Rab5 and Rab7 but did not modify it with Rab9. Oxymetazoline induced adrenoceptor interaction with Rab5 and Rab9 and only an insignificant increase in Rab7 signal. Phorbol myristate acetate increased α_{1A} -adrenoceptor interaction with Rab5 and Rab9 but did not modify it with Rab7. The agonists and the active phorbol ester, all of which induce receptor phosphorylation and internalization, favor receptor interaction with Rab5, i.e., association with early endosomes. Cell stimulation with phorbol myristate acetate induced the α_{1A} -adrenoceptors to interact with the late endosomal marker, Rab9, suggesting that the receptors are directed to slow recycling endosomes once they have transited to the Trans-Golgi network to be retrieved to the plasma membrane. The agonists noradrenaline and methoxamine likely induce a faster recycling and might direct some of the adrenoceptors toward degradation and/or very slow recycling to the plasma membrane. Oxymetazoline produced a mixed pattern of interaction with the Rab proteins. These data indicate that α_{1A} -adrenoceptor agonists can trigger different vesicular traffic and receptor fates within the cells.

1. Introduction

α_1 -Adrenoceptors are a subgroup of the G protein-coupled receptor superfamily, which mediates many of the actions of adrenaline, and noradrenaline. They participate in the functional equilibrium, which we call health, and also the pathogenesis of many diseases (Akinaga et al., 2019; García-Sáinz et al., 1999, 2000). Three α_1 -adrenoceptor subtypes have been identified, and they are referred to as α_{1A} , α_{1B} , and α_{1D} subtypes (Hieble et al., 1995). These subtypes are expressed differentially in tissues and organs (Hieble et al., 1995), play distinct roles in physiology and pathophysiology (Akinaga et al., 2019; García-Sáinz et al., 1999, 2000), and have nonidentical regulations (Akinaga et al., 2019). Receptor phosphorylation appears to be an initial event in receptor desensitization and internalization (García-Sáinz et al., 2000). α_1 -Adrenoceptor phosphorylation sites differ among the subtypes, the

type of desensitization (homologous, i.e., agonist-mediated vs. heterologous, i.e., activation-independent) and even vary in response to different agonists (Alcántara-Hernández et al., 2017; Alfonso-Méndez et al., 2018; Carmona-Rosas et al., 2019; Hernández-Espínosa et al., 2019).

Phosphorylation of α_1 -adrenoceptors triggers recruitment of β -arrestins, which sterically block receptor-G protein interaction, initiates a signaling switch, and favors receptor internalization by promoting its interaction with the endocytic machinery: these include clathrin, the AP2 adaptor complex, dynamin and other molecular entities, such as the Rab proteins (Lefkowitz, 2004). Rab proteins are a large family of monomeric GTPases, with more than 60 members. These GTPases interact with the cytoplasmic face of vesicles, favoring docking, fusion, cargo exchange, and vesicle transport, and are considered critical elements in vesicular transport (Schwartz et al., 2007; Steinmark, 2009;

* Corresponding author. Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Ap. Postal 70-248, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 04510, México.
E-mail address: agarcia@ifc.unam.mx (J.A. García-Sáinz).

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173423>

Received 13 June 2020; Received in revised form 21 July 2020; Accepted 25 July 2020

Available online 1 August 2020

0014-2999/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

