



Memoria del 45º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Receptores acoplados a proteínas G y sus múltiples facetas

G protein-coupled receptors and their multiple facets

Guzmán-Silva, Alejandro¹ y García-Sáinz, J. Adolfo^{1*}

1. Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

*Correspondencia. Circuito Exterior, Zona de Investigación Científica. Ciudad Universitaria, Ciudad de México, CP 04510
Tel. +52 (55) 5622-5613, agarcia@ifc.unam.mx

Resumen

Los receptores acoplados a proteínas G constituyen una de las familias más abundantes de proteínas de membrana. Son sensores del medio externo (luz, olores, sabores) y del interno (iones, hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, autacoides). Participan en el mantenimiento de la homeostasis así como en la génesis y desarrollo de diversas enfermedades. Además son el blanco del 20-30% de los fármacos de uso cotidiano. Durante los últimos años, el avance en el conocimiento ha sido importante con avances que se presentarán a grandes rasgos en esta revisión incluyendo: a) su posible origen evolutivo en hongos y plantas y su proliferación hasta los mamíferos, b) avances en su clasificación por grupos o clases, c) cristalización y conceptos actuales de los cambios conformacionales que ocurren durante la activación e interacción con las proteínas G, d) cambios en los paradigmas farmacodinámicos incluyendo: agonistas totales, agonistas parciales, agonistas sesgados, antagonistas, agonistas inversos, moduladores alostéricos e inductores de la internalización, e) fosforilación, otras modificaciones post-traduccionales y su impacto en el destino celular de este tipo de receptores.

Palabras clave: Receptores acoplados a proteínas G, estructura, función, farmacodinamia, regulación, señalización.

Abstract

G protein coupled receptors are one of the most abundant families of membrane proteins. They sense the external environment (light, odors and tastes) and internal milieu (ions, hormones, neurotransmitters, growth factors, autacoids). They participate in cell physiology and also in the pathogenesis of diverse diseases. It is currently estimated that 20-30 % of currently used legal drugs target these receptors. Great advances have taken place during the last years in this area; in this review we will briefly mention some of them including: a) their possible origin and evolution, b) classification in groups or classes, c) crystallization and the current ideas on the conformational changes that take place during activation and coupling with G proteins, d) changes in the pharmacodynamic paradigms including the concepts of: full agonists, partial agonists, biased agonists, antagonists, inverse agonists, allosteric modulators and internalization inducers, e) their phosphorylation (and other modifications) as well as their role in receptor trafficking.

Key words: Key words: GPCR, G protein-coupled receptors, structure, function, pharmacodynamics, regulation, signaling.

Introducción

El concepto de receptor lo podemos rastrear desde el inicio del siglo XX cuando Paul Ehrlich [1] y John Newport Langley [2] lo describieron con base en la competencia que observaron entre agentes endógenos, como algunas hormonas y neurotransmisores, con diversos colorantes y venenos, en diversas preparaciones biológicas. Formalmente, Langley establece que "*corpora non agunt nixi fixata*", es decir, que los agentes no actúan a menos de que se fijen a una sustancia receptiva o receptor [2].

En los siguientes setenta años tiene lugar una enorme expansión del conocimiento, particularmente en cuanto a la descripción de hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento y autacoides u hormonas locales, así como a sus múltiples acciones en diversos órganos y tejidos. Alrededor de los años sesenta del siglo XX el concepto de receptor se une a los de transducción de señales o señalización (refiriéndose a los eventos moleculares que ocurren para que las hormonas o neurotransmisores induzcan sus acciones) y al de "segundos mensajeros" (refiriéndose a los agentes o mensajeros intracelular que se genera en respuesta a la hormona o neurotransmisor, considerados como los primeros mensajeros, para desencadenar los efectos celulares). Estos conceptos fueron elaborados en gran medida por Earl Wilbur Sutherland, Jr. y sus colaboradores [3,4]. Sutherland (Figura 1) recibe el Premio Nobel en Fisiología y Medicina en 1971 por sus descubrimientos sobre el AMP cíclico y su papel como segundo mensajero, además que es considerado por muchos como el padre de este campo de estudio.

Hasta los años setenta del siglo XX y a pesar de los espectaculares avances logrados hasta esos momentos, la idea de receptor permanece como tal, es decir, como una entidad meramente conceptual, sin conocimiento real sobre su naturaleza bioquímica, su estructura molecular, función o regulación. A partir de esa época y aprovechando los avances en el uso de elementos radioactivos para la síntesis de ligandos (agonistas o antagonistas) con alta actividad específica, se iniciaron los estudios cuantitativos de los receptores en los diferentes tejidos utilizando preparaciones de membranas. Jesse Roth, Ira Pastan y Robert J. Lefkowitz, -del que hablaremos más adelante-, son pioneros en estos estudios. Aprovechando la cinética no catalítica se establecen la densidad y la afinidad de los receptores en dichas preparaciones. También se inician los esfuerzos por purificar a diversos receptores; sin

embargo, no es hasta el final de los años ochenta en que se logra la clonación de algunos de ellos. Robert Lefkowitz (Figura 2) y su grupo fueron pioneros en la investigación para determinar todos estos aspectos, principalmente en los receptores adrenérgicos y su trabajo fue reconocido con el Premio Nobel de Química en el 2012 [5].



Figura 1. Fotografía de Earl W. Sutherland. Imagen obtenida de <https://ihm.nlm.nih.gov/luna/servlet/detail/NLMNLM~1~1~101441404~176173~1970-Award-Winner---Earl-W---Suther>

Los avances en Biología Molecular y el estudio de diversos genomas ya completos (entre ellos el humano), permiten conocer y agrupar a los diversos receptores en familias, así como su definición como estructuras proteicas concretas con expresión diferencial en los tejidos. A partir de ello podemos empezar a hablar de proteínas bien definidas, -cuya información genética es localizable en los cromosomas-, y que incluso logramos expresar en sistemas modelos para su estudio, ya sea en forma nativa o con modificaciones (mutaciones) realizadas para conocer más de su función y cómo ésta se relaciona con la estructura. A ello ha seguido la cristalización de los receptores y la posibilidad del conocimiento de su función a nivel atómico, lo que ha permitido el avance en el conocimiento del proceso de activación, así como en su relación con otras estructuras que participan en la señalización y en el apagado de su acción. Mediante el uso de proteínas fluorescentes fusionadas a los receptores, se ha logrado visualizar en tiempo y espacio, la movilidad de éstos en distintos compartimentos celulares, entre muchos otros aspectos [6]. Todo ello

ha impactado en la Bioquímica, en la Biología Celular y Molecular, en la Farmacología y en muchas de las actividades clínicas en los campos de la Medicina humana y veterinaria, y por supuesto en la enseñanza de todas estas disciplinas. En este artículo nos asomaremos a algunos de estos logros.



Figura 2. Fotografía de Robert J. Lefkowitz. Imagen obtenida de <http://www.mediatheque.lindau-nobel.org/laureates/lefkowitz>

Familias de receptores

Existen diversas clasificaciones de receptores, todas ellas con cualidades y limitaciones [7,8]. Una de ellas divide a los receptores en membranales e intranucleares. Los intranucleares, se denominan así dado que su acción principal la realizan en el interior del núcleo, no son proteínas intrínsecas de membrana y ejercen su acción canónica como moduladores de la transcripción.

Los receptores de membrana, son en su mayoría receptores que atraviesan la membrana plasmática. Se dividen en tres grupos fundamentales con base en su función. Uno de ellos son los receptores canal, también llamados canales activados por ligandos extracelulares o receptores ionotrópicos. Otro de los grupos son los receptores con actividad enzimática o que se unen a enzimas itinerantes. Muchos de sus miembros forman parte del llamado "kinoma" (agrupación de las enzimas presentes en el genoma); también se les ha llamado enzimas moduladas por ligandos extracelulares. Incluye a receptores con

actividad de proteína cinasa de tirosina (como los receptores para insulina, el factor de crecimiento epidérmico, entre muchos otros); con actividad de proteína cinasa de serina/ treonina (como los receptores para el factor transformante β (TGF- β , por su nombre en inglés); con actividad de proteína fosfatasa de tirosina (CD45 entre otros), con actividad de guanilil ciclasa (como el receptor para el factor natriurético auricular). Uno de estos receptores no es una proteína de membrana pero tiene función de guanilil ciclasa activada por el óxido nítrico y fármacos con grupo nitro. Además, también se incluye a un gran número de receptores que no tienen propiamente actividad enzimática pero que se asocian a diversos complejos enzimáticos (por ejemplo a los receptores para leptina, al de la eritropoyetina, al de la prolactina, a receptores para inmunoglobulinas y a las integrinas, entre otros).

Finalmente, están los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs por su nombre en inglés, *G protein-coupled receptors*). Reciben este nombre porque muchas de sus acciones ocurren por mediación de dichas proteínas G (que son GTPasas heterotriméricas) que modulan a los efectores membranales (enzimas y canales iónicos) (Ver [7,8]).

Receptores acoplados a proteínas G

Los GPCRs reciben otros dos nombres, el de receptores "metabotrópicos", frecuentemente usado en el área de las neurociencias y el de receptores de siete dominios transmembranales, haciendo referencia a su estructura. Como puede apreciarse en la Figura 3, estos receptores tienen su extremo amino terminal en el espacio extracelular, atraviesan la membrana plasmática en siete ocasiones y su extremo carboxilo terminal se localiza en el interior de la célula. Las siete asas transmembranales, formadas de 25 a 30 aminoácidos de naturaleza hidrofóbica, se interconectan a través de tres asas extracelulares y tres asas intracelulares.

Los GPCRs son sujetos de diversas modificaciones postraduccionales que regulan su localización y función. Muchos de ellos contienen en la porción proximal de su cola carboxílica una o más cisteínas que pueden ser palmitoiladas, creando así un sitio adicional de anclaje a la membrana y por ende una nueva asa intracelular. Otros son sujetos de N-glucosilación en asparaginas localizadas en el extremo amino terminal o asas extracelulares. Los GPCRs son substratos de diversas proteínas cinasas que modifican sus residuos de tirosina, serina y treonina, principalmente; muchas de estas fosforilaciones están asociadas a la desensibilización

(fenómeno en el cual la respuesta celular se ve atenuada) e internalización de este tipo de receptores, como se ampliará más adelante.

EXTRACELULAR

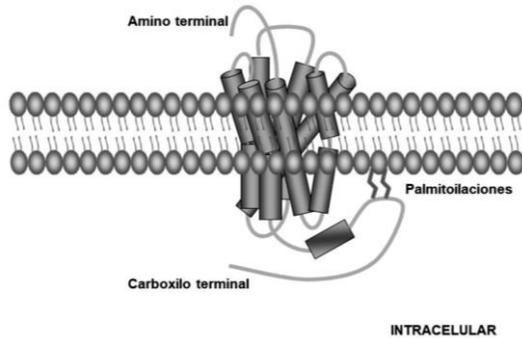


Figura 3. Representación esquemática de un GPCR. En el esquema se representa a la bicapa lipídica que constituye la membrana plasmática con el GPCR integrado a ella. Se señalan los espacios intracelular y extracelular y los extremos amino y carboxilo terminales. Además, se indica que en la zona correspondiente a la cola carboxílica se presentan frecuentemente amino ácidos (cisteínas) que pueden ser palmitoiladas.

La ubiquitinación y la SUMOilación de GPCRs también ha sido reportada y asociada a la degradación de los mismos (véase [9] y referencias citadas allí). Existe un grupo de GPCRs que se activa al ser proteolizado su extremo amino terminal, dejando expuesto un péptido que funciona como agonista; los miembros de este grupo se denominan receptores activados por proteasas (frecuentemente llamados PARs por las siglas de su nombre en inglés), siendo el más conocido el receptor para trombina [10]. Otras modificaciones postraduccionales con menor frecuencia son la nitración y la sulfatación de algunos residuos.

Evolución y GPCRs

La secuenciación y anotación de genomas completos ha permitido tener una idea del número de GPCRs que se encuentran codificados en el DNA de diversos organismos. Ello nos da una idea de cómo se ha ido multiplicando el número de GPCRs en el proceso evolutivo. Así, se ha postulado que los GPCRs aparecen hace aproximadamente 1200 millones de años, tiempo cercano a la separación de los alveolantes (como el *Plasmodium falciparum*, que no tiene GPCRs en su genoma) de los hongos (como las levaduras) y de las plantas. Estos dos reinos ya presentan algunos receptores de este tipo [11,12]. Es importante mencionar que sí hay proteínas con siete dominios transmembranales, en organismos con aparición evolutiva anterior, como la bacterio-rodopsina, de las Halobacterias (Archea),

pero estas proteínas no están relacionadas evolutivamente con los GPCRs, por lo que se trata de fenómenos de convergencia evolutiva, aparentemente.

Posiblemente por duplicación génica y la especialización por acumulación de mutaciones que aportan ventajas adaptativas a los organismos, los GPCRs se van haciendo cada vez más abundantes a lo largo del árbol evolutivo. Ya es importante su número en nemátodos y artrópodos y mucho más en vertebrados, particularmente en los mamíferos (véase la Figura 4). En el hombre se estima que tenemos aproximadamente entre 650 y 800 diferentes GPCRs, mientras que en el ratón (*Mus musculus*) más de mil y en otros animales aún más. Se ha propuesto que en diversos animales los genes correspondientes a GPCRs representan entre el 3 y el 5 %, convirtiendo a estas proteínas en una de las más abundantes y variadas de las proteínas de membrana [11-13].

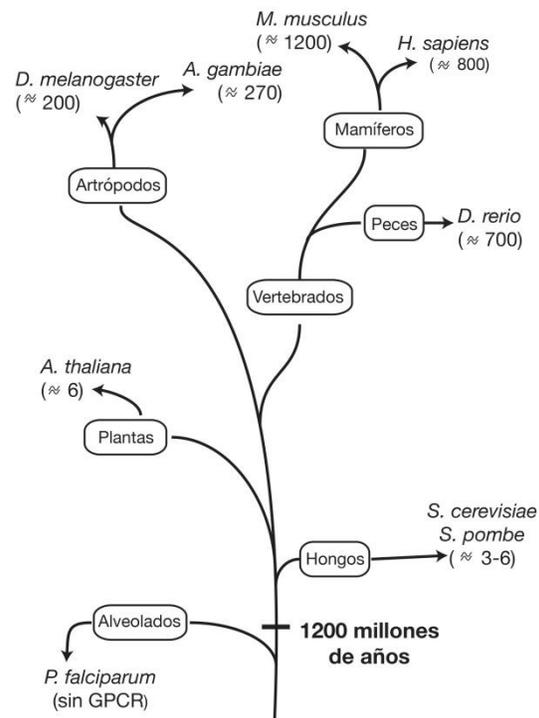


Figura 4. Representación esquemática de la evolución de los GPCRs. El número entre paréntesis indica la cantidad aproximada de GPCRs en los genomas. Modificada de [4].

Además de su importancia cuantitativa, es necesario señalar que estos receptores participan en una enorme cantidad de funciones en los diversos organismos, desde la reproducción en las levaduras, hasta la percepción de la luz, olores y sabores en los humanos. Son elementos indispensables en la comunicación hormonal, en la neurotransmisión y la

acción de muchos autacoides (hormonas de acción local). Están implicados en prácticamente la totalidad de los procesos fisiológicos de los mamíferos y participan en la patogenia de muy diversas enfermedades. Se ha estimado que aproximadamente el 20-30% de los fármacos de uso clínico actúan directamente sobre GPCRs [14,15]. Muchas de la drogas de uso ilegal (como algunos opiáceos, cannabinoides o serotoninérgicos) actúan también sobre este tipo de receptores y los fenómenos de tolerancia y dependencia que se presentan con estos agentes, están fuertemente asociados a la función y regulación de estos receptores.

Clasificación de los GPCRs

Otro de los avances que han ocurrido en los últimos años, es la posibilidad de agrupar a los receptores en familias con criterios estructurales y funcionales. Esto es muy importante ya que las clasificaciones actuales y las nomenclaturas más usadas no son realmente satisfactorias y hay un esfuerzo por llegar a una clasificación sistemática, similar a la que se creó para las enzimas en los años cincuenta del siglo pasado. Una de las clasificaciones más empleadas divide a los receptores en cinco grupos o clases denominados de la "A" a la "E" con un nombre entre paréntesis indicando a un receptor prototípico del grupo (véase <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=694&familyType=GPCR>). El grupo A (Rodopsina), con 719 receptores aceptados en el humano, el grupo B (Secretina) con 15 receptores, el grupo C (Glutamato) con 12 GPCRs, el grupo D (Adhesion) con 33 y el grupo E (Frizzled/ Sabor tipo 2) con 11 (ver también [11-13]). Otra clasificación separa los Frizzled y Sabor 2 (amargo) dando lugar a seis grupos [13]. Es importante señalar varias consideraciones y limitaciones:

- Las diversas clasificaciones son elementos de trabajo, por lo mismo cambiantes/ no definitivas, y algunas incluyen grupos de receptores en una clase y otras en otra.
- Como ya se mencionó el número total de receptores varía dado que hay pseudogenes, múltiples polimorfismos, problemas en secuenciación, anotación y limitantes de los diversos programas de análisis de secuencias.
- En muchos de los grupos hay receptores cuyos ligandos naturales se conocen y otros en los que no, y que se denominan receptores huérfanos. En algunos casos hay ligandos propuestos, pero aún no aceptados por las diversas comisiones que regulan las clasificaciones.

- Utilizando el polimorfismo más común se han asociado de variantes/ mutaciones con muy diversas patologías (véase [15,16] y referencias allí).

Cristalización de los GPCRs

Sin duda, la cristalización de los receptores β_2 -adrenérgicos y los subsecuentes ha representado un avance muy notable en el campo. Brian Kobilka (Figura 5), ha sido uno de los pioneros en el campo y por estas contribuciones recibió junto con su maestro Robert Lefkowitz el Premio Nobel de Química en 2012. Ambos son médicos con entrenamiento en el área cardiovascular. Dado que la investigación de frontera es interdisciplinaria no sorprende que el Nobel fuera en Química y no en Medicina. El trabajo de Kobilka ha permitido conocer a nivel atómico a este receptor. Ello comprobó que efectivamente, estos receptores tienen siete secciones transmembranales, unidas por asas intra y extracelulares, el extremo amino terminal extracelular y el carboxilo terminal intracelular, como se había predicho. Pero el trabajo va mucho más allá.



Figura 5. Fotografía de Brian Kobilka. Imagen obtenida de <http://flickr.com/photo/97469566@N00/8252482381>

Se cristalizó el receptor en presencia de agentes que impiden la activación del receptor (antagonistas o agonistas inversos) y también en presencia de agonistas. Comparando el estado inactivo y el activo se pudieron determinar los cambios estructurales que ocurren durante la activación de los receptores. Las porciones superiores de los segmentos transmembranales del receptor, cercanas al exterior de la célula, se acercan unas a otras en forma discreta bajo la acción del agonista. El agonista favorece un reacomodo de residuos hidrofóbicos en las

transmembranales. Esto va acompañado de un cambio opuesto y mucho más marcado en la porción distal del receptor, es decir en las zonas de los segmentos transmembranales cercanos al citoplasma. En términos coloquiales podríamos decir que el receptor se "aprieta" en su cara cercana al exterior celular y se "relaja" en la zona cercana al citoplasma. Ello ocasiona que una de las hélices de la subunidad α de la proteína Gs, se introduzca en el receptor. Acompaña a esta introducción, un giro del trímero (α , β , γ) de la proteína Gs. Gracias al trabajo de Kobilka y sus colaboradores, hemos podido empezar a entender de manera muy fina la activación de los GPCRs y sus correspondientes proteínas G. Por ahora, el receptor β_2 -adrenérgico, es el único en el que se ha logrado tal grado de avance, aunque ya existen muchos otros cristalizados. Seguramente en los próximos años, tendremos una visión panorámica en la cual podremos determinar, con mayor definición, las semejanzas y diferencias entre los distintos GPCRs. Recomendamos ampliamente la revisión de la conferencia Nobel de Kobilka [17] que se encuentra además disponible como video en la página de internet de los Premios Nobel (https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/aureates/2012/kobilka-lecture.html).

Actividad de los receptores y farmacodinamia.

La farmacodinamia es la rama de la farmacología que se encarga de estudiar los mecanismos de acción de los fármacos a niveles celular, molecular y submolecular. Es decir es la rama de la farmacología más estrechamente cercana con la bioquímica y cuyos límites son difíciles de establecer. En alguna ocasión Alfred G. Gilman (Premio Nobel de Medicina en 1994, por su trabajo sobre las proteínas G, compartido con Martin Rodbell) describió a la farmacología como "*biochemistry with a purpose*", algo así como una bioquímica aplicada y su definición cobra cada día más sentido. Para la mayoría de los médicos y docentes de las áreas biomédicas actuales, nuestra formación sobre la farmacodinamia de los receptores fue bastante simple: a) agonistas, agentes que activan a los receptores y b) antagonistas, agentes que en forma competitiva o no competitiva impiden la activación de los receptores. Esta visión simplista se irá modificando en forma muy importante en los próximos años.

Durante muchos años se pensó que los receptores y en particular los GPCRs eran entidades que se encontraban en estado "apagado o inactivo" en condiciones basales y que se activaban por los agonistas naturales o sintéticos. Ya durante los años

80 y 90 del siglo XX se había observado que algunos antagonistas disminuyen el estado basal, lo que fue considerado muchas veces como acciones inespecíficas o bien por lo menos inexplicables. Con la posibilidad de sobreexpresar receptores en sistemas celulares modelo, fue claro que estos receptores poseen cierta actividad denominada constitutiva. Los agentes que abaten tanto la actividad constitutiva como la estimulada por los agonistas, se les denomina "agonistas inversos". Podemos pensar que pasamos de un modelo de transición del receptor de inactivo a activo ($R^i \leftrightarrow R^a$) a un sistema que incluye receptores con actividad constitutiva ($R^i \leftrightarrow R^c \leftrightarrow R^a$). El antagonista clásico es pues, un agente que por sí mismo no impide la actividad endógena de los receptores pero que es capaz de impedir cambios conformacionales inducidos por los agonistas. En la Figura 6 se muestra cómo cambia la actividad de un receptor en función de la concentración de estos tipos de agentes.

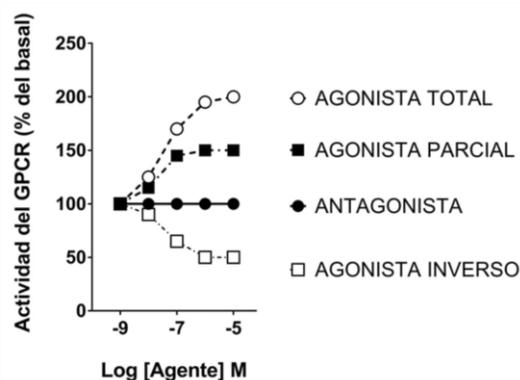


Figura 6. Relación entre la actividad de un GPCR y la concentración del agente utilizado. Se presenta en el eje de las ordenadas la actividad del receptor y en las abscisas la concentración de los agentes empleados utilizando una escala logarítmica. Nótese que los antagonistas clásicos no afectan la actividad intrínseca de los receptores (actividad basal, 100%); los agonistas totales incrementan la actividad en forma concentración-dependiente hasta llegar a un máximo operativo; los agonistas parciales logran incrementar la actividad sólo una fracción del máximo, aunque se incrementen las concentraciones; los agonistas inversos abaten la actividad intrínseca hasta llegar a un mínimo operativo.

Podrá notarse que en la Figura 6 se marca también el tipo de agonistas parciales. Se trata de agentes que desde hace mucho tiempo se conoce que inducen actividad pero que aun incrementando mucho la concentración no se llega al efecto del agonista total. La explicación farmacodinámica más aceptada es que estos agentes inducen un cambio conformacional en el receptor que no es óptimo para la acción a estudiar. Ello implica aún más estados activos es decir (R^{a1} , R^{a2} , R^{a3} , etc.). Estos estados conformacionales pueden generarse en forma

secuencial o no, lo cual desde el punto de vista cinético complican las diversas ecuaciones que describen tales conductas. Adicionalmente, se ha observado que para un mismo agonista, en una misma célula o tejido se presentan variaciones en los efectos. Así, un agente puede ser un agonista total para un efecto (digamos contracción), pero parcial para otro (migración) o incluso no tener acción sobre otro (proliferación) mientras que el agonista natural es capaz de activar todos estos procesos en forma similar. En otras palabras hay "agonistas sesgados" (*biased* en inglés). También se han comenzado a estudiar a agentes que modulan la actividad de los GPCRs, en sitios diferentes al sitio de unión del agonista (sitio activo), a los cuales se les ha denominado moduladores alostéricos, a semejanza de lo que ocurre con las enzimas. De igual forma se han descubierto agentes que modulan la internalización del receptor y su degradación. Los interesados en estos aspectos son referidos al trabajo de Terry Kenakin, en mi opinión, el gran "gurú" del campo [18-24].

Quizá algunos de los lectores piensen que toda esta teoría está aún muy lejos de la práctica clínica cotidiana, pero permítasenos presentar algunos ejemplos para intentar convencerlos que estos hallazgos ya están impactando en la medicina diaria:

- 1) Los receptores α_{1D} -adrenérgicos son de los GPCRs más importantes en el mantenimiento de la tensión arterial, participan en la génesis de hipertensión y en el mantenimiento del tono vascular [25-27]. Hace algunos años reportamos que este subtipo de receptor adrenérgico tiene actividad intrínseca y que algunos de los antagonistas de uso cotidiano, son en realidad agonistas inversos [28,29]. El grupo de Pilar de D'Ocon demostró que un grupo de receptores de este tipo con actividad intrínseca son importantes para mantener los flujos sanguíneos evitando variaciones bruscas en el tono vascular [30-32].
- 2) Por otro lado, la mayoría de los bloqueadores β -adrenérgicos, incluido el clásico propranolol, son en realidad agonistas inversos. Aún desconocemos qué ventajas o desventajas tiene el tratamiento con agonistas inversos β -adrenérgicos comparado con antagonistas clásicos y esto tomará tiempo pues los estudios clínicos serios son de muy largo plazo.
- 3) El agonista del receptor SIP1 de la esfingosina 1-fosfato, el fingolimod [33-35], tiene la capacidad de inducir una respuesta muy breve a través de su receptor, pero conduce a la internalización y degradación del mismo, funcionando como un

agonista de acción breve pero un "antagonista" funcional de largo plazo, pues disminuye la presencia de receptores funcionales en las células por largo plazo. Dado que la migración de los linfocitos de los nódulos a la periferia tiene la capacidad de inducir linfopenia e inmunosupresión; este agente ya tiene un nicho terapéutico en el tratamiento de la esclerosis múltiple recidivante.

- 4) Hay un creciente interés en desarrollar agonistas de los receptores μ para opioides que permitan ampliar la ventana terapéutica del efecto analgésico de los opioides, al disminuir la potencia y eficacia de sus acciones sobre la motilidad gastrointestinal y su acción supresora de la respiración; se van logrando avances con el desarrollo de agonistas sesgados [36,37].

Fosforilación e internalización de los GPCRs

Uno de los mecanismo más importantes de regulación de la actividad y localización celular de enzimas, es la fosforilación [38]. Por sus descubrimientos pioneros en este campo recibieron el Premio Nobel de Medicina en 1992, Edwin G. Krebs y Edmond H. Fischer. Su importancia tanto básica, como su potencial terapéutico siguen en aumento [38]. Los GPCRs son sustratos de fosforilación por diversas cinasas y dicha acción está asociada a dos procesos, esto es, su desensibilización e internalización.

La desensibilización es un fenómeno muy bien conocido por los médicos y en particular por los farmacólogos. Es bien conocida la disminución en la respuesta a un agente después de una o más aplicaciones (denominada en forma operativa, desensibilización homóloga). El caso más dramático es el que ocurre en las unidades de urgencias o terapia intensiva cuando un paciente presenta un paro cardíaco que requiere la aplicación de adrenalina; frecuentemente el paciente recupera ritmo después de su aplicación. Desafortunadamente, si se requieren aplicaciones posteriores la respuesta es cada vez menos clara. Sin embargo, hay que precisar que la desensibilización y la resensibilización de los GPCRs no son fenómenos farmacológicos, forman parte del ajuste que todas nuestras células tienen a las estimulaciones (piense en los cambios de sensibilidad a la luz que nos ocurren continuamente o a la rápida habituación que tenemos a estímulos gustativos o a los olores). Trabajo de investigación de diversos grupos, destacando los encabezados por Lefkowitz y su alumno Jeffrey Benovic, llevó al estudio y caracterización de una familia de cinasas que

fosforilan específicamente a la forma activada (en su forma estimulada por agonista) de GPCRs; estas cinasas han recibido el nombre de GRKs (por su nombre en inglés, *G protein-coupled Receptor Kinases*) y continúan siendo un campo de intenso estudio [39-45]. La activación del receptor y los cambios conformacionales en las proteínas G hacen que las GRKs tengan acceso a sitios específicos fosforilables (residuos de serina y/o treonina) donde se cataliza la fosfotransferencia usando ATP. La fosforilación de los receptores favorece su asociación con la proteína β -arrestina que funge como puente para la interacción con otra proteína, llamada clatrina [46] para iniciar el proceso de internalización de los GPCRs [39,47-49].

Un proceso similar ocurre en la llamada desensibilización heteróloga, con la diferencia de que el receptor afectado no requiere ser activado por los agonistas. En estos casos, la activación de otros receptores, de diversos tipos, desencadena una propagación intracelular de la señal que involucra la fosforilación de GPCRs, su desensibilización e internalización. En estos casos, las cinasas involucradas son generalmente proteínas cinasas activadas por segundos mensajeros como las proteínas cinasas A y la C, entre otras [6,50-53].

Es conveniente aclarar que esta separación es más conceptual que real. Suponer que las GRKs participan exclusivamente en la desensibilización homóloga o que no lo hacen en la heteróloga es claramente una simplificación excesiva (véase por ejemplo [54-56]).

Es importante señalar que una desensibilización no implica necesariamente internalización de los receptores, ni tampoco el caso inverso. Por ejemplo, en el caso del receptor α_{1B} -adrenérgico, la activación farmacológica de la proteína cinasa C, la estimulación del GPCR de la endotelina (ET_A), causan una desensibilización muy rápida que es incompatible con una internalización mayoritaria de los receptores α_{1B} -adrenérgicos [53,57-59]. Igualmente puede existir una substancial fosforilación e internalización de los GPCRs sin que se presente una desensibilización significativa [60-62]. Es decir, aunque se trata de fenómenos frecuentemente asociados (fosforilación-desensibilización-internalización), la relación causal entre ellos no está totalmente definida, hasta el momento.

Esta falta de asociación causal clara, aunada a la observación de que un mismo receptor puede ser fosforilado en distintos sitios en función del sistema

celular en que se estudia o el estímulo a que se sujeta ha llevado a la aceptación en el campo de que no es solamente la fosforilación de los receptores *per se* lo más importante, sino que la repercusión funcional depende de los sitios específicos fosforilados; a esto se le ha llamado el "código de barras" de la fosforilación de los GPCRs [9,63-69]. La espectrometría de masas se está convirtiendo en una herramienta obligada para avanzar en este campo, lo mismo que el uso de microscopía confocal, FRET y BRET [9,70,71] y el uso de anticuerpos específicos para los sitios fosforilados [72].

Es importante señalar que la internalización de receptores no es un proceso trivial sino que se trata de un proceso complejo, comprendido aún en forma incompleta y con diferentes consecuencias en la fisiología celular. Así, el receptor internalizado puede ser reciclado en forma rápida a la membrana plasmática, en forma más lenta o bien dirigido al proceso de degradación. Resulta claro que las consecuencias, considerando el aspecto temporal, son muy diferentes. ¿Qué moléculas participan en estos procesos y qué elementos estructurales del receptor "le indican" a la célula cómo procesarlo? Aún está en proceso de estudio.

Los GPCRs al igual que muchas otras proteínas integrales de membrana, son sintetizados en el retículo endoplásmico y de allí son sujetos de transporte en vesículas a diversos compartimentos celulares hasta llegar a la membrana plasmática (transporte anterógrado). Como se mencionó en el párrafo anterior los GPCRs se internalizan (transporte retrógrado) y son canalizados a diversos compartimentos para su reciclaje o bien degradación. En estos procesos participa una familia de GTPasas de la familia Ras, llamadas proteínas Rab [73-78]. Esta amplia familia de proteínas, con más de 60 miembros juega un papel fundamental en el tráfico vesicular tanto anterógrado como retrógrado.

En estudios recientes del laboratorio logramos demostrar que la internalización inducida durante la desensibilización homóloga del receptor α_{1B} -adrenérgico, involucra a proteínas Rab diferentes a las que participan en la internalización inducida en forma heteróloga [6,71,79], con una participación clave de la proteína cinasa C en esta última [71].

Sin embargo, datos recientes del laboratorio indican que esto no es general y no podemos señalar que para los GPCRs la internalización inducida por agonistas difiere a la inducida en forma heteróloga. Hemos observado que la internalización del receptor S1P1 de la esfingosina 1-fosfato, inducido por el

agonista natural involucra a las mismas proteínas Rab que la inducida por activación farmacológica de la proteína cinasa C (Martínez-Morales y colaboradores, en preparación). Es interesante mencionar que utilizando a este mismo receptor observamos diferencias en las proteínas Rab que participan en la internalización inducida por diversos agonistas (Martínez-Morales y colaboradores, en preparación).

Es claro, que la comprensión de los procesos involucrados en la internalización de los GPCRs dista mucho de ser satisfactoria ya que aún no sabemos cómo la célula se percata de que los receptores son internalizados por un proceso u otro o bajo la acción de diversos agonistas. Dada la intensa actividad en el campo, no es difícil pensar que en los próximos años tendremos mucha más información que nos permitan definir patrones de respuesta.

Otros aspectos

Lo que hemos mencionado hasta ahora habla de receptores monoméricos. Sin embargo, hay evidencia importante de que algunos receptores pueden formar homo- y hetero-dímeros lo cual puede tener importantes implicaciones en su acción, perfil

farmacológico y en la regulación espacio temporal de su acción. Así, por ejemplo, para que el receptor GABA tipo B sea funcional se requiere la expresión de dos diferente isoformas que constituyen el dímero funcional [80]. Los interesados en este novedoso aspecto son referidos a los siguientes trabajos [80-82].

Igualmente, es importante señalar que las acciones de los GPCRs no son solamente mediadas a través de las proteínas G, sino que hay evidencia de que proteínas como las arrestinas son capaces de participar en la acción de ellos [39,49,83]. También en este mismo sentido, es importante señalar que el grupo de receptores Frizzled tienen su señalización canónica en forma independiente de proteínas G [84].

Agradecimientos

El trabajo realizado en el laboratorio está siendo apoyado por donativos de la DGAPA (IN 200718) y CONACyT (253156 y Fronteras 882). El M. en C. Alejandro Guzmán Silva es estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas y está siendo apoyado por una Beca de posgrado del CONACyT. Se agradece el apoyo de María Guadalupe García Pasquel con las figuras del trabajo.

Referencias

- Robert, L., Labat-Robert, J., and Robert, A. M. (2010) Receptors and aging: dedicated to the memory of Paul Ehrlich for the 100th anniversary of his Nobel Prize. *Arch Gerontol Geriatr* **51**, 260-263
- Langley, J. N. (1905) On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *J Physiol* **33**, 374-413
- Butcher, R. W., and Robison, G. A. (1975) An appreciation of Earl Sutherland. *Metabolism* **24**, 237-240
- Raju, T. N. (1999) The Nobel chronicles. 1971: Earl Wilbur Sutherland, Jr. (1915-74). *Lancet* **354**, 961
- Lefkowitz, R. J. (2013) A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture). *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **52**, 6366-6378
- Castillo-Badillo, J. A., Cabrera-Wrooman, A., and García-Sáinz, J. A. (2014) Visualizing G protein-coupled receptors in action through confocal microscopy techniques. *Arch Med Res* **45**, 283-293
- Nelson, D. L. C., M. M. (2013) Biosignaling. in *Lehninger Principles of Biochemistry*, Sixth Edition Ed., W. H. Freeman and Company, New York. pp 433-504
- García-Sáinz, J. A. (2013) Señalización y segundos mensajeros. in *Bioquímica de Laguna* (Laguna, J., Piña-Garza, E., Martínez-Montes, F., Pardo-Vázquez, J. P., and Riveros-Rosas, H. eds.), Séptima Edición Ed., El Manual Moderno, Ciudad de México. pp
- Alfonzo-Méndez, M. A., Alcántara Hernández, R., and García-Sáinz, J. A. (2017) Novel Structural Approaches to Study GPCR Regulation. *Int J Mol Sci* **18**, 27
- Ossovskaya, V. S., and Bunnett, N. W. (2004) Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol. Rev.* **84**, 579-621
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G., and Schioth, H. B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1256-1272
- Fredriksson, R., and Schioth, H. B. (2005) The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1414-1425
- Lagerstrom, M. C., and Schioth, H. B. (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 339-357
- Overington, J. P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A. L. (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* **5**, 993-996
- Sriram, K., and Insel, P. A. (2018) GPCRs as targets for approved drugs: How many targets and how many drugs? *Mol. Pharmacol.*
- Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schioth, H. B., and Gloriam, D. E. (2017) Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov* **16**, 829-842
- Kobilka, B. (2013) The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (Nobel Lecture). *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **52**, 6380-6388
- Kenakin, T. (2004) Efficacy as a vector: the relative prevalence and paucity of inverse agonism. *Mol. Pharmacol.* **65**, 2-11
- Kenakin, T. (2005) New bull's-eyes for drugs. *Sci. Am.* **293**, 50-57

20. Kenakin, T. (2007) Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 407-415
21. Kenakin, T. (2014) Quantifying biased beta-arrestin signaling. *Handb. Exp. Pharmacol.* **219**, 57-83
22. Kenakin, T. (2015) The Effective Application of Biased Signaling to New Drug Discovery. *Mol. Pharmacol.* **88**, 1055-1061
23. Kenakin, T. P. (2009) Cellular assays as portals to seven-transmembrane receptor-based drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 617-626
24. Kenakin, T. P. (2009) *A Pharmacology Primer: Theory, Applications, and Methods*, Third Edition ed., Elsevier Academic Press, Amsterdam
25. Villalobos-Molina, R., and Ibarra, M. (1999) Vascular alpha 1D-adrenoceptors: are they related to hypertension? *Arch Med Res* **30**, 347-352
26. Koshimizu, T. A., Tanoue, A., and Tsujimoto, G. (2007) Clinical implications from studies of alpha1 adrenergic receptor knockout mice. *Biochem. Pharmacol.* **73**, 1107-1112
27. Tanoue, A., Koshimizu, T. A., Shibata, K., Nasa, Y., Takeo, S., and Tsujimoto, G. (2003) Insights into alpha1 adrenoceptor function in health and disease from transgenic animal studies. *Trends Endocrinol. Metab.* **14**, 107-113
28. García-Sáinz, J. A., and Torres-Padilla, M. E. (1999) Modulation of basal intracellular calcium by inverse agonists and phorbol myristate acetate in rat-1 fibroblasts stably expressing alpha1D-adrenoceptors. *FEBS Lett.* **443**, 277-281
29. García-Sáinz, J. A., Romero-Ávila, M. T., and Medina, L. C. (2010) alpha(1D)-Adrenergic receptors constitutive activity and reduced expression at the plasma membrane. *Methods Enzymol.* **484**, 109-125
30. Gisbert, R., Noguera, M. A., Ivorra, M. D., and D'Ocon, P. (2000) Functional evidence of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **295**, 810-817
31. Gisbert, R., Ziani, K., Miquel, R., Noguera, M. A., Ivorra, M. D., Anselmi, E., and D'Ocon, P. (2002) Pathological role of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* **135**, 206-216
32. Noguera, M. A., Ivorra, M. D., and D'Ocon, P. (1996) Functional evidence of inverse agonism in vascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* **119**, 158-164
33. Brinkmann, V., Billich, A., Baumruker, T., Heining, P., Schmouder, R., Francis, G., Aradhya, S., and Burtin, P. (2010) Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 883-897
34. Oo, M. L., Chang, S. H., Thangada, S., Wu, M. T., Rezaul, K., Blaho, V., Hwang, S. I., Han, D. K., and Hla, T. (2011) Engagement of S1P-degradative mechanisms leads to vascular leak in mice. *J Clin Invest* **121**, 2290-2300
35. Rivera, J., Proia, R. L., and Olivera, A. (2008) The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 753-763
36. Schmid, C. L., Kennedy, N. M., Ross, N. C., Lovell, K. M., Yue, Z., Morgenweck, J., Cameron, M. D., Bannister, T. D., and Bohn, L. M. (2017) Bias Factor and Therapeutic Window Correlate to Predict Safer Opioid Analgesics. *Cell* **171**, 1165-1175 e1113
37. Madariaga-Mazon, A., Marmolejo-Valencia, A. F., Li, Y., Toll, L., Houghten, R. A., and Martínez-Mayorga, K. (2017) Mu-Opioid receptor biased ligands: A safer and painless discovery of analgesics? *Drug Discov. Today* **22**, 1719-1729
38. Cohen, P. (2002) Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* **1**, 309-315
39. Kang, D. S., Tian, X., and Benovic, J. L. (2014) Role of beta-arrestins and arrestin domain-containing proteins in G protein-coupled receptor trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* **27**, 63-71
40. Komolov, K. E., and Benovic, J. L. (2017) G protein-coupled receptor kinases: Past, present and future. *Cell. Signal.*
41. Kong, G., Penn, R., and Benovic, J. L. (1994) A beta-adrenergic receptor kinase dominant negative mutant attenuates desensitization of the beta 2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **269**, 13084-13087
42. Krupnick, J. G., and Benovic, J. L. (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 289-319
43. Krasel, C., Dammeier, S., Winstel, R., Brockmann, J., Mischak, H., and Lohse, M. J. (2001) Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin. *J. Biol. Chem.* **276**, 1911-1915
44. Pitcher, J. A., Tesmer, J. J., Freeman, J. L., Capel, W. D., Stone, W. C., and Lefkowitz, R. J. (1999) Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 34531-34534
45. Ribas, C., Penela, P., Murga, C., Salcedo, A., Garcia-Hoz, C., Jurado-Pueyo, M., Aymerich, I., and Mayor, F., Jr. (2007) The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 913-922
46. Kirchhausen, T., Owen, D., and Harrison, S. C. (2014) Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, a016725
47. Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J. (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J. Cell Sci.* **115**, 455-465
48. Shenoy, S. K., and Lefkowitz, R. J. (2005) Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* **2005**, cm10
49. Thomsen, A. R., Plouffe, B., Cahill, T. J., 3rd, Shukla, A. K., Tarrasch, J. T., Dosey, A. M., Kahsai, A. W., Strachan, R. T., Pani, B., Mahoney, J. P., Huang, L., Breton, B., Heydenreich, F. M., Sunahara, R. K., Skiniotis, G., Bouvier, M., and Lefkowitz, R. J. (2016) GPCR-G Protein-beta-Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell* **166**, 907-919
50. García-Sáinz, J. A., Romero-Ávila, M. T., and Medina, L. C. (2010) Dissecting how receptor tyrosine kinases modulate G protein-coupled receptor function. *Eur. J. Pharmacol.* **648**, 1-5
51. García-Sáinz, J. A., Vázquez-Prado, J., and Medina, L. C. (2000) Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.* **389**, 1-12
52. García-Sáinz, J. A., Vázquez-Prado, J., and Villalobos-Molina, R. (1999) Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease. *Arch Med Res* **30**, 449-458
53. Vázquez-Prado, J., Casas-González, P., and García-Sáinz, J. A. (2003) G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cell. Signal.* **15**, 549-557
54. Casas-González, P., and García-Sáinz, J. A. (2006) Role of epidermal growth factor receptor transactivation in alpha1B-adrenoceptor phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.* **542**, 31-36
55. Casas-González, P., Ruiz-Martínez, A., and García-Sáinz, J. A. (2003) Lysophosphatidic acid induces alpha-1b-adrenergic receptor phosphorylation through G-beta-gamma, phosphoinositide 3-kinase, protein kinase C and epidermal growth factor receptor transactivation. *Biochim. Biophys. Acta* **1633**, 75-83
56. Casas-González, P., Vázquez-Prado, J., and García-Sáinz, J. A. (2000) Lysophosphatidic acid modulates alpha(1b)-

- adrenoceptor phosphorylation and function: roles of Gi and phosphoinositide 3-kinase. *Mol. Pharmacol.* **57**, 1027-1033
57. Vázquez-Prado, J., and García-Sáinz, J. A. (1996) Effect of phorbol myristate acetate on alpha 1-adrenergic action in cells expressing recombinant alpha 1-adrenoceptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* **50**, 17-22
 58. Vázquez-Prado, J., Medina, L. C., and García-Sáinz, J. A. (1997) Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of alpha1b-adrenoreceptors in Rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **272**, 27330-27337
 59. Vázquez-Prado, J., Medina, L. C., Romero-Ávila, M. T., González-Espinosa, C., and García-Sáinz, J. A. (2000) Norepinephrine- and phorbol ester-induced phosphorylation of alpha(1a)-adrenergic receptors. Functional aspects. *J. Biol. Chem.* **275**, 6553-6559
 60. Morquecho-León, M. A., Bazúa-Valenti, S., Romero-Ávila, M. T., and García-Sáinz, J. A. (2014) Isoforms of protein kinase C involved in phorbol ester-induced sphingosine 1-phosphate receptor 1 phosphorylation and desensitization. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 327-334
 61. Sánchez-Reyes, O. B., Romero-Ávila, M. T., Castillo-Badillo, J. A., Takei, Y., Hirasawa, A., Tsujimoto, G., Villalobos-Molina, R., and García-Sáinz, J. A. (2014) Free fatty acids and protein kinase C activation induce GPR120 (free fatty acid receptor 4) phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.* **723**, 368-374
 62. Sosa-Alvarado, C., Hernández-Méndez, A., Romero-Ávila, M. T., Sánchez-Reyes, O. B., Takei, Y., Tsujimoto, G., Hirasawa, A., and García-Sáinz, J. A. (2015) Agonists and protein kinase C-activation induce phosphorylation and internalization of FFA1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.*
 63. Alvarez-Curto, E., Inoue, A., Jenkins, L., Raihan, S. Z., Prihandoko, R., Tobin, A. B., and Milligan, G. (2016) Targeted Elimination of G Proteins and Arrestins Defines Their Specific Contributions to Both Intensity and Duration of G Protein-coupled Receptor Signaling. *J. Biol. Chem.* **291**, 27147-27159
 64. Bouzo-Lorenzo, M., Santo-Zas, I., Lodeiro, M., Nogueiras, R., Casanueva, F. F., Castro, M., Pazos, Y., Tobin, A. B., Butcher, A. J., and Camina, J. P. (2016) Distinct phosphorylation sites on the ghrelin receptor, GHSR1a, establish a code that determines the functions of ss-arrestins. *Sci Rep* **6**, 22495
 65. Prihandoko, R., Alvarez-Curto, E., Hudson, B. D., Butcher, A. J., Ulven, T., Miller, A. M., Tobin, A. B., and Milligan, G. (2016) Distinct Phosphorylation Clusters Determine the Signaling Outcome of Free Fatty Acid Receptor 4/G Protein-Coupled Receptor 120. *Mol. Pharmacol.* **89**, 505-520
 66. Tobin, A. B. (2008) G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom. *Br. J. Pharmacol.* **153** (Suppl 1), S167-S176
 67. Tobin, A. B., Butcher, A. J., and Kong, K. C. (2008) Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 413-420
 68. Torrecilla, I., Spragg, E. J., Poulin, B., McWilliams, P. J., Mistry, S. C., Blaukat, A., and Tobin, A. B. (2007) Phosphorylation and regulation of a G protein-coupled receptor by protein kinase CK2. *J. Cell Biol.* **177**, 127-137
 69. Zindel, D., Engel, S., Bottrill, A. R., Pin, J. P., Prezeau, L., Tobin, A. B., Bunemann, M., Krasel, C., and Butcher, A. J. (2016) Identification of key phosphorylation sites in PTH1R that determine arrestin3 binding and fine-tune receptor signaling. *Biochem. J.* **473**, 4173-4192
 70. Alcántara-Hernández, R., Hernández-Méndez, A., Romero-Ávila, M. T., Alfonzo-Mendez, M. A., Pupo, A. S., and García-Sáinz, J. A. (2017) Noradrenaline, oxymetazoline and phorbol myristate acetate induce distinct functional actions and phosphorylation patterns of alpha1A-adrenergic receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1864**, 2378-2388
 71. Alfonzo-Mendez, M. A., Hernández-Espinosa, D. A., Carmona-Rosas, G., Romero-Ávila, M. T., Reyes-Cruz, G., and García-Sáinz, J. A. (2017) Protein Kinase C Activation Promotes alpha1B-Adrenoceptor Internalization and Late Endosome Trafficking through Rab9 Interaction. Role in Heterologous Desensitization. *Mol. Pharmacol.* **91**, 296-306
 72. Butcher, A. J., Prihandoko, R., Kong, K. C., McWilliams, P., Edwards, J. M., Bottrill, A., Mistry, S., and Tobin, A. B. (2011) Differential G-protein-coupled Receptor Phosphorylation Provides Evidence for a Signaling Bar Code. *J. Biol. Chem.* **286**, 11506-11518
 73. Hutagalung, A. H., and Novick, P. J. (2011) Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol. Rev.* **91**, 119-149
 74. Schimmoller, F., Simon, I., and Pfeffer, S. R. (1998) Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J. Biol. Chem.* **273**, 22161-22164
 75. Schwartz, S. L., Cao, C., Pylypenko, O., Rak, A., and Wandinger-Ness, A. (2007) Rab GTPases at a glance. *J. Cell Sci.* **120**, 3905-3910
 76. Somsel Rodman, J., and Wandinger-Ness, A. (2000) Rab GTPases coordinate endocytosis. *J. Cell Sci.* **113 Pt 2**, 183-192
 77. Zerial, M., and McBride, H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107-117
 78. Stenmark, H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 513-525
 79. Castillo-Badillo, J. A., Sánchez-Reyes, O. B., Alfonzo-Méndez, M. A., Romero-Ávila, M. T., Reyes-Cruz, G., and García-Sáinz, J. A. (2015) alpha1B-Adrenergic Receptors Differentially Associate with Rab Proteins during Homologous and Heterologous Desensitization. *PLoS One* **10**, e0121165
 80. White, J. H., Wise, A., Main, M. J., Green, A., Fraser, N. J., Disney, G. H., Barnes, A. A., Emson, P., Foord, S. M., and Marshall, F. H. (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* **396**, 679-682
 81. Hague, C., Uberti, M. A., Chen, Z., Hall, R. A., and Minneman, K. P. (2004) Cell Surface Expression of alpha1D-Adrenergic Receptors Is Controlled by Heterodimerization with alpha1B-Adrenergic Receptors. *J. Biol. Chem.* **279**, 15541-15549
 82. Salahpour, A., Angers, S., and Bouvier, M. (2000) Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* **11**, 163-168
 83. Lefkowitz, R. J. (1998) G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem.* **273**, 18677-18680
 84. Schulte, G. (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class Frizzled receptors. *Pharmacol. Rev.* **62**, 632-667



DR. ADOLFO GARCÍA SÁINZ

Médico Cirujano por la Facultad de Medicina de la UNAM y Maestro y Doctor en Ciencias Químicas (Bioquímica) por la Facultad de Química de la UNAM. Realizó su posdoctorado en Brown University con John N. Fain y dos estancias cortas, una en Duke University con Robert. J. Lefkowitz y

otra con Paul Insel en la Universidad de California en San Diego. Es Investigador Emérito del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y pionero en el campo de transducción de señales en nuestro país.

Ha publicado más de 200 trabajos en revistas arbitradas y ha sido citado en más de 5000 ocasiones.

Bajo su dirección se han graduado 32 estudiantes de licenciatura, 23 de Maestría y 26 de Doctorado. Muchos de ellos laboran como investigadores independientes en el país o en el extranjero.

Más información en:

a) <http://www.ifc.unam.mx/investigadores/garcia-sainz>
y b) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Garcia-Sainz+JA%5BAll+Fields%5D+OR+Garcia-Sainz+A>