



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

“PARTICIPACIÓN DE PKC $\alpha$  Y PKC $\beta$ I EN LA  
DESENSIBILIZACIÓN FUNCIONAL DEL  
RECEPTOR LPA $_1$  EN CÉLULAS C9”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JAVIER MARTÍNEZ ORTIZ

TUTORA

DRA. SELMA ERÉNDIRA AVENDAÑO VÁZQUEZ

2007



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM



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.

Este proyecto se realizó con el apoyo de fondos solicitados por el Dr. Jesús Adolfo García Sáinz a CONACyT (45837-Q) y DGAPA (IN200206), en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Selma Eréndira Avendaño Vázquez.

**Referencia de la tesis:**

Martínez-Ortiz J. 2007. *Participación de PKC $\alpha$  y PKC $\beta$ I en la desensibilización funcional del receptor LPA<sub>1</sub> en células C9*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, Ciudad de México.

Agradezco muy sinceramente a la Dra. Selma Eréndira Avendaño Vázquez por el tiempo invertido en la dirección y supervisión del trabajo de tesis; así como por sus enriquecedores conocimientos y experiencias personales que me compartió, y que me ayudarán a formarme como investigador.

De la misma forma mi más atento agradecimiento al Dr. Jesús Adolfo García Sáinz por su apoyo, al proporcionarme un espacio que permitió el completo desarrollo de mi trabajo; además de brindarme la posibilidad para adquirir material, equipo y reactivos que fueron esenciales para el óptimo desenvolvimiento del proyecto. Hago extenso mis agradecimientos, al reconocer el apoyo económico (beca) que me brindó durante la estancia en su laboratorio a cargo.

Asimismo agradezco los acertados comentarios de la Dra. Rocío Alcántara Hernández y de mis Sinodales.

Dedico especialmente mi tesis a mis señores padres: Sr. Javier Martínez Resendiz y Sra. Demetria Ortiz Padilla por su apoyo incesante e incondicional que me brindaron en todo momento. Sabiendo lo que significa para ustedes, les ofrezco este trabajo, como fruto de todos sus esfuerzos administrados en mí. A ustedes, gracias por todo.....los quiero mucho.

A mis hermanos Pepe, Sergio y Lupita

A mis abuelitos Paula, Guadalupe (†), Calixto y José (†)

A mis tíos paternos y maternos

A mis primos

A mis amigos Graciela, David, Hugo, Miriam, Martín (QFB), Sergio (QFB), Fabiola, Alma, Ramsés, Elia, Adriana, Jaquelin, y demás banda que falta por mencionar.

## Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Martínez Ortiz Javier 53 01 54 61 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 098118137</p>
<p>2. Datos de la tutor Dra. Selma Eréndira Avendaño Vázquez</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dr. Jesús Adolfo García Sáinz</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dra. Luisa Alvarina Alba Lois</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dra. Laura Kawasaki Watanabe</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Dra. Marina Macías Silva</p>



ÍNDICE	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS	4
GLOSARIO	5
I. Introducción.....	6
1.1 Comunicación celular.....	6
1.2 Transducción de señales.....	7
1.2.1 Receptores de membrana.....	8
1.2.2 Receptores acoplados a proteínas G.....	8
1.2.3 Proteínas G heterotriméricas.....	10
1.2.4 Proteínas efectoras y vías de señalización.....	12
1.3 Ácido lisofosfatídico.....	13
1.3.1 Lisofosfolípidos.....	13
1.3.2 Biosíntesis y degradación de LPA.....	15
1.3.3 Efectos celulares y sistémicos del LPA.....	16
1.4 Receptores de LPA.....	18
1.4.1 Tipos de receptores y vías de señalización.....	18
1.4.2 Fenotipo de los ratones “knockout” para los receptores de LPA..	19
1.5 Regulación de receptores de LPA.....	22
1.5.1 Dimerización .....	23
1.5.2 Desensibilización.....	23
1.5.3 Trans-modulación.....	25
II. Justificación y Antecedentes.....	26
III. Objetivos e Hipótesis.....	27
IV. Métodos.....	28
4.1 Materiales.....	28
4.2 Técnicas.....	29

4.2.1	Cultivo celular.....	29
4.2.2	Transfección.....	29
4.2.3	Cuantificación de Calcio intracelular.....	29
4.2.4	Cromatografía de Fosfatos de Inositol (IPs).....	30
4.2.5	Marcaje metabólico ( <sup>32</sup> P).....	30
4.2.6	Co-inmunoprecipitación.....	31
4.2.7	Western blot.....	32
4.2.8	Microscopía confocal.....	32
4.2.9	Análisis estadístico.....	32
V.	Resultados.....	33
VI.	Discusión y Conclusiones.....	41
	Literatura citada.....	47

## **RESUMEN**

El ácido lisofosfatídico (LPA) además de ser un precursor y metabolito intermediario de la síntesis de glicéridos y de fosfolípidos, es reconocido como una molécula de señalización. El LPA es un lípido bioactivo que produce múltiples efectos biológicos en diversos tipos celulares y tejidos de mamíferos, a través de sus receptores. Actualmente existen reportados cinco receptores acoplados a proteínas G para LPA (LPA<sub>1</sub>/Edg2, LPA<sub>2</sub>/Edg4, LPA<sub>3</sub>/Edg-7, LPA<sub>4</sub>/p2y9/GPR23 y LPA<sub>5</sub>/GPR92). En un trabajo previo, se describió que los esteres de forbol, como el miristoil forbol acetato (PMA), induce la desensibilización del receptor LPA<sub>1</sub>. El propósito de este trabajo fue determinar que isoforma(s) de la proteína cinasa C está(n) asociada(s) con la desensibilización heteróloga del receptor LPA<sub>1</sub> en células C9. La hispidina y el Gö6976 abaten la acción del miristoil forbol acetato, sugiriendo las participaciones de PKC clásicas en la desensibilización heteróloga del receptor LPA<sub>1</sub>. Los datos sugieren que PKC $\alpha$  y PKC $\beta$ I inducen la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub>. Asimismo se observa una asociación física de estas isoformas de PKC con el receptor LPA<sub>1</sub>.

## **ABSTRACT**

Lysophosphatidic acid besides being a precursor and intermediary metabolite in the synthesis of glycerides and phospholipids is recognized as a signalling molecule. Lysophosphatidic acid is a bioactive lipid that produces multiple biological effects in various cell lines and mammalian tissues, through its receptors. Five G-protein coupled receptors for LPA have been reported (LPA<sub>1</sub>/Edg2, LPA<sub>2</sub>/Edg4, LPA<sub>3</sub>/Edg-7, LPA<sub>4</sub>/p2y9/GPR23 y LPA<sub>5</sub>/GPR92). In a preceding report, it was described that the phorbol ester, phorbol myristate acetate (PMA), induces desensitization of receptor LPA<sub>1</sub>. The objective in this work was to determine what PKC isoforms is associated with receptor LPA<sub>1</sub> heterologous desensitization in C9 cells. Hispidin and Gö6976 decrease phorbol myristate acetate action, suggesting the participation of conventional PKC isoforms in receptor LPA<sub>1</sub> heterologous desensitization. Data suggest that PKC $\alpha$  and PKC $\beta$ I induce receptor phosphorylation. It was observed at physical association those PKC isoforms with receptor LPA<sub>1</sub>.

## ABREVIATURAS

AR	Adrenergic receptor (Receptor adrenérgico)
AC	Adenylate cyclase (Adenilil ciclase)
cAMP	cyclic Adenosine 3, 5- monophosphate (Adenosín monofosfato cíclico)
EDG	Endothelial differentiation gene (Gen de diferenciación endotelial)
EGFP	Enhancer green fluorescent protein (Proteína verde fluorescente)
ERK/MAPK	Extracellular signal-regulated kinase/ Mitogen-activated protein kinases (Proteínas cinasas activadas por mitógenos y reguladas por señales externas)
GPCRs	G-protein-coupled receptors (Receptores acoplados a proteínas G)
GRK	G-protein-coupled receptors Kinase (Cinasa de receptores acoplados a proteínas G)
IP <sub>3</sub>	Inositol 1, 4, 5-triphosphate (Inositol trisfosfato)
LP	Lysophospholipids (Lisofosfolípidos)
LPA	Lysophosphatidic acid (Ácido lisofosfatídico)
LPA <sub>1</sub>	Lysophosphatidic acid receptor 1 (Receptor 1 para LPA)
mRFP1	monomer Red fluorescent protein 1 (Proteína roja fluorescente monomérica; derivada de la proteína fluorescente "DsRed" de <i>Discosoma sp.</i> )
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase (Fosfoinositol 3 cinasa)
PKA	Protein Kinase A (Proteína cinasa A)
PKC	Protein Kinase C (Proteína cinasa C)
PLC	Phospholipase C (Fosfolipasa C)
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate (Miristoil forbol acetato)
RGS	Regulators of G protein signalling (Proteínas regulatorias de la señalización de las proteínas G)
RTK	Receptor tyrosine kinase (Receptor con actividad de Tirosina-cinasa)
S1P	Sphingosine 1-phosphate (Esfingosina 1-fosfato)

## GLOSARIO

1. Agonista.- Cualquier ligando que al unirse a su receptor, produce una respuesta funcional (inducción de la cascada de señalización intracelular), estabilizando al receptor en estado activo [Gether y Kobilka, 1998; Sánchez-Lemus y Arias-Montaño, 2004].
2. Balsas lipídicas (“lipids rafts”).- microdominios de la membrana plasmática definida por su abundancia de colesterol y glicosfingolípidos (en la cara externa de la bicapa lipídica); dicha composición lipídica resulta en gran orden y menor fluidez en comparación con otras regiones [Insel *et al.*, 2005b].
3. Proteína cinasa.- Enzima que tiene la facultad de catalizar la fosforilación de una proteína.
4. Segundo mensajero.- pequeña molécula que se forma o libera dentro de la célula, en respuesta a una señal extracelular; permitiendo la transmisión de la señal en el interior de la célula (*i.e.* cAMP, IP<sub>3</sub> y Ca<sup>2+</sup>). Se denomina como segundo mensajero, considerando al agonista como el primer mensajero. [Alberts *et al.*, 2002].
5. Señalización cruzada (“cross-talk”).- Mecanismo de regulación de las cascadas de señalización generadas por activación de los receptores, donde dos o más sistemas de señalización pueden entrecruzarse y modificarse entre sí (ya sea estimulándose o inhibiéndose) [Hill, 1998; Sánchez-Lemus y Arias-Montaño, 2004].

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Comunicación celular

Las células no viven aisladas de su entorno; al contrario, se hallan en constante interacción con su exterior. Reciben y responden a señales procedentes de su medio externo y de otras células, estableciendo así una comunicación con estos [Cooper, 2000; Lodish *et al.*, 2000]. Esta propiedad fundamental de la vida, ocurre tanto a nivel unicelular como multicelular. Los procariotas (incluyendo bacterias y arqueobacterias) y eucariotas unicelulares interactúan con su medio y con otros individuos, conservando su autonomía. En organismos multicelulares, la individualidad de cada célula se integra y coordina para regular las necesidades biológicas del organismo. Para ello, complejos mecanismos de comunicación intercelular han sido desarrollados para operar de manera óptima procesos celulares como son la proliferación, el metabolismo, la diferenciación, la sobrevivencia y el movimiento [Cooper, 2000; Alberts *et al.*, 2002]. En general, se reconocen cinco mecanismos de señalización intercelular, basados en la distancia de transmisión de las moléculas de señalización [Cooper, 2000; Alberts *et al.*, 2002]:

- a) Endocrina.- las moléculas (hormonas) son secretadas por células endocrinas especializadas, que se transportan por el torrente sanguíneo para actuar en células “blanco” situadas a distancias lejanas.
- b) Paracrina.- las moléculas liberadas por una célula, actúan en células cercanas de distinto linaje.
- c) Autocrina.- la célula responde a las moléculas que ella misma libera; incluso las moléculas pueden actuar sobre células del mismo tipo.
- d) Sináptica.- las moléculas (neurotransmisores) son liberadas por terminales nerviosas en espacios intercelulares denominados sinapsis químicas. A pesar de ser muy similar a la señalización paracrina, este tipo de señalización se caracteriza por ser más rápida y precisa, y por eso sus peculiaridades citológicas.
- e) Yuxtacrina.- las moléculas permanecen sujetas a la superficie de la célula, influyendo solo en células “blanco” que mantienen un contacto directo con la célula de señalización.

Algunos autores sugieren que las uniones abiertas (“gap junctions”) conforman otro mecanismo de señalización [Alberts *et al.*, 2002], aunque se pueden considerar como un mecanismo de señalización intracelular, por lo cual se descartará de esta clasificación.

## **1.2 Transducción de señales**

Los mecanismos de señalización dependen completamente de las características fisicoquímicas de las moléculas de señalización, así como de la exacta y compleja maquinaria proteica que cada célula posee para integrar, interpretar y responder a un conjunto de señales específico. De esta manera, la variedad de respuestas que se producen, son reflejo de la información transmitida por la plétora de moléculas de señalización, y la variación existente en cualquiera de los integrantes de esta maquinaria de señalización [Cooper, 2000; Alberts *et al.*, 2002]. Incluso dentro de un mismo tipo celular se producen distintas respuestas a una misma molécula [Alberts *et al.*, 2002].

En general, la transducción de señales se refiere a la conversión y transmisión del mensaje implícito de una señal extracelular que conduce a cambios intracelulares, que se proyectan como respuestas específicas (alteraciones en la actividad enzimática, en la actividad de un canal iónico o de la expresión génica) [Lodish *et al.*, 2000]. Este proceso de señalización se integra por una molécula de señalización (*ídem*, agonista o ligando, que corresponde al mensaje), una proteína receptora (capta y transfiere el mensaje del agonista), una o varias proteínas efectoras (realizan los ajustes bioquímicos necesarios para producir determinadas respuestas), y una o varias proteínas moduladoras (regulan la amplitud y frecuencia de las respuestas dadas por el agonista).

Inicialmente, la célula “blanco” reconoce al agonista por medio de un receptor específico, e induce la activación de varios elementos proteicos que regulan prácticamente todos los procesos celulares [Cooper, 2000]. Los agonistas pueden ser capaces de atravesar la membrana plasmática y unirse a receptores citoplasmáticos o nucleares; o unirse a receptores expuestos en la membrana plasmática. En general, los receptores intracelulares responden a moléculas hidrofóbicas (hormonas esteroides, retinoides y Vitamina D) y los receptores transmembranales unen numerosas hormonas peptídicas, neurotransmisores, factores de crecimiento y algunos fosfolípidos (*i.e.* LPA y S1P) [Cooper, 2000; Alberts *et al.*, 2002].

### *1.2.1 Receptores de membrana*

Los receptores de membrana se caracterizan por tener una o más regiones extracelulares, una o más transmembranales y zonas intracelulares. La región extracelular del receptor es el sitio al cual se une el agonista. Por otro parte, la región intracelular tiene la facultad de transmitir la señal externa a través de ciertas proteínas citoplasmáticas [Berg *et al.*, 2002]. Se distinguen cinco categorías de receptores de membrana [Cooper, 2000; Alberts *et al.*, 2002]:

- a) Canales iónicos.- son proteínas que forman un poro, que se abre o cierra en respuesta a señales eléctricas (cambios del potencial de membrana), químicas (unión de un neurotransmisor) o mecánicas (presión o estiramiento), y que provocan un cambio en la permeabilidad de la membrana plasmática (en células eléctricamente excitables). Estos receptores están involucrados en la señalización sináptica.
- b) Receptores con actividad enzimática intrínseca.- son proteínas que al ser activadas por el agonista, se induce la auto-fosforilación de sus dominios citoplasmáticos, y el reclutamiento de proteínas que median la señalización.
- c) Receptores acoplados a cinasas itinerantes.- son proteínas que al ser activadas por su agonista, promueven la activación de proteínas cinasas.
- d) Integrinas.- son proteínas que unen algunos componentes de matriz extracelular o ligandos situados en la membrana de otras células.
- e) Receptores acoplados a proteínas G.- son proteínas que al ser activadas por el agonista, producen la activación de proteínas G.

### *1.2.2 Receptores acoplados a proteínas G.*

Dentro de los receptores de membrana, los receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs) son la familia más numerosa, versátil y ubicua. Esta familia de receptores participa en la mayoría de los procesos fisiológicos en mamíferos [Lefkowitz, 2004a]. Se activan por una variedad de estímulos extracelulares que van desde proteínas, péptidos, aminoácidos, aminas, lípidos, hasta iones y fotones. [Tyndall y Sandilya, 2005]. Además del significado fisiológico, los GPCRs son patofisiológicamente importantes;



siendo “blancos” de diversos fármacos aplicados en el tratamiento de muchas enfermedades (*i.e.* hipertensión, úlcera, asma, ansiedad, alergia, cáncer, migraña y enfermedad de Parkinson) [Karnik *et al.*, 2003; Klabunde y Evers, 2005].

La amplia distribución de los GPCRs en eucariotas y procariotas (de estos últimos se conoce muy poco), hace necesaria su clasificación. El sistema de Kolakowshi agrupa a los GPCR en clases: A, B, C, D, E y F. Las primeras clases (A-C) concentran GPCRs de vertebrados; mientras que las clases D, E, F y subclase IV de la clase A reúnen GPCRs de plantas, hongos, bacterias (y arqueobacterias) e invertebrados. [Kolakowshi, 1994]. Por otra parte, el sistema GRAFS (nombre derivado de las iniciales de los representantes de cada subfamilia) solo clasifica a los GPCRs de mamíferos en subfamilias: **G**lutamato, **R**odopsina, de **A**dhesión, **F**rizzled/Taste2 y **S**ecretina. Dentro de este sistema, las subfamilias de la Rodopsina, Secretina y Glutamato, corresponden a las clases A, B y C, respectivamente. Pero, las subfamilias de Frizzled/Taste2, y de Adhesión no se incluyen en ninguna [Fredriksson *et al.*, 2003]. A pesar de la divergencia filogenética, el mecanismo de acción es similar entre los diferentes GPCRs [Fredriksson *et al.*, 2003; Eilers *et al.*, 2005; Beinborn, 2006]. Por la gran complejidad de los GPCRs y por el propósito que tiene este trabajo, solo me enfocaré a los GPCRs tipo rodopsina, categoría en donde se ubica el receptor LPA<sub>1</sub> y de la cuál se tiene mayor conocimiento.

Estructuralmente, los GPCRs se conforman por un dominio amino terminal extracelular (7-600 residuos), un dominio carboxilo terminal intracelular (12-359 residuos); y una región de siete dominios transmembranales helicoidales (TM1-TM7), ligados por tres asas intracelulares (ICL) y tres extracelulares (ECL). Se puede formar una cuarta asa citoplasmática por la palmitoilación de una cisteína del dominio carboxilo [Tyndall y Sandilya, 2005]. Entre otras características comunes (conservadas) de los GPCRs, se encuentra la presencia de: a) un puente disulfuro que enlaza al 3<sup>er</sup> dominio transmembranal (TM3) con la 2<sup>a</sup> asa extracelular (ECL2); b) un motivo DRY (Asp-Arg-Tyr) en el TM3, involucrado en el acoplamiento con las proteínas G; y c) un motivo NPxxY (Asn-Pro-x-x-Tyr) en TM7, que contribuye en la transducción de las señales extracelulares y/o en la internalización del receptor inducida por el agonista [He, *et al.*, 2001; Karnik, *et al.*, 2003; y Rosenkilde, *et al.*, 2005].

La activación del GPCR, dada por la unión del agonista en un sitio específico formado entre las asas extracelulares y dominios transmembranales, provoca el movimiento específico de los dominios TM5, TM6 y TM7 hacia un centro conformado por TM1, TM2, TM3 y TM4. Este cambio conformacional involucra modificaciones a nivel intramolecular (puentes de hidrógeno y fuerzas van der Waals) [Farrens *et al.*, 1996; Gether *et al.*, 1997; Miura *et al.*, 2003; Karnik *et al.*, 2003; Eilers *et al.*, 2005]. La nueva conformación del receptor, produce la activación de las proteínas G, a través de la 3ª asa intracelular. El carboxilo terminal, está implicado en la desensibilización por fosforilación y regulación por endocitosis de los receptores [O'Dowd *et al.*, 1988; Stefan y Blumer, 1994; Karnik *et al.*, 2003; Lefkowitz, 2004a]. Galandrin y Bouvier (1996) sugieren que los distintos patrones de cambio conformacional están determinados por la unión de diferentes agonistas. Es necesario resaltar, que aunque el mecanismo de activación del receptor es similar entre GPCRs (distintos a la subfamilia de rodopsina), existen diferencias en la asociación del agonista al receptor (unión a nivel del amino terminal, de asas extracelulares y/o de la región transmembranal) [Malherbe *et al.*, 2001; Chong *et al.*, 2002; Karnik *et al.*, 2003].

La transducción de señales de los GPCRs, no siempre es dada por las proteínas G. Se tiene evidencia de que algunos GPCRs poseen una vía de señalización independiente de proteínas G, para regular distintos procesos celulares [Schnitzler *et al.*, 1995; Seta *et al.*, 2002; Gsandtner *et al.*, 2005; Rajagopal *et al.*, 2005]. Algunos autores sugieren que las  $\beta$ -arrestinas participan en la señalización de GPCR independiente de sus proteínas G [McDonald *et al.*, 2000; Kohout *et al.*, 2001; Ahn *et al.*, 2003; Lefkowitz y Shenoy, 2005]. Incluso se han descubierto receptores membranales distintos a los GPCRs, que activan a proteínas G (*i.e.* EGF, IGF, FGF, PDGF, ZP3, CD3 $\epsilon$ ) [Patel, 2004]. Esto ha provocado la re-definición del concepto de los GPCRs, con el surgimiento de algunos términos técnicamente correctos: 7-transmembranales (7TM), heptahelicoidales o serpentinos. No obstante, el término GPCR es usado convencionalmente para referirse a estos receptores de siete dominios transmembranales que activan proteínas GTPasas heterotriméricas [Hall *et al.*, 1999; Lefkowitz, 2004a].

### 1.2.3 Proteínas G heterotriméricas.

La señalización clásica de los GPCRs esta relacionada con las proteínas G heterotriméricas [Gilman, 1987]. Existe evidencia que demuestra que un mismo GPCR se

puede asociar a varias proteínas G en distintos tipos celulares (*i.e.* receptores adrenérgicos y de LPA) [Hein *et al.*, 2005; Heck y Hofmann, 2001; Lefkowitz, 2004a]. En estado inactivo, estas proteínas están constituidas por tres subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) unidas entre sí. La interacción específica de las proteínas G con el receptor “activo” origina una disociación de la subunidad  $\alpha$  del complejo  $\beta\gamma$ . Entre los aspectos implicados en la activación de las proteínas G, se encuentran: a) un intercambio de GDP (guanosín difosfato) por GTP (guanosín trifosfato) en la subunidad  $\alpha$ , y b) una modificación post-traducciona de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (palmitoilación y acilación). La interacción GPCR-proteína G no es permanente ni prolongada. Algunos estudios indican que la dinámica de interacción del receptor  $\alpha_{2A}$ -adrenérgico con las proteínas G, está dada por un acoplamiento de colisión rápida [Hein *et al.*, 2005]. La alta eficiencia, fidelidad y rapidez que se alcanza en la interacción GPCR-proteína G, es explicado por dos modelos: a) Pre-acoplamiento del GPCR con los demás componentes de la vía de señalización, en ausencia del agonista [Neubig, 1994]; y b) Compartimentalización de estos componentes de señalización en microdominios membranales (“lipid rafts”) [Hein *et al.*, 2005; Insel *et al.*, 2005a, b].

Debe recalarse que la hidrólisis de GTP a GDP (que propiamente conduce a la re-asociación de las subunidades de la proteína G, y por lo tanto la inactivación de las proteínas G heterotriméricas) inducida por la actividad intrínseca de GTPasa de la subunidad  $\alpha$ , es regulada por proteínas reguladoras de la señalización de proteínas G (RGS; *i.e.* subfamilia B/R4, A/RZ, C/R7D/R12). En este mecanismo de regulación de la señalización de las proteínas G, también participan algunas proteínas efectoras (*i.e.* la adenilil ciclasa) [De Vries y Farquhar 1999; Patel, 2004], aunque posiblemente esto se deba a la interacción de RGS con proteínas efectoras (*e.g.* RGS2, -3, -4, -10, -12 inhiben la activación del adenilil ciclasa (AC), guanilil ciclasa (GC), PLC $\beta$  (Fosfolipasa  $\beta$ ) y/o canales de Ca<sup>2+</sup>) [Abramo-Newerly *et al.*, 2005].

Por las vías de señalización que activan, las proteínas G se han clasificado en 4 tipos: G<sub>qs</sub>, G<sub>oi/o</sub>, G<sub>oq/11</sub> y G<sub>o12/13</sub>. Entre las proteínas que activan las G<sub>qs</sub>, se encuentran la adenilil ciclasa (AC), las cinasas de tirosina Src (c-Src, Hck), la GTPasa de la tubulina y algunos canales de K<sup>+</sup>. Las proteínas G<sub>oi/o</sub> inhiben la adenilil ciclasa y algunos canales de Ca<sup>2+</sup>; y pueden activar cinasas de la familia ERK/MAPK y la familia Src (c-Src, Hck),

ciertos canales  $K^+$ , y otras proteínas como la fosfodiesterasa de guanosín monofosfato cíclico (cGMP-PDE) y la proteína activadora de la GTPasa Rap1 (Rap1GAP). Las proteínas  $G_{\alpha q/11}$ , pueden inducir la activación de isoformas de la fosfolipasa  $C\beta$  (PLC $\beta$ ), del factor intercambiador de nucleótidos de guanina p63-Rho (p63-RhoGEF) y algunos canales de  $K^+$ . Las proteínas  $G_{\alpha 12/13}$  activan a la fosfolipasa  $C\epsilon$  y  $D$ , a la proteínas fosfatasa 5 (PP5), y otras proteínas como son la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS), el factor intercambiador de nucleótidos de guanina p115-Rho (p115RhoGEF), la proteína de choque térmico HSP90 (integrante de la familia de las chaperonas), y la radixinina. Por su parte, el complejo  $G_{\beta\gamma}$  participa principalmente en la inhibición de la adenilil ciclasa clase I y en la activación de adenilil ciclasa clases II, IV y VII; asimismo puede activar a cinasas tipo PKD (Proteína cinasa D/PKC $\mu$ ), Src, JNK (Cinasa Jun N-terminal), PI3K, ciertos canales de  $K^+$ , y otras proteínas como PLC $\beta$  y los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina p14-RhoGEF y P-RexGEF [Milligan y Kostenis, 2006].

#### *1.2.4 Proteínas efectoras y vías de señalización.*

La especificidad de la vía de señalización de las proteínas G heterotriméricas, ha sido atribuida a las combinaciones selectivas de las subunidades  $G\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Son diversas las proteínas efectoras y segundos mensajeros relacionados con la activación de proteínas G. [Krumins y Gilman, 2006]. Las vías de señalización mejor caracterizadas son:

- a) Sistema de la adenilil ciclasa.- Tanto  $G_{\alpha s}$  como  $G_{\alpha i}$  participan en la regulación de la adenilil ciclasa, activándola o inhibiéndola respectivamente. Esta enzima se conforma de dos regiones transmembranales con seis segmentos cada una y dos regiones citoplasmáticas en las que se ubican los dominios catalíticos. Tras la activación de la proteína G, la adenilil ciclasa produce cAMP a partir de ATP (adenosín trifosfato). El cAMP es un segundo mensajero que activa a la proteína cinasa A (PKA). La PKA fosforila específicamente a varios sustratos en los residuos de serina o treonina [Robinson *et al.*, 1971; Ho y Sutherland, 1975; Huxley, 1999].
- b) Sistema de Fosfoinosítidos-Calcio.- Las proteínas  $G_{\alpha q/11}$  participan en la activación de la PLC $\beta$ . Esta enzima citoplasmática hidroliza el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato, dando origen a dos segundos mensajeros: inositol 1,4,5-

trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). La PLC $\gamma$  es otra isoforma que hidroliza el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato, aunque ésta se activa por receptores con actividad de cinasa intrínseca. El IP<sub>3</sub> es una molécula hidrosoluble que se une a receptores tipo canal situados en retículo endoplasmático (retículo sarcoplasmático en miocitos). Esta unión, provoca la apertura del canal, y por lo tanto la salida de Ca<sup>+2</sup> al citoplasma. El efecto del incremento de los niveles de Ca<sup>+2</sup> citoplasmático, se ejerce sobre varios sustratos; entre los que se encuentran algunas isoformas de la proteína cinasa C (PKC clásicas) [Exton, 1994; Newton, 2001]. El catión facilita la traslocación de PKC a la membrana (por incremento de la afinidad del dominio C2). Por su parte, el DAG se mantiene en la membrana plasmática activando a la familia de cinasas PKC (excepto las atípicas), al liberar el dominio catalítico del regulatorio [Newton, 2001].

### **1.3 Ácido lisofosfatídico**

Inicialmente, el ácido lisofosfatídico (LPA) solo era conocido como un precursor y metabolito en la síntesis de glicéridos y de fosfolípidos de membrana plasmática. Estudios posteriores ampliaron la descripción del papel funcional de LPA, para ser reconocido como una molécula de señalización. El LPA es el principal lípido bioactivo presente en el torrente sanguíneo, que actúa como factor de crecimiento. Este descubrimiento intensificó la investigación de los lisofosfolípidos, en especial de la S1P (esfingosina 1-fosfato) y del LPA, en los sistemas de señalización celular [Zhang *et al.*, 1991; Spiegel y Milstien, 1995; Moolenaar *et al.*, 1994 y 1999].

#### *1.3.1 Lisofosfolípidos (LPs).*

Existen muchos lípidos que actúan como ligandos de GPCRs, entre los que se encuentran el tromboxano, las prostaglandinas, los cannabinoides endógenos, el factor activador de plaquetas y los lisofosfolípidos [Howlett, 2005]. Los lisofosfolípidos son moléculas constituidas por un esqueleto de glicerol o esfingoide, al cual se unen un grupo fosfato y una cadena de ácidos grasos (saturada o insaturada). Los LPs son especies lipídicas cuantitativamente minoritarias, comparadas con fosfolípidos como la fosfatidilcolina, la esfingomiélin, y la fosfatidiletanolamina. Ese inconveniente cuantitativo es remunerado por la gran función metabólica y de señalización extracelular que desempeñan los LPs.

Entre los principales representativos de los LPs, se encuentran el LPA y la SIP [Fukushima *et al.*, 2001; Ishii *et al.*, 2004].

El LPA es el nombre genérico aplicado a compuestos que comparten una estructura monoacil-hidroxi-*sn*-glicerol-3-fosfato. La presencia de un grupo fosfato e hidroxilo, permiten que el LPA sea mucho más soluble en agua que otros fosfolípidos. Existen muchas especies de LPA, determinadas por diferencias en la cadena de ácido graso y posición de los grupos químicos en el esqueleto de glicerol. Se han encontrado especies con sustituyentes acil saturados (estearoil (18:0), palmitoil (16:0)) e insaturados (oleoil (18:1), linoleoil (18:2) y araquidonil (20:4)) [Gerrard y Robinson, 1989; Tigyi y Miledi, 1992]. Estos grupos sustituyentes pueden unirse tanto a la posición *sn*-1 como a la *sn*-2 del esqueleto de glicerol. Incluso se han descubierto ciertas especies 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) [Fischer *et al.*, 1998; Sugiura *et al.*, 1999]. La distribución en los fluidos fisiológicos y actividad de estas especies de LPA es variable. Mientras en el plasma prevalecen las especies 1-oleoil-LPA y 1-palmitoil-LPA [Tokumura *et al.*, 1994], en el líquido de ascitis domina la especie 2-acil-LPA [Xu *et al.*, 1995]. El oleoil-LPA (1-acil 18:1 LPA), es la especie más usada en la investigación científica, ya que es la más eficiente en promover las respuestas celulares [Santos *et al.*, 2000].

Se ha señalado que el fosfato del LPA es importante para su actividad. Existe evidencia de que la longitud y grado de insaturación de la cadena de ácidos grasos, también modulan la actividad del LPA [Tokumura *et al.*, 1978; Jalink *et al.*, 1995]. De esta manera, las especies de LPA de cadenas cortas (*i.e.* lauroil- y decanoil-LPA) muestran baja o nula actividad [Van Corven *et al.*, 1992; Jalink *et al.*, 1995]. La presencia de insaturaciones en la cadena de ácidos grasos, se asocia con una mayor actividad del LPA [Hopper *et al.*, 1999]. Se ha determinado que el grupo hidroxilo posicionado en *sn*-2 del glicerol, solo es importante para la solubilidad del LPA; aunque la presencia de grupos voluminosos (*i.e.* acetil) en esta posición, alteran la actividad del LPA [Jalink *et al.*, 1995; Hopper *et al.*, 1999; Lynch y Macdonald, 2001].

### 1.3.2 Biosíntesis y degradación de LPA.

Varios estudios indican que el LPA es producido por plaquetas activadas [Watson *et al.*, 1985; Tigyi y Mideli 1992; Eichholtz *et al.*, 1993], macrófagos, adipocitos, fibroblastos y células epiteliales; además de ciertos tipos celulares tumorales (*i.e.* células ováricas cancerosas) [Eichholtz *et al.*, 1993; Pages *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2001]. Muchos tipos de células generan LPA, que bien podría actuar como mediador paracrino o autocrino [Pages *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2002].

La síntesis de LPA se da a nivel extracelular. El LPA se genera a partir de los glicerofosfolípidos (GPL) en las dos vías. En suero y plasma, el GPL es convertido en fosfolípidos por una reacción de desacilación, catalizada por la fosfolipasa A (PLA). El corte de la cadena de ácido graso, depende de la fosfolipasa que participa; así, PLA1 corta el ácido graso unido al carbono de la posición uno del glicerol, y PLA2 corta el ácido graso posicionado al segundo carbono del glicerol. Finalmente la liso-PLD resuelve la síntesis de LPA [Tigyi y Parrill, 2003; Aoki, 2004]. La liso-fosfolipasa D (liso-PLD) corta el grupo polar (X) unido al fosforilo del fosfolípido generado en la primera reacción. La ectoenzima (enzima extracelular) autotaxina (ATX) o nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 2 (NPP2) es otro nombre dado a la liso-fosfolipasa D (ATX/Liso-PLD). La ATX/Liso-PLD cataliza la producción de LPAs poli-insaturados a partir de lisofosfatidilcolina (LPC) u otro LP localizado en la región externa de la membrana plasmática. La ATX/LisoPLD 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 [Umezu-Goto *et al.*, 2002; Tokumura *et al.*, 2002].

En plaquetas y células cancerosas, la fosfolipasa D (PLD) es la primera en actuar sobre el GLP, al cortar el grupo polar [puede ser colina (LPC), etanolamina (LPE) o serina (LPS)], dando origen al ácido fosfatídico (AP). Finalmente el ácido fosfatídico sufre una reacción de desacilación, catalizada por PLA1 o PLA2, generando LPA. Otros posibles procesos de síntesis de LPA son: la reducción de la acildihidroxiacetona fosfato por acción de la acil DHAP reductasa; la fosforilación del monoacilglicerol, catalizada por la monoacilglicerol cinasa [Pagès *et al.*, 2001; Brindley *et al.*, 2002]; y una reacción de esterificación del glicerol 3-fosfato, catalizada por las aciltransferasas de glicerol fosfato (GAPT) [Fukushima *et al.*, 2001]. Existe evidencia de que el LPA, también puede

ser formado a partir de lipoproteínas de baja densidad (LDL) [Siess *et al.*, 1999]. Algunos estudios sugieren que el LPA extracelular modula su biosíntesis, al reprimir la acción de la ATX [van Meeteren *et al.*, 2005]. Acerca del mecanismo regulatorio de la síntesis del LPA, se tiene poco conocimiento.

El transporte del LPA ocurre por acoplamiento extracelular con albúmina, o intracelularmente con gelsolina o con proteínas de unión de ácidos grasos (FABPs) [Pagès *et al.*, 2001]. La albúmina es necesaria para que el LPA sea soluble en el plasma sanguíneo; aunque existe evidencia que sugiere la modulación funcional del LPA por parte de la albúmina [Jalink *et al.*, 1990; Hama *et al.*, 2002]. La gelsolina desempeña un papel importante en la unión y transporte de LPA. Posiblemente, las FABPs se relacionen con el transporte de LPA a la membrana [Pagès *et al.*, 2001].

El proceso de degradación del LPA ocurre a través de tres vías principales:

- A) Desfosforilación del LPA para formar monoacilglicerol (MAG), reacción catalizada por las lípido fosfato fosfohidrolasas (LPP<sub>1-3</sub>), que pertenecen a la familia de las fosfatidato fosfatasas tipo 2 (PAP-2) [Roberts *et al.*, 1998; Brindley *et al.*, 2002].
- B) Conversión del LPA en ácido fosfatídico (PA) por acción de las LPA-aciltransferasas (LPAAT). Las LPAAT son enzimas encontradas en microsomas y membranas plasmáticas, que son cruciales en la síntesis *de novo* de glicerolípidos y renovación de fosfolípidos de membrana plasmática [Eberhardt *et al.*, 1997; Thompson y Clark, 1994].
- C) Remoción del grupo acil del esqueleto de glicerol [Tigyi y Parrill, 2003; Thompson y Clark, 1994]. 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) [Thompson y Clark, 1994].

### 1.3.3 Efectos celulares y sistémicos del LPA.

El LPA es una molécula que ejerce múltiples efectos biológicos en diversos tipos celulares y tejidos de mamíferos, dentro del rango de concentración nano y micromolar [Eichholtz *et al.*, 1993; Baker *et al.*, 2001]. Cantidades significativas de LPA extracelular



son encontradas en fluidos fisiológicos como el plasma sanguíneo [Tigyi y Miledi, 1992; Aoki *et al.*, 2002; Sano *et al.*, 2002], la saliva [Tigyi y Miledi, 1992; Eichholtz *et al.*, 1993; Sugiura *et al.*, 2002], fluido folicular [Tokumura *et al.*, 1999], fluido cerebrospinal [Tigyi *et al.*, 1995] y líquido de ascitis de pacientes de carcinoma ovárico [Xu *et al.*, 1995; Westermann *et al.*, 1998]. La concentración y las variedades de LPA son algunos de los factores que determinan los distintos efectos celulares generados por el LPA [Zheng *et al.*, 2000; Panther *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002].

Entre los efectos celulares mediados por el LPA, se encuentran: la proliferación de varios tipos celulares (incluyendo células de cáncer prostático, ovárico, tiroideo y de melanoma) [van Corven *et al.*, 1989; Tokumura *et al.*, 1994; Fang *et al.*, 2000; Gibbs *et al.*, 2000; Budnik *et al.*, 2003]; migración azarosa o dirigida (*i.e.* plaquetas, células endoteliales, fibroblastos de piel, linfocitos-T, y células tumorales); protección ante la apoptosis [Jalink *et al.*, 1993; Pietruck *et al.*, 1997; van Dijk *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 2001; Van Leeuwen *et al.*, 2003]; sobrevivencia (*e.g.* osteoblastos, células epiteliales intestinales, células mesangiales, hepatocitos, leucocitos y células de Schwann) [Fang *et al.*, 2000]; contracción de músculo liso intestinal y miofibroblastos [Toews *et al.*, 1997; Parizi *et al.*, 2000; Sakai *et al.*, 2003]; retracción neurítica, redondeo neuronal y colapso del cono de crecimiento [Jalink *et al.*, 1994; Fukushima *et al.*, 2000; Campbell y Holt, 2001]; despolarización de membrana plasmática [Dubin *et al.*, 1999; Postma *et al.*, 2001]; formación de fibras de estrés y de adhesiones focales [Kumagai *et al.*, 1993; Sawada *et al.*, 2002]; maduración de ovocitos de mamífero *in vitro* [Hinokio *et al.*, 2002]; cambios de permeabilidad vascular (células endoteliales) [van Nieuw *et al.*, 2000]; liberación de neurotransmisores (*i.e.* sustancia P en neuronas sensoriales) [Renback *et al.*, 1999]; e inducción (células de músculo liso vasculares) [Ramakers y Moolenaar, 1998; Hayashi *et al.*, 2001]; o inhibición de la diferenciación (astrocitos, gliomas, neuroblastomas y fibroblastos) [Nguyen *et al.*, 2004]. La movilización de calcio [Jalink *et al.*, 1990; Durieux *et al.*, 1992; Fueller *et al.*, 2003] es un efecto subcelular inducido por el LPA.

Entre los principales efectos sistémicos (producto de la adición de varios efectos celulares) en los que participa el LPA, se encuentran: la angiogénesis; la mielinización [Weiner *et al.*, 1998; Sugiura *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003], la neurogénesis [Chun, 1999], la cicatrización (en piel e intestino) [Balazs *et al.*, 2001; Sturm y Dignass, 2002], la progresión de algunos tipos de cáncer [Mills y Moolenaar, 2003], e interviene en

procesos patológicos como las respuestas pro-inflamatorias y aterogénicas [Siess, 2002; Zhao *et al.*, 2006].

#### 1.4 Receptores de LPA

En la última década se ha notado un aumento en el conocimiento de los receptores de lisofosfolípidos. Se ha identificado una familia de tres GPCR para LPA (LPA<sub>1, 2 y 3</sub>) y cinco para S1P (S1P<sub>1-5</sub>) [Anliker y Chun, 2004; Chun *et al.*, 2002; Lynch, 2002]; además de cinco receptores no relacionados filogenéticamente con los anteriores: dos para LPA (LPA<sub>4 y 5</sub>) [Noguchi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006] y tres para S1P (GPR<sub>3, 6 y 12</sub> que poseen actividad constitutiva) [Uhlenbrock *et al.*, 2002]. Entre otros receptores de lisofosfolípidos, se encuentran OGR (su ligando es el esfingosilfosforilcolina), GPR4 (que une a la lisofosfatidilcolina y/o el esfingosilfosforilcolina), G2A (sus ligandos son la lisofosfatidilcolina y el esfingosilfosforilcolina) y TDAG8 (que une a la psicovina, la glucopsicovina y/o la lisosulfatida), que además de unirse a su ligando son regulados por protones [Xu, 2002; Tomura *et al.*, 2005].

##### 1.4.1 Tipos de receptores y vías de señalización

La expresión ubicua de los receptores para LPA, hace suponer que las células responden de una u otra manera a este lisofosfolípido. Los diferentes efectos celulares de corto plazo del LPA mediados por sus GPCRs, son determinados por el subtipo y el nivel de expresión de los receptores [Hla *et al.*, 2001], así como de su acoplamiento a las proteínas G de distintas subunidades  $\alpha$  [Moolenaar, 1999]. A esto, cabe añadir la acciones de largo plazo mediadas por los receptores intracelulares de LPA (*i.e.* GPCR LPA<sub>1</sub> y PPAR $\gamma$  «receptor  $\gamma$  activado por peroxisomas proliferadores» localizados a nivel nuclear), de los cuales se conoce poco. Existen evidencias para sugerir un modelo de señalización de GPCRs nucleares de LPA, similar al de los GPCRs transmembranales [Gobeil *et al.*, 2003; McIntyre *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2006; Waters *et al.*, 2006].

Los GPCR de LPA, también se denominan como la familia de receptores EDG. De esta forma, el Edg-2 corresponde al LPA<sub>1</sub>, el Edg-4 al LPA<sub>2</sub>, y el Edg-7 al LPA<sub>3</sub> [An *et al.*, 1997; An *et al.*, 1998; Bandoh *et al.*, 1999]. Los p2y9/GPR23 y GPR92 reconocidos por sus calificativos de receptores “huérfanos” antes del descubrimiento de su relación con el LPA, corresponden a los receptores LPA<sub>4</sub> y LPA<sub>5</sub>, respectivamente [Noguchi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006]. El primer receptor de LPA identificado fue el

LPA<sub>1</sub>, reportado como el gen *vzg-1* (gen 1 de zona ventricular) que se expresaba en las regiones neurogénicas corticales del cerebro de ratón [Hecht *et al.*, 1996]. Los receptores de LPA se acoplan a G<sub>i/o</sub>, G<sub>q/11</sub> y G<sub>12/13</sub>, activando a la fosfolipasa C y D (que conduce al incremento de la concentración de calcio intracelular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) [Jalink *et al.*, 1990; Pietruck *et al.*, 1997; Itagaki *et al.*, 2005], la inhibición de la AC [Van Corven, *et al.*, 1989], la estimulación de la fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K), la activación de las GTPasas Rac y Rho [Saba, 2004] y la activación de las proteínas MAPK [Cook *et al.*, 1993]. En la tabla y figura A se resumen las vías de señalización de los receptores de LPA en mamíferos.

#### 1.4.2 Fenotipo de los ratones “knockout” para los receptores de LPA

Varios estudios en ratones que presentan alguna alteración de los receptores de LPA, destacan el papel patofisiológico de estos receptores. Por ello, enfermedades como la arteriosclerosis [Siess *et al.*, 1999], el asma [Toews *et al.*, 1997] y ciertos tipos de cáncer son asociados con defectos en la señalización del LPA [Xu *et al.*, 1995; Stam *et al.*, 1998; Sasawa *et al.*, 1999; Ediger *et al.*, 2003; Mills y Moolenaar, 2003]. Los ratones “knockout” para LPA<sub>1</sub> «Edg-2/LPA<sub>1</sub><sup>(-/-)</sup>» exhiben un fenotipo particular: los ratones neonatos son de reducido tamaño, con deformaciones en la región cráneo-facial, hematomas frontales, y una semi-letalidad (50%) debida a la incapacidad de amamantarse (debido a defectos olfativos); además de que no presentan daño neuropático [Contos *et al.*, 2000, 2002; Inoue *et al.*, 2004].

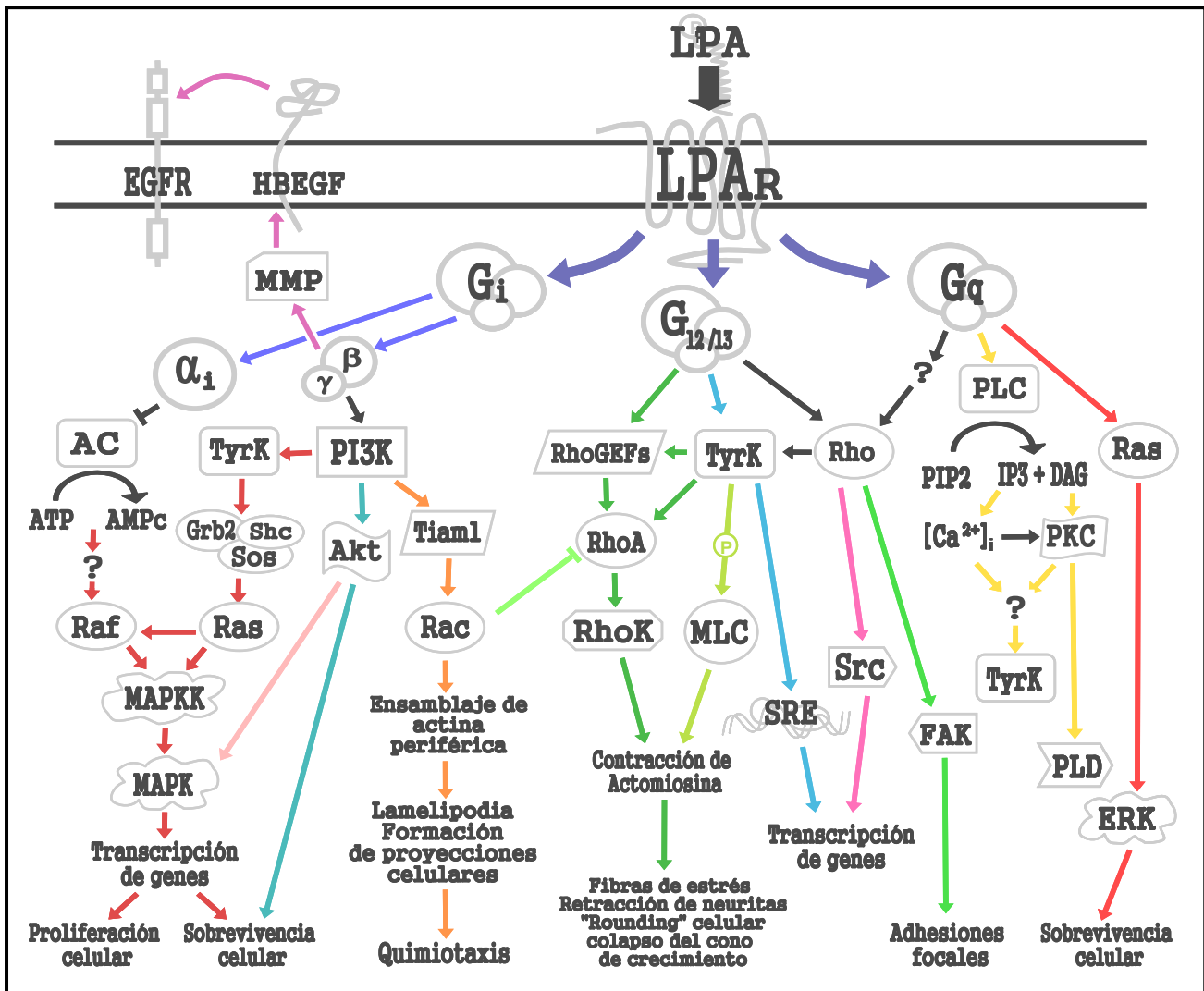
Los ratones “knockout” homocigotos para LPA<sub>2</sub> «Edg-4/LPA<sub>2</sub><sup>(-/-)</sup>» no presentan un fenotipo notable. A diferencia de los ratones Edg-2/LPA<sub>1</sub><sup>(-/-)</sup>, aquellos ratones que son doble “knockout” «LPA<sub>1</sub><sup>(-/-)</sup>/LPA<sub>2</sub><sup>(-/-)</sup>», presentan un número mayor de hematomas frontales perinatales. Los ratones doble “knockout”, presentan una abolición parcial o total de algunas respuestas mediadas por LPA; tales como la activación de PLC, AC, movilización de Ca<sup>2+</sup>, activación de Akt (también conocida como proteína cinasa B) y JNK (Cinasa Jun N-terminal) y la formación de fibras de estrés [Contos *et al.*, 2002].

**Tabla A.**  
**Receptores acoplados a proteínas G para ácido lisofosfatídico**

RECEPTOR	SINÓNIMOS	DISTRIBUCIÓN	PROTEÍNAS G	VÍAS DE SEÑALIZACIÓN	EFFECTOS	REF.
<b>LPA<sub>1</sub></b>	Edg-2, vzg1	UBÍCUA	G <sub>i/o</sub> , G <sub>q/11</sub> , G <sub>12/13</sub> , G <sub>βγ</sub>	AC↓, ERK↑, Akt↑, Rho↑, Rac↑, PLC↑, [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> ↑; Pyk2, GSK-3	INHIBE PROLIFERACIÓN, INDUCE REDONDEO CELULAR, PROCESO DE RETRACCIÓN NEURÍTICA Y SOBREVIVENCIA DE OLIGODENDROCITOS	Anliker y Chun, 2004 (A, B); Ishii <i>et al.</i> , 2004; Radeff- Huang <i>et al.</i> , 2004; Gardell <i>et al.</i> , 2006; Sayas <i>et al.</i> , 2006
<b>LPA<sub>2</sub></b>	Edg-4	UBÍCUA	G <sub>i/o</sub> , G <sub>q/11</sub> , G <sub>12/13</sub> , G <sub>βγ</sub>	AC↓, ERK↑, Akt↑, Rho↑, PLC↑, [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> ↑	INDUCE PROLIFERACIÓN Y SOBREVIVENCIA (E.G. CÉLULAS DE SCHWANN), RETRACCIÓN NEURÍTICA, REDONDEO CELULAR Y REARREGLO DE CITOESQUELETO, DESARROLLO CEREBRAL, OLFACCIÓN	zu Heringdorf y JaKobs, 2006
<b>LPA<sub>3</sub></b>	Edg-7	UBÍCUA	G <sub>i/o</sub> , G <sub>q/11</sub>	AC↓↑, ERK↑, PLC↑, [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> ↑	IMPLANTACIÓN (VÍA COX-2) Y ESPACIAMIENTO DE EMBRIÓN DE RATÓN	zu Heringdorf y JaKobs, 2007
<b>LPA<sub>4</sub></b>	p2y9/GPR23	ALTOS NIVELES EN OVARIO. NEURONAS DE HIPOCAMPO EMBRIONARIO, CÉLULAS INMORTALIZADAS DE HIPOCAMPO, PIEL Y CORAZÓN, BAJOS NIVELES EN OTROS TEJIDOS	G <sub>q/11</sub> , G <sub>s</sub> , G <sub>12/13</sub>	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> ↑, AC↑, Rho↑, ROCK↑	RETRACCIÓN NEURÍTICA, REDONDEO CELULAR Y AGREGACIÓN CELULAR ASOCIADA A N-CADERINA	Janssens <i>et al.</i> , 1997; Noguchi <i>et al.</i> , 2003; Fujiwara <i>et al.</i> , 2003; Yanagida <i>et al.</i> , 2006; Lee <i>et al.</i> , 2006 (a)
<b>LPA<sub>5</sub></b>	GPR92	ALTOS NIVELES EN CORAZÓN, INTESTINO DELGADO, BAZO, GANGLIOS DE ESPINA DORSAL Y CÉLULAS MADRES EMBRIONARIAS. BAJOS NIVELES EN OTROS TEJIDOS	G <sub>q/11</sub> , G <sub>s</sub> , G <sub>12/13</sub> , G <sub>βγ</sub>	AC↑, [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> ↑	RETRACCIÓN NEURÍTICA, FORMACIÓN DE FIBRAS DE ESTRÉS	Lee <i>et al.</i> , 2006 (b); Kotarsky <i>et al.</i> , 2006

Figura A

Vía de señalización del receptor para ácido lisofosfatídico



Los ratones “knockout” para el LPA<sub>3</sub> (Edg-7/LPA<sub>3</sub><sup>(-/-)</sup>) muestran una reducción significativa en el número de individuos por camada. La implantación embrionaria sufre retraso y anomalías en la distribución, originando un aplazamiento en el desarrollo e inclusive la mortalidad neonatal. Además, ocurre un decremento en los niveles de prostaglandinas E2 e I2 por la deficiente regulación de la ciclooxigenasa 2 (COX2) [Ye *et al.*, 2005]. Actualmente no se encuentran estudios reportados sobre delección génica de LPA<sub>4</sub>/p2y9/GPR23 y LPA<sub>5</sub>/GPR92.

La existencia de distintos subtipos de receptores para un mismo ligando en una célula, permite la atenuación, amplificación o sustitución (en ausencia de algún receptor) de la vía de señalización celular (*i.e.* mientras LPA<sub>1</sub> y LPA<sub>2</sub> pueden inhibir la adenilil ciclasa, LPA<sub>4</sub> y LPA<sub>5</sub> llegan a activar la adenilil ciclasa) [zu Heringdorf y Jakobs, 2006; Lee *et al.*, 2006 (a), (b)]. Los estudios de delección génica, permiten comprender que la señalización de los GPCRs para LPA, es sinérgica o redundante; es decir, que uno o más receptores diferentes llegan a activar la misma vía de señalización. Este mecanismo que permite la realización de una homeostasis celular es consistente con ciertos datos experimentales recabados. Los ratones “knockout” para LPA<sub>1</sub> presentan una disminución de actividades proliferativas y de migración en fibroblastos, pero no así una supresión. Es por ello que ni siquiera el ratón doble “knockout” es letal [Contos *et al.*, 2002; Kingsbury *et al.*, 2004].

### **1.5 Regulación de receptores de LPA**

La modulación de una vía de señalización es un mecanismo empleado por la célula para resolver sus propias necesidades. Esta regulación puede darse a nivel de receptor, proteínas G o proteínas efectoras, mediante la participación de proteínas que regulan la amplitud y frecuencia de las respuestas dadas por el agonista (proteínas moduladoras) [Vázquez-Prado *et al.*, 2003]. Entre las proteínas moduladoras que pueden considerarse, se encuentran las cinasas (GRK, PKA, PKC, Akt/PKB, PI3K y de la familia Src) [Benovic *et al.*, 1985; Kefalas *et al.*, 1995; Post *et al.*, 1996; Krupnick *et al.*, 1998; Kandel y Hay, 1999; Vanhaesebroeck y Alessi, 2000; Vázquez-Prado *et al.*, 2000a; García-Caballero *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2001; Dalle *et al.*, 2002; Doronin *et al.*, 2002; Hunyady *et al.*, 2002; Zamah *et al.*, 2002; Rapacciuolo *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Tesmer *et al.*, 2005], y fosfatasa (familia de PPs «fosfatasa serina/treonina») [Lefkowitz *et al.*, 1998; Shih *et al.*, 1999; Alcántara-Hernández *et al.*, 2000], las

$\beta$ -arrestinas [Lohse *et al.*, 1989; Goodman *et al.*, 1996; Shenoy y Lefkowitz, 2003], los RGS (reguladores de la señalización de proteínas G) [Ross y Wilkie, 2000; Chidiac y Roy, 2003], e inclusive otros receptores [Hadcock *et al.*, 1992; Vázquez-Prado *et al.*, 1997; Medina *et al.*, 1998; Rosenfeldt *et al.*, 2001; Hobson *et al.*, 2001]. La regulación involucra procesos de modificación transcripcional, post-transcripcional o post-traducciona l de corto o largo plazo [Vázquez-Prado *et al.*, 2003]. Siendo objeto de estudio los GPCRs de LPA, solo me enfocaré en la regulación que se produce a nivel de receptor; aunque por la compleja y estrecha relación que mantienen los elementos que conforman un sistema de señalización, se mencionarán ciertas entidades moduladoras que participan en varios sistemas de señalización.

### 1.5.1 Dimerización

Desde hace unos cuantos años se conoce que los GPCRs forman asociaciones físicas entre sí, un fenómeno definido como “dimerización” [Lodish *et al.*, 2000; Alberts *et al.*, 2002]. Este mecanismo depende de la unión del agonista y de dominios ubicados en las regiones transmembranales, amino- o carboxilo terminales de los receptores [Angers *et al.*, 2002; George *et al.*, 2002; Javitch, 2004; Petrosky *et al.*, 2005]. La homodimerización es un proceso esencial para la adecuada expresión de los GPCRs en la superficie celular [Canals *et al.*, 2004; Herrick-Davis *et al.*, 2004; Salahpour *et al.*, 2004]. La heterodimerización es un proceso que regula la función [Rocheville *et al.*, 2000; Levoye *et al.*, 2006], expresión, señalización y/o farmacología de los GPCRs [Jones *et al.*, 1998; Kaupmann *et al.*, 1998; White *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003; Terrillon y Bouvier, 2004; Bulenger *et al.*, 2005; Hague *et al.*, 2005; Prinster *et al.*, 2005]. Existe poca información en torno a la dimerización de GPCRs que involucre receptores de LPA. Los receptores de LPA forman homo- y hetero-dímeros entre sí (LPA<sub>1-3</sub>) y con otros receptores (S1P<sub>1-3</sub> y GPR4). [Zaslavsky *et al.*, 2006]. No debe descartarse que la formación de homo- o hetero-dímeros de receptores para LPA module varios de los aspectos señalados anteriormente.

### 1.5.2 Desensibilización

La desensibilización (o “taquifilaxia”) es un fenómeno adaptativo observado como la disminución gradual de la respuesta celular, por la continua estimulación de un receptor [Leeb-Lundberg *et al.*, 1987; Lefkowitz, 1998]. Un GPCR es desensibilizado de forma homóloga (específica-agonista) o heteróloga (no específica-agonista), dependiendo del

estímulo [Fergusson y Caron, 1998; Barak *et al.*, 2006]. Este mecanismo regulatorio puede involucrar eventos de fosforilación e internalización. La fosforilación es una modificación post-traducciona en el carboxilo terminal o en las asas intracelulares, mediada por GRK [Benovic *et al.*, 1987] o cinasas activadas por segundos mensajeros (*i.e.* PKA, PKC, PI3K) [González-Arenas *et al.*, 2006; Vázquez-Prado *et al.*, 1997]. La unión de moléculas de  $\beta$ -arrestinas a los GPCR fosforilados obstaculiza estéricamente la interacción proteína G-receptor y conduce a la internalización del receptor. La internalización del receptor es mediada por vesículas de clatrina o de caveolinas, suprimiendo de esta manera la vía de señalización [Lin *et al.*, 1997; Groarke *et al.*, 1999; Hanyaloglu *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2002]. El destino de un GPCR internalizado, es el reciclamiento a la membrana plasmática (re-sensibilización) o la degradación (vía endosomas y proteosomas) [Shenoy *et al.*, 2001; Lefkowitz y Whalen, 2004]. Aunque son estructuralmente diferentes, las vesículas de clatrina o caveolina sirven como microdominios que pueden integrar elementos de distintas vías de señalización [Anderson, 1998; Brodsky *et al.*, 2001]. Existe evidencia de que la unión de GRKs o de  $\beta$ -arrestinas a los GPCRs (eventos independientes del proceso de fosforilación) es suficiente para abatir la señalización [Dicker *et al.*, 1999; Mukherjee *et al.*, 1999; Yu y Hinkle, 1999].

De los GPCRs para LPA que se conocen, el LPA<sub>1</sub> es del que se tiene mayor conocimiento en torno a su desensibilización. Tras la activación de LPA<sub>1</sub> por su agonista, ocurre una desensibilización y una subsiguiente internalización. Se conoce que GRK2 y  $\beta$ -arrestina-1 participa en la desensibilización homóloga de la señalización del LPA [Iacovelli *et al.*, 2002]. En contraste, la PKC media la desensibilización heteróloga e internalización del LPA<sub>1</sub> [Avendaño-Vázquez *et al.*, 2005]. La internalización de LPA<sub>1</sub> vía  $\beta$ -arrestina-clatrina (mediada por las GTPasas Rab5 y dinamina2), es dependiente de la concentración de LPA. Asimismo ocurre un reciclamiento a la membrana plasmática [Murph *et al.*, 2003]. Se reconoce que los microdominios de membrana plasmática ricos en colesterol, son importantes para la endocitosis (al mediar el reclutamiento de  $\beta$ -arrestinas) y señalización del LPA<sub>1</sub> [Urs *et al.*, 2005]. Asimismo se conoce de la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub>, inducida por la Angiotensina II [Avendaño-Vázquez *et al.*, 2005].



### 1.5.3 Trans-modulación

Contrario a la desensibilización heteróloga, la trans-modulación es el “cross-talk” positivo o negativo entre distintos sistemas de señalización (*i.e.* GPCRs y RTK) que regula varios procesos patofisiológicos [Gschwind *et al.*, 2001]. El significado fisiológico de la trans-modulación incide en la amplificación, duración e intensidad de las señales generadas por interacciones cooperativas entre GPCR/RTK *versus* unión del ligando a su receptor y transducción de señales en los sistemas fisiológicos [Zhao *et al.*, 2006]. Varios estudios reportan que los GPCRs son capaces de transducir algunas señales mediante la activación de RTK (*i.e.* transactivación del receptor de EGF por el LPA) [Rosenfeldt *et al.*, 2001; Casas-González, *et al.*, 2003; y Sukocheva *et al.*, 2006] u otros receptores (*i.e.* GPCR o canales iónicos) [Herlitze *et al.*, 1996; Casas-González, 2000; Tomblor *et al.*, 2006]. Incluso los RTKs pueden trans-modular la actividad de otros receptores [El-Shewy *et al.*, 2006; Molina-Muñoz *et al.*, 2006; Singleton *et al.*, 2006]. Mucho se conoce acerca de la trans-modulación de RTKs (PDGFR $\beta$ , EGFR) por el LPA. La trans-modulación de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) por LPA, a través de una vía de activación de MMP (metaloproteinasas de matriz extracelular) dependiente de PKC $\delta$  [Wang *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2006]. La capacidad de los ligandos para activar MMP, resultando en el corte y liberación de HB-EGF (unión a heparina-EGF), ha sido demostrado como un evento necesario para la trans-modulación de EGFR [Prenzel *et al.*, 1999]. Existen reportes de la trans-modulación de RTKs por GPCRs independiente de MMP, que podrían emplear proteínas moduladoras como  $\beta$ -arrestina y GRK-2 [Waters *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2006].

## II. JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES

El LPA, al igual que la SIP, se ha convertido en una importante molécula de señalización. Los diversos efectos biológicos producidos por el LPA, son resultado de la señalización intracelular desencadenada por sus receptores. En la actualidad, se tienen reportados cinco GPCR de LPA: LPA<sub>1</sub>/Edg2, LPA<sub>2</sub>/Edg4, LPA<sub>3</sub>/Edg-7, LPA<sub>4</sub>/p2y9/GPR23 y LPA<sub>5</sub>/GPR92. Estudios exhaustivos han proporcionado información en torno a las vías de señalización que activa el LPA a través de sus distintos receptores; en especial para LPA<sub>1</sub> y LPA<sub>2</sub>. No obstante, poco se conoce en torno a la regulación de estos receptores.

La intrincada coordinación de las funciones de las cinasas y fosfatasas, es establecida como un mecanismo fundamental para la regulación de las funciones celulares. Las aproximadamente 500 cinasas de mamíferos son elementos clave en la regulación proteica por fosforilación [Newton, 2004]. En general, las células emplean la fosforilación de proteínas para alterar su actividad, localización, interacción con otras proteínas [Alcántara-Hernández, *et al.*, 2005], o especificidad de acoplamiento [Pawson *et al.*, 2001; Pawson, 2004]. De esta forma, la fosforilación es un instrumento regulatorio en los distintos sistemas de señalización.

La PKC cataliza la fosforilación de múltiples proteínas en residuos de serina y/o treonina, entre los que se encuentran algunos receptores cuyo efecto es la desensibilización heteróloga [Newton, 2001]. La participación de PKC en la fosforilación del LPA<sub>1</sub>, permite comprender que esta proteína se involucra en la desensibilización heteróloga de este receptor [Avendaño-Vázquez *et al.*, 2005]. Considerando la enorme participación de la PKC en los sistemas de señalización, se puede resaltar su papel en la integración de distintas vías de señalización (al igual que PKA y PI3K) [García-Sáinz *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 1998; Vázquez-Prado *et al.*, 2003].

### III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### Objetivo general

El propósito de este trabajo es determinar que isoforma(s) de PKC está(n) asociada(s) con la desensibilización heteróloga del receptor LPA<sub>1</sub> en células C9.

#### Objetivos particulares

Los objetivos particulares, derivados del anterior, son los siguientes:

- A. Observación de cambio en el efecto funcional que tiene el LPA sobre el receptor LPA<sub>1</sub>, en presencia de PMA e inhibidores específicos de PKC.
- B. Detección de la asociación de isoformas de PKC al receptor LPA<sub>1</sub>, por co-inmunoprecipitación, apoyado con el uso de inhibidores específicos de PKC.
- C. Determinación de la cinética de asociación de PKC al receptor LPA<sub>1</sub>
- D. Estimación del grado de fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub>, dada por la desensibilización heteróloga, empleando inhibidores específicos de PKC.
- E. Determinación de la cinética de fosforilación LPA<sub>1</sub> mediada por PKC.
- F. Generación de células C9 co-transfectadas establemente con el receptor LPA<sub>1</sub> fusionado a EGFP y la isoforma de PKC $\alpha$  fusionada con la mRFP1; y células C9 transfectadas con PKC $\alpha$  ó PKC $\beta$ I fusionada con la EGFP.
- G. Visualización de la co-localización de la PKC y el receptor LPA<sub>1</sub>.

#### Hipótesis

Si el PMA induce la desensibilización por fosforilación y endocitosis del receptor LPA<sub>1</sub> de las células C9; entonces alguna(s) de las isoformas de PKC sensibles a ésteres de forbol (*i.e.* isoformas clásicas y/o nuevas) participa(n) en la regulación funcional del receptor LPA<sub>1</sub>.

## IV. MÉTODOS

### 4.1 Materiales

El ácido lisofosfatídico (LPA: L- $\alpha$ -Lysophosphatidic acid [oleoyl (C18: 1, [cis]-9) (oleoyl-sn-glycero-3-phosphate)]) y el PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. Los inhibidores de PKC convencionales y nuevas: el Gö6976 [12-(2-Cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indolo(2,3-a)pyrrolo(3,4-c)-carbazole], la hispidina [6-(3,4-dihydroxystyryl)-4-hydroxy-2-pyrone], y la rottlerina (Mallotoxina) [5,7-dihydroxy-2,2-dimethyl-6-(trihydroxy-3-methyl-5-acetybenzyl)-8-cinnamoyl-1,2-chromene] se obtuvieron de Calbiochem<sup>®</sup> Biochemicals. El inhibidor general de PKC: staurosporina (*Streptomyces* sp), se obtuvo de Calbiochem<sup>®</sup> Biochemicals. El medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium 1X; con 4.5 gramos de glucosa/litro, con L-glutamina, piruvato de sodio y bicarbonato de sodio.) sin fosfatos y con fosfatos, y el medio de cultivo F-12K (1X Modificado por Kaighn; con L-glutamina y bicarbonato de sodio) se compraron a *in vitro* S.A. El suero fetal bovino, la tripsina, los antibióticos (geneticina, como antibiótico selectivo) y otros reactivos utilizados para el cultivo celular fueron obtenidos de Invitrogen. El plásmido PKC $\alpha$ -mRFP1 que expresa la proteína mRFP1 (monomer red fluorescent protein 1 derivada de *Discosoma* sp. fluorescent protein "DsRed"; Clave GENBANK: AY678264) fusionada con la PKC $\alpha$  humana (en el plásmido pcDNA3.1) fue proporcionado generosamente por el Dr. Simon M. Ameer-Beg (del Gray Cancer Institute, Mount Vernon Hospital, Northwood, Middlesex, United Kingdom) [Peter *et al.*, 2005]. La Lipofectamina<sup>™</sup> 2000 se consiguió 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 adquirió de Molecular Probes. La proteína A agarosa usada en los ensayos de inmunoprecipitación se obtuvo de Upstate Biotechnology, Inc. El anticuerpo policlonal anti Edg-2/LPA<sub>1</sub> fue comprado a Upstate Biotechnology, Inc. El anticuerpo anti-EGFP fue generado por el biólogo Christian Colín Santana, a partir de una proteína de fusión EGFP-GST. Los anticuerpos policlonales anti-PKC $\alpha$ , anti-PKC $\beta$ I y anti-PKC $\delta$  se consiguieron de Santa Cruz Biotechnology, Inc. El anticuerpo

anti-IgG se compró de Zymed<sup>®</sup>. Los reactivos de quimioluminiscencia se adquirieron de Pierce Biotechnology. El fosfato radiactivo (<sup>32</sup>P) se consiguió a PerkinElmer, Inc. El [<sup>3</sup>H] Mio-inositol se compró a Perkin Elmer Life and Analytical Science. Las columnas de intercambio iónico con resina DOWEX.

## **4.2 Técnicas**

### **4.2.1 Cultivo celular**

La línea celular epitelial de hígado de rata C9 que sobre-expresa al receptor LPA<sub>1</sub> fusionado a la EGFP (enhancer green fluorescent protein) fue generada en nuestro laboratorio [Avendaño-Vázquez *et al.*, 2005]. Las células C9 LPA<sub>1</sub>-EGFP se mantuvieron en medio Ham's F12 (Kaighn's Modification) complementado con 10% de suero fetal bovino, 100 µg/ mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina, 0.25 µg/mL de anfotericina B y 3.5mL de geneticina (G418, como antibiótico de selección), a 37° C y con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

El LPA se encuentra en el suero empleado en el medio de cultivo. Por ende, ocurre una pre-estimulación de las células, que se previene con la sustitución de medio completo sin suero (medio de ayuno), 5 a 12 horas antes del experimento.

### **4.2.2 Transfección**

Se transfectaron las células C9 LPA<sub>1</sub>-EGFP con el plásmido mRFP1-PKC $\alpha$ , y células C9 WT ("wild type"- silvestres) los plásmidos LPA<sub>1</sub>-EGFP y mRFP1-PKC $\alpha$ , EGFP-PKC $\alpha$  ó EGFP-PKC $\beta$ I, empleando Lipofectamina<sup>™</sup> 2000. Las células que expresaban las proteínas de fusión fueron seleccionadas por resistencia a geneticina (G418) y citometría de flujo usando el aparato FACS (FACS Calibur, BD Biosciences) y el software Cell Quest (BD Biosciences).

### **4.2.3 Cuantificación de Calcio intracelular**

La determinación de la concentración de calcio intracelular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, se realizó en células ayunadas e incubadas con 2.5 µM de Fura-2/AM durante una hora. La medición de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se hizo en solución buffer Krebs-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 *et al.*, [1985], usando el software de AMINCO-Bowman.

#### **4.2.4 Cromatografía de Fosfatos de Inositol (IPs)**

Para la cuantificación de IPs, la noche anterior se ayunaron las células con DMEM libre de inositoles con 1% de SFB y 3  $\mu\text{Ci/mL}$  de [ $^3\text{H}$ ] Mio-inositol por cada pozo. Las células se incubaron durante 20 min (37 °C) con una solución buffer Krebs-Ringer-HEPES (pH 7.4) con 20  $\mu\text{L/mL}$  LiCl (1M) por cada pozo. Se realizaron los correspondientes estímulos (inhibidores de PKC, LPA y/o PMA). Se detuvo la reacción por aspiración del medio y adición de 2 mL de una solución fría de cloroformo-metanol (1:2) y se mantuvo en hielo por 20 min. Se hizo la recuperación del lisado en tubos de ensayo, a los cuales se les añadió 1700  $\mu\text{L}$  de cloroformo y agua. Después de centrifugar a 3000 rpm (por 10 min), se tomó la fase superior para ser depositada en columnas de intercambio iónico DOWEX (que previamente fueron regeneradas de una condición acetato a formato). Primero se hizo una elución de glicerofosfoinositoles (GPI) con 10 mL de un buffer que contiene 5mM de borato de sodio y 60mM de formato de sodio. Esta primera elución se desechó. Posteriormente se obtuvieron inositoles totales (IPs), mediante la adición de 3 mL de buffer de elución compuesto por 0.1M ácido fórmico y 1M de formato de amonio. Se hicieron tres eluciones de IPs que fueron recuperadas en viales. Inmediatamente se les adicionó 13 mL de una solución de Centelleo (tritosisol) [Fricke, 1975]. Finalmente se realizó la cuantificación de los niveles de IPs en el aparato LS6500 Multi-purpose Scintillation Counter de Beckman Instruments, Inc.

#### **4.2.5 Marcaje metabólico ( $^{32}\text{P}$ )**

Los experimentos de marcaje metabólico se realizaron en pozos de 35 mm con una confluencia celular del 100%. Las células se incubaron durante una hora en medio DMEM sin fosfatos, en seguida se marcaron con 75  $\mu\text{Ci/mL}$  de [ $^{32}\text{P}$ ]Pi en medio DMEM sin fosfatos por 4 horas a 37°C. Se aplicaron los correspondientes estímulos (inhibidores de PKC, LPA y/o PMA), y se detuvo la estimulación por medio de dos lavados con buffer salino de fosfatos (PBS) 1X frío.

Las células se lisaron por una hora, en frío con un buffer RIPA que contiene 100 mM de cloruro de sodio, 20 mM de fluoruro de sodio, 10 mM de pirofosfato de sodio, 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 sodio e inhibidores de proteasas (20 µg/mL de leupeptina, 100 µg/mL de PMSF, 500 µg/mL de bacitracina, 50 µg/mL de inhibidor de tripsina). Los lisados celulares se centrifugaron a 14 000 rpm por 10 minutos y los sobrenadantes se incubaron (en agitación) toda la noche a 4°C con anticuerpo anti-EGFP y proteína A- Sefarosa.

Al siguiente día, se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos a 4°C, Las muestras se lavaron dos veces con buffer WB1 (50 mM de Tris HCl, 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 12 mM de desoxicolato de sodio, 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 sodio, 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 sodio, pH 7.5). Para cada lavado, las muestras se centrifugaron a 14000 rpm por 3 minutos a 4°C. Posteriormente, las muestras se desnaturalizaron añadiendo Buffer de cargado (120 mM de Tris pH 6.8, SDS 10%, glicerol, β-mercaptoetanol, 7 M de urea y 10 mg/mL de azul de bromofenol) e hirviéndolas durante 10 minutos. Las muestras se centrifugaron e inmediatamente se sometieron a una electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS al 10%. Por último los geles se secaron y expusieron por 48 horas en pantallas amplificadoras. La visualización y cuantificación de los niveles de fosforilación de los receptores LPA<sub>1</sub>, se realizó en un analizador de imágenes Typhoon 8600 (y software Typhoon Scanner Control, Versión 1.0) y utilizando el programa Image Quant (Versión 5.2).

#### **4.2.6 Co-inmunoprecipitación**

Las células cultivadas en cajas Petri de 100 mm (confluencia del 100%), se mantuvieron en medio de ayuno F12–K a 37°C toda la noche previa al experimento. Al siguiente día, se cambió el medio de ayuno por PBS 1X; y se aplicaron los correspondientes estímulos (inhibidores de PKC, LPA y/o PMA). La estimulación fue detenida por dos lavados con PBS frío. Las células fueron lisadas por una hora, en frío con un buffer RIPA. Posteriormente, los lisados celulares se recuperaron y centrifugaron a 14 000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se incubó toda la noche a 4°C con anticuerpo anti-EGFP y proteína A- Sefarosa.

Al siguiente día, las muestras fueron desnaturalizadas por la adición del mismo Buffer de cargado empleado en experimentos de marcaje metabólico. Las muestras fueron hervidas y sometidas a una electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS al 10%. Las proteínas presentes en los geles fueron electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 $\mu$ m (Bio–Rad Laboratorios).

#### **4.2.7 Western blot**

Las membranas fueron bloqueadas (1.5 horas a 37°C) con leche (baja en grasas) al 5% en buffer TBS-tween (tween 0.1%). En seguida, se incubaron toda la noche a 4°C con anti-PKC $\alpha$ , - $\beta$ I o - $\delta$  (1:1000) en TBS-tween. Al siguiente día, se lavaron 3 veces con TBS-tween, y se incubaron con anticuerpo anti-IgG en TBS-tween (1:10000), por una hora a 37°C. Finalmente, se reveló por quimioluminiscencia. La cuantificación de los niveles de asociación de PKC se logró mediante el programa Scion Image para Windows.

#### **4.2.8 Microscopía confocal**

Las células se crecieron en cajas Petri de fondo de vidrio. Previo a la estimulación, las células se mantuvieron en buffer salino de fosfatos (1X). Los estímulos fueron añadidos, mientras se colectaban las imágenes. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal Olympus<sup>®</sup>. La EGFP fue excitada con láser de argón/helio-neón a 488 nm y la fluorescencia emitida se detectó a 522 nm; y la mRFP1 se excitó a 514 nm y se detectó la emisión a 600 nm. Todas las imágenes fueron captadas por el mismo porcentaje de láser, la misma apertura de iris, la misma ganancia y una misma apertura numérica. Las imágenes se procesaron usando el programa Olympus Fluoview FV10–ASW (Versión 1.4).

#### **4.2.9 Análisis estadístico**

Los datos recabados se analizaron y graficaron mediante el software Prisma 4 para Windows (Versión 4.0) y se presentan como promedios  $\pm$  SEM. A los datos se les aplicó un análisis de varianza ANOVA One-way seguido de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni.



## V. RESULTADOS

### Efecto de Gö6976 e Hispidina en la respuesta funcional del receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP.

El receptor LPA<sub>1</sub> activa el sistema de señalización de los fosfoinosítidos-calcio [Ishii *et al.*, 2004; Avendaño-Vázquez *et al.*, 2005]. Para evaluar la desensibilización funcional del receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP por PMA, y el efecto que tienen los inhibidores específicos de PKC en la señalización del receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP, se consideraron como parámetros la producción de fosfatos de inositol y el incremento de los niveles de calcio intracelular. Los datos de  $[Ca^{2+}]_i$  muestran una casi nula respuesta al LPA con el pre-tratamiento de PMA por 5 min. (Gráfica A de fig. 1). Debe aclararse que el PMA por si mismo no produce un efecto en los niveles de  $[Ca^{2+}]_i$  [Avendaño-Vázquez *et al.*, 2005]. La acción del PMA es abatido totalmente por la staurosporina (inhibidor general de PKC) y por un pre-tratamiento de PMA por 12 horas (Gráfica B y C de fig. 1  $p < 0.05$ ). Asimismo los inhibidores Gö6976 e hispidina revierten el efecto del PMA, en un 85% y 55%, respectivamente (Gráfica D y E de fig. 1  $p < 0.05$ ). Mientras que, la rottlerina no cambia significativamente la acción del PMA (Gráfica F de fig. 1  $p < 0.05$ ).

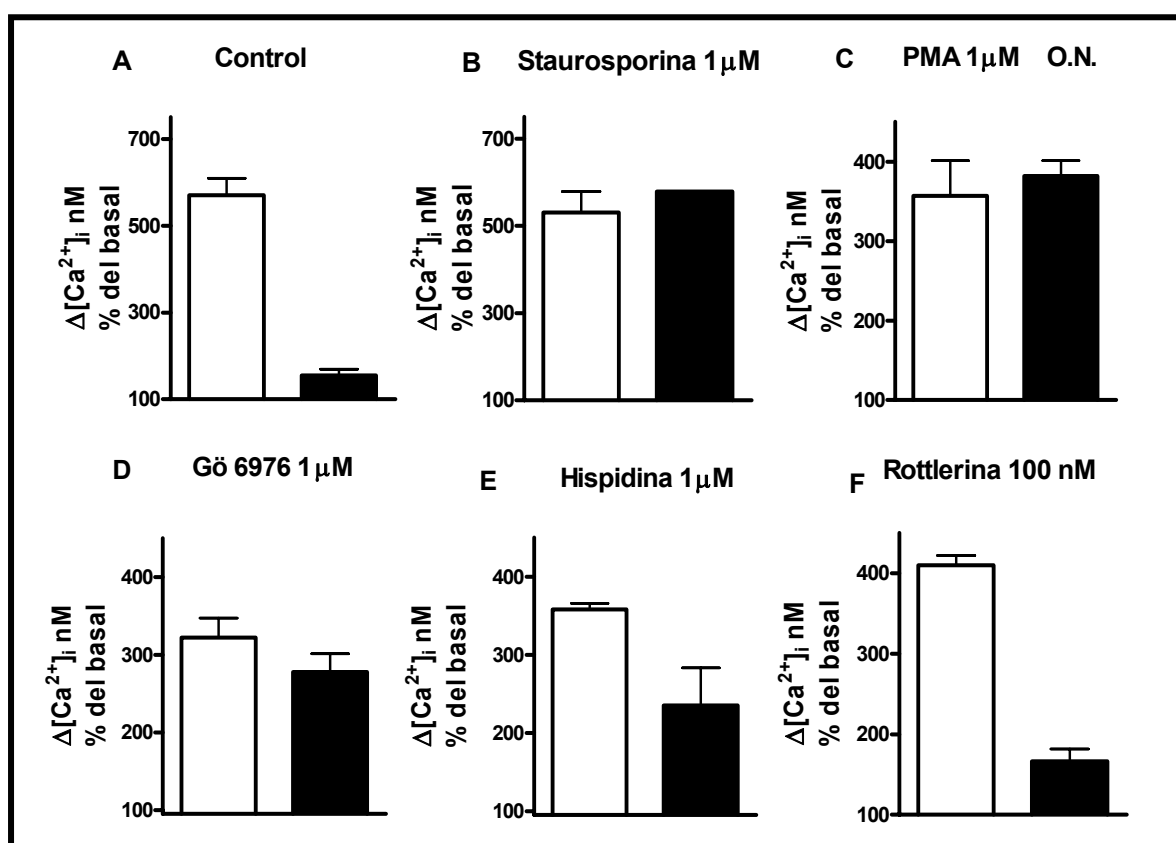


Fig.1. Cuantificación del  $[Ca^{2+}]_i$  en células C9 LPA<sub>1</sub>-EGFP. Tratamientos: Estimulación con LPA 1  $\mu$ M (Barras blancas); Pre-incubación con PMA 1  $\mu$ M (por 5 minutos) en A, B, D, E y F (Barras negras). Gráfica C (Control positivo): Pre-incubación con PMA 1  $\mu$ M (12 horas). La pre-incubación con los inhibidores Staurosporina (1  $\mu$ M), Gö6976 (1  $\mu$ M), Hispidina (1  $\mu$ M) y Rottlerina (100 nM) fueron de 15 min. Datos mostrados como promedios  $\pm$  SEM (n=5). Aplicación de un análisis de varianza ANOVA One-way seguido de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni ( $p < 0.05$ ). El análisis comparativo se realizó entre los datos de la estimulación con LPA (Barra blanca) *versus* los datos de la pre-incubación con PMA (por 5 minutos) + estimulación con LPA (Barra negra) de cada recuadro.

Se detectaron ciertas irregularidades en los trazos crudos de  $[Ca^{2+}]_i$  donde se prueba la hispidina y el Gö6976. Los inhibidores reducen el efecto de LPA, en condiciones control. Esto hizo pensar, sobre posibles efectos fisiológicos u ópticos de estos inhibidores. Para reconocer la naturaleza de estos efectos se recurrió a la técnica de cromatografía de fosfatos de inositol. Los datos de cuantificación de fosfatos de inositol indican que el PMA (pre-incubado 5 minutos antes de la estimulación con LPA) produce una disminución en la producción de IPs. La hispidina y el Gö6976 abaten la acción del PMA ( $p < 0.05$ ); no así la rottlerina (fig. 2). La efectividad de inhibición de la hispidina y Gö6976 es considerable; incluso existe una recuperación casi completa de la respuesta a LPA, lo que demuestra que el efecto observado en los datos de  $[Ca^{2+}]_i$  era de carácter óptico y que efectivamente bloquean el efecto del PMA. Al igual que en los datos de  $[Ca^{2+}]_i$ , el PMA (por si solo) no produce un efecto en la producción de fosfatos de inositol [Avendaño-Vázquez *et al*, 2005].

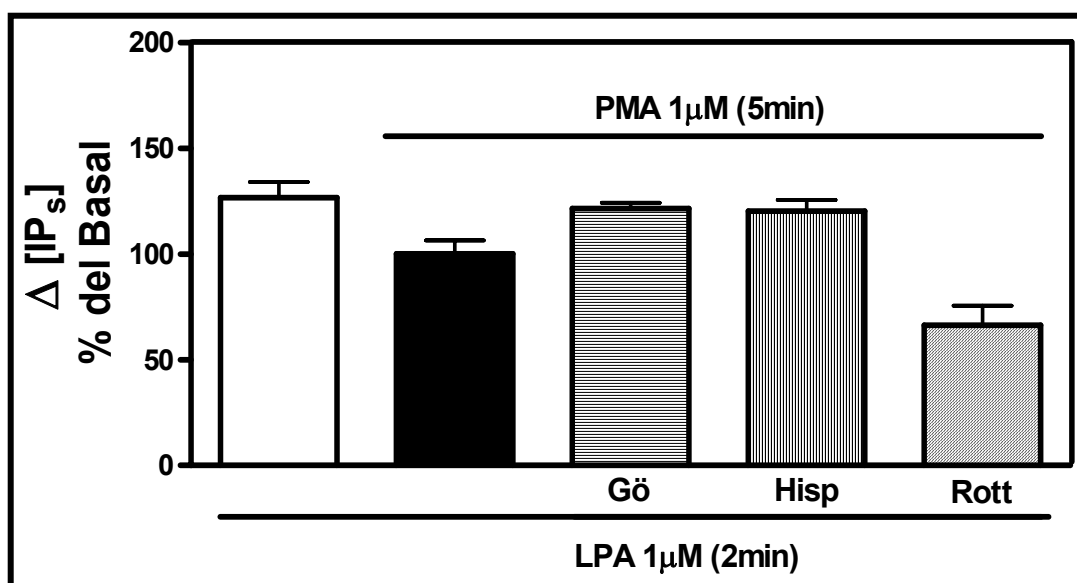


Fig. 2. Medición de Fosfatos de Inositol (IP<sub>s</sub>) en células C9 LPA<sub>1</sub>-EGFP. Tratamientos: Estimulación con LPA 1μM (Barra blanca); Pre-incubación con PMA 1μM (por 5 minutos) y estimulación con LPA (Barra negra); Pre-incubación con Gö6976 1μM (15 min), y estimulación con PMA y LPA (Barra líneas horizontales); Pre-incubación con Hispidina 1μM (15 min), y estimulación con PMA y LPA (Barra líneas verticales); Pre-incubación con Rotterina 100 nM (15 min), y estimulación con PMA y LPA (Barra líneas diagonales). Datos mostrados como promedios ± SEM (n=8). Aplicación de un análisis de varianza ANOVA One-way seguido de prueba de comparación múltiple de Bonferroni ( $p < 0.05$ ). El análisis comparativo se realizó entre los datos de la estimulación con LPA (Barra blanca) *versus* los datos de las demás condiciones.

### Fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP por PKC $\alpha$ y PKC $\beta$ I

Para comprobar la correlación entre la prueba funcional y los niveles de fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP, se llevaron a cabo estudios de marcaje metabólico con <sup>32</sup>P. La gráfica de dosis-respuesta de PMA, en células C9 LPA<sub>1</sub>-EGFP, nos revela que la fosforilación máxima del receptor LPA<sub>1</sub> se detecta desde concentraciones nanomolares de PMA (fig. 3). Los estudios de marcaje metabólico con <sup>32</sup>P muestran un aumento en los niveles de fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP con PMA. El efecto de PMA en la fosforilación del receptor es disminuído por el Gö6976 y por la hispidina a un valor aproximado del 50%, mientras que la rottlerina no afecta significativamente la acción del PMA (fig. 4 p < 0.05).

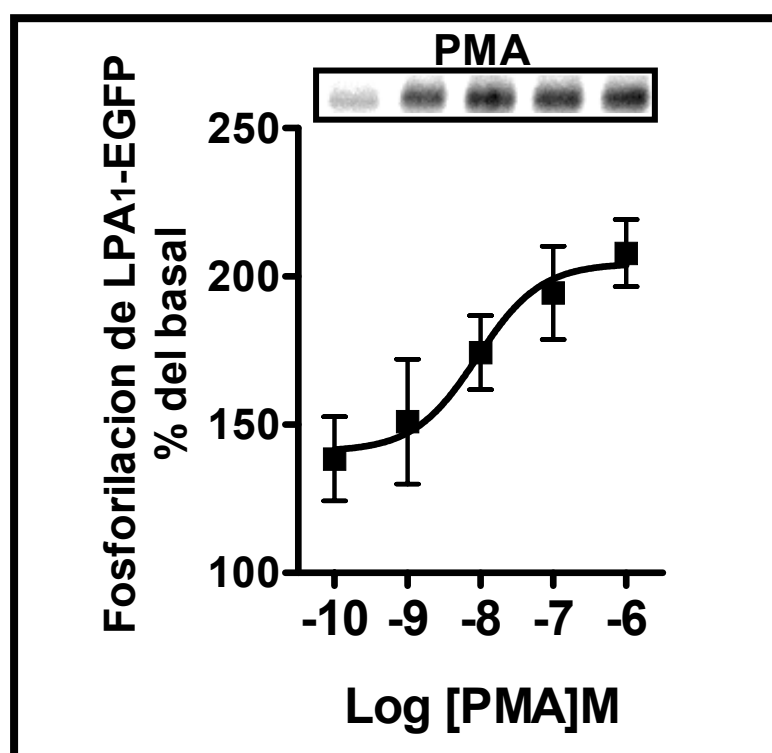


Fig. 3 Marcaje metabólico (<sup>32</sup>P) en células C9 LPA<sub>1</sub>-EGFP. Gráfica de Dosis-respuesta de PMA (15 min).

La figura 5 nos muestra que PMA produce un rápido incremento en los niveles de fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP, durante los primeros 10 minutos. La cinética de fosforilación del receptor, se mantiene en incremento durante los primeros 60 minutos. El efecto inhibitorio de Gö6976 e hispidina es notable a partir de los 5 y 10 minutos (fig. 5).

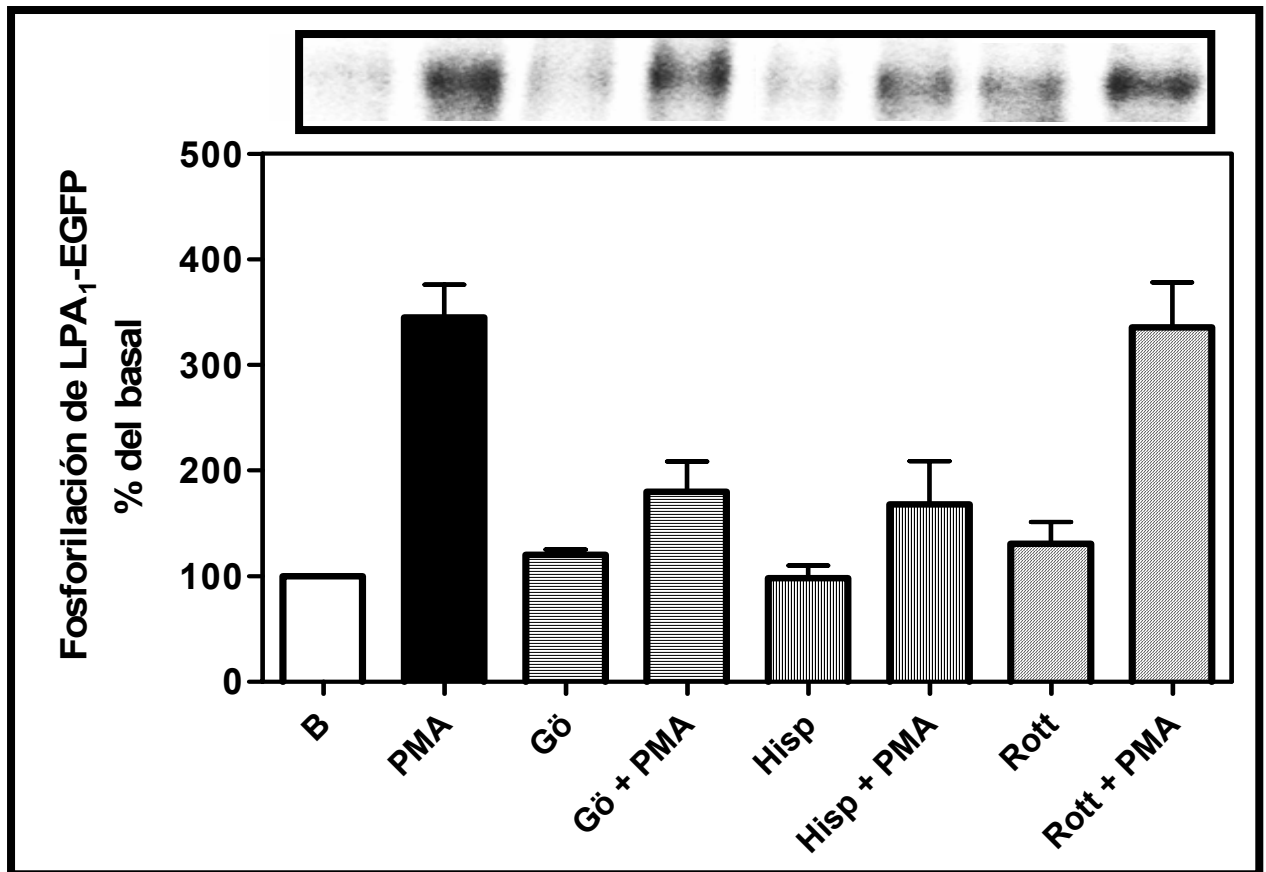


Fig. 4. Fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP. Tratamientos: Basal (Barra Blanca); Estimulación con PMA 1µM por 15 minutos (Barra Negra); Pre-incubación de Gö6976 1µM (15 minutos) con o sin PMA 1µM (Barra líneas horizontales Horizontales); Pre-incubación de Hispidina 1µM (15 minutos) con o sin PMA 1µM (Barra líneas Verticales); Pre-incubación de Rottlerina 100 nM (15 minutos) con o sin PMA 1µM (Barra líneas Diagonales). Datos mostrados como promedios ± SEM (n=5-9). Aplicación de un análisis de varianza ANOVA One-way seguido de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni (p < 0.05). El análisis comparativo se realizó entre los datos de la estimulación con PMA (Barra negra) *versus* los datos de las demás condiciones.

#### **Asociación de PKCα y PKCβI al receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP**

De las isoformas de PKC (nuevas y clásicas) presentes en las células C9, con el receptor LPA<sub>1</sub> se co-inmunoprecipitan PKCα, PKCβI y PKCδ. No obstante, los estudios funcionales indican que las isoformas de PKC clásicas son las que están participando en el efecto de PMA. Las gráficas 6 y 7 muestran variaciones discretas entre las distintas condiciones, que son estadísticamente no significativas. Es notable que sólo PKCβI exhiba un decremento de asociación al receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP, en presencia de hispidina (fig. 7). Los experimentos de co-inmunoprecipitación de curso temporal indican que ambas isoformas se encuentran asociadas al receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP en ausencia del estímulo «PMA»; y los niveles de asociación de PKCα y PKCβI (después de la estimulación con PMA) exhiben un incremento discreto comparado *versus* la condición basal (figura 8). La relación entre la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP y la asociación de las isoformas de PKC a este, no muestran un carácter recíproco (fig. 9).

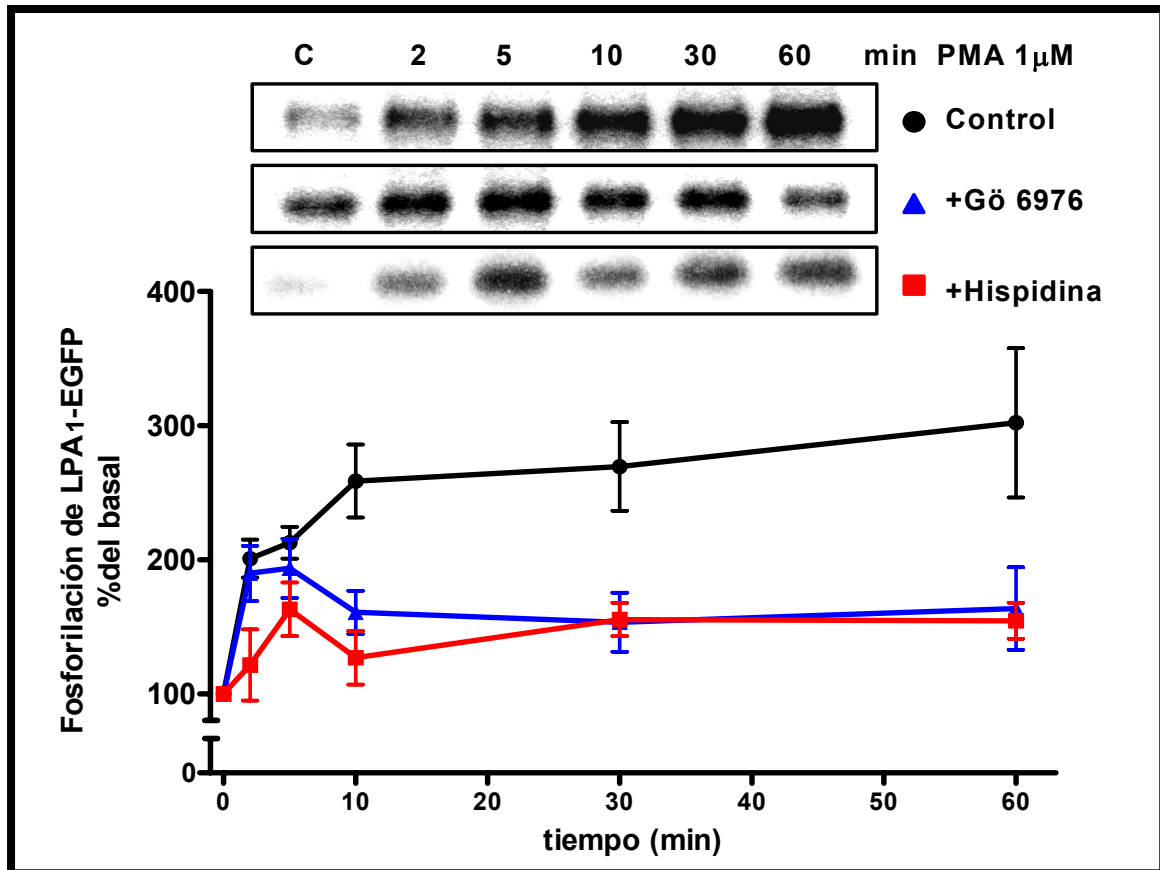


Fig. 5. Curso temporal de fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP. Tratamientos: Estimulación con PMA 1 $\mu$ M en varios tiempos (Control); Pre-incubación de Gö6976 1 $\mu$ M (15 minutos) + PMA (1 $\mu$ M); Pre-incubación de Hispidina 1 $\mu$ M (15 minutos) + PMA (1 $\mu$ M). Datos mostrados como promedios  $\pm$  SEM (n=4).

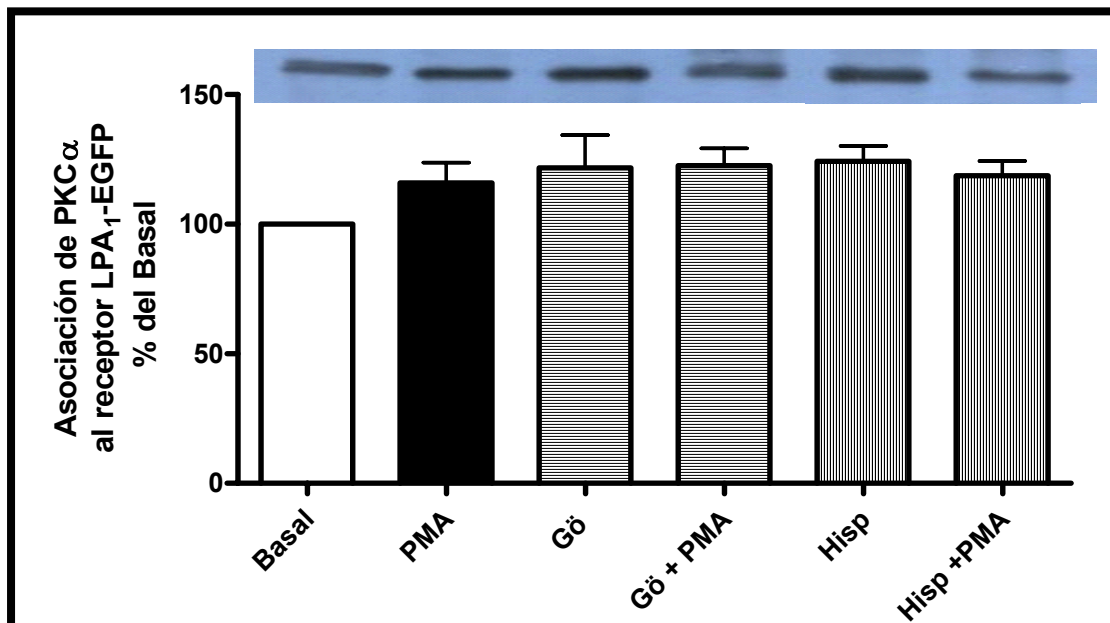


Fig. 6. Asociación de PKC $\alpha$  al receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP. Tratamientos: Basal (Barra Blanca); PMA 1 $\mu$ M por 15 minutos (Barra Negra); Pre-incubación de Gö6976 1 $\mu$ M (15 minutos) con o sin PMA 1 $\mu$ M (Barra líneas horizontales); Pre-incubación de Hispidina 1 $\mu$ M (15 minutos) con o sin PMA 1 $\mu$ M (Barra líneas verticales). Datos mostrados como promedios  $\pm$  SEM (n=7). Inmunoprecipitación: Anti-EGFP; Inmunoblotting: Anti- PKC $\alpha$  (1:1000). Aplicación de un análisis de varianza ANOVA One-way seguido de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni ( $p < 0.05$ ). El análisis comparativo se realizó entre los datos de la estimulación con PMA (barra negra) *versus* los datos de las demás condiciones.

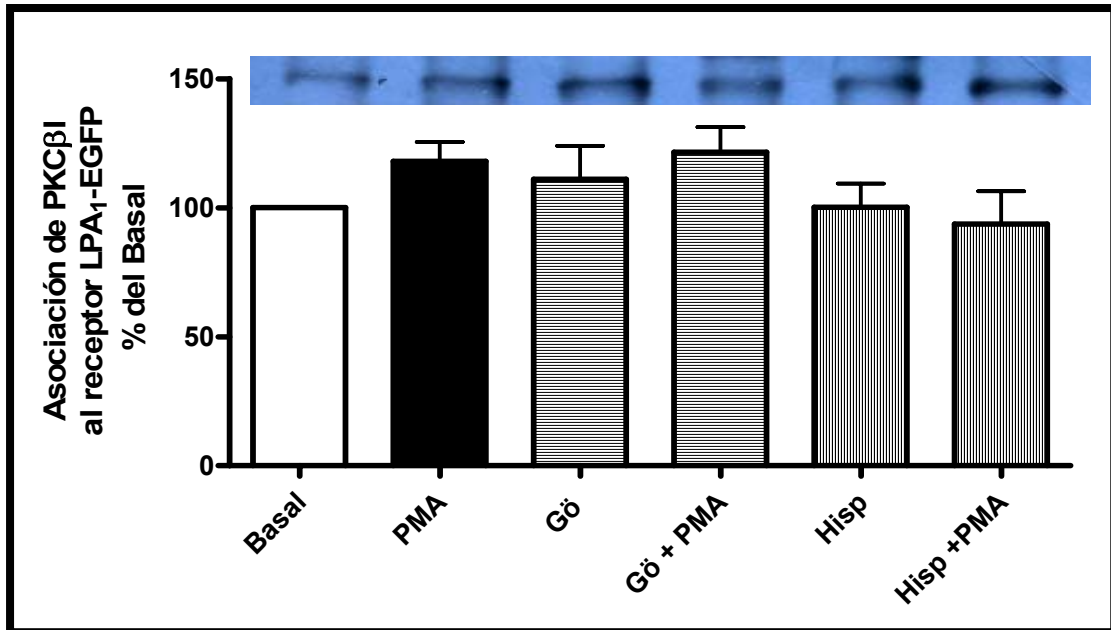


Fig. 7. Asociación de PKCβI al receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP. Tratamientos: Basal (Barra Blanca); PMA 1μM por 15 minutos (Barra Negra); Pre-incubación de Gö6976 1μM (15 minutos) con o sin PMA 1μM (Barra líneas horizontales Horizontales); Pre-incubación de Hispidina 1μM (15 minutos) con o sin PMA 1μM (Barra líneas verticales). Inmunoprecipitación: Anti-EGFP; Inmunoblotting: Anti-PKCβI (1:1000). Datos mostrados como promedios ± SEM (n=9). Aplicación de un análisis de varianza ANOVA One-way seguido de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni (p < 0.05). El análisis comparativo se realizó entre los datos de la estimulación con PMA (Barra negra) *versus* los datos de las demás condiciones.

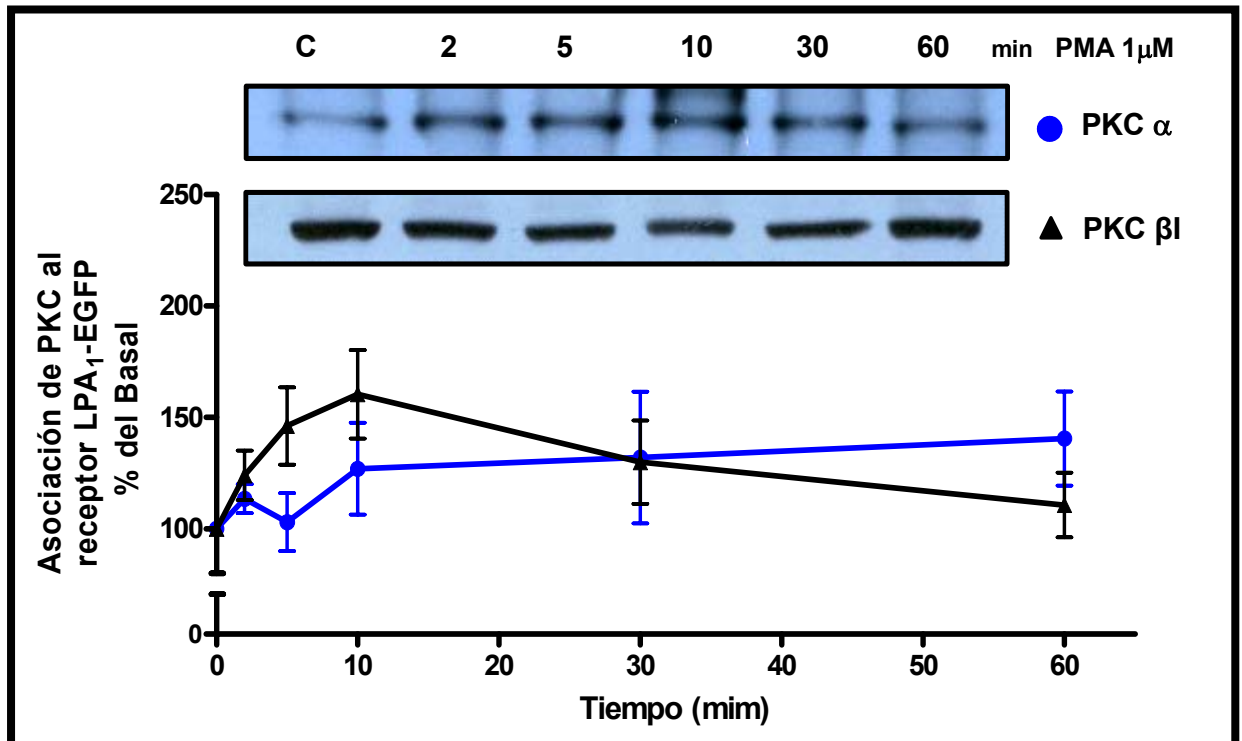


Fig.8. Curso temporal de asociación de PKC al receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP. Tratamientos: Estimulación con PMA 1μM, en varios tiempos (Control). Inmunoprecipitación: Anti-EGFP; Inmunoblotting: Anti- PKCα ó PKCβI (1:1000). Datos mostrados como promedios ± SEM (n=7).

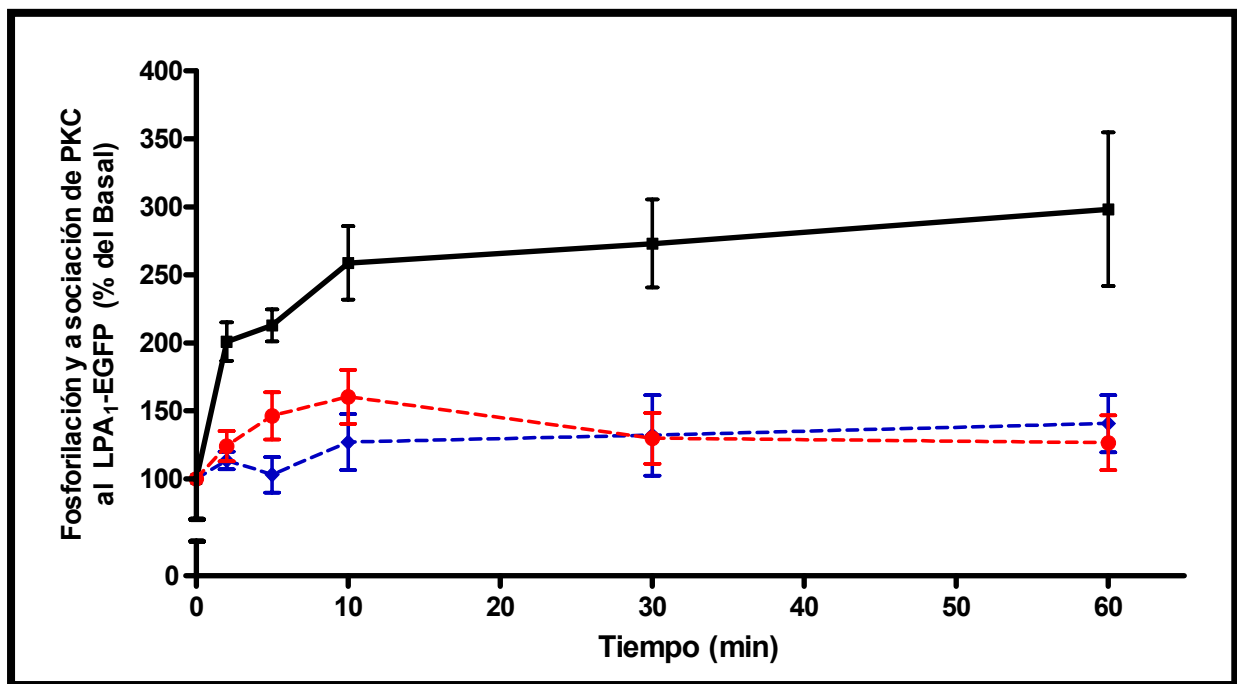


Fig. 9. Relación entre la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP y la asociación de PKC. Fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP (línea negra). Asociación de PKC $\alpha$  (línea azul) y PKC $\beta$ I (línea roja) al receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP. Inmunoprecipitación: Anti-EGFP; Inmunoblotting: Anti- PKC $\alpha$  ó PKC $\beta$ I (1:1000). Tratamientos: PMA 1 $\mu$ M

### Visualización de la co-localización de la PKC y el receptor LPA<sub>1</sub>

En condiciones basales, el receptor LPA<sub>1</sub> (fusionado a la EGFP por el extremo carboxilo) se localiza a nivel de membrana plasmática (fig. 10A) [Avendaño-Vázquez *et al*, 2005], mientras que la PKC $\alpha$  (fusionada a la mRFP1 ó a EGFP) o PKC $\beta$ I se encuentra distribuída en el citoplasma (fig. 10B, 11A y 11C). La estimulación con PMA, provoca cierto movimiento de las PKC $\alpha$ -EGFP y PKC $\beta$ I-EGFP (fig. 11).

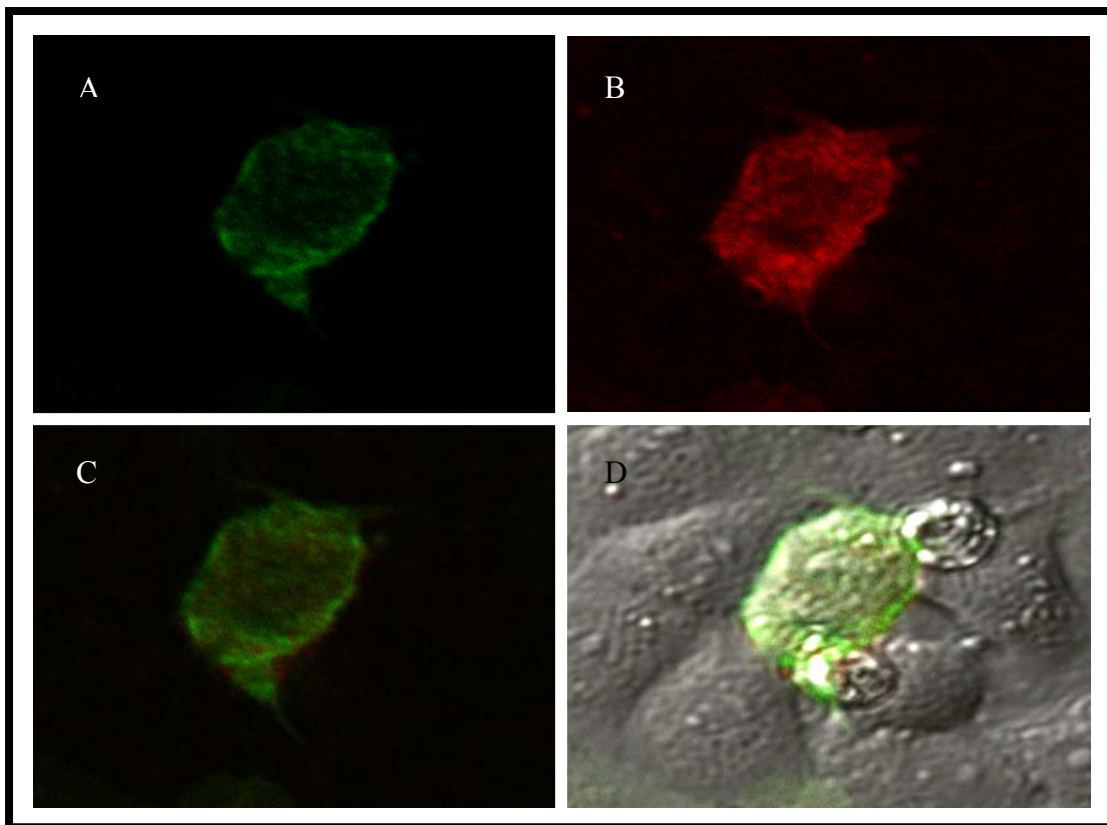


Fig. 10. Co-localización de LPA<sub>1</sub>-EGFP y PKC $\alpha$ -mRFP1. Distribución de LPA<sub>1</sub>-EGFP (A). Distribución de PKC $\alpha$ -mRFP1 (B). Co-localización de LPA<sub>1</sub>-EGFP y PKC $\alpha$ -mRFP1 (C). Visualización en Microscopio de Luz transmitida (D). EGFP fué excitada con láser de argón/helio-neón (Microscopio confocal Olympus<sup>®</sup>) a 488 nm y la fluorescencia emitida se detectó a 522 nm. La mRFP1 se excitó a 514 nm y se detectó la emisión a 600 nm.

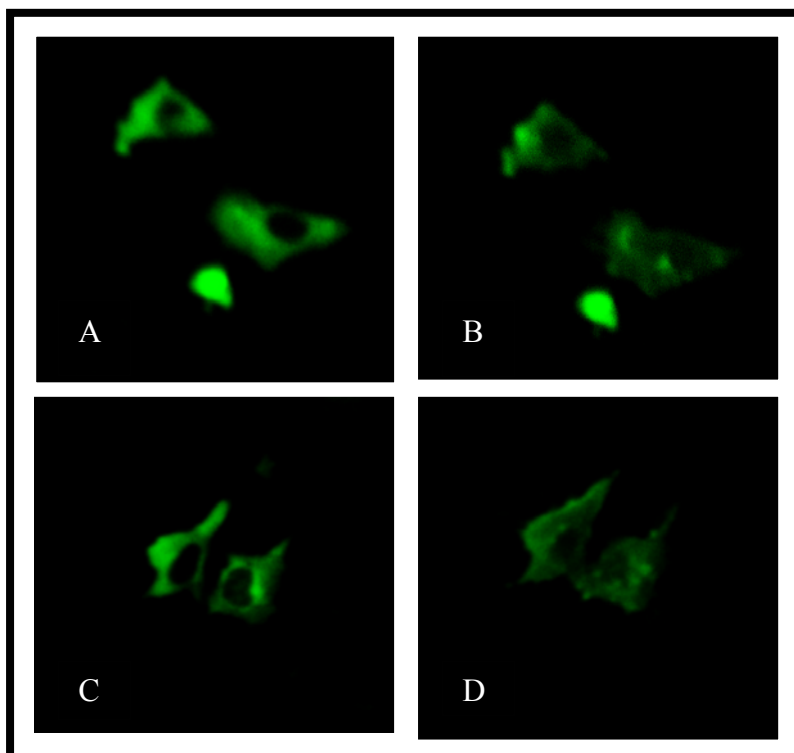


Fig. 11. Distribución de PKC $\alpha$ -EGFP y PKC $\beta$ 1-EGFP en células C9 WT. Condiciones basales en C9 transfectadas con PKC $\alpha$ -EGFP (A) o PKC $\beta$ 1-EGFP (C). Estimulación con PMA 2 $\mu$ M (5 min) (B y D). EGFP fué excitada con láser de argón/helio-neón (Microscopio confocal Olympus<sup>®</sup>) a 488 nm y la fluorescencia emitida se detectó a 522 nm.



## VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En las células C9 LPA<sub>1</sub>-EGFP la señal del LPA es desensibilizada por la pre-incubación con PMA [Avendaño-Vázquez *et al*, 2005]. El PMA es un agente promotor de tumores que activa directamente a las isoformas clásicas y nuevas de PKC [Liu y Heckman, 1998; Newton, 2004]. La acción del PMA es abatida totalmente por la staurosporina y por un pre-tratamiento de PMA por 12 horas (Gráfica B y C de fig. 1), nos indica que se trata de una desensibilización dependiente de PKC. La incubación de PMA por 12 horas suprime las PKC (sensibles a PMA) a nivel de síntesis proteica y de mRNA [Standaert *et al*, 1993]. Este conocimiento se aprovechó como estrategia (control negativo) para detectar con mayor certeza las isoformas de PKC sensibles a ésteres de forbol. Para conocer que isoforma(s) participa(n) en la desensibilización heteróloga del receptor LPA<sub>1</sub> se usaron inhibidores específicos de PKC. Los datos de medición  $[Ca^{2+}]_i$  y de fosfatos de inositol, revelan que PKC $\alpha$  y PKC $\beta$  participan en la regulación heteróloga del LPA<sub>1</sub>, en células C9 transfectadas con el receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP (figura 1 y 2). Debe señalarse que las respuestas irregulares de Gö6976 e hispidina en los datos crudos de medición de la  $[Ca^{2+}]_i$ , podrían deberse a los efectos ópticos de tales inhibidores. Es decir, la estructura fisicoquímica de estos compuestos de cierta manera altera la lectura en el espectrofluorómetro. No obstante, esta complicación fue solucionada mediante el empleo de una técnica no fundamentada en la medición óptica: Cromatografía de fosfatos de inosítoles. Esta técnica permitió aclarar la intervención de PKC $\alpha$  y PKC $\beta$  en la desensibilización funcional del LPA<sub>1</sub>; y de esta manera confirmar la hipótesis planteada inicialmente.

El empleo de inhibidores “específicos” para PKC, resulta una buena estrategia para determinar que isoforma(s) de PKC participa(n) en la desensibilización heteróloga del receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP. Para establecer la dosis adecuada que produce un óptimo efecto de inhibición de PKC, se consideraron las IC<sub>50</sub> de inhibición citadas en el catálogo MERCK Calbiochem® Biochemicals (información proporcionada por los aportes de la literatura científica). La staurosporina inhibe entre otras cinasas a PKC (IC<sub>50</sub> = 700 pM). La hispidina inhibe las isoformas PKC $\beta$  (IC<sub>50</sub> = 2  $\mu$ M). Por su parte, el Gö6976 inhibe las isoformas PKC $\alpha$  (IC<sub>50</sub> = 2.3 nM), PKC $\beta_1$  (IC<sub>50</sub> = 6.2 nM) y PKC $\mu$  (IC<sub>50</sub> = 20 nM). La rottlerina es un inhibidor menos específico, ya que inhibe PKC $\delta$  (IC<sub>50</sub> = 3-6  $\mu$ M), PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ , PKC $\gamma$  (IC<sub>50</sub> = 30-42  $\mu$ M), PKC $\epsilon$ , PKC $\eta$  y PKC $\zeta$  (IC<sub>50</sub> = 80-100  $\mu$ M). La

concentración de estos inhibidores fue fijada a  $1\mu\text{M}$ ; a esta concentración: el Gö6976 mostraría la participación de  $\text{PKC}\alpha$ , y quizás de  $\text{PKC}\beta$ ; y la hispidina mostraría la participación de  $\text{PKC}\beta$ . Para rottlerina se manejó una concentración  $100\text{ nM}$ , concentración a la cuál mostraría la participación de  $\text{PKC}\delta$ . En la actualidad no se cuenta con inhibidores “específicos” para todas las isoformas de PKC, lo que obliga a recurrir a otras herramientas que permitan establecer la participación de PKC en las diversas funciones de la célula. Los siRNA (“small interfering RNA”, fragmentos cortos de RNA de interferencia) [Yang *et al.*, 1997, Jiang *et al.*, 2003; Latchoumycandane *et al.*, 2005] o los oligonucleótidos antisentido [Wagner, 1994; Cheng *et al.*, 1998; Lebedeva y Stein, 2001], por su infalible especificidad, complementarían los datos que resultan del empleo de inhibidores específicos de PKC. Estos experimentos se realizarán posteriormente en el laboratorio.

Los resultados de marcaje metabólico con  $^{32}\text{P}$  muestran que el incremento en el estado de fosforilación del receptor  $\text{LPA}_1\text{-EGFP}$  inducido por PMA, se reduce con el uso de inhibidores específicos de PKC: Gö6976 e hispidina (figura 4). Estos datos sugieren que la fosforilación del receptor  $\text{LPA}_1\text{-EGFP}$  inducida por  $\text{PKC}\alpha$  y  $\text{PKC}\beta$ , promueve su desensibilización heteróloga (agonista-independiente). Esta información sustenta nuevamente la hipótesis que se formuló previo al desarrollo de los experimentos. No siempre la fosforilación de GPCR indica que el receptor sea desensibilizado, en ciertos casos representa la activación del mismo (*i.e.* la fosforilación del  $\beta_2\text{-AR}$  por PKA induce el cambio de acoplamiento del receptor de la proteína  $\text{G}_s$  a la proteína  $\text{G}_i$ ) [Daaka *et al.* 2002; Zamah *et al.*, 2002]. En ciertas condiciones, el  $\alpha_{1\text{B}}\text{-AR}$  es fosforilado, pero no es desensibilizado [Medina *et al.*, 1998]. Sin embargo, los estudios de microscopía confocal sustentan que el receptor  $\text{LPA}_1\text{-EGFP}$  es fosforilado e internalizado (eventos característicos de la desensibilización) por acción del PMA, mediante la participación de PKC [Avendaño-Vázquez *et al.*, 2005]. Existe evidencia de la estrecha relación entre la fosforilación y desensibilización de GPCRs, y de la participación de PKC en la modulación funcional de GPCRs [Vázquez-Prado *et al.*, 1997; Diviani *et al.*, 1997; García-Sáinz *et al.*, 2000; García-Caballero *et al.*, 2001].

La co-inmunoprecipitación es una herramienta valiosa para detectar la asociación física de las isoformas de PKC al receptor  $\text{LPA}_1\text{-EGFP}$ . Tanto  $\text{PKC}\alpha$  como  $\text{PKC}\beta$  exhiben un incremento discreto en respuesta a PMA (figura 6 y 7). La prueba

estadística indica que este incremento, no es estadísticamente significativo. Los datos muestran que la hispidina disminuye los niveles de asociación de PKC $\beta$ I al receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP (figura 7), este decremento no ocurre para la PKC $\alpha$  en presencia de Gö6976 (figura 6). La co-inmunoprecipitación de otras isoformas de PKC (*i.e.* PKC $\delta$ ) que no parecen relacionarse con la desensibilización heteróloga del receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP, podrían desempeñar otra función dentro del complejo proteico que se concentra en el microdominio membranal. La existencia de múltiples isoformas y patrón de distribución de las PKC, sugiere que estas isoformas poseen distintas funciones en la regulación celular [Lee *et al.*, 1997; Insel *et al.*, 2005b]. Además de la desensibilización heteróloga de los GPCRs, la familia de cinasas serina-treonina PKC están involucradas en la señalización de los receptores que lleva a la expresión de genes [Zhao *et al.*, 2004, 2006], la regulación de proteínas de citoesqueleto [Gonda *et al.*, 1990; Ng *et al.*, 1999], la apoptosis [Ghayur *et al.*, 1996; Sawai *et al.*, 1997], la proliferación y la diferenciación celular [Szallasi *et al.*, 1994; Pessino *et al.*, 1995; O'Driscoll *et al.*, 1995; Wong y Jin, 2005], la transmodulación de receptores [Prenzel *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2006], la regulación de permeabilidad de membrana [Ludt *et al.*, 1991; Dehecchi *et al.*, 1993; Chen y Wu, 1995], y en la iniciación de reacciones bioquímicas involucradas en el anabolismo y el catabolismo [Sander y Myatt, 1990; Duyster *et al.*, 1993]. Las proteínas de andamiaje, adaptadoras y de anclaje que forman parte de este complejo proteico, contribuyen en el reclutamiento de proteínas activas (*i.e.* cinasas o fosfatasa) [Mochly-Rosen, 1995; Pawson y Scott, 1997].

El receptor LPA<sub>1</sub> se encuentra fosforilado en condiciones basales. Los resultados indican que PKC $\alpha$  y PKC $\beta$  incrementan gradualmente el estado de fosforilación del receptor para LPA. Durante los primeros 10 minutos se muestra un considerable aumento en los niveles de fosforilación del receptor; posteriormente, el incremento comienza a mantenerse en una pendiente constante (figura 5). Este patrón de fosforilación ha sido reportado en otros receptores [Handock *et al.*, 1992; Vázquez-Prado *et al.*, 2000; Alcántara-Hernández *et al.*, 2000]. La acción de las cinasas se mantiene por un tiempo prolongado y posiblemente decrece paulatinamente con el transcurso del tiempo (participación de las fosfatasa específicas) [Shin y Malbon, 1996; Alcántara-Hernández *et al.*, 2005]. Aunque no son significativos los cambios de asociación de PKC $\alpha$  y PKC $\beta$ I al receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP, se manifiesta una cinética de asociación (a menor escala) similar al de la cinética de fosforilación. Durante los primeros 10 minutos

se detecta una rápida fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP, “acompañada” por un aumento discreto en los niveles de asociación de PKC $\alpha$  y PKC $\beta$ I (aunque PKC $\beta$ I exhibe un mayor incremento de asociación) a este receptor. Posteriormente, los niveles de asociación de PKC $\alpha$  y PKC $\beta$ I fluctúan en un cierto rango (aunque existe un ligero aumento de asociación de PKC $\alpha$  y una reducción de PKC $\beta$ I asociadas). Esta fluctuación de los niveles de asociación de estas isoformas de PKC, podrían corresponder a la “estabilización” en los índices de fosforilación del receptor que comienzan a observarse a partir de los 30 minutos (figura 9). Esto representaría la participación de PKC $\alpha$  y PKC $\beta$ I en la desensibilización heteróloga del receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP en distintos tiempos. La no apreciación de cambios de asociación de PKC $\alpha$  y PKC $\beta$ I estadísticamente significativos, puede representar faltas técnicas-experimentales de la metodología empleada, que se requieran afinar o en su defecto emplear técnicas alternativas (*i.e.* FRET, siRNA u oligonucleótidos antisentido), para obtener mejores resultados y de esta manera realizar un análisis objetivo. Una posible explicación de la ausencia de cambios de asociación, estadísticamente significativos, es la presencia de la proteína verde fluorescente (EGFP) fusionada al extremo carboxilo del receptor LPA<sub>1</sub>. Es decir, la EGFP puede intervenir en la interacción PKC-LPA<sub>1</sub>, que ocurre normalmente en condiciones naturales (células C9 “silvestres”), evitando la asociación estable de PKC $\alpha$  y PKC $\beta$ I.

De los datos recabados por estos experimentos, se puede esbozar un modelo de regulación heteróloga del receptor LPA<sub>1</sub> en las células C9. La unión de un agonista (*i.e.* Angiotensina II, Bradicidina, Endotelina, Esfingosina 1-fosfato) a un determinado receptor, promueve la activación de PKC $\alpha$  y PKC $\beta$ I (en este caso representada por la acción del PMA). Las PKC $\alpha$  y PKC $\beta$ I activas fosforilan al LPA<sub>1</sub> (en sitios específicos de la tercera asa intracelular y/o carboxilo terminal) e inducen un cambio conformacional del mismo. Los cambios físico-químicos de los receptores LPA<sub>1</sub> fosforilados, impiden la interacción con sus correspondientes proteínas G heterotriméricas (Gq y Gi). Ciertos mecanismos post-fosforilación (aun desconocidos) conducen a la internalización LPA<sub>1</sub> [Avendaño-Vázquez *et al.*, 2005]. En la internalización del receptor podrían participar las proteínas caveolas, y de esa forma atenuarse la señalización del receptor LPA<sub>1</sub> [Rapacciuolo *et al.*, 2003]. Como cualquier GPCR internalizado, el receptor LPA<sub>1</sub> tiene dos destinos: degradación o reciclamiento a membrana plasmática (re-sensibilización). El proceso de degradación (vía endosomas y proteosomas) requiere de una previa ubiquitinación para ser detectado por el proteosoma; de esta manera se suprime

completamente la respuesta del receptor. Por su parte, la re-sensibilización es un proceso que involucra eventos de desfosforilación, mediadas por fosfatasas específicas, que permiten la reintegración del receptor a la superficie celular; y completar un ciclo de “activación-desensibilización-re-sensibilización” [Ferguson, 2001; Lefkowitz y Whalen, 2004].

Se debe admitir que en la transfección de las células C9 LPA<sub>1</sub>-EGFP, no se obtuvo la eficiencia cuantitativa deseada y estabilidad de la expresión de PKC $\alpha$ -mRFP1. Este problema puede radicar en el modo de incorporación al DNA huésped que de cierta forma afecte el marco de lectura de los ribosomas ó en la inserción del plásmido en regiones de heterocromatina lo que hace que se pierdan en las siguientes generaciones celulares. La citometría de flujo fue el método más indicado para seleccionar aquellas células que expresaran tanto LPA<sub>1</sub>-EGFP como mRFP1-PKC $\alpha$ ; debido a que ambos plásmidos poseen el mismo agente selectivo (resistencia a Geneticina). El número de células obtenidas por citometría de flujo, fue otra de las limitantes para llevar a cabo un minucioso estudio de microscopía confocal: FRET (Fluorescente Resonante Energy Transfer) que reforzaría los datos de co-inmunoprecipitación. Aunque la co-inmunoprecipitación es una buena técnica para detectar la asociación física de proteínas, el FRET es una herramienta más sofisticada que permite monitorear la interacción entre proteínas [Azpiazu y Gautam, 2004; Hein *et al.*, 2005; Peter *et al.*, 2005]. El movimiento de PKC $\alpha$ -EGFP y PKC $\beta$ I-EGFP (inducida por la estimulación con PMA) evidencia su activación, pero no la desensibilización del receptor LPA<sub>1</sub>. Aunque las células C9 expresan receptores LPA<sub>1</sub> endógenos, no se demuestra que estas isoformas de PKC desensibilicen a este receptor (figura 11).

Perspectivas a futuro: En la profundización de este proyecto de investigación, en el laboratorio se han originado mutantes de LPA<sub>1</sub>-EGFP en sitios posibles de fosforilación por PKC (S<sub>240</sub>A, S<sub>244</sub>A, T<sub>322</sub>V y S<sub>341</sub>A). Esto permitirá establecer la importancia de estos sitios, en la regulación ó función del receptor. Asimismo se crearon las construcciones mLPA<sub>1</sub>-EGFP (EGFP fusionado al carboxilo del receptor LPA<sub>1</sub> de ratón), HA-hLPA<sub>2</sub> EGFP (EGFP fusionado al carboxilo terminal del receptor LPA<sub>2</sub> de humano), hLPA<sub>3</sub>-Myc-His (un epítipo de Myc-His fusionados al carboxilo terminal LPA<sub>3</sub> de humano) y hLPA<sub>3</sub>-EGFP (EGFP fusionado al carboxilo del receptor LPA<sub>3</sub> de humano), y de receptores adrenérgicos. Estas construcciones abrirán la línea de investigación encaminada a otros tipos de regulación de GPCR: la trans-modulación ó

heterodimerización de receptores de LPA (incluso se podría aplicar el mismo protocolo en el caso de los receptores para S1P). Estos aportes han sido creados por la Dra. S. Eréndira Avendaño Vázquez y apoyados por el Dr. Jesús Adolfo García Sáinz. Entre otras posibles opciones que pueden desplegar el proyecto de investigación (dentro del mismo modelo biológico de las células C9) son: determinar las moléculas asociadas con la internalización (no dependiente del agonista) de LPA<sub>1</sub>, establecer la función que desempeñan las otras PKC, investigar sobre las fosfatasas involucradas en la desfosforilación del LPA<sub>1</sub>, indagar sobre GRKs asociadas con la desensibilización homóloga del LPA<sub>1</sub>, determinar una posible participación y función de otras cinasas (*i.e.* PKA, PKB/Akt ó Cinasa de Caseína) en el receptor LPA<sub>1</sub>. O bien, se puede aplicar este protocolo en otros receptores LPA presentes en las células C9 (*i.e.* LPA<sub>2</sub>).

## LITERATURA CITADA

1. Abramow-Newerly, M., Roy, A. A., Nunn, C., y Chidiac, P. (2005). RGS proteins have a signaling complex: Interactions between RGS proteins and GPCR, effectors, and auxiliary proteins. *Cell Signal* **18**(5):579-91
2. Ahn, S., Nelson, C. D., Garrison, T. R., Miller, W. E. y Leftkowitz, R. J. (2003). Desensitization, internalization, and signaling functions of  $\beta$ -arrestins demonstrated by RNA interference. *PNAS* **100** (4): 1740-4
3. Alberts, B., Jonson, A., Lewis, J., Raff, M. Roberts, K. y Walter, P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4<sup>a</sup> Ed. Garland Science, Nueva York.
4. Alcántara-Hernández, R., Vázquez-Prado, J. y García-Sainz, J. A. (2000). Protein phosphatase-protein kinase interplay modulates alpha 1b-adrenoceptor phosphorylation: effects of okadaic acid. *Br. J. Pharmacol.* **129**(4): 724-30
5. Alcántara-Hernández, R., Casas-González, P. y García-Sáinz, J. A. (2005). Signal transduction pathway cross talk. Roles of protein kinases, protein phosphatases and reactive oxygen species. *Currents Trends in Endocrinology*. **1**: 19-29
6. An, S., Dickens, M.A., Bleu, T., Hallmark, O.G. y Goetzl, E.J. (1997). Molecular cloning of the human Edg2 protein and its identification as a functional cellular receptor for lysophosphatidic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, **231**: 619-22.
7. An, S., Bleu, T., Hallmark, O.G. y Goetzl, E.J. (1998). Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*, **273**: 7906-10.
8. Anderson, R. G. (1998). The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 199–225
9. Angers, S., Salahpour, A., y Bouvier, M. (2002). Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**: 409–35
10. Anlinker, B. y Chun, J. (2004). Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **279**: 20555–558. (a)
11. Anliker, B. y Chun, J. (2004). Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**: 457–65 (b)
12. Aoki, J., Taira, A., Takanezawa, Y., Kishi, Y., Hama, K., Kishimoto, T., Mizuno, K., Saku, K., Taguchi, R. y Arai, H. (2002). Serum lysophosphatidic

- acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem*, **277**: 48737-44
13. Aoki, J. (2004). Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Semin Cell Dev Biol*, **15**: 477-89
  14. Avendaño-Vázquez, S. E., García-Caballero, A. y García-Sáinz, J. A. (2005). Phosphorylation and desensitization of the lysophosphatidic acid receptor LPA<sub>1</sub>. *Biochem. J.* **385**: 677-84
  15. Avendaño-Vázquez, S. E. (2005). *Fosforilación y desensibilización del receptor LPA<sub>1</sub> para el ácido lisofosfatídico*. Tesis Doctoral. Facultad de Química UNAM. Ciudad de México. 90 pag.
  16. Azpiazu, I. y Gautam, N. (2004). A FRET based sensor indicates that receptor access to a G protein is unrestricted in living mammalian cell. *J Biol Chem.* **279**: 27709-18
  17. Baker, D.L., Desiderio, D.M., Miller, D.D., Tolley, B. y 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
  18. Bandoh, K., Aoki, J., Hosono, H., Kobayashi, S., Kobayashi, T., Murakami-Murofushi, K., Tsujimoto, M., Arai, H. y 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
  19. Bandoh, K., Aoki, J., Taira, A., Tsujimoto, M., Arai, H. y 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
  20. Barak, L. S., Gilchrist, J., Becker, J. M. y Kim, K-M. (2006). Relationship between the G protein signaling and homologous desensitization of G protein-coupled receptors. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **339**: 695–700
  21. Beinborn, M. (2006). Class B GPCRs: A Hidden Agonist Within? *Mol Pharmacol* **70**:1–4
  22. Benovic, J. L., Pike, L. J., Cerione, R. A., Staniszewski, C., Yoshimasa, T, Codina, J., et al., (1985). Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and



- effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* **260** (11): 7094-101
23. Benovic, J. L. Kühn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M. G. y Lefkowitz, R. J. (1987). Functional desensitization of 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. USA.* **84**: 8879-82
  24. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. y Clarke, N. D. 2002. *Biochemistry*. 2<sup>a</sup> Ed. W. H. Freeman, Nueva York.
  25. Brindley, D. N., English, D., Pilquill, C., Buri, K. y Ling, Z-Ch. (2002). Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids. *Biochim Biophys Acta***1582**(1-3): 33-44
  26. Brodsky, F. M., Chen, C. Y., Knuehl, C., Towler, M. C., y Wakeham, D. E. (2001). Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**: 517–68
  27. Budnik, L.T., Brunswig-Spickenheier, B. y 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
  28. Bulenger, S, Marullo, S. y Bouvier, M. (2005). Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci* **26**:131-7
  29. Campbell, D.S. y Holt, C.E. (2001). Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron*, **32**: 1013-26
  30. Canals, M., Burgueno, J., Marcellino, D., Cabello, N., Canela, E. I., Mallol, J., Agnati, L., Ferre, S., Bouvier, M., Fuxe, K., Ciruela, F., Lluís, C. y Franco, R. (2004). Homodimerization of adenosine A2A receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Neurochem* **88**(3): 726-34
  31. Casas-González, P, Vázquez-Prado, J. y García-Sáinz, J.A. (2000). Lysophosphatidic acid modulates  $\alpha 1\beta$ -adrenoceptor phosphorylation and function. Roles of  $G_i$  and phosphoinositide 3-kinase, *Mol. Pharmacol.* **57**: 1027– 1033

32. Casas-González, P., Ruiz-Martínez, A. y García-Sáinz, J. A. (2003). Lysophosphatidic acid induces  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor phosphorylation through  $G\beta\gamma$ , phosphoinositide 3-kinase, protein C and epidermal growth factor receptor transactivation. *Biochim Biophys Acta.* **1633**: 75-83
33. Chen, C.-C. y Wu, M.-L. (1995) Protein kinase C isoform d is involved in the stimulation of the  $Na^{+}/H^{+}$  exchanger in C6 glioma cells. *Mol. Pharmacol.* **48**: 995-1003
34. Cheng, C-C., Wang, J-K. y Lin, S-B. (1998). Antisense Oligonucleotides Targeting Protein Kinase C- $\alpha$ , - $\beta$ , or - $\delta$  But Not - $\eta$  Inhibit Lipopolysaccharide-Induced Nitric Oxide Synthase Expression in RAW 264.7 Macrophages: Involvement of a Nuclear Factor  $\kappa$ B-Dependent Mechanism. *The Journal of Immunology* **161**: 6206–14
35. Chidiac, P. y Roy. A. A. (2003). Activity, regulation, and intracellular localization of RGS proteins. *Recept. Channels.* **9**(3): 135-47
36. Chong, J.M. et al. (2002) Disulfide bond assignments of secreted Frizzled-related protein-1 provide insights about Frizzled homology and netrin modules. *J. Biol. Chem.* **277**: 5134–44
37. Chun, J. (1999). Lysophospholipid receptors: implications for neural signaling *Crit. Rev. Neurobiol.*, **13**(2): 151-68
38. 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
39. 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**: 61–9
40. Contos, J.J., Fukushima, N., Weiner, J.A., Kaushal, D. y 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
41. Contos, J.J., Ishii, I., Fukushima, N., Kingsbury, M.A., Ye, X., Kawamura, S., Brown, J.H. y Chun, J. (2002). Characterization of *lpa2* (Edg4) and *lpa1/lpa2* (Edg2/Edg4) Lysophosphatidic Acid Receptor Knockout Mice: Signaling Deficits without Obvious Phenotypic Abnormality Attributable to *lpa2*. *Mol Cell Biol.* **22** (19): 6921-9

42. Cook, S.J., Rubinfeld, B., Albert, I. y 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
43. Cooper, G. M. 2000. *The Cell a Molecular Approach*. 2<sup>a</sup> Ed. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts.
44. Daaka, Y., Luttrell, L. M. y Lefkowitz, R J. (2002). Switching of the coupling of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A *Nature* **390**: 88-91
45. Dalle, S., Imamura, T., Rose, D. W., Worrall, D. S., Ugi, S., Hupfeld, C. J. y Olefsky, J. M. (2002). Insulin induces heterologous desensitization of G-protein-coupled receptor and insulin-like growth factor I signaling by down regulating beta-arrestin-1. *Mol. Cell. Biol.* **22** (17): 6272-85
46. De Vries, L. y Farquhar, M. G. (1999). RGS proteins: more than just GAPs for heterotrimeric G proteins. *Trends Cell Biol* **9**: 138–144
47. Dehecchi, M. C., Tamanini, A., Berton, G. y Cabrini, G. (1993). Protein kinase C activates chloride conductance in C127 cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *J Biol Chem.* **268**: 11321-5
48. Dicker, F., Quitterer, U., Winstel, R., Honold, K. y Lohse M. J. (1999). Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(10): 5476-81
49. Diviani, D., Lattion, A. L. y 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
50. Doronin, S., Shumay, E., Wang, H. Y. y Malbon, C. C. (2002). Akt mediates sequestration of the beta (2)-adrenergic receptor in response to insulin. *J. Biol. Chem.* **277** (17): 15124-31
51. Dubin, A.E., Bahnson, T., Weiner, J.A., Fukushima, N. y 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

52. Durieux, M. E., Salafranca, M. N., Lynch, K. R. y Moorman, R. (1992). Lysophosphatidic acid induces a pertussis toxin-sensitive  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^-$  current in *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol.* **263**(4 pt 1):C896-900
53. Duyster, J., Schwende, H., Fitzke, E., Hidaka, H. y Dieter, P. (1993) Different roles of protein kinase C- $\beta$  and - $\delta$  in arachidonic acid cascade, superoxide formation and phosphoinositide hydrolysis. *Biochem. J.* **292**: 203-207
54. Eberhardt, C., Gray, P.W. y Tjoelker, L.W. (1997). Human lysophosphatidic acid acyltransferase. cDNA cloning, expression, and localization to chromosome 9q34.3. *J Biol Chem*, **272**: 20299-305
55. Ediger, T.L., Schulte, N.A., Murphy, T.J. y Toews, M.L. (2003). Transcription factor activation and mitogenic synergism in airway smooth muscle cells. *Eur Respir J.* **21**: 759-69
56. Eichholtz, T., Jalink, K., Fahrenfort, I. y Moolenaar, W.H. (1993). The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J*, **291** (3): 677-80
57. Eilers, M., Hornak, V., Smith, S. O. y Konopka, J. B. (2005) Comparison of Class A and D G Protein-Coupled Receptors: Common Features in Structure and Activation. *Biochemistry.* **44**: 8959-75
58. El-Shewy, H. M., Jonson, K. R., Lee, M-H., Jaffa, A. A., Obeid, L. M. y Luttrell, L. M. (2006). Insulin-like growth factors mediate heterotrimeric G protein-depend ERK1/2 activation by transactivating sphingosine-1-phosphate receptors. *JBC* **M605339200**:1-11
59. Exton, J. H. (1994). Phosphoinositide phospholipases and G proteins in hormone action. *Annu. Rev. Physiol.* **56**: 349-69
60. 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. y 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
61. Fang, X., Yu, S., LaPushin, R., Lu, Y., Furui, T., Penn, L.Z., Stokoe, D., Erickson, J.R., Bast, R.C., Jr. y Mills, G.B. (2000). Lysophosphatidic acid prevents apoptosis in fibroblasts via G(i)-protein-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem J*, **352** (1): 135-43

62. Farrens, D. L. et al. (1996). Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for activation of rhodopsin. *Science* **274**: 768-70
63. Fergusson, S. S. y Caron, M. G. (1998). G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **9**(2): 119-27
64. Ferguson, S. S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol.Rev.* **53**: 1-24.
65. Fischer, D.J., Liliom, K., Guo, Z., Nusser, N., Virag, T., Murakami-Murofushi, K., Kobayashi, S., Erickson, J.R., Sun, G., Miller, D.D. y 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.
66. Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L-G. y Schiöth, H. B. (2003) The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **63**: 1256-72
67. Fricke, U. (1975). Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton X-100. *Anal. Biochem.* **63**: 555-8.
68. Fueller, M., Wang, D. A., Tigyi, G., y Siess, W. (2003). Activation of human monocytic cells by lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Cellular Signaling.* **15**: 367- 375
69. Fujiwara, Y., Sebok, A., Meakin, S., Kobayashi, T., Murakami-Murofushi, K., y Tigyi, G. (2003). Cyclic phosphatidic acid elicits neurotrophin-like actions in embryonic hippocampal neurons. *J. Neurochem.* **87**(5): 1272-83
70. Fukushima, N., Weiner, J.A. y Chun, J. (2000). Lysophosphatidic acid (LPA) is a novel extracellular regulator of cortical neuroblast morphology. *Dev Biol*, **228**: 6-18
71. Fukushima, N., Ishii, I., Contos, J. A., Weiner, J. A. y Chun, J. (2001). Lysophosphatidic receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**:507–34
72. Galnadrin, S. y Bouvier, M. (2006) Distinct Signaling profiles of  $\beta_1$  and  $\beta_2$  Adrenergic receptor Ligands toward adenylyl Cyclase and Mitogen-Activated Protein Kinases Reveals the Pluridimensionality of Efficacy. *Mol. Pharmacol.* **70**: 1575-84.

73. García-Caballero, A., Olivares-Reyes, J. A., Catt, K. J. y García-Sáinz, 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**(3): 576-85
74. García-Sáinz, J. A., Vázquez-Prado, J. y Medina, L. C. (2000). Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.* **389**: 1-12
75. George, S. R., O'Dowd, B. F., y Lee, S. (2002). G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **1**(10): 808–20
76. Gether, U., Kobilka, B. (1998). G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* **273**: 17979-82
77. Gerrard, J.M. y Robinson, P. (1989). Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin. *Biochim Biophys Acta*, **1001**: 282-5
78. Ghayur, T., Hugunin, M., Talanian, R.V., Ratnofsky, S., Quinlan, C., Emoto, Y., Pandey, P., Datta, R., Huang, Y., Kharbanda, S., Allen, H., Kamen, R., Wong, W. y Kufe, D. (1996) Proteolytic activation of protein kinase C d by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J. Exp. Med.* **184**: 2399-2404
79. Gibbs, T.C., Y. Xie, and K.E. Meier. (2000). Regulation of expression of EDG family receptors in human prostate cancer cell lines. *Ann. NY Acad. Sci.* **905**:290–3
80. Gilman, A.G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 615–49
81. Gobeil, F., Bernier, S. G., Vázquez-Tello, A., Brault, S., Beauchamp, M. H., Quiniou, C., Marrache, A .M.Checchin, D., Sehmlaub, F., Hou, X., Nader, M., Bkaily, G., Ribeiro-da-Silva, A., Goetzl, E. J. y Chemtob S. (2003). Modulation of pro-inflammatory gene expression by nuclear lysophosphatidic acid receptor type 1. *J. Biol. Chem.* **278**(40): 38875-83
82. Gonda, Y., Nishizawa, K. y Ando, S. (1990). Involvement of protein kinase-C in the regulation of assembly-disassembly of neurofilaments *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* **167**: 1316-25

83. González-Arenas, A. Aguilar-Maldonado, B., Avendaño-Vázquez, S. E. y García-Sáinz, J. A. (2006). Estrogens Cross-Talk to  $\alpha_{1b}$ -Adrenergic Receptors. *Molecular Pharmacology*. **70**: 154-62
84. Goodman, O. B. Jr., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H. y Benovic, J. L. (1996). Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **383**(6599): 447-50
85. Groarke, D. A., Wilson, S., Krasel, C., y Milligan, G. (1999). Visualization of agonist-induced association and trafficking of green fluorescent protein-tagged forms of both beta-arrestin-1 and the thyrotropin-releasing hormone receptor-1. *J. Biol. Chem.* **274** (3): 23263–9
86. Grynkiewicz, G., Poenie, M. y Tsien, R.Y. (1985). A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, **260**: 3440-50.
87. Gsandtner, I., Charalambous, C., Stefan, E., Ogris, E., Freissmuth, M. y Zezula, J. (2005). Heterotrimeric G Protein-independent Signaling of a G Protein-coupled Receptor. Direct binding of ARNO/Cytohesin-2 to the carboxyl terminus of the  $A_2$  adenosine receptor is necessary for sustained activation of ERK/MAP kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **280**: 31898–905
88. Gschwind, A., Zwick, E., Prenzel, N., Leserer, M. y Ullrich, A. (2001). Cell communication networks: epidermal growth factor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transduction. *Oncogene*. **20**: 1594-1600
89. Hadcock, J. R., Port, J. D., Gelman, M. S. y 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**(36): 26017-22
90. Hague, C., Lee, S. E., Chen, Z., Prinster, S. C., Hall, R. A. y Minneman, K. P. (2005). Heterodimers of  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1D}$ -adrenergic receptors form a single functional entity. *Mol. Pharm.* **69**: 45-54
91. Hall, R., Premont, R., y Lefkowitz, R. J. (1999). Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J. Cell Biol.* **145**:927–32.
92. Hama, K., Bandoh, K., Kakehi, Y., Aoki, J. y 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
93. Handock, J. R., Port, J. D., Gelman, M. S. y 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
  94. Hanyaloglu, A. C., Vrecl, M., Kroeger, K. M., Miles, L. E., Qian, H., Thomas, W. G., y Eidne, K. A. (2001). Casein kinase II sites in the intracellular C-terminal domain of the thyrotropin-releasing hormone receptor and chimeric gonadotropin-releasing hormone receptors contribute to beta-arrestin-dependent internalization. *J. Biol. Chem.* **276**(21): 18066–74
  95. Hayashi, K., Takahashi, M., Nishida, W., Yoshida, K., Ohkawa, Y., Kitabatake, A., Aoki, J., Arai, H. y Sobue, K. (2001). Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids. *Circ Res*, **89**: 251-8
  96. He, R., Browning, D. D. y Ye, R. D. (2001). Differential Roles of the NPXXY Motif in Formyl Peptide Receptor Signaling. *The Journal of Immunology*, **166**: 4099-4105
  97. Hecht, J. H., Weiner, J. A., Post S. R. y Chun J. (1996). Ventricular Zone Gene-1 (*vzg-1*) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *The Journal of Cell Biology* **135**: 1071-83
  98. Heck, M. y Hofmann, K. P. (2001). Maximal rate and nucleotide dependence of rhodopsin-catalyzed transducin activation: initial rate analysis based on a double displacement mechanism. *J. Biol. Chem.* **276**: 10000-9
  99. Hein, P., Frank, M., Hoffmann, C., Lohse, M. J. y Bünemann, M. (2005). Dynamics of receptor/G coupling in living cells. *The EMBO Journal* **24**: 4106-13
  100. Herlitze, S., Garcia, D. E., Mackie, K., Hille, B., Scheuer, T., y Catterall, W. A. (1996). Modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **380**(6571): 258–62
  101. Herrick-Davis, K., Grinde, E., y Mazurkiewicz, J. (2004). Biochemical and biophysical characterization of serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor homodimers on the plasma membrane of living cells. *Biochemistry* **43**(4): 13963–71



102. Hill, S. M. (1998). Receptor Crosstalk: Communication Through Cell Signaling Pathways. *Anat. Rec. (New Anat.)* **253**: 42-8
103. Hinokio, K., Yamano, S., Nakagawa, K., Irahara, M., Kamada, M., Tokumura, A. y 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
104. Hla, T., Lee, M. J., Ancellin, N., Paik, J. H., y Kluk, M. J. (2001). Lysophospholipids-receptor revelations. *Science* **294**(5548): 1875– 8
105. Hobson, J. P., Rosenfeldt, H. M., Barak, L. S., Oliveira, A., Poulton, S., Caron, M. G., Milstein, S. y Spiegel, S. (2001). Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science*. **291**(5509): 1800-3
106. Ho, R. J. y Sutherland, E. W. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (**72**): 1773-77
107. Hopper, D. W., Ragan, S. P., Hooks, S. B., Lynch, K. R. y Macdonald, T. L. (1999) Structure--activity relationships of lysophosphatidic acid: conformationally restricted backbone mimetics. *J Med Chem*, **42**: 963-70
108. Howlett, A. C. (2005). A short guide to the nomenclature of seven-transmembrane spanning receptors for lipid mediators, *Life Sci*. **77**: 1522–30
109. Huang, H., Sun, Y. y Huang, X. Y. (2004). Distinct Roles for Src Tyrosine Kinase in  $\beta_2$ -Adrenergic Receptor Signaling to MAPK and in Receptor Internalization. *J. Biol. Chem.* **279**: 21637-42
110. Hunyady, L. Baukal, A. J. Gáborik, Z., Olivares-Reyes, J. A., Szaszák, M., Lodge, R., Catt, K. J. y Balla, T. (2002). Differential PI 3-kinase dependence of early and late phases of recycling of the internalized AT<sub>1</sub> angiotensin receptor. *J Cell Biol.* **157** (7):1211-22
111. Huxley, J. H. (1999). Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **274**: 7599-7602
112. Iacovelli, L. Capobianco, L. D'Ancona, G. M., Picascia, A., 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** (1): 103-10
113. Inoue, M., Rashid, M. H., Fujita, R., Contos, J. J., Chun, J., y Ueda, H. (2004). Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nat.Med.* **10** (7): 712-8

114. Insel, P. A., Head, B. P., Ostrom, R. S., Patel, H. H., Swaney, J. S., Tang, C-M y Roth, D. M. (2005). Caveolae and Lipid Rafts G Protein–Coupled Receptor Signaling Microdomains in Cardiac Myocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1047**: 166–172 (a)
115. Insel, P. A., Head, B. P., Patel, H. H., Roth, D. M., Bunday, R. A. y Swaney, J. S. (2005). Compartmentation of G-protein-coupled receptors and their signalling components in lipid rafts and caveolae. *Biochem. Soc. Trans.* **33**: 1131-34 (b)
116. Ishii, I., Fukushima, N., Ye, X. y Chun, J. (2004). Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu. Rev. Biochem.* **73**: 321–54
117. Itagaki, K., Kannan, K.B. y Hauser, C.J. (2005). Lysophosphatidic acid triggers calcium entry through a non-store-operated pathway in human neutrophils. *J Leukoc Biol.* **77**: 181-9
118. Jalink, K., van Corven, E.J. y Moolenaar, W.H. (1990). Lysophosphatidic acid, but not phosphatidic acid, is a potent Ca<sup>2+</sup>-mobilizing stimulus for fibroblasts. Evidence for an extracellular site of action. *J Biol Chem*, **265**: 12232-9.
119. Jalink, K., Moolenaar, W.H. y Van Duijn, B. (1993). Lysophosphatidic acid is a chemoattractant for Dictyostelium discoideum amoebae. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**: 1857-61
120. Jalink, K., van Corven, E.J., Hengeveld, T., Morii, N., Narumiya, S. y 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
121. 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. y Moolenaar, W.H. (1995). Lysophosphatidic acid-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization in human A431 cells: structure-activity analysis. *Biochem J*, **307** (2): 609-16
122. Janssens, R., Boeynaems, J. M., Godart, M., y Communi, D. (1997). Cloning of a human heptahelical receptor closely related to the P2Y5 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**(1): 106-112
123. Javitch, J. A. (2004). The ants go marching two by two: oligomeric structure of G-protein-coupled receptors. *Mol. Pharmacol.* **66**(5): 1077–82

124. Jiang, Z. Y., Zhou, Q. L., Coleman, K.A., Chouinard, M., Boese, Q. y Czech, M. P. Insulin signaling through Akt\_protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *PNAS* **100**(13): 7569-74
125. 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. y Gerald, C. (1998). GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature*. **396**(6712): 674–9
126. Kandel, E. S. y Hay, N. (1999). The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp. Cell. Res.* **253**: 210– 29
127. Karnik, S. S., Gogonea, C., Patil, S, Saad, Y. y Takezako, T. (2003) Activation of G-protein-coupled receptors: a common molecular mechanism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. **14**: 431-37
128. Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., Karschin, A. y Bettler, B. (1998). GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* **396**: 683-7
129. Kefalas, P., Brown, T. R. y Brickell, P. M. (1995). Signalling by the p60c-src family of protein-tyrosine kinases. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **27**(6): 551-63
130. Kingsbury, M. A., Rehen, S. K., Ye, X.. y Chun, J. (2004). Genetics and cell biology of lysophosphatidic acid receptor-mediated signaling during cortical neurogenesis. *J Cell Biochem.* **92** (5): 1004-12
131. Klabunde, T. y Evers, A. (2005). GPCR Antitarget modeling: Pharmacophore models for biogenic amine binding GPCRs to avoid GOCR-mediated side effects. *ChemBioChem.* **6**: 876-89
132. Kohout, T. A., Lin, F. S., Perry, S. J., Conner, D. A., y Lefkowitz, R. J. (2001). Beta-Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 1601–6
133. Kolakowski, L. F. Jr (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Recept. Channels* **2**:1–7
134. Kotarsky, K., Boketoft, Å., Bristulf, J., Nilsson, N. E., Norberg, Å., Hansson, S., Owman, C., Sillard, R., Leeb-Lundberg, L. M. F. y Olde, B. (2006). Lysophosphatidic Acid Binds to and Activates GPR92, a G Protein-Coupled

- Receptor Highly Expressed in Gastrointestinal Lymphocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* **318**(2): 619-28.
135. Kumagai, N., Morii, N., Fujisawa, K., Yoshimasa, T., Nakao, K. y 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
  136. Krumins, A. M. y Gilman, A. G. (2006). Targeted Knockdown of G Protein Subunits Selectively Prevents Receptor-mediated Modulation of Effectors and Reveals Complex Changes in Non-targeted Signaling Proteins. *J Biol. Chem.* **281**: 10250-62
  137. Krupnick, J. G. y Benovic, J. L. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**: 289-319
  138. Latchoumycandane, C., Anantharam, V., Kitazawa, M., Yang, Y., Kanthasamy, A. y Kanthasamy, A. G. (2005). Protein Kinase C<sub>β</sub> Is a Key Downstream Mediator of Manganese-Induced Apoptosis in Dopaminergic Neuronal Cells *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (JPET) **313**:46–55
  139. Lee, C-W., Rivera, R., Dubin, A. E. y Chun, J. (2006). LPA<sub>4</sub>/GPR23 is an LPA receptor utilizing G<sub>s</sub>, G<sub>q</sub>/G<sub>i</sub>-mediated calcium signaling and G<sub>12/13</sub>-mediated Rho activation. *J. Biol. Chem.* **M6010826200**: 1-21(a)
  140. Lee, C. W., Rivera, R., Gardell, S., Dubin, A. E. y Chun, J. (2006). GPR92 as a new G<sub>12/13</sub> and G<sub>q</sub> coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP: LPA<sub>5</sub>, *J. Biol. Chem.* **281**: 23589- 97 (b)
  141. Lee, Y. S., Dlugosz, A. A., McKay, R., Dean, N. M. y Yuspa1, S. H. (1997). Definition by Specific Antisense Oligonucleotides of a Role for Protein Kinase Ca in Expression of Differentiation Markers in Normal and Neoplastic Mouse Epidermal Keratinocytes. *Mol. Carcinog.* **18**:44–53
  142. Leeb-Lundeberg, L. M., Cotecchia, S, DeBlasi, A, Caron, M. G. y Leftkowitz, R. J. Regulation of Adrenergic receptor Function by Phosphorilation. I Agonist-promoted desentization and phosphorylation of α<sub>1</sub>- adrenergic receptors coupled to inositol phospholipids metabolism in DDt1 MF-2 smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **262** (7): 3098-3105

143. Lebedeva, I. y Stein, C. A. (2001). Antisense Oligonucleotides: Promise and Reality. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**:403–19
144. Lefkowitz, R. J., Pitcher, J., Krueger, K. y Daaka, C. C. (1998). Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *Adv. Pharmacol.* **42**: 416-20
145. Lefkowitz, R. J. (1998). G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem.* **273**(30): 18677–80
146. Lefkowitz, R. J. (2004) Historical review: A brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol. Sci* **25**: 413-22 (a)
147. Lefkowitz, R. J., y Whalen, E. J. (2004). Beta-arrestins: traffic cops of cell signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**: 162–168 (b)
148. Lefkowitz, R. J. y Shenoy, S. K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* **308** (5721): 512–7
149. Levoye, A., Dam, J., Ayoub, M. A., Guillaume, J-L. Couturier, C., Delagrang, P. y Jockers, R. (2006). The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT<sub>1</sub> melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO Journal* **25**: 3012-23
150. Li, Y., Gonzalez, M.I., Meinkoth, J.L., Field, J., Kazanietz, M.G. y Tennekoon, G.I. (2003). Lysophosphatidic acid promotes survival and differentiation of rat Schwann cells. *J Biol Chem*, **278**: 9585-91
151. Lin, F. T., Krueger, K. M., Kendall, H. E., Daaka, Y., Fredericks, Z. L., Pitcher, J. A., y Lefkowitz, R. J. (1997). Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1. *J. Biol. Chem.* **272**: 31051–7
152. Liu, W. S. y Heckman, C. A. (1998). The Sevenfold Way of PKC Regulation. *Cell Signal.* **10**(8): 529-42
153. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L. S., Matsudaira, P., Baltimore, D. y Darnell, J. 2000. *Molecular Cell Biology*. 4<sup>a</sup> Ed. W. H. Freeman, Nueva York.
154. Lohse, M. J., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. y Benovic, J. L. (1989). Inhibition of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase prevents rapid homologous desensitization of  $\beta_2$ -adrenergic receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3011-15

155. Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G. y Lefkowitz, R. J. (1990).  $\beta$ -Arrestin: A Protein That Regulates  $\beta$ -Adrenergic Receptor Function. *Science*. **248**: 1547-9
156. Ludt, J., Tonnessen, T. I., Sandvig, K. y Olsnes, S. (1991). Evidence for involvement of protein kinase C in regulation of intracellular pH by  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  antiport. *J Membrane Biol.* **119**: 179-86.
157. Lynch, K. R. y Macdonald, T. L. (2001). Structure activity relationships of lysophospholipid mediators. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **64**: 33-45
158. Lynch, K. R. (2002). Lysophospholipid receptor nomenclature. *Biochim Biophys Acta*. **1582** (1-3): 70– 1
159. Malherbe, P. et al. (2001) Identification of essential residues involved in the glutamate binding pocket of the group II metabotropic glutamate receptor. *Mol. Pharmacol.* **60**: 944–54
160. Medina, L. C., Vazquez-Prado, J., Torres-Padilla, M. E., Mendoza-Mendoza, A., Cruz-Munoz, M. E., Garcia-Sainz, J. A. (1998). Crosstalk: phosphorylation of  $\alpha 1\text{b}$ -adrenoceptors induced through activation of bradykinin B2 receptors. *FEBS Lett.* **422**(2):141-5
161. McDonald, P. H., Chow, C-W., Millar, W. E., Laporte, S. A., Field, M. E., Lin, F-T., Davis, R. J. y Lefkowitz (2000).  $\beta$ -Arrestin 2: A receptor-Regulated MAPK Scaffold for the Activation of JNK3. *Science* **290**: 1574-8
162. McIntyre, T. M., Pontsler, A. V., Silva, A. R., Hilaire, A. S., Xu, Y., Hinshaw, J. C., Zimmerman, G. A., Hama, K., Auki, J., Arai, H. y Prestwitch, G. D. (2003). Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPAR $\gamma$ agonist. *PNAS* **100** (1): 131-6
163. Milligan, G. y Kostenis, E. (2006). Hetrotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol.* **147**: S46-55
164. Mills, G.B. y Moolenaar, W.H. (2003). The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer.* **3**: 582-91
165. Miura, S. et al. (2003). TM2-TM7 interaction in coupling movement of transmembrane helices to activation of the angiotensin II type-1 receptor. *J. Biol. Chem.* **278**: 3720-25
166. Mochly-Rosen, D. (1995) Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* **268**, 247-251

167. Molina-Muñoz, T., Romero-Avila, M. T. y García-Saínz, J. A. (2006). Insulin-like growth factor-I induces alpha(1B)-adrenergic receptor phosphorylation through G beta gamma and epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol Endocrinol.* **20**(11): 2773-83
168. Moolenaar, W.H. (1994). LPA: a novel lipid mediator with diverse biological actions. *Trends Cell Biol*, **4**: 213-9
169. Moolenaar, W. H. (1999). Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp. Cell Res.* **253**: 230–38
170. Mukherjee, S., Palczewski, K., Gurevich, V., Benovic, J. L., Banga, J. P. y Hunzicker-Dunn, M. (1999). A direct role for arrestins in desensitization of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor in porcine ovarian follicular membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(23): 493-8
171. Murph, M. M., Scaccia, L. A., Volpicelli, L. A. y Radhakrishna, H. (2003). Agonist-induced endocytosis of lysophosphatidic acid-coupled LPA<sub>1</sub>/EDG-2 receptors via a dynamin2- and Rab5-dependent pathway. *J Cell Sci.* **116**(10): 1969-80
172. Neubig, R. R. (1994). Membrane organization in G-protein mechanisms. *FASEB J.* **8**: 939-46.
173. Newton, A.C. (2001). Protein Kinase C: Structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem. Rev.* **101**: 2353-64
174. Newton, A. C. (2004). Diacylglycerol's affair with protein kinase C turns 25, *Trends Pharmacol. Sci.* **25**: 175–177.
175. Ng, T., Shima, D., Squire, A., Bastiaaens, P. I. H., Gschmeissne, S., Humphries, M. J. y Parker, P. J. (1999). PKCa regulates b1 integrin-dependent cell motility through association and control of integrin traffic. *The EMBO Journal* **18** (14): 3909–23
176. Noguchi, K., Ishii, S. y 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.* **28**: 25600-6
177. O'Dowd, B. F., Hnatowich, M., Regan, J. W., Leader, W. M., Caron, M. G., y Lefkowitz, R. J. (1988). Site-directed mutagenesis of the cytoplasmic domains of the human  $\beta$ 2-adrenergic receptor. Localization of regions involved in G protein-receptor coupling. *J. Biol. Chem.* **263**:15985–92.

178. O'Driscoll, K.R., Teng, K.K., Fabbro, D., Greene, L.A. y Weinstein, I.B. (1995) Selective translocation of protein kinase C-d in PC12 cells during nerve growth factor-induced neuritogenesis. *Mol. Biol. Cell* **6**: 449-458
179. Pages, G., Girard, A., Jeanneton, O., Barbe, P., Wolf, C., Lafontan, M., Valet, P. y Saulnier-Blache, J. S. (2000). LPA as a paracrine mediator of adipocyte growth and function. *Ann N Y Acad Sci*, **905**: 159-64
180. Pagès, C., Simon, M-F. Valet, P. y Saulnier-Blanche, J. S. (2001). Lysophosphatidic acid and synthesis and release. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* **64**: 1-10
181. Panther, E., Idzko, M., Corinti, S., Ferrari, D., Herouy, Y., Mockenhaupt, M., Dichmann, Gebicke-Haerter, P., Di Virgilio, F., Girolomoni, G y Norgauer, J. (2002). The Influence of Lysophosphatidic Acid on the Functions of Human Dendritic Cells. *J Immuno.* (**169**): 4129-35
182. Parizi, M., Howard, E.W. y 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
183. Patel, T. B. (2004). Single Transmembrane Spanning Heterotrimeric G Protein-Coupled Receptors and Their Signaling Cascades. *Pharmacol Rev* **56**:371–85.
184. Pawson, T., y Scott, J. D. (1997) Signaling through scaffold, anchoring and adaptor proteins. *Science* **278**: 2075–2080
185. Pessino, A., Passalacqua, M., Sparatore, B., Patrone, M., Melloni, E. y Pontremoli, S. (1995) Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of de protein kinase C expression accelerates induced differentiation of murine erythroleukaemia cells. *Biochem. J.* **312**: 549-54
186. Peter, M., Ameer-Beg, S. M., Hughes, M. K. Y., Keppler, M. D., Prag, S., Marsh, M., Vojnovic, B. y Ng, T. (2005). Multiphoton-FLIM Quantification of the EGFP-mRFP1 FRET Pair for Localization of Membrane Receptor-Kinase Interactions. *Biophys. J.* **88**: 1224-37.
187. Petrosky, K. Y., Ou, H. D., Löhr, F., Dötch, V. y Lim, W. A. (2005). A General Model for Preferential Hetero-oligomerization of LIN-2/7 Domains. Mechanism Underlying Directed Assembly of Supramolecular Signaling Complexes. *J. Biol. Chem.* **280** (46): 38528-36



188. Pietruck, F., Busch, S., Virchow, S., Brockmeyer, N. y Siffert, W. (1997). Signalling properties of lysophosphatidic acid in primary human skin fibroblasts: role of pertussis toxin-sensitive GTP-binding proteins. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **355**:1–7
189. Post, S. R., Aguila-Buhain, O. e Insel, P. A. (1996). A key role for protein kinase A in homologous desensitization of the beta 2-adrenergic receptor pathway in S49 lymphoma cells. *J. Biol. Chem.* **271**(2): 895-900
190. Postma, F.R., Jalink, K., Hengeveld, T., Offermanns, S. y Moolenaar, W.H. (2001). G $\alpha$  (13) mediates activation of a depolarizing chloride current that accompanies RhoA activation in both neuronal and nonneuronal cells. *Curr Biol*, **11**: 121-4
191. Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C. y Ullrich, A. (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*. 402:884–8
192. Prinster, S. C., Hague, C. y Hall, R. A. (2005). Heterodimerization of G-protein coupled receptors: Specificity and Functional Significance. *Pharmacol Rev.* **57**(3): 289-98
193. Radeff-Huang, J., Seasholtz, T. M., Matteo, R. G. y Brown, J. H. (2004). G protein mediated signaling pathways in lysophospholipid induced cell proliferation and survival. *J. Cell. Biochem.* **92**: 949–66
194. Rajagopal, K., Lefkowitz, R. J., y Rockman, H. A. (2005) When 7 transmembrane receptors are not G protein–coupled receptors. *J. Clin. Invest.* **115**: 2971-74
195. Ramakers, G.J. y Moolenaar, W.H. (1998). Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid. *Exp Cell Res.* **245**: 252-62
196. Rapacciuolo, A., Suvarna, S., Barki-Harrington, L., Luttrell, L. M., Cong, M., Lefkowitz, R. J. y 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
197. Renback, K., Inoue, M. y 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

198. Roberts, R., Sciorra, V.A. y 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
199. Rocheville, M., Lange, D. C., Kumar, U., Patel, S. C., Patel, R. C. y Patel, Y. C. (2000). Receptors for Dopamine and Somatostatin: Formation of Hetero-Oligomers with Enhanced Functional Activity. *Science*. **288**: 154- 7
200. Romero-Ávila, M. T., Flores-Jasso, C. F. y García-Sáinz, J. A. (2002). Alpha1B-Adrenergic receptor phosphorylation and desensitization induced by transforming growth factor-beta. *Biochem. J*. **368**: 581-7
201. Rosenfeldt, H. M., Hobson, J. P., Milstien, S. y Spiegel, S. (2001). The sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 is essential for platelet-derived growth factor-induced cell motility. *Biochem Soc Trans*. **29**(Pt 6): 836-9
202. Rosenkilde, M. M., Kledal, T. N. y Schwartz, T. W. (2005). High Constitutive Activity of a Virus-Encoded Seven Transmembrane Receptor in the Absence of the Conserved DRY Motif (Asp-Arg-Tyr) in Transmembrane Helix 3. *Mol Pharmacol* **68**:11-19
203. Ross, E. M. y Wilkie, T. M. (2000). GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like-proteins. *Annu. Rev. Biochem*. **69**: 795-827
204. Saba, J. D. (2004). Lysophospholipids in Development: Miles Apart and Ending In. *J Cell Biochem* **92**: 967-92-9.
205. Sakai, J., Oike, M., Hirakawa, M. y Ito, Y. (2003). Theophylline and cAMP inhibit lysophosphatidic acid-induced hyperresponsiveness of bovine tracheal smooth muscle cells. *J Physiol*, **549**: 171-80
206. Salahpour, A., Angers, S., Mercier, J. F., Lagace, M., Marullo, S. y Bouvier, M. (2004). Homodimerization of the  $\beta_2$ -Adrenergic Receptor as a Prerequisite for Cell Surface Targeting. *J Biol Chem* **279**: 33390-97
207. Sánchez-Lemus, E. y Arias-Montaño, J. A. (2004). Transactivación de receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK's) por receptores acoplados a proteínas G. *Rev Biomed* **15**:33-48.
208. Sander, J. y Myatt, L. (1990). Regulation of prostaglandin-E2 synthesis in human amnion by protein kinase-C. *Prostaglandins*. **39**: 355-63

209. Sano, T., Baker, D., Virag, T., Wada, A., Yatomi, Y., Kobayashi, T., Igarashi, Y. y 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
210. Santos, W. L., Rossi, J. A., Boggs, S. D. y MacDonald, T. L. (2000). The molecular pharmacology of lysophosphatidate signaling. *Ann N Y Acad Sci*, **905**: 232-41
211. Sasagawa, T., Okita, M., Murakami, J., Kato, T. y Watanabe, A. (1999). Abnormal serum lysophospholipids in multiple myeloma patients. *Lipids*. **34**: 17-21
212. Sawada, K., Morishige, K., Tahara, M., Ikebuchi, Y., Kawagishi, R., Tasaka, K. y 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
213. Sawai, H., Okazaki, T., Takeda, Y., Tashima, M., Sawada, H., Okuma, M., Kishi, S., Umehara, H. y Domae, N. (1997) Ceramide-induced translocation of protein kinase C-d and -1 to the cytosol. *J. Biol. Chem.* **272**: 2452-8
214. Sayas, C.L. Ariaens, A., Ponsioen, B. y Moolenaar, W. H. (2006). GSK-3 Is Activated by the Tyrosine Kinase Pyk2 during LPA1-mediated Neurite Retraction. *Mol Biol Cell*. **17**(4): 1834-44
215. Schmidt, P., Holsboer, F. y Spengler, D. (2001). Beta(2)-adrenergic receptors potentiate glucocorticoid receptor transactivation via G protein beta gamma-subunits and the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Mol. Endocrinol.* **15**(4): 533-64
216. Schnitzler, G. R. Briscoe, C., Brown, J .M. y Firtel, R. A. (1995). Serpentine cAMP receptors may act through a G protein-independent pathway to induce postaggregative development in Dictyostelium. *Cell*. **81**(5): 737-45
217. Scott, M. G., Benmerah, A., Muntaner, O., y Marullo, S. (2002). Recruitment of activated G protein-coupled receptors to pre-existing clathrin-coated pits in living cells. *J. Biol. Chem.* **277** (5): 3552-9
218. Seta, K., Nanamori, M., Modrall, J. G., Neubig, R. R. y Sadoshima, J. (2002). AT1 receptor mutant lacking heterotrimeric G protein coupling activates the Src-Ras-ERK pathway without nuclear translocation of ERKs. *J. Biol. Chem.* **277**(11): 9268-77

219. Shah, B. H., Baukal, A. J., Shah, F. B. Catt, K. J. (2006). Role of Metalloproteinase-dependent EGF receptor activation in  $\alpha$ 1-adrenoceptor-stimulated MAP kinase phosphorylation in GT1-7 neurons. *J Neurochem.* **96**: 520–32
220. Shin, M., Lin, F., Scott, J. D. Wang, H. Y. y Malbon, C. C. (1999). Dynamic complexes of beta2-adrenergic receptors with protein kinases and phosphatases and the role of gravin. *J. Biol. Chem.* **274**(3): 1588-95
221. Shin, M. y Malbon, C. C. (1996). Protein Kinase C Deficiency Blocks Recovery from Agonist-induced Desensitization. *J. Biol. Chem.* **275** (35): 21478-83
222. Shen, Z., Belinson, J., Morton, R.E., Xu, Y. y Xu, Y. (1998). Phorbol 12-myristate 13-acetate stimulates lysophosphatidic acid secretion from ovarian and cervical cancer cells but not from breast or leukemia cells. *Gynecol Oncol*, **71**: 364-8
223. Shenoy, S. K., McDonald, P. H., Kahout, T .A. y Lefkowitz, R. J. (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta-2 adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* **294**: 1307–13
224. Shenoy, S. K., y Lefkowitz, R. J. (2003). Multifaceted roles of betaarrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem. J.* **375**: 503–515
225. Siess, W., Zangl, K.J., Essler, M., Bauer, M., Brandl, R., Corrinth, C., Bittman, R., Tigyi, G. y 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.
226. Siess, W. (2002). Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta.* **1582**(1-3): 204– 15
227. Singleton, P. A., Dudek, S. M., Ma, S-F. y García, J. G. N. (2006). Transactivation of Sphingosine 1-Phosphate receptors Is Essential for Vascular Barrier Regulation. Novel Role for Hyaluronan and CD44 Receptor Family. *Journal of Biological Chemistry.* **281**: 34381-93
228. Spiegel, S. y Milstien, S. (1995). Sphingolipid metabolites: members of a new class of lipid second messengers. *J. Membr. Biol.* **146**:225–37

229. Stefan, C. J. y Blumer, K. J. (1994). The 3rd cytoplasmic loop of a yeast G-protein-coupled. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 3339–49.
230. Stam, J.C., Michiels, F., van der Kammen, R.A., Moolenaar, W.H. y Collard, J.G. (1998). Invasion of T-lymphoma cells: cooperation between Rho family GTPases and lysophospholipid receptor signaling. *Embo J*, **17**: 4066-74
231. Standaert, M. L., Cooper, D. R., Hernandez, H., Arnold, T. P. and Farese, R. V. (1993). Differential down-regulation of insulin-sensitive protein kinase-C isoforms by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in rat adipocytes and BC3H-1 myocytes. *Endocrinology* **132**: 689–692
232. Sugiura, T., Nakane, S., Kishimoto, S., Waku, K., Yoshioka, Y., Tokumura, A. y 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
233. Sugiura, T., Nakane, S., Kishimoto, S., Waku, K., Yoshioka, Y. y Tokumura, A. (2002). Lysophosphatidic acid, a growth factor-like lipid, in the saliva. *J Lipid Res*, **43**: 2049-55
234. Sukocheva, O., Wadham, C., Colmes, A., Albanese, N., Terrier, E., Feng, F., Bernal, A., Derian, C. K., Ullrich, A., Vadas, M. A. y Xia, P. (2006). Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1. *The Journal of Cell Biology* **173**: 301-10
235. Szallasi, Z., Denning, M.F., Smith, C.B., Dlugosz, A.A., Yuspa, S.H., Pettit, G.R. y Blumberg, P.M. (1994) Bryostatín 1 protects protein kinase C-d from down-regulation in mouse keratinocytes in parallel with its inhibition of phorbol ester-induced differentiation. *Mol. Pharmacol.* **48**: 840-850
236. Robinson, G. A., Butcher, R. W. y Sutherland, E. W. (1971). Cyclic AMP. Academic Press, New York: 5-13
237. Terrillon, S. y Bouvier, M. (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* **5**(1): 30-4
238. Tesmer, V. M., Kawano, T., Shankaranarayanan, A., Kozasa, T. y Tesmer, J. J. G. (2005). Snapshot of Activated G Proteins at the Membrane: The  $G\alpha_q$ -GRK2-G $\beta\gamma$  Complex. *Science*. **310**: 1686-90
239. Thompson, F.J. y Clark, M.A. (1994). Purification of a lysophosphatidic acid-hydrolysing lysophospholipase from rat brain. *Biochem J*, **300** (Pt 2): 457-61.

240. Tigyi, G. y 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
241. Tigyi, G., Hong, L., Yakubu, M., Parfenova, H., Shibata, M. y Leffler, C.W. (1995). Lysophosphatidic acid alters cerebrovascular reactivity in piglets. *Am J Physiol*, **268**: H2048-55
242. Tigyi, G. y Parrill, A.L. (2003). Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action. *Prog Lipid Res*, **42**: 498-526
243. Toews, M.L., Ustinova, E.E. y Schultz, H.D. (1997). Lysophosphatidic acid enhances contractility of isolated airway smooth muscle. *J Appl Physiol*, **83**: 1216-22
244. Tokumura, A., Fukuzawa, K. y Tsukatani, H. (1978). Effects of synthetic and natural lysophosphatidic acids on the arterial blood pressure of different animal species. *Lipids*, **13**: 572-4
245. Tokumura, A., Iimori, M., Nishioka, Y., Kitahara, M., Sakashita, M. y Tanaka, S. (1994). Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta. *Am J Physiol*, **267**: C204-10
246. Tokumura, A., Miyake, M., Nishioka, Y., Yamano, S., Aono, T. y Fukuzawa, K. (1999) Production of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in human follicular fluids of In vitro fertilization patients. *Biol Reprod*, **61**: 195-9
247. Tokumura, A., Majima, E., Kariya, Y., Tominaga, K., Kogure, K., Yasuda, K. y 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
248. Tomblor, E., Cabanilla, N. J., Carman, P., Permaul, N., Hall, J. J., Richman, R. W., Lee, J., Rodriguez, J., Felsenfeld, D. P., Hennigan, R. F. y Diverse' - Pierluissi, M. A. (2006). G Protein-induced Trafficking of Voltage-dependent Calcium Channels. *J. Biol. Chem.* **281** (3): 1827-39
249. Tomura, H., Mogi, C., Sato, K. y Okajima, F. (2005). Proton-sensing and lysolipidsensitive G-protein-coupled receptors: a novel type of multifunctional receptors. *Cell Signal.* **17**: 1466-76
250. Tyndall, J. D. A. y Sandilya, R. (2005) GPCR Agonist and Antagonist in the Clinic. *Medicinal Chemistry.* **1**: 405-21

251. Uhlenbrock, K., Gassenhuber, H. y Kostenis, E. (2002). Sphingosine 1-phosphate is a ligand of the human gpr3, gpr6 and gpr12 family of constitutively active G protein-coupled receptors, *Cell. Signal.* **14**: 941–53
252. Umezu-Goto, M., Kishi, Y., Taira, A., Hama, K., Dohmae, N., Takio, K., Yamori, T., Mills, G.B., Inoue, K., Aoki, J. y 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
253. Urs, N. M., Jones, K. T., Salo, P. D., Severin, J. E., Trejo, J. y Radhakrishna, H. (2005). A requirement for membrane cholesterol in the  $\beta$ -arrestin- and clathrin-dependent endocytosis of LPA<sub>1</sub> lysophosphatidic acid receptors. *Journal of Cell Science* **118**: 5291-5304
254. Van der Bend, R.L., de Widt, J., van Corven, E.J., Moolenaar, W.H. y 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**: 235-40
255. Van Corven, E.J., Groenink, A., Jalink, K., Eichholtz, T. y Moolenaar, W.H. (1989). Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell.* **59**: 45-54.
256. Van Corven, E.J., van Rijswijk, A., Jalink, K., van der Bend, R.L., van Blitterswijk, W.J. y 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
257. Van Dijk, M.C., Postma, F., Hilkmann, H., Jalink, K., van Blitterswijk, W.J. y Moolenaar, W.H. (1998). Exogenous phospholipase D generates lysophosphatidic acid and activates Ras, Rho and Ca<sup>2+</sup> signaling pathways. *Curr Biol*, **8**; 386-92
258. Vanhaesebroeck, B. y Alessi, D.R. (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* **346**: 561– 576
259. Van Leeuwen, F.N., Olivo, C., Grivell, S., Giepmans, B.N., Collard, J.G. y Moolenaar, W.H. (2003). Rac activation by lysophosphatidic acid LPA<sub>1</sub> receptors through the guanine nucleotide exchange factor Tiam1. *J Biol Chem*, **278(1)**: 400-6

260. Van Meeteren, L.A., Ruurs, P., Christodoulou, E., Goding, J.W., Takakusa, H., Kikuchi, K., Perrakis, A., Nagano, T. y Moolenaar, W.H. (2005). Inhibition of autotaxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem*, **280**: 21155-61
261. Van Nieuw Amerongen, G.P., Vermeer, M.A. y 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
262. Vazquez-Prado J, Medina LC, Garcia-Sainz JA. (1997). Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of alpha1b-adrenoreceptors in Rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem.* **272**(43):27330-7
263. Vázquez-Prado, J., Medina, L. C., Romero-Avila, M. T, González-Espinosa, C. y García-Sáinz, J. A. (2000). Norepinephrine- and Phorbol Ester-induced Phosphorylation of  $\alpha_{1a}$ -Adrenergic Receptors. *J. Biol. Chem.* **275** (9): 6553-9 (a)
264. Vázquez-Prado, J., Casas-González, P. y García-Sáinz, J. A. (2003). G protein –coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cell Signal.* **15**: 549-57
265. Wagner, R.W. (1994). Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* **372**:333–5
266. Wang, L., Cummings, R., Zhao, Y., Kazlauskas, A., Sham, J. K., Morris, A., Georas, S., Brindley, D. N. y Natarajan, V. (2003). Involvement of phospholipase D2 in lysophosphatidate-induced transactivation of platelet-derived growth factor receptor-beta in human bronchial epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **278**(41): 39931-40
267. Waters, C. M., Saatian, B., Moughal, N. A., Zhao, Y., Tigyi, G., Natarajan, V., Pyne, S. y Pyne, N. J. (2006). Integrin signaling regulates the nuclear localization and function of the lysophosphatidic acid receptor-1 (LPA1) in mammalian cells. *Biochem. J.* **398**: 55-62
268. Waters, C., Connell, M. C., Pyne, S. y Pyne N. J. (2005). c-Src is involved in regulating signal transmission from PDGFbeta receptor-GPCR(s) complexes in mammalian cells. *Cell Signal.* **17**(2): 263-77
269. Watson, S.P., McConnell, R.T. y 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
270. Weiner, J.A., Hecht, J.H. y 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
271. Westermann, A.M., Havik, E., Postma, F.R., Beijnen, J.H., Dalesio, O., Moolenaar, W.H. y Rodenhuis, S. (1998). Malignant effusions contain lysophosphatidic acid (LPA)-like activity. *Ann Oncol*, **9**: 437-42
272. White, J. H., Wise, A., Main, M. J., Green, A., Fraser, N. J., Disney, G. H., Barnes, A. A., Emson, P., Foord, S. M., y Marshall, F. H. (1998). Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature*. **396** (6712): 679–82
273. Wong, C. y Jin, Z-G. (2005) Protein kinase C-dependent protein kinase D activation modulates ERK signal pathway and endothelial cell proliferation by vascular endothelial growthfactor. *J. Biol. Chem.* **280** (39): 33262-9
274. Xie, Y., Gibbs, T. C., Mukhin, Y. V., y Meier, K. E. (2002). Role for 18:1 lysophosphatidic acid as an autocrine mediator in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* **277**:32516–26
275. Xu, Y., Gaudette, D.C., Boynton, J.D., Frankel, A., Fang, X.J., Sharma, A., Hurteau, J., Casey, G., Goodbody, A. y Mellors, A. (1995). Characterization of an ovarian cancer activating factor in ascites from ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res.* **1**: 1223-32
276. Xu, Y. (2002). Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine: G protein-coupled receptors and receptor-mediated signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* **1582**: 81–8
277. Xu, Y-H, Rathi, S. S. Zhang, M., Bhugra, P. y Dhalla, N. S. (2002). Mechanism of the Positive Inotropic effect of Lysophosphatidic Acid in Rat heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Therapeut.* **7**(2): 109-15
278. Xu, J., He, J., Castleberry, A. M., Balasubramanian, S., Lau, A. G. y Hall, R. A. (2003). Heterodimerization of alpha 2A- and beta 1-Adrenergic Receptors. *J Biol Chem.* **278**: 10770-7
279. Yanagida, K., Ishii, S., Hamano, F., Noguchi, K. y Shimizu, T. (2006). LPA<sub>4</sub>/p2y<sub>9</sub>/GPR23 mediates Rho-dependent morphological changes in a rat neuronal cell line. *J. Biol. Chem.* **M6010767200**:1-26

280. Yang, H., He, S., Quan, Z., Peng, W., Yan, B., Liu, J., Cao, R., Xu, Y., wen, G. y Hu, W. (2007). Small Interfering RNA-mediated Caveolin-1 Knockout on Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression in Insulin-stimulated Human Vascular Endothelial Cell. *Acta Biochim Biophys Sin* **39**: 224-33
281. Ye, X., Hama, K., Contos, J.J., Anliker, B., Inoue, A., Skinner, M.K., Suzuki, H., Amano, T., Kennedy, G., Arai, H., Aoki, J. y Chun, J. (2005). LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature*. **435** (7038): 104-8
282. Yu, R., y Hinkle, P. M. (1999). Signal transduction and hormone-dependent internalization of the thyrotropin-releasing hormone receptor in cells lacking G<sub>q</sub> and G<sub>11</sub>. *J. Biol. Chem.* **274**: 15745–50
283. Zamah, A. M., Delahunty, M., Luttrell, L. M., y Lefkowitz, R. J. (2002). Protein kinase A-mediated phosphorylation of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor regulates its coupling to G<sub>s</sub> and G<sub>i</sub>. Demonstration in a reconstituted system. *J Biol Chem.* **277**:31249–56
284. Zaslavsky, A., Singh, L. S., Tan, H., Ding, H., Liang, Z. y Xu, Y. (2006). Homo- and hetero-dimerization of LPA/S1P receptors, OGR1 and GPR4. *Biochim Biophys Acta.* **1071**(10): 1200-12
285. Zhang, H., Desai, N. N., Olivera, A., Seki, T. y Brooker G, (1991). Sphingosine-1 phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J. Cell. Biol.* **114**:155–67
286. Zhao, K-W., Li, X., Zhao, Q., Huang, Y., Li, D., Peng, Z-G., Shen, W-Z, Zhao, J., Zhou, Q., Chen, Z., Sims, P. J., Wiedmer, T. y Chen, G-Q. (2004). Protein kinase C<sub>γ</sub> mediates retinoic acid and phorbol myristate acetate–induced phospholipid scramblase 1 gene expression: its role in leukemic cell differentiation. *Blood* **104** (12): 3731-38
287. Zhao, Y. He, D., Saatian, B., Watkins, T., Spannhake, E. w., Pyne, N. J. y Natarajan, V. (2006). Regulation of Lysophosphatidic Acid-Induced Epidermal Growth Factor receptor Transactivation and Interleukin-8 Secretion in Human Bronchial Epithelial Cells by Protein Kinase C $\delta$ , Lyn Kinase, and Matrix Metalloproteinases. *J Biol. Chem.* **281**: 19501-11
288. Zheng, Y., Kong, Y. y 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

289. Zheng, Y., Voice, J. K., Kong, Y. y Goetzl, E. J. (2000). Altered expression and functional profile of lysophosphatidic acid receptors in mitogen-activated human blood T lymphocytes. *The FASEB Journal* (**14**): 2387-89
290. Zhu, C. C., Cook, L. B., y Hinkle, P. M. (2002). Dimerization and phosphorylation of thyrotropin-releasing hormone receptors are modulated by agonist stimulation. *J. Biol. Chem.* 277(31): 28228–37
291. Zhu, T., Gobeil, F., Vázquez-Tello, A., Leduc, M., Rihakova, L., Bossolasco, M., Bkaily, G., Peri, K., Varma, D. R., Orvoine, R. y Chemtob, S. (2006). Intracrine signalling through lipid mediators and their cognate nuclear G-protein-coupled receptors: a paradigm based on PGE<sub>2</sub>, PAF y LPA<sub>1</sub> receptors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **84**: 377-91
292. zu Heringdorf, D. M. y Jakobs, K. H. (2006). Lysophospholipid receptors: Signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 1-18