



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias Bioquímicas

**REGULACIÓN DEL RECEPTOR FFA1 POR ÁCIDOS GRASOS Y POR
LA PROTEINA CINASA C**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CARLA SOSA ALVARADO

ASESOR:

JESÚS ADOLFO GARCÍA SÁINZ

Instituto de Fisiología Celular, UNAM,

Miembros del comité Tutor y entidad de adscripción

Dra. Marina Macías Silva, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dra. Rosario Muñoz Clares, Facultad de Química, UNAM.

MÉXICO, D.F. OCTUBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se realizó bajo la tutoría del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz en el Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, con financiamiento por parte de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM (IN200915) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (153278 y 177556).

El comité tutorial que asesoró la elaboración de esta tesis estuvo integrado por:

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz

Dra. Marina Macías Silva

Dra. Rosario A Muñoz Clares

El jurado de exámen de maestría estuvo integrado por:

Presidente: Dra. Victoria Chagoya de Sánchez

Vocal: Dr. Fernando López Casillas

Vocal: Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez

Vocal: Dra. Martha Robles Flores

Secretario: Dra. María Cristina Fernández Mejía

Carla Sosa Alvarado fue alumna del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y fue apoyada con una beca de posgrado del CONACyT (368105)

AGRADECIMIENTOS

Siempre estaré agradecida con el Dr. J. Adolfo García Sáinz por darme tanto. Por ser tutor y persona, por enseñarme que la naturaleza habla por sí misma, que el aprendizaje es continuo, por una nueva visión y perspectiva de la ciencia. Haber sido su alumna fue una de las mejores experiencias.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Marina Macías Silva y la Dra. Rosario Muñoz Clares por su compromiso constante y sus atinados comentarios que reconocían las debilidades y oportunidades del proyecto. Su apoyo representó una herramienta clave para dar dirección al trabajo y a mí.

A los miembros de mi jurado de tesis: Dra Victoria Chagoya de Sánchez, Dra. Martha Robles Flores, Dra Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez, Dra. Maria Crtistina Fernández Mejía y al Dr. Fernando Lopez Casillas por sus preguntas, observaciones y sugerencias que ayudaron a mejorar el escrito.

A mis maestros de laboratorio Aurelio Hernández y Omar B. Sánchez Reyes, por su muchísima paciencia. Fue su admiración por la ciencia y la docencia lo que los mantuvo motivados para enseñarme muchas lecciones valiosas. Ahora sé que el significado de la ciencia va mucho más allá de los números, lo que dice el libro y lo que hacen las pipetas, porque lo esencial es invisible para los ojos. Gracias por todo.

A Marco Alfonzo, Aldo Meisozo, Alejandro Guzman, Gabriel Carmona, Marco Morquecho, Sócrates Villegas, Juan Carlos Martinez y a David por sus consejos y por las bromas y risas que hacen más ligero el trabajo en el laboratorio.

A Tere y a Rocio por su atención y ayuda técnica durante el tiempo que estuve en el laboratorio.

A Guadalupe Jiménez y Fermín Domínguez por ser el pulmón del laboratorio que me permitía trabajar todos los días.

Algo me dejó la maestría sin haberlo contemplado fue un muy buen amigo. Israel Cotzomi, gracias a tu compañía en todo momento pude continuar en este trayecto y sobretodo encontrarle el gusto a esto en las buenas y en las malas. A Dianis, Jenni, Pau, Kevin, Vicente y a Alfred por ser buenos compañeros.

A Vero, Estefi y Marisol por siempre estar al pendiente de mí y por ser las mejores amigas. No pude haber escogido mejores personas para disfrutar todos los grandes y pequeños detalles.

A Sofía Moran, Sofía Gómez y a Berenice Palacios por ser mujeres fuertes, excelentes maestras y por eso un ejemplo a seguir. Son la viva evidencia de que la victoria ama la preparación.

A mi papá, a Cris y a Lil por su inmenso apoyo desde el inicio y por su presencia. A mi mami, por cuidarme, soportarme y por recibirme al final del día con un abrazo.

Por último a ella, que siempre fue mis pies cuando necesitaba firmeza, mis ojos cuando no veía claro, el motivo para seguir, el tiempo necesario para ser paciente y para reír. Por llegar más lejos que nadie. Por lo increíble que ha sido ser tú hermana, gracias Ceci.

Agradezco al programa de apoyo a los alumnos de posgrado (PAEP) por el apoyo otorgado para la asistencia al congreso de Sociedad Mexicana de Bioquímica, Guadalajara, México 2014.

Agradezco a las unidades del Instituto de Fisiología Celular, UNAM por sus servicios:

Unidad de Biología Molecular:

Dra. Laura Ongay Larios

Biol. Maria Guadalupe Codiz Huerta

Biol. Dolores Minerva Mora Cabrera

Unidad de Microscopia

Dr. Fernando García Hernández

Unidad de cómputo

Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo

Ing. Ivette Rosas Arciniega

Taller de mantenimiento

Ing. Aurey Galván Lobato

Ing. Manuel Ortíz Benavides

INDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
I. INTRODUCCIÓN	
I.1.Receptores Acoplados a Proteína G	3
I.2. Transactivación de los receptores acoplados a proteína G con los receptores de actividad tirosina cinasa	6
I.3. Regulación de la actividad de los receptores acoplados a proteína G	8
I.4 La familia de los receptores acoplados a proteína G para ácidos grasos	18
I.5 Generalidad del receptor FFA1	19
I.6 Funciones fisiológica del receptor FFA1	20
I.7 Ácidos grasos	21
I.8 Los ácidos grasos como ligandos del receptor FFA1	24
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
III. JUSTIFICACIÓN	26
IV. HIPÓTESIS	27
V. OBJETIVO GENERAL	27
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	
VII. 1 Reactivos	28
VII. 2 Línea celular	28
VII. 3 Expresión del receptor FFA1 en el sistema inducible T-REx	29
VII. 4 Medición de la concentración de calcio intracelular	32
VII. 5 Ensayos de fosforilación del receptor FFA1 con [³² P]Pi	32
VII. 6 Inmunoensayos de la activación de ERK	33
VII. 7 Microscopia confocal	34
VII. 8 Análisis estadístico	34
VIII. RESULTADOS	
VIII. Modelo del receptor FFA1 y los sitios de fosforilación predecibles por análisis <i>in silico</i>	35
VIII. 2 Activación del receptor FFA1 por DHA y α -LA	36
VIII. 3 Efecto de la activación del receptor de EGF sobre la actividad del receptor FFA1	40
VIII. 4 Efecto de la PKC sobre la actividad del receptor FFA1	42
VIII. 5 Fosforilación del receptor FFA1 inducido por agonista y por la PKC	43
VIII. 6. Efecto de los inhibidores de PKC, BIM y Gö6976, sobre la fosforilación del receptor FFA1	46
VIII. 7 Efecto de DHA, α -LA y PMA sobre la fosforilación e internalización del receptor FFA1-GFP	47
	50
IX. DISCUSION	
X. CONCLUSION	55

XI. ABREVIATURAS	56
XII. BIBLIOGRAFÍA	57
XIII, ANEXOS	58
ÍNDICE DE FIGURAS	
Fig 1. Estructura de los receptores acoplados a proteína G	4
Fig 2. Modelo de la activación de los receptores acoplados a proteína G	5
Fig 3. Modelo de la transactivación de los receptores con actividad de tirosina cinasas con los GPCRs de manera dependiente e independiente de ligando	8
Fig 4. Modelo de la desensibilización homóloga y heteróloga de los receptores α_{1B} Adrenoreceptor	9
Fig 5. Modelo general del mecanismo de desensibilización de GPCRs	10
Fig 6. Estructura de las isoformas de PKC	15
Fig 7. Modelo de regulación de PKC por fosforilación, unión de ligandos y liberación del pseudosubstrato	17
Fig 8. Modelo de la estructura del FFA1 y residuos esenciales para la función del receptor	20
Fig 9. Estructura de los ácidos grasos saturados e insaturados	22
Fig 10. Mapa de los vectores del sistema de expresión de genes del sistema inducible de expresión T-REx	29
Fig 11. Modelo del mecanismo de acción de la tetraciclina sobre el sistema inducible de expresión T-REx	31
Fig 12. Modelo de los sitios de fosforilación del receptor FFA1 predecibles por análisis <i>in silico</i>	35
Fig 13. Efecto de DHA, α -LA y PMA sobre la internalización del receptor FFA1	49
Fig 14. Modelo de la fosforilación e internalización del receptor FFA1 por ácidos grasos y PMA	55
INDICE DE CUADROS	
Cuadro 1. Características de la familia de los GPCRs para ácidos grasos	18
Cuadro 2. Síntesis de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados	23
Cuadro 3. Definición y función de los componentes de los vectores del sistema inducible de expresión T-REx	30
INDICE DE GRÁFICAS	
Gráfica 1. Efecto de LPA, DHA y α -LA, en la línea HEK293 T-REx FFA1 no inducida y HEK 293 silvestres	37
Gráfica 2. Efecto de DHA y α -LA sobre la movilización de la $[Ca^{2+}]_i$ en células inducidas HEK293 T-REx FFA1	39
Gráfica 3. Efecto del inhibidor AG1478 sobre la activación de ERK inducido por DHA, α -LA y EGF.	41
Gráfica 4. Efecto de PMA, un activador de PKC, sobre la actividad del receptor FFA1	42
Gráfica 5. Efecto de DHA y α -LA sobre la fosforilación del receptor FFA1	44
Gráfica 6. Efecto de PMA sobre la fosforilación del receptor FFA1	45
Gráfica 7. Efecto de los inhibidores BIM y GÖ6976 sobre la fosforilación del receptor inducido por DHA o PMA	46
Gráfica 8. Efecto de α -LA, DHA y PMA sobre la fosforilación del receptor FFA fusionado con la GFP.	48

RESUMEN

El receptor para ácidos grasos 1 (por sus siglas en inglés: FFA 1) es un receptor acoplado a proteínas G que es activado por ácidos grasos libres de cadena mediana y larga. El receptor FFA 1 se expresa en las células β -pancreáticas y tiene la función de potencializar la secreción de insulina. El receptor FFA 1 se encuentra acoplado a la proteína heterotrimérica $G\alpha_q/11$ que señala por la vía de activación de la fosfolipasa C, que hidroliza fosfatidil inositol bifosfato para generar diacilglicerol e inositol trifosfato que activa a sus receptores en el retículo endoplasmático y en consecuencia incrementa la concentración de calcio intracelular. Estudios previos sugieren que el receptor FFA 1 es un blanco terapéutico para la diabetes tipo 2, sin embargo, los mecanismos moleculares de regulación de este receptor no se han descrito aún.

Con el objetivo de investigar el mecanismo de regulación del receptor FFA 1, se determinó el efecto de ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido alfa-linolénico (α -LA) dos ligandos naturales del receptor FFA 1, y el efecto del éster de forbol 12-miristato-13 acetato (PMA), un activador de la proteína cinasa C (PKC) sobre la actividad, la fosforilación y la internalización de este receptor. En el presente estudio se utilizó la línea celular HEK 293 Flp-In-T-REx que expresa de manera estable e inducible el receptor FFA 1 y otra línea celular HEK 293 que expresa al receptor para ácidos grasos 1 fusionado a la proteína verde fluorescente.

Los resultados obtenidos, muestran que el DHA y el α -LA incrementan la concentración de calcio intracelular de manera dosis dependiente y activan a ERK1/2 (extracelular signal response kinase) a tiempos cortos. En ambos ensayos, el efecto de DHA fue más potente que el α -LA. Se comprobó que el DHA y el α -LA no tienen efecto sobre la línea celular HEK 293 sin transfectar ni en las células HEK 293 T-REx fusionado con el receptor FFA 1 sin inducir.

El efecto de AG1478, un inhibidor del receptor de factor de crecimiento epidérmico, bloqueó parcialmente la activación de ERK 1/2, por el efecto del α -LA; sin embargo, el efecto del DHA no fue afectado por la presencia de este inhibidor.

El DHA y el α -LA promueven la fosforilación del receptor FFA 1. De manera interesante, PMA promueve la fosforilación del receptor FFA 1 pero no su desensibilización. Las isoformas de la PKC (α y β) participan en la fosforilación del receptor FFA 1 inducido por DHA y por PMA. El DHA, el α -LA y el PMA promueve la internalización del receptor FFA 1 por un tiempo de 30 minutos

En conclusión, el receptor FFA 1 es fosforilado e internalizado, más no desensibilizado por la PKC inducido por el efecto, el DHA, α -LA y por el efecto PMA. Se sugiera que las isoformas clásicas de la PKC participan en la fosforilación del receptor FFA 1.

SUMMARY

The free fatty acid receptor 1 (FFA1) is a G-protein coupled receptor (GPCR) that is activated by medium and long chain free fatty acids. FFA1 receptor is expressed in pancreatic β cell and promotes glucose-stimulated insulin secretion. FFA1 is coupled to $G\alpha_{q/11}$ protein and typically signals through phospholipase C that hydrolyzes phosphatidylinositol 4,5 biphosphate into diacylglycerol and inositol triphosphate. The latter serves as a second messenger to mobilize calcium from intracellular stores (endoplasmic reticulum). Previous studies suggest FFA1 as a possible therapeutic target for type 2 diabetes, however, the molecular mechanism of its regulation is not totally understood.

To further investigate this, we measured the effect of docosahexaenoic acid (DHA) and α -linolenic acid (α -LA), natural ligands of FFA1 receptor, and the effect of phorbol myristate acetate ester (PMA), a PKC activator, over receptor activation, phosphorylation and internalization. In the present study, we used the cell line HEK 293 T-REx FFA1, an inducible expression system, and also HEK 293 cells expressing the FFA1 receptor fused to GFP (Green Fluorescent Protein)

The results of the present study show that DHA and α -LA promoted intracellular calcium increase in a dose-response manner, and ERK activation at early times in HEK293 T-REx cell line. DHA was a more potent agonist than α -LA in both assays. The cell line HEK 293 wild type and HEK 293 T-Rex not induced (without doxycycline) did not show a significant response to DHA and α -LA stimulation.

AG1478, an EGF receptor inhibitor, partially inhibited ERK1/2 activation in response to α -LA; however, it did not prevent the activation of ERK 1/2 by DHA.

Receptor FFA1 phosphorylation was induced by DHA and α -LA. Interestingly, the effect of PMA, an activator of PKC, induced receptor FFA1 phosphorylation but not its desensitization. Classic PKC isoforms (α γ β) seem to participate in receptor FFA1 phosphorylation induced by DHA and PMA.

Receptor FFA1 internalization was induced by DHA, α -LA and PMA at the time of 30 minutes.

In conclusion, the results of the present study demonstrate that receptor FFA1 phosphorylation and internalization, but not desensitization is induced by the effect of DHA, α -LA and PMA. We suggest that the principal activation of the PKC classic isoforms participates in the receptor FFA1 phosphorylation.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Receptores Acoplados a Proteína G

Los Receptores Acoplados a Proteínas G (por sus siglas en inglés: GPCRs) son una familia extensa de proteínas integrales de membrana (se conocen aproximadamente 800 genes que codifican para GPCRs en el genoma humano) que funcionan como nódulos de comunicación entre la célula y su medio externo. El nombre GPCRs deriva del acoplamiento de las proteínas G, que son un heterotrímero conformado por la subunidad $G\alpha$ y el dímero $G\beta\gamma$, en las regiones intracelulares del receptor [1-4].

Los GPCR regulan vías de señalización que integran distintas respuestas fisiológicas, que van desde la diferenciación celular hasta procesos más complejos como la función cardiovascular, inmunológica, metabólica, entre otras; la alteración de su actividad se relaciona con la manifestación de diversas patologías. El estudio del estado de activación y las vías de señalización que regulan los GPCR en condiciones patológicas y fisiológicas ha permitido la generación de fármacos que actúan directamente sobre los receptores [1,5-7].

La estructura de los GPCRs consiste en un extremo amino terminal (N-terminal) localizado en el espacio extracelular, siete dominios hidrofóbicos transmembranales (TM1-7) de estructura hélice alfa, que se encuentran conectados por tres asas intra y extracelulares, y un extremo carboxilo terminal (C-terminal) localizado en el citosol (figura 1) [8,9]. La interacción hélice-hélice de los dominios transmembranales de los GPCRs, contribuye a la estabilidad de la estructura funcional del receptor en la membrana y al mantenimiento del sitio de unión al ligando [10].

Los GPCRs pueden reconocer un amplio espectro de ligandos (por ejemplo: neurotransmisores, ácidos grasos, lípidos, péptidos, hormonas, iones y fotones) y su sitio de unión puede localizarse en el extremo N-terminal, en las asas extracelulares o en los dominios transmembranales [9, 11].

En ausencia de ligando, el receptor tiene una actividad basal (constitutiva) que mantiene el equilibrio entre el estado inactivo y activo. En su estado inactivo, la subunidad $G\alpha$ de las proteínas G heterotrímeras, se encuentra asociado con las subunidades $G\beta\gamma$ y unido a nucleótidos de guanosina difosfato (por sus siglas en inglés: GDP). Las subunidades $G\beta\gamma$ facilitan el acoplamiento de la subunidad $G\alpha$ con el receptor y evitan la disociación de GDP de manera independiente de la activación del receptor [12].

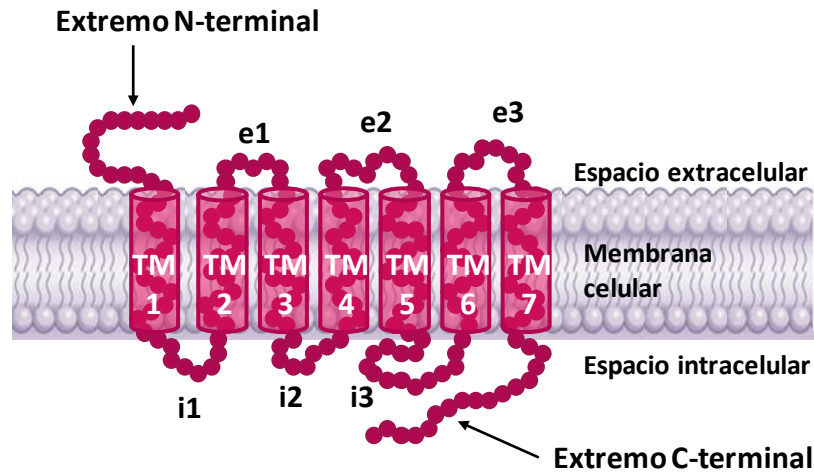


Figura 1. Estructura de los receptores acoplados a proteína G. Modelo de la estructura de los GPCRs donde se muestra el extremo amino terminal (N-terminal) en el espacio extracelular, las asas extracelulares (e1, e2, e3) e intracelulares (i1,i2,i3) que mantienen conectados los dominios transmembranales (TM1-7) y el extremo carboxilo terminal (C-terminal). Los dominios transmembranales están compuestos por aminoácidos hidrofóbicos con estructura α hélice. Boackaert J. 1999.

La transducción de señal inicia cuando, un ligando estabiliza el estado activo del receptor y promueve cambios conformacionales en los dominios transmembranales y en las regiones citoplasmáticas que activan a las proteínas G y expone sitios intracelulares del receptor determinantes para la unión de proteínas citosólicas [13-15]. El receptor al ser activado, confiere actividad de factor intercambiador de GDP por nucleótido guanosina trifosfato (por sus siglas en inglés: GTP) que promueve la activación y disociación de la subunidad $G\alpha$ del dímero $G\beta\gamma$ y de esta manera interaccionan con sus proteínas blanco. La actividad de GTPasa de la subunidad $G\alpha$ causa la hidrólisis de GTP, volviendo a su estado inactivo y reasociándose con el dímero $G\beta\gamma$ (figura 2).

Los GPCRs se encuentran acoplados a diferentes clases de proteínas G heterotriméricas, que modulan de manera negativa o positiva la actividad de proteínas efectoras (adenilato ciclasa, proteínas cinasas y fosfolipasas) y la generación de segundos mensajeros, como: Calcio (Ca^{2+}), AMP cíclico (cAMP), fosfatidil inositol bifosfato (PIP_2), inositol-1,4,5 trifosfato (IP_3), diacilglicerol (DAG) que están involucrados en la regulación de múltiples vías de señalización intracelular (figura 2.) [10].

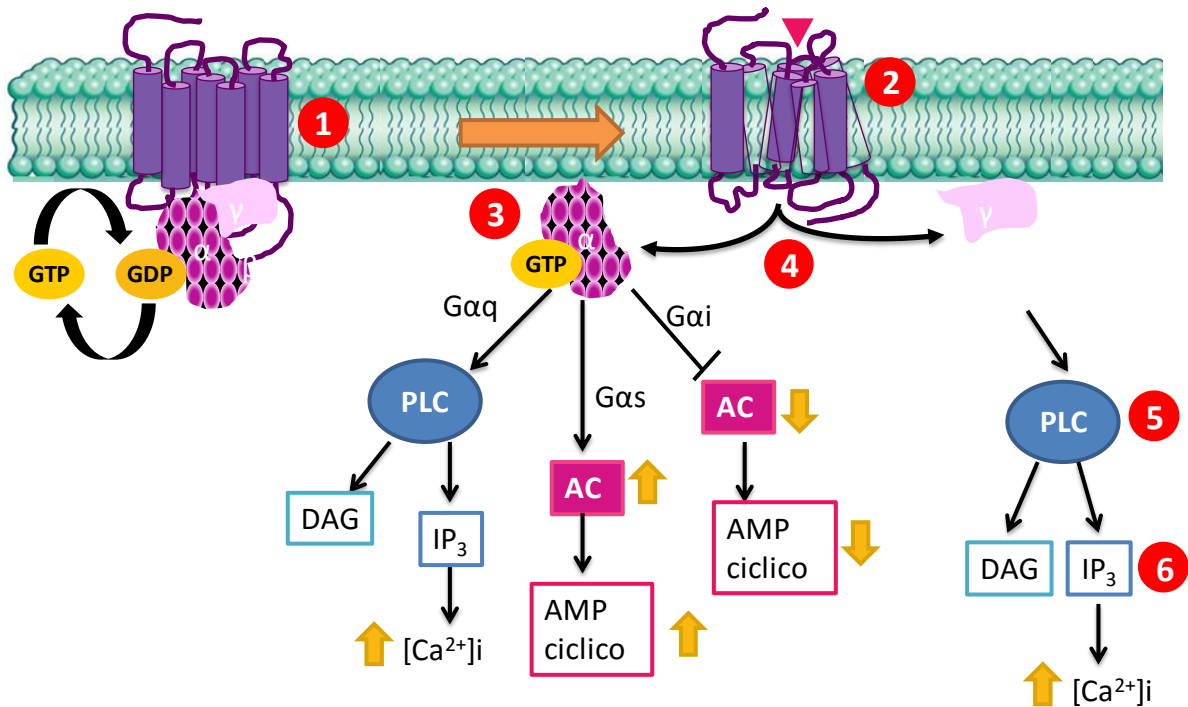


Figura 2. Modelo de activación de los receptores acoplados a proteína G. (1) En ausencia de ligando, las proteínas G heterotriméricas se encuentran acopladas con el receptor. La subunidad $G\alpha$ se encuentra unido con GDP (estado inactivo). (2) El receptor es activado cuando el ligando (triángulo rosa) interacciona con los sitios específicos dentro del receptor, y genera un cambio conformacional que favorece (3) el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$, (4) La activación de la subunidad $G\alpha$ genera la disociación del complejo en $G\alpha/GTP$ y $G\beta\gamma$. (5 y 6) La subunidad $G\alpha$ se clasifica en diferentes tipos: $G\alpha_q$ que activa a la fosfolipasas C (PLC) que actúa sobre el lípido de membrana fosfatidil inositol 4,5 bifosfato cuyos productos son diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3). IP_3 activa a sus receptores en el retículo endoplasmático para liberar calcio hacia el espacio intracelular. $G\alpha_s$ que activa a la enzima adenilato ciclasa (AC) que produce AMP cíclico, en cambio $G\alpha_i$ inhibe la actividad de la adenilato ciclasa. La subunidad $G\beta\gamma$, también actúa sobre vías de señalización que implica la activación de la fosfolipasa C (PLC). M. J. Berridge, 2012.

Con base en la estructura del receptor y el sitio o los sitios de unión para el ligando, los GPCRs se clasifican en cinco familias: A-F. Las familias A, B y C se encuentran en especies de mamíferos. La familia A es la más amplia de los GPCRs y se caracteriza por tener un extremo N-terminal y C-terminal cortos. El sitio de unión a ligando de los receptores de la familia A se encuentra entre las asas extracelulares y los dominios transmembranales. Los receptores β - adrenérgicos, rodopsina, opiodes, histamina, dopamina y quimiocinas son miembros de la familia A de los GPCRs. La familia B se subdivide en la subfamilia de receptores de Secretina y Adhesión. Los ligandos de los receptores de secretina se consideran péptidos largos como la hormona paratiroidea, glucagon, polipéptido insulínico dependiente de glucosa (por sus siglas en inglés: GIP) y péptido parecido a glucagon (por sus siglas en inglés: GLP-1). Los ligandos de los receptores de adhesión no se han identificado pero se piensa que son proteínas de la matriz extracelular las que activan a estos receptores. La familia C es la tercera mayor familia de los GPCRs. Se clasifica en la subfamilia de

receptores de glutamato cuyos ligandos son pequeños como glutamato o calcio. La familia D se encuentra principalmente en hongos y la familia E que corresponde a receptores de AMP cíclico no se expresa en células mamíferas. La familia F se clasifica en la familia de los receptores Frizzled [9, 16-18].

I.2 Transactivación de los receptores acoplados a proteína G con los receptores de actividad tirosina cinasa

Además de los GPCRs, los receptores con actividad de tirosina cinasa (por sus siglas en inglés: RTK) son otra familia extensa de proteínas integrales de membrana que regulan vías de señalización. Los receptores para factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal (por sus siglas en inglés: EGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina (por sus siglas en inglés: IGF-I), son ejemplos de RTK. La mayoría de los RTK atraviesan la membrana solo una vez y en su forma inactiva se encuentran como monómeros. Los receptores para insulina e IGF-I tienen cuatro subunidades, unidas por puentes disulfuro, y dos de ellas atraviesan la membrana plasmática. La activación de los receptores RTK inicia con la unión de su ligando en los dominios extracelulares que induce la dimerización del receptor y en consecuencia la autofosforilación en los residuos de tirosina encontrados en sus dominios intracelulares. Estos dominios intracelulares funcionan como sitios de unión para proteínas de andamiaje que contienen dominios SH2 (dominio homólogo 2 a Src) o PTB (dominio de unión a fosfotirosinas) y participan en diversas vías de señalización [19,20]

Cuando un RTK se activa y autofosforila, Grb2 por medio de su dominio SH2, se une a los sitios de tirosina fosforilados y recluta a Sos (son of sevenless) en la membrana. Sos promueve el intercambio de GDP por GTP en Ras con la finalidad de activarla, e iniciar la vía de señalización de las cinasas dependientes de mitógenos (por sus siglas en inglés: MAPK) que incluye la activación de Raf (MAPKKK), MEK (MAPKK) y las cinasas de respuesta a estímulos externos (por sus siglas en inglés: ERK/MAPK). Los miembros de la familia de las MAPK al activarse se translocan del citosol hacia la región nuclear donde regula la actividad de diversos factores de transcripción a través de la fosforilación. La vía de señalización de las MAPK se asocia con la proliferación celular, diferenciación y apoptosis [21,22].

Las funciones fisiológicas celulares pueden ser coordinadas por la transactivación entre los receptores acoplados a proteína G y los RTK. Se define como transactivación al mecanismo por el cual un GPCR activado estimula la señalización de un RTK, con la finalidad de converger el mecanismo de señalización hacia una respuesta específica [19]. La transactivación de los GPCRs con los RTK se observó por primera vez en fibroblastos de rata-1 (Rat-1), en los que se probaron diversos ligandos para GPCRs que generaban la

fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés: EGFR) de manera transitoria e inmediata [23]. Existen dos formas de transactivación:

1. La transactivación dependiente de ligando: los GPCRs activados promueven la generación de segundos mensajeros como calcio, PKC, cinasas de tirosinas como Src y Pyk2, proteínas de andamiaje, β -arrestina y las especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés: ROS) que promueven la activación de las metaloproteasas de matriz extracelular y la activación de los RTK. Las metaloproteasas son endopeptidasas que contienen zinc e hidrolizan componentes de la matriz extracelular. La familia de las Metaloproteasas y Desintegrinas A (por sus siglas en inglés: ADAM) hidrolizan las cadenas pépticas que anclan a los factores de crecimiento a la membrana y componentes de la adhesión celular como las integrinas. Los factores de crecimiento al ser liberados en el espacio extracelular por la acción de las metaloproteinasas activan a sus correspondientes receptores y promueven la activación de ERK [19,23].
2. La transactivación independiente de ligando: el receptor EGF en ausencia de ligando puede ser activado por mecanismos intracelulares iniciados por los GPCRs, que requieren la activación de proteínas cinasas de tirosina como Src y Pyk2. La proteína heterotrimérica $G\alpha_{q/11}$ señala por la vía de fosfoinosítidos (PLC/PIP₂/IP₃ y DAG/Ca²⁺) que promueve el incremento en la concentración de calcio intracelular proveniente de las pozas en el retículo endoplasmático. La activación de la cinasa Pyk2 está regulado por una autofosforilación y por calcio. En su forma activa, Pyk2 fosforila, activa y se asocia con Src para actuar sobre las tirosinas en los dominios intracelulares de los RTK. La transactivación de los RTK por los GPCRs es una vía alterna para la activación de las MAPK y ERK, sin embargo esta vía de señalización es dependiente del tejido celular [19,23, 24].

La vía de señalización de las MAPK inducida por transactivación entre los RTK y los GPCRs es altamente regulado ya que la alteración en la actividad de estos receptores se asocia con la hiperproliferación celular característica de diversos tipos de cáncer. Por lo que los mecanismos que atenúan la señal de los GPCRs como la desensibilización y la internalización determinan con la extensión en que los receptores regulan la activación prolongada de las MAPK [24].

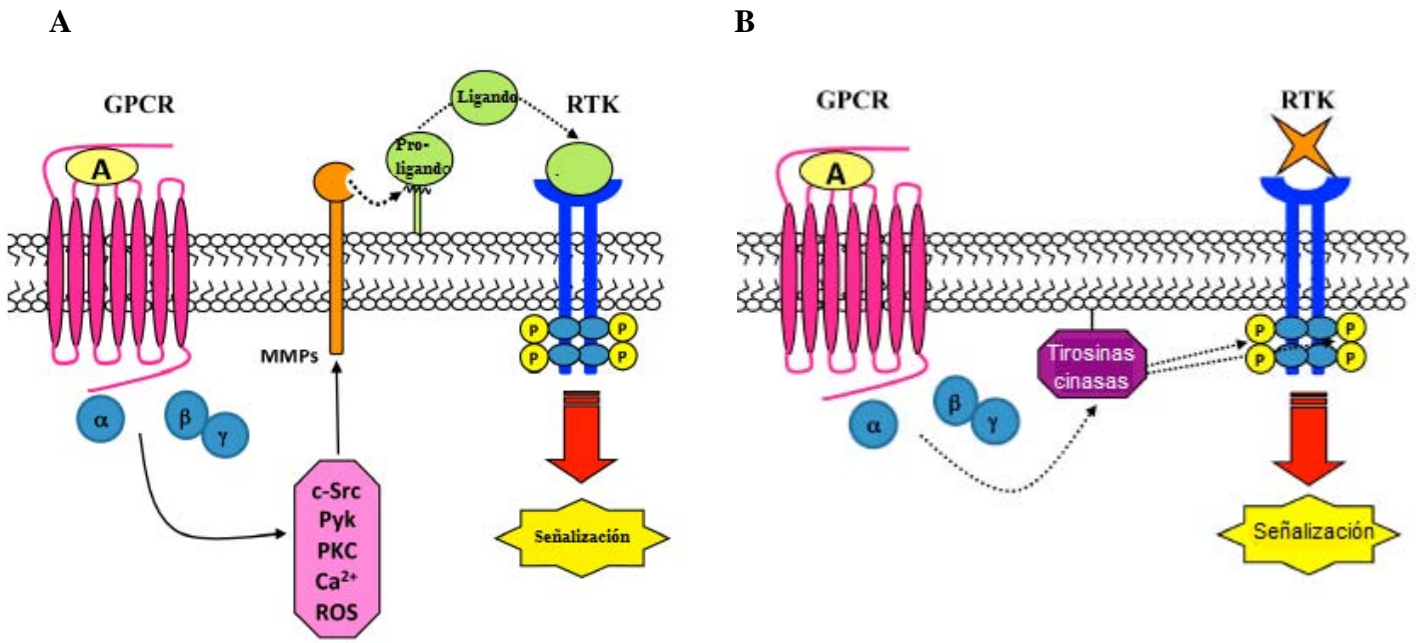


Figura 3. Modelo de la transactivación de los receptores con actividad de tirosina cinasas con los GPCRs de manera dependiente e independiente de ligando. (A). Modelo de la transactivación de los RTK con los GPCRs. La activación de los GPCRs por su ligando, promueve cascadas de señalización que generan ROS, activan a proteínas cinasas de tirosina como c-Src, Pyk o producen segundos mensajeros como calcio. Estos factores activan a las metaloproteinasas que promueven la liberación de segundos mensajeros en el espacio extracelular y activan a sus correspondientes receptores. **(B).** Modelo de la transactivación de los RTK con GPCRs independiente de ligando. Los GPCRs activados, promueven la generación de cinasas de tirosina que fosforilan los sitios intracelulares de los RTK e iniciar la vía de señalización. Fabio Cattaneo et al. 2014.

I.3 Regulación de la actividad de los receptores acoplados a proteína G

Los GPCRs son desensibilizados con la finalidad de regular la señal en un determinado tiempo y espacio; de esta manera las células son protegidas de la exposición prolongada del agonista. La desensibilización de los GPCRs está conformada por diferentes eventos continuos: la fosforilación y la internalización del receptor [25].

Desensibilización

La desensibilización es la pérdida o disminución de la respuesta del receptor ante un agonista. Este mecanismo se regula por la acción de las proteínas cinasas como las GRKs (por sus siglas en inglés: G-protein coupled Receptor Kinase) y las cinasas dependientes de segundos mensajeros como la proteína cinasa C (PKC) o la proteína cinasa A (PKA). La fosforilación en residuos de serina/treonina localizados en la tercera asa intracelular y/o en el extremo C-terminal del receptor, impiden físicamente la unión de las proteínas G, terminado así la señalización [25-27].

La fosforilación por las GRK promueve la asociación de proteínas citosólicas de andamiaje, como las β -arrestinas, hacia los sitios fosforilados y subsecuentemente la internalización del receptor (figura 4A). Sin embargo, este proceso solo describe un tipo de desensibilización conocida como la homóloga. La desensibilización heteróloga es un proceso iniciado por la activación de otros GPCRs o de RTK que activan a la PKC o a la PKA. Estas proteínas cinasas fosforilan aminoácidos de serina/treonina de un receptor diferente al ya activado (figura 4B). Una característica singular de las proteínas cinasas dependientes de segundos mensajeros es su capacidad de fosforilar a los GPCRs en ausencia de ligando. Estos mecanismos señalan la importancia de la fosforilación como una modificación postraduccional indispensable en la señalización celular [26, 28, 29].

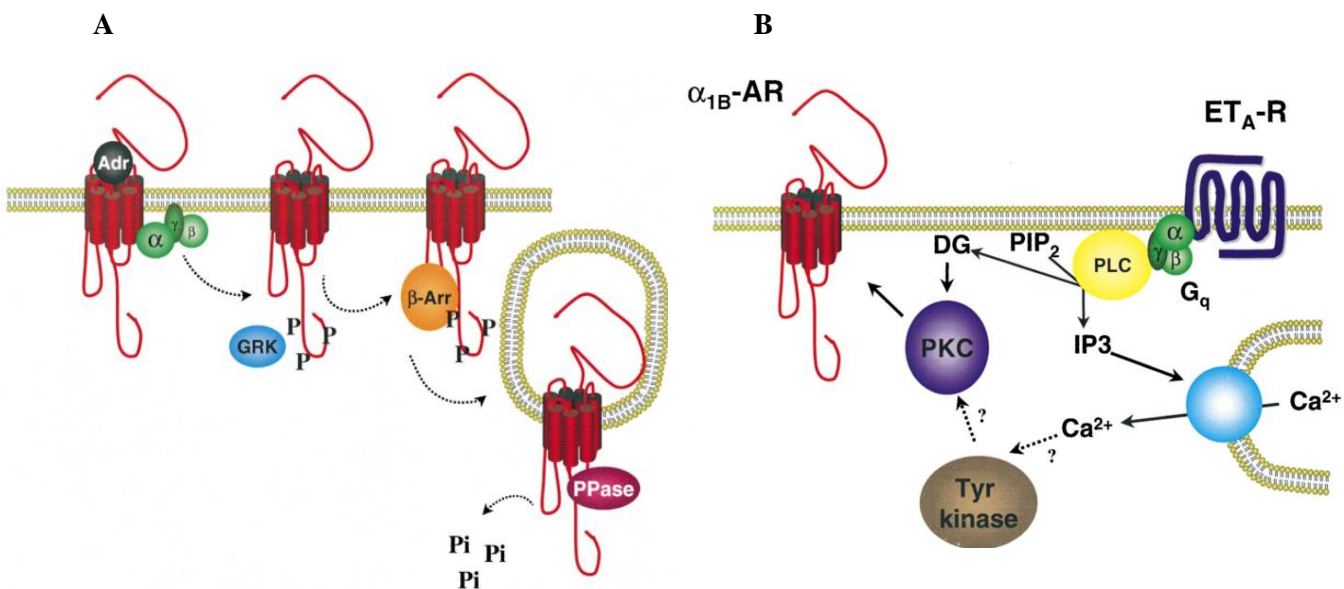


Figura 4. Modelo de desensibilización homóloga y heteróloga del α_{1B} -Adrenoreceptor. (A) Modelo de desensibilización homóloga del α_{1B} -Adrenoreceptor. El receptor al ser activado por adrenalina (Adr), es fosforilado (P) por GRK e internalizado por β -arrestina (β -Arr). Una vez localizado en endosomas las enzimas fosfatasa (PPase) retiran los grupos fosfatos del receptor. (B) Modelo de desensibilización heteróloga del α_{1B} -Adrenoreceptor. La activación del receptor de endotelina (ET-AR) que lleven a la activación de PKC que fosforila en sitios blancos al receptor α_{1B} -Adrenoreceptor promoviendo su desensibilización. Imagen tomada de J. Adolfo García Sáinz et al, 2000.

Tráfico vesicular de los receptores acoplados a proteína G

La internalización o secuestro de los GPCRs es un evento que forma parte de la desensibilización. La unión de las β -arrestinas a los sitios fosforilados de los GPCRs, promueve el desacoplamiento de las proteínas G y la endocitosis del receptor por vesículas recubiertas de clatrina o caveolas (figura 5) [26]. Las β -arrestinas se pueden unir a receptores no activados, sin embargo se unen con mayor afinidad a los receptores activados por ligando y fosforilados por GRK2 [29]. El estado de fosforilación del receptor estabiliza una

conformación que promueve la interacción de los GPCRs con otros elementos intracelulares de la maquinaria endocítica [5].

El tráfico vesicular de los GPCRs por las β -arrestinas diverge en dos vías: la vía de degradación o la vía de reciclamiento. Los GPCRs que entran a la vía de reciclamiento, se internalizan en vesículas de clatrina, para ser desfosforilados por fosfatasa y resensibilizados para volver a la membrana celular. En cambio, en la vía de degradación, los receptores son internalizados y ubiquitinizados [30]. La importancia biológica y funcional de la internalización es disminuir el número de receptores expresados en la membrana para evitar una sobreestimulación de la vía de señalización y mantener la homeostasis celular.

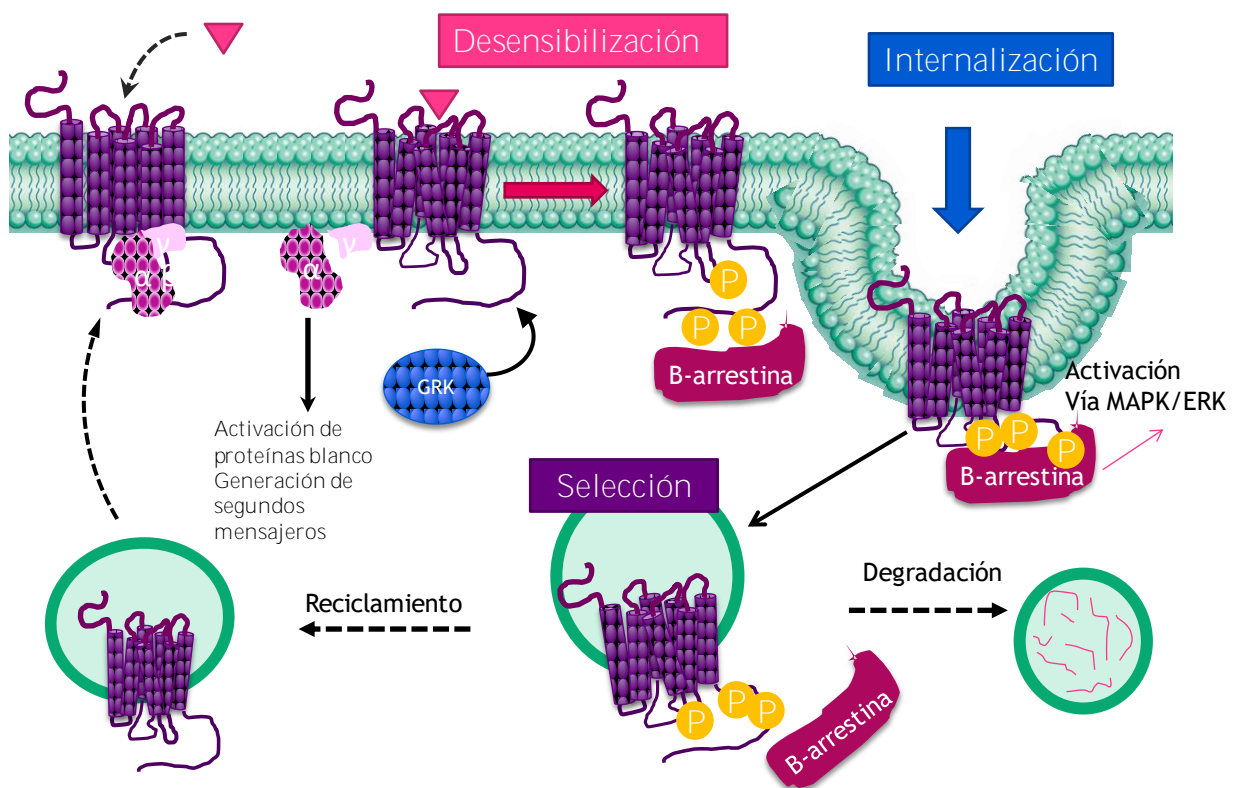


Figura 5. Modelo del mecanismo general de desensibilización de los GPCRs. La interacción ligando-receptor promueve el cambio conformacional que activa las proteínas G heterotriméricas y a proteínas cinasas como GRK. La fosforilación del receptor y la unión de las proteínas de andamiaje, β -arrestinas impiden físicamente la unión de las proteínas G heterotriméricas, de esta forma terminando la señalización. La unión de las β -arrestinas, promueve la unión de otras proteínas que forman parte de la maquinaria de la internalización del receptor. Al mismo tiempo se inicia la activación de vías de señalización independiente a la activación de las proteínas G heterotriméricas. De acuerdo al tipo de receptor, ligando y sitios de fosforilación, el receptor es dirigido a la vía de reciclamiento para ser desfosforilado y resensibilizado para regresar a la membrana, o por la vía de los lisosomas para ser degradado. Imagen modificada de Stefanie Ritter y Randy Hall 2009.

La dinámica de la internalización diverge entre la clase o familias de GPCRs. La β -arrestina 2 interacciona con mayor afinidad con los GPCRs de la familia A y promueve su endocitosis en vesículas de clatrina, pero no se internaliza junto con estos receptores. En cambio, las β arrestina 1 y 2 tienen la misma afinidad por los receptores de la familia B y son internalizadas junto con ellos en endosomas. La activación, desensibilización y el tráfico vesicular son específicos para cada familia de GPCRs, siendo la estructura del receptor el punto clave que hace distinto los mecanismos moleculares de regulación [16].

Las proteínas cinasas intracelulares median diversas vías de señalización. Estas proteínas modifican las propiedades de sus sustratos por la adición reversible de un grupo fosfato en residuos de serina, treonina y tirosina. En 1995, Steven Hanks y Tony Hunter definieron el término “proteínas cinasas AGC” a una subfamilia de proteínas cinasas que comparten las siguientes características:

- Fosforilan residuos de serina y treonina localizados en la estructura de sus sustratos.
- Conservan el dominio catalítico en el extremo C-terminal de las proteínas cinasas dependientes de segundos mensajeros como AMP cíclico (PKA), GMP cíclico (PKG) y diacilglicerol y calcio (PKC).
- Contienen un motivo de unión para ATP y un dominio de regulación.

Algunas proteínas cinasas AGC requieren de la fosforilación en el motivo hidrofóbico, en el asa de activación y en el motivo de giro (estos dos últimos están en el dominio catalítico) para su completa activación. Las cinasas PKA, PKB y PKC contienen en el asa de activación secuencias conservadas de unión para la cinasa dependiente de fosfoinosítidos (por sus siglas en inglés: PDK-1) que es necesaria para la actividad enzimática y la estabilización de la estructura de cinasa [31].

Características de las cinasas de los receptores acoplados a proteína G (GRK)

La sub-familia de las GRKs pertenece a la familia de cinasas AGC y su activación se lleva a cabo por un cambio conformacional generado por su unión con los GPCRs activados. La sub-familia de la GRK está formada por diversos miembros: GRK 1 y 7 son cinasas de rodopsina o visuales, GRK2 y GRK3 son ubicuas y fosforilan diversos tipos de GPCRs, mientras que GRK4-6 tienen distribución celular, localización subcelular y sustratos particulares por lo que se les denomina el grupo GRK 4 [30]. La estructura de las GRKs posee en su extremo N-terminal una región RGS (por su definición en inglés: Regulator of G-protein Signaling) llamado dominio homólogo RH. El extremo C-terminal de las GRKs es específico para cada subfamilia: GRK 1 y 7 tienen sitios de prenilación, GRK 2 y 3 se encuentran en el citosol y contienen un dominio homólogo de pleckstrina (por sus siglas en inglés: PH) que permite la interacción directa con la

subunidad $G\beta\gamma$; la GRK5 contiene un elemento de unión a lípidos con carga positiva y se encuentra constitutivamente en la membrana, y la subfamilia de las GRK 4 y 6 que contienen sitios de palmitoilación que permite la localización en la membrana celular [28,32].

Las GRK 2 y 3 fosforilan receptores que son activados por su agonista, en cambio las GRK5 y 6 participan en la fosforilación de los receptores de manera basal. La actividad de las subfamilias de las GRK es dependiente del tipo de ligando, receptor, vía de señalización y tejido donde se exprese [28].

Las proteínas cinasas AGC se activan por medio de la fosforilación en dos motivos: en el segmento de activación y en el motivo hidrofóbico en el extremo C-terminal. La activación de las GRK no depende de la fosforilación en sus motivos, si no de un cambio conformacional generado por su interacción con GPCRs activados [31].

Características de la PKC

La PKC pertenece también a la familia de cinasas AGC que fosforilan diversas proteínas [29]. PKC puede ser activada por una variedad de hormonas (angiotensina y adrenalina), factores de crecimiento (insulina y EGF) y neurotransmisores (dopamina y endorfina) que al unirse con sus receptores correspondientes (por ejemplo GPCR o RTK) activan a la fosfolipasa C que genera diacilglicerol y calcio. La activación de PKC se relaciona con la regulación de diversas funciones celulares como la migración, proliferación, diferenciación celular y apoptosis [33-35].

Las isoformas de PKC conservan una estructura común, conformada por una región reguladora (20-40 kDa) en el extremo N-terminal y una región catalítica (aproximadamente 45 kDa) en el extremo C-terminal. La región catalítica contiene los dominios de unión a ATP y al sustrato y la región reguladora contiene el pseudosustrato y los dominios de unión a cofactores. Las isoformas de PKC varían en su región reguladora mas no en su región catalítica, señalando que cumplen con funciones variables dependiendo del tipo de célula y tejido donde se expresen [33,36].

Actualmente existen 11 isoformas de PKC y se clasifican en 3 subfamilias de acuerdo a los cofactores que los activan y a las características de su región reguladora (figura 6):

- PKC clásicas (α , $\beta 1$, $\beta 2$ y γ),
- PKC nuevas (δ , σ , ϵ , θ , y η)
- PKC atípicas (λ , ι y ζ).

Estructura y Regulación de la PKC

Región Reguladora

Contiene dos estructuras modulares constantes que proveen sensibilidad y especificidad para ciertos cofactores de unión reversible, y la región del pseudosustrato. Esta región mantiene a la enzima en un estado catalíticamente inactiva.

Dominio C1: Las isoformas de PKC contienen uno (C1) o dos dominios (C1A y C1B) C1. Esta parte de la estructura tiene dos variantes: el dominio C1 que contiene 12 cisteínas (6 para C1A y C1B) que representan los sitios de unión para ésteres de forbol/diacilglicerol y un dominio C1 atípico que contiene 6 cisteínas y residuos básicos en la secuencia consenso por lo que no son sensibles a diacilglicerol ni a ésteres de forbol. Esta región se encuentra en las isoformas atípica de PKC. El DAG es producto final de la Fosfolipasa C (PLC) y ésteres de forbol como PMA (forbol 12-miristato-13-acetato) que se une al dominio C1B. Los ésteres de forbol provienen de la familia de la planta *Euphorbiaceae* y tienen un rol importante en la promoción de crecimiento de tumores [36].

El dominio C1 contiene una región hidrofóbica, una región con residuos de carga positiva, una región hidrofílica y una región que contiene dos Zinco que mantienen el plegamiento correcto de la cinasa. La interacción electrostática de los aminoácidos positivos del dominio C1 con los fosfolípidos aniónicos de membrana como fosfatidilserina, promueve que este dominio penetre la membrana celular e interactúe con DAG [33, 34,36]. La unión de cofactores lipídicos como DAG o ésteres de forbol a la región hidrofílica del dominio C1, promueve una superficie hidrofóbica más dominante que incrementa la afinidad de C1 por los lípidos de membrana. De esta manera, PMA y el DAG funcionan como anclajes hidrofóbicos que reclutan a la PKC en la membrana [38]. La unión de ligandos al dominio C1 también estabiliza la conformación activa al promover la liberación del pseudosustrato.

Las isoformas de PKC pueden interactuar con otros lípidos como ceramidas, ácido fosfatídico e PIP₃ y ácido araquidónico. La ceramida promueve la translocación de la PKC α del citosol hacia la membrana y ácido araquidónico dirige la translocación de la PKC ϵ del citosol hacia el aparato de Golgi.

Dominio C2: Este dominio conformado por 130 residuos se presenta en las isoformas de PKC clásicas y en su forma modificada, en las isoformas de PKC novels. En las isoformas de PKC clásicas, el dominio C2 contiene 5 aspartatos en el sitio de unión a Ca²⁺. La unión de Ca²⁺ neutraliza la región de cargas negativas, y promueve un cambio conformacional que hace posible la localización de PKC en la membrana, la interacción y aumento de la afinidad de PKC por las cargas negativas de las cabezas de los fosfolípidos de membrana [33].

En las isoformas de PKC novel, los residuos que mantienen el plegamiento del dominio C2 que le permite unirse a lípidos ácidos se encuentran presentes, sin embargo no se encuentran los aspartatos que coordinan la unión de Ca^{2+} . Por lo que las isoformas de esta familia de PKC, no utilizan calcio como un intermediario para unirse a calcio, en contraste, las isoformas de PKC clásicas el dominio C2 requiere de la unión con calcio para reconocer los lípidos de membrana. El paso limitante de la activación de PKC es la unión de DAG en el dominio C1 y la unión de Ca^{2+} en el dominio C2 es determinante para localizar a PKC en la membrana [34,36, 38]

Pseudosubstrato: Todas las isoformas de PKC, contienen un dominio de pseudosubstrato autoinhibitorio que precede al dominio C1A. El pseudosubstrato tiene una secuencia similar a los substratos, sin embargo no presenta los residuos fosforilables (intercambio de serinas por alaninas), por lo que mantiene a las PKC en un estado inactivo ocupando el sitio activo en la región catalítica. La unión de los ligandos a los dominios C1 y C2 generan un cambio conformacional que causa la liberación del pseudosubstrato del sitio activo [33,36].

Región Catalítica

La región catalítica se encuentra conservada en todas las isoformas de PKC. Dentro de la región catalítica se encuentran dos dominios, C3 y C4 que le confieren la actividad de cinasa a la PKC (figura 6).

- Dominio C3: Contiene la secuencia GXGXXG que son sitios de unión para ATP
- Dominio C4. Sitio de unión a substratos de PKC.

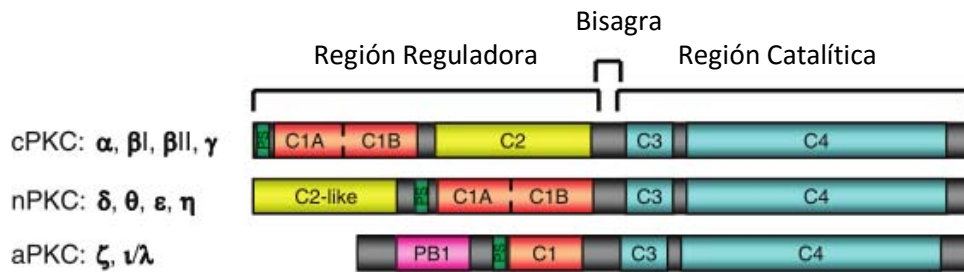


Figura 6: Estructura de las isoformas de PKC. La región catalítica se conserva en todas las isoformas de PKC, mientras que la región reguladora varía entre cada isoforma. La región reguladora de todas las isoformas de PKC tiene un motivo de pseudosubstrato (verde), un extremo N-terminal que es continuo del dominio C1 (rosa). Dentro de la región reguladora se encuentran los dominios C1A y C1B que son sitios de unión para DAG/PMA y el dominio C2 que es el sitio de unión para Ca^{2+} . El dominio C2 se presenta solo en las isoformas clásicas (PKCc) y PKC nuevas (PKCn), pero este dominio es solo funcional en las isoformas de PKCc. Las PKC atípicas (PKCa) presentan sitios de unión a fosfatidilserina. Imagen tomada de Susan F Stenberg, 2008.

En el extremo C-terminal de PKC se encuentra La mutación en el sitio S660 por alanina en la isoforma PKC βII disminuyó la afinidad de esta enzima por los lípidos de membrana [36].

Dominio Cinasas: La estructura cinasa de las PKC contienen secuencias conservadas y encontradas en otras cinasas miembro de la familia AGC como PKA. El dominio cinasa de la PKC contiene un amino terminal conformado por la secuencia rica en glicina y característica del asa de unión para ATP: GXGGXXG (motivo conservado en las proteínas cinasas y proteína de unión a nucleótidos). El extremo C-terminal del lóbulo contienen el asa de activación que posiciona el magnesio y a los sustratos al momento de fosforilar. Dentro del dominio cinasa se encuentra un conjunto de residuos ácidos cerca del sitio activo que funciona como una puerta electrostática para mantener el pseudosustrato en el sitio activo [34]

Activación de las PKC

La fosforilación de PKC es una modificación que se requiere para la maduración y activación de las PKC. Estas cinasas son fosforiladas en tres posiciones: una transfosforilación cercano al sitio activo que alinea los residuos correctamente para la catálisis y dos autofosforilaciones en el extremo C-terminal que hace a la PKC catalíticamente competente por un cambio conformacional [36].

La PKC clásicas contiene una “asa de activación” que es una región conservada compuesta por 20-30 residuos localizada en el dominio cinasa y forma parte del sitio de unión al sustrato. La adición de grupos fosfatos en esta región (contiene serinas y treoninas) por la acción de la PDK-1, introduce cargas negativas que alinean los residuos en el sitio catalítico y estabiliza la conformación activa de la enzima. Una vez que la “asa de activación” es fosforilada, PDK-1 debe de ser liberada del extremo C-terminal de PKC para permitir la autofosforilación y la maduración de esta cinasa (figura 7).

Las isoformas de PKC clásicas y nuevas requieren de dos fosforilaciones adicionales en los motivos conservados en el extremo C-terminal: en la región de “motivo de giro” flanqueado por prolinas y en el motivo hidrofóbico conservado (FXXF(S/T)(F/Y) que se encuentra implicado en la maduración de la PKC, en la unión con PDK-1 y en el aumento de la afinidad de PKC por los ligandos de su dominio C2.

A diferencia de las isoformas de PKC clásicas y nuevas, los sitios de serina/treonina en el motivo hidrofóbico de las isoformas de PKC atípicas son reemplazados por glutamina que mimetiza los grupos fosforilados [36].

La fosforilación en los motivos anteriormente mencionados, promueven la activación de las isoformas de PKC de manera distinta. La isoformas PKC β II requiere de la fosforilación en la T500 en el asa de activación, de una autofosforilación en la T641 en el extremo C-terminal que estabiliza la conformación catalítica y una segunda autofosforilación en la S660 en el C-terminal. Las PKC clásicas no requiere de cargas negativas en el asa de activación para la catálisis. La isoforma β II mantiene su actividad catalítica aún

si es desfosforilado en su asa de activación, sin embargo la fosforilación en el motivo giro (T641) es necesaria para que sea catalíticamente competente [33,36, 38].

Las isoformas de PKC nuevas también requieren de la fosforilación en motivo de giro y en el motivo hidrofóbico, el cual también puede deberse a una transfosforilación o autofosforilación; sin embargo, estos mecanismos son dependientes de la clase de isoforma de esta familia y del contexto celular. Basandose en los modelos de estructura de otras cinasas como PKA y PDK-1, por un consenso general se señalo que la fosforilación del motivo hidrofóbico es necesaria para el mantenimiento de la actividad catalítica [36].

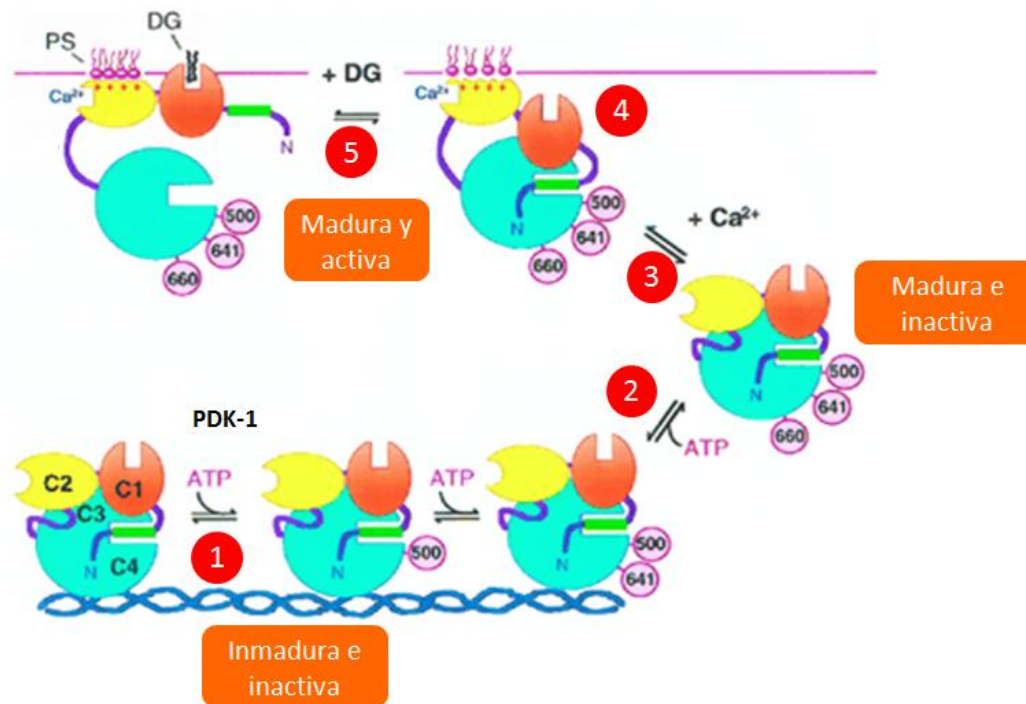


Figura 7. Modelo de regulación de PKC por fosforilación, unión de ligandos y liberación del pseudosustrato.

(1) El estado inmaduro e inactivo de la PKC se caracteriza por contener unido el pseudosustrato (barra verde) en el sitio activo (rectángulo), los dominios C1 (rojo) y C2 (amarillo) sin sus cofactores y la región C3 (dominio de cinasa, esfera azul) inactivo. (2) La cinasa PDK-1 fosforila a la PKC en el residuo T500 (PKC β II) en el asa de activación que promueve el estado catalítico de la enzima, seguido por dos autofosforilaciones en la S660 y T641 en el extremo C-terminal que estabilizan la conformación catalítica de la PKC. La fosforilación de estos residuos en la PKC, promueven la maduración de la cinasa, más no la activación y la liberación hacia el espacio intracelular. (3) La unión de calcio intracelular con el dominio C2 de las isoformas de PKC clásicas, promueven un cambio conformacional que lo vuelve más afín a los lípidos aniónicos de membrana. Las isoformas de PKC atípicas son activadas por su unión con los lípidos de membrana, mientras que las PKC nuevas son activadas por su unión con los lípidos de membrana, mientras que las PKC nuevas son activadas por DAG (DG) o lípidos de membrana. (4) Las isoformas de PKC clásicas al tener unido calcio, aumenta su afinidad por los lípidos de membrana como el DAG (DG) que promueve un cambio conformacional que (5) induce la liberación del pseudosustrato del sitio activo y así el estado activo y maduro de la cinasa. Newton A. 1995.

I.4 La familia de los Receptores Acoplados a Proteína G para ácidos grasos

La familia de GPCRs que son activados por ácidos grasos está conformada por los receptores GPR40/FFA1, GPR41/FFA3 y GPR43/FFA2 que fueron identificados en el gen humano CD22 locus cromosomal 19q13.1 [39]. El GPR120/FFA4 es otro GPCR activado por ácidos grasos de cadena mediana y larga y fue localizado en el cromosoma 10q23.3. Por análisis de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos de los receptores GPR40-43, se identificaron siete regiones hidrofóbicas correspondientes a los dominios transmembranales de los GPCRs, y por análisis filogenético se relacionaron con los receptores de lípidos y de eicosanoides que pertenecen a la subfamilia clase A de los GPCRs [40]. Posteriormente se confirmó que los receptores FFA contenían en su estructura residuos característicos de GPCRs de la subfamilia A: residuos de cisteína en el asa extracelular 2 y 3 que forma un puente de disulfuro que estabiliza el estado inactivo del receptor, residuos de prolina en el dominio transmembranal 5, 6, y 7; el motivo altamente conservado D/ERY en el dominio transmembranal 3. Este motivo forma el “candado iónico”, que mantiene la interacción de los dominios transmembranales responsables de la activación de las proteínas G [9, 11, 41].

Los miembros de la familia de los GPCRs para ácidos grasos conservan baja similitud entre ellos (GPR40 y GPR41 tienen una similitud de 34% y GPR40 con el GP43 es de 41%) [41,42]. El GPR120 conserva solo el 10% de homología en la secuencia con el receptor FFA1 [43]. Como se muestra en cuadro 1, los miembros de la familia de los receptores FFA son activados por ácidos grasos de diferente longitud y su activación está implicada en la regulación de procesos metabólicos. Por lo que estos receptores son considerados como sensores nutricionales que pueden ser un blanco terapéutico para la obesidad y diabetes mellitus tipo 2 [44-46].

Nombre del receptor	Ligandos del receptor *	Proteína G a la que se encuentra acoplada	Cromosoma en donde fue localizado	Tejido donde se expresa	Implicación fisiológica
FFA1/ GPR40	C12-C16 C12-C22	G $\alpha_{q/11}$	19q13.1	Células β pancreáticas, cerebro, entero-endocrinas	Células β del páncreas: Potencializa la secreción de insulina Células enteroendocrinas: Estimular la secreción de incretinas GLP-1 Cerebro:
FFA2/ GPR43	C3-C5	G $\alpha_{q/11}$ G $\alpha_{i/o}$	19q13.1	Células del sistema inmune, entero-endocrinas, adipocitos	Acumulación de lípidos, inhibición de la lipólisis
FFA3/ GPR41	C2-C3	G α_i	19q13.1	Adipocitos	Regulación de la leptina y de la respuesta antiinflamatoria
FFA4/ GPR120	C12-C16 C12-C22	G $\alpha_{q/11}$	10q23.3	Adipocitos	Secreción de insulina y glucagon, producción de citocinas, diferenciación de adipocitos, regulación de la respuesta inflamatoria

*Se indica la longitud de la cadena de los ácidos grasos C:carbonos

Cuadro 1. Características de la familia de los receptores para ácidos grasos.

1.5 Generalidades del receptor FFA1

El receptor FFA1 presenta dos residuos de cisteína (C79 y C170) en el tercer TM y en la tercera asa extracelular que posiblemente forma un puente de disulfuro, característica general de los GPCRs. Este mismo, presenta un sitio potencial de palmitoilación (C289) en el dominio C-terminal, dos sitios potenciales de N-glicosilación (N155 y N165) en la segunda asa extracelular y cinco sitios posibles de fosforilación para la PKC que son S212, T215, T287, T293 y S298 localizados en la tercera asa intracelular y en el extremo C-terminal [47,48].

Los ligandos endógenos del receptor FFA1 son ácidos grasos de cadena saturada (ácido palmítico, C16:0) o poliinsaturados como el ácido docosahexaenoico (C22:6), ácido oléico (C18:1), ácido linoleico (C18:2), ácido linolénico (C18:3), y otros ácidos grasos de cadena mediana (6-12 carbonos) o larga (>12 carbonos) son capaces de activar al receptor [49].

El receptor FFA1 interacciona específicamente con los grupos carboxilo de los ácidos grasos no esterificados para ser activado. La selectividad y reconocimiento de los grupos carboxilo es conferida por tres residuos (R183, N244 y R258) que se localizan en los dominios TM5, TM6, y TM7 respectivamente. En el sitio de unión a ligando, se encuentran los residuos Y91 y Y240 que estabilizan el grupo carboxílico de los ligandos, junto con los residuos de arginina [50]

Se observó que la mutación de los tres residuos (R183, N244 y R258) alteran de manera diferente la activación del receptor por diversos ligandos, sugiriendo que el receptor presenta más de un sitio de unión para el ligando (sitios alostéricos) [51, 52]. El TAK-875 es un agonista selectivo sintético del receptor FFA1 que ha pasado por la fase I y II de ensayos clínicos. Se ha reportado su unión en un sitio alostérico localizado entre los segmentos transmembranales 3-5 y las regiones del asa extracelular 2. El TAK-875 es reconocido por el residuo R183, R258, Y91 y N244 [50].

La propiedad del receptor FFA1 de distinguir la longitud de la cadena de los ácidos grasos es conferida por el residuo de H86 y N244, ya que estos residuos no se encuentran conservados en los receptores FFA2 Y FFA3. Estos dos residuos confieren la correcta orientación y coordinación de los ácidos grasos. Dentro del sitio de unión del ligando se encuentran los residuos de Histidina (H86 y H137) que dependen de su protonación para interactuar con el ligando. El E145 y el E172 que se encuentran en la segunda asa extracelular forman parte del “candado iónico”, que junto con las R183 y R258 mantienen inactivo al receptor (figura 7) [52]. Cuando el carboxilo del ligando interactúa con estos residuos, permiten un cambio conformacional del receptor que fomenta su activación. Mutaciones puntuales en los residuos R183, R285, Y91 y N244 causan una diversificación en las potencias de TAK-875 y γ -ácido linolénico. Estas observaciones indican que el receptor FFA1 presenta más de un sitio de unión para diferentes ligandos [48].

Se ha encontrado un polimorfismo en el sitio G180 en el TM5 en humanos, que causa una disminución en la secreción de insulina; otro polimorfismo en el sitio D175 en la segunda asa extracelular genera una reducción del 40% de la respuesta máxima del receptor cuando es activado [41,52].

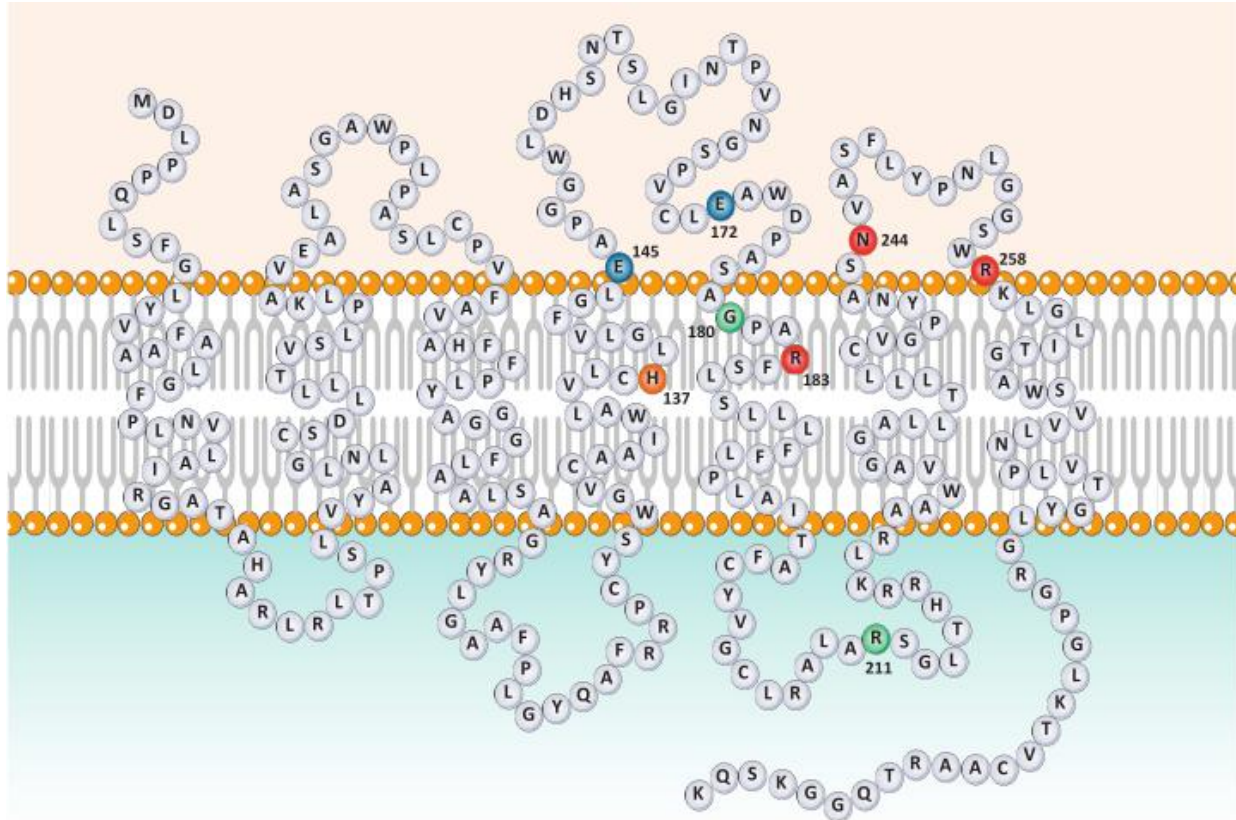


Figura 8. Modelo de la estructura del receptor FFA1 y residuos esenciales para la función del receptor. Los sitios de color rojo representa los sitios de reconocimiento y unión a ligando, el sitio naranja reconoce la unión de ligandos sintéticos, los sitios marcados en azul son los sitios participantes en el “candado iónico” y el sitio en verde se ha identificado como un sitio importante en la función de estimulador de secreción de insulina del GPR40. Imagen tomada de Mancini et al. 2013

1.6 Funciones fisiológicas del receptor FFA1

El receptor FFA1 se encuentra acoplado a la proteína $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ que activa a la fosfolipasa C que hidroliza a PIP_2 para generar DAG e IP_3 . El calcio intracelular se libera del retículo endoplasmático a partir de la activación de los receptores de IP_3 que se localizan en este organelo [51] Diversos estudios demostraron que el receptor FFA1 se expresa en la superficie de células β pancreáticas de tejido humano, simio y ratón [49,53].

Estudios *in vivo* en donde sobreexpresaron o deletaron el gen del receptor FFA1 en todo el cuerpo de los ratones C57BL/6J (una cepa característica de presentar diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares y obesidad a causa de una dieta con un alto contenido de grasa) concluyeron que éste, contribuye a la homeostasis de la glucosa en periodos de ayuno y mejora la tolerancia a la glucosa en condiciones que promueven la resistencia a la insulina [54] y mantiene la secreción de insulina cercana al nivel basal [55-58]. En contraste, Steneneberg y colaboradores, concluyeron que la delección del receptor FFA1 evita el desarrollo de la resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y retrasa el desarrollo de hígado graso en ratones diabéticos que consumían una dieta alta en grasa [59].

La pérdida de función vía RNA de interferencia, oligonucleótidos anti-sentido, inhibición farmacológica y delección del gen en estudios *in vitro*, han mostrado que el receptor FFA1 participa en la secreción de insulina [53-55,60] y disminuye el nivel de expresión de genes de apoptosis (por ejemplo: caspasa-3). La activación crónica de la vía $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ en las células β -pancreáticas promueve la expresión de genes relacionados con la diferenciación y mantenimiento de las células β -pancreáticas (por ejemplo: pancreática y duodenal homeobox 1: PDX) y la expresión de IRS que conduce a la activación de la proteína cinasa B (por sus siglas en inglés: PKB) y ERK. Por lo tanto, el receptor FFA1 promueve la sobrevivencia, la proliferación, la diferenciación, el mantenimiento y crecimiento de las células β -pancreáticas [61,62]. La activación del receptor FFA1 promueve la activación de genes y factores de transcripción que participan en la síntesis de insulina por ejemplo: Ins2 (que codifica para pre-proinsulina) y en el metabolismo de glucosa y lípidos (GLUT2 y PPAR γ) [61,63].

El receptor FFA1 también se expresa en células enteroendocrinas, osteocitos, macrófagos y neuronas. La expresión del receptor FFA1 en hipotálamo y neuronas se asocia con la atenuación del dolor y en el mantenimiento de la memoria [64]. En células enteroendocrinas del tracto intestinal, el receptor FFA1 promueve de forma indirecta la secreción de insulina a través de la regulación de las incretinas GLP-1 y GIP, hormonas que circulan en el torrente sanguíneo y participan en la estimulación de secreción de insulina [65].

1.7 Ácidos grasos

El cuerpo humano requiere alrededor de 50 nutrientes que son indispensables para su funcionamiento y desarrollo dentro de los cuales se encuentran los lípidos. Los lípidos forman parte de los tejidos de las plantas y los animales y se clasifican como a) esteroides, b) fosfolípidos, c) esfingomielinas, d) ceras y e) grasas. Los principales componentes de las grasas son los ácidos grasos que pueden clasificarse de acuerdo a la longitud de su cadena alifática y por el grado de insaturación [66,67].

Los ácidos grasos son ácidos monocarboxílicos de cadena larga, que contienen un número par de átomos de carbono, normalmente entre 8 y 22 (figura 9) Sin embargo, también existen frecuentemente ácidos grasos con un número impar de átomos de carbono, que probablemente derivan de la metilación de un ácido graso de cadena par [66].

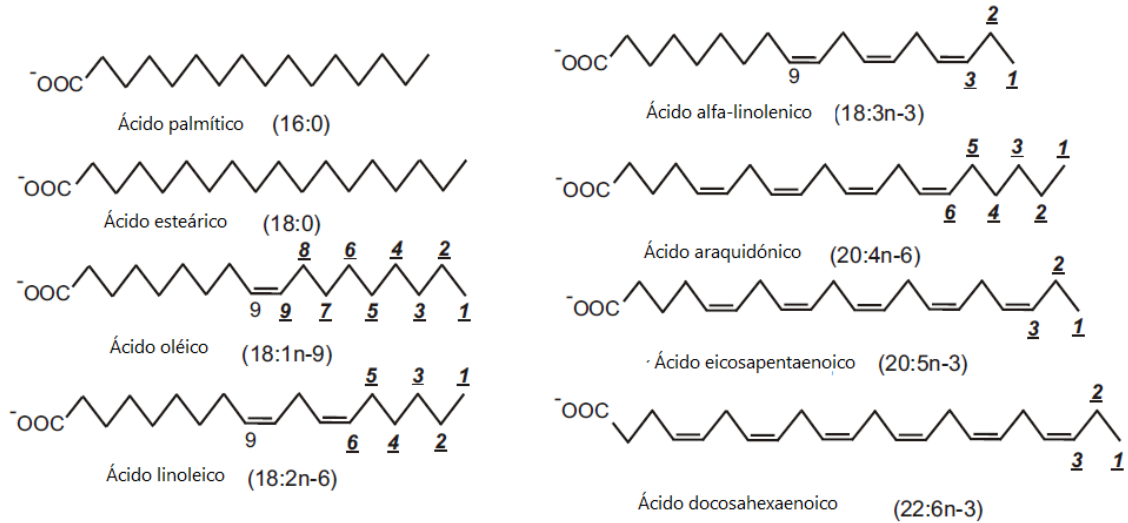
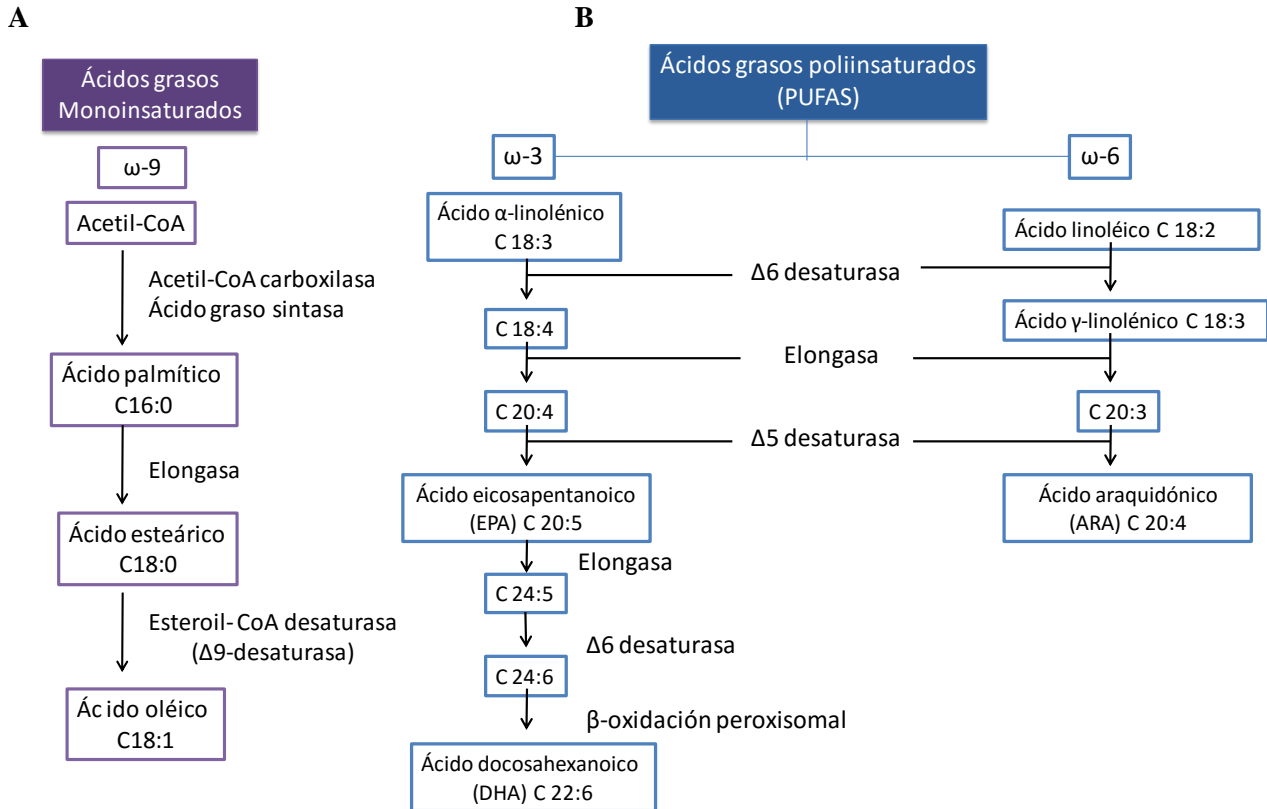


Figura 9. Estructura de los ácidos grasos saturados e insaturados. La estructura de los ácidos grasos se representa con saturación o insaturación (=), el número de carbonos de cada ácido graso, la numeración correspondiente a la insaturación y la familia de ácidos grasos omega a la que pertenece (C:n-3 o 6) Imagen tomada y modificada de Eva Tvrzicka 2011.

Los ácidos grasos se pueden obtener a partir de diferentes fuentes biológicas. Los ácidos grasos de cadena mediana y larga provienen de la hidrólisis de triglicéridos de las lipoproteínas, de los quilomicrones o bien de los que están unidos a la albúmina proveniente del tejido adiposo, por la acción de la enzima lipoproteína lipasa y lipasa sensible a hormona. El acetato (C2:0), propionato (C3:0) y butirato (C4:0) son ácidos grasos de cadena corta que se producen principalmente en el colon por el metabolismo bacteriano [67].

Los ácidos grasos en el organismo se presentan tanto en su forma saturada como insaturada con la presencia de una (monoinsaturados) o más (poliinsaturados) dobles ligaduras. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena mediana (C6-C12) y de cadena larga (> C12) se consideran componentes esenciales de la dieta, debido a que las células de los mamíferos no presentan desaturasas $\Delta 12$ y $\Delta 15$ [68] que inserten un doble enlace después del carbono 9 a partir del extremo carboxilo terminal. De acuerdo a la posición del primer doble enlace con respecto al extremo del grupo metilo (ω) de la cadena alifática, los ácidos grasos poliinsaturados se pueden clasificar en la familia de los ácidos grasos omega 3 (ω -3) y omega 6 (ω -6) [69].

La síntesis de cada una de las familias de ácidos grasos poliinsaturados es diferente y sus componentes no son redundantes de una familia con otra (cuadro 2). El ácido α -linolénico (α -LA, C18:3 ω -3) y el ácido linoleico (LA, C18:2 ω -6) son los ácidos grasos más abundantes en la dieta y son precursores de una serie de ácidos grasos poliinsaturados que se obtienen por desaturación (enzima desaturasa Δ 5 y Δ 6), elongación y una reacción en la β -oxidación [70,71] El ácido docosahexaenoico (DHA C22:6) y el ácido eicosapentanoico (EPA C20:5) pertenecen a la familia de los omega-3, y el ácido araquidónico (ARA C20:4) a la familia de los omega-6 [71-73].



Cuadro 2. Síntesis de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados. El panel A representa la ruta de la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados. En el panel B, se muestra la vía de la síntesis de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y 6. Cuadro tomado de Angel Catalá 2013.

En el torrente sanguíneo, los ácidos grasos se transportan unidos a albúmina, lipoproteínas de muy baja densidad (por sus siglas en inglés: VLDL) o en moléculas más grandes como los quilomicrones; sin embargo una fracción de ácidos grasos libres no se encuentra unido a algún tipo de proteína de transporte [74]. Anteriormente, los ácidos grasos se consideraban nutrientes energéticos que eran intercambiables con los hidratos de carbono. Fue hasta en 1929 y 1930 que las investigaciones de George y Mildred Burr condujeron a una nueva perspectiva sobre los ácidos grasos. Sus experimentos consistieron en eliminar por completo los ácidos grasos de la dieta, y solo alimentar a las ratas con caseína, sacarosa y vitaminas.

Describieron que las ratas padecían descamación de la piel, pérdida de peso, retraso en el crecimiento y posteriormente morían [74]. Ralph Holman y colaboradores realizaron un estudio utilizando las mismas condiciones experimentales y observaron que al adicionar pequeñas cantidades de ácido linolénico en la dieta, los efectos se revertían. Estos hallazgos establecieron que los ácidos grasos insaturados son esenciales en la dieta para el mantenimiento de la salud [75].

Actualmente los ácidos grasos no solo se consideran nutrimentos energético, sino también como componentes de la membrana, precursores de hormonas, moléculas señal, mediadores de procesos inflamatorios, y ligandos para factores de transcripción implicados en la regulación del metabolismo de lípidos [68,76]. Los ácidos grasos también actúan sobre el páncreas para potenciar la secreción de insulina en estado de ayuno y en presencia de glucosa [77].

1.8 Los ácidos grasos como ligandos del receptor FFA1

En 1968, diversos grupos describieron por primera vez el efecto de los ácidos grasos no esterificados sobre la secreción de insulina de las células β -pancreáticas. En 1967, Crespín y colaboradores [78] determinaron el efecto de los ácidos grasos sobre la liberación de insulina por perfusiones de ácidos grasos en la arteria pancreática de perros anestesiados. Las conclusiones del estudio señalaron que los ácidos grasos insaturados o saturados actuaban directamente sobre las células β -pancreáticas para estimular la secreción de insulina. Sin embargo, se desconocía el mecanismo por el cual sucedía este fenómeno. A partir de estos hallazgos, aumentó la importancia de estudiar el mecanismo de acción de los ácidos grasos en las células β pancreáticas, sobre todo en estados patológicos [79].

La obesidad es una enfermedad que presenta un desbalance energético reflejado en la alteración del metabolismo de lípidos e hidratos de carbono. La elevada concentración de ácidos grasos en sangre en los sujetos obesos se asocia con la resistencia a la insulina, hiperinsulinemia y posteriormente la disminución de la secreción de insulina por la muerte de células pancreáticas. La obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer, dislipidemia e hipertensión [80-82].

En condiciones fisiológicas, la concentración de ácidos grasos libres (0.1-10 μ M) en el plasma [53], promueve la secreción de insulina, pero su exposición crónica con elevadas concentraciones (50-100 μ M), altera la función de las células β -pancreáticas [83].

En la literatura se menciona que los ácidos grasos insaturados promueven efectos benéficos sobre el funcionamiento de las células pancreáticas. El grupo de N.G. Morgan y colaboradores observaron un incremento en la actividad de las caspasas 3 y 7 cuando las células derivadas de insulinoma de rata (línea celular INS-1 β cells y BRIN-BD11) eran incubadas con ácido palmítico (C16:0) (250 μ M) por 24 horas; sin

embargo, este efecto era revertido por la adición de palmitoleato (C16:1), favoreciendo así el mantenimiento del número de células del páncreas [84]. Por otra parte, se observó que la exposición de ácido araquídico por 24 horas en la línea celular BRIN-BD11, promovía la proliferación de las células β del páncreas. Por lo contrario, la exposición de la misma línea celular con ácido palmítico, presentaba una disminución en la secreción de la insulina, debido al aumento en la apoptosis y al aumento en la concentración de triglicéridos intracelulares [85].

El funcionamiento adecuado de las células β del páncreas se ve influenciado por la exposición prolongada tanto de ácidos grasos saturados como insaturados, sin embargo la explicación de un posible mecanismo por el cual los ácidos grasos actuaban de manera directa sobre el páncreas para promover la secreción de insulina se mantenía incierto. Fue hasta en el 2002 que el grupo de Briscoe y colaboradores mostraron por ensayos de PCR-RT, que el receptor FFA1 se expresaba de manera significativa en el cerebro y en las células β del páncreas. Por ensayos de movilización de calcio intracelular y de fosforilación de ERK, identificaron a los ácidos grasos de cadena larga y mediana como los ligandos de este receptor [49]. Un año más tarde, Itoh y colaboradores mostraron que los ácidos grasos promovían la secreción de insulina mediante la activación del receptor FFA1 [53].

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El receptor FFA1 representa un posible blanco terapéutico para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo, por lo que la generación de agonistas sintéticos que estimularan a este receptor sin causar una alteración en la secreción basal de insulina y disminuir la concentración de glucosa sanguínea, fue el objetivo de muchos grupos de investigación.

Se ha demostrado ampliamente que los ácidos grasos libres y los agonistas sintéticos activan al receptor con diferente eficacia y afinidad, sin embargo los efectos generados por una activación prolongada de este receptor, no fue considerado dentro estos estudios.

El grupo de Jing Qiang y colaboradores, exploraron el efecto del ácido α -linolénico sobre la internalización del receptor. Demostraron que el receptor FFA1 ante la exposición de ácido α -linolénico (100 μ M) se internaliza por las β -arrestinas 2 en vesículas de clatrina y que de manera constitutiva se internaliza por balsas lipídicas [86]. Por otra parte, Mancini y colaboradores utilizando ensayos de transferencia de energía bioiluminoscente (por sus siglas en inglés: BRET), mostraron que la unión de las β -arrestinas con el receptor FFA1 puede ser de manera dependiente e independiente de la activación de la proteína $G\alpha_q$ [87]. Ambos grupos de investigación sugieren que la cinasa GRK2 participa en la internalización del receptor FFA1.

Previamente se ha descrito que la fosforilación es un mecanismo que regulan el estado de actividad del receptor y por lo tanto el tiempo de señalización. Se conoce que la desensibilización de los GPCRs es un mecanismo clave para el mantenimiento de la homeostasis celular. Actualmente los estudios del receptor FFA1 no toman en cuenta el efecto de los ácidos grasos libres sobre la fosforilación del receptor y no consideran si la internalización del receptor es dependiente o independiente de este evento. Por otra parte, los patrones de fosforilación del receptor FFA1 por cinasas dependientes de segundos mensajeros como PKC, no se ha descrito y tampoco su posible participación en la regulación del receptor FFA1 de manera heteróloga y homóloga. La activación de PKC se ha asociado con el mecanismo observado en diversas patologías, entre ellas diabetes mellitus tipo 2 [37].

III. JUSTIFICACIÓN

El receptor FFA1 se ha relacionado con funciones celulares esenciales como el crecimiento y proliferación en tejidos donde se expresa endógenamente. Al igual que receptor FFA1, el receptor FFA4 (GPR120) es activado por ácidos grasos de cadena mediana y larga y por sus funciones relacionadas con la secreción de insulina y la inflamación causada por macrófagos durante la obesidad, se ha considerado este receptor como otro posible blanco terapéutico para la obesidad y diabetes mellitus tipo 2.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, mostraron que la actividad del receptor FFA4 no es atenuado por la activación de PKC por PMA. Sin embargo, en el mismo estudio, evidenciaron que los agonistas que tanto los agonistas del receptor FFA4, DHA y α -Linolénico como el PMA promueven la fosforilación del receptor sugiriendo que los sitios específicos fosforilados pudieran determinar funciones del receptor. El papel de las isoformas de PKC en la fosforilación del receptor FFA4 fue estudiado, utilizando inhibidores selectivos para las isoformas α , β y δ . Los resultados de este experimento sugieren que parte de la fosforilación del receptor FFA4 es llevado a cabo por las isoformas clásicas de PKC, sin embargo no excluyen la posible participación de otras isoformas de PKC o de otras cinasas como GRK [88].

Los resultados previamente mencionados ejemplifica la importancia del estudio del mecanismo o los mecanismos de regulación de los GPCRs activados por ácidos grasos. Actualmente no se ha determinado el estado de fosforilación del receptor FFA1 inducido por los ácidos grasos. Esta problemática justifica un abordaje integral sobre el mecanismo de regulación del receptor FFA1, como el que ofrece estudiar la posible participación de cinasas dependientes de segundos mensajeros en la fosforilación e internalización del receptor.

IV. HIPÓTESIS

El receptor FFA1 es fosforilado por su activación con DHA y ácido α -linolénico, y por la activación de la PKC. Se propuso que la fosforilación por los agonistas está asociada a desensibilización pero la acción de la PKC pudiera no desensibilizar al receptor. Todo ello con base principalmente en los datos del receptor FFA4 (de la misma rama de receptores) y de lo observado con otros GPCRs.

V. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de DHA, α -linolénico y PKC sobre la fosforilación y desensibilización del receptor FFA1.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para determinar la activación de receptores de ácidos grasos que se expresen de manera endógena en la línea celular HEK293 silvestre.

1. Determinar el efecto de DHA y ácido α -Linolénico en la línea celular HEK293 silvestre sobre:
 - 1.1 La movilización del calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$).
2. Determinar el efecto de DHA y ácido α -Linolénico en la línea celular HEK293 T-REx no inducida sobre:
 - 2.1 La movilización del calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$).

Para conocer la activación, fosforilación homóloga y desensibilización del receptor.

3. Determinar el efecto de DHA y ácido α -linolénico sobre la actividad del receptor FFA1 expresado de manera inducible en las células HEK293 T-REx sobre:
 - 3.1 La movilización de $[Ca^{2+}]_i$
 - 3.2. El grado de activación de ERK
 - 3.3 El grado de fosforilación del receptor ($[^{32}P]Pi$)

Para conocer la fosforilación y desensibilización heteróloga del receptor.

4. Determinar el efecto de PMA sobre el receptor FFA1 expresado de manera inducible en las células HEK293 T-REx determinando:
 - 4.1 La movilización de la $[Ca^{2+}]_i$ en células HEK293 T-REx preincubadas con PMA y posteriormente tratadas con DHA o ácido α -linolénico.
 - 4.2 El grado de fosforilación del receptor ($[^{32}P]Pi$)
 - 4.3 El grado de internalización del receptor

Para identificar la isoforma de PKC que participa en la fosforilación y desensibilización del receptor.

5. Determinar el efecto de los inhibidores específicos de isoformas de PKC en el receptor FFA1 sobreexpresado en el sistema inducible en las células HEK293 T-REx tratados con DHA y PMA sobre:
 - 5.1 El grado de fosforilación del receptor ($[^{32}P]Pi$).

Para explorar la posible transactivación del receptor FFA1 con el receptor de EGF.

6. Determinar el efecto del receptor EGF sobre la actividad del receptor FFA1 expresado en el sistema inducible en las células HEK293 T-REx midiendo:

- 6.1 El grado de activación de ERK y el efecto de inhibidores de la cinasa del receptor de EGF

Para estudiar la internalización del receptor FFA1.

7. Determinar el efecto de DHA, α -LA y PMA sobre la internalización del receptor en la línea celular HEK293 FFA1-GFP (proteína verde fluorescente).

7.1. El grado de disminución de la fluorescencia en la membrana celular.

Para comprobar el efecto en la fosforilación del receptor FFA1-GFP

8. Determinar el efecto de α -LA y PMA sobre la fosforilación del receptor en la línea celular HEK293 FFA1-GFP.

8.1 El grado de fosforilación del receptor ($[^{32}\text{P}]\text{Pi}$).

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1 *Reactivos*

Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (por sus siglas en inglés: DMEM), los antibióticos estreptomycin y penicilina, la tripsina, el suero de bovino fetal y otros reactivos para el cultivo celular se obtuvieron de Gibco, Life Technologies. Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), ácido docosahexaenoico (DHA), ácido α -linolénico (por sus siglas en inglés: α -LA), el anticuerpo M2 monoclonal anti-FLAG, la albúmina libre de ácidos grasos >96% y la resina monoclonal M2 anti-FLAG se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. G66976, Bisindolilmaleimida I, AG1478 se obtuvieron de Calbiochem. El $[^{32}\text{P}]\text{Pi}$ (8,500-9,120 Ci/mmol) se obtuvo de Perkin y Elmer. El medio DMEM libre de fosfatos, Lipofectamina 2000 y el Fura-2AM se obtuvieron de Molecular Probes y la proteína A agarosa se obtuvo de Upstate Biotechnology. La construcción de la línea celular FFA1 fusionado con la proteína verde fluorescente (GFP) en el extremo C-terminal se obtuvo de OriGene y los anticuerpos que reconocen a la GFP se obtuvieron en el laboratorio [89]. El anticuerpo policlonal de conejo MAPK p-p44/42 (T202/Y204) y el anticuerpo p44/p42 MAPK (ERK1/2)(137F5) policlonal de conejo se obtuvieron de Cell Signaling. Rodamina (TRITC)-conjugated affini-pure donkey anti-mouse IgG(H+L) se obtuvo de Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. Las membranas de polivinildifluoride (PVDF) se obtuvieron de Immobilon P transfermembrane y el Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate 100 ml se obtuvo de Millipore.

VII.2 *Línea celular*

El receptor FFA1 fusionado con el epítipo FLAG en el extremo N-terminal se subclonó en la línea celular derivada de riñón de embrión humano (por sus siglas en inglés: HEK293) con el sistema de expresión de células de mamífero regulado por el represor de tetraciclina/doxiciclina (por sus siglas en inglés: T-REx). La línea celular HEK293 T-Rex FFA1 fue generada por el equipo del Dr. Gozoh Tsujimoto (Universidad de Kyoto, Japón). Las células HEK293-TREx FFA1 se sembraron en cajas de Petri de 10 cm de diámetro. Se mantuvieron en medio DMEM (7 ml) suplementado con 10% de suero fetal de bovino, adicionado con 100

μg/ml de estreptomicina y 100 u/ml de Penicilina. El cultivo celular se mantuvo incubado a 37°C, en 95% de aire y 5% de CO₂. Un día previo a cada experimento, la expresión del receptor se indujo con 1μg/ml de doxiciclina. La línea celular estable que expresa FFA1 fusionada con GFP se obtuvo en el laboratorio transfecando las células HEK 293 con el plásmido de la construcción utilizando Lipofectamina 2000 de acuerdo al instructivo del fabricante. Las clonas que expresaban la construcción fueron seleccionadas por incubación con G418, por su respuesta a DHA en los ensayos de calcio y por la fluorescencia. Las células seleccionadas crecieron en medio DMEM suplementado con G418 (300ng/mL).

VII.3 Expresión del receptor FFA1 en el sistema inducible T-REx

El sistema T-REx es un sistema de regulación de la expresión de genes de células mamíferas que utiliza los elementos reguladores del operón de resistencia a tetraciclina (Tet operón). El sistema de regulación de tetraciclina T-REx se basa en la inducción de la expresión del gen de interés en presencia de tetraciclina y en su represión en ausencia del antibiótico [90,91]. Los principales componentes del sistema T-REx son:

- Vector de expresión inducible. Contiene el gen de interés cuya expresión es regulada por el promotor humano de citomegalovirus (CMV) que contiene dos copias de las secuencias del operador de *tet* (TetO₂). La secuencia de TetO₂ sirve como sitio de unión para 4 moléculas del represor (o dos homodímeros) de tetraciclina (TetR) (figura 10 panel A)
- Vector pcDNA 6/TR de regulación. La expresión del gen de TetR se encuentra bajo el control del promotor CMV (figura 10 panel B)

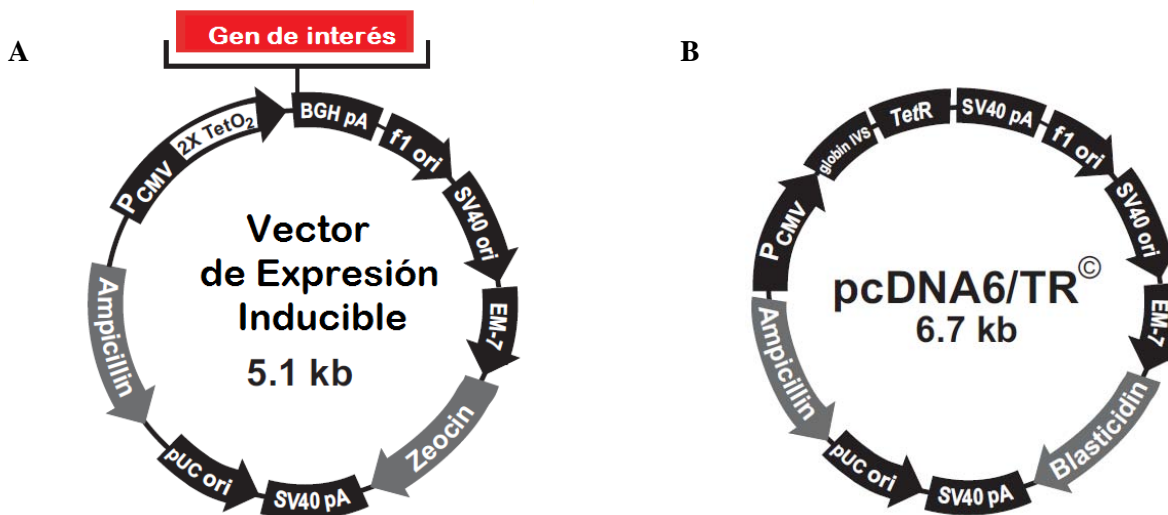


Figura 10. Mapa de los vectores del sistema de expresión de genes sistema inducible de expresión T-REx. (A) Mapa del vector con el sistema de expresión inducible. El promotor humano inmediato de CMV (P_{CMV}) seguido por las secuencias de los dos operadores de *tet* (2xTetO₂) regula la transcripción del gen de interés. (B) Mapa del vector pcDNA6/TR que contiene el gen del represor de tetraciclina (TetR) regulado por el promotor humano inmediato de CMV (P_{CMV}). Imagen tomada de Invitrogen, Lifetechnologies 2011.

Definición	Función
Promotor humano inmediato de citomegalovirus (P _{CMV})	Aumenta la expresión del gen TetR (pcDNA 6/TR) o el gen de interés (vector del sistema de expresión inducible).
Intron de globina de conejo II (IVS)	Aumenta la expresión del gen TetR
Gen TetR	Codifica para el represor de tetraciclina que se une a las secuencias de los operadores de tet para reprimir la transcripción del gen de interés en ausencia de tetraciclina.
SV40 señal de poliadenilación (SV40 pA)	Permite la terminación de la transcripción y poliadenilación del RNA mensajero.
Origen fl (fl ori)	Permite el rescate del DNA de hebra sencilla
SV40 origen y promotor (SV40 ori)	Permite y aumenta la expresión del gen de resistencia a blasticidina en células mamíferas
Promotor EM-7 (EM-7)	Promotor sintético procarionte que permite la expresión del gen de resistencia a blasticidina en <i>E.coli</i>
Gen de resistencia a blasticidina o zeocina	Permite la selección de células mamíferas establemente transfectadas (blasticidina vector pcDNA6/TR y zeocina vector de expresión inducible)
Gen de resistencia a Ampicilina	Permite la selección de <i>E.coli</i> transformante
Origen pUC (pUC)	Aumenta el número de copias y crecimiento en células <i>E.coli</i>

Cuadro 3. Definición y función de los componentes de los vectores del sistema inducible de expresión T-REx. Invitrogen, Life Technologies, 2011.

En ausencia de tetraciclina, el TetR en forma de homodímero se une con alta afinidad a la secuencia de TetO₂, manteniendo así la represión de la expresión del gen de interés. La tetraciclina presente en el medio, se une con alta afinidad con TetR (estequiometría 1:1) y causa un cambio conformacional en la estructura de Tet que lo impide unirse en los sitios de TetO₂. El complejo TetR:tetraciclina se disocia de los operadores de tetraciclina y permite la transcripción del gen de interés (figura 11)

La doxiciclina es un inductor del sistema T-REx alternativo a la tetraciclina. La doxiciclina presenta una estructura y mecanismo de acción similar a la tetraciclina; sin embargo la doxiciclina tiene un mayor tiempo de acción (48 horas vs 24 horas de la tetraciclina) [90].

1. En ausencia de tetraciclina, el represor de tetraciclina (TetR) que se encuentra en el vector pcDNATM6/TR, se expresa en altas concentraciones y forma homodímeros que se unen con alta afinidad a la secuencia los dos operadores de tetraciclina (TetO₂) en el promotor del plásmido de expresión inducible.

2. La unión de TetR a la secuencias de TetO₂ reprime la expresión del gen de interés.

3. La tetraciclina que se encuentra en el medio se une con tetR, y promueve un cambio conformacional que impide su unión a los sitios localizados en TetO₂. La liberación de los sitios TetO₂ permite la transcripción de los genes de interés.

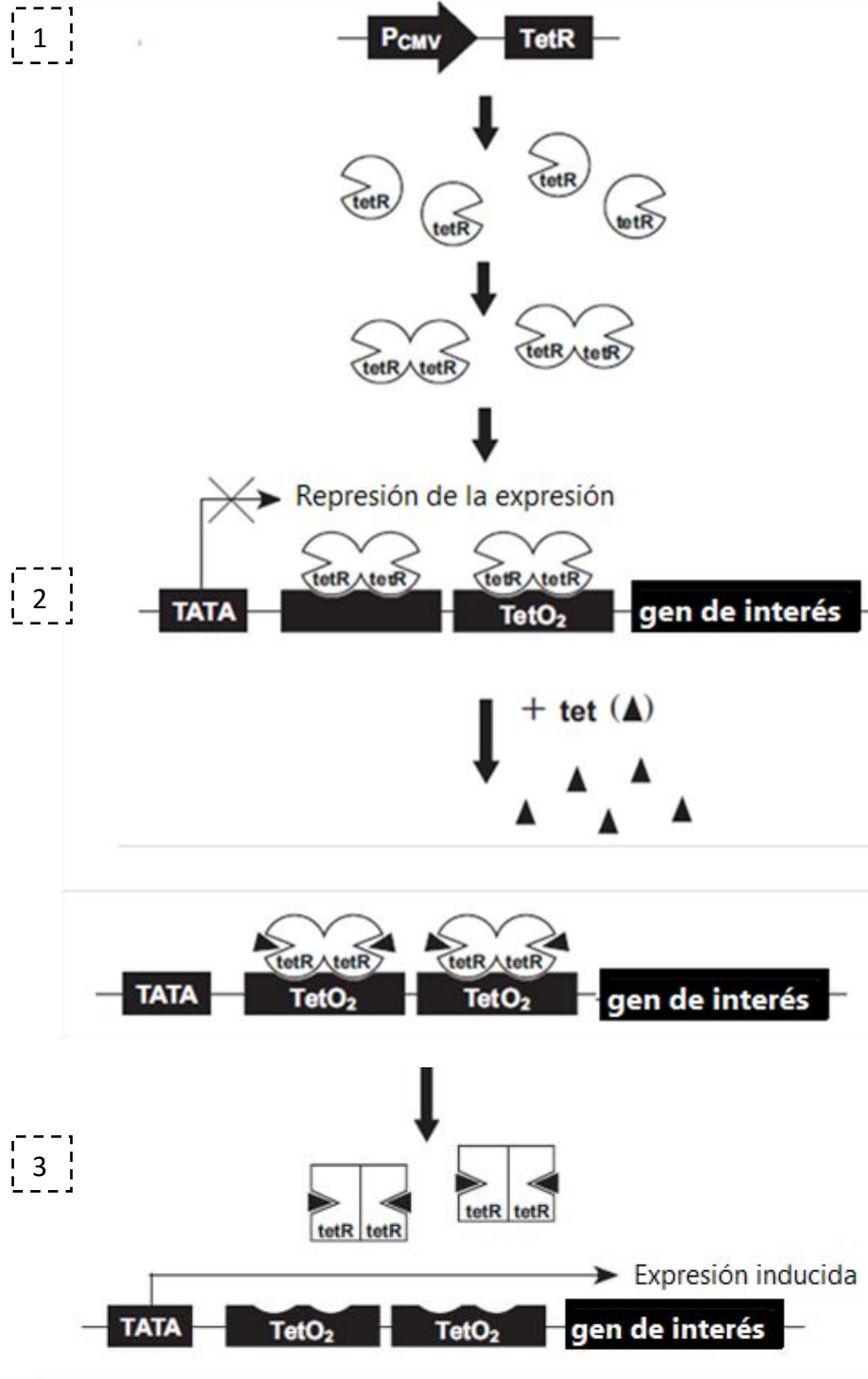


Figura 11. Modelo del mecanismo de acción de la tetraciclina sobre el sistema inducible T-REx. Invitrogen, Lifetechnologies, 2011.

VII.4 Medición de la concentración de Calcio intracelular

El día del experimento, los cultivos celulares que presentaban un 80% de confluencia se ayunaron con medio DMEM (7mL) sin suero de bovino fetal por 2 horas. El cultivo celular se cargó con Fura-2 AM (2.5 μ M) en Krebs-Ringer-HEPES-Glucosa (NaCl 120 mM, HEPES 20 mM, KCl 4.75 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 127 mM, glucosa 10mM, 0.05% de albúmina de suero de bovino, pH 7.4) por 1 hora a 37°C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se utilizó verseno (20mg/100ml) por 5 minutos a 37°C, con la finalidad de desprender las células de la caja y concentrarlas en un tubo Falcon de 15 ml que contenía el buffer Krebs-Ringer-HEPES-Glucosa. Con la finalidad de eliminar los residuos de Fura-2 AM extracelulares, se realizaron tres lavados con la solución Krebs-Ringer-HEPES-Glucosa. Se resuspendió la pastilla de células formado con la solución Krebs-Ringer-HEPES-Glucosa con albúmina desgrasada para no interferir con la respuesta de los estímulos. Se registraron los cambios de fluorescencia a una longitud de onda de excitación a 340 a 380 nm y emisión de 510 nm.

La concentración de calcio libre intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) se calculó como se describió por Grynkiewicz et al. (1985) usando la ecuación:

$$[Ca^{2+}]_i = Kd (F - F_{min} / F_{max} - F)$$

En donde:

- F_{min} = fluorescencia mínima
- F_{max} = fluorescencia máxima
- Kd = constante de afinidad del Fura-2 AM por Ca²⁺ (224 nM)

La fluorescencia máxima se obtuvo al lisar las células con TritonX-100 al 10% y la fluorescencia mínima se obtuvo al adicionar el quelante EGTA 5 mM. Los trazos se calcularon con el software de Amino-Bowman y las gráficas se realizaron en Prism 5.0/Graph Pad.

VII.5 Ensayos de fosforilación del receptor FFA1 con [³²P]Pi

Se sembraron las células HEK 293 transfectadas con el receptor FFA1 en una placa de 6 pozos. Una vez que alcanzaron una confluencia del 90%, se indujeron con doxíciclina (10 μ g/ml) por 12 horas. Posteriormente se incubaron por 3 horas a 37°C con el medio de cultivo DMEM sin suero y sin fosfatos que contenía [³²P] Pi (100 μ Ci/ml) (Perkin y Elmer). Como siguiente paso, las células se estimularon con los tratamientos

correspondientes. Se paró la reacción aspirando el medio y colocando las células sobre hielo y lavándolas dos veces con solución amortiguadora de Fosfatos PBS (NaCl 0.15 M y Na₂HPO₄ 10 mM a pH 7.4).

Se agregó 500 µL de solución amortiguadora de lisis frío a pH 7.4 (Tris-HCl 50 mM, pH7.4; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM pH8.0; pirofosfato de sodio 10mM, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 100µM, β glicerofosfato 10 mM, PMSF 100 µg/ml, fosfo-serina, fosfo-tirosin y fosfo-treonina 1 mM, inhibidores de proteasas SDS 10%) a cada pozo y se incubaron por 1 hora sobre hielo. Posteriormente se levantaron los lisados y se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se colocaron en tubos Eppendorf de tapa plana de 1.5 ml, que contenían la resina anti-FLAG (25 µl). Los tubos se colocaron en una gradilla de acrílico y se dejaron en agitación toda la noche en refrigeración.

Al día siguiente, las muestras se lavaron con el amortiguador de lavado frío (HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaF 10 mM, SDS 0.05% a pH 7.2); entre cada lavado las muestras se agitaron vigorosamente y se centrifugaron. El sobrenadante se eliminó por aspiración. A los receptores fosforilados e inmunoprecipitados se les agregó la solución de carga (Laemmli 2x con 5% de β-mercaptoetanol, Tris 1 M pH 6.8, glicerol 20%, SDS 0.04% y azul de bromofenol 0.01%. Se adicionó también SDS 10% y urea 8 M). Las muestras se hirvieron por 5 min y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min. Las muestras se corrieron en un gel de acrilamida (SDS-PAGE) al 10.5%. Los geles se secaron y se transfirieron en membrana de PVDF, fueron colocados en una placa de autoradiografía por toda la noche. La visualización y detección se realizó empleando el programa Image Quant del equipo Thyphoon del sistema Phosphor Imager de Molecular Dynamics. La densitometría se cuantificó utilizando el programa ImageJ.

VII.6 Detección de la forma activa de ERK por inmunoensayo

Las células se sembraron en una placa de 6 pozos e incubaron y hasta presentar una confluencia entre el 80-85%. Las células se trataron con DHA (30µM), α-LA (30µM) o EGF (100 ng/ml) durante 5 minutos y con el inhibidor AG1478 (10 µM) durante 15 minutos. Posteriormente al tratamiento, las células se lavaron dos veces con PBS no estéril y lisaron con 400 µL de buffer Laemmli (Tris HCL 0.5 M, SDS 10%, glicerol, β-mercaptoetanol 5%) en cada pozo y se dejaron en hielo durante una hora.

Los lisados totales se hirvieron por 5 minutos y centrifugaron por 5 minutos a 10,000 rpm. Se corrieron los lisados (40 µL) en geles SDS-PAGE al 10% a 110V y posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF por 1 hora a 120 mA. Las membranas se bloquearon con .5% de leche sin grasa disuelta en TBS-Tween (NaCl 136 mM y Tris 19.8 mM, Tween 0.1% a pH 7.6) por una hora a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con una dilución 1:2000 de anticuerpo p-ERK (P-p44/42) y con el anticuerpo ERK total 1:10,000, con leche al 2% disuelta en TBS-Tween. Al día siguiente, se lavaron tres veces con 10 ml de TBS-Tween por 5 minutos. Las membranas se incubaron con el anticuerpo

secundario que tiene acoplada la peroxidasa de rábano (HRP-Goat-anti Rabbit IgG (H+L)) a una dilución 1:10,000 en TBS-Tween por 1 hora. Después de tres lavados con 10 ml de TBS-Tween por 5 minutos, las membranas se revelaron por quimioluminiscencia. En análisis densitométrico de cada inmunoblot se realizó con el programa Image J.

VII.7 *Microscopia Confocal*

Las células HEK293 FFA1-GFP se sembraron en caja de Petri con fondo de vidrio y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Al alcanzar un 20% de confluencia, las células se ayunaron por 3 horas con DMEM sin suero y posteriormente se estimularon. Las células se lavaron con PBS 0.1M una vez ya fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS 0.1M durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados para quitar el exceso de paraformaldehído con PBS 0.1M. Las imágenes se tomaron con el microscopio confocal Olympus Fluoview FV10 con objetivo de inmersión de agua (60x) y se visualizaron con el programa ImageJ.

VII.8 *Análisis Estadístico*

Los resultados se calcularon utilizando el programa Graph Prism 5. Se presentan las medias con el error estándar en cada gráfica. Los datos se evaluaron por análisis de varianza (ANOVA) de una vía. La comparación de los datos se realizó por la prueba de comparación múltiple de Bonferroni considerando $p < 0.05$ y $p < 0.001$ como significativa. Los tiempos medios ($t_{1/2}$) se calcularon por análisis de regresión no lineal.

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Modelo del receptor FFA1 y los sitios de fosforilación predecibles por análisis *in silico*

Por un análisis *in silico* utilizando el software GPS 2.1 [83] se determinaron los sitios probables de fosforilación por diferentes proteínas cinasas. El programa permite realizar una comparación en la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés con los sitios consenso de diversas proteínas cinasas [92]. Los resultados del análisis arrojaron dos sitios probables de fosforilación para cada una de las siguiente cinasas: PKC (T215, S298), PKB (T293, T287) y GRK (S298 y S293) y un sitio de fosforilación localizado en la primera asa intracelular para PKA (T39) (figura 12). Con base a estos resultados se decidió explorar si el receptor FFA1 es una fosfoproteína. Como primer paso es contar con un sistema que exprese el receptor y sea funcional

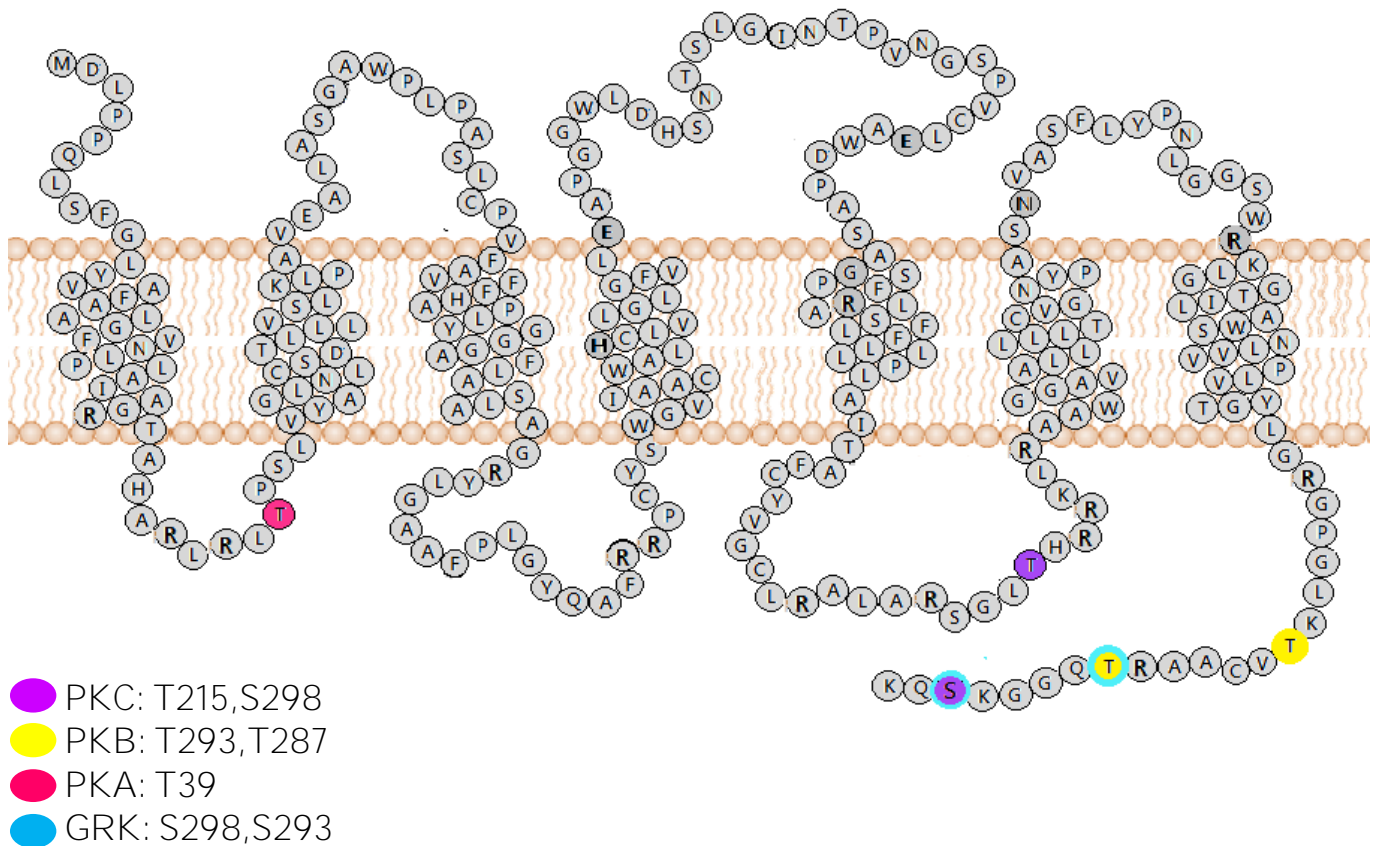


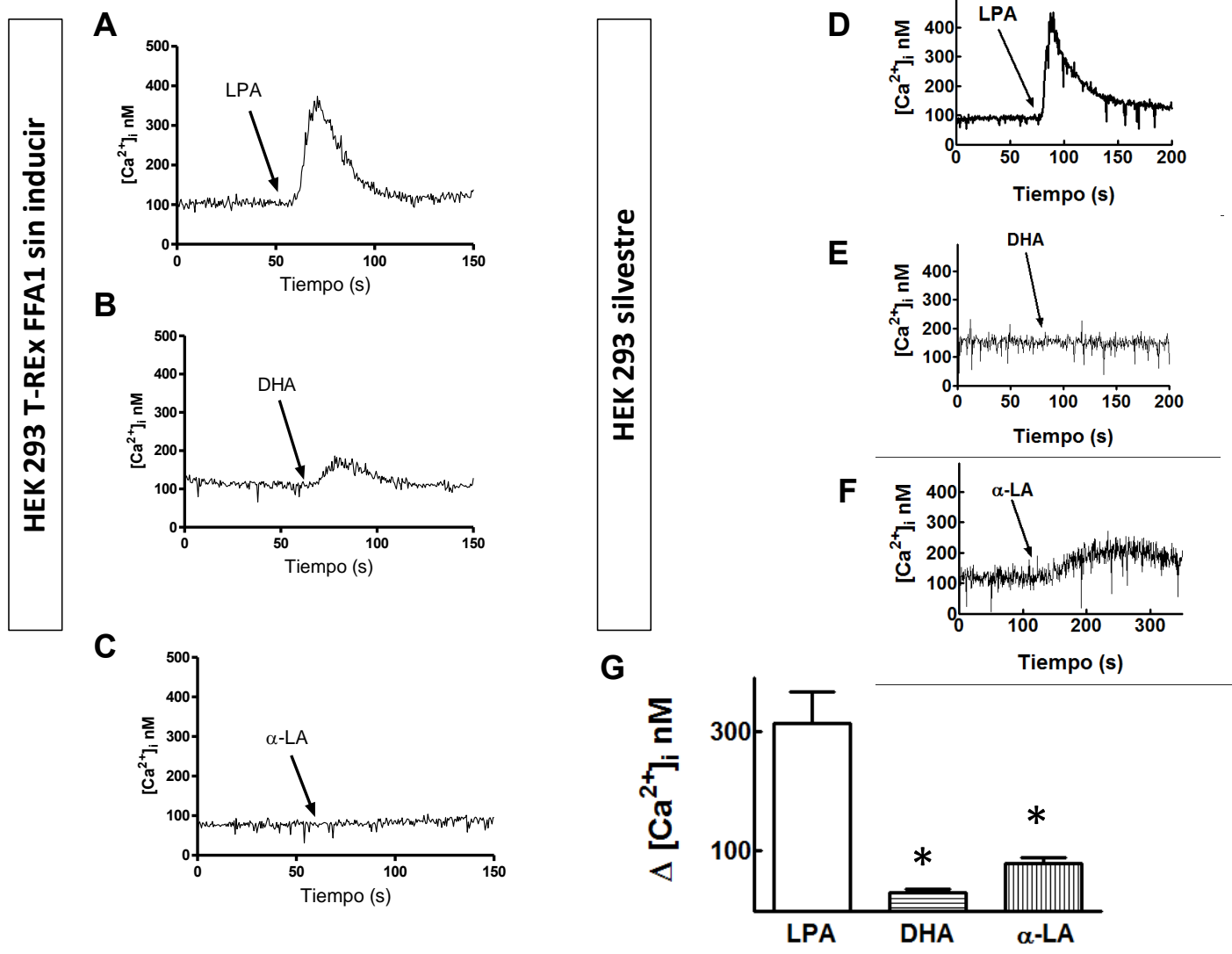
Figura 12. Modelo de los sitios de fosforilación del receptor FFA1 predecibles por análisis *in silico*. Modelo de la estructura del receptor FFA1 donde se señala con diferentes colores, los residuos posibles de fosforilación por cuatro cinasas: la proteína cinasa C (PKC), la proteína cinasa B (PKB), la proteína cinasa A (PKA) y la cinasa de los GPCRs (GRK).

VIII. 2. Activación del receptor FFA1 por DHA y α -LA

Para comprobar que los efectos observados en los experimentos se debía a la activación del receptor FFA1 por DHA y α -LA, utilizamos dos líneas celulares que no contenía la expresión del receptor FFA1: 1) la línea celular HEK 293 silvestre que no tiene la construcción del receptor FFA1-TREx transfectado 2) la línea celular HEK 293 FFA1-TREx que no fue inducida con doxiciclina (ver en métodos y materiales).

Las células HEK 293 expresan de manera endógena los receptores para ácido lisofosfatídico, (LPA) por lo que se considero a este lípido como nuestro agonista control en todos los experimentos [89]. LPA (1 μ M) genera un incremento en la concentración de calcio intracelular de 300 nM en la línea celular HEK293 T-REx FFA1 sin inducir (Gráfica 1 panel A); en cambio DHA o α -LA no generan un efecto significativo (Gráfica 1 panel B y C). Con base en los resultados obtenidos, se sugiere que: 1) el sistema T-REx regula la sobreexpresión del receptor FFA1 en la membrana y 2) la actividad de GPCRs endógenos en la línea celular HEK 293 no se alteró por la presencia de la construcción del sistema T-REx.

Las células HEK293 silvestres se comportaron de manera similar que las células HEK293 T-REx sin inducir, observando que en ambas líneas celulares, hay una baja respuesta ante DHA y α -LA en comparación con la respuesta de LPA (Gráfica 1 paneles D-G). Se ha reportado que el receptor FFA1 no se expresa de manera endógena en esta línea celular [93].

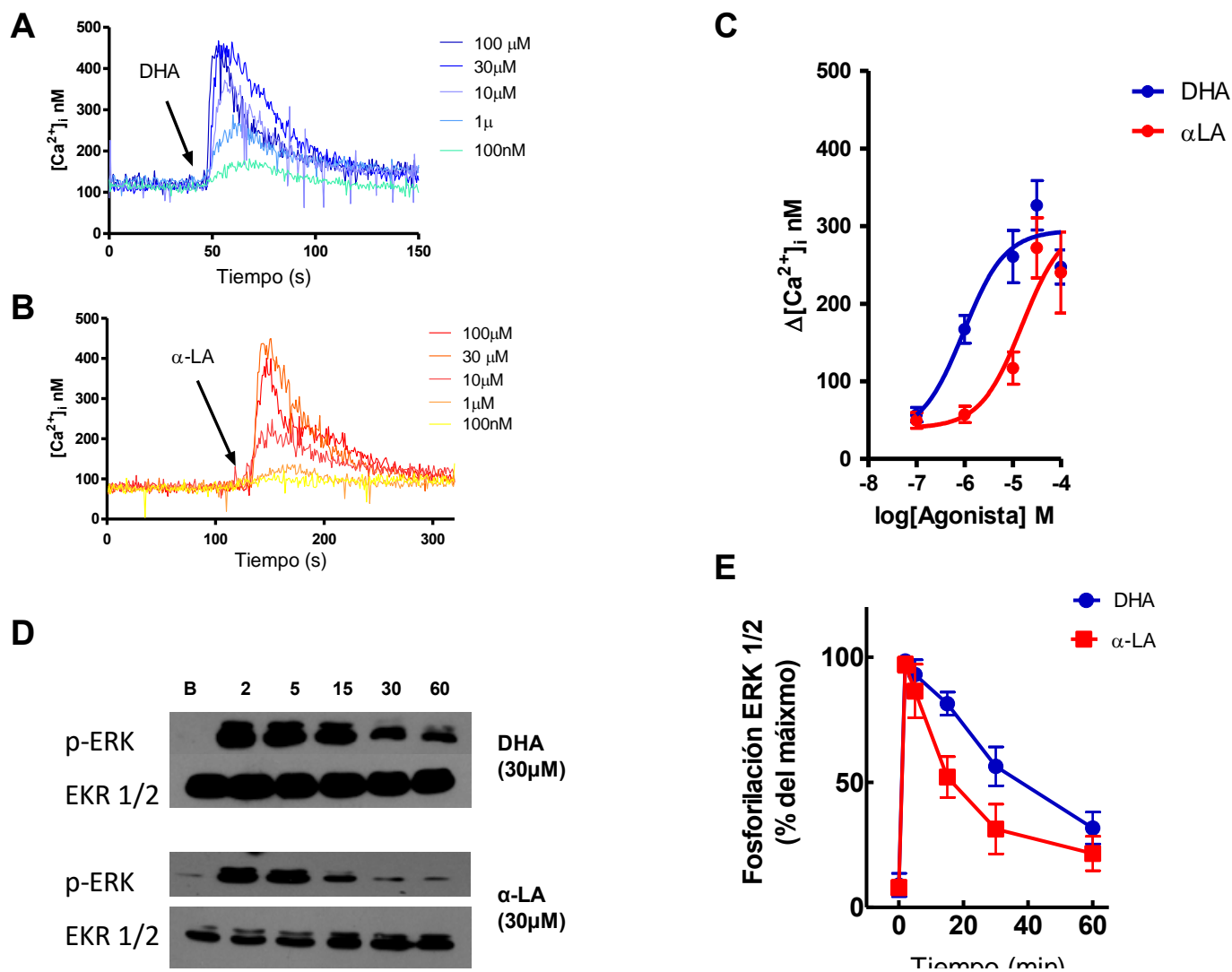


Gráfica 1. Efecto de LPA, DHA y α-LA, en la línea HEK293 T-REx FFA1 no inducida y HEK 293 silvestres. Se determinó el efecto de LPA (1 μM), DHA (30 μM) y α-LA (30 μM) por ensayos de medición de cambios en la [Ca²⁺]_i en la línea celular HEK 293 T-REx FFA1 no inducidas (**A**, **B** y **C**) y en células HEK 293 silvestres (**D**, **E**, **F**, y **G**). LPA incrementa la concentración de calcio intracelular de manera rápida y transitoria, sin embargo DHA y α-LA generaron un efecto no significativo en ambas líneas celulares. La gráfica de barras representa los datos de 6 experimentos individuales con su promedio ±, S.E.M (* p < 0.05 vs LPA control).

Para caracterizar la respuesta del receptor FFA1 en los ensayos de medición de $[Ca^{2+}]_i$, las células HEK 293 T-REx FFA1 se indujeron con doxiciclina (ver en materiales y métodos: expresión del receptor FFA1 en el sistema inducible T-REx) previo a cada experimento. Los resultados del presente estudio demuestran que DHA y α -LA incrementan rápidamente y transitoriamente la concentración de calcio intracelular de manera dosis-dependiente. No se observó un efecto saturante de α -LA, ya que a concentraciones mayores a 30 μ M las células se dañaban o no respondían. Sin embargo, se muestra en la curva dosis respuesta, que el receptor FFA1 es activado con bajas concentraciones de DHA (EC_{50} 1 μ M), y el efecto de α -LA se observa utilizando concentraciones mayores (Gráfica 2 paneles A y B).

Otra forma de estudiar la actividad funcional del receptor fue mediante la fosforilación de la cinasa de estímulos externos ERK/MAPK por ensayos de inmunoblot. Como se muestra en la Gráfica 2 en los paneles D y E, DHA y α -LA promueven la fosforilación de ERK generando el efecto máximo en los primeros minutos; posterior a este tiempo, el efecto disminuye. Considerando el periodo de tiempo de 15 y 30 minutos, el efecto de DHA es mayor que el efecto de α -LA.

Los resultados de los ensayos de medición de la $[Ca^{2+}]_i$ y de fosforilación de ERK sugieren que el receptor FFA1 es activado por ácidos grasos insaturados y que DHA se comporta como un agonista de mayor potencia con respecto a α -LA.



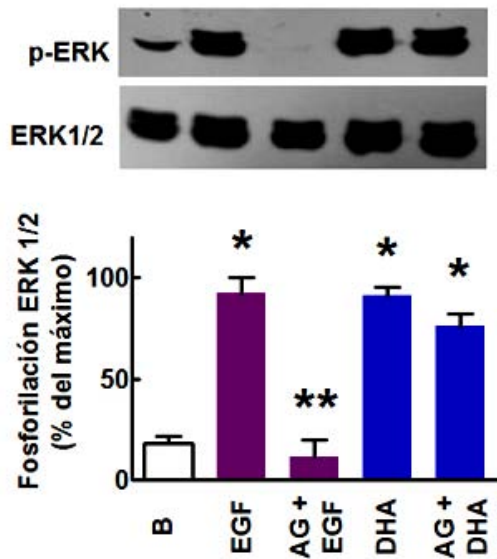
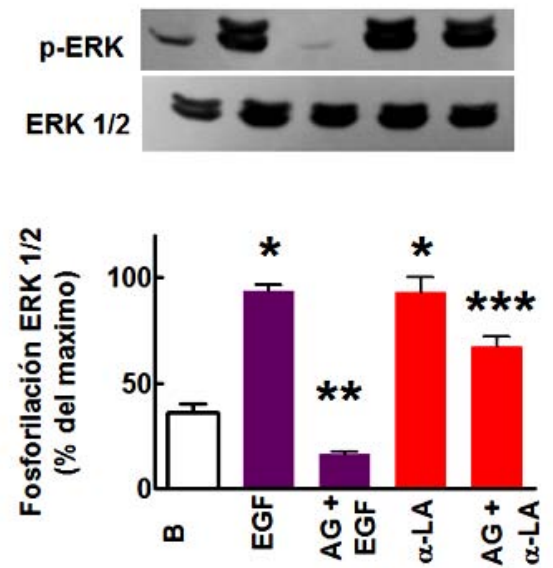
Gráfica 2. Efecto de DHA y α -LA sobre la movilización de la $[Ca^{2+}]_i$ en células inducidas HEK293 T-REx FFA1.

La línea celular HEK293 T-REx FFA1 fue inducida 12-24 horas previo al experimento y posteriormente se estimularon con DHA y α -LA a diferentes concentraciones y tiempos. (A y B) Trazos representativos de liberación de calcio intracelular por concentraciones crecientes de DHA o α -LA. (C) Curva dosis respuesta de DHA y α -LA sobre la movilización de $[Ca^{2+}]_i$. La gráfica de la curva dosis respuesta, representa los resultados de 6 experimentos independientes. Para evaluar el grado de activación de ERK, se realizaron inmunoblots con lisados totales que posteriormente se corrieron en geles SDS-PAGE al 10%. (D) Inmunoblot representativos de la fosforilación de ERK (p-ERK) inducido por DHA (30 μ M) o α -LA (30 μ M) a diferentes tiempos de exposición. (E) Curva de curso temporal de la activación de ERK por DHA (30 μ M) y α -LA (30 μ M). La densitometría de los inmunoblots se detectó con el programa ImageJ. La gráfica del curso temporal representa el análisis de la densitometría de los inmunoblots de 3 experimentos independientes con su promedio \pm S.E.M.

VIII. 3 Efecto de la activación del receptor de EGF sobre la actividad del receptor FFA1

Con la finalidad de confirmar si la activación de ERK por el receptor FFAR1 requiere de la transactivación del receptor de EGF, la línea celular HEK293 T-REx FFA1 se incubó por 15 minutos con el inhibidor del receptor EGF, AG1478 (10 μ M) y posteriormente se estimuló con EGF (100 ng/ml), DHA (30 μ M) y α -LA (30 μ M) durante 5 minutos. El efecto se determinó por ensayos de inmunoblot

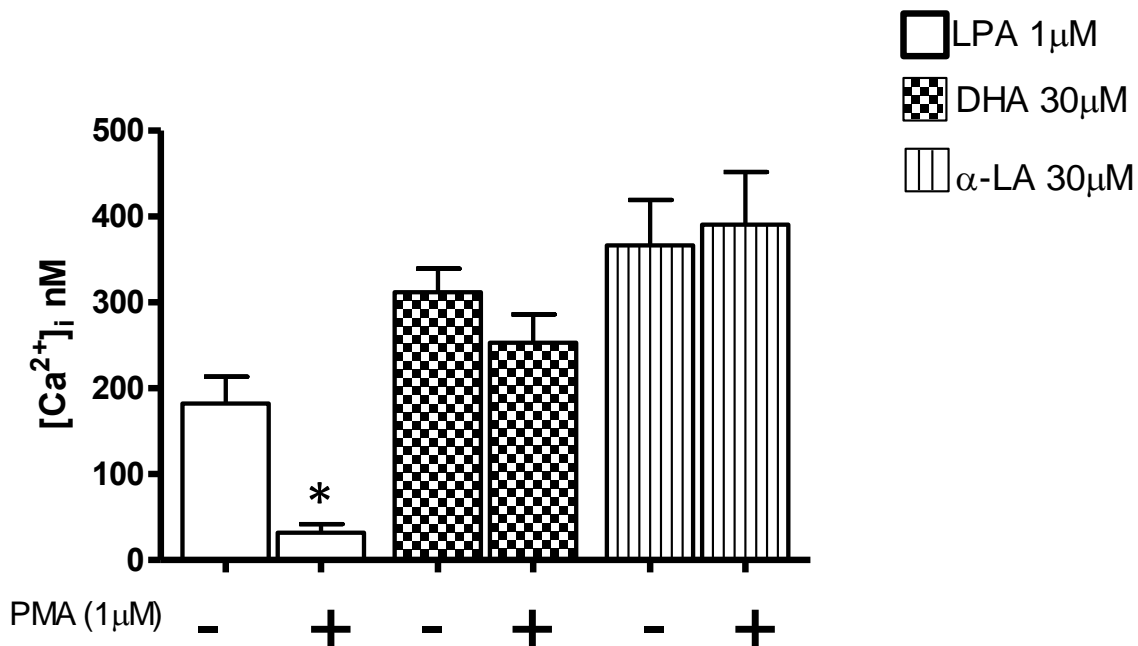
En células estimuladas con EGF, la fosforilación de ERK fue cinco veces mayor que el valor basal, sin embargo este efecto es atenuado por la presencia del inhibidor AG1478 (gráfica 3 paneles A y B). El receptor FFA1 al ser estimulado por DHA induce la fosforilación de ERK sin ser afectado por la acción del inhibidor AG1478 (gráfica 3 panel A). A pesar de que posiblemente el inhibidor del receptor EGF genera una disminución en la fosforilación de ERK inducido por α -LA (gráfica 3 panel B), la transactivación directa al realizar un mayor número de experimentos se observó que no generaba una diferencia significativa.

A**B**

Gráfica 3. Efecto del inhibidor AG1478 sobre la activación de ERK inducido por DHA, α-LA y EGF. La línea celular HEK293 T-REx FFA1 fue preincubada por 15 minutos con el inhibidor AG1478 (10μM) y posteriormente estimulada con EGF (100 ng/mL), DHA (30 μm) y α-LA (30μM) durante 5 minutos. Los extractos totales se corrieron en geles de SDS-PAGE al 10% y se transfirieron en membrana de PVDF. **(A)** Imunoblot representativo (parte superior) y el análisis de cada inmunoblot (parte inferior) del efecto de AG1478 sobre la activación de ERK inducida por DHA y EGF. **(B)** Imunoblot representativo (parte superior) y el análisis de cada experimento (parte inferior) del efecto de AG1478 sobre la activación de ERK inducida por α-LA y EGF. El análisis de los inmunoblots por densitometría se realizó con el programa ImageJ. Las gráficas representan los resultados de 4 experimentos independientes con su promedio ± S.E.M. (* p <0.001 vs el valor Basal) (**p < 0.001 vs EGF sin AG1478) (***) p <0.05 vs α-LA sin AG1478).

VIII. 4. Efecto de la PKC sobre la actividad del receptor FFA1

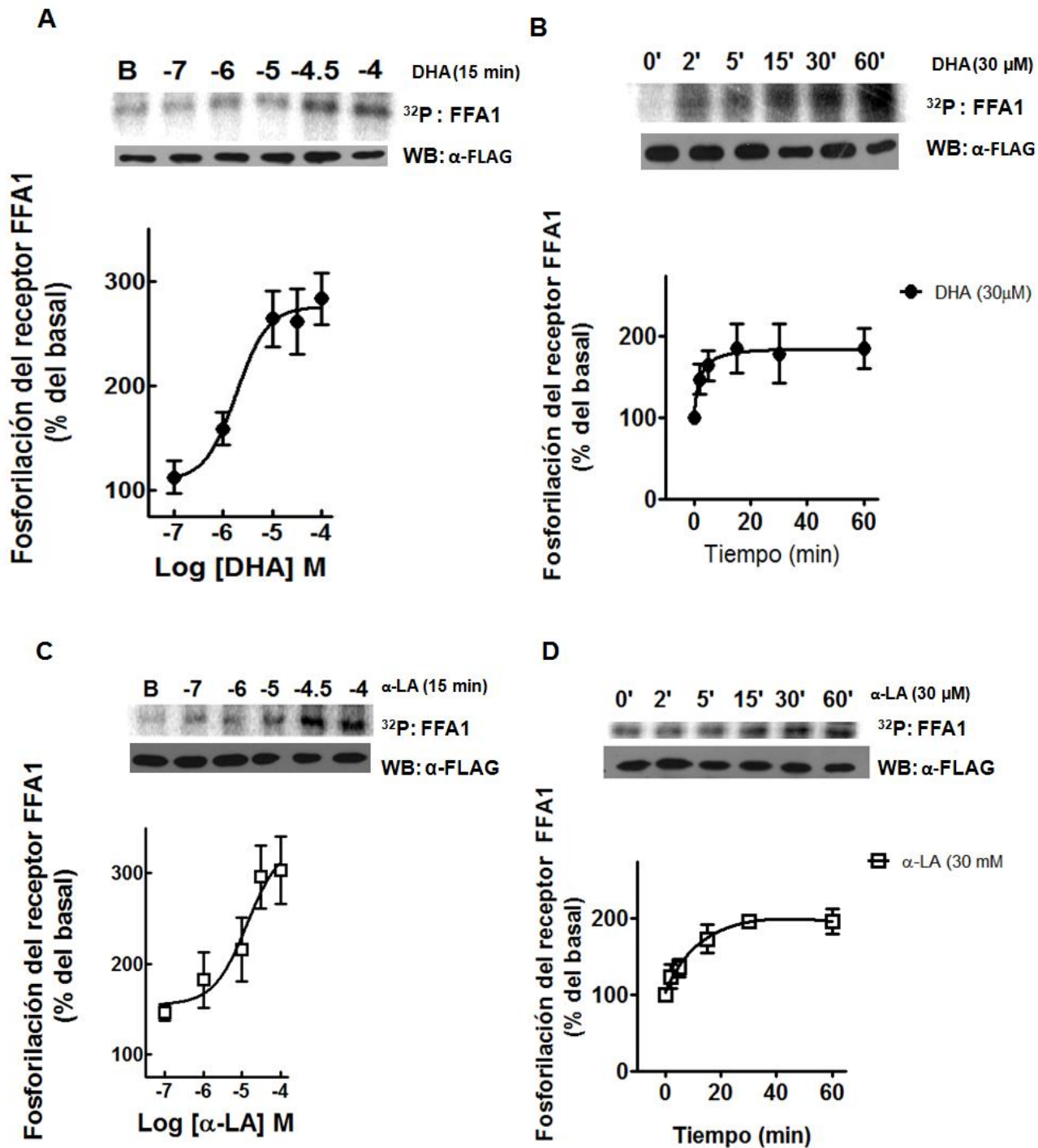
Estudios realizados en nuestro laboratorio mostraron que la fosforilación de los GPCRs inducida por GRK o por proteínas cinasas dependientes de segundos mensajeros, es un evento inicial para la desensibilización de los receptores. Para determinar si el receptor FFA1 se desensibiliza de manera heteróloga por PKC, las células HEK293 T-REx FFA1 se indujeron y preincubaron con el activador de PKC, PMA (1 μ M) durante 5 minutos. Posteriormente, se estimularon con LPA (1 μ M), DHA (30 μ M) y α -LA (30 μ M). LPA promovió un cambio en la concentración de calcio intracelular, sin embargo esta respuesta fue abatida por el efecto de PMA. De manera interesante, la activación de la PKC por PMA no bloqueó la respuesta del receptor FFA1 al ser estimulado por DHA o α -LA. Los presentes resultados muestran que el efecto disminuido de LPA se atribuye directamente a la desensibilización de los receptores de LPA por la PKC y no por la depleción de las pozas intracelulares de calcio, ya que la respuesta del receptor FFA1 se mantiene aún en presencia de PMA (Gráfica 4).



Gráfica 4. Efecto de PMA, un activador de PKC, sobre la actividad del receptor FFA1. La línea celular HEK293 T-REx FFA1 fue utilizada para estudiar la desensibilización heteróloga del receptor por PKC. Se midió el efecto de LPA (1 μ M), DHA (30 μ M) y α -LA (30 μ M) en células no preincubadas y preincubadas con PMA (1 μ M) durante 5 minutos por ensayos de medición de la concentración de calcio intracelular. El efecto de LPA se atenuó de manera significativa por la activación de PKC por PMA con respecto a su control. El receptor FFA1 no es afectado por PKC, al mantener su actividad cuando es estimulado con DHA o α -LA posteriormente a la incubaciones con PMA. La gráfica representa los resultados de 5 experimentos independientes se muestra la media \pm S.E.M. (* $p < 0.001$ vs LPA en ausencia de PMA)

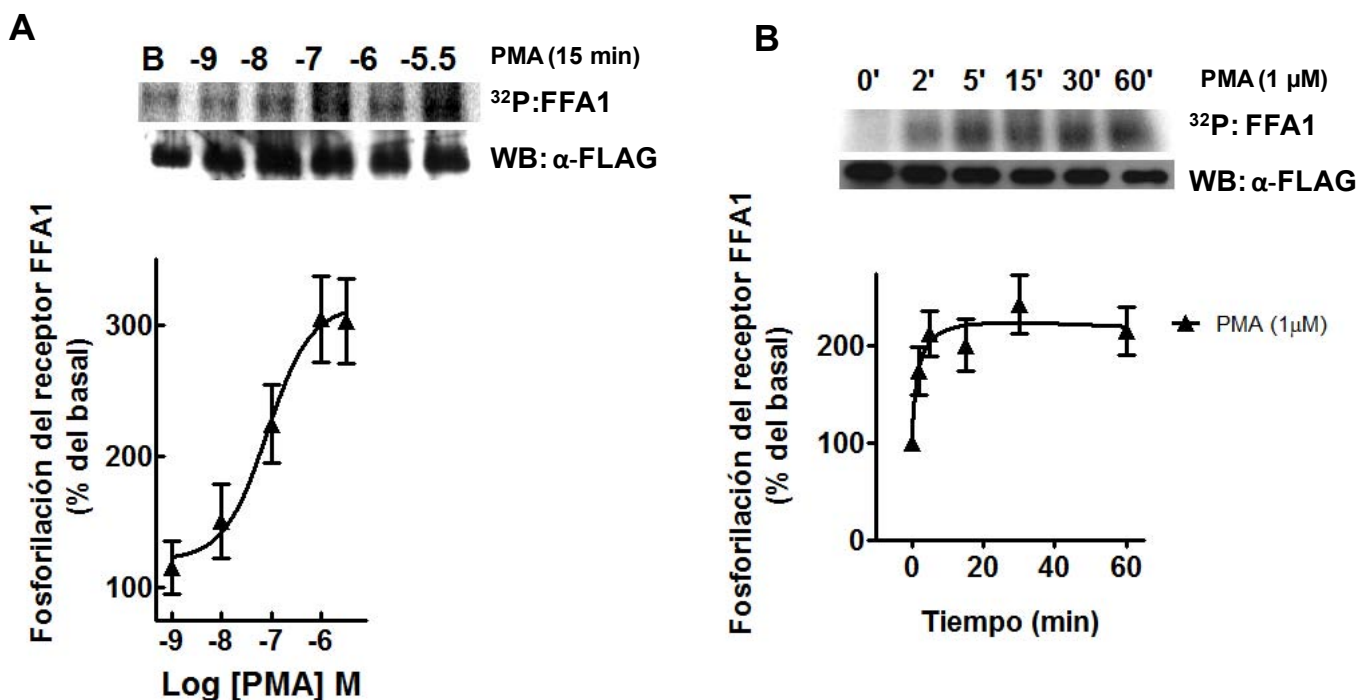
VIII. 5. Fosforilación del receptor FFA1 inducido por agonista y por la PKC

El estado de fosforilación del receptor inducido por DHA y α -LA se determinó en las células HEK293 T-REx FFA1. Los resultados mostraron que el receptor es fosforilado por el efecto de DHA y α -LA de manera dependiente de la concentración y tiempo de exposición. DHA promueve la fosforilación del receptor con una EC_{50} de 10 μ M, y alcanza su efecto máximo con una concentración de 100 μ M (Gráfica 5 panel A). El tiempo de fosforilación es inmediato ($t_{1/2}$ 2 min) y este efecto se mantiene por 1 hora (figura 16 panel B). α -LA induce la fosforilación del receptor de manera dosis dependiente, sin observar un efecto saturante (Gráfica 5 panel C). El efecto máximo de fosforilación se observa a los 15 minutos y se mantiene durante una hora (Gráfica 5 panel D).



Gráfica 5. Efecto de DHA y α -LA sobre la fosforilación del receptor FFA1. Para evaluar el grado de fosforilación del receptor FFA1, inducido por DHA (30 μ M) y α -LA (30 μ M) se realizaron ensayos de marcaje con fósforo radioactivo ($[^{32}\text{P}]\text{Pi}$) en la línea celular HEK293 T-REx FFA1. El receptor FFA1 fue inmunoprecipitado con la resina ANTI-FLAG monoclonal (ver metodología, ensayos de fosforilación). (A) Fosforilación del receptor FFA1 por concentraciones incrementadas de DHA (incubación con el agonista durante 15 minutos) y (B) a diferentes tiempos (incubación con el agonista 30 μ M). (C) Curva dosis respuesta de la fosforilación del receptor inducido por α -LA (incubación con el agonista durante 15 minutos). (D) Gráfica del curso temporal de la fosforilación del receptor por α -LA (30 μ M). Autoradiografía representativa de cada estímulo se muestra en la parte superior de la gráfica. Los análisis de densitometría de las autoradiografías se llevaron a cabo con el programa ImageJ. Las gráficas representan los resultados de 5-6 experimentos independientes con promedio \pm S.E.M.

Se logró identificar la banda que corresponde al peso del receptor (~35 kDa) por ensayos de inmunoblot, utilizando anticuerpos ANTI-FLAG. En los ensayos de medición de la $[Ca^{2+}]_i$, el receptor FFA1 no es desensibilizado por la activación de PKC. Para corroborar el efecto de PMA sobre el receptor, se evaluó el grado de fosforilación del receptor FFA1 por PKC, en la línea celular HEK293 T-REx FFA1 que fueron marcadas metabólicamente con $[^{32}P]Pi$ y estimuladas con PMA. El receptor FFA1 es fosforilado por PKC de manera dosis-dependiente con una EC_{50} de 100 nM (Gráfica 6 panel A). El efecto máximo se observa a partir de los 5 minutos y se mantiene por una hora (Gráfica 6 panel B). Los presentes resultados señalan que la fosforilación del receptor FFA1 puede ser de manera homóloga por efecto de DHA y α -LA, y de manera heteróloga por PKC, aunque no desensibilice al receptor.

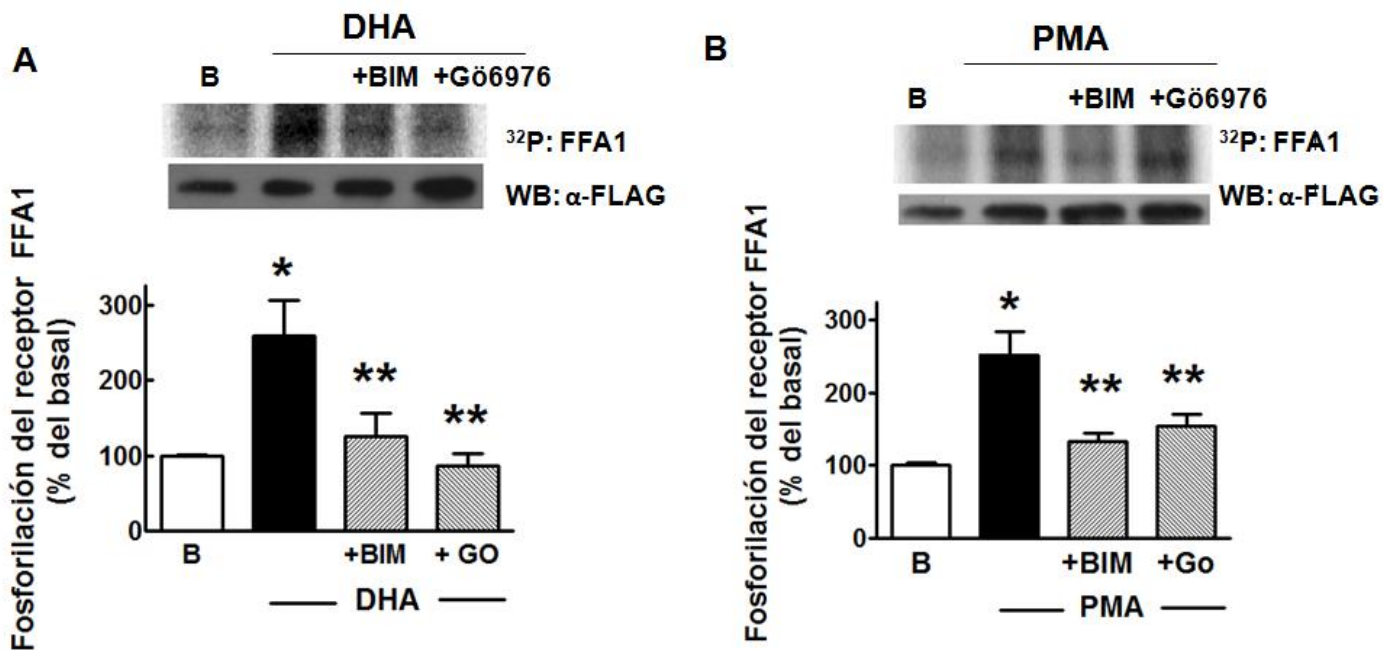


Gráfica 6. Efecto de PMA sobre la fosforilación del receptor FFA1. La línea celular HEK293 T-REx FFA1 fue marcada metabólicamente con $[^{32}P]Pi$ durante 4 horas y posteriormente se estimuló con PMA a concentraciones y tiempos diferentes. El receptor se inmunoprecipitó con la resina ANTI-FLAG monoclonal. El grado de la fosforilación del receptor FFA1 por PMA se presenta en (A) la curva dosis y (B) en el curso temporal. En la parte superior de cada gráfica se muestra la autorradiografía representativa. Las gráficas representan el análisis de las densitometrías de cada autorradiografía de 4-6 experimentos independientes con su promedio \pm y S.E.M.

VIII. 6. Efecto de los inhibidores de PKC, BIM y Gö6976, sobre la fosforilación del receptor FFA1

De forma general se acepta que, la desensibilización homóloga es conducida por la acción de las cinasas GRK aunque, se ha reportado que las isoformas de PKC también participan en la desensibilización homóloga de algunos GPCRs. Para estudiar si las isoformas de PKC participan en la fosforilación del receptor FFA1, la línea celular HEK293 T-REx FFA1 fue preincubada con dos inhibidores farmacológicos de PKC, 1 μ M de Bisindolilmaleimida I (BIM) y 1 μ M de Gö6976 durante 15 minutos previo a la estimulación con DHA (30 μ M) o PMA (1 μ M). BIM es un inhibidor de las isoformas clásicas y nuevas de PKC, mientras que Gö6976 selectivo de las isoformas de PKC α y β .

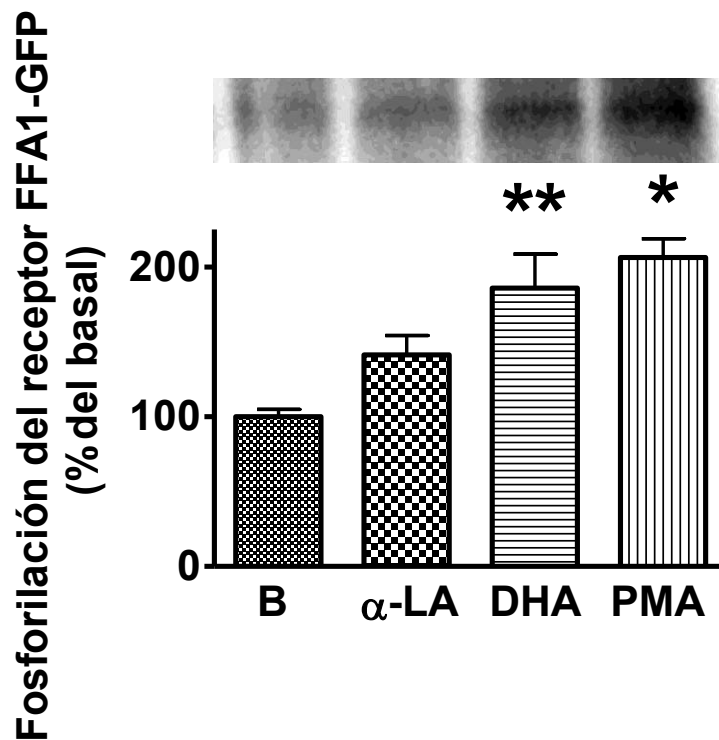
DHA y PMA inducen la fosforilación del receptor, sin embargo este efecto es disminuido por la presencia de BIM y Gö6976 (Gráfica 7 paneles A y B). Estos resultados sugieren que las isoformas clásicas de PKC participan en la fosforilación del receptor. Las isoformas PKC α y β son las principales cinasas que posiblemente llevan a cabo la fosforilación homóloga del receptor FFA1.



Gráfica 7. Efecto de los inhibidores BIM y Gö6976 sobre la fosforilación del receptor inducido por DHA o PMA. Se evaluó el grado de fosforilación del receptor FFA1 en las células HEK293 T-REx FFA1 que fueron metabólicamente marcadas con [32 P]Pi, preincubadas con BIM (1 μ M) y Gö6976 (1 μ M) durante 15 minutos y posteriormente fueron estimuladas con DHA (30 μ M) o PMA (1 μ M). El receptor se inmunoprecipitó con la resina ANTI-FLAG monoclonal. (A y B) En la parte superior, se muestra la autorradiografía representativa. La gráfica en la parte inferior, representa el análisis de densitometría de las autorradiografías de 5 experimentos independientes. Los resultados se muestran con promedio \pm S.E.M. (* p < 0.001 vs el valor del Basal) (** p < 0.005 vs el valor en ausencia del inhibidor)

VIII. 7 Efecto de DHA, α -LA y PMA sobre la fosforilación e internalización del receptor FFA1-GFP

Se determinó el efecto de DHA, α -LA y PMA sobre la internalización del receptor. La línea celular HEK293 FFA1 fusionado con la GFP en el extremo C-terminal se utilizó durante los ensayos de microscopia confocal, debido a que la inmunofluorescencia emitida por la Rodamina TRITC unido con el receptor FFA1, no nos permitió contrastar al receptor internalizado del receptor expresado en membrana de las células HEK293 T-REx. Nuestros resultados confirmaron, que la fosforilación del receptor FFA1 de la línea celular HEK293 FFA1-GFP es similar al efecto observado en la línea celular HEK293 T-REx (Gráfica 8). DHA promueve una mayor fosforilación del receptor FFA1, en comparación con el efecto de α -LA, sin embargo PMA promueve un estado de fosforilación mayor. Estos resultados coinciden con el efecto observado en las figuras 14 y 15. Las células HEK293 FFA1-GFP fueron estimuladas con DHA (30 μ M), α -LA (30 μ M) y PMA (1 μ M) durante 30 minutos y fijadas en cajas de fondo de vidrio. La expresión del receptor FFA1-GFP se delimita en la membrana celular en condiciones basales. DHA, α -LA y PMA alteran la distribución del receptor FFA1-GFP en la membrana celular y relocalizan al receptor en la zona citosólica de las células en compartimentos o vesículas (Figura 12). Estos resultados sugieren que la internalización del receptor es dependiente del estado de fosforilación del receptor (Gráfica 5 y 6).



Gráfica 8. Efecto de α -LA, DHA y PMA sobre la fosforilación del receptor FFA fusionado con la GFP. La línea celular HEK293 FFA1-GFP fue metabólicamente marcada con fósforo radioactivo y posteriormente se estimularon con α -LA (30 μ M), DHA (30 μ M) y PMA (1 μ M) durante 15 minutos. El receptor fue inmunoprecipitado con suero anti-GFP acoplada a proteína A agarosa y las muestras se corrieron en geles SDS-PAGE. La autoradiografía se visualizó con el equipo Typhoon y el análisis de la densitometría se realizó con el programa ImageJ. En parte superior, se muestra la autoradiografía representativa de la fosforilación del receptor FFA1-GFP y en la gráfica el análisis de los datos obtenidos de 6 experimentos independientes. Se representa el promedio \pm S.E.M. de cada experimento y la diferencia significativa (* $p < 0.001$ vs el valor basal) y (** $p < 0.05$ vs el valor basal)

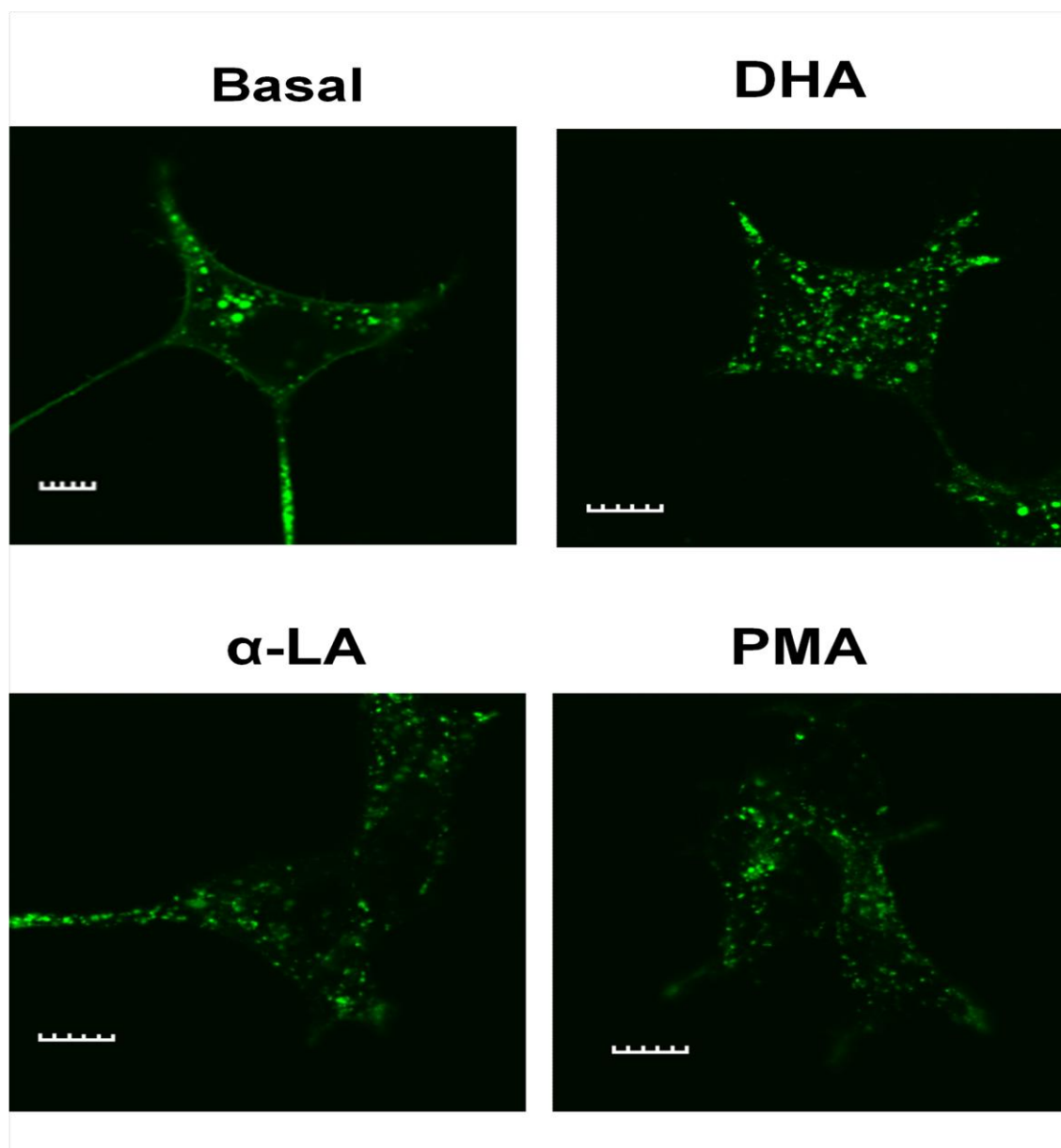


Figura 13. Efecto de DHA, α -LA y PMA sobre la internalización del receptor FFA1. Imágenes representativas de la internalización del receptor FFA1 expresado en la línea celular HEK293 FFA1-GFP. Las células se estimularon con DHA (30 μ M), α -LA (30 μ M) y PMA (1 μ M) durante 30 minutos y se fijaron con paraformaldehído al 4%. Las células se visualizaron con el microscopio confocal FV10 Olympus. La barra indica una distancia de 10 μ m.

IX. DISCUSIÓN

El receptor GPR40/FFA1 es un GPCR que pertenece a la familia de los receptores activados por ácidos grasos no esterificados. Este receptor se encuentra acoplado a la proteína $G\alpha_{q/11}$ por lo que señala por la vía de fosfoinosítidos-calcio ($G\alpha_q/PLC\beta/PIP_2$ y $DAG/IP_3/Ca^2$) [52]. El conocimiento sobre la activación del receptor FFA1 por agonistas endógenos y sintéticos ha sido ampliamente demostrado; sin embargo, poco se sabe sobre su mecanismo de regulación. El objetivo de nuestro estudio fue determinar el efecto de los agonistas y de los activadores de la PKC, sobre la fosforilación e internalización del receptor. Estos dos últimos, son eventos de la desensibilización, por lo que su estudio es necesario para comprender el mecanismo de regulación del receptor FFA1 y su implicación en la señalización.

En el presente estudio, utilizamos la línea celular HEK 293 con el objetivo de entender el mecanismo de regulación del receptor FFA1 y medimos los cambios en la concentración de calcio intracelular como un fenómeno que indica el estado de activación del receptor en presencia de agonistas o del activador de PKC, PMA. Como lo demostraron los grupos de investigación de Yasuaki Itoh, Morgan N y Susanne Schnell [53,94], el aumento de la concentración de calcio intracelular inducido por los ácidos grasos, puede provenir del retículo endoplasmático y de la estimulación los canales de calcio tipo L dependientes de voltaje. Feng y colaboradores [96] demostraron que el receptor FFA1 es incapaz de incrementar la concentración de calcio intracelular cuando se depletan las pozas de calcio del retículo endoplasmático en células- β primarias.

Nuestros resultados coinciden con estudios previos, al observar que en las células estimuladas con DHA o α -LA se generó un incremento en la concentración de calcio intracelular. Durante los ensayos, DHA y α -LA activaron al receptor de manera transitoria y rápidamente, sin embargo el efecto de DHA fue más potente que α -LA. Diversos estudios que tratan sobre la activación del receptor FFA1, señalan que DHA y α -LA son dos potentes ligandos naturales en comparación con otros ácidos grasos libres como el ácido caproico [94]. En nuestros ensayos de medición de calcio intracelular, la concentración saturante de α -LA no se pudo determinar, debido a que las células se encontraban maltratadas. El α -LA es un ácido graso abundante en sangre ($1\mu M$), sin embargo en eventos experimentales, el exceso de ácidos grasos altera el ambiente de las células, afectando su función y su estructura [97].

ERK/MAPK es una cinasa que participa en la proliferación, diferenciación y sobrevivencia celular, que puede ser activada por la señalización de GPCRs [98]. Los efectos observados de los ácidos grasos poliinsaturados sobre la proliferación y sobrevivencia en la línea celular INS-1 (células pancreáticas) y MDA-MB-231 (células de cáncer de mama) promueve la activación de ERK por la vía de señalización del

receptor FFA1 [99]. En nuestro estudio, DHA y α -LA inducen la fosforilación de ERK, de manera inmediata y disminuye hasta los 60 minutos.

Una de las ventajas que proporciona el sistema T-REx es que las propiedades de los agonistas se observan de manera más pronunciada, debido a una elevada densidad de receptores en la membrana. El receptor FFA1 se subclonó de manera estable en el sistema de expresión inducible T-REx, con el objetivo de controlar la expresión del receptor previo a cada experimento y evitar la variabilidad entre los resultados. [90]. En este estudio observamos que las células HEK 293 FFA1 T-REx en ausencia de doxicilina, no generaban una respuesta ante el estímulo de DHA y α -LA. Con respecto a lo anterior, se comprobó que la expresión del receptor se encuentra regulada por el sistema inducible T-REx. Por otra parte, las células HEK 293 silvestre presentaron un efecto disminuido o bajo cuando eran estimuladas con DHA o α -LA. Durante los ensayos, las condiciones celulares se encontraban óptimas referido por el efecto observado de LPA en ambas líneas celulares. En las células HEK 293 silvestres presentaron una baja respuesta ante los ácidos grasos poliinsaturados, demostrando que las respuestas observadas se debe a la activación del receptor FFA1 sobreexpresado.

El principal mecanismo de transactivación de los GPCRs con el receptor EGF en diversas líneas celulares, ocurre por la activación de metaloproteinasas por GPCRs que liberan ligandos del receptor EGF, como el ligando de unión a heparina-EGF (por sus siglas en inglés: HB-EGF) [99]. Se ha determinado que en diferentes líneas celulares, la transactivación entre estos dos receptores promueve la sobrevivencia celular por activación de ERK. Como se observó en los resultados anteriores [100], el receptor FFA1 induce la fosforilación de ERK, por lo que se quiso determinar el papel del receptor EGF en la señalización.

El inhibidor del receptor EGF, AG1478, bloquea totalmente la fosforilación de ERK inducido por EGF. De forma interesante, AG1478 bloquea parcialmente el efecto de α -LA sobre la fosforilación de ERK, pero el efecto de DHA no se ve afectado por la presencia del inhibidor. La evidencia sobre la activación de ERK por la transactivación del receptor FFAR1 con el receptor de EGF es controversial. Mientras que el estudio de Hardy y colaboradores [101], mencionan que el oleato (C18:1 ω -9) no induce la transactivación del receptor de EGF. Guzman-Soto y colaboradores [99] señalan que la activación de ERK por el receptor FFA1 requiere de la transactivación con el receptor de EGF. Yonozawa y colaboradores [102] observaron que la proliferación celular inducida por oleato es por la vía de señalización de ERK. La literatura, sugiere que, el receptor FFA1 activa a ERK de dos maneras: de manera independiente y dependiente del receptor EGF. La distinción de la fosforilación de ERK por la vía de señalización del receptor FFA1 o por la transactivación con el receptor EGF pareciera ser que es dependiente de agonista. En nuestros resultados, el efecto potente de DHA es suficiente para promover la activación del receptor y la fosforilación de ERK. Nuestros resultados sugieren que la estimulación del receptor con α -LA requiere de la transactivación parcial del

receptor de EGF para activar a ERK. Una diferencia notable entre los ensayos realizados por Hardy, Guzman-Soto y Yonozawa, y nuestros ensayos, fue el tipo de agonista que se utilizó para estudiar la actividad del receptor.

En la última década, se observó que los ligandos de los GPCRs pueden ser “funcionalmente selectivos” al activar preferentemente la señalización de una o más proteínas G o la señalización de las proteínas β -arrestinas. Estos ligandos sesgados se unen a sitios en el receptor distinto (sitio alostérico) al sitio de unión del ligando (ligando ortostérico). Los ligandos sesgados se caracterizan por su habilidad de modular la afinidad del agonista hacia una conformación del receptor que no altera su actividad. Mancini y colaboradores señalaron que los ligandos del receptor FFA1 son ligandos sesgados al demostrar que el ácido oléico y el ácido palmítico promueven mayormente la señalización de la proteína $G\alpha_{q/11}$ sobre la vía de la activación de las β -arrestinas [87]. Con respecto a los resultados obtenidos, se puede considerar que DHA y α -LA se comportan como ligandos sesgados al comparar la actividad de ambos agonistas en cada ensayo. La activación del receptor FFA1 por distintos ácidos grasos poliinsaturados, estabilizan diferencialmente estados de activación del receptor que permiten la interacción con otras proteínas intracelulares con la finalidad de generar una respuesta biológica específica. Se hace énfasis en considerar el tipo de agonista utilizado en los ensayos de la caracterización de vías de señalización del receptor FFA1 [103].

Los receptores de LPA, angiotensina tipo II, acetilcolina muscarínicos M_3 , μ -opioides y el receptor de esfingosina 1 fosfato 1 (por sus siglas en inglés: SIP1), son algunos ejemplos de GPCRs que son desensibilizados por PKC. Andrew B Tobin [104] propone que las proteínas cinasas fosforilan con una cinética diferente, sitios específicos localizados en el extremo C-terminal y en las asas intracelulares de los GPCRs. Este mecanismo funciona como un “código de barras” y en consecuencia, se activa una vía de señalización con mayor preferencia sobre otra. Diversos grupos que estudiaron el mecanismo de la fosforilación de los GPCRs, demostraron que la fosforilación no es exclusivamente requerida para la desensibilización [105]. Uno de los objetivos del presente estudio, consistió en determinar la función de la fosforilación del receptor FFA1. Los resultados mostraron que el receptor LPA es desensibilizado por el efecto de PMA, sin embargo, la PKC no bloqueó la activación del receptor FFA1 por DHA y α -LA. De manera interesante, observamos que el receptor es fosforilado de forma dependiente de agonista y por la PKC, sugiriendo que la fosforilación del receptor no es necesaria para la desensibilización.

La expresión de las isoformas clásicas y atípicas de PKC se han asociado con los mecanismos moleculares de diversas patologías [106,107], una de ellas es diabetes tipo 2. Demostramos que el receptor FFA1 es fosforilado por PKC de manera dependiente de agonista y por el efecto de PMA. Existe evidencia de la participación de PKC en la desensibilización homóloga en diversos receptores [108, 109] El receptor μ -opioide adapta un cambio conformacional específico de acuerdo a la eficacia de sus agonistas, exponiendo

los sitios de fosforilación para PKC o para GRK con una marcada preferencia. Con base en los resultados de nuestros experimentos, el receptor FFA1 es fosforilado por GRK y PKC, sin embargo la clase de agonista puede promover un cambio conformacional que favorezca la fosforilación de los sitios blancos para las isoformas PKC ϵ .

El análisis *in silico* del receptor FFA1, muestra sitios blancos de fosforilación para diversas cinasas, por lo que posiblemente, el patrón de fosforilación imparte distintas vías de señalización y respuestas biológicas que sean exclusivas del receptor FFA1 (por ejemplo la secreción de insulina).

Los agonistas del receptor FFA1 promueven la internalización del receptor por la vía de las β -arrestina 1 y preferentemente por la vía de las β -arrestina 2 [87,86]. Mancini y colaboradores detectaron que el reclutamiento de las β -arrestinas es dependiente de la activación de la proteína $G\alpha_{q/11}$ por el ácido palmítico y el ácido oléico. Por otra parte, el TAK-875, un agonista sintético y selectivo del receptor FFA1 promueve la internalización del receptor de manera independiente de la activación de la proteína $G\alpha_{q/11}$. Este mismo grupo señaló que la secreción de insulina por el receptor FFA1, es mediada por la funcionalidad selectiva de ambos agonistas.

En el presente estudio, el receptor FFA1-GFP se manifestó de manera similar al comportamiento del receptor FFA1 subclonado en la línea HEK293-TREx por lo que consideramos que la GFP no interfiere en la activación del receptor FFA1. Los efectos de DHA y α -LA sobre la internalización del receptor coinciden con los resultados hallados en los estudios de Qian Jan y Arturo Mancini [87,86]. El receptor FFA1 no es desensibilizado por PKC en los ensayos de medición de calcio intracelular, sin embargo si promueve la internalización del receptor. El mayor número de vesículas formadas se observa en las células estimuladas con DHA, refiriendo el efecto potente observado en los ensayos de actividad funcional del receptor FFA1 realizados en el presente estudio.

La mayoría de los GPCRs que son estimulados por su ligando, posteriormente internalizados en vesículas cubiertas de clatrina que requieren de la actividad de la GTPasa dinamina para separarse de la membrana plasmática y transportarse hacia el citosol [110]. Actualmente se ha reportado que los receptores de LPA, S1P1, β -adrenérgicos, hormona estimulante de tiroides y hormona paratiroidea son algunos ejemplos de GPCRs que en su estado endocitado son capaces de seguir señalizando, sugiriendo una vía “no clásica” de señalización” [111]. Se ha demostrado que los GPCRs son internalizados junto con sus ligandos y las proteínas G heterotriméricas y de esta manera, la señalización continúa (aún cuando el ligando ha sido retirado del medio); sin embargo este mecanismo puede variar de acuerdo al tipo de ligando. Ciertos ligandos del receptor de S1P1 y de la hormona paratiroidea promueven un estado conformacional que favorece el mantenimiento y la duración de la señalización por vía endosomas sobre la señalización desde la membrana plasmática [110,112].

La internalización de los GPCRs contribuye no solamente a la terminación de la señal, si no a la señalización alterna de las proteínas G, sin embargo es importante considerar factores que pudieran influir como la afinidad del receptor por el ligando, el grado de fosforilación del receptor, la afinidad de las proteínas β arrestinas, el destino intracelular del receptor y su ligando, y ambiente celular donde se encuentre [111]. Arturo Mancini y colaboradores mencionan que el receptor FFA1 promueve la liberación de insulina por la vía de las β -arrestinas. A partir de la internalización del receptor FFA1 observada en el presente estudio, se puede sugerir que DHA induce un estado conformacional del receptor que favorece el estado activo por más tiempo en comparación con el α -LA. Posiblemente, la diferencia de los efectos de ambos agonistas no solo se limita en la activación, fosforilación e internalización del receptor, sino que también en la señalización del receptor FFA1 desde los endosomas.

X. CONCLUSIONES

El receptor FFA1 es fosforilado e internalizado de manera dependiente de agonista y por el efecto de PMA, siendo las isoformas de PKC clásicas las que realizan de manera pronunciada este efecto. La PKC no desensibiliza al receptor FFA1. El receptor promueve la activación de ERK, sugiriendo que es de manera independiente de la transactivación con el receptor EGF. La elaboración del presente trabajo ayuda a comprender mejor los mecanismos de regulación del receptor FFA1 por el efecto de sus agonistas naturales y por cinasas dependientes de segundos mensajeros.

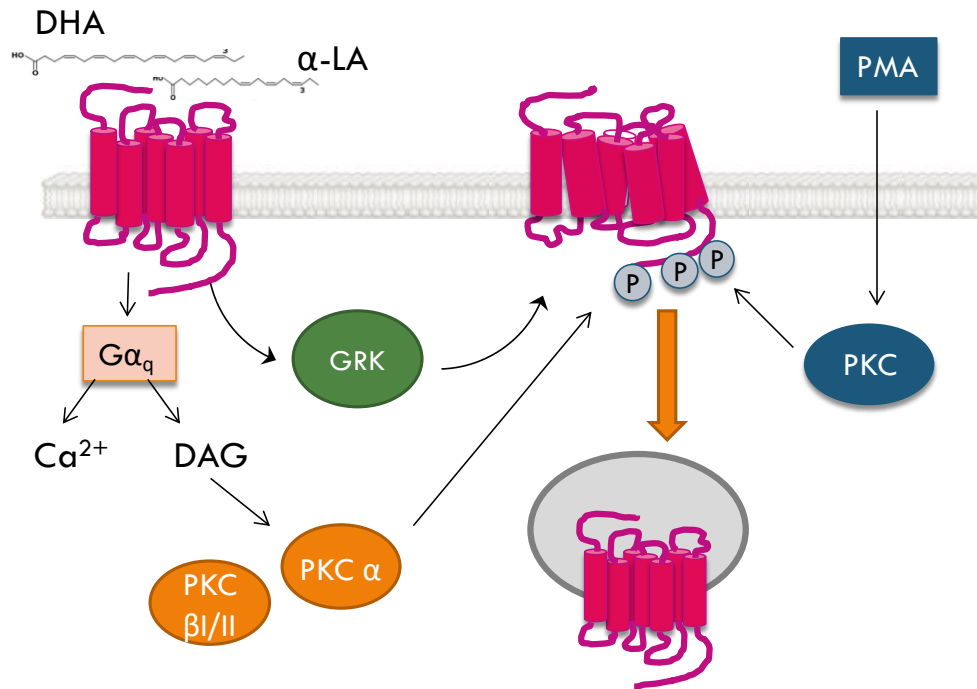


Figura 14. Modelo de la fosforilación e internalización del receptor FFA1 por ácidos grasos y PMA. El receptor FFA1 (lado izquierdo) al ser activado por DHA y α -LA, promueve la generación de DAG y calcio que funcionan como coactivadores de la PKC, principalmente de las isoformas clásicas. PKC también puede ser activada por PMA.

XI. ABREVIATURAS

PKC Proteína Cinasa C

FFA1 Receptor de ácidos grasos 1

GPCR Receptores acoplados a proteína G

PMA Éster de forbol, forbol miristato acetato

RTK Receptor con actividad de tirosina cinasa

Ca²⁺ Calcio

DHA Ácido docosahexaenoico

α-LA Ácido alfa linolenico

T-REx Sistema inducible de expresión de tetraciclina

ERK Cinasa regulada por señales extracelulares

PLC Fosfolipasa C

IP₃ Inositol 1,4,5 trifosfato

PIP₂ Fosfatidil inositol Bifosfato 4,5

GRK Proteína cinasa para GPCRs

EGF Factor de crecimiento epidérmico

GFP Proteína verde fluorescente

³²P Fósforo 32

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Hill S.J. G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br J Pharmacol*, 2006. 147 Suppl 1: S27-37
2. Hutchings C.J., Koglin M. y Marshall F.H., Therapeutic antibodies directed at G protein-coupled receptors. *MAbs*, 2010. 2(6): 594-606
3. Hara T. et al, Novel selective ligands for free fatty acid receptors GPR120 and GPR40. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2009. 380(3): 247-55.
4. Digby G.J., Conn P.J., y Lindsley C.W. Orthosteric and allosteric induced ligand directed trafficking at GPCR. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2010. 13(5): 587-594.
5. Kimple A., et al., Regulators of G-protein signaling and their G α substrates: promises and challenges in their use as drug discovery targets., *Pharm Rev* 2011. 63: 728-749
6. Magalhaes A.C., Dunn H. & Ferguson S.G. Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins., *British Journal of Pharmacology*. 2012. 165: 1717-1736
7. Hutchings C. J., Koglin M. y Marshall F. H.. Therapeutic antibodies directed at G protein-coupled receptors. *MAbs*, 2010. 2(6): 594-606.
8. Zhao, Y. y Natarajan V. Lysophosphatidic acid signaling in airway epithelium: role in airway inflammation and remodeling. *Cell Signal*, 2009. 21(3): 367-37
9. Bockaert, J. y Pin J.P. Molecular tinkering of G protein coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO journal*. 1999. 18 (7) 1723-1799.
10. Tuteja N. Signaling through G protein coupled receptors. *Plant signaling and behavior* 2009, 4(10):942-947.
11. Kobilka B.K. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta*. 2007, 1768(4): 794-807.
12. McCudden, C.R., et al. G protein signaling: back to the future. *CMLS*, 2005; 62: 551-577.
- 13 Kenakin, T. New concepts in drug discovery: collateral efficacy and permissive antagonism. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. 4(11): 919-27.
14. Rosenbaum, D.M., S.G. Rasmussen, and B.K. Kobilka, The structure and function of G protein-coupled receptors. *Nature*, 2009. 459(7245): 356-63.
15. Rasmussen, S.G., et al., Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 2011; 477(7366): 549-55.
16. Leonard A.P., et al. A high content, live cell and real time approach to the quantitation of ligand-induced β -arrestin2 and class A/class B GPCR mobilization. *Microsc Microanal*, 2013. 19 (1):150-170.
17. Hutchings, C.J., M. Koglin, y F.H. Marshall, Therapeutic antibodies directed at G protein-coupled receptors. *MAbs*, 2010. 2(6): 594-606.
18. Ng S.Y.L., Lee L.T.O., y Chow B.K.C. Receptor oligomerization: from early evidence to current understanding in class B GPCRs. *Frontiers in endocrinology*. 2013, 175 (3): 1-11
19. Cattaneo F., et al, Cell-Surface Receptors Transactivation Mediated by G Protein-Coupled Receptors. *Int. J. Mol. Sci*. 2014,15; 19700-19728.
20. McKay MM y Morrison D.K. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* ,2007, 26;3113–3121
21. Goldsmith ZG y Dhanasekaran DN. G Protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 2007; 26: 3122–3142
22. Pierce K. L., Luttrell, L. M. y Lefkowitz R.J. New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene* ,2001; 20: 1532-1539.
23. Fischer O.M, et al. EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochemical Society*, 2003; 31:1203-1208.
24. Kranenburg O y Moolenaar W.H. Ras-MAP kinase signaling by lysophosphatidic acid and other G protein-coupled receptor agonists. *Oncogene*, 2001; 20: 1540 -1546
25. Von Zastrow M. Regulation of G protein coupled receptor by phosphorylation and endocytosis. *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress*, Chapter 5: Regulation of G coupled protein receptors. 2002 59-70.

26. García-Sáinz A.J., Vázquez-Prado, J. y Medina L.C. α_1 - Adrenoreceptors: function and phosphorylation. *European Journal of Pharmacology* 1999, 389 (2000):1-12.
27. Ferguson S.S. Evolving concepts in G protein coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. 2001, 53 (1):1-24
28. Pao C.S. y Benovic J.L. Phosphorylation-independent desensitization of G protein coupled receptor? *Science STK*, 2002; 152: 1-3.
29. Shenoy S.K. y Lefkowitz R.J. β -arrestin mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends in pharmacology science*, 2011; 32(9): 521-533.
30. Lefkowitz, R.J., Rajagopal K. y Whalen E.J. New roles of β arrestins in cell signaling: not just for seven transmembrane receptor. *Molecular Cell*, 2006; 24:643-652.
31. Pearce L, Komander D y Alessi D.R. The nuts and bolts of AGC protein kinase. *Molecular cell biology*, *Nature review* 2010;11:9-22.
32. Mushegian, A, Guverich V.V. y Guverich E.V. The origin evolution of G-protein coupled receptor kinases. *PlosOne*, 2012; 7(3): 1-12.
33. Steinberg, S.F. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev*, 2008. 88(4): 1341-1378
34. Newton, A.C. Protein Kinase C: Structure, Function, and Regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. 270(48): 28495-28498.
35. Breitkreutz, D., et al. Protein kinase C family: on the crossroads of cell signaling in skin and tumor epithelium. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2007. 133(11): 793-808.
36. Newton A.C. y Johnson, J.E. Protein Kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane targeting modules. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998; 1376: 155-172.
37. Silinsky, M.E. & Searl, T.J. Phorbol ester and neurotransmitters realise: more than just Protein kinase C? *British Journal of Pharmacology*. 2003, 138: 1191-1201
38. Lipp, P. and G. Reither, Protein kinase C: the "masters" of calcium and lipid. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011. 3(7).
39. Sawzdargo M, et al. A cluster of four novel human G protein coupled receptor gene occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 19q13.1. *Biochemical and biophysical research communication*. 1997; 239: 543-547.
40. Briscoe C.P. et al. The orphan G protein coupled receptor GPR40 is activated by médium and long chain fatty acids. *J.Biol Chem*, 2003; 278 (13):11303-11.
41. Stoddart, L.A., N.J. Smith, and G. Milligan, *International Union of Pharmacology. LXXI. Free fatty acid receptors FFA1, -2, and -3: pharmacology and pathophysiological functions. Pharmacol Rev*, 2008. 60(4): 405-17.
42. Brown A.J., Jupe S. y Briscoe C.P. A family of fatty acids binding receptor. *DNA and Cell biology*, 2005; 24(1):54-61
43. Milligan, G., et al., G-protein-coupled receptors for free fatty acids: nutritional and therapeutic targets. *Br J Nutr*, 2014. 111 Suppl 1: S3-7
44. Hara T, et al. Role of free fatty acids receptors in the regulation of energy metabolism. *Biochimica et biophysica acta*. 2014; 1841: 1292-1300.
45. Kimple M.E et al. Inhibitory G proteins and their receptors: emerging therapeutic target for obesity and diabetes. *Experimental and molecular medicine*. 2014; 46: 1-9.
46. Swaminath G. Fatty acid binding receptors and their physiological role in type 2 diabetes. *Arch Pharm Chem Life Sci*. 2008; 341: 753-761.
47. Huang, H., M.H. Dai, and Y.X. Tao, *Physiology and therapeutics of the free fatty acid receptor GPR40. Prog Mol Biol Transl Sci*, 2014; 121: 67-94.
48. Srivastava, A., et al., High-resolution structure of the human GPR40 receptor bound to allosteric agonist TAK-875. *Nature*, 2014. 513 (7516): 124-7.
49. Briscoe, C.P., et al., The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem*, 2003. 278(13): 11303-11
50. Chi Shing Sum, et al. Identification of residues important for agonist recognition and activation in GRP40. *JBC*, 2007; 282 (40): 29248-29255 -

51. Constanzi, S., Neumann S. y Gershengorn M.C. Seven transmembrane spanning receptor for free fatty acids as therapeutic targets for diabetes mellitus: pharmacological, phylogenetic and drug discovery aspects. *J. Biol Chem*, 2008; 283 (24): 16269-73.
52. Mancini A.D. y Poitout V. The fatty acid receptor FFA1/GPR40 a decade later: how much do we know? *Trends Endocrinol Metab*, 2013; 24 (8): 398-407.
53. Itoh Y, et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β cells through GPR40. *Letter to nature*, 2003; 422 : 173-176
54. Burant, C.F., Activation of GPR40 as a therapeutic target for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2013. 36 Suppl 2: S175-9
55. Alquier, T. y Poitout V. GPR40: good cop or bad cop? *Diabetes*, 2009; 58(5): 1035-1036.
56. Nagasumi, K. et al. Overexpression of GPR40 in pancreatic beta cells augments glucose-stimulated insulin secretion and improves glucose tolerance in normal and diabetic mice. *Diabetes*, 2009; 58(5): 1067-76
57. Matsuda-Nagasumi K. et al. Lack of GPR40/FFAR1 does not induce diabetes even under insulin resistance condition. *Diabetes Obes Metab*, 2013; 15(6) : 538-545.
58. Kebede M. et al. The fatty acid receptor GPR40 plays a role in insulin secretion in vivo after high fat feeding. *Diabetes* 2008; 57(9): 2432-7
59. Stenenberg P et al. The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab*, 2005; 1(4); 245-58
60. Briscoe, C.P., et al., Pharmacological regulation of insulin secretion in MIN6 cells through the fatty acid receptor GPR40: identification of agonist and antagonist small molecules. *Br J Pharmacol*, 2006. 148(5): 619-28.
61. Kim, I.S., et al., Differential Gene Expression in GPR40-Overexpressing Pancreatic beta-cells Treated with Linoleic Acid. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2015; 19(2): 141-9
62. Jain S. Chronic activation of a designer Gq coupled receptor improves β cell function. *The journal of clinical investigation*. 2013; 123 (4): 1750-1762
63. Kim, H.S., et al., PPAR-gamma activation increases insulin secretion through the up-regulation of the free fatty acid receptor GPR40 in pancreatic beta-cells. *PLoS One*, 2013. 8(1): 50128.
64. Nakamoto, K., et al., Hypothalamic GPR40 signaling activated by free long chain fatty acids suppresses CFA-induced inflammatory chronic pain. *PLoS One*, 2013; 8(12): 81563.
65. Edfalk, S., P. Stenoberg, and H. Edlund, Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes*, 2008; 57(9): 2280-7.
66. Rodriguez Cruz M. et al. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Revista de Investigación Clínica*. 2005; 57 (3): 457-472.
67. Cleland L.G., James M.J., y Proudman S.M. Fish oil: what the prescriber needs to know. *Arthritis and research therapy*. 2006; 8(202): 1-9.
68. Tvřzicka E. et al. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease- a review part 1: classification, dietary, sources and biological functions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomuc Czech Rep*. 2011; 155 (2); 117-130.
69. Dranse H.J., Kelly M.E.M. y Hudson B.D. Drugs or diet? Developing a novel therapeutic strategies targeting the free fatty acid family of GPCR. *British Journal of Pharmacology*. 2013; 170: 696-711.
70. Ooi E.M.M., et al. Effect of dietary fatty acids on human lipoprotein metabolism: a comprehensive update. *Nutrients*, 2015; 7:4416-4425
71. Catalá A. Five decades with poliunsaturated fatty acids: chemical synthesis, enzymatic formation, lipid peroxidation and its biological effects. *Journal of Lipids*. 2013; 1-19.
72. Dyall S.C. Long chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Frontiers in aging neuroscience*. 2015; 7 (52): 1-15.
73. Jump, D.B., The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem*, 2002. 277(11): 8755-8.
74. Haber E.P., et al. Pleiotropic effects of fatty acids on pancreatic β -cells. *Journal of cellular physiology*, 2002; 194:1-12
75. Mukhopadhyay, R. Essential Fatty Acids: The work of George and Mildred Burr. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287 (42): 35439-35441.

76. Holliday, N.D., Watson S.J. y Brown A.J.H. Drug discovery opportunities and challenges at G protein coupled receptors for long chain free fatty acids. *Frontiers of endocrinology*. 2012.; 2 (112): 1-12.
77. Nolan C.J. et al. Fatty acid signaling in the β - cell and insulin secretion. *Diabetes*, 2006; 55 (2): s16-23
78. Warnotte, C., Nenquin M. y Henquin J.C. Unbound rather than total concentration and saturation rather than unsaturation determine the potency of fatty acids on insulin secretion. *Molec and cell endocrinology*. 1999; 155: 147-153.
79. Crespin S.R., Greenough III W.B y Steinberg D. Stimulation of insulin secretion by long free fatty acids. A direct pancreatic effect. *The journal of clinical investigation*, 1979; 52: 1979-1984.
80. Ye J. Role of insulin in the pathogenesis of free fatty acid-induced insulin resistance in Skeletal muscle. *Endocrine, Metabolic and immune disorders- drug targets*. 2007; 7: 65-74.
81. Mo X.L., et al. Free fatty acid receptor GPR120 and pathogenesis of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Progress in molecular biology and translational Science*. 2013; 114: 251-275.
82. Balaban S. et al. Obesity and cancer progression: is there a role of fatty acid metabolism? *Biomed Research international*. 2015. 1-17
83. Yamashita T. Dual effects of the non-esterified fatty acid receptor GPR40 for human health. *Progress in lipid research*. 2015; 58: 40-50.
84. Dhayal S., Welters H.J. y Morgan N.G. Structural requirements for the cytoprotective action of mono-unsaturated fatty acids in the pancreatic β -cell, BRIN-BD11. *British Journal of pharmacology*, 2008; 153: 1718-1727.
85. Keane D y Newsholme P. Saturated and unsaturated (including arachidonic acid) non-esterified fatty acid modulation of insulin secretion from pancreatic β -cells. *Biochem. Soc. Trans*. 2008; 36: 955-958.
86. Qian, J., et al., Differential requirements of arrestin-3 and clathrin for ligand-dependent and -independent internalization of human G protein-coupled receptor 40. *Cell Signal*, 2014. 26(11): 2412-23
87. Mancini A, et al. β -arrestin recruitment and biased agonism at free fatty acid receptor 1. *JBC*, 2015; 1-15 Manuscript
88. Sanchez-Reyes O.B. et al. Free fatty acids and protein kinase C activation induce GPR120 (free fatty acid receptor 4) phosphorylation. *Eur J Pharmacol*, 2014; 723: 368-374.
89. Avendaño-Vázquez S., García-Caballero A. y García-Sáinz A.J. Phosphorylation and desensitization of lysophosphatidic acid receptor LPA₁. *Biochem J*. 2005; 385: 677-684.
90. Ward R.J., Alvarez-Curto E. y Milligan G. Using Flp-In T-REx system to regulate GPCR expression. Chapter 2. *Methods in molecular biology*, 2011; 746: 1-18.
91. T-REx system: A tetracycline-Regulated expression system for mammalian cells. Invitrogen, Lifetechnologies Corporation, 2011.
92. Xue Y, et al. GPS 2.1: enhanced prediction of kinase-specific phosphorylation sites with an algorithm of motif length selection. *Protein Eng Des Sel*. 2011; 24(3): 255-60. Disponible en: <http://gps.biocuckoo.org/>
93. Atwood B.K. et al. Expression of G protein coupled receptors and related proteins HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarrays analysis. *BMC Genomics*. 2011;12 (14):1-14
94. Schnell S, Schaefer M, y Schöfl C. Free fatty acids increase cytosolic free calcium and stimulate insulin secretion from β -cells through activation of GPR40. *Molecular and cell endocrinology*, 2007; 263: 173-180
95. Morgan N.G y Shalinee Dhayal. G protein coupled receptors mediating long chain fatty acid signaling in the pancreatic beta cell. *Biochem pharmacology*; 2009; 78: 1419-27
96. Feng D.D. et al. Reduction in Voltage-Gated K⁺ Currents in Primary Cultured Rat Pancreatic β Cells by Linoleic Acids. *Endocrinology*, 2005;147 (2): 674-682
97. Han Na Suh, et al Linolenic acid stimulates gluconeogenesis via Ca²⁺/PLC, cPLA₂ y PPAR pathways through GPR40 in primary cultured chicken hepatocytes. *Am J. Physiol Cell Physiol*, 2008; 295:1518-1527.
98. Eishingdrelo H. y Kongsamut S. Minireview: Targeting GPCR Activated ERK Pathways for Drug Discovery. *Current Chemical Genomics and Translational medicine*, 2013; 7: 9-15.
99. Soto-Guzman, A et al. Oleic acid induces ERK 1/2 activation and AP-1 DNA binding activity through a mechanism involving Src kinase and EGFR transactivation in breast cancer cells. *Molec and cellular endocrinology*. 2008; 249:81-91.

100. Madhura P. et al. **Activation of Extracellular Signal- Regulated Protein Kinases 1 and 2 (ERK1/2) by Free Fatty Acid Receptor 1 (FFAR1/ GPR40) Protects from Palmitate-Induced Beta Cell Death, but Plays no Role in Insulin Secretion.** *Cellular physiology and biochemistry*; 2015;35: 1537-45
- 101 Hardy S. et al. Oleates promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein coupled receptor GPR40. *J Bio. Chem.* 2005; 280: 13285-291.
- 102 Yonezawa T. Unsaturated fatty acids promote proliferation via ERK 1/2 and Akt pathway in bovine mammary epithelial cells. *Biochem and Biophys Research Commun.* 2008; 367: 729-735.
103. Wisler J. et al. Recent developments in biased agonism. *Curr Opin Cell Biol.* 2014; 26: 18-24.
104. Tobin A.B. G protein coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom.
- 105 Ferguson S.G. Phosphorylation-independent attenuation of GPCR signalling. *Trends in pharmacological science*, 2007; 28 (4): 173-179.
- 106 Beeson M. et al. Activation of Protein Kinase C ζ by Insulin and Phosphatidylinositol-3,4,5-(PO4)₃ Is Defective in Muscle in Type 2 Diabetes and Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes*, 2003; 52: 1926-34.
107. Shi Hao T. Induction of autophagy by palmitic acid via Protein Kinase C-mediated Signaling Pathway Independent of mTOR (Mammalian Target of Rapamycin). *J.Biol.Chem.* 2012;287:14364-76
108. Hull L.C. et al. The effect of protein kinase C and G protein coupled receptor kinase inhibition on tolerance induced by μ -opioid agonists of different efficacy. *JPET*, 2010;332 (3):1127-35.
109. Liu Q. et al. Distinct phosphorylation sites in the SST2A somatostatin receptor control internalization, desensitization and arrestin binding. *Mol Pharmacol*, 2008;73:292-304.
110. Calebiro D. et al. Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Science*, Cell Press, 2010; 31 (5): 221-228
111. Jalink K., y Moolenaar W.H. G protein coupled receptors: the inside story. *BioEssays*, 2010;32:13-16
112. Singh S.P. et al. Upon thyrotropin binding the thyrotropin receptor I internalized and localized to endosome. *Endocrinology* 2004; 145(2):1003-1010