



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM**
POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

FOSFORILACIÓN Y DESENSIBILIZACIÓN
DEL RECEPTOR LPA₁ PARA EL ÁCIDO
LISO FOSFATÍDICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

**SELMA ERÉNDIRA AVENDAÑO
VÁZQUEZ**

Tutor: DR. J. ADOLFO GARCÍA SÁINZ



RECONOCIMIENTOS

MÉXICO, D. F.

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. J. Adolfo García Sáinz, en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. J. Adolfo García Sáinz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Herminia Loza Tavera	Facultad de Química, UNAM
Dr. Félix Recillas Targa	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Rafael Moreno Sánchez	Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"
Dr. Jorge Vázquez Ramos	Facultad de Química, UNAM

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Herminia Pasantes Ordóñez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Jorge Vázquez Ramos	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Félix Recillas Targa	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. José Vargas Díaz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dr. Rafael Moreno Sánchez	Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"
Suplente	Dra. Ivonne Rosenstein Azoulay	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente	Dr. Gloria Soberón Chávez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Agradezco la asesoría técnica de la Dra. Rocío Alcántara Hernández, del M. C. Valentín Mendoza Rodríguez y la Q.F.B. Cristina Aranda Fraustro.

Agradezco a los auxiliares de laboratorio Fermín Domínguez Díaz y María Guadalupe Jiménez

Agradezco al personal de las Unidades de apoyo del Instituto de Fisiología Celular

Unidad de Microscopía Electrónica,
Dr. Luis Fernando Oropeza Hernández
M. C. Rodolfo Paredes Díaz
Dra. Olga Araceli Patrón Soberano

Unidad de Biología Molecular:
Dra. Laura Ongay Larios
Biol. María Guadalupe Códiz Huerta
Biol. Dolores Minerva Mora Cabrera

Unidad de Cómputo
Biol. Gerardo Coello Coutiño
Ing. Ivette Rosas Arciniega
y especialmente al Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo

Taller de Mantenimiento
Ing. Aurey Galván Lobato
Ing. Manuel Ortíz Benavides

Biblioteca
Raúl Zarate Zarza
Javier Gallegos Infante

Bioterio
M.V.Z. Héctor Alfonso Malagón Rivero

Agradezco al personal del Departamento de Compras del IFC
Antonio García Ortiz
Aurora Gutiérrez Bardales
Juliana Estrada Reyes
y especialmente a María del Carmen Mendoza Ávila

Agradezco además a
Dominga Vera García,
Ma Guadalupe Ramírez Zenteno,
Rosario Villaseñor Ávila y
María Elena Gutiérrez Robles

También agradezco a los miembros del Posgrado en Ciencias Bioquímicas

Dra. Amelia Farrés González-Saravia
Dra. Rosario Muñoz Clares
Dr. Jorge Vázquez Ramos

Leticia García Gutiérrez
Adelina Gonzáles Pérez

Este proyecto se realizó con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN206302 y IX247004), del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (36230-N y 144587) y de la Dirección General de Estudios de Posgrado.

*Cuando los chicos de pregrado me preguntan
cómo es que aguanto tanto tiempo estar encerrada en el laboratorio,
volteo y me doy cuenta de que las paredes están ahí.*

*“No espero nada. No temo nada. Soy libre”
Δεν ελπίζω τίποτα. Δεν φοβάμαι τίποτα. Είμαι λεφτερός*

Nikos Kazantzakis

Eréndira

*Ella está parada
en la hoja verde,
está de pie ante la vida,
camina sobre la hoja,
salta su nervadura,
juega con ella.*

*Cuando siente tristeza,
llora,
y la planta bebe
sus lágrimas.
En su soledad
no canta,
su voz se quiebra,
no pasa nada.*

*Se acaricia a sí misma
y se reconforta,
se calma,
se envuelve en la frescura,
y duerme, duerme,
y en el sueño
mordisquea el porvenir.*

*Por la mañana,
se lava la cara
en una laguna de menta.
El sol la calienta
y abraza,
se siente pequeña.*

*Mi hermana,
amiga de la soledad,
de mi infancia,
parada en la hoja verde,
en la noche siguiente
se despide
de las luces a sus pies
y baila.*

*Amaranta
14-11-98*

DEDICATORIA

A Odette, Amaranta, Etelvina y Alberto
Porque lo mejor que me pudo haber pasado fue... que fueran ustedes

A Gabriel, Luz y Neptali
Por el inmenso amor demostrado a cada minuto y con cada acción

A Fabián
Por todos los “porque”

A la memoria de

Corina
Porque este viaje va también por ti

Prof. José Alberto Ceniceros
Un gran Diablo de los números que en el cielo/infierno de los números estará
dando clases de pie
(sentado no, porque se duerme)

A mi amada UNIVERSIDAD

AGRADECIMIENTOS

*“Todo lo que fui es todo lo que soy,
con lo que vine ayer es con lo que me voy hoy”
Alejandro Sanz*

Agradezco

Infinitamente al **Dr. Jesús Adolfo García Sáinz** por toda la paciencia, tolerancia y libertad. Por enseñarme con su ejemplo. Por ser un Caballero y un tutor al que siempre pude admirar.

*“...al final del viaje partiremos de nuevo, al final del viaje comienza un camino, otro buen camino”
Silvio Rodríguez*

A mi comité turotal de maestría

Agradezco al Dr. Jorge Vázquez Ramos por tomar tan enserio el papel de co-tutor, por su compromiso con el posgrado, por la buena disposición para discutir conmigo y por las muchas veces que estuvo apunto de ahorcarme con mi propia lengua.

*“De los dóciles y humildes pueden salir los santos, pocas veces los sabios”
Santiago Ramón y Cajal*

Al Dr. Rafael Moreno Sánchez por lo duro y rudo que fue. Por que no esperaba menos de él y yo no pensaba dar menos. Porque siempre fue un reto discutir con él y eso mantuvo vivo mi espíritu.

*“La crítica científica se justifica solamente entregando, a cambio de un error, una verdad”
Santiago Ramón y Cajal*

A mi comité tutorial de doctorado

A la Dra. Herminia Loza Tavera por ayudarme cuando no había nadie que pudiera hacerlo, por ser tan crítica y exigente. Por haber compartido conmigo momentos difíciles, con lo que no hizo otra cosa que honrarme con su amistad. Por todas las palabras, enseñanzas y además por perfeccionar mi lenguaje científico y con ello mi pensamiento.

*“En cierto sentido no sería paradójico afirmar que el hombre que plantea un problema no es enteramente el mismo que lo resuelve”
Santiago Ramón y Cajal*

Al Dr. Félix Recillas Targa por todo lo que hablamos, por todo su apoyo, todo lo que vi y aprendí, porque no quería (pero lo hacías tan bien)... ser mi co-tutor.

*“Descubrir es aproximar dos ideas que se hallaban separadas”
Pedro Simón Laplace*

A mi jurado de examen doctoral

*“...todos podemos comprobar que sólo nos estiman y respetan quienes nos leen y tratan de comprendernos”
Santiago Ramón y Cajal*

A la Dra. Herminia Pasantes, al Dr. Jorge Vázquez, al Dr. Félix Recillas, al Dr. José Bargas, al Dr. Rafael Moreno, a la Dra. Ivonne Rosenstein y a la Dra. Gloria Soberón por haber leído y corregido mi escrito. A los Drs. Jorge Vázquez y Rafael Moreno quizás algún día (uno de esos que ellos mencionan... “cuando yo sea”...) cuando yo tenga”) les agradeceré haberme hecho re-escribir la tesis, pero por el momento no puedo.

*“El trabajo más relevante del siglo XX es un artículo de dos páginas, (Nature 1953, Apr 25:171: 737-738).”
J. Adolfo García Sáinz*

A las personas del IFC que hicieron todo lo que estuvo en sus manos para ayudarme

A Cristi Aranda, Valentín Mendoza, Pati Juárez y Dulce Mata porque sin su valiosa ayuda no hubiera hecho las proteínas de fusión. A las chicas de la UBM, Lupita y Mine por siempre apoyarme y ser tan lindas conmigo. A la Dra Ongay por compartir mis “angustias moleculares” (que resultaban muy interesantes para ella), por los consejos técnicos y toda la buena vibra. Al personal de Microscopía, Luis Fernando, Rodolfo y Araceli por el apoyo y la tolerancia. Gracias Luis Fernando por el cigarro de las mañanas y la plática inteligente y divertida. A Raúl y Javier en la Biblio, por ayudarme n veces con las fotocopadoras y a encontrar lo que estaba frente a mis ojos. A Héctor Malagón por toda la ayuda y por evitar que mis manos se mancharan de sangre (de conejo). Gracias por el ejemplo de buen trabajo y por hacerlo de tan buen humor. A los chicos de Computo, sobre todo a Juan (Super-Juan) Barbosa que me salvó la vida miles de veces, junto con miles de archivos, datos, presentaciones etc. Juan eres casi perfecto. Para ser perfecto solo te falta traer un localizador satelital incluido para que sepamos exactamente en que parte del IFC estas. Gracias por ayudarnos y soportarnos a todos. A los chicos del taller Aurey y Manolo, por secundarme en todo lo que se me ocurría. Gracias por hacerlo todo, o por lo menos intentarlo. A las chicas de compras nacionales Juliana (reina chula) y Aurora, por pelear a mi lado contra TRoríficas-cancelaciones, presupuestos, dineros y proveedores. A Mari Carmen, de compras internacionales, por los cigarritos a escondidas, por hacer que todo llegue pronto, bien y aún frío. Por su ejemplo de entrega en el trabajo.

A todos quienes han influido en mi formación

A la facultad de Ciencias UNAM, por haberme formado/deformado. A la facultad de Química, por la segunda parte y por ser mi casa en este crecimiento desgastante. Al posgrado de la Facultad de Química, ese alguien sin cuerpo que se encarga de hacer todo, planearlo todo y asignar ¡cada comité! Al IFC y toda su gente, valiosa a más no poder. A mis profesores: Rita Zarate, Arnulfo Sánchez, Toño Le Chang, Martha y Jorge Dahdá quienes abrieron mi mente. José Luis Álvarez, Silvia Devars, María Eugenia Gonsebatt y Julio Prieto por retar mi pensamiento y hacerme crecer. A Miguel Ángel Palomino, porque tuve que aprender a leer inglés en menos de un semestre (o estaba frita) por tus gritos, tu esfuerzo y creatividad en el aula y por ser un excelente amigo. Y a Carlos Castillo Pompeyo por las mejores clases de Bioquímica que he tomado (que influyeron mucho para que siguiera el camino que he seguido), por ser mi amigo y por enseñarme que el aprendizaje es una relación íntima que establece uno con un libro.

“Si uno no sabe algo, lo que tiene que hacer es ir a la pinche biblioteca, buscar un pinche libro y leerlo”.
Pompeyo

Al laboratorio del Dr. García Sáinz

(El otro lado) A Rocío, porque en un ambiente tan difícil eres tú la única que siempre esta para bien, por la sorprendente capacidad de seguir sin importar la adversidad y además hacerlo de tan de buen grado, por haber sido mi amiga por tanto tiempo y estar conmigo en tantas “malas”. A Cristián por soportarme, por ser tan solidario, por compartir mucho, mucho más que solo el trabajo en el lab. A Aliesha porque si no hubieras llegado a darme ánimos no hubiera podido seguir, por tu buen carácter, tu optimismo, por compartir un poquito de Claudio conmigo y porque tú y José (mi amigo de chocolate) son ¡familia! A Paty (Party) por los buenos momentos y las muchísimas risas compartidas. A Fermín, por las pláticas mañaneras y por tu ayuda en mil cosas. A Diana, Javier e Itzel, por que en suma... hacemos un gran equipo. (El de este lado) Tere Ro por que un día fue bueno y por la ultima temporada, que fue un espacio para poder terminar. A Bety, Ekaterina (la mexicana) por ser ejemplo de tenacidad, Ekaterina (la rusa) porque ya nos hacía falta sangre fresca, Tzindilú, Alejandro Wrooman por ser compañero y amigo, por los chistes y la complicidad, porque para mi fortuna estas ahí. A Lupita Jiménez por siempre ayudarme. (Los de antes) Luz, por lo divertida que eras, Agustín, por todo lo que me ayudaste, Artemio, por el ABC del pipeteo, Mario, Paco, Vero, Alejandro y Andrés por los buenos ratos. Al Sr. Salvador y a Ivonne por su ayuda en otros buenos tiempos.

“Somos lo que hay, lo que se vende como pan caliente, lo que prefiere y pide la gente, lo que se agota en el mercado, lo que se escucha en todos lados... somos lo máximo”
Manolín (el Médico de la Salsa)

A tres laboratorios del IFC que fueron fundamentales

Al laboratorio de la Dra. Alicia González Manjarrez

A ese maravilloso laboratorio que me adoptó, me quiso, me apapacho y compartió conmigo travesuras, baile, risas, chelas, y horas y horas de palabras interesantes, inteligentes y divertidas. Gracias a La Miss, porque cuando se me olvida lo maravillosos que puede ser hacer ciencia, pensar ciencia y vivir ciencia, me lo recuerda. A Cristi Aranda por los interrogatorios que siempre aclararon mi mente, por ser tan buena amiga, mía y de Ama (aunque siempre más de Ama, pero hasta por eso gracias). Al pariente Mauricio Romero, por el “Treme”, por estar conmigo, por ser mi hermanito, por quererme tanto (*idem*). A Alexander de Luna por compartir tu mundo conmigo, familia (Pao, por las ricas pláticas, Darío, por los ricos besos y Julián) y Jalisquillos que te acompañan (en especial Arturo y Luis esposas e hijas). Gracias Alex por los sábados de frontón en Los Alacranes, por iniciarme en la docencia, por haber pasado tanto junto a mi y seguir ahí. A Martín Escamilla por las clases de tango y todas las risas. A Lulu y Simón. A Andrea y Xitlali por ser mis amigas, por recordarme lo maravilloso que es ser Bióloga, por la frescura, por darme lecciones de evolución, ecología, agaves, mezcales y de vida.

Al laboratorio del Dr. Fernando López Casillas

A Vale por siempre estar dispuesto a reír conmigo y porque no conozco alguien que ame tanto el trabajo en el laboratorio y lo haga con tal gusto, que inspire. A Paty Juárez por ser mi compañera solidaria y mi amiguita favorita. A Vero Ponce por tu claridad mental compartida en sabrosas pláticas. A Adver por las charlas buenísimas. A Dulce por ser mi amiga y ayudarme en muchos sentidos. A Gaby por tu buen carácter, por portarte siempre increíble conmigo. Por Camila y Juan. A Male y Penélope además por el “Clube de tupperware”. Les agradezco por soportarme y quererme como soy.

Al laboratorio del Dr. Luis Vaca

Por ser mi refugio académico en épocas difíciles. Gracias Dr. Vaca por su generosidad, por compartir los seminarios, las discusiones científicas, las ideas y sobre todo por sus consejos de microscopía confocal. A Angélica y Gala por dejarme ser parte de algo muy especial. A todos en el establo, en especial a Fabián, Pichi, Aldo, Inés, Benito, Cecilia,

Poncho y Julián, con quienes he disfrutado de muchas cosas, (pláticas de horas sobre ciencia, el FLJ, los miRNAs, pesca de trucha, comidas, cantadas etc.), quienes me han ayudado para crecer académicamente y de quienes he recibido mucho cariño.

"This is the story of the hare who lost his spectacles"
Jethro Tull

Quiero agradecer especialmente a todas esas personas que han hecho mi vida infinitamente dulce

A mis padres, por que nunca tendré como pagarles todo el amor, todo el respeto y toda la libertad. **A Etel**, por tu amistad, tu ejemplo, tu fuerza, tu apoyo, tu magia (que en una noche hacia aparecer de la nada traje de jarocha, mandil bordado y flores de papel), tu cariño (un poco apache), tu voz (clara y fuerte), tu eterno cantar que siempre me indicó donde estaba mi hogar. Gracias por tu vida dedicada a nosotras, brindada con tanto amor y tanta creatividad. **A Beto**, por el ajedrez (que nunca terminó con el monstruo, sólo lo hizo ajedrecista), por las palabras y las ideas que fueron y vinieron en todos los tonos, por haber cimentado mi filosofía (barata ahora encarecida) por los libros y la llave al mundo de las letras, por la música, el cine y el baile, sobre todo por el baile. Por el cariño (éste un poco mas tierno) y por tu sueño... que me dio la vida.

A mis hermanas Amaranta y Odette, porque este viaje ya valió la pena solo por haberlas tenido junto a mí. Por que no hay nada que me duela, que me guste, que disfrute tanto como ustedes. **A Ama** por protegerme y aceptarme, por la poesía y la pintura. Por ser mi compañera y amiga. Por **Muriel, Olivia y Jorge**, porque cuando creo que ya no puedo amar a nadie tanto como a mi familia... la familia crece. **A Odette** por ser siempre la voz con la claridad y la certeza, por las miles de lecciones que me has dado. Por ser chiquita y de manos y orejas pequeñas. Por ser mi cómplice y mi amiga. A las dos las amo de aquí a la luna dos vueltas y de regreso.

A Gabriel, Luz y Neptalí. A ti abuelito, porque nadie me querrá como tú. A ti abuela por la paciencia (por momentos casi perdida), por las tardes después de la escuela. A ti tío, por ser tan cariñoso con nosotras (pellizquitos de pulguita incluidos), gracias tío por los viajes a la 11 cada noche por Ama y por mí y gracias por tu familia (**Nieves y Gonzalo**) que cuidan y quieren tanto a la mía.

A Fabián por la luz, la ternura y el amor que has traído a mi vida, porque contigo puedo ser todo y hacer todo, por hablar de ciencia conmigo a cualquier hora y en cualquier lugar. Por devolverme a Eréndira. Por cada destornudo pagado con un beso. Por enseñarme a andar en bicicleta, compartir tu música conmigo y ser "derecho, macizo y reata".

A mi familia paterna. A mi abuela Ofelia, mi tía Chata (Josefina) y mis tíos Ricardo, Manuel y Román. A sus respectivas familias, en especial a Ara, Amada y Cinthya, porque fuimos una gran generación y por lo feliz que fui bailando con ustedes.

A mis amigos durante tantos años.

A Martha mi "más vieja amiga". A mi hermano Gerardo, por tu mundo (fascinante y diferente) que siempre se suma al mío. A Erika, donde estés, estamos juntas. A Marco por los idiomas y los libros, por todo lo que hemos vivido juntos "Ti voglio moltissimo". A Jorge Antonio por estar. A Armando Mata por permanecer. A Luis Luna por abrir mis ojos y mi entendimiento, por las horas y horas de charla. A Aleph (por tu voz, tus palabras y tus risas), Froy (por ser mi gurú científico y uno de mis mejores amigos), a Dago (por el "cabronsita" que siempre me hace feliz), Sirobska (porque siempre estas ahí, porque te admiro y te quiero), Victor, Valeria, Armando, Mariana (por las mañanas deliciosas en la Fac, de Scrabble y tortas de tres quesos, por los maratones de Cine y todo lo que vivimos), Mauricio Ruvalcaba (por lo que fue), Dalia Amor, Genaro, Laura Padierna, Solange, Patricia Romero (Pato oaxaqueño), Sofía Gómez, (Chofilalala), Katja, Corina, Juan Antonio, Kassandra y Adrián, por las prácticas de campo y todos los buenos momentos vividos en Ciencias. Gabriel Gazquez (por la entera identificación, los planes y los sueños), Javier Roman² y los HM (por enseñarme a nadar y con ello hacerme más libre). A Lucia (Nikiporrori) por siempre arrastrarme a la superficie y a Pili por ser mi compañerita cuando éramos chiquitas en este negocio. A Agustín por Los Alacranes, los viajes y los sueños (algunos hechos realidad y otros olvidados en el tintero). Gracias por el paquete-títulos y por librarme para siempre de quedarme solterona. Por todo lo bueno Godira. Gracias a mi ex familia política por todo lo compartido, en especial a Ricky, Yola, Mario, Lucia y Martha.

Gracias por todo.

"Cualquier reclamación, que sea sin membrete. Buenas noches amigos y enemigos"
Silvio Rodríguez

Índice

1. Introducción	8
1.1. El ácido lisofosfatídico.....	8
1.2. Los receptores para ácido lisofosfatídico.....	15
1.3. Los receptores acoplados a proteínas G.....	20
2. Justificación del trabajo y antecedentes	23
3. Hipótesis y Objetivos	24
4. Materiales y métodos	25
4.1. Cultivo celular.....	25
4.2. Determinación de la concentración de calcio intracelular, $[Ca^{2+}]_i$	25
4.3. Determinación de fosfatos de inositol, IPs.....	26
4.4. Determinación de la producción de AMPc.....	26
4.5. Ensayo de unión de $GTP\gamma S$ a membranas.....	27
4.6. Caracterización de los receptores para LPA expresados en forma endógena en las células C9.....	27
4.7. Construcción de las proteínas de fusión y su expresión en forma estable en las células C9.....	28
4.8. Ensayos de fosforilación.....	28
4.9. Ensayos tipo Western blot.....	29
4.10. Estudios de microscopía confocal.....	30
4.11. Análisis estadístico.....	30
5. Resultados	31
5.1. Señalización y desensibilización de los receptores para LPA	31

5.2.	Acoplamiento funcional de los receptores para LPA con las proteínas G.....	34
5.3.	Desacoplamiento de los receptores para LPA y las proteínas G.....	39
5.4.	Los subtipos de receptores para LPA presentes en las células C9.....	41
5.5.	Intento de inmunoprecipitación del receptor LPA ₁ endógeno.....	43
5.6.	Anticuerpo anti LPA ₁	44
5.7.	Construcción de las proteínas de fusión.....	45
5.8.	Generación de la línea celular C9 LPA ₁ -EGFP.....	47
5.9.	Inmunoprecipitación del receptor LPA ₁ fosforilado.....	48
5.10.	Efecto de la activación de los receptores de LPA y angiotensina II en la fosforilación del receptor LPA ₁	50
5.11.	El PMA induce la internalización del receptor LPA ₁ -EGFP.....	51
6.	Discusión.....	55
7.	Conclusiones.....	60
8.	Perspectivas.....	61
8.1.	Desensibilización, fosforilación e internalización de los receptores LPA ₂ , LPA ₃ y LPA ₄	61
8.2.	Participación de la 3a asa y el extremo COOH en la regulación por fosforilación del receptor LPA ₁	62
8.3.	Regulación de los receptores para LPA por otros agonistas.....	64
8.4.	Isoformas de PKC que regulan al receptor LPA ₁	65
8.5.	Homodímeros y/ heterodímeros funcionales de los receptores para LPA.....	66
9.	Literatura citada.....	67
10.	Apéndice.....	77

Índice de tablas y figuras.

Tabla 1. Principales actividades biológicas del LPA.....	9
Figura 1. Vías de señalización del LPA.....	10
Figura 2. Los LPA.....	11
Figura 3. Vías de síntesis del LPA.....	13
Figura 4. Vías de degradación del LPA.....	14
Tabla 2. Los receptores para LPA.....	20
Figura 5. Mecanismo general de acción de los GPCRs.....	21
Figura 6. Desensibilización de los GPCRs.....	22
Figura 7. Desensibilización al LPA en las células C9.....	31
Figura 8. Curvas dosis-respuesta.....	32
Figura 9. Comparación de la respuesta de LPA en dos líneas celulares.....	32
Figura 10. Sensibilidad al PMA de diferentes GPCRs en las células C9.....	33
Figura 11. Una PKC sensible a PMA bloquea la señal de LPA en las células C9.....	34
Figura 12. Inhibición de la proteína Gi por ADP ribosilación.....	34
Figura 13. Participación de Gi en la señal inducida por LPA en las células C9.....	35
Figura 14. Producción de IPs en las células C9.....	35
Figura 15. Incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por LPA en presencia de tapsigargina.....	36
Figura 16. Inhibición de la adenilato cilasa por la proteína Gi en las células C9.....	37
Figura 17. Efecto inhibitor del PMA sobre la acumulación de AMPc en las C9.....	38
Figura 18. El LPA disminuye los niveles de AMPc a través de la proteína Gi.....	38
Figura 19. La PKC inhibe la acumulación de AMPc en las células C9.....	39
Figura 20. La activación de PKC reduce el acoplamiento funcional del receptor para LPA con las proteínas G en las células C9.....	39
Figura 21. Efecto de la angiotensina II sobre la unión de GTP γ S a membranas extraídas de células C9.....	40
Figura 22. Purificación de la proteína α_i	41
Figura 23. RNA de las células C9.....	41
Figura 24. RT-PCR de los mRNAs de los receptores Edgs para LPA.....	42
Figura 25. Fragmentos de los mRNAs de los Edgs amplificados por PCR y RT-PCR....	42

Figura 26. Análisis por RT-PCR de la presencia del mRNA del receptor LPA ₄ en diferentes líneas celulares.....	43
Figura 27. Intento de purificación del receptor LPA ₁	43
Figura 28. LPA ₁ de humano y rata.....	44
Figura 29. Péptido LPA ₁	44
Figura 30. Segundo intento de purificación del receptor LPA ₁	44
Figura 31. Cuatro diferentes vectores para generar proteínas de fusión.....	45
Figura 32. Diseño general de los oligonucleótidos.....	46
Figura 33. Curva de letalidad del G418 en las células C9.....	47
Figura 34. Citometría de flujo de las células C9 transfectadas con el pEGFP-N1-LPA ₁ ..	47
Figura 35. Efecto del LPA y la activación de PKC en la [Ca ²⁺] _i en las células C9 LPA ₁ -EGFP.....	48
Figura 36. Fosforilación del receptor LPA ₁ -EGFP. I.....	49
Figura 37. Fosforilación del receptor LPA ₁ -EGFP. II.....	49
Figura 38. Fosforilación del receptor LPA ₁ -EGFP. III.....	50
Figura 39. Participación de la PKC en la desensibilización homóloga y heteróloga del receptor LPA ₁	51
Figura 40. Microscopía de las células C9 LPA ₁ -EGFP.....	51
Figura 41. Cortes en Z de tres células C9 LPA ₁ -EGFP.....	52
Figura 42. Cortes en Z de una célula C9 LPA ₁ -EGFP.....	52
Figura 43. Localización subcelular del receptor LPA ₁ -EGFP.....	53
Figura 44. Internalización del receptor LPA ₁ -EGFP inducida por PMA.....	53
Figura 45. Internalización del receptor LPA ₁ -EGFP.....	54
Figura 46. Regulación del receptor LPA ₁ por fosforilación.....	60
Figura 47. Fosforilación de los Edgs inducida por PMA y LPA.....	61
Figura 48, Vectores pGEX-2T-LPA ₁ 3 ^a y pGFX-2T-LPA ₁ COOH.....	62
Tablas 3. Oligonucleótidos diseñados para la mutagénesis del LPA ₁	63
Figura 49. Fosforilación del receptor LPA ₁ inducida por diferentes estímulos.....	64
Figura 50. Isoformas α y δ de PKC.....	65

Referencia de la tesis

Avendaño-Vázquez SE. 2005. *Fosforilación y desensibilización del receptor LPA₁ para el ácido lisofosfatídico*. Tesis doctoral. Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México. 90 pag.

Resumen

El ácido lisofosfatídico (LPA) es un mediador celular capaz de generar diversos efectos biológicos en muchos tipos de células y tejidos. Este mediador lipídico actúa a través de cuatro receptores acoplados a proteínas G, que han sido descritos muy recientemente, los LPA₁₋₄. La existencia de diferentes subtipos de receptores para el ácido lisofosfatídico sugiere que éstos deben poseer diferentes propiedades, tanto en su acción como en su regulación. El objetivo de este trabajo fue analizar la influencia de la proteína cinasa C (PKC), en la función y fosforilación del receptor LPA₁, expresado en la línea celular epitelial de hígado de rata C9. En estas células, el ácido lisofosfatídico induce la producción de fosfatos de inositol, incrementa transitoriamente la concentración de calcio intracelular e inhibe la actividad de la adenilato ciclasa. Estas respuestas fueron anuladas en células tratadas previamente con el éster de forbol, miristoil forbol acetato (PMA). La acción del éster de forbol fue bloqueada con el uso de inhibidores de la PKC y por la “down regulation” de la cinasa. Se observó que la fosforilación del receptor LPA₁ se incrementa en respuesta al éster de forbol. El efecto fue rápido ($t_{1/2} \sim 1$ min), intenso (2 veces con respecto a la fosforilación basal del receptor) y sostenido (por lo menos hasta los 60 min). Los inhibidores de la PKC reducen claramente la fosforilación del receptor LPA₁ inducida por el éster de forbol. El receptor LPA₁ fusionado a la proteína verde fluorescente se internaliza en respuesta a la activación de la PKC. Además, el ácido lisofosfatídico y la angiotensina II fueron capaces de inducir la fosforilación del receptor LPA₁, demostrando que este receptor puede ser objeto tanto de desensibilización homóloga como heteróloga.

Abstract

Lysophosphatidic acid is a potent cellular mediator with diverse biological effects on many cell types and tissues. Lysophosphatidic acid (LPA) actions are mediated by four G protein coupled receptors recently described, LPA₁₋₄. The existence of several LPA receptor subtypes suggests different properties in their action and regulation. We tested the effect of protein kinase C (PKC) direct activation by phorbol esters on the phosphorylation and function of LPA₁ receptor, expressed in the rat hepatic epithelial cell line, C9. In these cells, lysophosphatidic acid induced inositol phosphate production, increased intracellular calcium concentration and inhibited adenylyl cyclase activity. These responses were abolished in cells previously challenged with active phorbol esters. Phorbol esters action was blocked by inhibitors of PKC and by PKC isoforms down regulation. LPA₁ receptor phosphorylation was observed in response to phorbol esters. The effect was rapid ($t_{1/2} \sim 1$ min), intense (2-fold) and sustained (at least 60 min). Protein kinase C inhibitors markedly decreased the LPA₁ receptor phosphorylation induced by phorbol esters. LPA₁ receptor tagged with the green fluorescent protein internalized in response to protein kinase C activation. In addition, lysophosphatidic acid and angiotensin II were also able to induce LPA₁ receptor phosphorylation showing that LPA₁ receptor can be subjected to homologous and heterologous desensitization.

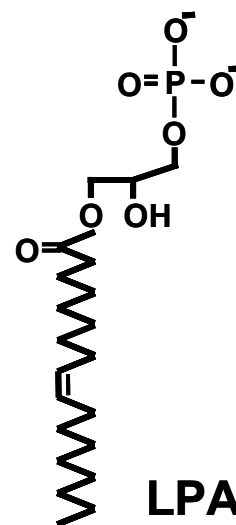
Abreviaturas

AC	(<u>A</u> denyl cyclase) adenilato cilcasa
Ang II	<u>a</u> ngiotensina <u>I</u> I
ATX	<u>a</u> uto <u>t</u> axina
BIM	<u>b</u> isindol <u>i</u> l <u>m</u> aleimida
Bk	(<u>b</u> radik <u>i</u> nin), bradicinina
BSA	(<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin), albúmina sérica bovina
[Ca²⁺]_i	concentración intracelular de calcio
DNA	(<u>d</u> eoxyribonucleic <u>a</u> cid) ácido desoxiribonucleico
ET	<u>e</u> ndot <u>e</u> lina
Edg	(<u>e</u> ndothelial <u>d</u> ifferentiation <u>g</u> ene), gen de diferenciación endotelial
ERK	(<u>e</u> xtracellular signal- <u>r</u> egulated <u>k</u> inase) cinasa regulada por señales extracelulares
GEF	(<u>g</u> uanine nucleotide <u>e</u> xchange <u>f</u> actor) factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GPCRs	(<u>G</u> <u>p</u> rotein <u>c</u> oupled <u>r</u> eceptors), receptores acoplados a proteínas G
GRKs	(<u>G</u> <u>p</u> rotein <u>c</u> oupled <u>r</u> eceptors <u>k</u> inases), cinasas GPCRs
IUPHAR	(<u>I</u> nternational <u>U</u> nion of <u>P</u> harmacology) Unión Internacional de Farmacología
LDL	(<u>l</u> ow <u>d</u> ensity <u>l</u> ipoproteins) lipoproteínas de baja densidad
Liso-PLD	(<u>l</u> ysophospholipase <u>D</u>), lisofosfolipasa D
LPA	(<u>l</u> ysophosphatidic <u>a</u> cid), ácido lisofosfatídico
LPC	(<u>l</u> ysophosphatidyl <u>ch</u> oline), lisofosfatidilcolina
MAPK	(<u>m</u> itogen- <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inase) cinasa activada por mitógenos
PA	(<u>p</u> hosphatidic <u>a</u> cid), ácido fosfatídico
PI3K	(<u>p</u> hosphatidy <u>l</u> inositol <u>3</u> - <u>k</u> inase) fostatidilinositol 3 cinasa
PKC	(<u>p</u> rotein <u>k</u> inase <u>C</u>), proteína cinasa C
PMA	(<u>p</u> horbol <u>m</u> yristate <u>a</u> cetate), forbol-miristato-acetato (también TPA)
PTX	(<u>p</u> ertussis <u>t</u> oxin) toxina pertussis
S1P	(<u>s</u> phingosine- <u>1</u> - <u>p</u> hosphate), esfingosina-1-fosfato
SREs	(serum response elements), elementos de respuesta a suero
ST	(staurosporine), estaurosporina
SOC	(<u>s</u> to <u>r</u> e- <u>o</u> perated Ca ²⁺ entry <u>ch</u> annels), canales de Ca ²⁺ activados por vaciamiento de reservorios

1. Introducción

1.1. El ácido lisofosfatídico

La primera parte de la historia del ácido lisofosfatídico (LPA) fue el descubrimiento de su papel como intermediario en la síntesis *de novo* de triglicéridos y de los fosfolípidos de membrana. En los años 80 el LPA cobró gran importancia, al publicarse numerosos estudios donde se describió como mensajero celular [1-6]. Sin embargo, sería hasta la última década del siglo pasado cuando ocurrirían grandes avances en el estudio del LPA y su señalización.



Un grupo pionero en este campo fue el dirigido por Wouter H. Moolenaar del Netherlands Cancer Institute en Ámsterdam. Ellos hicieron una extensa caracterización del LPA como mensajero celular [7]. Las características bioquímicas del LPA hacían difícil su purificación, lo que a su vez hacía complicado determinar si era el responsable directo de los efectos celulares o lo era alguno de sus metabolitos. El grupo de Moolenaar fue el que confirmó que el LPA era el principal agente biológicamente activo presente en el suero, describiéndolo entonces como factor de crecimiento [8].

El interés creciente en el LPA como mensajero llevó a la publicación de una amplia gama de estudios donde se describió su participación en diversos procesos celulares como es la migración celular [9,10], la proliferación y la sobrevivencia celular [11-14], la activación de la transcripción de genes regulados por elementos de respuesta a suero (SREs) [15], la agregación de plaquetas [16,17], la contracción de músculo liso [18,19], la mielinización [20,21], la liberación de algunos neurotransmisores [22,23] y la reorganización del citoesqueleto durante la formación de fibras de estrés, el establecimiento de adhesiones focales, la retracción de neuritas y el “rounding” celular [24-28].

El descubrimiento de las potentes y diversas acciones que ejercía el LPA sobre casi todas las células de mamífero estimuló la investigación sobre este fosfolípido. Al grupo de Moolenaar, se sumaron otros grupos al estudio de los efectos celulares del LPA y su señalización intracelular (Tabla 1).

Tabla 1. Principales actividades biológicas del LPA

Efecto celular	Tipo celular/ comentarios	Vías de señalización/ principales efectores
Proliferación celular	Muchos tipos celulares normales y transformados	Gi-Ras-ERK1/2 [13,29,30]
Sobrevivencia celular, rescate de apoptosis	Células de Schwann, leucocitos, células de túbulos renales, células epiteliales intestinales, osteoblastos, células mesangiales, hepatocitos	Gi-PI3K-Akt/PKB [31]
Migración celular (al azar o dirigida)	En diversos tipos celulares normales y transformados, <i>D. discoideum</i> (quimiotaxis) [32]	Gi-PI3K-Tiam1-Rac [33], G _{12/13} , RhoA y Cdc42 [24,34]
Invasión de células tumorales <i>in vitro</i>	Diversos carcinomas, hepatomas y linfomas de células T [29,35-37]	
Cicatrización <i>in vivo</i>	Piel [38], epitelio intestinal [39]	
Crecimiento y plegamiento de corteza cerebral <i>ex vivo</i>	Reducción de muerte celular e incremento en mitosis de las células progenitoras [40]	
Agregación de plaquetas y agregación de plaquetas-monocitos	Sangre completa	Participación de los receptores para ADP, P2Y1 y P2Y12 [41]
Remodelamiento vascular, formación de neointima <i>in vivo</i>	Lo inducen las especies insaturadas de LPA	ERK, p38MAPK [42,43]
Retracción de neuritas, "rounding" celular, colapso y redirección del cono de crecimiento	Neuroblastos neocorticales [44] y células PC 12, neuronas DRG (dorsal root ganglion), conos de crecimiento retinales [45] y neuronas espinales de <i>Xenopus</i> [46]	Proteínas de la familia Rho: Cdc42, Rac y RhoA [47,48]
Ensamblaje de adhesiones focales y formación de fibras de estrés	Swiss 3T3 cells y células de cáncer de ovario humanas	Rho, Rac, FAK, MAPK, PI3K, PKC [49-51]
Contracción de músculo liso	Células de músculo liso y miofibroblastos	Gi-Rho GEF RhoA- Rho cinasas [18,52,53]
Inhibición/ reversión de la diferenciación	Gliomas y neuroblastomas (supresión del crecimiento de neuritas. Células de músculo liso vascular (conversión a la morfología de fibroblastos; pérdida de la contractilidad) [54]. Reversión de la morfología estelar en astrocitos [55]	Gi, Rho GEF, RhoA, ERK y p38MAPK
Mielinización	Oligodendrocitos [20,21]	
Liberación de algunos neurotransmisores	Liberación de catecolaminas en células PC12 [22], y liberación de sustancia P en neuronas sensoriales [23]	IP3-Ca ²⁺ [22] Gi [23]
Despolarización de la membrana celular	Células neuronales y no neuronales	G ₁₃ - Canales de Cl ⁻ [56,57] y corrientes cationicas no selectivas [58]
Incremento en la permeabilidad endotelial	Células endoteliales de capilares de cerebro y células endoteliales vasculares	RhoA- Rho cinasa [59]
Inhibición de la comunicación por "gap junctions" (basadas en conexina 43)	Células de hepatomas y fibroblastos	c-Src [60]
Maduración de ovocitos de mamífero <i>in vitro</i>	Ovocitos inmaduros de hamster, dependiente de las células del <i>cumulus</i> [61]	

ERK, extracellular signal-regulated kinase, PI3K phosphatidylinositol 3-kinase, MAPK, mitogen-activated protein kinase, PKC, protein kinase C, GEF, guanine nucleotide exchange factor, Tiam1 (GEF específico de Rac).

Mucho se ha progresado en el conocimiento de los eventos de señalización desencadenados por el del LPA. Ahora se sabe que el LPA, a concentraciones nanomolares, es capaz de activar diversas cascadas de señalización, entre otras, la estimulación de las fosfolipasas C y D (PLC y PLD) [62,63], la inhibición de la adenilato ciclasa mediada por la proteína Gi [13], la movilización intracelular del ión Ca²⁺ [8,13], la activación de la fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K), la activación de Rho mediada por las proteínas G₁₂/G₁₃ [64,65] y la activación de la cascada de señalización de las proteínas

MAPquinas (MAPK) [66,67]. Además, la evidencia experimental reciente demuestra que el LPA puede activar vías de señalización de forma directa o a través de la transactivación del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) [64,68-71] (Figura 1).

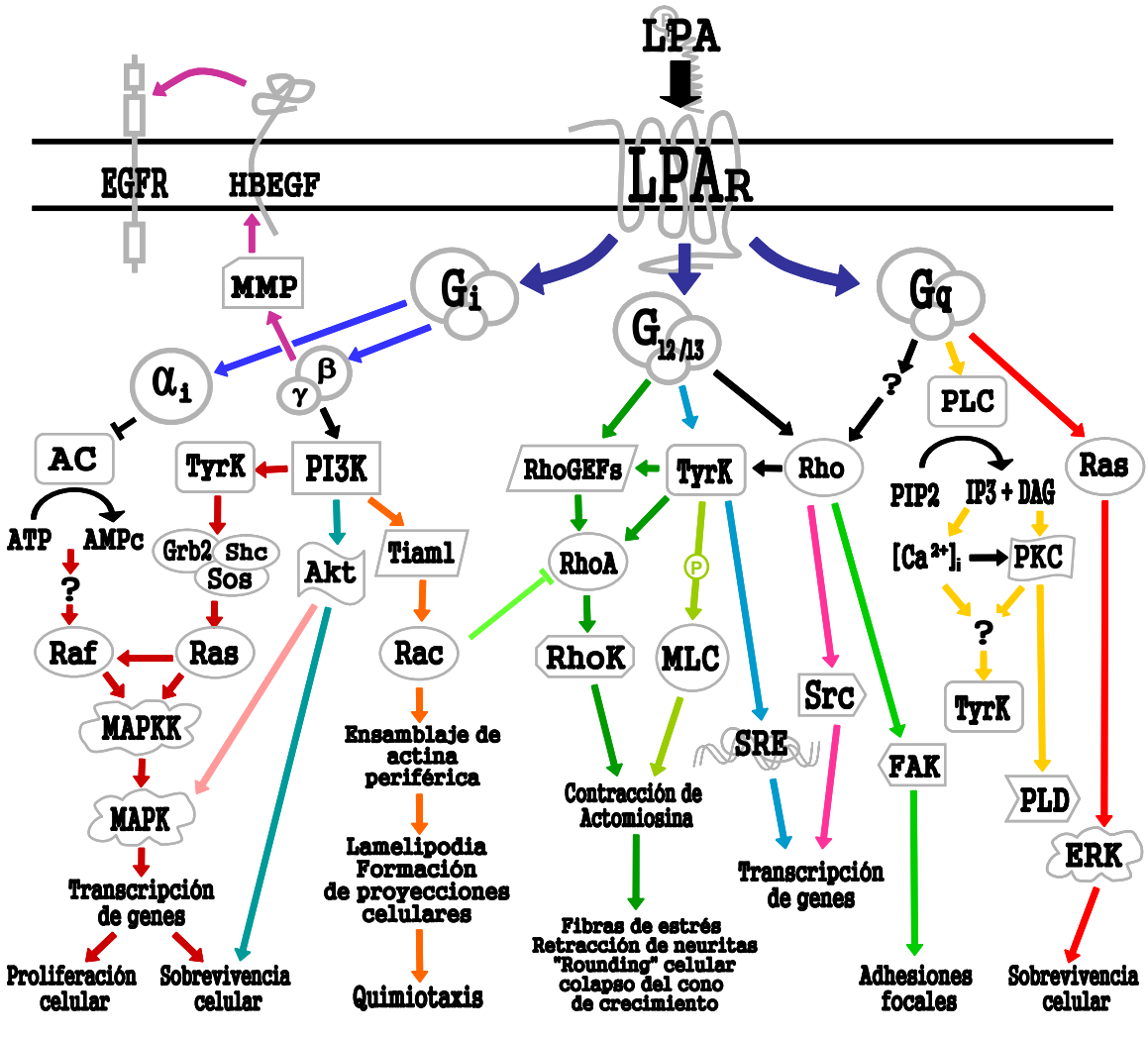


Figura 1. Vías de señalización del LPA. Los receptores para LPA se pueden acoplar a las proteínas G heterotrímicas, Gi, Gq y G_{12/13}, a través de las cuales el LPA modifica la estructura del citoesqueleto y tiene efecto en la proliferación y supervivencia celular. EGFR, epidermal growth factor receptor, HBEGF heparin-binding EGF, MMP, matrix metalloproteinases, AC, adenylyl cyclase, PLC, phospholipase C, PLD, phospholipase D, MAPK, mitogen-activated protein kinase MAPKK, MAPK kinase, ERK, extracellular signal-regulated kinase, TyrK, tyrosine kinase, PI3K phosphatidylinositol 3-kinase, PKC, protein kinase C, RhoK, Rho kinase, FAK, focal adhesion kinase, SRE, serum response element, MLC, myosin light-chain GEF, guanine nucleotide exchange factor, Tiam1 (Rac GEF). Frecuentemente se reporta la participación de MEK como MAPKK y p38 MAPK y ERK como MAPK activadas por el LPA.

Se han detectado cantidades significativas de LPA extracelular en fluidos biológicos como son el suero [72-74], la saliva [72,75-77], el líquido seminal [78], el fluido folicular [79], el fluido cerebrospinal [80] y el líquido de ascitis proveniente de

pacientes con cáncer de ovario [81-83]. Se sabe que el LPA es producido y liberado principalmente por plaquetas estimuladas [72,84-87], macrófagos y células epiteliales, así como también por algunos tipos de células tumorales [88]; pero se ha demostrado que muchos otros tipos celulares pueden producirlo [89], por lo que podría actuar tanto como mediador paracrino como autocrino [90,91].

Ya que tiene un grupo fosfato y un grupo hidroxilo libre, el LPA es mucho más soluble en agua que otros fosfolípidos. Sin embargo, debido a su carácter hidrofóbico, en los diferentes fluidos biológicos el LPA se encuentra asociado a proteínas. En el suero, donde su concentración es $\sim 2\text{-}20 \mu\text{M}$ [75,92], el LPA se encuentra unido con alta afinidad a la albúmina (en una relación de 3:1) [72,75,93], a la gelsolina plasmática y a otras proteínas aun no identificadas [94-96]. Se ha establecido que los efectos fisiológicos del LPA no dependen de la presencia de la albúmina aunque hay reportes que sugieren que su interacción puede modular su actividad biológica [8,78].

LPA es el nombre genérico con el que se denominan compuestos con la estructura común monoacil-sn-glicerol-3-fosfato. Múltiples especies de LPA se encuentran en forma natural en los fluidos biológicos (Figura 2).

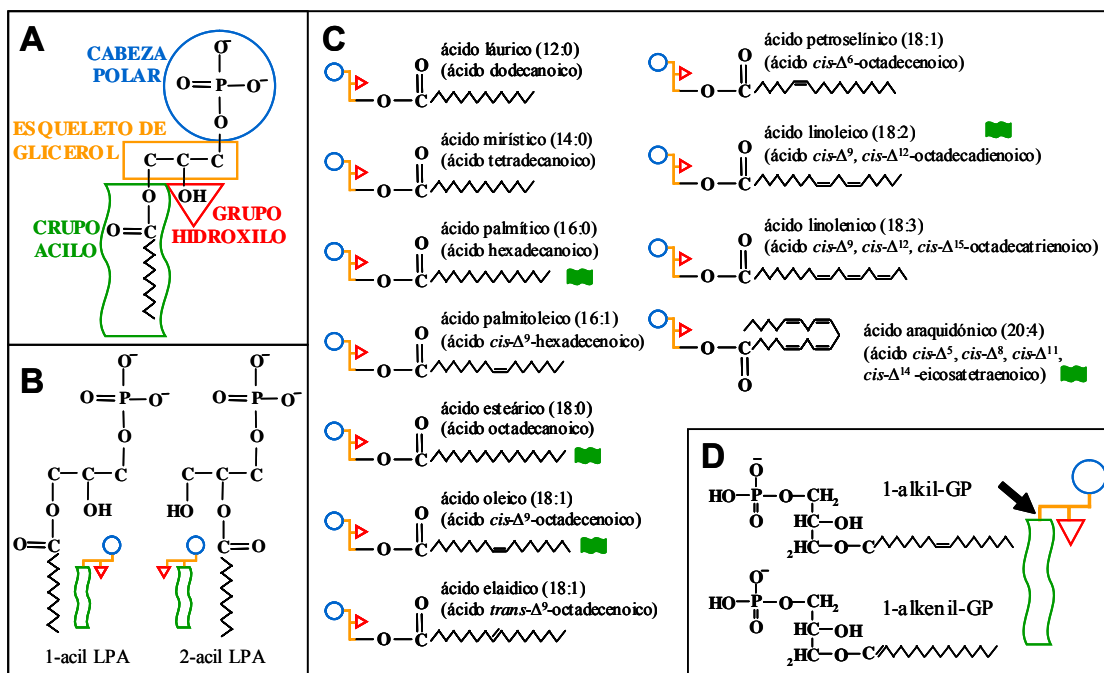


Figura 2. Los LPA. *A* Estructura general del LPA. *B* El grupo acil puede unirse tanto al C1 como al C2 del glicerol formando 1-acil LPA y 2-acil LPA. *C* Los diferentes grupos acil que pueden formar parte del LPA (marcados con un símbolo verde las especies más abundantes en la naturaleza). *D* Variantes del LPA en las cuales el grupo acil se une al esqueleto de glicerol a través de un enlace éter en lugar de un enlace éster.

Liberadas por plaquetas activadas, se han detectados especies moleculares de LPA con sustituyentes acil saturados (estearoil (18:0), palmitoil (16:0) e insaturados (oleoil (18:1), linoleoil (18:2), araquidonil (20:4)) [72,76]. Además, esta diversidad de grupos sustituyentes puede unirse tanto a la posición sn-1 como a la sn-2 del esqueleto de glicerol. En el suero predominan las especies 1-oleoil-LPA y 1-palmitoil-LPA [97], mientras que, en el líquido de ascitis predominan las especies 2-acil-LPA [81]. Además, se han detectado pequeñas cantidades de LPA en las que el grupo acil se une al glicerol a través de un enlace éter en la posición sn-1 en lugar de un enlace éster (1-alkil-2-liso-sn-glicerol-3-fosfato y 1-alkenil-2-liso-sn-glicerol-3-fosfato) [98,99]. El oleoil-LPA (1-acil 18:1 LPA), es el más usado como agonista experimentalmente, ya que se ha demostrado que es el más eficiente en inducir la variedad de respuestas celulares generadas por el LPA [100].

Ha sido complicado establecer una relación estructura-actividad para el LPA debido a que existen numerosas variantes en su composición. Sin embargo, se ha establecido que el di-anión fosfato que conforma la cabeza polar del LPA es crítico para su actividad [101], mientras que la longitud de la cadena del grupo acilo, su grado de insaturación [101,102] y su unión al esqueleto de glicerol sólo modulan la actividad del LPA [103,104]. Un hallazgo consistente es que la máxima actividad del LPA se observa con cadenas largas de acilo (C16 a C20) y esta actividad decrece al disminuir la longitud de la cadena; las especies de cadena corta, tales como el lauroil- y el decanoil-LPA, muestran poca o nula actividad [12,101]. Del mismo modo, las cadenas de ácidos grasos con insaturaciones presentan mayor actividad que las cadenas de ácidos grasos saturados [105]. También se ha establecido que el grupo hidroxilo en la posición 2 del glicerol no es necesario para la actividad de agonista del LPA (pero es importante para su solubilidad); sin embargo, grupos muy voluminosos en esta posición evitan que el LPA tenga actividad, por ejemplo, grupos hidroxil, metoxi y hasta hidroxietil son tolerados, pero no así un grupo acetil [101,105,106].

De los mecanismos moleculares que llevan a la producción del LPA se sabe muy poco. Se han propuesto dos vías de síntesis: (1) en el suero y en el plasma, el LPA se genera a partir de lisofosfolípidos; (2) en plaquetas y algunas células cancerosas, el LPA se genera a partir de ácido fosfatídico. En cada vía, se requieren al menos dos actividades

de fosfolipasa que actúen sobre los fosfolípidos: la actividad de la fosfolipasa A1 ó la fosfolipasa A2 (PLA1/PLA2) más la actividad de la lisofosfolipasa D (Liso-PLD) en la primera vía y la actividad de la fosfolipasa D (PLD) más la actividad de la PLA1/PLA2 en la segunda vía (Figura 3). En la actualidad, se han identificado múltiples fosfolipasas con actividades de PLA1, PLA2, PLD y Liso-PLD. Entre otras, se sabe que participan en la producción de LPA: la PLA2 secretoria (sPLA2-IIA), la PLA1 PA-selectiva asociada a membrana (mPA-PLA1), la lecitin-colesterol aciltransferas (LCAT) y la liso-PLD [95,107].

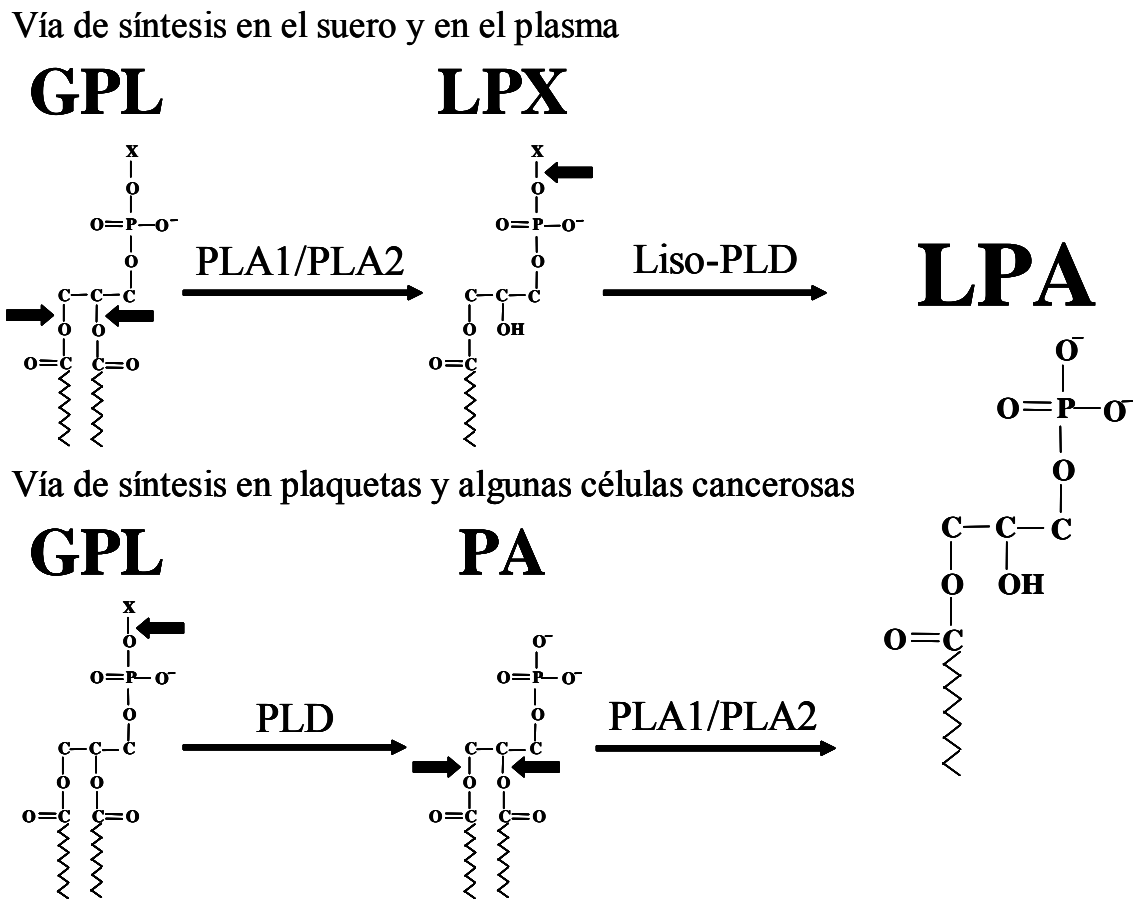


Figura 3. Vías de síntesis del LPA. El LPA se genera a partir de los glicerofosfolípidos (GPL) por dos vías. En la vía por la que se genera el LPA en suero y plasma participa primero una fosfolipasa A (PLA) que corta el sustituyente acilo unido al C1 (PLA1) o al C2 (PLA2) del glicerol generando lisofosfolípidos (LPX), que son sustrato de la lisofosfolipasa D (liso-PLD). La liso-PLD corta el grupo polar (X) unido al fosforilo, que puede ser un grupo colina (LPC), etanolamina (LPE) o serina (LPS). En la vía por la que se genera el LPA en plaquetas y células tumorales participa primero una fosfolipasa D que genera ácido fosfatídico (PA) y después una fosfolipasa A (PLA1/PLA2).

Recientemente se logró un progreso significativo en el estudio de la generación de LPA cuando se descubrió que la enzima que producía el LPA en suero, liso-PLD, era la autotaxina (ATX) o nucleotido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 2 (NPP2) [108,109]. La

lisofosfatidilcolina (LPC) es el principal sustrato fisiológico de la ATX/Liso-PLD; además de encontrarse como constituyente de la membrana plasmática, es secretada por el hígado y circula a altas concentraciones en plasma asociada a la albúmina y lipoproteínas. La ATX/Liso-PLD hidroliza tanto a la LPC libre o unida a proteínas, como a la LPC asociada a membrana. Al parecer, la LPC es el principal lisofosfolípido del que se genera el LPA [108,110].

Se ha propuesto, además, que el LPA podría originarse por modificaciones oxidativas no enzimáticas de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) [111].

Se sabe muy poco de la regulación de las vías de síntesis de LPA. Se ha propuesto que la limitación para la generación de LPA en sangre no es la actividad de la Liso-PLD, presente constitutivamente en plasma, sino la liberación de PLA1 y PLA2 y la generación *de novo* del “pool” de lisofosfolípidos. Estudios muy recientes han demostrado que la ATX se inhibe potente y específicamente por el LPA (Ki ~100 nM), mientras que la ectofosfodiesterasa NPP1 (homóloga a la ATX pero que carece de actividad Liso-PLD) es insensible a LPA; lo que sugieren que, al reprimir la actividad de la ATX, el LPA regula su propia biosíntesis en el medio extracelular [112].

La degradación enzimática del LPA, a productos inactivos biológicamente, puede regular la duración y la magnitud de sus efectos celulares. La degradación del LPA puede ocurrir por tres vías principales (Figura 4).

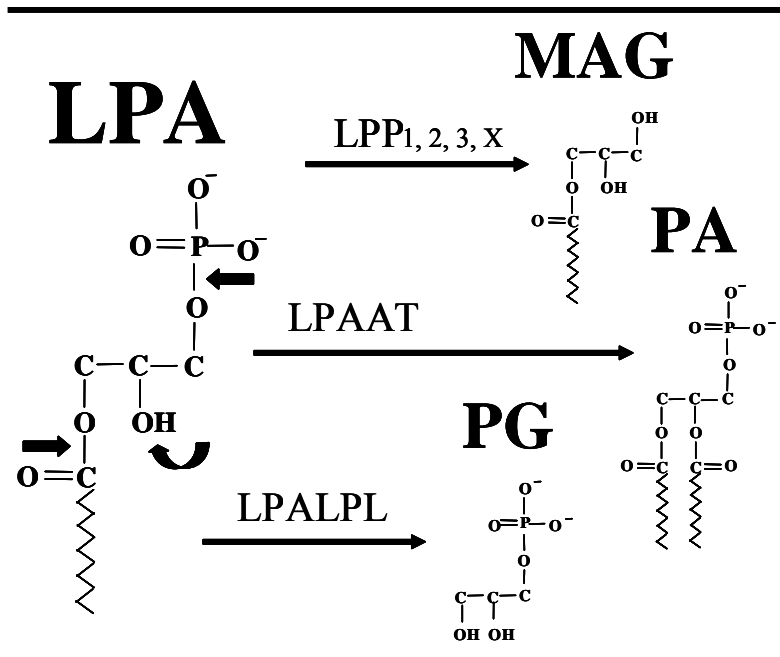


Figura 4. Vías de degradación del LPA. La degradación del LPA ocurre por tres vías principales. La primera es la remoción del grupo fosfato para formar monoacilglicerol (MAG) por acción de las fosfatasa o fosfolipasas (LPPs). La segunda es su conversión a ácido fosfatídico (PA), por adición de un segundo grupo acil, por acción de las LPA aciltransferasas (LPAAT). La tercera es la remoción del grupo acil para formar glicerol fosfato (PG) por acción de las LPA lisofosfolipasa (LPALPL).

El LPA puede ser desfosforilado para formar monoacilglicerol (MAG) por la acción de fosfatasas de la familia de las fosfatidato fosfatasas tipo 2 (PAP-2), las lípido fosfato fosfohidrolasas (LPP₁₋₃) [113,114]. Alternativamente, el LPA puede ser convertido a ácido fosfatídico (PA) por acción de las LPA aciltransferasas (LPAAT). Esta familia de enzimas transfiere del acetil-CoA un segundo grupo acil al LPA [115,116]. La tercera vía de degradación del LPA involucra la hidrólisis del grupo acil del esqueleto de glicerol, para formar glicerol fosfato, por las lisofosfolipasas (LPL) [95,117]. La mayoría de las lisofosfolipasas reportadas actúan tanto sobre la LPC como sobre el LPA; sin embargo, se ha reportado al menos una lisofosfolipasa específica para LPA en cerebro de rata (LPA-LPL) [117].

El prefijo “liso” en el nombre del LPA hace referencia a la característica que poseen los lípidos de comportarse como detergentes. El LPA no tiene un efecto desestabilizador sobre la membrana de las células blanco. El LPA actúa como mensajero celular a concentraciones muy por debajo de su concentración micelar crítica [118], y lo hace a través de su unión a receptores de membrana específicos. Es importante mencionar que las vías de señalización intracelulares inducidas por el LPA se comenzaron a caracterizar mucho tiempo antes de que se identificaran sus receptores.

1.2. Los receptores para LPA

El grupo de Moolenaar fue fuerte impulsor de la hipótesis que planteaba la existencia de un receptor para LPA acoplado a proteínas G presente en la membrana plasmática [8,119]. Contaba, además, con evidencia experimental de la existencia de tal receptor. Identificaron por fotoafinidad un posible receptor de membrana para el LPA utilizando un análogo del LPA marcado con ³²P, el [³²P]diazirine-LPA. La proteína de membrana marcada, de masa molecular aparente de 38-40 kDa, se detectaba en varios tipos celulares: neuronas, muestras de cerebro homogenizado, fibroblastos normales y células de diversos carcinomas. El marcaje de esa proteína se inhibía competitivamente al usar oleoil-LPA no marcado, pero no con otros fosfolípidos [120].

Sin embargo, el crédito por el descubrimiento del primer receptor para LPA la obtendría un grupo diferente. En 1996 el grupo de Jerold Chun, en La Jolla, buscando receptores de membrana que dirigieran la neurogénesis cortical en cerebro de mamíferos,

identificó el primer gen que codifica para un receptor de ácido lisofosfatídico. Fue clonado de una línea celular de neuroblastos neocorticales derivada de la zona ventricular (una región proliferativa que se encuentra sobre los ventrículos cerebrales), por eso fue llamado *vzg-1* (ventricular zone gene-1). El gen codifica un mensajero de 3.8 kb y una proteína de 40- 41 kDa cuyo perfil de hidrofobicidad muestra los siete dominios transmembranales característicos de los receptores acoplados a proteínas G o GPCRs (G protein coupled receptors). Con base en ensayos funcionales (“rounding” celular dependiente de suero), datos de distribución tisular y al hecho de que su sobre-expresión correlacionaba con un incremento en el número de sitios de unión para LPA, ellos concluyeron que el gen *vzg-1* codificaba un receptor de membrana para LPA que se acoplaba a una proteína Gi heterotrimérica [47].

Un año más tarde el grupo de Edward J Goetzl, en San Francisco, lo confirmó cuando clonó el cDNA homólogo al de la proteína Edg2 de ovino a partir de una genoteca de cDNA de pulmón. La proteína de 364 aa conserva un 96% de identidad con los Edg2 de borrego y ratón. Por medio de análisis de tipo Northern blot se detectó en la mayoría de los tejidos humanos, siendo más abundante en cerebro. Además, por ensayos con genes reporteros con secuencias SREs, que mostraron una elevada respuesta a LPA, y ensayos de unión específica de LPA marcado radiactivamente, concluyeron que el *edg2* humano, homólogo al *vzg-1* de ratón, es un receptor para LPA [121].

Con la secuencia del primer receptor para LPA reportado, el grupo de Edward J Goetzl realizó una búsqueda de genes que pudieran codificar nuevos subtipos de receptores para LPA. En 1998, identificaron el cDNA que codifica para el receptor Edg4 [91]. El análisis de la secuencia predice una proteína de 382 aa que comparte un 46% de identidad y un 72% de similitud con el Edg2, contiene 7 regiones transmembranales, sitios potenciales de N-glicosilación en el extremo amino, y sitios potenciales de fosforilación en serina y treonina en su porción intracelular. Los ensayos funcionales mostraron que la expresión del Edg4 inducía un incremento en la transcripción de genes reporteros con secuencias SREs en sus promotores (EC50 de 10 nM) [91]. Los análisis de tipo Northern blot mostraron que los dos transcritos principales del *edg4*, de 8 y 1.8 kb, no se distribuían de forma tan amplia en los tejidos humanos como el *edg2/vzg-1*, y mostraban un patrón de distribución completamente diferente al de éste último. El

transcrito de 8 kb se detectó en leucocitos de sangre periférica, timo, bazo y varios tipos de células tumorales, mientras que el transcrito de 1.8 kb se detectó en leucocitos, testículo, próstata, páncreas y líneas celulares de cáncer. Poca o ninguna expresión se detectó en cerebro, corazón, placenta y el tracto digestivo, tejidos donde el Edg2 se expresa en abundancia.

A partir de las secuencias de los receptores Edg2 y Edg4, el grupo de Junken Aoki en Japón diseñó oligonucleótidos degenerados con los que logró amplificar por PCR el cDNA que codifica al tercer receptor para el LPA, el Edg7 [122]. El análisis de la secuencia predice una proteína de 353 aa que comparte un 54% de identidad con el Edg2 y un 49% de identidad con el Edg4. Por análisis de tipo Northern blot se detectó un transcrito de 4.3 kb en corazón, páncreas, próstata y testículo con una expresión menor en pulmón, ovario y líneas celulares de algunos tipos de cáncer. Los análisis tipo Western blot mostraron a la proteína Edg7 con una masa molecular ~35 kDa y los análisis funcionales demostraron la movilización de calcio intracelular en respuesta a oleoil-LPA [122].

A la identificación de los tres receptores para LPA se sumaron estudios sucesivos que llevaron a la identificación de otros GPCRs que responden a lípidos, estableciéndose así la familia Edg de receptores, que incluía a los tres receptores para LPA y cinco receptores para esfingosina-1-fosfato (S1P). El nombre inicial de los receptores para LPA, Edg (endothelial differentiation gene), se debió a que los genes que los codifican se reportaron originalmente como genes homólogos al *edg-1*, un gen de respuesta temprana en células endoteliales de cordones umbilicales humanos [123], que se identificó más tarde como receptor para S1P. Sin embargo, este nombre tenía poca relación con los receptores, por lo que, en el año 2002 se propuso una nomenclatura para ellos siguiendo los lineamientos de la IUPHAR. Se nombró LPA_{1, 2, 3} a los Edg2, 4 y 7; y S1P_{1, 2, 3, 4, 5} a los Edg1, 5, 3, 6, y 8, respectivamente [124].

Recientemente fue identificado un cuarto receptor para LPA, el LPA₄. Este receptor es capaz de inducir el incremento en la [Ca²⁺]_i y estimular la actividad de la adenilato ciclasa. Ensayos de PCR en tiempo real demostraron que en el ovario hay una expresión significativamente mayor del LPA₄ que en el resto de los tejidos humanos. Este receptor comparte solamente el 24% de identidad con los otros tres receptores para LPA

y los análisis filogenéticos lo muestran cercano al receptor purinérgico P2Y y distante a los LPA₁₋₃, sugiriendo que los receptores para LPA han evolucionado a partir de por lo menos dos diferentes genes ancestrales [125].

Si bien la mayoría de los subtipos de GPCRs muestran selectividad en sus interacciones con las proteínas G, los subtipos de receptores para LPA parecen acoplarse a múltiples proteínas G heterotriméricas. Así, en los estudios realizados en modelos donde los receptores se expresan heterológamente, el acoplamiento de los subtipos de receptores a las proteínas G y las cascadas de señalización que activan, sólo puede indicar lo que es posible pero no concluir que esto ocurra en condiciones fisiológicas. Por consiguiente, el subtipo preciso de receptor que se acopla a una proteína G específica no ha sido descrito satisfactoriamente.

A pesar de que se ha reportado un gran número de agonistas y antagonistas para los receptores de LPA [98,104,126,127], su susceptibilidad a hidrólisis o su requerimiento a altas concentraciones y el que no sean completamente específicos, ha limitado su uso en el estudio de las características de la señalización específica de cada receptor. Sin embargo, la evidencia experimental con la que se cuenta hasta el momento sugiere que el LPA₁ es el receptor que se acopla preferentemente a la proteína Gi e inhibe a la adenilato ciclasa, mientras que, el receptor LPA₂ se acopla a G_{12/13}/ Rho e induce el rearrreglo del citoesqueleto, el receptor LPA₃ señala generalmente vía la proteína Gq y la activación de la PLC y el receptor LPA₄ se acopla a la Gs y estimula a la adenilato ciclasa [81,125].

Se ha reportado que las disfunciones en la expresión o en la señalización de los receptores para LPA contribuyen al desarrollo de procesos patológicos como la arteriosclerosis [111], el asma [18] y la generación, invasión y progresión de algunos tipos de cáncer [36,81,128-130]. Por ejemplo, la alteración en los niveles de expresión de los receptores para LPA puede ser un evento importante en el desarrollo de cáncer de colon, ya que la relación LPA₂/ LPA₁ se incrementa (~18 veces) durante esta transformación maligna [131].

Los estudios genéticos en ratones “knockout” para los receptores de LPA han demostrado la importancia de su función para el desarrollo de mamíferos. Ratones “knockout” para el LPA₁ presentan deformaciones craneofaciales acompañados de

hematomas frontales. Estos ratones no son capaces de mamar, probablemente porque presentan disfunciones olfativas, lo que lleva a la pérdida de peso y a la mortalidad neonatal [44]. La migración celular, el “rounding” y la proliferación celular en respuesta a LPA decrecen en fibroblastos embrionarios de ratones “knockout” para el LPA₁, pero no están ausentes, lo que es consistente con los datos que muestran redundancia en la señalización de los receptores para LPA.

Los ratones “knockout” para el LPA₂ no tienen defectos fenotípicos evidentes [132] y los ratones doble “knockout” LPA₁/LPA₂ no muestran un fenotipo diferente al de los ratones “knockout” para el LPA₁ excepto por un modesto incremento en la presencia de hematomas frontales. Sin embargo, los fibroblastos embrionarios derivados de los ratones doble “knockout” LPA₁/LPA₂ muestran claras alteraciones en la señalización inducida por el LPA. La activación de la PLC, el incremento de la [Ca²⁺]_i, la activación de la adenilato ciclasa, la inducción de la proliferación, la activación de la cinasa JNK, la activación de Akt y la formación de fibras de estrés fueron eliminadas o severamente reducidas [132].

Los ratones “knockout” para el LPA₃ presentan una disminución significativa en el número de individuos por camada. Ocurre un retraso y una mala distribución en la implantación de los embriones, lo que trae como consecuencia el retraso en su desarrollo y en algunas ocasiones su muerte [81].

El que casi todas las células de mamífero expresen receptores para LPA hacía pensar que tenían un papel fundamental para la célula. Sin embargo, en ninguno de los casos, ni siquiera en el doble mutante, el fenotipo de los ratones “knockout” es letal. Esto podría tener varias explicaciones. Los receptores para LPA en condiciones normales, podrían actuar en forma redundante; esto es, que uno o más subtipos de receptores para LPA diferentes activen el mismo proceso celular. Esta idea es apoyada por la evidencia experimental en modelos de expresión heteróloga, en donde los diferentes subtipos de receptores para LPA son capaces de activar las mismas vías de señalización.

Podría ocurrir también que en ausencia de un receptor sus “obligaciones celulares” sean llevadas a cabo por alguno de los otros receptores para LPA, o posiblemente un receptor con un mecanismo de señalización diferente. Se ha descrito que en los ratones “knockout” para el LPA₁, la ausencia del receptor para LPA activa un

mecanismo compensatorio en donde se incrementa la actividad proliferativa inducida por el receptor para el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

Podría también deberse a que los receptores para LPA ejerzan sus funciones principalmente en condiciones patofisiológicas, como la inflamación o la cicatrización, por lo que, durante el desarrollo normal no sea notoria su ausencia (Tabla 2).

Tabla 2. Los receptores para LPA.

Nombre	Nombre previo	% de identidad	Localización cromosómica	PM	Efectos celulares/ vías de señalización
	Fenotipo de los ratones “knockout” para el receptor			Alteraciones en la señalización presentes en las células provenientes de los ratones “knockout”	
LPA ₁	Edg-2, Ip _{A1} , vzg-1, rec1.3 Gpcr26,		Ratón 4 cerca del <i>vc</i> Humano 9q 31.3-32	41 kDa	✓AC, ×AC, ✓SER, ✓PLC, ζ [Ca ²⁺] _i , Δ IP, ✓MAPK, \varnothing ácido araquidónico, ✓actomiosina, ✓“rounding” celular, ✓formación de fibras de estrés, ↑incorporación de BrdU, × apoptosis.
	50% de letalidad neonatal, imposibilidad de los cachorros de mamar, tamaño pequeño en las crías, dimorfismos craneofaciales, hematomas frontales e incremento en la apoptosis en las células de Schwann del nervio ciático.			Las células corticales cerebrales embrionarias pierden la capacidad de agruparse e incorporar BrdU en respuesta a LPA. En fibroblastos embrionarios hay una menor activación de la PLC, menor inhibición de la AC y se elimina la activación de la AC en respuesta a LPA. Se observa un incremento compensatorio en la proliferación celular, inducida por FGF.	
LPA ₂	Edg-4, Ip _{A2}	46 % LPA ₁	Ratón 8 cerca del <i>kat</i> Humano 19p12	39 kDa	✓AC, ×AC, ✓SER, ✓PLC, ζ [Ca ²⁺] _i , Δ IP, ✓MAPK, \varnothing ácido araquidónico y ✓“rounding” celular
	No hay fenotipos obvios			En fibroblastos embrionarios se observa una disminución en la activación de la PLC y en la producción de IP en respuesta a LPA.	
LPA ₃	Edg-7, Ip _{A3}	54 % LPA ₁ 49 % LPA ₂	Ratón 3 Humano7	40 kDa	✓AC, ×AC, ζ [Ca ²⁺] _i , Δ IP, ✓MAPK y \varnothing ácido araquidónico.
	Disminución en tamaño de las camada, varios embriones implantados en el mismo sitio, hipertrofia placentaria, retraso en el desarrollo embrionario y muerte.			“Down regulation” de COX2 que lleva ala disminución en los niveles de PGE2 y PGI2.	
LPA ₄	p2y9/ GPR23	24 % LPA ₁₋₃	Humano Xq13-q21.1	41 kDa	✓AC, ✓transcripción e ζ [Ca ²⁺] _i
	No hay ratones “knockout” para éste receptor.			No hay información al respecto.	

✓activación, × inhibición, ζ movilización, ↑ incremento, Δ incremento en la producción, \varnothing liberación. AC, adenylyl cyclase, SRE, serum response element, PLC, phospholipase C, IP, Inositol phosphate, MAPK, mitogen-activated protein kinase, COX2 cyclooxygenase 2, PGE2, prostaglandin E2, PGI2, prostaglandin I2.

1.3. Los receptores acoplados a proteínas G

Los receptores para LPA pertenecen a la superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (GPCRs). La vía de señalización de estos receptores se inicia con la unión de su ligando específico; esta unión induce cambios conformacionales en el receptor que le permiten activar a las proteínas G heterotriméricas. Las proteínas G, compuestas por tres subunidades (α , β y γ), al activarse se disocian (α y $\beta\gamma$) y activan moléculas efectoras específicas [133,134]. El mismo cambio conformacional que activa a las proteínas G hace que en el receptor se expongan

aminoácidos que son fosforilados por proteínas cinasas de serinas y treoninas. Estas proteínas cinasas pueden ser de la familia de cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) o del tipo de cinasas activadas por segundos mensajeros, como la proteína cinasa C (PKC) [135,136]. Al receptor fosforilado se unen las proteínas β -arrestinas que impiden su acoplamiento funcional con las proteínas G y además participan, junto con una maquinaria proteica no caracterizada por completo, en la internalización del receptor en vesículas recubiertas de clatrina [21,137-139]. Los receptores internalizados pueden ser desfosforilados y reciclados a membrana, lo que se conoce como resensibilización, o pueden ser ubiquitinados para su posterior degradación [140] (Figura 5).

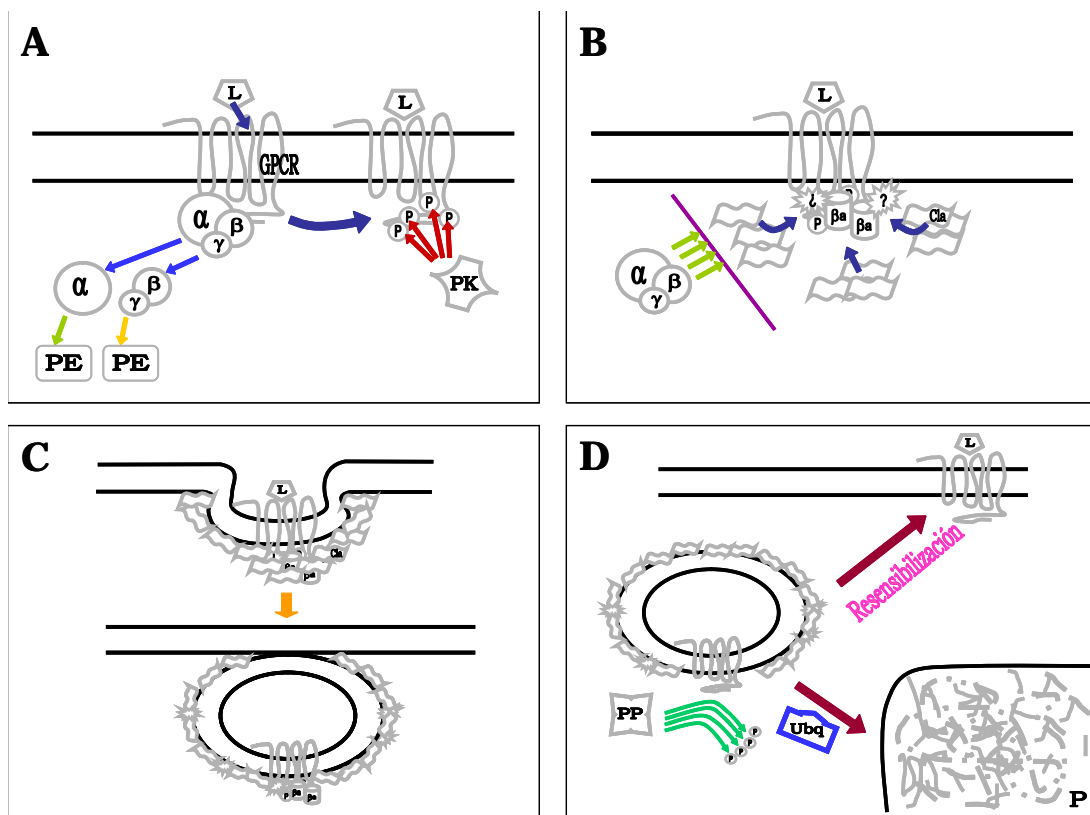


Figura 5. Mecanismo general de acción de los GPCRs. *A* La vía inicia cuando el ligando (L) interactúa con su receptor específico (GPCR). El receptor activa a las proteínas G cuyas subunidades se disocian (α y $\beta\gamma$) y a su vez activan proteínas efectoras (PE). El receptor es fosforilado por cinasas (PK) en sitios específicos. *B* Al receptor fosforilado se unen las proteínas β -arrestinas (β) que evitan el acoplamiento del receptor con las proteínas G e inducen la internalización del receptor en vesículas recubiertas de clatrina (Cla). *C*. *D* Una vez internalizado el receptor es desfosforilado por proteínas fosfatasa (PP) y puede ser ubiquitinado (Ubq) para ser degradado en el proteosoma (P) o reciclado a membrana.

El que los receptores no puedan responder a su ligando y sean incapaces de activar sus vías de señalización, debido a su estado de fosforilación y/o el que se encuentren internalizados, se ha denominado desensibilización. Se han descrito dos

formas generales de desensibilización de los GPCRs denominadas desensibilización homóloga y desensibilización heteróloga. La desensibilización homóloga es inducida por el propio agonista y a este tipo de desensibilización se ha relacionado la fosforilación del receptor llevada a cabo por las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs). La desensibilización heteróloga ocurre cuando un receptor es desensibilizado en ausencia de su agonista y en este tipo de desensibilización participan las cinasas activadas por segundos mensajeros [141-143] (Figura 6).

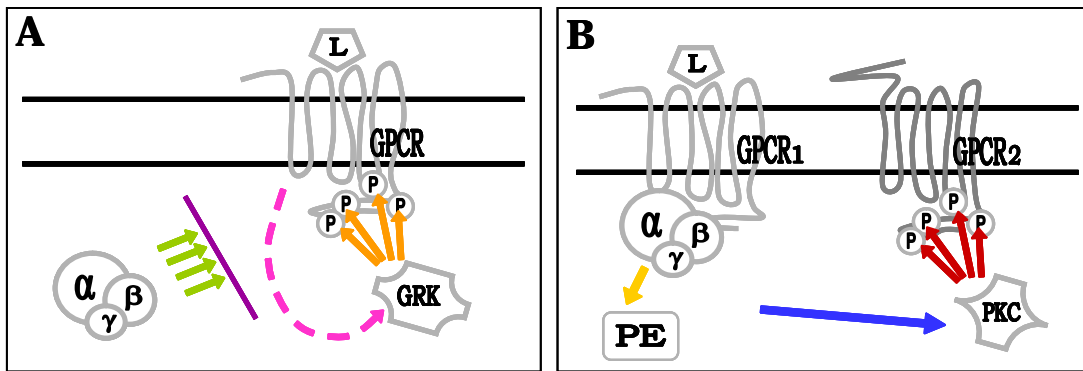


Figura 6. Desensibilización de los GPCRs. **A** Desensibilización homóloga. El receptor es fosforilado en presencia de su ligando específico (L). En este tipo de desensibilización participan típicamente las cinasas de receptor acoplados a proteínas G (GRKs). **B** Desensibilización heteróloga. La activación de un receptor (GPCR1) por su ligando específico (L) lleva a la fosforilación y desensibilización de un GPCR diferente (GPCR2). En este tipo de desensibilización participan generalmente las cinasas activadas por segundo mensajeros, por ejemplo la PKC.

La desensibilización heteróloga de los GPCRs puede ocurrir en respuesta a la activación de otros GPCRs no relacionados [121,144-146], o más aún, por la activación de receptores con mecanismos muy distintos como son los receptores con actividad de cinasas, por ejemplo, los receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) [147] y el receptor para el factor de crecimiento transformante β (TGF β) [148].

2. Justificación del trabajo y antecedentes

La presencia ubicua de los receptores para LPA y su participación durante el desarrollo embrionario de mamíferos los hace foco de interés biológico, pero además, el que las alteraciones tanto en su expresión como en su señalización contribuyan al desarrollo de diversos procesos patológicos, les otorga gran importancia biomédica. Es por esto que resulta de gran interés identificar los mecanismos reguladores que operan sobre estos receptores y su señalización, ya que nos permitiría no solo entender la génesis de los padecimientos, sino también identificar blancos terapéuticos y estrategias médicas asertivas en el tratamiento de los mismos.

De la regulación de la señal inducida por los receptores para LPA se sabe muy poco. Sólo existen dos reportes previos donde se observó que la señal generada por el LPA era modulada por la acción del PMA [8,149]. Sin embargo, estas investigaciones se publicaron tiempo antes de que se comprobara la existencia de receptores específicos en membrana para este mediador, por lo que cobra gran interés identificar los mecanismos reguladores que operan sobre sus receptores.

En nuestro laboratorio se han realizado estudios sobre las vías de señalización de varios GPCRs expresados de forma endógena en la línea epitelial de hígado de rata C9 [121,150]. En esta línea celular se observó que la concentración de calcio libre citoplasmático se incrementa en respuesta a la estimulación de las células con LPA pero no había señal cuando las células eran preestimuladas con PMA, lo cual sugería que los receptores para LPA expresados en las células C9 eran regulados por la acción de la PKC.

3. Hipótesis y Objetivos

Por lo anterior, nuestra hipótesis fue que la pérdida de señal para el LPA en células C9 tratadas con PMA se debía a que los receptores para este mensajero eran fosforilados, desensibilizados e internalizados a consecuencia de la activación de la PKC.

El objetivo general de este trabajo fue determinar si el receptor LPA₁ es regulado por fosforilación en respuesta a la activación de la PKC.

En tanto que los objetivos particulares, derivados del anterior, son los siguientes:

a) Establecer si la señalización inducida por el LPA en las células C9 es inhibida al activar de forma dosis dependiente a la PKC con PMA y establecer la concentración ideal para observar el efecto inhibitor sobre la señal del LPA.

b) Identificar qué subtipos de receptores para LPA se expresan de forma endógena en esta línea celular.

c) Construir proteínas de fusión de los receptores para LPA que permitan purificarlos por inmunoprecipitación y evaluar su grado de fosforilación.

d) Generar un sistema celular que exprese de forma estable las proteínas de fusión de los receptores.

e) Hacer ensayos de marcaje metabólico en las células C9 con ³²P y purificación de los receptores para evaluar el grado de fosforilación de los mismos.

f) Utilizar las proteínas de fusión de los receptores para LPA con la proteína EGFP para determinar si los receptores se internalizan a consecuencia de la activación de la PKC en las células C9.

4. Materiales y métodos

El ácido lisofosfatídico (LPA: $L\text{-}\alpha\text{-Lysophosphatidic acid [oleoyl (C18: 1, [cis]-9) (oleoyl-sn-glycero-3-phosphate)]$), la angiotensina II (Ang II), el miristoil forbol acetato (PMA), la endotelina (ET), la bradicinina (Bk), la esfingosina-1-fosfato, la estaurosporina (ST), la bis indolil maleimida I (BIM) y los inhibidores de proteasas se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. El medio Ham's F12 (Kaighn's modification, F12K) se compró a in vitro SA. El suero fetal bovino, la tripsina, los antibióticos y otros reactivos utilizados para el cultivo celular provienen de Invitrogen. El Fura-2 AM (ácido 1-[2-(5-carboxioxazol-2-yl)-6-aminobenzofurano-5-oxi]-2,2-(2'-amino-5'-metilfenoxi)-etano -N, N, N', N'-tetra acético, penta acetoximetil éster) (acetoxymethyl ester) se obtuvo de Molecular Probes, el Myo-[2- ^3H] inositol (22.9 Ci/mmol) de New England Nuclear. El anticuerpo policlonal anti Edg-2/LPA₁ fue comprado a Upstate. La toxina Pertussis fue purificada de vacunas concentradas [121,151] y el kit de RT-PCR es de Promega.

4.1. Cultivo celular

La línea celular epitelial de hígado de rata, C9, se obtuvo de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células C9 se cultivaron en medio Ham's F12 (Kaighn's Modification) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina y 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. El LPA se encuentra presente en el suero con el que se complementa el medio de crecimiento de las células. Para evitar que las células estuvieran pre-estimuladas, fue indispensable reducir al mínimo posible la cantidad de suero. 18 horas antes del experimento se sustituyó el medio de crecimiento por F12K con 1% de suero fetal bovino, lo cual constituyó un medio de ayuno para las células. En los experimentos que se realizaron para probar el efecto de la toxina pertussis (PTX) las células se incubaron durante 18 horas con 100 ng/mL de éste agente presente en el medio de cultivo.

4.2. Determinación de la concentración de calcio intracelular, [Ca²⁺]_i

Los experimentos se realizaron en células incubadas con 2.5 μM de Fura-2/AM durante

una hora. La medición de $[Ca^{2+}]_i$ se hizo en solución buffer Krebs-Ringer-HEPES-glucosa con 0.05% de albúmina sérica bovina a 37 °C en un espectrofluorómetro AMINCO-Bowman Serie-2. Los registros se hicieron a 340 nm y 380 nm de excitación y 510 nm de emisión, finalmente la concentración intracelular de calcio se calculó según Grynkiewicz [152] usando el software de AMINCO-Bowman.

4.3. Determinación de fosfatos de inositol, IPs

Las células se marcaron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) libre de inositoles con 5 μ Ci/mL de $[^3H]$ inositol y 1% de suero fetal bovino durante 18 horas. Las células se estimularon en presencia de 2 mM de LiCl. La estimulación se detuvo adicionando 2 mL de una solución cloroformo/metanol (1:2 v/v). Las muestras se centrifugaron a 3 000 rpm, se recuperó la fase acuosa, los fosfatos de inositol totales se separaron por cromatografía, usando la resina Dowex AG1-X8, y se cuantificaron en un contador de centelleo [153].

4.4. Determinación de la producción de AMPc

La acumulación de AMPc se determinó por el método de Brown [154] con algunas modificaciones. Se utilizaron cultivos confluentes, ayunados durante 18 horas. El día del experimento las células se tripsinizaron y se resuspendieron en solución Krebs-Ringer-HEPES-glucosa a una concentración final de 25 mg de células por mL de solución amortiguadora. Se utilizó 1 mL de células por condición experimental.

La estimulación con los diferentes agentes se realizó en presencia de 100 μ M del inhibidor de fosfodiesterasas MIX (3-isobutyl-1-methylxanthine) y se detuvo con HCl 2 N en ebullición durante 2 minutos. Posteriormente las muestras se pasaron a un baño de hielo y se neutralizaron (pH 7.4- pH 7.8) añadiendo buffer de fosfato de sodio (NaH_2PO_4) 1 M pH 6 e hidróxido de sodio (NaOH) 2N. Las muestras se centrifugaron a 3 000 rpm y se utilizaron 20 μ l del sobrenadante para el ensayo de competencia con la proteína cinasa A (PKA), en presencia de 20 nCi de $[^3H]$ AMPc. La incubación con la PKA fue de una hora y se detuvo por adsorción con carbón activado. Las muestras se centrifugaron a 3 000 rpm y el sobrenadante se mezcló con 4 mL de líquido de centelleo. La cantidad de AMPc radiactivo ($[^3H]$ AMPc) se determinó utilizando el contador de centelleo.

4.5. Ensayo de unión de GTP γ S a membranas

Los experimentos se realizaron con cultivos celulares confluentes, ayunados durante 18 horas. El día del experimento las células se estimularon con los diferentes agentes, se lavaron dos veces con PBS y se “rasparon” en una solución amortiguadora con 50 mM de Tris pH 7.4, 150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 10 mM de pirofosfato de sodio, 100 μ M de Na₃VO₄, 10 mM de β -glicerofosfato, 1 mM de fosfoserina, 1 mM de fosfotreonina, 1 mM de fosfotirosina y los inhibidores de proteasas: 20 μ g/mL de leupeptina, 20 μ g/mL de bacitracina, 500 μ g/mL de inhibidor de tripsina, 100 μ g/mL PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride). Se obtuvieron membranas de acuerdo al método de Mattingly [155] y se resuspendieron en buffer de unión (50 mM de Tris pH 7.4, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de EDTA, 100 mM de NaCl, 0.1% de BSA, 1 mM de DTT y 1 mM de GDP). El ensayo de unión de [³⁵S]GTP γ S se realizó como describen Wieland y Jakobs [156] con algunas modificaciones. La reacción de unión se llevó a cabo en un volumen de 250 μ l durante 30 minutos a 25 °C, en el buffer de unión con 0.2 nM de [35S]GTP γ S y se inició con la adición de las membranas celulares en una concentración de 25 μ g de proteína por muestra. Una vez transcurrido el tiempo, las muestras se filtraron en un colector Brandel con filtros Whatman GF/C. La unión no específica se determinó en presencia de 30 μ M de GTP γ S frío. Los filtros se lavaron tres veces con 50 mM de Tris y 10 mM de MgCl₂ y se colocaron en viales con 4 mL de líquido de centelleo. La cantidad de GTP γ S unido se determinó usando un contador de centelleo.

4.6. Caracterización de los receptores para LPA expresados en forma endógena en las células C9

Se obtuvo RNA total utilizando el kit TRIZOL Reagent® de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del proveedor y tratando las muestras posteriormente con DNAsa. Para generar los cDNAs, de tres de los receptores para LPA, se empleó el Access RT-PCR System (Promega). En cada reacción se utilizó 0.1 u/ μ l de transcriptasa reversa AMV, 0.1 u/ μ l de *Tfi* DNA polimerasa, 1 X de buffer de reacción AMV/*TFI*, 1 mM de MgSO₄, 0.2 mM de cada dNTP, 1 μ M de cada oligonucleótido y 0.1 μ g de RNA total. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 45 minutos a 48°C (transcripción

reversa), 2 minutos a 94°C (inactivación de la AMV RT y primera desnaturalización del RNA/cDNA), 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 56°C y 2 minutos a 72°C.

Los oligonucleótidos empleados fueron diseñados para amplificar diferentes exones de los tres receptores para LPA pertenecientes a la familia de los Edgs [157] y el receptor completo LPA₄ flanqueado por los sitios de corte para las enzimas de restricción Xho I y Hind III (5' CCGCTCGAGCCACCATGGGTGACAGAAGATTCATT 3' y 5' CCCAAGCTTCGCAAAGGTGGATTCTAGCATTAATTC 3'). Los productos obtenidos fueron de 349 pb en el caso del LPA₁, de 798 pb para el LPA₂, de 382 pb para el LPA₃ y de 1112 pb para el LPA₄. Para los tres Edgs se utilizaron como control positivo los genes clonados en los plásmidos pcDNA3 y pCR3.1. La identidad del receptor LPA₁, además, se verificó por secuenciación.

4.7. Construcción de las proteínas de fusión y su expresión en forma estable en las células C9

Se amplificó por PCR la secuencia completa de los receptores para LPA utilizando como molde los LPARs clonados en los vectores pcDNA3 (mLPA₁) y pCR3.1 (hLPA₂ and hLPA₃) que fueron donados por el Dr. Kevin R. Lynch. Los productos de PCR fueron clonados en el vector pEGFP-N1 (Clontech BD Biosciences) para generar los receptores fusionados con la proteína verde fluorescente, EGFP, fusionada al extremo carboxilo. Los LPARs-EGFP fueron transfectados en las células C9 usando Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las células que expresaban altos niveles de las proteínas de fusión fueron seleccionadas por resistencia a geneticina (G418) y citometría de flujo usando un FACS (FACS Calibur, BD Biosciences) y el software Cell Quest (BD Biosciences, Palo Alto, CA). Como control negativo las células C9 fueron también transfectadas establemente con el vector pEGFP-N1 vacío (C9-EGFP).

4.8. Ensayos de fosforilación

Los experimentos de fosforilación se realizaron con cultivos confluentes en pozos de 35 mm. Las células se incubaron durante una hora en medio DMEM sin fosfatos, posteriormente se marcaron metabólicamente durante 4 horas en medio DMEM sin

fosfatos con 75 $\mu\text{Ci/mL}$ de $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Pi}$. Se agregaron los diferentes estímulos y se detuvo el estímulo lavando dos veces con PBS frío.

Las células se lisaron en frío durante una hora con un buffer que contiene 100 mM de NaCl, 20 mM de NaF, 10 mM de pirofosfato de Na, 50 mM de Tris pH 8, 5 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 0.1% de SDS, 10 mg/mL de desoxicolato de Na, 100 nM de ácido okadaico e inhibidores de proteasas (20 $\mu\text{g/mL}$ de leupeptina, 20 $\mu\text{g/mL}$ de aprotinin, 100 $\mu\text{g/mL}$ de PMSF, 500 $\mu\text{g/mL}$ de bacitracina, 20 $\mu\text{g/mL}$ de benzamidina, 20 $\mu\text{g/mL}$ de pepstatina, 50 $\mu\text{g/mL}$ de inhibidor de tripsina). Los lisados se centrifugaron a 12 000 g por 10 minutos. y los sobrenadantes se incubaron con anticuerpo anti GFP (Clontech BD Bioscience) y proteína A- sefarosa (Upstate), toda la noche a 4°C, con agitación.

Al día siguiente se lavaron tres veces con buffer WB1 (50 mM de Tris HCl, 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 12 mM de desoxicolato de Na, pH 7.5), dos veces con buffer WB2 (50 mM de Tris HCl, 500 mM de NaCl, 0.1% de Triton X-100, 1.2 mM de desoxicolato de Na, pH 7.5) y una vez con el buffer WB3 (50 mM de Tris HCl, 0.1% de Triton X-100, 1.2 mM de desoxicolato de Na, pH 7.5). Finalmente, las muestras se desnaturalizaron hirviéndolas en buffer de cargado (120 mM de Tris pH 6.8, 4% de SDS, 0.2% de glicerol, 5% de β -mercapto etanol, 7 M de urea, 1 mM de DTT y 10 mg/mL de azul de bromofenol) y se sometieron a SDS-PAGE. Los geles se secaron y expusieron durante 24 horas en pantallas amplificadoras. Las imágenes de fosforilación de los receptores se capturaron en un PhosphorImager y se cuantificaron usando el programa Image Quant.

4.9. Ensayos tipo Western blot

Los geles de la SDS-PAGE se electrotransfirieron, a 60 mA/gel durante 75 minutos, a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas en buffer TBE con 10% de leche (libre de grasa) y 5% de BSA a temperatura ambiente durante una hora. Se incubaron con el anticuerpo primario en TBS tween 0.1% a 4°C durante toda la noche. Se lavaron tres veces con TBS tween 0.1% y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 45 minutos. Se lavaron tres veces más con TBS tween 0.1% y se reveló utilizando el kit de quimioluminiscencia de PIERCE.

4.10. Estudios de microscopía confocal

Se adquirieron las imágenes de células adheridas a cubre objetos de vidrio en 1 mL de medio Krebs-Hepes-BSA-Glucosa. Los estímulos fueron adicionados directamente sobre las células mientras las imágenes eran colectadas. Las imágenes se obtuvieron con un equipo confocal Bio-Rad MR1024 acoplado a un microscopio de luz invertido Nikon TMD 300. Se utilizó un objetivo de inmersión en glicerol 100x/ 1.3 NA. La GFP fue excitada con láser de argón/criptón a 488 nm y la fluorescencia emitida se detectó a 522 nm. Todas las imágenes se colectaron con una apertura numérica de 1.3, el mismo porcentaje de láser, la misma apertura de iris y la misma ganancia. Las imágenes se procesaron usando el programa Confocal Assistant.

4.11. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados y graficados utilizando el software Prisma 4 para Windows, (GraphPad Software, San Diego California USA) y se presentan como promedios \pm SEM. A los datos se les aplicó un análisis de varianza ANOVA One-way seguido de un test de comparación múltiple Newman-Keuls.

5. Resultados

5.1. Señalización y desensibilización de los receptores para LPA

Durante el estudio de la señalización y desensibilización del receptor para angiotensina AT1, expresado endógenamente en la línea celular epitelial de hígado de rata C9, se observó que la estimulación con 1 μM de LPA inducía el incremento rápido y transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en estas células (Figura 7A). Esta observación no fue sorprendente, casi todas las células de mamífero responden al LPA. Lo que llamó nuestra atención fue que la preincubación de estas células con 1 μM de PMA durante 5 minutos eliminó completamente la respuesta del LPA (Figura 7B).

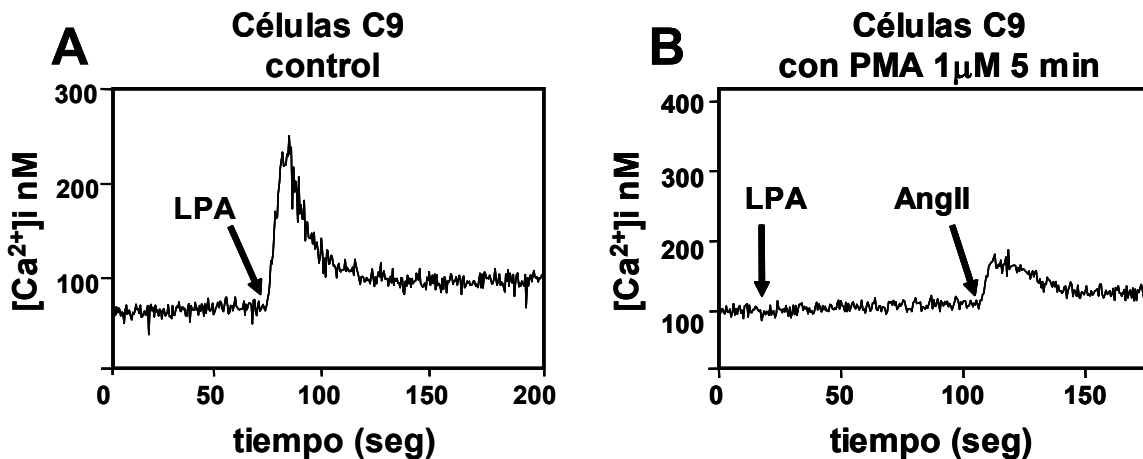


Figura 7. Desensibilización al LPA en las células C9. A Trazo representativo de la movilización de calcio intracelular inducida por 1 μM de LPA. B Células C9 preincubadas durante 5 minutos con 1 μM de PMA y estimuladas posteriormente con 1 μM de LPA (no hay respuesta) y con 100 nM de angiotensina II.

Dada la observación anterior, caracterizamos la respuesta inducida por el LPA en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células C9, así como el efecto inhibitor del PMA sobre ella. En las células C9 el LPA incrementa inmediata y transitoriamente la concentración de calcio intracelular en forma dosis-dependiente con una EC_{50} de 78 ± 3 nM (Figura 8A). Este incremento no ocurre cuando, 5 minutos previos al estímulo con LPA, se activa a la PKC con 1 μM de PMA (Figura 7B y 8B). El PMA bloquea la acción del LPA en forma dependiente de la dosis, con una IC_{50} de 5 ± 0.3 nM (Figura 8B). Establecimos con este análisis, que la concentración idónea para ver ambos efectos en las células C9 es de 1 μM tanto para el LPA como para el activador de PKC, el PMA (Figura 8).

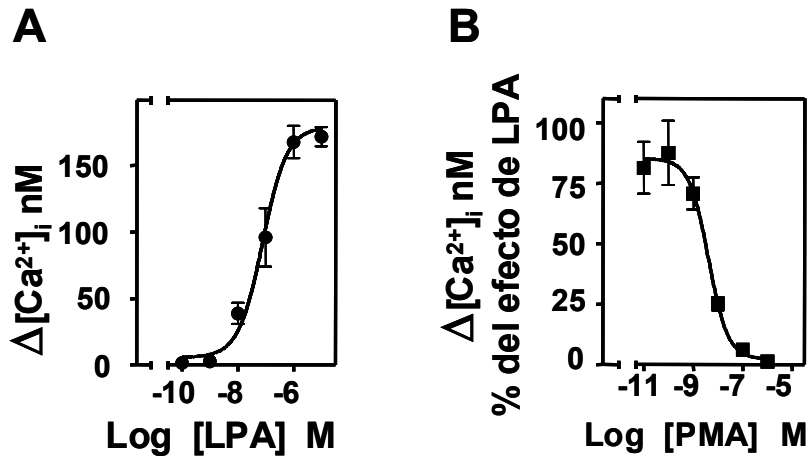


Figura 8. Curvas dosis-respuesta. *A* Curva dosis-respuesta de la movilización de calcio intra-celular inducida por el LPA en las células C9. *B* Curva de inhibición del PMA sobre la señal en la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por el LPA. Se presentan de 6 a 12 experimentos realizados con diferentes preparaciones de células.

La sensibilidad de la respuesta de LPA en las células C9 llamó nuestra atención porque en los fibroblastos Rat-1 α_{1b} , en los que el LPA también induce transitoriamente el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, y que ha sido durante mucho tiempo el modelo celular de estudio de nuestro laboratorio, la señal del LPA es casi insensible a la activación de la PKC. En los fibroblastos Rat-1 α_{1b} el PMA activa efectivamente a la PKC y ésta puede desensibilizar la señal de un GPCR, el receptor adrenérgico α_{1b} [121]. La señal inducida por la noradrenalina no se observa en fibroblastos preincubados con 1 μ M de PMA durante 5 minutos (Figura 9).

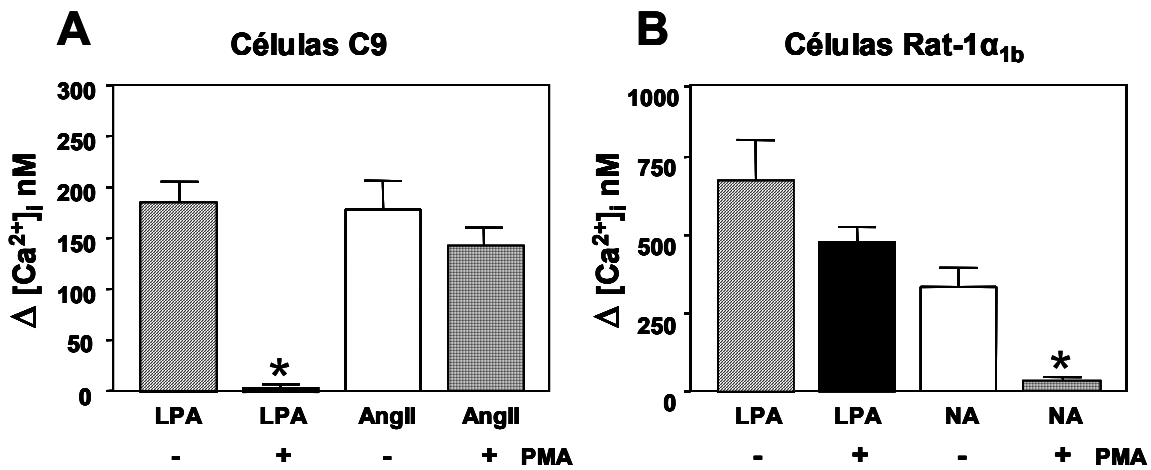


Figura 9. Comparación de la respuesta de LPA en dos líneas celulares. *A* Células C9. Incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por 1 μ M de LPA y su ausencia en células pretratadas con 1 μ M de PMA durante 5 min. La señal de angiotensina II (AngII) es detectable (parcialmente sensible) después de la activación de PKC. *B* Fibroblastos murinos Rat-1 α_{1b} . La señal de LPA es parcialmente sensible a la activación de PKC a diferencia de la señal de la noradrenalina, la cual se elimina con la preincubación con PMA. * $P < 0.001$ vs. su control, el resto no presentó diferencias significativas. Se presentan de 4 a 12 experimentos realizados con diferentes preparaciones de células.

Comprobamos que en las células C9 la acción de la PKC es específica sobre la señal del LPA, ya que, la movilización de calcio inducida por otros agentes que estimulan a diferentes GPCRs apenas se afecta con la preincubación con PMA. El estímulo de 100 nM de angiotensina II (Figura 7B, 9A y 10), 1 μ M de bradicinina o 10 nM de vasopresina activa a sus respectivos receptores aún después de la activación de PKC (Figura 10). Este resultado demuestra, además, que la ausencia de señal para el LPA en las células C9 estimuladas previamente con el PMA no se debe al vaciamiento de los almacenes intracelulares de calcio.

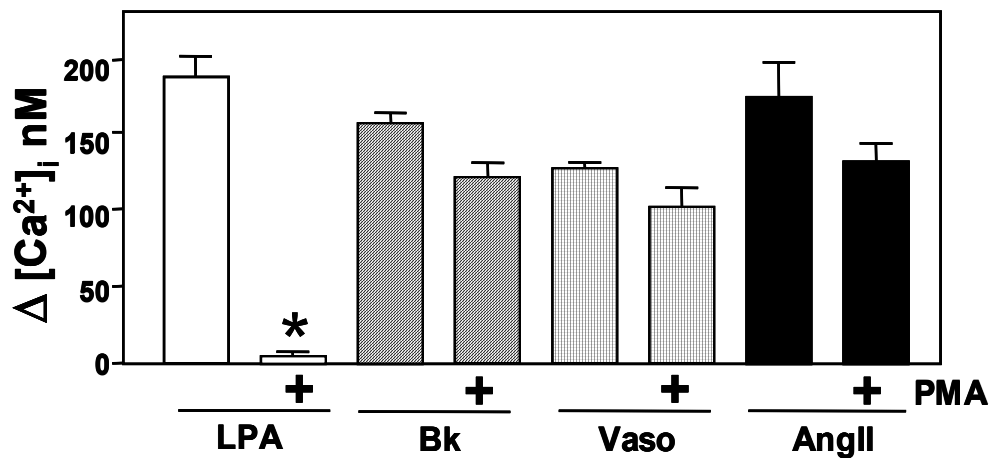


Figura 10. Sensibilidad al PMA de diferentes GPCRs en las células C9. 1 μ M de LPA, 1 μ M de bradicinina (Bk), 10 nM de vasopresina (Vaso) y 100 nM de angiotensina II (AngII) activan a sus respectivos receptores acoplados a proteínas G e inducen el incremento transitorio en la $[Ca^{2+}]_i$ en las células C9. De la señal de los cuatro diferentes GPCRs, solamente la del LPA desaparece al activar a la PKC con la preincubación durante 5 minutos con 1 μ M de PMA. * $P < 0.001$ vs. su control, el resto no presentó diferencias significativas. Se presentan de 4 a 12 experimentos realizados con diferentes preparaciones de células.

Para comprobar que la PKC es la responsable de bloquear el incremento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el LPA utilizamos dos estrategias para inhibir su actividad. La primera consistió en el uso de dos inhibidores, la estaurosporina (ST) y la bisindolil maleimida I (BIM). La segunda aproximación comprende el tratamiento crónico (durante 18 horas) con 1 μ M de PMA, que induce la “down regulation” de las isoformas de PKC sensibles a PMA. Con ambas estrategias observamos que el efecto del PMA se revertía, lo cual confirmó la participación de una isoforma de PKC sensible al PMA en la regulación de la señalización de LPA (Figura 11).

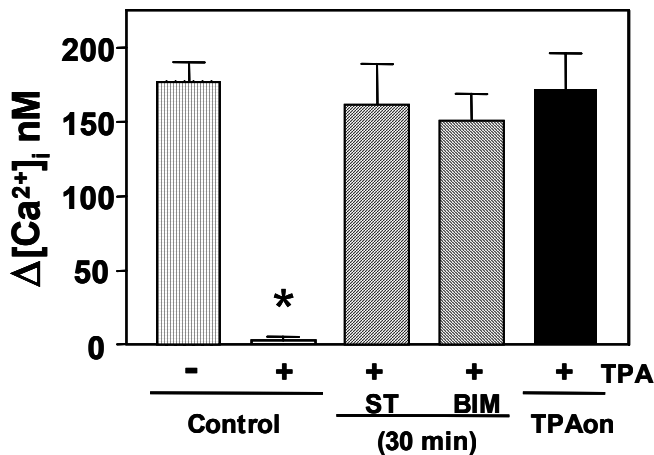
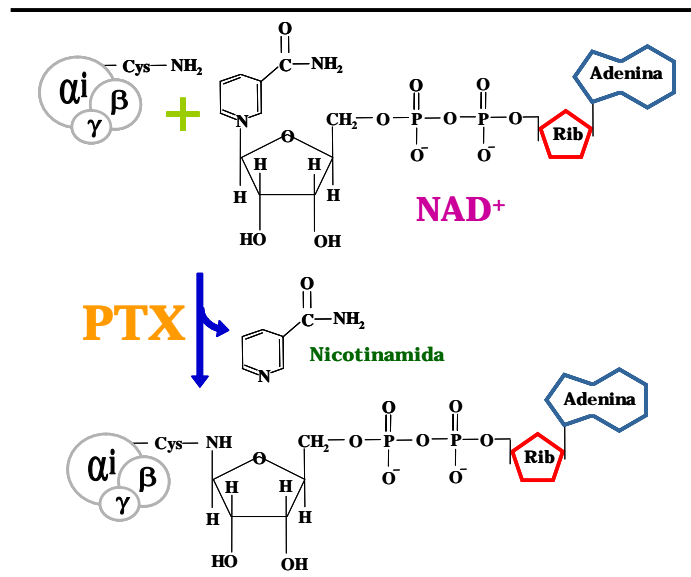


Figura 11. Una PKC sensible a PMA bloquea la señal de LPA en las células C9. Incremento de la concentración de calcio intracelular inducido por 1 μM de LPA en células C9 control (-) o incubadas con 300 nM de estaurosporina por 30 min (ST), 1 μM de bis indolil maleimida I por 30 min (BIM) o 1 μM de PMA toda la noche (PMAon) y preincubadas posteriormente con 1 μM de PMA durante 5 min (+). * $P < 0.001$ vs. el resto de los tratamientos. Se presentan de 6 a 12 experimentos realizados con diferentes preparaciones de células.

5.2. Acoplamiento funcional de los receptores para LPA con las proteínas G

En los reportes en los que se caracterizaron las acciones intracelulares del LPA se demostró que éste induce el incremento de calcio intracelular activando tanto a proteínas G heterotriméricas del tipo G_q, como Gi [91]. Para determinar la participación de estas proteínas G en la señalización del LPA en las células C9 utilizamos toxina pertussis, un agente que ADP ribosila y bloquea selectivamente a la proteína Gi (Figura 12).

Figura 12. Inhibición de la proteína Gi por ADP ribosilación. La toxina pertussis induce la ADP ribosilación, en una cisterna, de la proteína heterotrimérica Gi. El grupo ADP ribosil es tomado del NAD y se libera nicotinamida.



La toxina pertussis reduce significativamente, pero no elimina, la respuesta en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por LPA, lo que sugiere que, si bien hay una pequeña contribución a la señalización del LPA insensible a la toxina, es la proteína Gi la que está generando casi en su totalidad la movilización de calcio intracelular inducida por LPA. Un resultado

muy interesante es que, tanto la señal de calcio mediada por Gi como la señal independiente de toxina pertussis son bloqueadas por la activación de PKC con PMA (Figura 13).

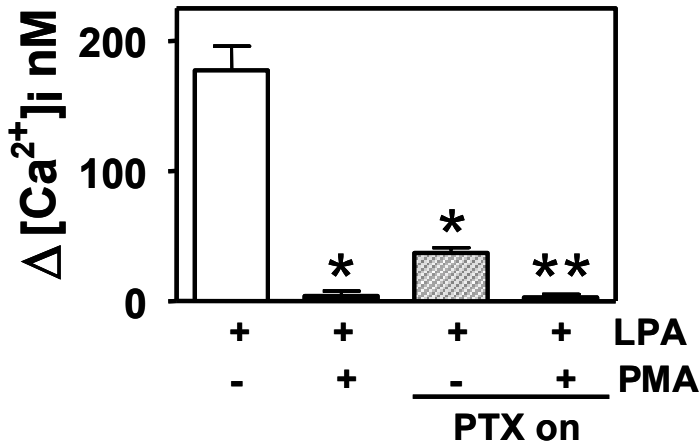
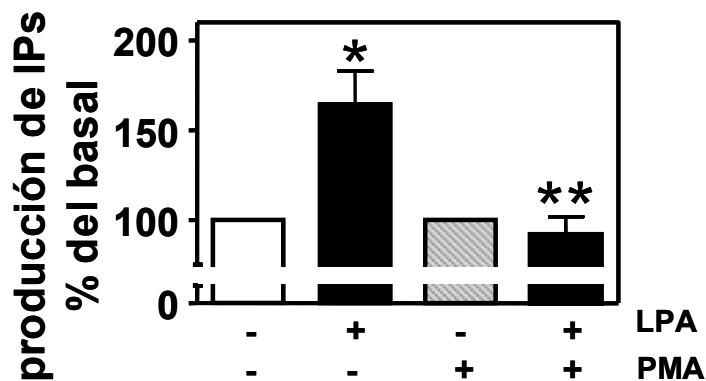


Figura 13. Participación de la Gi en la señal inducida por el LPA en las células C9. Efecto del tratamiento con 1 μM de PMA durante 5 minutos sobre el incremento en la [Ca²⁺]_i inducida por 1 μM de LPA en células C9 control o incubadas durante toda la noche con 100 ng/mL de toxina pertussis (PTXon). **P* < 0.001 vs. LPA, ***P* < 0.001 vs. LPA y *P* < 0.05 vs. LPA con PTXon.

Se sabe que la movilización de calcio intracelular puede generarse a partir de la salida de calcio del retículo endoplasmático inducida por la activación de receptores para IP₃. Para determinar si el LPA induce la activación de fosfolipasas y la producción de los segundos mensajeros IP₃ y DAG, medimos la producción de inositol fosfato en respuesta al LPA en las células C9. Nuestros resultados mostraron que la estimulación de las células C9 con el LPA incrementa la producción de inositol fosfato ([³H]IP) en células marcadas con [³H]inositol, lo que confirma la participación de una fosfolipasa y la producción de los segundos mensajeros IP₃ y DAG en la señalización del LPA en las células C9. La activación de la PKC con el PMA no causa ningún efecto sobre la producción basal de IPs pero bloquea completamente el efecto del LPA (Figura 14).

Figura 14. Producción de IPs en las células C9. El pretratamiento durante 5 minutos con 1 μM de PMA inhibe el incremento en la producción de fosfatos de inositol (IPs) inducida por 1 μM de LPA en células C9. *P* < 0.01 vs. células control y ***P* < vs. LPA sin PMA. Se presentan de 6 a 8 experimentos independientes.



Estos resultados además demuestran que la activación de la cinasa bloquea la cascada de señalización antes de que ocurra la movilización de calcio intracelular, sugiriendo que la PKC probablemente este actuando sobre el receptor de LPA

El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ puede generarse además por la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales en membrana plasmática. Una aproximación experimental para evaluar si en la señal de calcio inducida por el LPA participa la entrada de calcio fue realizar experimentos en los que primero se vacía el retículo endoplasmático utilizando 1 μ M de tapsigargina y después se estimula con 1 μ M de LPA. Aún en presencia de tapsigargina el LPA fue capaz de inducir el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. Esta señal insensible al vaciamiento del retículo es activada por proteínas heterotriméricas G_i ya que en células C9 incubadas durante toda la noche con 100 ng/ mL de toxina pertussis no hubo señal (Figura 15).

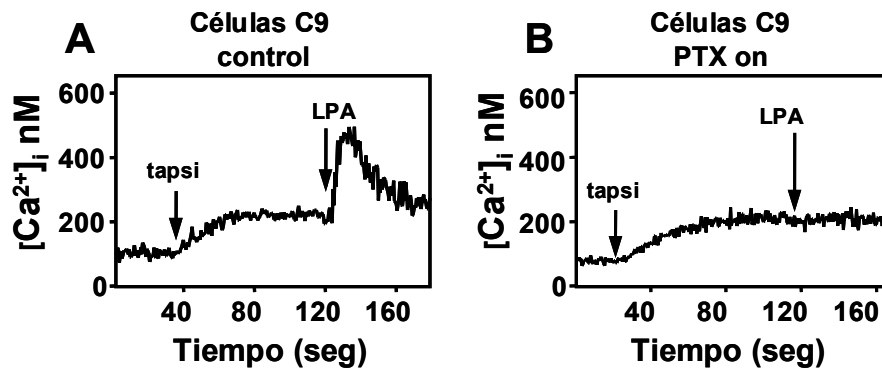


Figura 15. Incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por LPA en presencia de tapsigargina. A Trazo representativo del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por 1 μ M de LPA en células pretratadas con 1 μ M de tapsigargina (tapsi). B Las células C9 incubadas durante toda la noche con 100 ng/mL de toxina pertussis (PTXon) y pretratadas con 1 μ M de tapsigargina (tapsi) y estimuladas posteriormente con 1 μ M de LPA no muestran respuesta.

Estos experimentos mostraron que el LPA esta induciendo tanto la salida de calcio del retículo endoplasmático, a través de la activación de receptores para IP_3 , como la movilización de calcio proveniente de otro origen, muy probablemente extracelular, sin embargo esto tendrá que ser comprobado experimentalmente.

La proteína G_i inhibe a la enzima adenilato ciclasa la cual genera el segundo mensajero AMPc a partir de ATP. El acoplamiento funcional de los receptores para LPA con la proteína G_i fue confirmado por la determinación de los niveles de AMPc en las células C9. Para observar el efecto inhibitor de la proteína G_i es necesario elevar los

niveles de AMPc activando directamente a la adenilato ciclasa con 1µM de forskolina y probar los diferentes estímulos en su presencia, de lo contrario, las diferencias no son apreciables, como ocurrió con los diferentes estímulos en ausencia de forskolina (Figura 16). En las células C9, en presencia de forskolina, el LPA disminuye los niveles de AMPc al igual que la esfingosina-1-fosfato. La activación de los receptores para angiotensina II, así como la activación de los receptores para bradicinina, no tienen efecto inhibitor (Figura 16).

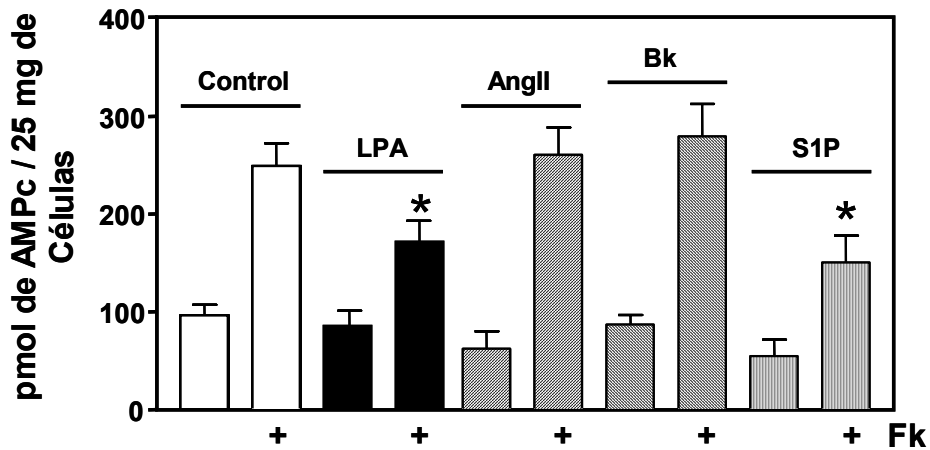


Figura 16. Inhibición de la adenilato ciclasa por la proteína Gi en las células C9. La estimulación durante 2 minutos con 1 µM de forskolina eleva 1.5 veces los niveles de AMPc en las células C9. En ausencia de forskolina ningún estímulo tuvo efecto significativo. En presencia de forskolina, la estimulación durante 2 minutos con 100 nM de angiotensina II (AngII) ó 1 µM de bradicinina (Bk) no tuvieron efecto. En cambio, en presencia del activador de la adenilato ciclasa, 1 µM de LPA y 1 µM de esfingosina-1-fosfato (S1P) redujeron significativamente los niveles de AMPc. * $P < 0.05$ vs. control + Fk. Se presentan de 4 a 6 experimentos independientes.

Estos datos muestran que, a pesar de que estos estímulos son capaces de activar el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, cada uno de ellos tiene particularidades en cuanto a las vías de señalización a las que se acopla en las células C9. Además, demuestran que el LPA es capaz de activar al menos dos vías de transducción al mismo tiempo, por una parte la vía inhibitoria de la adenilato ciclasa y por otra la de IP3-calcio. En esta última participan un componente sensible a la toxina pertussis (Gi) y un componente insensible a la toxina. Podría ocurrir que un subtipo de receptor para LPA pueda estar llevando a cabo todas las acciones o que dos (o más) subtipos de receptores para LPA se expresen en las células C9 y cada uno de ellos active distintas vías de transducción.

Intentamos probar si la activación de la PKC bloqueaba los efectos del LPA en los

niveles de AMPc, al igual que lo hacia en la $[Ca^{2+}]_i$, para determinar si la participación reguladora de la PKC ocurría antes de activarse cualquier vía de transducción. Sin embargo, al realizar las determinaciones de la concentración de AMPc en presencia de PMA nos dimos cuenta de que el ensayo de AMPc no resulta un buen parámetro para estudiar la regulación de la señal de LPA por PKC, ya que, por sí solo el PMA tiene efecto inhibitor sobre la adenilato ciclasa (Figura 17).

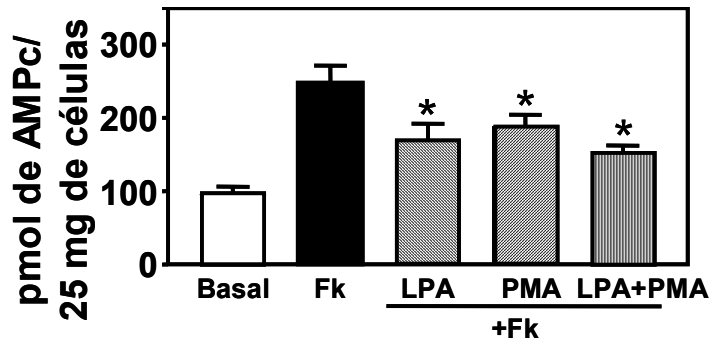
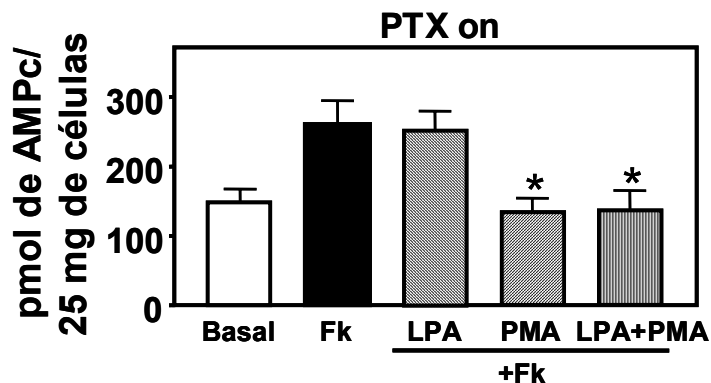


Figura 17. Efecto inhibitor del PMA sobre la acumulación de AMPc en las C9. 1 μ M de LPA (LPA), 1 μ M de PMA (PMA) o ambos (LPA+PMA) inhibieron parcial pero significativamente los niveles de AMPc incrementados por la forskolina (+Fk). * $P < 0.5$ vs. Fk. Se presentan de 6 a 13 experimentos independientes.

Nuestros datos mostraron que tanto el LPA como el PMA tienen efecto inhibitor sobre la acumulación de AMPc en las células C9, por lo que teníamos que determinar si ambos agentes actuaban de la misma forma sobre la vía. Utilizamos la toxina pertussis para detectar la participación de la proteína heterotrimérica G_i y dos estrategias para inhibir la actividad de PKC, un inhibidor (la bisindolil maleimida I, BIM) y el tratamiento crónico (durante 18 horas) con 1 μ M de PMA, que induce la “down regulation” de las isoformas de PKC sensibles a PMA. El efecto del LPA fue revertido con el uso de la toxina pertussis a diferencia del efecto de PMA que siguió observándose en las células incubadas con la toxina. En estas células es evidente cómo el PMA enmascara el efecto del LPA cuando las células son estimuladas con ambos agentes (Figura 18).

Figura 18. El LPA disminuye los niveles de AMPc a través de la proteína G_i . El tratamiento durante 18 horas con 100 ng/mL de toxina pertussis (PTXon) revierte la inhibición en la acumulación de los niveles de AMPc inducida por 1 μ M de LPA. * $P < 0.05$ vs. FK o LPA. Se presentan de 5 a 6 experimentos independientes.



Con las dos estrategias utilizadas para inhibir a la PKC observamos que el efecto del PMA se revertía pero el del LPA no (Figura 19). Estos resultados demuestran que estos agentes actúan de forma diferente al inhibir la vía de la adenilato ciclasa; mientras el LPA lo hace en la forma clásica a través de la proteína Gi, el PMA actúa independiente de Gi, probablemente fosforilando e inhibiendo directamente a la adenilato ciclasa, algo ya reportado en la literatura [158].

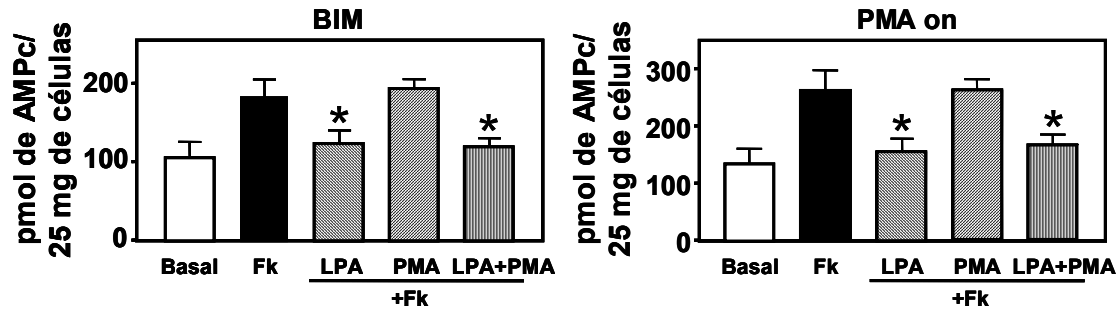


Figura 19. La PKC inhibe la acumulación de AMPc en las células C9. El pretratamiento durante 30 minutos con 1 μ M de bisindolil maleimida I (BIM) o durante toda la noche con 1 μ M de PMA (PMAon), revierte la inhibición en la acumulación de los niveles de AMPc inducida por 1 μ M de PMA pero no la inducida por 1 μ M de LPA. * $P < 0.05$ vs. FK o PMA. Se presentan 4 experimentos independientes.

5.3. Desacoplamiento de los receptores para LPA y las proteínas G

Otro parámetro que permite evaluar la activación de los GPCRs es la unión de GTP γ S. En experimentos realizados con membranas de células C9 estimuladas con LPA se detecta un claro incremento en la unión de GTP γ S. En las membranas de células pre-estimuladas con PMA y después con LPA, el incremento en la unión de GTP γ S es significativamente menor y semejante al incremento mostrado por membranas de células incubadas toda la noche con toxina pertussis y estimuladas con el LPA (Figura 20). Estos datos sugieren que la activación de la PKC evita el acoplamiento funcional entre la proteína G y los receptores para LPA.

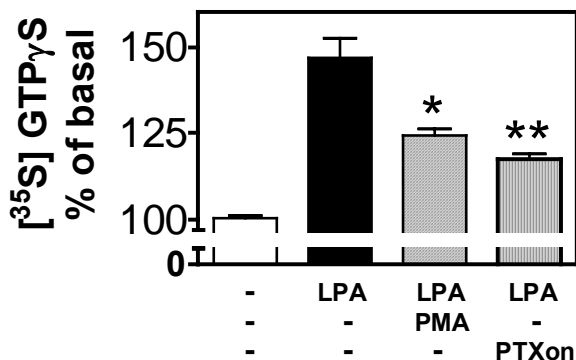


Figura 20. La activación de PKC reduce el acoplamiento funcional del receptor para LPA con las proteínas G en las células C9. Efecto de la estimulación con 1 μ M de PMA (PMA) durante 5 minutos o con 100 ng/mL de toxina pertussis (PTXon) durante toda la noche, sobre la unión de GTP γ S inducida por 1 μ M de LPA en células C9. * $P < 0.05$ vs. LPA y $P > 0.05$ vs. **. * y *** $P > 0.05$ vs. el control. ($n=4$).

El LPA fue el estímulo que causó el efecto más evidente en los ensayos de unión de GTP γ S realizados en las membranas de las células C9. La angiotensina II apenas logró incrementar la unión de GTP γ S con respecto al basal en forma significativa y el efecto de la activación de la PKC con el PMA o la inhibición de la proteína Gi con la toxina pertussis sobre la acción de la angiotensina II no pudieron ser evaluados, lo que mostró la poca sensibilidad del ensayo en estas condiciones (Figura 21).

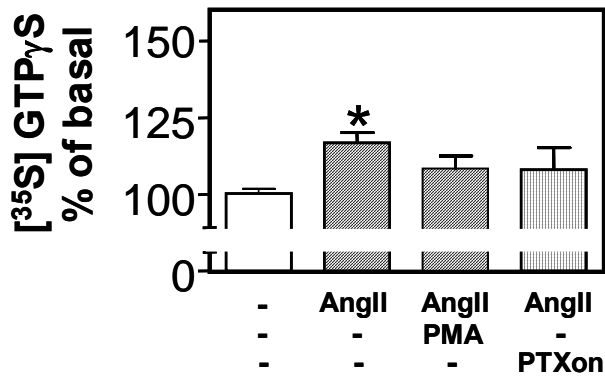


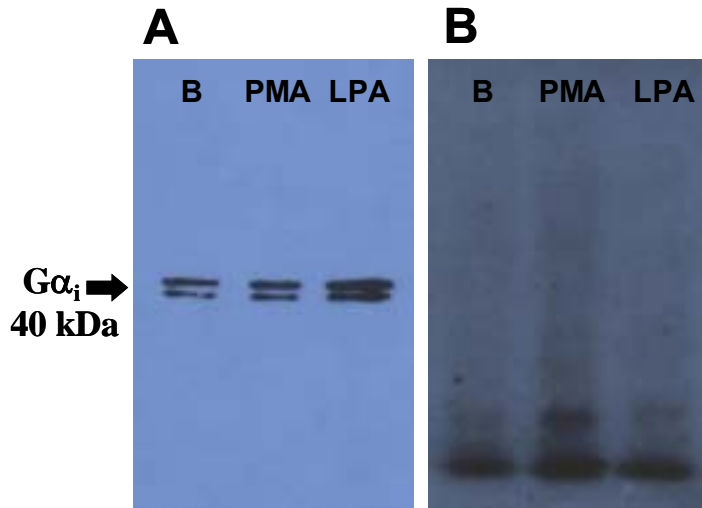
Figura 21. Efecto de la angiotensina II sobre la unión de GTP γ S a membranas extraídas de células C9. La estimulación con 100 nM de angiotensina II induce un incremento pequeño pero significativo en la unión de GTP γ S. Para este estímulo, la activación de PKC con 1 μ M de PMA (PMA) durante 5 minutos o la inhibición de la proteína Gi con 100 ng/mL de toxina pertussis (PTXon) durante toda la noche no pudieron ser evaluados.* P < 0.05 vs. basal, única diferencia significativa, (n =6).

El PMA disminuyó la unión de GTP γ S inducida por el LPA, sin embargo no lo hizo a nivel basal. La reducción fue similar a la provocada por la toxina pertussis. Esto podría deberse a que los receptores para LPA expresados en las células C9 estén también acoplados a proteínas G diferentes a la Gi (por ejemplo G_{12/13}) y que la activación de la PKC no bloquea este acoplamiento.

Para explorar la posibilidad de que la proteína Gi fuera el punto de regulación donde actúa la PKC sobre la señal del LPA evaluamos si la subunidad α i era fosforilada y con ello inactivada. Existen tres diferentes proteínas G α i, α i1, α i2 y α i3, de las cuales la proteína α i2 es la más abundante [159]. Purificamos a la subunidad α i2, a partir de extractos de células C9 marcadas metabólicamente con ³²P sin estímulo o estimuladas con PMA o LPA, utilizando anticuerpos específicos para esta proteína. La proteína α i2 fue purificada eficientemente como lo muestra el ensayo tipo Western blot en el que se observan dos bandas, de un peso molecular aproximado a los 40 kDa (el que se detecte a la proteína como dos bandas puede deberse a que existan dos poblaciones de proteína α i2 con diferentes modificaciones postraduccionales (Figura 22A)). Sin embargo, la autorradiografía mostró que estas proteínas no se encuentran fosforiladas en estado basal

y no son fosforiladas en respuesta a los dos estímulos, PMA o LPA (Figura 22B), lo que descartó la regulación por fosforilación de la Gi (Figura 22).

Figura 22. Purificación de la proteína α_i . La proteína α_i fue purificada de extractos de células C9, marcadas metabólicamente con ^{32}P , no estimuladas (B) o estimuladas con 1 μM de PMA (PMA) o 1 μM LPA (LPA), utilizando anticuerpos específicos generados en conejo. **A** Las muestras de inmunoprecipitación fueron sometidas a SDS-PAGE, transferidas a una membrana de nitrocelulosa y probadas por western blot utilizando un anticuerpo anti α_i generado en ratón. **B** Alternativamente el gel de la SDS-PAGE fue secado y expuesto para evaluar la señal del ^{32}P en placas de autorradiografía.



5.4. Los subtipos de receptores para LPA presentes en las células C9

La identificación de los subtipos de receptores para LPA que se expresan de forma natural en las células C9 se realizó por RT-PCR. Se extrajo RNA de las células C9 y se sometieron a una electroforesis en agarosa para evaluar su integridad (Figura 23).

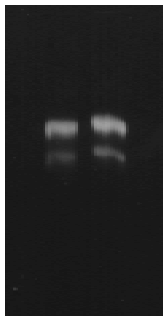


Figura 23. RNA de células C9. Se extrajo RNA total utilizando TRIZOL Reagent®. Se sometió a electroforesis en gel de agarosa con formaldehído y se tiñió con bromuro de etidio para poder observarlo con luz ultravioleta y evaluar su grado de integridad y pureza. Se muestra en ambos carriles muestras de células C9.

También se extrajo RNA total de células Rat-1 α_{1b} y HEK 293 para poder comparar la expresión de los subtipos de receptores para LPA. Una vez confirmado el buen estado del RNA se realizaron los ensayos de RT-PCR.

Cuando se evaluó la presencia de los mensajeros correspondientes a los tres subtipos de receptores para LPA pertenecientes a la familia de los EDGs (LPA₁₋₃), en las muestras de RNA total de las tres líneas celulares, los resultados mostraron diferencias interesantes entre ellas. En las células C9 se detectó la presencia de mensajero de los receptores LPA₁ (que además se confirmó por secuenciación) y LPA₂, pero no del receptor LPA₃, mientras que en las células Rat-1 α_{1b} se detectaron los mRNA de los receptores LPA₁ y LPA₃, pero no del LPA₂ y en las células HEK 293 se detectan mensajeros de los tres subtipos de receptores para LPA (Figura 24).

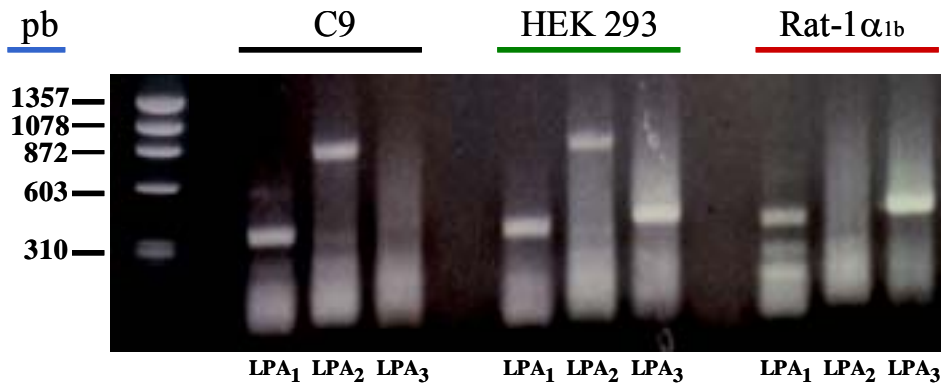
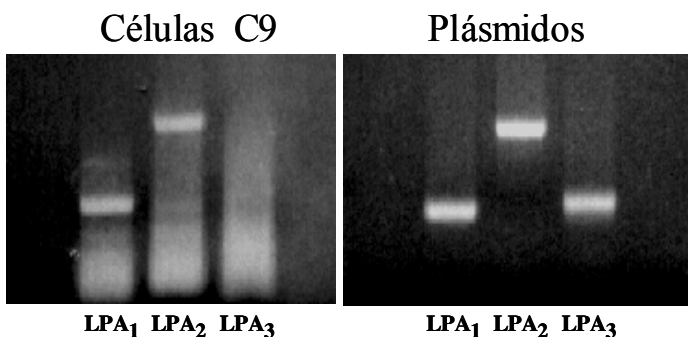


Figura 24. RT-PCR de los mRNAs de los receptores Edgs para LPA. Se muestran los fragmentos amplificados por RT.PCR, correspondientes a los receptores Edgs para LPA, amplificados usando como molde RNA total de las células C9, HEK 293 y Rat-1 α_{1b} . LPA₁ (349 pb), LPA₂ (798 pb) y LPA₃ (382 pb). En el primer carril se muestra el marcador de tamaño, los números a su izquierda corresponden a la longitud en pb.

Para confirmar la longitud de los fragmentos de los mensajeros de los EDGs, éstos también se amplificaron por PCR utilizando como molde las secuencias correspondientes a los tres receptores clonadas en plásmidos (Figura 25).

Figura 25. Fragmentos de los mensajeros de los Edgs amplificados por PCR y RT-PCR. Los fragmentos: LPA₁ (349 pb), LPA₂ (798 pb) y LPA₃ (382 pb) se obtuvieron utilizando como molde RNA total de células C9 o los plásmidos con los receptores mLPA₁, hLPA₂ y hLPA₃.



También se analizó la presencia del receptor LPA₄ por RT-PCR utilizando como molde RNA total extraído de diferentes tipos celulares. Además de las células epiteliales de hígado de rata C9 y los fibroblastos de rata Rat- 1 transfectados con el receptor α_{1b} adrenérgico, se analizaron la células COS-1 que son una línea celular de riñón de mono verde africano, las células HEK 292 que son una línea celular embrionaria de riñón humana, las células C6 que es un glioma de rata y las células B103 que son un neuroblastoma de rata; esta ultima es una línea celular que no expresa ninguno de los receptores para LPA de la familia Edg. En todas las líneas celulares se detectó mensajero del receptor LPA₄ (Figura 26).

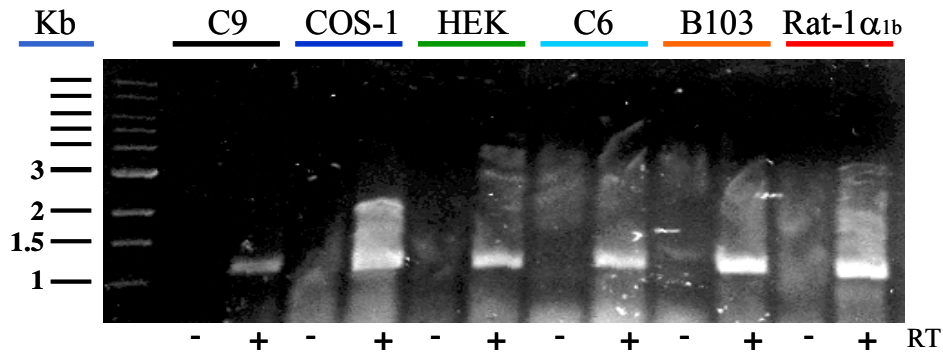


Figura 26. Análisis por RT-PCR de la presencia del mRNA del receptor LPA₄ en diferentes líneas celulares. Se amplificó el mensajero completo del LPA₄ utilizando oligonucleótidos específicos y como molde RNA total extraído de las líneas celulares, C9, COS-1, HEK 293, C6, B103 y Rat-1α1b. Se muestran las reacciones hechas sin (-RT) y con (+RT) Reverse Transcriptasa, en estas últimas se observa una banda de ~1112 pb que corresponde al mensajero del LPA₄. A la izquierda se muestra el marcador de 1Kb ladder.

En este punto decidimos concentrar nuestros esfuerzos en el estudio del receptor LPA₁. Los resultados mostraron claramente que la activación de PKC por el PMA induce la desensibilización de la señal del LPA. Dada la naturaleza rápida de esta desensibilización, se estudió el estado de fosforilación del receptor como posible mecanismo de desensibilización.

5.5. Intento de inmunoprecipitación del receptor LPA₁ endógeno

Se utilizó un anticuerpo comercial, que reconoce los aminoácidos 328-344 del LPA₁ humano, para intentar inmunoprecipitar al receptor endógeno de las células C9 marcadas metabólicamente con ³²P, pero no se logró su purificación (Figura 27).

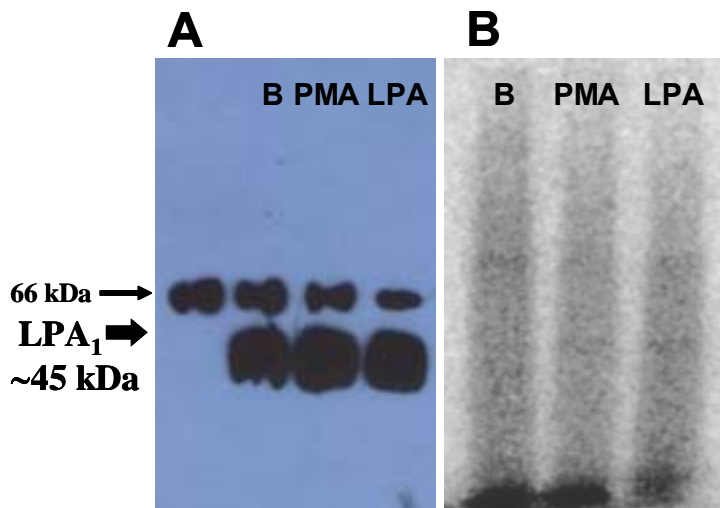


Figura 27. Intento de purificación del receptor LPA₁. El receptor LPA₁ se intentó purificar de extractos de células C9, marcadas metabólicamente con ³²P, no estimuladas (B) o estimuladas con 1 μM de PMA (PMA) o 1 μM LPA (LPA), utilizando anticuerpos comerciales. **A** Las muestras de inmunoprecipitación fueron sometidas a SDS-PAGE, transferidas a una membrana de nitrocelulosa y probadas por western blot utilizando el mismo anticuerpo. Se observa una banda inespecífica que coincide con la banda de 66 kDa del peso molecular y en los tres carriles con muestras de inmunoprecipitación, las bandas correspondientes a las IgGs. **B** Alternativamente el gel de la SDS-PAGE fue secado y expuesto para evaluar la señal del ³²P en el PhosphorImager.

El que no pudiéramos purificar al receptor LPA₁ que se expresa en forma endógena en las células C9 utilizando el anticuerpo dirigido contra el receptor humano, podía deberse a las diferencias existentes entre los receptores LPA₁ de ambas especies. El anticuerpo comercial se generó utilizando como antígeno un péptido que comprende los aminoácidos 328-344 del receptor. En esta zona del receptor LPA₁ existen dos aminoácidos, la S³³¹ y la T³³⁵, que en el receptor de rata son N (Figura 28).

Receptor LPA₁ de *Homo sapiens*

```

1  MAAISTSPV IQPQSTANW EPOCFYMEI AFFYRSGKH LATEWNTVEK LVNGLGITVC
61  IFIMLANLLV MVAITVNRFF HFFIYYLGNL LAAADFFAGL AYFYLMFNTG PNTARLTVST
121  WLLRQGLIDT SITASVRMLL AJAIERHITY FFMQLHTSMS NRRVVVIVV IWTMAIVMGA
181  IFSVGNVIC DIRMCSNMAP LYSQSYLNFV AIFNLVTFV MVVLTARHFG YVRCSTNMS
241  HSSGPARNR DTMMLIKTY VIVLGAFTIC WTPGVLILL DVCCPQCDVL AYEKFFLLA
301  EFNAMNPII TSYRKRNSA TFRQILVCR QENIQPTES SDRAASLME TILAGVHND
361  ESVV
  
```

Receptor LPA₁ de *Rattus norvegicus*

```

1  MAAASTSPV IQPQSTANW EPOCFYMEI AFFYRSGKH LATEWNTVEK LVNGLGITVC
61  IFIMLANLLV MVAITVNRFF HFFIYYLGNL LAAADFFAGL AYFYLMFNTG PNTARLTVST
121  WLLRQGLIDT SITASVRMLL AJAIERHITY FFMQLHTSMS NRRVVVIVV IWTMAIVMGA
181  IFSVGNVIC DIRMCSNMAP LYSQSYLNFV AIFNLVTFV MVVLTARHFG YVRCSTNMS
241  HSSGPARNR DTMMLIKTY VIVLGAFTIC WTPGVLILL DVCCPQCDVL AYEKFFLLA
301  EFNAMNPII TSYRKRNSA TFRQILVCR QENIQPTES SDRAASLME TILAGVHND
361  ESVV
  
```

Figura 28. LPA₁ de humano y rata. Se muestran las secuencias polipeptídicas de los receptores LPA₁ de humano y de rata. En los recuadros verdes se señala la secuencia del receptor de humano que fue utilizada como antígeno para generar el anti-cuerpo comercial y la secuencia equivalente en el receptor de rata. Se señalan en óvalos los aminoácidos diferentes entre ambas especies.

5.6. Anticuerpo anti LPA₁

Dada la posibilidad de que las diferencias entre los receptores de humano y rata fueran la causa de que el anticuerpo comercial no inmunoprecipite al receptor de las células C9, decidimos generar un anticuerpo dirigido contra la secuencia del receptor LPA₁ de rata.

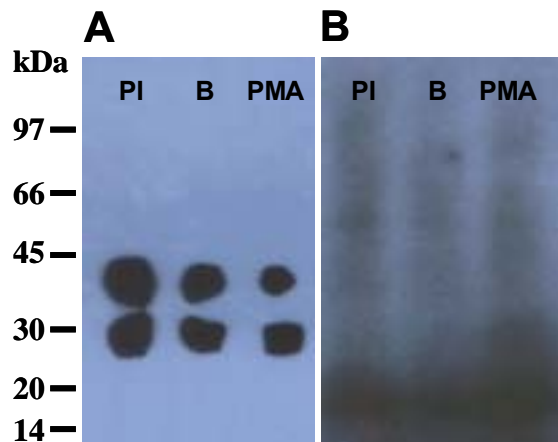
Se mandó sintetizar un péptido que contiene los primeros quince aminoácidos del receptor (ninguno de ellos es un sitio posible de N-glucosilación) y con él se inmunizaron conejos (Figura 29).

KMAAASTSSPVISQPQ

Figura 29 Péptido LPA₁. Péptido utilizado como antígeno para generar anticuerpos anti el receptor LPA₁ de rata en conejos. La lisina en naranja (K) no pertenece a la secuencia del receptor.

Una vez obtenido el suero de los conejos inmunizados con el péptido se realizaron experimentos de inmunoprecipitación con células C9 marcadas metabólicamente con ³²P (Figura 30).

Figura 30. Segundo intento de purificación del receptor LPA₁. El receptor LPA₁ se intentó purificar de extractos de células C9, marcadas metabólicamente con ³²P, no estimuladas (B) o estimuladas con 1 μM de PMA (PMA), utilizando el suero preinmune (PI) o el suero de los conejos inmunizados con el péptido con los primeros 15 aa del LPA₁ de rata (en B y PMA). **A** Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE, transferidas a una membrana de nitrocelulosa y probadas por Western blot utilizando el mismo anticuerpo. **B** Alternativamente el gel de la SDS-PAGE fue secado y expuesto para evaluar la señal del ³²P en placas de autorradiografía.



Tampoco con el uso del suero anti LPA₁ generado en nuestro laboratorio se logró purificar a este receptor en extractos de células C9. La razón de ambas negativas podría ser el que algunos anticuerpos son eficientes en ensayos tipo Western blot pero no lo son en ensayos de inmunoprecipitación, y en este caso ninguno de los dos lo son. Por esta razón decidimos generar proteínas de fusión de los receptores LPA₁₋₃ con proteínas o etiquetas para las cuales existieran anticuerpos comerciales eficientes para hacer ensayos de inmunoprecipitación.

5.7. Construcción de las proteínas de fusión

Para construir las proteínas de fusión contábamos con cuatro diferentes plásmidos. El pEGFP-N1, con el que se pueden generar proteínas de fusión con la proteína verde fluorescente en la parte carboxilo, el pcDNA3.1/Myc-His que genera proteínas con el epítipo de Myc más 6 histidinas en el extremo carboxilo, el pCMV-Myc que permite obtener proteínas con el epítipo de Myc en la parte amino y el pCMV-HA que permite generarlas con el epítipo de hemaglutinina también en la parte amino (Figura 31).

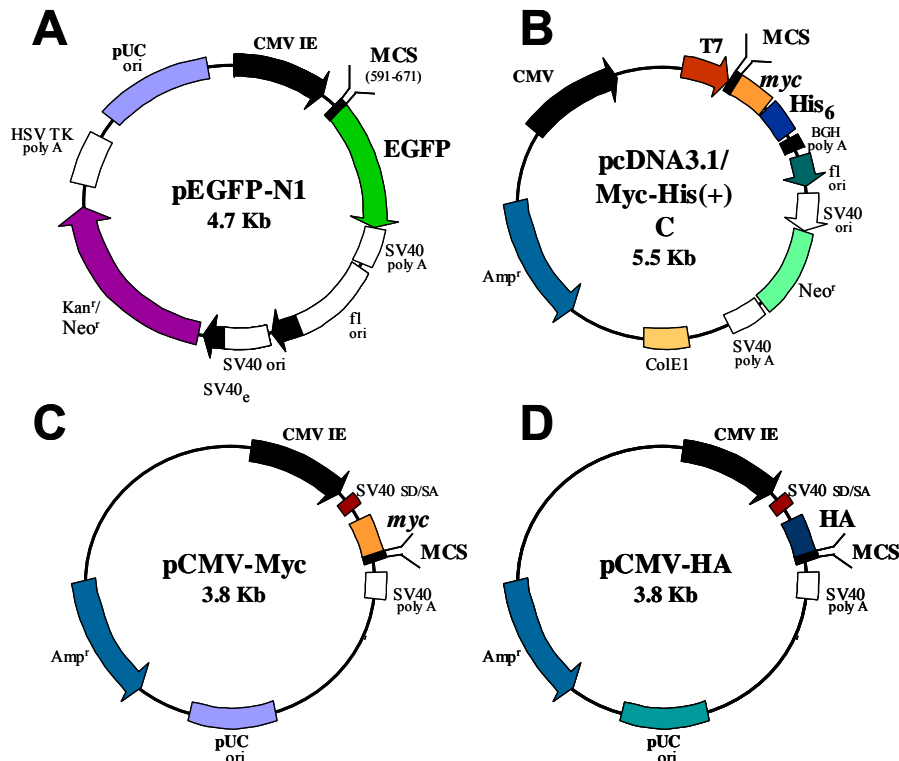


Figura 31. Cuatro diferentes vectores para generar proteínas de fusión. Vectores utilizados para generar proteínas de fusión de los receptores para LPA con cuatro diferentes etiquetas. **A** pEGFP-N1. **B** pcDNA3.1 Myc-His. **C** pCMV-Myc y **D** pCMV-HA. Tres de ellos con el promotor de CMV IE (**A**, **C** y **D**) y uno con el promotor de T7 (**B**). Dos de ellos con resistencia a G418 (Neo^r) (**A** y **B**) que permite hacer transfecciones estables y dos sin ellas (**C** y **D**) que permiten solo transfecciones transitorias.

Se diseñó un par de oligonucleótidos, por cada receptor, que permitiera insertar la secuencia completa del receptor en los cuatro diferentes plásmidos. Para su diseño se tomaron en cuenta varias consideraciones. Se estudió la secuencia de los sitios múltiples de clonación (MCS) de los cuatro vectores para poder escoger un par de enzimas de restricción que nos permitieran hacer una clonación direccional; estas enzimas, además de no cortar la secuencia del receptor, tenían que estar en los cuatro MCS en el mismo orden (5'→3').

Una vez seleccionadas las secuencias de las enzimas de restricción se incluyó una secuencia Kosak (secuencia consenso de inicio de la traducción) en el oligo “forward” y se incluyeron las bases necesarias para que la secuencia del receptor quedara en marco de lectura con las secuencias de los epítomos en los casos en los que éstos estuvieran en la parte amino.

En el oligo “reverse”, además de incluir las bases necesarias para que la secuencia de las etiquetas en el carboxilo quedara en marco con la de los receptores, se incluyó la mutación del codón de “stop” para que se tradujera como un solo polipéptido. Además se consideró en éste punto que, al mutar el codón de “stop” del receptor, se localizara uno próximo en la secuencia 3' siguiente para los casos en los que la etiqueta se encontrara en la parte amino.

Por último se incluyeron bases en los extremos para asegurar el corte de los productos de PCR por las enzimas y el fragmento de secuencia del receptor (inicial y final) cuya longitud se varió para conseguir que las Tm de ambos oligos “forward” y “reverse” fuera la misma. Los oligonucleótidos diseñados tienen el mismo patrón general (Figura 32).

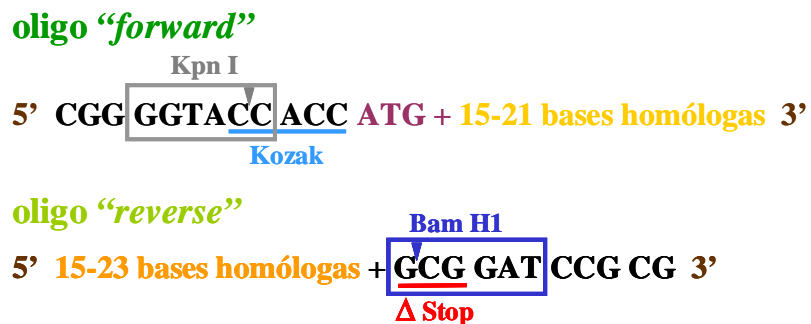


Figura 32. Diseño general de los oligonucleótidos. Se presenta el patrón general de los oligonucleótidos utilizados para clonar la secuencia de los receptores para LPA en los vectores para generar proteínas de fusión. Kpn I y Bam HI fueron las enzimas seleccionadas, se incluyó la secuencia Kosak y la mutación del codón de “stop”. “bases homólogas”, se refiere a las bases de las secuencias iniciales y finales de los genes de los receptores para LPA.

5.8. Generación de la línea celular C9 LPA₁-EGFP

Una vez obtenido el plásmido con la fusión del receptor LPA₁ con la EGFP, verificado por secuenciación, se generó una línea estable de células C9 que la expresara de forma estable (C9 LPA₁-EGFP). Las células C9 transfectadas con el LPA₁-EGFP se seleccionaron por resistencia al antibiótico G418 (Geneticina). Para determinar la concentración de G418 adecuada se realizó una curva dosis-muerte para este antibiótico (Figura 33).

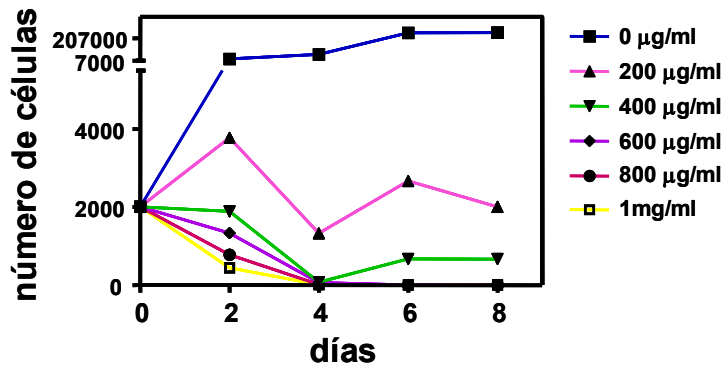


Figura 33 Curva de letalidad del G418 en las células C9. Cultivos de células C9 con una población inicial de 2000 células se mantuvieron en ausencia (línea azul) o en presencia de diferentes concentraciones de G418 durante 8 días. Cada dos días se contabilizó la población celular. Se graficaron los promedios de tres diferentes experimentos.

Se utilizaron 600 µg/mL de G418 para la primera selección y después la línea celular se mantuvo en medio con 300 µg/mL. De esta población celular se hizo una segunda selección por citometría de flujo de la que se obtuvo la línea C9 LPA₁-EGFP estable (Figura 34).

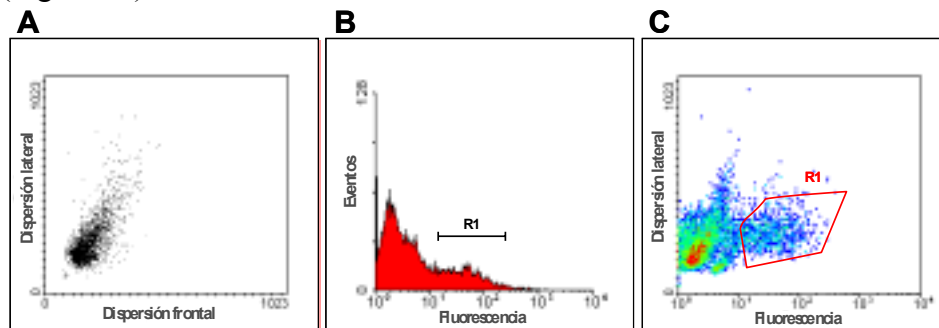


Figura 34. Citometría de flujo de las células C9 transfectadas con el pEGFP-N1-LPA₁. En **A** se muestra una gráfica de la dispersión frontal (~tamaño) contra la dispersión lateral (~complejidad) en la que se puede observar una población homogénea lo que indica que las células se encuentran en buen estado. En **B** se presenta una gráfica de fluorescencia contra número de eventos (~número de células) en la que son visibles dos poblaciones, la que corresponde a las células no fluorescentes y la población de células fluorescentes, esta última delimitada por R1. En **C** se presenta una gráfica de fluorescencia contra dispersión lateral en la que se puede observar que la población fluorescente tiene un patrón similar de complejidad. La región (R1) delimitó la población que fue separada.

Se realizaron ensayos de movilización de calcio intracelular para determinar si la línea celular C9 LPA₁-EGFP, obtenida de ambas selecciones, respondía a la estimulación

con LPA y PMA como lo hacen las células C9 silvestres. El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por el LPA en estas células mostró las mismas características de la señalización generada por el LPA en las células silvestres (Figura 35), incluyendo la sensibilidad a la activación de la PKC con el PMA (Figura 35B y C). Las células C9 LPA₁-EGFP presentan un mayor incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ comparadas con las células silvestres, este efecto se debe a que hay un mayor número de receptores presentes en la membrana plasmática capaces de responder a su ligando (Figura 35C).

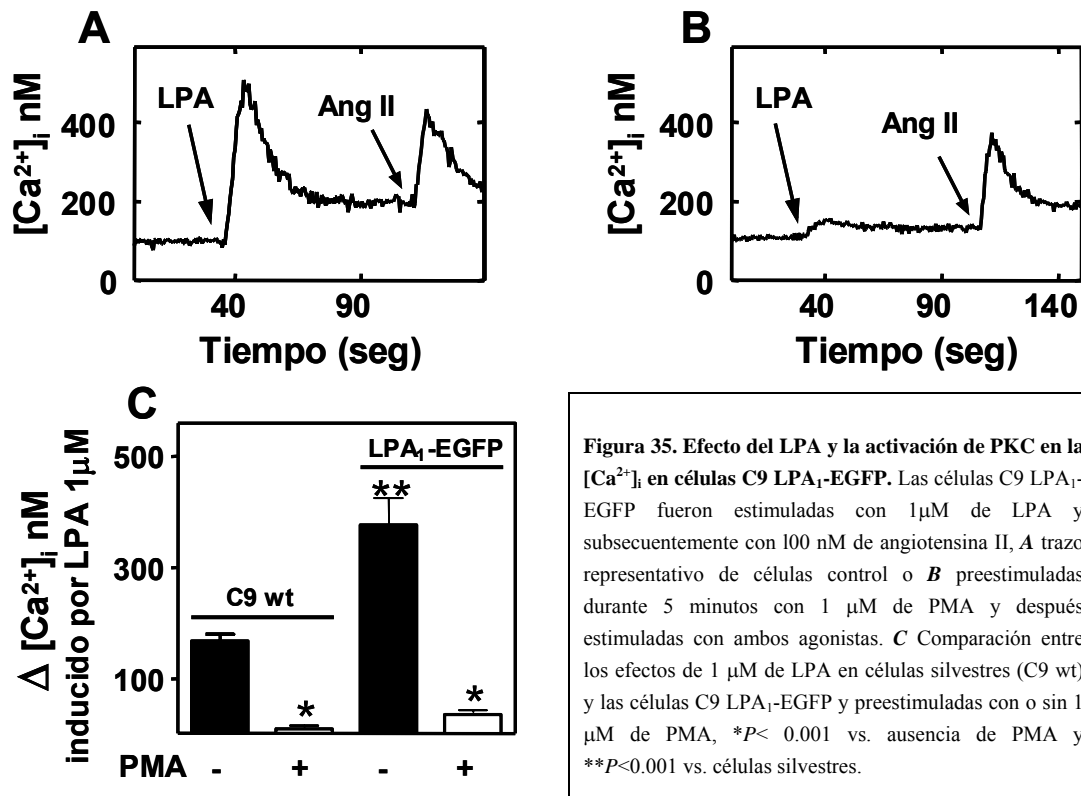
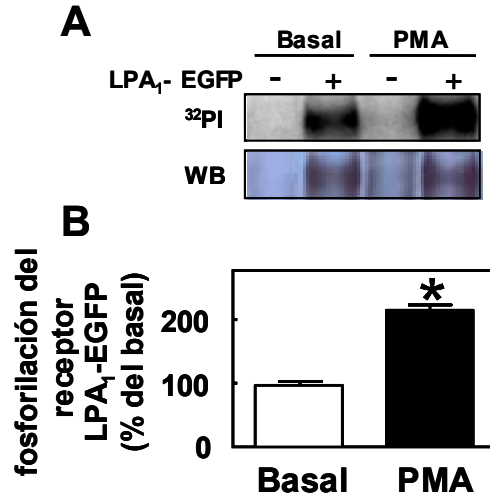


Figura 35. Efecto del LPA y la activación de PKC en la $[Ca^{2+}]_i$ en células C9 LPA₁-EGFP. Las células C9 LPA₁-EGFP fueron estimuladas con 1 μ M de LPA y subsecuentemente con 100 nM de angiotensina II, **A** trazo representativo de células control o **B** preestimuladas durante 5 minutos con 1 μ M de PMA y después estimuladas con ambos agonistas. **C** Comparación entre los efectos de 1 μ M de LPA en células silvestres (C9 wt) y las células C9 LPA₁-EGFP y preestimuladas con o sin 1 μ M de PMA, * $P < 0.001$ vs. ausencia de PMA y ** $P < 0.001$ vs. células silvestres.

5.9. Inmunoprecipitación del receptor LPA₁ fosforilado

Los ensayos de inmunoprecipitación para evaluar el grado de fosforilación del receptor LPA₁ se realizaron en las células C9 LPA₁-EGFP marcadas con ³²P, utilizando un anticuerpo comercial anti EGFP. Los resultados mostraron que el receptor LPA₁ se encuentra como fosfoproteína en las células control y su grado de fosforilación incrementa aproximadamente 2 veces en células tratadas durante 5 minutos con 1 μ M de PMA (Figura 36A *panel superior* y 36B). La identidad del receptor se corroboró en un ensayo de tipo Western blot usando el anticuerpo comercial que reconoce los aminoácidos 328-344 del receptor LPA₁ (Figura 36B *panel inferior*).

Figura 36. Fosforilación del receptor LPA₁-EGF. I. A Las células C9 silvestres (-) o C9 LPA₁-EGFP (+), marcadas metabólicamente con [³²P]Pi, fueron no estimuladas (Basal) o estimuladas durante 5 minutos con 1 μM de PMA (PMA). El receptor LPA₁-EGFP fue inmunoprecipitado usando un anticuerpo policlonal comercial anti-EGFP. Las muestras de inmunoprecipitación fueron sometidas a SDS-PAGE, el gel fue secado y expuesto para evaluar la señal del ³²P en el PhosphorImager (³²PI), *panel superior*. Alternativamente el gel de la SDS-PAGE fue transferido a una membrana de nitrocelulosa y probado por Western blot utilizando el anticuerpo comercial anti LPA₁, *panel inferior*. **B** Cuantificación por densitometría del grado de fosforilación del receptor LPA₁-EGFP. Los resultados están expresados como porcentaje de la fosforilación basal del receptor LPA₁-EGFP. Están graficados los promedios ± el S.E.M de 8 experimentos independientes. **P* < 0.001 vs. Basal.



La fosforilación del receptor muestra un comportamiento dosis-dependiente, con una EC₅₀ aparente de 11 ± 2 nM, y alcanza una respuesta máxima a una concentración de 1 μM de PMA (Figura 37A). La fosforilación del receptor es relativamente rápida (*t*_{1/2} ~1 minuto) y se mantiene hasta los 60 minutos (Figura 37B).

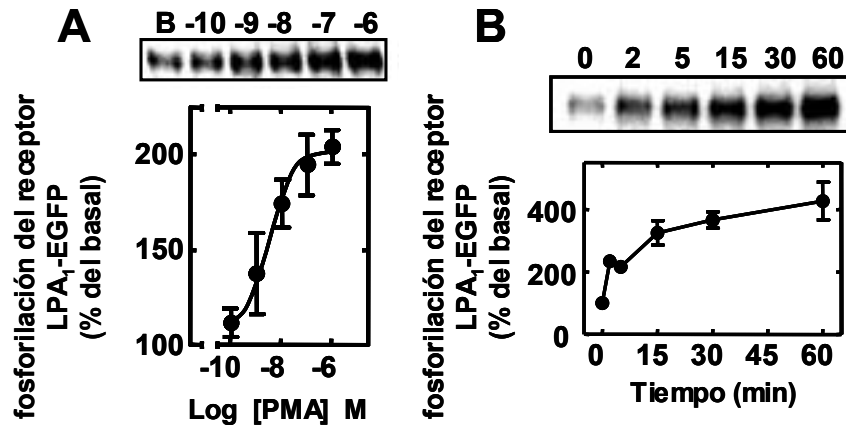


Figura 37. Fosforilación del receptor LPA₁-EGFP. II. Las células C9 LPA₁-EGFP fueron marcadas metabólicamente con [³²P]Pi y el receptor LPA₁-EGFP fue inmunoprecipitado usando anticuerpos policlonales anti-EGFP. **A** Curva dosis- respuesta del efecto de PMA en la fosforilación del receptor LPA₁-EGFP (B, no tratadas con PMA). **B** Curso temporal del efecto de 1 μM PMA en la fosforilación del receptor LPA₁-EGFP. Se muestra una autorradiografía representativa en cada caso y las graficas corresponden a los promedios ± el S.E.M de la densitometría de 4-6 experimentos independientes.

Al realizar los experimentos de fosforilación del receptor LPA₁-EGFP en presencia de los inhibidores de la PKC, ST y BIM, observamos que el uso de ambos inhibidores evita la fosforilación del receptor LPA₁ inducida por el PMA (Figura 38). Estos resultados demuestran que la activación de la PKC con el uso de PMA induce tanto la desensibilización del receptor LPA₁ como su fosforilación y que ambos eventos están correlacionados.

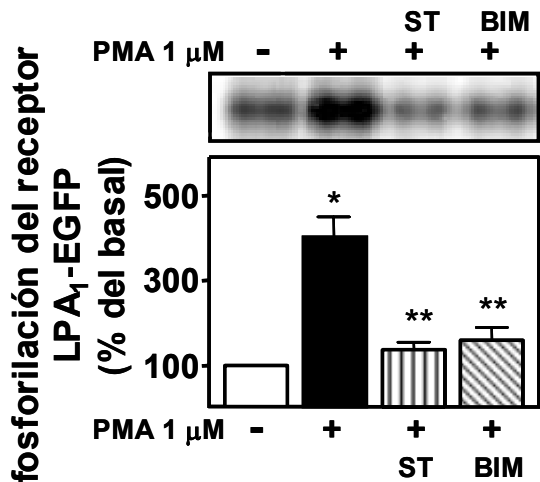


Figura 38. Fosforilación del receptor LPA₁-EGF III. Las células C9 LPA₁-EGFP fueron marcadas metabólicamente con [³²P]Pi y el receptor LPA₁-EGFP fue inmunoprecipitado usando un anticuerpo policlonal anti-EGFP. Fosforilación del receptor en células preincubadas durante 30 minutos con o sin 300 nM staurosporine (ST) o 1 μM bisindolyl-maleimide I (BIM) y después estimuladas durante 5 minutos con 1 μM PMA (+). En la parte superior, se presenta una autorradiografía representativa. En la parte inferior se presenta la gráfica de la densitometría. Los resultados están expresados como porcentaje de la fosforilación basal del receptor LPA₁-EGFP. Están graficados los promedios ± el S.E.M de 4 experimentos independientes. **P* < 0.001 vs. basal (-) y ***P* < 0.001 vs. PMA solo (+).

5.10. Efecto de la activación de los receptores de LPA y angiotensina II en la fosforilación del receptor LPA₁

Se ha reportado que la respuesta de los receptores para LPA es regulada por el propio agonista, en un proceso que involucra a la GRK2 y a la β-arrestina-1 [160] y que el LPA induce la endocitosis del receptor LPA₁ mediada por dinamina 2 y Rab5 [161]. Sin embargo, no se ha reportado que la fosforilación del receptor sea parte de estos procesos. Para determinar si el LPA es capaz de inducir la fosforilación del receptor LPA₁, estimulamos a las células C9 LPA₁-EGFP durante 5 minutos con 1 μM de LPA. El receptor muestra una fosforilación mucho mayor (~8 veces la fosforilación basal del receptor) (Figura 39B) que la inducida por el PMA. La determinación de la movilización de calcio intracelular mostró además que el LPA induce también la desensibilización funcional del receptor (Figura 39A). Estos datos demuestran que la fosforilación del receptor LPA₁ inducida por su ligando correlaciona con su desensibilización.

La regulación por fosforilación de los GPCRs ocurre en forma natural en dos circunstancias, en presencia del propio agonista (homóloga) o en ausencia de éste (heteróloga) [143]. Nuestros resultados demostraron que el receptor LPA₁ es desensibilizado por fosforilación tanto de forma homóloga como heteróloga. Para determinar en cual de estas dos formas de desensibilización esta participando la PKC, realizamos experimentos de fosforilación del receptor probando el efecto del propio LPA y de la angiotensina II en células control o pretratadas con el inhibidor de PKC. Los datos muestran que la fosforilación del receptor LPA₁ inducida por la angiotensina II (Figura

39B) es muy semejante en intensidad a la inducida por el PMA y se previene con el uso de inhibidores de PKC (Figura 39B). El LPA, además de inducir un incremento mucho mayor en el grado de fosforilación del receptor LPA₁ que el inducido por la angiotensina II o el PMA, no es evitado por los inhibidores de PKC (Figura 39B). Estos datos sugieren que la PKC está participando de forma importante en la regulación heteróloga del receptor LPA₁ y no en la regulación homóloga del receptor.

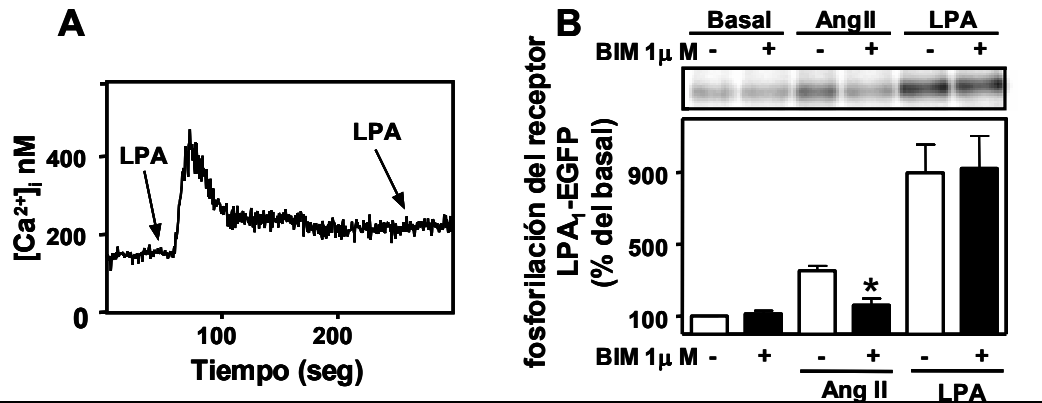
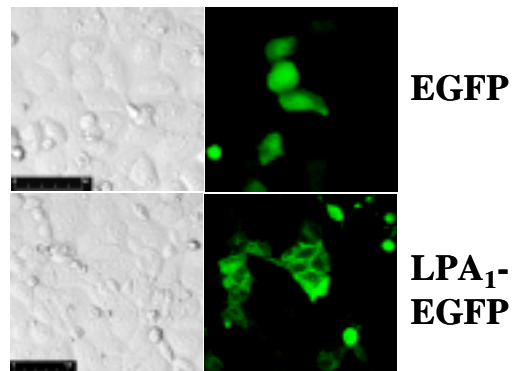


Figura 39. Participación de la PKC en la desensibilización homóloga y heteróloga del receptor LPA₁. *A* Trazo representativo del incremento de la concentración de calcio intracelular en células estimuladas con 1 μM de LPA seguido de un segundo estímulo con 1 μM de LPA. *B* Células incubadas con (+) o sin (-) 1 μM de bisindolylmaleimide I (BIM) durante 30 minutos y después estimuladas con 300 nM de angiotensina II o 1 μM de LPA. En la parte superior, se presenta una autorradiografía representativa. En la parte inferior se presenta la gráfica de los promedios ± el S.E.M de la densitometría de 4 experimentos independientes. Los resultados están expresados como porcentaje de la fosforilación basal del receptor LPA₁-EGFP. **P*< 0.001 vs. Ang II sin BIM.

5.11. El PMA induce la internalización del receptor LPA₁-EGFP

Finalmente probamos si la activación de PKC por PMA afecta la localización subcelular del receptor LPA₁. Para determinar si el receptor LPA₁ se internaliza a consecuencia de su fosforilación, se realizaron estudios de microscopia confocal del receptor LPA₁-EGFP. Las imágenes de microscopia confocal realizadas con células vivas crecidas adheridas a cubreobjetos mostraron que el receptor LPA₁-EGFP se localizaba en su mayoría en membrana plasmática, a diferencia de la proteína EGFP la cual se localiza en todo el interior celular (Figura 40).

Figura 40. Microscopia de las células C9 LPA₁-EGFP. Imágenes de microscopia de luz transmitida (*izquierda*) o microscopia confocal (*derecha*), de las células C9 que expresan a la proteína verde fluorescente sola (EGFP) o al receptor LPA₁-fusionado a la proteína verde fluorescente (LPA₁-EGFP). El receptor se localización predominantemente en la membrana plasmática, a diferencia de la proteína EGFP que se distribuye homogéneamente por todo el interior celular.



Cuando capturamos imágenes secuenciales de diferentes planos focales (lo que se conoce como cortes en el eje Z) pudimos observar que la señal de fluorescencia del LPA₁-EGFP con mayor intensidad se observaba en la membrana, en particular, en las zonas de contacto entre células (Figura 41A). Cuando los planos focales correspondían a la zona en la que es visible el núcleo se podían observar claramente corpúsculos altamente fluorescentes que podrían corresponder al receptor recién sintetizado localizado en el retículo endoplasmático y/o en el trans-Golgi (Figura 41B). En los planos focales superiores al núcleo se observaba fluorescencia distribuida en toda la célula, en una forma semejante a una señal de epifluorescencia (Figura 41C y Video 1).

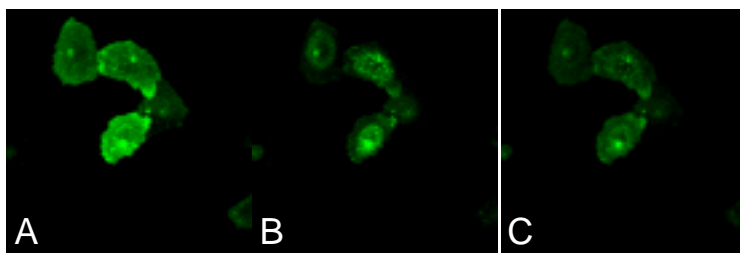
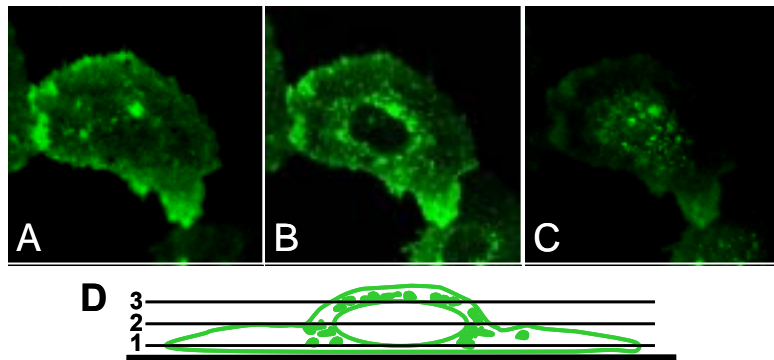


Figura 41. Cortes en Z de tres células C9 LPA₁-EGFP. Se muestran tres imágenes representativas extraídas del Video 1. Los planos focales van de: *A* el más cercano a la superficie de adhesión, *B* plano nuclear y *C* plano superior al plano nuclear.

Imágenes de estas mismas células, vistas a mayor aumento, nos permitieron observar mejor la distribución del receptor. En los cortes en Z de una célula se puede observar claramente los tres patrones arriba mencionados (Figura 42A-C y Video 2). Esta observación además nos sugirió la morfología que adoptan las células C9 adheridas (Figura 42D).

Figura 42. Cortes en Z de una célula C9 LPA₁-EGFP. Se muestran tres imágenes representativas extraídas del Video 2. Los planos focales van de: *A* el más cercano a la superficie de adhesión, *B* plano nuclear y *C* plano superior al plano nuclear. *D* Modelo de la morfología de las células C9 adheridas. Las líneas simulan los planos correspondientes a las imágenes mostradas, 1=A, 2=B y 3=C.



Para evitar que la morfología de las células C9 LPA₁-EGFP interfiriera en la determinación de la localización del receptor, realizamos los estudios de microscopía confocal en células tripsinizadas y sembradas sobre los cubreobjetos una hora antes de la observación (células redondas ligeramente adheridas). Las imágenes muestran que el receptor LPA₁-EGFP se encuentra casi en su totalidad en la membrana plasmática (Video 3); hecho que fue corroborado por su co-localización con el marcador fluorescente de membrana FM-4-64 (Figura 43A). También se detecta una pequeña población de

receptores intracelulares que se localizan en el retículo endoplasmático y/o en el trans-Golgi. La señal fluorescente de estos receptores co-localiza con zonas que son marcadas con brefeldina, un compuesto fluorescente que marca estos organelos (Figura 43B y Video 4)

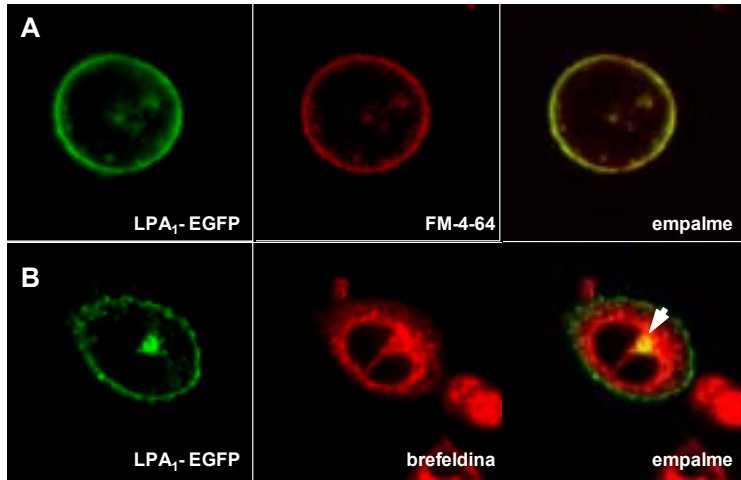
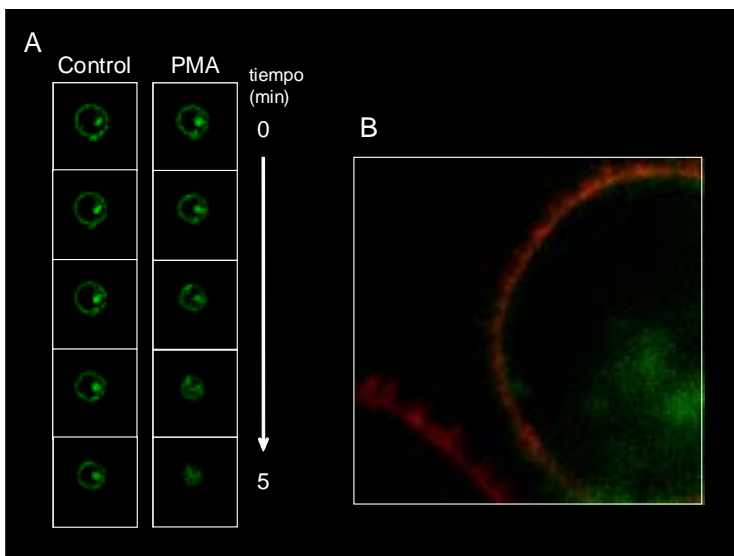


Figura 43. Localización subcelular del receptor LPA₁-EGFP. **A** Imágenes de microscopía confocal que muestran al receptor LPA₁-EGFP (verde) y al marcador de membrana FM-4-64 (rojo) co-localizados (empalme). **B** Imágenes del receptor LPA₁-EGFP (verde) y el marcador de retículo endoplasmático, la brefeldina (rojo). La mayor parte de los receptores se encuentran en la membrana celular y solo una pequeña fracción de ellos, (flecha), co-localizan con la brefeldina (empalme).

Al utilizar el activador de PKC se observa una notable disminución de la señal de fluorescencia en la membrana celular y una acumulación de ésta en puntos alrededor del núcleo (Figuras 44A y 45E). El proceso visualizado en tiempo real muestra que la internalización ocurre rápidamente (Figura 44A y Video 5 y 6). La localización intracelular del receptor se comprobó al aplicar el FM-4-64 al finalizar los 5 minutos de estimulación con el PMA (Figura 44B).

Figura 44. Internalización del receptor LPA₁-EGFP inducida por PMA en las células C9. **A** Secuencia de imágenes de microscopía confocal que muestran al receptor LPA₁-EGFP en células no estimuladas (Control) o tratadas con 1µM de PMA (PMA). En el tiempo cero la mayor parte de los receptores se encuentran en la membrana celular, transcurridos 5 minutos su localización es intracelular. **B** Una imagen a mayor aumento de una células estimulada con PMA y después tratada con FM-4-64 (empalme).



De forma similar, el LPA también induce la internalización del receptor LPA₁-EGFP (Figura 45G y Video 7). En las células que expresan solamente a la EGFP la señal de fluorescencia se detecta en toda la célula incluyendo el núcleo (Figura 45A y C) y no se observó cambio en su distribución en respuesta al PMA (Figura 45B) ni al LPA (Figura 45CH). Todos estos datos demuestran una correlación temporal entre la fosforilación, desensibilización e internalización de receptor LPA₁.

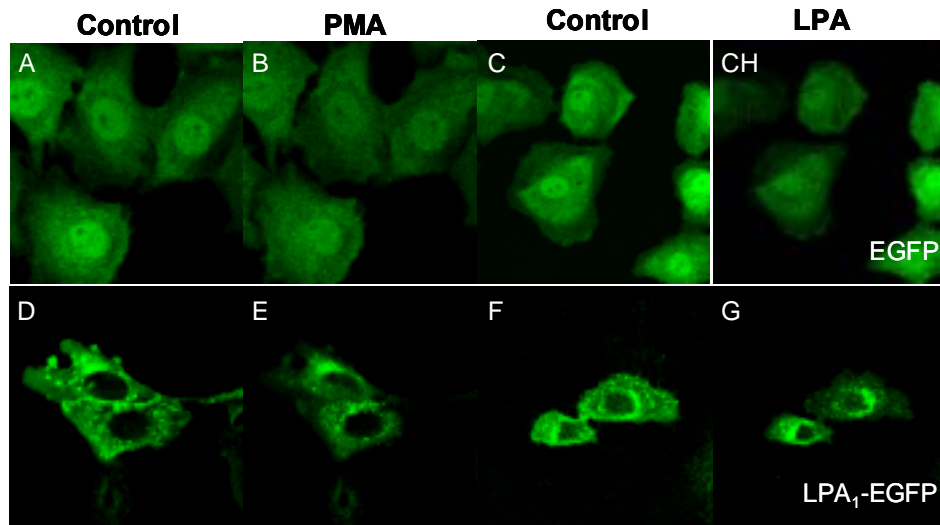


Figura 45. Internalización del receptor LPA₁-EGFP. Imágenes de las células C9 que expresan de forma estable la proteína EGFP sola (panel superior) o el receptor LPA₁-EGFP (panel inferior), sin estímulo (control) o estimuladas durante 5 minutos con 1 μ M de PMA (PMA) o 1 μ M de LPA (LPA).

6. Discusión y conclusiones

Nuestro principal interés fue estudiar la regulación funcional de los receptores para LPA en células de mamífero que los expresaran de forma endógena, por lo que utilizamos la línea celular epitelial de hígado de rata C9, la cual había mostrado movilización de calcio intracelular en respuesta a LPA [150]. Los resultados obtenidos confirman la presencia de receptores de membrana para ácido lisofosfatídico acoplados funcionalmente a proteínas G en las células C9. En esta línea celular, el LPA inhibe a la adenilato ciclasa e induce la producción de fosfatos de inositol, además de incrementar transitoriamente la concentración intracelular de calcio.

Durante mucho tiempo se pensó que la activación de fosfolipasas (PL) y la producción de fosfatos de inositol era llevada a cabo exclusivamente por la proteína Gq [162], la cual activaba a la proteína PLC β . Actualmente está bien establecido que tanto la subunidad α de las proteínas Gq, como las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas Gi, pueden activar a las PLC β y γ , generar IPs e inducir la movilización intracelular de calcio por vaciamiento de almacenes intracelulares [163-168].

En estas células, el LPA ejerce sus acciones activando tanto a proteínas G sensibles como insensibles a la toxina pertussis, pero son las proteínas sensibles (Gi) las que principalmente están actuando en la señalización del LPA. El acoplamiento funcional de los receptores para LPA con la proteína Gi fue confirmado por su acción inhibitoria sobre los niveles de AMPc. La habilidad del LPA para activar a las proteínas Gi en estas células es consistente con reportes previos en otros tipos celulares [11,13,169].

El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ puede generarse, además, por la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales. Esta entrada de calcio puede ocurrir por dos vías. La primera ocurre a través de canales tipo SOC (store-operated Ca^{2+} channel), que son canales de Ca^{2+} activados por el vaciamiento de reservorios intracelulares [170,171]; éstos pueden ser TRPCs (transient receptor potential cation channels) o pueden ser CRACs (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel) [172]. La otra vía ocurre a través de canales de Ca^{2+} tipo L. Algunos receptores pueden activar la entrada de Ca^{2+} a través de este tipo de canales, ya que pueden ser activados por cinasas, segundos mensajeros o alguna de las subunidades de las proteínas G [173-175]. Estudios previos han demostrado que este tipo de canales están presentes en estas células ya que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$

inducida por bradicinina es parcialmente bloqueada por nitrendipina y nifedipina [121]

El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el LPA en este tipo celular tiene dos componentes. Uno de ellos proviene de la liberación de calcio del retículo endoplasmático a través de la activación de los receptores para IP₃; el segundo muy probablemente corresponde a la entrada de Ca^{2+} extracelular. Sin embargo es necesaria evidencia experimental que compruebe la procedencia de este último.

La respuesta en calcio inducida por el LPA fue bloqueada por completo en células C9 estimuladas previamente con PMA, un activador directo de la PKC. Tal acción es específica para la respuesta del LPA (ninguna otra señal activada por un GPCR se bloquea completamente) y no puede ser atribuida al vaciamiento de los reservorios intracelulares de calcio o al deterioro celular, ya que la estimulación subsiguiente con un agente diferente, como la angiotensina II, induce la movilización de calcio intracelular. La acción del PMA fue bloqueada con el pretratamiento con inhibidores de PKC (bisindolil maleimida I o estaurosporina), así como por el tratamiento crónico con PMA, demostrando que la señal del LPA en estas células es regulada por la activación de una isoforma de PKC sensible a PMA (α β γ δ ϵ θ ν η ó μ). Mas aún, los ensayos de unión de [³⁵S]GTP γ S sugieren que la activación de la PKC induce el desacoplamiento funcional del receptor con las proteína G. El PMA hace que la unión de GTP γ S en respuesta al LPA disminuya a niveles semejantes a los de las células preincubadas con toxina pertussis, condición en la que la activación de la proteína G_i no ocurre.

Los resultados de los ensayos de unión de GTP γ S mostraron que el PMA reduce significativamente la unión inducida por el LPA, pero no la bloquea completamente como hace con su señal de Ca^{2+} . Una idea que ha surgido en el campo de estudio de la regulación de los GPCRs es que la fosforilación de un receptor podría estar cambiando el acoplamiento del receptor de un tipo de proteína G a otro diferente [21,139]. Estos datos podrían sugerir que el PMA bloquea el acoplamiento de los receptores para LPA a algunas proteínas G (G_i, G_q) pero podría permitir el acoplamiento con otras (G_{12/13}) no detectables por las pruebas funcionales que realizamos.

La cuantificación e identificación de los subtipos de receptores para LPA por métodos farmacológicos es extremadamente difícil debido a la unión inespecífica de los radioligandos, y a que los agonistas y antagonistas selectivos para estos receptores apenas

están siendo desarrollados [127,176,177]. Por lo anterior, el análisis de los subtipos de receptores para LPA que se expresan en las células C9 se realizó por RT-PCR.

Determinamos que las células C9 expresan dos de los tres subtipos de receptores para LPA pertenecientes a la familia de los Edg: el receptor LPA₁ y el receptor LPA₂. Mientras la fase final de este trabajo experimental estaba en proceso, se publicó la existencia de un cuarto receptor para LPA que no pertenece a la familia de los Edg: el LPA₄ [125]. Se analizó por RT-PCR la presencia de este receptor en las células C9 y se confirmó su expresión en ellas.

Se intentó, sin éxito, la inmunoprecipitación de los receptores para LPA endógenos utilizando anticuerpos comerciales y anticuerpos generados en nuestro laboratorio. Dos razones principales podrían explicar nuestro fracaso: 1) una baja densidad de receptores para LPA en estas células, 2) los anticuerpos, a pesar de ser eficientes para detectar a los receptores en ensayos de tipo Western blot, no son capaces de inmunoprecipitarlos. Para librar esta dificultad generamos una proteína de fusión del receptor LPA₁ con la variante “enhanced” de la proteína verde fluorescente (EGFP). La adición de la proteína EGFP al extremo carboxilo del receptor LPA₁ nos da la posibilidad de inmunoprecipitar al receptor con anticuerpos policlonales comerciales anti-EGFP. El receptor LPA₁-EGFP se transfectó en las células C9 para mantener el mismo fondo o contexto celular; además, se demostró que era funcional y conservaba las características de señalización y desensibilización de los receptores endógenos.

El receptor LPA₁ fusionado a la proteína EGFP nos permitió la detección directa del receptor LPA₁ fosforilado. La proteína de fusión aparece como una única banda fosforilada de aproximadamente 90 kDa. El peso estimado para la proteína de fusión es de 67 kDa. El receptor LPA₁ tiene dos sitios probables de glucosilación, la Asn²⁰ y la Asn³⁵. El que la proteína de fusión no migre en el peso esperado se puede deber a que se encuentre glucosilada y sea esta modificación postraducciona la que genera el retardamiento electroforético del receptor. La identidad de la banda se confirmó utilizando anticuerpos comerciales que reconocen al receptor.

La fosforilación del receptor correlaciona con su desensibilización. El uso de inhibidores de PKC disminuye dramáticamente la fosforilación del receptor LPA₁-EGFP inducido por PMA. Existen reportes previos de que el PMA es capaz de bloquear la

señalización del LPA [8,149]. Sin embargo, esos estudios se realizaron cuando no se había descrito receptor alguno para el LPA. Este es el primer reporte que demuestra la asociación de ambos procesos: la fosforilación del receptor de membrana y la desensibilización de la señal del LPA. Además, nuestros datos indican que la activación de la PKC participa en ambos fenómenos.

Se ha establecido que la tercera asa intracelular y el extremo carboxilo de los GPCRs son los sitios blanco de regulación por fosforilación en estos receptores [143]. Ambos fragmentos del receptor LPA₁ fueron analizados con diferentes programas que predicen sitios probables de fosforilación por diversas cinasas. Los resultados muestran cuatro sitios probables de fosforilación por PKC: la Thr²³⁶, la Ser³¹², la Thr³²¹ y la Ser³⁴¹ [178]. Si estos residuos son en realidad fosforilados y el significado funcional de su fosforilación queda por determinarse.

Existe gran cantidad de evidencia que asocia la fosforilación de los GPCRs con su desensibilización [145,150,179] y el papel de PKC en la modulación de la función de los GPCRs ha sido extensivamente documentado [121,180,181]. Nuestros estudios de microscopía confocal mostraron que el PMA induce un decremento rápido y claro en la cantidad de receptores de membrana, sugiriendo que la activación de la PKC puede jugar un papel importante en la internalización del receptor. Esto es consistente con los resultados obtenidos por otros grupos [182].

A pesar de que el efecto del PMA es claro cuando se compara la fosforilación basal del receptor LPA₁-EGFP, la intensidad de la señal es mucho menor que la inducida por el LPA. Nuestros resultados indican que los receptores LPA₁ ocupados por el agonista son fosforilados y desensibilizados. Los inhibidores de PKC no evitan la fosforilación del receptor LPA₁ inducida por el propio LPA. Estos datos indican que la PKC está participando de forma predominante en la regulación heteróloga del receptor LPA₁ y no así en la regulación homóloga del receptor. En este último proceso podrían estar involucradas las GRKs, como se ha observado para otros GPCRs, pero esto queda por ser definido experimentalmente. El hecho de que la fosforilación del receptor LPA₁ inducida por el agonista sea mucho más intensa que la inducida por el PMA y ambas generen la desensibilización del receptor, sugiere que la fosforilación del receptor inducida por el agonista podría estar haciendo más que el solo apagar su señal.

En el presente trabajo demostramos que la activación de otros GPCRs expresados en forma endógena en las células C9, como son los receptores para angiotensina II, puede también inducir la fosforilación del receptor LPA₁. Varios reportes han documentado la importancia de la regulación cruzada entre los receptores acoplados a la misma o diferentes vías de señalización [145,148,183]. Esta regulación cruzada resulta de suma importancia cuando se considera en un contexto fisiológico, en donde las células están constantemente expuestas a mezclas de mensajeros presentes en el medio extracelular. Hay una extensa variedad de vías de señalización que participan en tal comunicación cruzada [121,144,181].

7. Conclusiones

Nuestros datos indican que la activación de la PKC por el PMA induce la fosforilación del receptor LPA₁, que este efecto está asociado a la desensibilización e internalización del receptor, y que el receptor LPA₁ puede ser fosforilado a consecuencia tanto de la estimulación con su agonista, como a través de la activación de receptores no relacionados, participando la PKC principalmente en esta última forma de desensibilización (Figura 46).

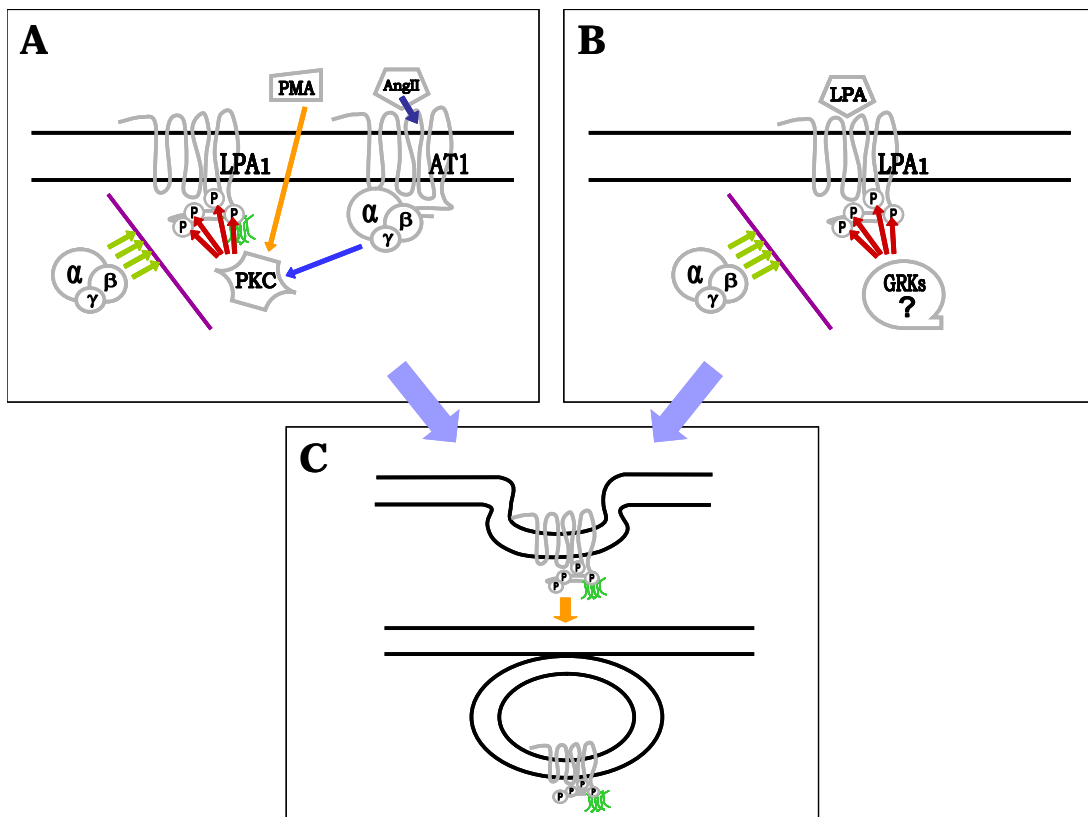


Figura 46. Regulación del receptor LPA₁ por fosforilación. **A** El PMA activa a la PKC y ésta fosforila al receptor LPA₁ evitando su señalización. Agonistas de otros GPCRs, como la angiotensina II, pueden inducir la fosforilación del receptor por PKC. **B** El propio agonista también induce la fosforilación del receptor LPA₁, muy probablemente por GRKs. **C** El receptor LPA₁ fosforilado es internalizado.

8. Perspectivas

8.1. Desensibilización, fosforilación e internalización de los receptores

LPA₂, LPA₃ y LPA₄

La existencia de diferentes subtipos de receptores para LPA (al menos cuatro reportados hasta el momento) podría proveer a la célula de vías redundantes de señalización para funciones esenciales. Sin embargo, lo que ocurre con mayor frecuencia en la naturaleza es que, cuando existen diferentes subtipos de receptores para un mismo ligando, las propiedades de activación, señalización y regulación difieren entre ellos. Datos preliminares parecen apoyar la idea de que los receptores para LPA, al menos los pertenecientes a la familia de los Edgs, presentan claras diferencias en cuanto a su susceptibilidad a ser fosforilados en respuesta al PMA o a su propio ligando LPA. En el laboratorio se cuenta ya con las proteínas de fusión de los receptores LPA₂₋₄, fusionados a la proteína EGFP, lo que permitirá hacer los estudios de fosforilación, localización subcelular e internalización de tales receptores. (Figura 47).

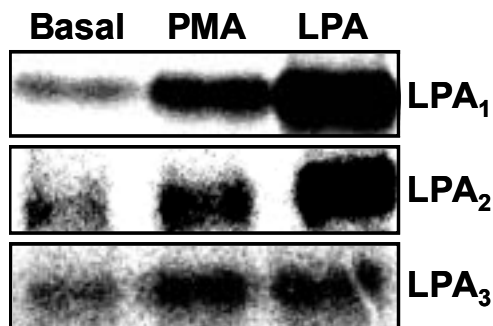


Figura 47. Fosforilación de los Edgs inducida por PMA y LPA. Los receptores LPA₁ y LPA₂ presentan patrones de fosforilación similares. Ambos son fosforilados en respuesta a 1 μ M de PMA, y lo son en mayor grado en respuesta a 1 μ M de LPA. El LPA₁ es, de los tres, el que presenta la mayor fosforilación inducida por el agonista. El receptor LPA₃ parece ser el menos susceptible de ser fosforilado y ambos estímulos lo hacen casi con la misma intensidad.

La fosforilación y desensibilización de los receptores para LPA tienen gran importancia fisiológica, dado que la persistente actividad de los receptores para LPA participa en la génesis de condiciones patológicas.

8.2. Participación de la 3^a asa y el extremo COOH en la regulación por fosforilación del receptor LPA₁

Se sabe que los sitios fosforilados en el proceso de desensibilización de los GPCRs se encuentran generalmente en la tercera asa intracelular y en el extremo carboxilo [184]. Para evaluar la contribución al proceso de desensibilización de los sitios presentes en cada uno de estos fragmentos del receptor LPA₁ se plantean varias estrategias:

a) La clonación de estos fragmentos en vectores de expresión en mamíferos que nos permitirán sobre expresar cada uno de los fragmentos en las células C9 y con ello competir la fosforilación y desensibilización del receptor endógeno.

b) La construcción de proteínas de fusión de cada uno de ellos con la proteína GST (glutación-S-transferasa). Estas proteínas de fusión podrán ser producidas en *E.coli* y purificadas para ser usadas como carnada en experimentos de tipo “pull down” para identificar proteínas reguladoras que se asocien a estas porciones del receptor.

Actualmente se cuenta ya con ambas proteínas de fusión (GST-LPA₁COOH y GST-LPA₁3^a) y se trabaja en su subclonación en plásmidos de expresión en mamífero (pcDNA3). Figura 48

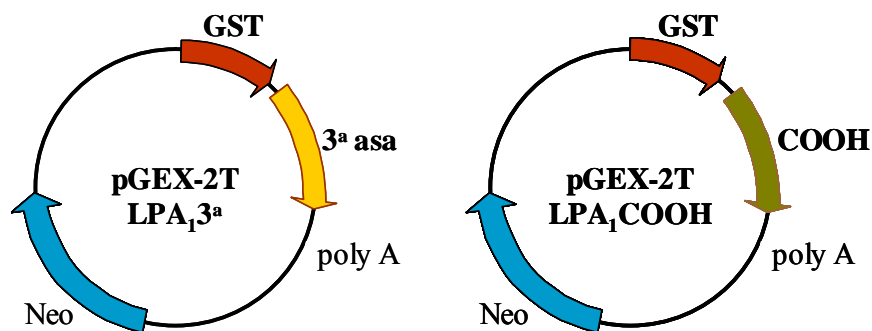


Figura 48. Vectores pGEX-2T-LPA₁3^a y pGEX-2T-LPA₁COOH. La tercera asa intracelular (3^a) y el extremo carboxilo (COOH) del receptor LPA₁ fueron clonados en el plásmido pGEX-2T para generar proteínas de fusión con la glutación-S-transferasa (GST).

c) Mutagénesis de los sitios posibles de fosforilación por PKC en la tercera asa y el extremo carboxilo del receptor LPA₁. Se diseñaron y mandaron sintetizar oligonucleótidos que permiten mutar la S²⁴⁰, la S²⁴⁴, y la S³⁴¹ a alaninas y aspárticos, y la T³²² a valina y glutámico, con el propósito de generar versiones del receptor LPA₁, que no puedan ser fosforilados (Ala y Val) o simulen estar fosforilados constitutivamente

(Asp y Glu), para realizar ensayos de desensibilización fosforilación e internalización (Tabla 3).

Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para la mutagénesis del LPA₁

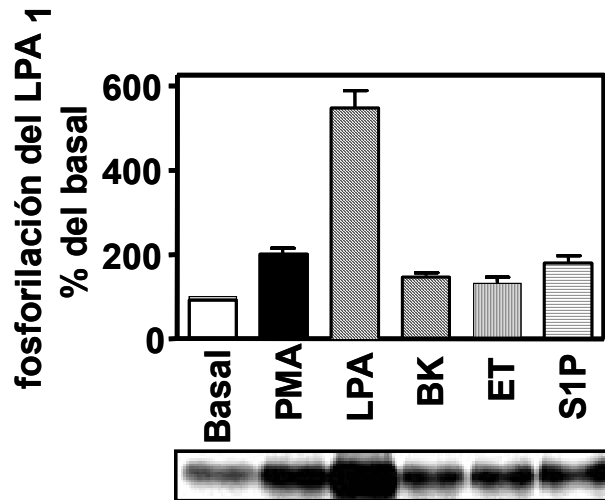
S240y4AF	CTATGAGGATGG <u>CT</u> CGGCATAGTG <u>CT</u> GGGACCCAGGAG
S240y4AR	CTCCTGGGTCCAGCACTATGCCGAGCCATCCTCATAG
S240y4DF	CTATGAGGATGG <u>A</u> TCGGCATAGTG <u>A</u> TGGACCCAGGAGGAATCG
S240y4DR	CGATTCCTCCTGGGTCCATCACTATGCCGATCCATCCTCATAG
T322VF	GATGAGCGCCG <u>TCT</u> TCAGGCAGATC
T322VR	GATCTGCCTGAAGACGGCGCTCATC
T322EF	GAGATGAGCGCCG <u>AG</u> TCAGGCAGATCCTGTGTTGC
T322ER	GCAACACAGGATCTGCCTGAACTCGGCGCTCATCTC
S341AF	CCCACGGAAGGCG <u>CT</u> GACCGCTCTGCC
S341AR	GGCAGAGCGGTCAGCGCCTTCCGTGGG
S341DF	CCCACGGAAGGCG <u>A</u> TGACCGCTCTGCC
S341DR	GGCAGAGCGGTCATCGCCTTCCGTGGG

8.3. Regulación de los receptores para LPA por otros agonistas

Nuestros datos demostraron que el receptor LPA₁ puede ser fosforilado en respuesta a la estimulación de las células C9 con angiotensina II. Datos preliminares han mostrado que otros agonistas de GPCRs también son capaces de inducir la fosforilación de este receptor (Figura 49). Por lo tanto, resultaría interesante analizar el impacto de esta fosforilación en la desensibilización e internalización del receptor.

Figura 49. Fosforilación del receptor LPA₁ inducida por diferentes estímulos.

Fosforilación del receptor LPA₁ inducida por 1 μM de PMA, 1 μM de LPA, 1 μM de bradicinina (BK), 10 nM de endotelina (ET) y 1 μM de esfingosina-1-fosfato (S1P). Se muestran graficados los promedios ± S.E.M. (n=4).



8.4. Isoformas de PKC que regulan al receptor LPA₁

Nuestros datos demostraron que una isoforma de PKC sensible a PMA (α β γ δ ϵ θ ν η ó μ) era la responsable de la fosforilación y desensibilización del receptor LPA₁. Datos preliminares, realizados en membranas extraídas de células C9, mostraron que la isoformas α se translocaliza a membrana en respuesta a PMA pero no lo hace en respuesta a LPA, mientras que la isoforma δ parece responder a la estimulación con LPA y no así a la de PMA (Figura50).

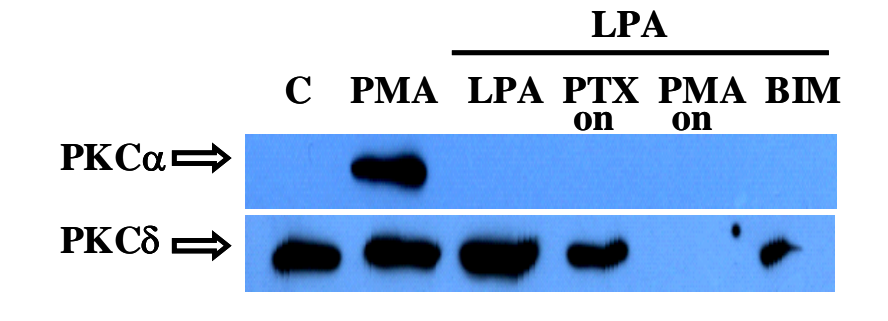


Figura 50. Isoformas α y δ de PKC. Se detectaron las isoformas de PKC α y δ , por Western blot, en muestras de membranas extraídas de las células C9 estimuladas con 1 μ M de PMA y 1 μ M de LPA en células no tratadas o pretratadas con 100 ng/mL de toxina pertussis (PTXon), 1 μ M de PMA toda la noche (TPAon) o 1 μ M de bisindolil maleimida I (BIM).

Actualmente se realizan experimentos de coimmunoprecipitación de ambas isoformas de PKC con el receptor LPA₁-EGFP y ensayos de fosforilación y desensibilización utilizando inhibidores específicos de estas dos isoformas de PKC.

8.5. Homodímeros y/ heterodímeros funcionales de los receptores para LPA

Es posible que funciones combinadas o sinérgicas de los receptores puedan existir en las células que expresan más de un subtipo. Sin embargo se ha reportado que diversos GPCRs no actúan como monómeros; cada vez cobra mas importancia la observación de que la homo y hetero oligomerización de los GPCRs tiene importantes repercusiones en su señalización [91,185,186]. Nuestros resultados experimentales mostraron que la mayoría de las células expresan al menos dos subtipos de receptores para LPA, por lo que resultaría interesante determinar si éstos forman homo o heterodímeros. Para este propósito se plantearon varias estrategias:

a) La coexpresión y coimmunoprecipitación de los subtipos de receptores para LPA. Actualmente se cuenta con las proteínas de fusión de los diferentes subtipos de receptores para LPA con diferentes etiquetas, Myc y HA fusionados al extremo amino, y la EGFP y Myc-His₆ fusionados al extremos carboxilo.

b) La coexpresión y estudios por FRET/BRET de los receptores para LPA fusionados a las proteínas EGFP, EYFP, ECFP y mRFP1. Actualmente se trabaja en la generación de estas proteínas de fusión.

9. Literatura citada

1. Tokumura, A., Maruyama, T., Fukuzawa, K. and Tsukatani, H. (1985) Effects of lysophosphatidic acids and their structural analogs on arterial blood pressure of cats. *Arzneimittelforschung*, **35**, 287-92.
2. Tokumura, A., Kume, T., Fukuzawa, K. and Tsukatani, H. (1981) Cardiovascular effects of lysophosphatidic acid and its structural analogs in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **219**, 219-24.
3. Tokumura, A., Harada, K., Fukuzawa, K. and Tsukatani, H. (1986) Involvement of lysophospholipase D in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma. *Biochim Biophys Acta*, **875**, 31-8.
4. Tokumura, A., Fukuzawa, K., Yamada, S. and Tsukatani, H. (1980) Stimulatory effect of lysophosphatidic acids on uterine smooth muscles of non-pregant rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, **245**, 74-83.
5. Tokumura, A., Fukuzawa, K. and Tsukatani, H. (1982) Contractile actions of lysophosphatidic acids with a chemically-defined fatty acyl group on longitudinal muscle from guinea-pig ileum. *J Pharm Pharmacol*, **34**, 514-6.
6. Tokumura, A., Fukuzawa, K., Isobe, J. and Tsukatani, H. (1981) Lysophosphatidic acid-induced aggregation of human and feline platelets: structure-activity relationship. *Biochem Biophys Res Commun*, **99**, 391-8.
7. Moolenaar, W.H. (1994) LPA: a novel lipid mediator with diverse biological actions. *Trends Cell Biol*, **4**, 213-9.
8. Jalink, K., van Corven, E.J. and Moolenaar, W.H. (1990) Lysophosphatidic acid, but not phosphatidic acid, is a potent Ca²⁺(+)-mobilizing stimulus for fibroblasts. Evidence for an extracellular site of action. *J Biol Chem*, **265**, 12232-9.
9. Gerrard, J.M., Clawson, C.C. and White, J.G. (1980) Lysophosphatidic acids: III. Enhancement of neutrophil chemotaxis. *Am J Pathol*, **100**, 609-18.
10. Lummen, G., Virchow, S., Rumenapp, U., Schmidt, M., Wieland, T., Otto, T., Rubben, H. and Jakobs, K.H. (1997) Identification of G protein-coupled receptors potentially stimulating migration of human transitional-cell carcinoma cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **356**, 769-76.
11. van Corven, E.J., Hordijk, P.L., Medema, R.H., Bos, J.L. and Moolenaar, W.H. (1993) Pertussis toxin-sensitive activation of p21ras by G protein-coupled receptor agonists in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1257-61.
12. van Corven, E.J., van Rijswijk, A., Jalink, K., van der Bend, R.L., van Blitterswijk, W.J. and Moolenaar, W.H. (1992) Mitogenic action of lysophosphatidic acid and phosphatidic acid on fibroblasts. Dependence on acyl-chain length and inhibition by suramin. *Biochem J*, **281** (Pt 1), 163-9.
13. van Corven, E.J., Groenink, A., Jalink, K., Eichholtz, T. and Moolenaar, W.H. (1989) Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell*, **59**, 45-54.
14. Moolenaar, W.H. and van Corven, E.J. (1990) Growth factor-like action of lysophosphatidic acid: mitogenic signalling mediated by G proteins. *Ciba Found Symp*, **150**, 99-106; discussion 106-11.
15. Perkins, L.M., Ramirez, F.E., Kumar, C.C., Thomson, F.J. and Clark, M.A. (1994) Activation of serum response element-regulated genes by lysophosphatidic acid. *Nucleic Acids Res*, **22**, 450-2.
16. Sandmann, G., Siess, W. and Essler, M. (2003) Lysophosphatidic acid is the unique platelet-activating substance in human malignant ascites. *Eur J Med Res*, **8**, 397-404.
17. Gerrard, J.M., Kindom, S.E., Peterson, D.A., Peller, J., Krantz, K.E. and White, J.G. (1979) Lysophosphatidic acids. Influence on platelet aggregation and intracellular calcium flux. *Am J Pathol*, **96**, 423-38.
18. Toews, M.L., Ustinova, E.E. and Schultz, H.D. (1997) Lysophosphatidic acid enhances contractility of isolated airway smooth muscle. *J Appl Physiol*, **83**, 1216-22.
19. Mori, M. and Tsushima, H. (2000) Activation of Rho signaling contributes to lysophosphatidic acid-induced contraction of intact ileal smooth muscle of guinea-pig. *Can J Physiol Pharmacol*, **78**, 729-36.

20. Weiner, J.A., Hecht, J.H. and Chun, J. (1998) Lysophosphatidic acid receptor gene vzg-1/lpA1/edg-2 is expressed by mature oligodendrocytes during myelination in the postnatal murine brain. *J Comp Neurol*, **398**, 587-98.
21. Baillie, G.S., Sood, A., McPhee, I., Gall, I., Perry, S.J., Lefkowitz, R.J. and Houslay, M.D. (2003) beta-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates beta-adrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 940-5.
22. Shiono, S., Kawamoto, K., Yoshida, N., Kondo, T. and Inagami, T. (1993) Neurotransmitter release from lysophosphatidic acid stimulated PC12 cells: involvement of lysophosphatidic acid receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, **193**, 667-73.
23. Renback, K., Inoue, M. and Ueda, H. (1999) Lysophosphatidic acid-induced, pertussis toxin-sensitive nociception through a substance P release from peripheral nerve endings in mice. *Neurosci Lett*, **270**, 59-61.
24. Jalink, K., van Corven, E.J., Hengeveld, T., Morii, N., Narumiya, S. and Moolenaar, W.H. (1994) Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J Cell Biol*, **126**, 801-10.
25. Jalink, K., Eichholtz, T., Postma, F.R., van Corven, E.J. and Moolenaar, W.H. (1993) Lysophosphatidic acid induces neuronal shape changes via a novel, receptor-mediated signaling pathway: similarity to thrombin action. *Cell Growth Differ*, **4**, 247-55.
26. Tigyi, G., Fischer, D.J., Sebok, A., Marshall, F., Dyer, D.L. and Miledi, R. (1996) Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: neurite-protective effects of cyclic AMP signaling. *J Neurochem*, **66**, 549-58.
27. Tigyi, G., Fischer, D.J., Sebok, A., Yang, C., Dyer, D.L. and Miledi, R. (1996) Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: control by phosphoinositide-Ca²⁺ signaling and Rho. *J Neurochem*, **66**, 537-48.
28. Manning, T.J., Jr., Rosenfeld, S.S. and Sontheimer, H. (1998) Lysophosphatidic acid stimulates actomyosin contraction in astrocytes. *J Neurosci Res*, **53**, 343-52.
29. Fang, X., Gaudette, D., Furui, T., Mao, M., Estrella, V., Eder, A., Pustilnik, T., Sasagawa, T., Lapushin, R., Yu, S., Jaffe, R.B., Wiener, J.R., Erickson, J.R. and Mills, G.B. (2000) Lysophospholipid growth factors in the initiation, progression, metastases, and management of ovarian cancer. *Ann N Y Acad Sci*, **905**, 188-208.
30. Budnik, L.T., Brunswig-Spickenheier, B. and Mukhopadhyay, A.K. (2003) Lysophosphatidic acid signals through mitogen-activated protein kinase-extracellular signal regulated kinase in ovarian theca cells expressing the LPA1/edg2-receptor: involvement of a nonclassical pathway? *Mol Endocrinol*, **17**, 1593-606.
31. Fang, X., Yu, S., LaPushin, R., Lu, Y., Furui, T., Penn, L.Z., Stokoe, D., Erickson, J.R., Bast, R.C., Jr. and Mills, G.B. (2000) Lysophosphatidic acid prevents apoptosis in fibroblasts via G(i)-protein-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem J*, **352 Pt 1**, 135-43.
32. Jalink, K., Moolenaar, W.H. and Van Duijn, B. (1993) Lysophosphatidic acid is a chemoattractant for Dictyostelium discoideum amoebae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1857-61.
33. Van Leeuwen, F.N., Olivo, C., Grivell, S., Giepmans, B.N., Collard, J.G. and Moolenaar, W.H. (2003) Rac activation by lysophosphatidic acid LPA1 receptors through the guanine nucleotide exchange factor Tiam1. *J Biol Chem*, **278**, 400-6.
34. van Dijk, M.C., Postma, F., Hilkmann, H., Jalink, K., van Blitterswijk, W.J. and Moolenaar, W.H. (1998) Exogenous phospholipase D generates lysophosphatidic acid and activates Ras, Rho and Ca²⁺ signaling pathways. *Curr Biol*, **8**, 386-92.
35. Sutphen, R., Xu, Y., Wilbanks, G.D., Fiorica, J., Grendys, E.C., Jr., LaPolla, J.P., Arango, H., Hoffman, M.S., Martino, M., Wakeley, K., Griffin, D., Blanco, R.W., Cantor, A.B., Xiao, Y.J. and Krischer, J.P. (2004) Lysophospholipids are potential biomarkers of ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **13**, 1185-91.
36. Mills, G.B. and Moolenaar, W.H. (2003) The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer*, **3**, 582-91.
37. van Leeuwen, F.N., Giepmans, B.N., van Meeteren, L.A. and Moolenaar, W.H. (2003) Lysophosphatidic acid: mitogen and motility factor. *Biochem Soc Trans*, **31**, 1209-12.
38. Balazs, L., Okolicany, J., Ferrebee, M., Tolley, B. and Tigyi, G. (2001) Topical application of the

- phospholipid growth factor lysophosphatidic acid promotes wound healing in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **280**, R466-72.
39. Sturm, A. and Dignass, A.U. (2002) Modulation of gastrointestinal wound repair and inflammation by phospholipids. *Biochim Biophys Acta*, **1582**, 282-8.
 40. Kingsbury, M.A., Rehen, S.K., Contos, J.J., Higgins, C.M. and Chun, J. (2003) Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding. *Nat Neurosci*, **6**, 1292-9.
 41. Haseruck, N., Erl, W., Pandey, D., Tigyi, G., Ohlmann, P., Ravanat, C., Gachet, C. and Siess, W. (2004) The plaque lipid lysophosphatidic acid stimulates platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation in whole blood: involvement of P2Y1 and P2Y12 receptors. *Blood*, **103**, 2585-92.
 42. Yoshida, K., Nishida, W., Hayashi, K., Ohkawa, Y., Ogawa, A., Aoki, J., Arai, H. and Sobue, K. (2003) Vascular remodeling induced by naturally occurring unsaturated lysophosphatidic acid in vivo. *Circulation*, **108**, 1746-52.
 43. Zhang, C., Baker, D.L., Yasuda, S., Makarova, N., Balazs, L., Johnson, L.R., Marathe, G.K., McIntyre, T.M., Xu, Y., Prestwich, G.D., Byun, H.S., Bittman, R. and Tigyi, G. (2004) Lysophosphatidic acid induces neointima formation through PPARgamma activation. *J Exp Med*, **199**, 763-74.
 44. Contos, J.J., Fukushima, N., Weiner, J.A., Kaushal, D. and Chun, J. (2000) Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13384-9.
 45. Campbell, D.S. and Holt, C.E. (2001) Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron*, **32**, 1013-26.
 46. Yuan, X.B., Jin, M., Xu, X., Song, Y.Q., Wu, C.P., Poo, M.M. and Duan, S. (2003) Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nat Cell Biol*, **5**, 38-45.
 47. Hecht, J.H., Weiner, J.A., Post, S.R. and Chun, J. (1996) Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J Cell Biol*, **135**, 1071-83.
 48. Kranenburg, O., Poland, M., van Horck, F.P., Drechsel, D., Hall, A. and Moolenaar, W.H. (1999) Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and Galpha12/13 subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction. *Mol Biol Cell*, **10**, 1851-7.
 49. Kumagai, N., Morii, N., Fujisawa, K., Nemoto, Y. and Narumiya, S. (1993) ADP-ribosylation of rho p21 inhibits lysophosphatidic acid-induced protein tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activation in cultured Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem*, **268**, 24535-8.
 50. Kumagai, N., Morii, N., Fujisawa, K., Yoshimasa, T., Nakao, K. and Narumiya, S. (1993) Lysophosphatidic acid induces tyrosine phosphorylation and activation of MAP-kinase and focal adhesion kinase in cultured Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett*, **329**, 273-6.
 51. Sawada, K., Morishige, K., Tahara, M., Ikebuchi, Y., Kawagishi, R., Tasaka, K. and Murata, Y. (2002) Lysophosphatidic acid induces focal adhesion assembly through Rho/Rho-associated kinase pathway in human ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol*, **87**, 252-9.
 52. Sakai, J., Oike, M., Hirakawa, M. and Ito, Y. (2003) Theophylline and cAMP inhibit lysophosphatidic acid-induced hyperresponsiveness of bovine tracheal smooth muscle cells. *J Physiol*, **549**, 171-80.
 53. Parizi, M., Howard, E.W. and Tomasek, J.J. (2000) Regulation of LPA-promoted myofibroblast contraction: role of Rho, myosin light chain kinase, and myosin light chain phosphatase. *Exp Cell Res*, **254**, 210-20.
 54. Hayashi, K., Takahashi, M., Nishida, W., Yoshida, K., Ohkawa, Y., Kitabatake, A., Aoki, J., Arai, H. and Sobue, K. (2001) Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids. *Circ Res*, **89**, 251-8.
 55. Ramakers, G.J. and Moolenaar, W.H. (1998) Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid. *Exp Cell Res*, **245**, 252-62.
 56. Postma, F.R., Jalink, K., Hengeveld, T., Bot, A.G., Alblas, J., de Jonge, H.R. and Moolenaar, W.H. (1996) Serum-induced membrane depolarization in quiescent fibroblasts: activation of a chloride conductance through the G protein-coupled LPA receptor. *Embo J*, **15**, 63-72.
 57. Postma, F.R., Jalink, K., Hengeveld, T., Offermanns, S. and Moolenaar, W.H. (2001) Galpha(13)

- mediates activation of a depolarizing chloride current that accompanies RhoA activation in both neuronal and nonneuronal cells. *Curr Biol*, **11**, 121-4.
58. Dubin, A.E., Bahnson, T., Weiner, J.A., Fukushima, N. and Chun, J. (1999) Lysophosphatidic acid stimulates neurotransmitter-like conductance changes that precede GABA and L-glutamate in early, presumptive cortical neuroblasts. *J Neurosci*, **19**, 1371-81.
59. van Nieuw Amerongen, G.P., Vermeer, M.A. and van Hinsbergh, V.W. (2000) Role of RhoA and Rho kinase in lysophosphatidic acid-induced endothelial barrier dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, E127-33.
60. Postma, F.R., Hengeveld, T., Alblas, J., Giepmans, B.N., Zondag, G.C., Jalink, K. and Moolenaar, W.H. (1998) Acute loss of cell-cell communication caused by G protein-coupled receptors: a critical role for c-Src. *J Cell Biol*, **140**, 1199-209.
61. Hinokio, K., Yamano, S., Nakagawa, K., Irahara, M., Kamada, M., Tokumura, A. and Aono, T. (2002) Lysophosphatidic acid stimulates nuclear and cytoplasmic maturation of golden hamster immature oocytes in vitro via cumulus cells. *Life Sci*, **70**, 759-67.
62. Verheijden, G.F., Verlaan, I., Schlessinger, J. and Moolenaar, W.H. (1990) Epidermal growth factor-induced phosphoinositide hydrolysis in permeabilized 3T3 cells: lack of guanosine triphosphate dependence and inhibition by tyrosine-containing peptides. *Cell Regul*, **1**, 615-20.
63. van der Bend, R.L., de Widt, J., van Corven, E.J., Moolenaar, W.H. and van Blitterswijk, W.J. (1992) The biologically active phospholipid, lysophosphatidic acid, induces phosphatidylcholine breakdown in fibroblasts via activation of phospholipase D. Comparison with the response to endothelin. *Biochem J*, **285 (Pt 1)**, 235-40.
64. Gohla, A., Harhammer, R. and Schultz, G. (1998) The G-protein G13 but not G12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho. *J Biol Chem*, **273**, 4653-9.
65. Itagaki, K., Kannan, K.B. and Hauser, C.J. (2005) Lysophosphatidic acid triggers calcium entry through a non-store-operated pathway in human neutrophils. *J Leukoc Biol*, **77**, 181-9.
66. Hordijk, P.L., Verlaan, I., van Corven, E.J. and Moolenaar, W.H. (1994) Protein tyrosine phosphorylation induced by lysophosphatidic acid in Rat-1 fibroblasts. Evidence that phosphorylation of map kinase is mediated by the Gi-p21ras pathway. *J Biol Chem*, **269**, 645-51.
67. Cook, S.J., Rubinfeld, B., Albert, I. and McCormick, F. (1993) RapV12 antagonizes Ras-dependent activation of ERK1 and ERK2 by LPA and EGF in Rat-1 fibroblasts. *Embo J*, **12**, 3475-85.
68. Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C. and Ullrich, A. (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, **379**, 557-60.
69. Daub, H., Wallasch, C., Lankenau, A., Herrlich, A. and Ullrich, A. (1997) Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *Embo J*, **16**, 7032-44.
70. Zwick, E., Wallasch, C., Daub, H. and Ullrich, A. (1999) Distinct calcium-dependent pathways of epidermal growth factor receptor transactivation and PYK2 tyrosine phosphorylation in PC12 cells. *J Biol Chem*, **274**, 20989-96.
71. Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C. and Ullrich, A. (1999) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*, **402**, 884-8.
72. Tigyi, G. and Miledi, R. (1992) Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem*, **267**, 21360-7.
73. Sano, T., Baker, D., Virag, T., Wada, A., Yatomi, Y., Kobayashi, T., Igarashi, Y. and Tigyi, G. (2002) Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *J Biol Chem*, **277**, 21197-206.
74. Aoki, J., Taira, A., Takanezawa, Y., Kishi, Y., Hama, K., Kishimoto, T., Mizuno, K., Saku, K., Taguchi, R. and Arai, H. (2002) Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem*, **277**, 48737-44.
75. Eichholtz, T., Jalink, K., Fahrenfort, I. and Moolenaar, W.H. (1993) The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J*, **291 (Pt 3)**, 677-80.
76. Gerrard, J.M. and Robinson, P. (1989) Identification of the molecular species of lysophosphatidic

- acid produced when platelets are stimulated by thrombin. *Biochim Biophys Acta*, **1001**, 282-5.
77. Sugiura, T., Nakane, S., Kishimoto, S., Waku, K., Yoshioka, Y. and Tokumura, A. (2002) Lysophosphatidic acid, a growth factor-like lipid, in the saliva. *J Lipid Res*, **43**, 2049-55.
 78. Hama, K., Bandoh, K., Kakehi, Y., Aoki, J. and Arai, H. (2002) Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids: possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors. *FEBS Lett*, **523**, 187-92.
 79. Tokumura, A., Miyake, M., Nishioka, Y., Yamano, S., Aono, T. and Fukuzawa, K. (1999) Production of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in human follicular fluids of In vitro fertilization patients. *Biol Reprod*, **61**, 195-9.
 80. Tigyi, G., Hong, L., Yakubu, M., Parfenova, H., Shibata, M. and Leffler, C.W. (1995) Lysophosphatidic acid alters cerebrovascular reactivity in piglets. *Am J Physiol*, **268**, H2048-55.
 81. Kiselyov, K., Xu, X., Mozhayeva, G., Kuo, T., Pessah, I., Mignery, G., Zhu, X., Birnbaumer, L. and Muallem, S. (1998) Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature*, **396**, 478-82.
 82. Westermann, A.M., Havik, E., Postma, F.R., Beijnen, J.H., Dalesio, O., Moolenaar, W.H. and Rodenhuis, S. (1998) Malignant effusions contain lysophosphatidic acid (LPA)-like activity. *Ann Oncol*, **9**, 437-42.
 83. Xiao, Y.J., Schwartz, B., Washington, M., Kennedy, A., Webster, K., Belinson, J. and Xu, Y. (2001) Electrospray ionization mass spectrometry analysis of lysophospholipids in human ascitic fluids: comparison of the lysophospholipid contents in malignant vs nonmalignant ascitic fluids. *Anal Biochem*, **290**, 302-13.
 84. Schumacher, K.A., Classen, H.G. and Spath, M. (1979) Platelet aggregation evoked in vitro and in vivo by phosphatidic acids and lysoderivatives: identity with substances in aged serum (DAS). *Thromb Haemost*, **42**, 631-40.
 85. Simon, M.F., Chap, H. and Douste-Blazy, L. (1982) Human platelet aggregation induced by 1-alkyl-lysophosphatidic acid and its analogs: a new group of phospholipid mediators? *Biochem Biophys Res Commun*, **108**, 1743-50.
 86. Watson, S.P., McConnell, R.T. and Lapetina, E.G. (1985) Decanoyl lysophosphatidic acid induces platelet aggregation through an extracellular action. Evidence against a second messenger role for lysophosphatidic acid. *Biochem J*, **232**, 61-6.
 87. Mauco, G., Chap, H., Simon, M.F. and Douste-Blazy, L. (1978) Phosphatidic and lysophosphatidic acid production in phospholipase C- and thrombin-treated platelets. Possible involvement of a platelet lipase. *Biochimie*, **60**, 653-61.
 88. Zheng, Y., Kong, Y. and Goetzl, E.J. (2001) Lysophosphatidic acid receptor-selective effects on Jurkat T cell migration through a Matrigel model basement membrane. *J Immunol*, **166**, 2317-22.
 89. Fukami, K. and Takenawa, T. (1992) Phosphatidic acid that accumulates in platelet-derived growth factor-stimulated Balb/c 3T3 cells is a potential mitogenic signal. *J Biol Chem*, **267**, 10988-93.
 90. Pages, G., Girard, A., Jeanneton, O., Barbe, P., Wolf, C., Lafontan, M., Valet, P. and Saulnier-Blache, J.S. (2000) LPA as a paracrine mediator of adipocyte growth and function. *Ann NY Acad Sci*, **905**, 159-64.
 91. Jones, K.A., Borowsky, B., Tamm, J.A., Craig, D.A., Durkin, M.M., Dai, M., Yao, W.J., Johnson, M., Gunwaldsen, C., Huang, L.Y., Tang, C., Shen, Q., Salon, J.A., Morse, K., Laz, T., Smith, K.E., Nagarathnam, D., Noble, S.A., Branchek, T.A. and Gerald, C. (1998) GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature*, **396**, 674-9.
 92. Baker, D.L., Desiderio, D.M., Miller, D.D., Tolley, B. and Tigyi, G.J. (2001) Direct quantitative analysis of lysophosphatidic acid molecular species by stable isotope dilution electrospray ionization liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem*, **292**, 287-95.
 93. Thumser, A.E., Voysey, J.E. and Wilton, D.C. (1994) The binding of lysophospholipids to rat liver fatty acid-binding protein and albumin. *Biochem J*, **301** (Pt 3), 801-6.
 94. Goetzl, E.J., Lee, H., Azuma, T., Stossel, T.P., Turck, C.W. and Karliner, J.S. (2000) Gelsolin binding and cellular presentation of lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*, **275**, 14573-8.
 95. Tigyi, G. and Parrill, A.L. (2003) Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action. *Prog*

- Lipid Res*, **42**, 498-526.
96. Meerschaert, K., De Corte, V., De Ville, Y., Vandekerckhove, J. and Gettemans, J. (1998) Gelsolin and functionally similar actin-binding proteins are regulated by lysophosphatidic acid. *Embo J*, **17**, 5923-32.
 97. Tokumura, A., Iimori, M., Nishioka, Y., Kitahara, M., Sakashita, M. and Tanaka, S. (1994) Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta. *Am J Physiol*, **267**, C204-10.
 98. Fischer, D.J., Liliom, K., Guo, Z., Nusser, N., Virag, T., Murakami-Murofushi, K., Kobayashi, S., Erickson, J.R., Sun, G., Miller, D.D. and Tigyi, G. (1998) Naturally occurring analogs of lysophosphatidic acid elicit different cellular responses through selective activation of multiple receptor subtypes. *Mol Pharmacol*, **54**, 979-88.
 99. Sugiura, T., Nakane, S., Kishimoto, S., Waku, K., Yoshioka, Y., Tokumura, A. and Hanahan, D.J. (1999) Occurrence of lysophosphatidic acid and its alkyl ether-linked analog in rat brain and comparison of their biological activities toward cultured neural cells. *Biochim Biophys Acta*, **1440**, 194-204.
 100. Santos, W.L., Rossi, J.A., Boggs, S.D. and MacDonald, T.L. (2000) The molecular pharmacology of lysophosphatidate signaling. *Ann N Y Acad Sci*, **905**, 232-41.
 101. Jalink, K., Hengeveld, T., Mulder, S., Postma, F.R., Simon, M.F., Chap, H., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., van Blitterswijk, W.J. and Moolenaar, W.H. (1995) Lysophosphatidic acid-induced Ca²⁺ mobilization in human A431 cells: structure-activity analysis. *Biochem J*, **307** (Pt 2), 609-16.
 102. Tokumura, A., Fukuzawa, K. and Tsukatani, H. (1978) Effects of synthetic and natural lysophosphatidic acids on the arterial blood pressure of different animal species. *Lipids*, **13**, 572-4.
 103. Lynch, K.R. and Macdonald, T.L. (2001) Structure activity relationships of lysophospholipid mediators. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **64**, 33-45.
 104. Bandoh, K., Aoki, J., Taira, A., Tsujimoto, M., Arai, H. and Inoue, K. (2000) Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure-activity relationship of cloned LPA receptors. *FEBS Lett*, **478**, 159-65.
 105. Hopper, D.W., Ragan, S.P., Hooks, S.B., Lynch, K.R. and Macdonald, T.L. (1999) Structure-activity relationships of lysophosphatidic acid: conformationally restricted backbone mimetics. *J Med Chem*, **42**, 963-70.
 106. Lynch, K.R., Hopper, D.W., Carlisle, S.J., Catalano, J.G., Zhang, M. and MacDonald, T.L. (1997) Structure/activity relationships in lysophosphatidic acid: the 2-hydroxyl moiety. *Mol Pharmacol*, **52**, 75-81.
 107. Aoki, J. (2004) Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Semin Cell Dev Biol*, **15**, 477-89.
 108. Umezu-Goto, M., Kishi, Y., Taira, A., Hama, K., Dohmae, N., Takio, K., Yamori, T., Mills, G.B., Inoue, K., Aoki, J. and Arai, H. (2002) Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol*, **158**, 227-33.
 109. Tokumura, A., Majima, E., Kariya, Y., Tominaga, K., Kogure, K., Yasuda, K. and Fukuzawa, K. (2002) Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J Biol Chem*, **277**, 39436-42.
 110. Moolenaar, W.H. (2002) Lysophospholipids in the limelight: autotaxin takes center stage. *J Cell Biol*, **158**, 197-9.
 111. Siess, W., Zangl, K.J., Essler, M., Bauer, M., Brandl, R., Corrinth, C., Bittman, R., Tigyi, G. and Aepfelbacher, M. (1999) Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6931-6.
 112. van Meeteren, L.A., Ruurs, P., Christodoulou, E., Goding, J.W., Takakusa, H., Kikuchi, K., Perrakis, A., Nagano, T. and Moolenaar, W.H. (2005) Inhibition of autotaxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem*, **280**, 21155-61.
 113. Roberts, R., Sciorra, V.A. and Morris, A.J. (1998) Human type 2 phosphatidic acid phosphohydrolases. Substrate specificity of the type 2a, 2b, and 2c enzymes and cell surface activity of the 2a isoform. *J Biol Chem*, **273**, 22059-67.

114. Brindley, D.N. and Waggoner, D.W. (1998) Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases. *J Biol Chem*, **273**, 24281-4.
115. Eberhardt, C., Gray, P.W. and Tjoelker, L.W. (1997) Human lysophosphatidic acid acyltransferase. cDNA cloning, expression, and localization to chromosome 9q34.3. *J Biol Chem*, **272**, 20299-305.
116. Yamashita, A., Kawagishi, N., Miyashita, T., Nagatsuka, T., Sugiura, T., Kume, K., Shimizu, T. and Waku, K. (2001) ATP-independent fatty acyl-coenzyme A synthesis from phospholipid: coenzyme A-dependent transacylation activity toward lysophosphatidic acid catalyzed by acyl-coenzyme A:lysophosphatidic acid acyltransferase. *J Biol Chem*, **276**, 26745-52.
117. Thompson, F.J. and Clark, M.A. (1994) Purification of a lysophosphatidic acid-hydrolysing lysophospholipase from rat brain. *Biochem J*, **300 (Pt 2)**, 457-61.
118. Simon, M.F., Chap, H. and Douste-Blazy, L. (1984) Platelet aggregating activity of lysophosphatidic acids is not related to their calcium ionophore properties. *FEBS Lett*, **166**, 115-9.
119. Fernhout, B.J., Dijcks, F.A., Moolenaar, W.H. and Ruigt, G.S. (1992) Lysophosphatidic acid induces inward currents in *Xenopus laevis* oocytes; evidence for an extracellular site of action. *Eur J Pharmacol*, **213**, 313-5.
120. van der Bend, R.L., Brunner, J., Jalink, K., van Corven, E.J., Moolenaar, W.H. and van Blitterswijk, W.J. (1992) Identification of a putative membrane receptor for the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid. *Embo J*, **11**, 2495-501.
121. Garcia-Sainz, J.A. and Avendano-Vazquez, S.E. (1999) Activation of bradykinin B2 receptors increases calcium entry and intracellular mobilization in C9 liver cells. *Biochem Mol Biol Int*, **47**, 927-33.
122. Bandoh, K., Aoki, J., Hosono, H., Kobayashi, S., Kobayashi, T., Murakami-Murofushi, K., Tsujimoto, M., Arai, H. and Inoue, K. (1999) Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*, **274**, 27776-85.
123. Hla, T. and Maciag, T. (1990) Isolation of immediate-early differentiation mRNAs by enzymatic amplification of subtracted cDNA from human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **167**, 637-43.
124. Chun, J., Goetzl, E.J., Hla, T., Igarashi, Y., Lynch, K.R., Moolenaar, W., Pyne, S. and Tigyi, G. (2002) International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*, **54**, 265-9.
125. Noguchi, K., Ishii, S. and Shimizu, T. (2003) Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J Biol Chem*, **278**, 25600-6.
126. Heise, C.E., Santos, W.L., Schreihofner, A.M., Heasley, B.H., Mukhin, Y.V., Macdonald, T.L. and Lynch, K.R. (2001) Activity of 2-substituted lysophosphatidic acid (LPA) analogs at LPA receptors: discovery of a LPA1/LPA3 receptor antagonist. *Mol Pharmacol*, **60**, 1173-80.
127. Hasegawa, Y., Erickson, J.R., Goddard, G.J., Yu, S., Liu, S., Cheng, K.W., Eder, A., Bandoh, K., Aoki, J., Jarosz, R., Schrier, A.D., Lynch, K.R., Mills, G.B. and Fang, X. (2003) Identification of a phosphothionate analogue of lysophosphatidic acid (LPA) as a selective agonist of the LPA3 receptor. *J Biol Chem*, **278**, 11962-9.
128. Stam, J.C., Michiels, F., van der Kammen, R.A., Moolenaar, W.H. and Collard, J.G. (1998) Invasion of T-lymphoma cells: cooperation between Rho family GTPases and lysophospholipid receptor signaling. *Embo J*, **17**, 4066-74.
129. Sasagawa, T., Okita, M., Murakami, J., Kato, T. and Watanabe, A. (1999) Abnormal serum lysophospholipids in multiple myeloma patients. *Lipids*, **34**, 17-21.
130. Ediger, T.L., Schulte, N.A., Murphy, T.J. and Toews, M.L. (2003) Transcription factor activation and mitogenic synergism in airway smooth muscle cells. *Eur Respir J*, **21**, 759-69.
131. Shida, D., Watanabe, T., Aoki, J., Hama, K., Kitayama, J., Sonoda, H., Kishi, Y., Yamaguchi, H., Sasaki, S., Sako, A., Konishi, T., Arai, H. and Nagawa, H. (2004) Aberrant expression of lysophosphatidic acid (LPA) receptors in human colorectal cancer. *Lab Invest*, **84**, 1352-62.
132. Contos, J.J., Ishii, I., Fukushima, N., Kingsbury, M.A., Ye, X., Kawamura, S., Brown, J.H. and Chun, J. (2002) Characterization of lpa(2) (Edg4) and lpa(1)/lpa(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality

- attributable to lpa(2). *Mol Cell Biol*, **22**, 6921-9.
133. Pierce, K.L., Premont, R.T. and Lefkowitz, R.J. (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 639-50.
 134. Hall, R.A., Premont, R.T. and Lefkowitz, R.J. (1999) Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol*, **145**, 927-32.
 135. Pitcher, J.A., Freedman, N.J. and Lefkowitz, R.J. (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem*, **67**, 653-92.
 136. Freedman, N.J. and Lefkowitz, R.J. (1996) Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res*, **51**, 319-51; discussion 352-3.
 137. Benovic, J.L., Kuhn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1987) Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 8879-82.
 138. Claing, A., Laporte, S.A., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol*, **66**, 61-79.
 139. Daaka, Y., Luttrell, L.M. and Lefkowitz, R.J. (1997) Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, **390**, 88-91.
 140. Zhang, J., Ferguson, S.S., Barak, L.S., Aber, M.J., Giros, B., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (1997) Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor signaling: role of G protein-coupled receptor kinases and arrestins in receptor desensitization and resensitization. *Receptors Channels*, **5**, 193-9.
 141. Sibley, D.R., Strasser, R.H., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1985) Homologous desensitization of adenylate cyclase is associated with phosphorylation of the beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, **260**, 3883-6.
 142. Lohse, M.J., Andexinger, S., Pitcher, J., Trukawinski, S., Codina, J., Faure, J.P., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1992) Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J Biol Chem*, **267**, 8558-64.
 143. Lefkowitz, R.J. (1993) G protein-coupled receptor kinases. *Cell*, **74**, 409-12.
 144. Casas-Gonzalez, P., Ruiz-Martinez, A. and Garcia-Sainz, J.A. (2003) Lysophosphatidic acid induces alpha1B-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.
 145. Vazquez-Prado, J., Medina, L.C. and Garcia-Sainz, J.A. (1997) Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of alpha1b-adrenoceptors in Rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem*, **272**, 27330-7.
 146. Medina, L.C., Vazquez-Prado, J., Torres-Padilla, M.E., Mendoza-Mendoza, A., Cruz Munoz, M.E. and Garcia-Sainz, J.A. (1998) Crosstalk: phosphorylation of alpha1b-adrenoceptors induced through activation of bradykinin B2 receptors. *FEBS Lett*, **422**, 141-5.
 147. del Carmen Medina, L., Vazquez-Prado, J. and Garcia-Sainz, J.A. (2000) Cross-talk between receptors with intrinsic tyrosine kinase activity and alpha1b-adrenoceptors. *Biochem J*, **350 Pt 2**, 413-9.
 148. Romero-Avila, M.T., Flores-Jasso, C.F. and Garcia-Sainz, J.A. (2002) alpha1B-Adrenergic receptor phosphorylation and desensitization induced by transforming growth factor-beta. *Biochem J*, **368**, 581-7.
 149. Plevin, R., MacNulty, E.E., Palmer, S. and Wakelam, M.J. (1991) Differences in the regulation of endothelin-1- and lysophosphatidic-acid-stimulated Ins(1,4,5)P3 formation in rat-1 fibroblasts. *Biochem J*, **280 (Pt 3)**, 609-15.
 150. Garcia-Caballero, A., Olivares-Reyes, J.A., Catt, K.J. and Garcia-Sainz, J.A. (2001) Angiotensin AT(1) receptor phosphorylation and desensitization in a hepatic cell line. Roles of protein kinase c and phosphoinositide 3-kinase. *Mol Pharmacol*, **59**, 576-85.
 151. Sekura, R.D., Fish, F., Manclark, C.R., Meade, B. and Zhang, Y.L. (1983) Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem*, **258**, 14647-51.

152. Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, **260**, 3440-50.
153. Berridge, M.J., Dawson, R.M., Downes, C.P., Heslop, J.P. and Irvine, R.F. (1983) Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem J*, **212**, 473-82.
154. Brown, B.L., Albano, J.D., Ekins, R.P. and Sgherzi, A.M. (1971) *Biochem J*, **121**, 561-62.
155. Mattingly, R.R., Wasilenko, W.J., Woodring, P.J. and Garrison, J.C. (1992) Selective amplification of endothelin-stimulated inositol 1,4,5-trisphosphate and calcium signaling by v-src transformation of rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem*, **267**, 7470-77.
156. Wieland, T. and H, J.K. (1994) Measurement of receptor-stimulated guanosine 5'-O-(γ -thio) triphosphate binding by G proteins. *Methods in Enzymology*, **237**, 3-13.
157. Moller, T., Contos, J.J., Musante, D.B., Chun, J. and Ransom, B.R. (2001) Expression and function of lysophosphatidic acid receptors in cultured rodent microglial cells. *J Biol Chem*, **276**, 25946-52.
158. Cumbay, M.G. and Watts, V.J. (2004) Novel regulatory properties of human type 9 adenylate cyclase. *J Pharmacol Exp Ther*, **310**, 108-15.
159. Jones, D.T. and Reed, R.R. (1987) Molecular cloning of five GTP-binding protein cDNA species from rat olfactory neuroepithelium. *J Biol Chem*, **262**, 14241-9.
160. Iacovelli, L., Capobianco, L., D'Ancona, G.M., Picascia, A. and De Blasi, A. (2002) Regulation of lysophosphatidic acid receptor-stimulated response by G-protein-coupled receptor kinase-2 and beta-arrestin1 in FRTL-5 rat thyroid cells. *J Endocrinol*, **174**, 103-10.
161. Murph, M.M., Scaccia, L.A., Volpicelli, L.A. and Radhakrishna, H. (2003) Agonist-induced endocytosis of lysophosphatidic acid-coupled LPA1/EDG-2 receptors via a dynamin2- and Rab5-dependent pathway. *J Cell Sci*, **116**, 1969-80.
162. Sternweis, P.C. and Smrcka, A.V. (1992) Regulation of phospholipase C by G proteins. *Trends Biochem Sci*, **17**, 502-6.
163. Sternweis, P.C. and Smrcka, A.V. (1993) G proteins in signal transduction: the regulation of phospholipase C. *Ciba Found Symp*, **176**, 96-106; discussion 106-11.
164. Stehno-Bittel, L., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Perez-Terzic, C. and Clapham, D.E. (1995) The G protein beta gamma subunit transduces the muscarinic receptor signal for Ca²⁺ release in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*, **270**, 30068-74.
165. Phaneuf, S., Carrasco, M.P., Europe-Finner, G.N., Hamilton, C.H. and Lopez Bernal, A. (1996) Multiple G proteins and phospholipase C isoforms in human myometrial cells: implication for oxytocin action. *J Clin Endocrinol Metab*, **81**, 2098-103.
166. Yoshikawa, D.M., Hatwar, M. and Smrcka, A.V. (2000) G protein beta 5 subunit interactions with alpha subunits and effectors. *Biochemistry*, **39**, 11340-7.
167. Clapham, D.E. (1995) Calcium signaling. *Cell*, **80**, 259-68.
168. Litosch, I. (2002) Phosphatidic acid modulates G protein regulation of phospholipase C-beta1 activity in membranes. *Cell Signal*, **14**, 259-63.
169. Toman, R.E. and Spiegel, S. (2002) Lysophospholipid receptors in the nervous system. *Neurochem Res*, **27**, 619-27.
170. Bolotina, V.M. (2004) Store-operated channels: diversity and activation mechanisms. *Sci STKE*, **2004**, pe34.
171. Nilius, B. (2004) Store-operated Ca²⁺ entry channels: still elusive! *Sci STKE*, **2004**, pe36.
172. Ayub, K. and Hallett, M.B. (2004) The mitochondrial ADPR link between Ca²⁺ store release and Ca²⁺ influx channel opening in immune cells. *Faseb J*, **18**, 1335-8.
173. van der Heyden, M.A., Wijnhoven, T.J. and Opthof, T. (2005) Molecular aspects of adrenergic modulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels. *Cardiovasc Res*, **65**, 28-39.
174. Wickman, K. and Clapham, D.E. (1995) Ion channel regulation by G proteins. *Physiol Rev*, **75**, 865-85.
175. Zhang, M.I. and O'Neil, R.G. (1999) The diversity of calcium channels and their regulation in epithelial cells. *Adv Pharmacol*, **46**, 43-83.
176. Durieux, M.E. and Lynch, K.R. (1993) Signalling properties of lysophosphatidic acid. *Trends*

- Pharmacol Sci*, **14**, 249-54.
177. Lynch, K.R. and Macdonald, T.L. (2002) Structure-activity relationships of lysophosphatidic acid analogs. *Biochim Biophys Acta*, **1582**, 289-94.
178. Blom, N., Gammeltoft, S. and Brunak, S. (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol*, **294**, 1351-62.
179. Alcantara-Hernandez, R., Vazquez-Prado, J. and Garcia-Sainz, J.A. (2000) Protein phosphatase-protein kinase interplay modulates alpha 1b-adrenoceptor phosphorylation: effects of okadaic acid. *Br J Pharmacol*, **129**, 724-30.
180. Diviani, D., Lattion, A.L. and Cotecchia, S. (1997) Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the alpha1B-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, **272**, 28712-9.
181. Vazquez-Prado, J., Casas-Gonzalez, P. and Garcia-Sainz, J.A. (2003) G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cell Signal*, **15**, 549-57.
182. Rapacciuolo, A., Suvarna, S., Barki-Harrington, L., Luttrell, L.M., Cong, M., Lefkowitz, R.J. and Rockman, H.A. (2003) Protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation mediates beta-1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways. *J Biol Chem*, **278**, 35403-11.
183. Hadcock, J.R., Port, J.D., Gelman, M.S. and Malbon, C.C. (1992) Cross-talk between tyrosine kinase and G-protein-linked receptors. Phosphorylation of beta 2-adrenergic receptors in response to insulin. *J Biol Chem*, **267**, 26017-22.
184. Tobin, A.B. (1997) Phosphorylation of phospholipase C-coupled receptors. *Pharmacol Ther*, **75**, 135-51.
185. Devi, L.A. (2001) Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends Pharmacol Sci*, **22**, 532-7.
186. Maggio, R., Novi, F., Scarselli, M. and Corsini, G.U. (2005) The impact of G-protein-coupled receptor hetero-oligomerization on function and pharmacology. *Febs J*, **272**, 2939-46.

Apéndices

Artículo

Avendaño-Vazquez SE, Garcia-Caballero A, Garcia-Sainz JA. (2005)

Phosphorylation and desensitization of the lysophosphatidic acid receptor LPA1.

Biochem J. **385**: 677-84.

Carta del Consejo Editorial del Biochemical Journal

El trabajo fue seleccionado por el **Biochemical Journal Editorial Board** como uno de los 10 finalistas para el premio **Biochemical Journal Young Investigator Award**, durante la **12th Internacional Conference on Second Messenger and Phosphoproteins**, llevado a cabo en Montreal, Canadá del 3 al 7 de Agosto de 2004.

Resumen CANIFARMA 2004

El trabajo recibió el premio CANIFARMA 2004 en Investigación Básica.