



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Caracterización de tres mutantes puntuales de sitios
probables de fosforilación por PKC del receptor LPA₁”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

HUGO BALLEZA TAPIA

TUTORA

DRA. SELMA ERÉNDIRA AVENDAÑO VÁZQUEZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

2007



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 al 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:

Balleza-Tapia H. 2007. *Caracterización de tres mutantes puntuales de sitios probables de fosforilación por PKC del receptor LPA₁*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, Ciudad de México.

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Balleza Tapia Hugo 16 43 20 31 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 095000053</p>
<p>2. Datos de la tutor Dra. Selma Eréndira Avenidaño Vázquez</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dr. Jesús Adolfo García Sáinz</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dr. Arturo Carlos II Becerra Bracho</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dra. Laura Kawasaki Watanabe</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 M. en C. Paola Moreno Álvarez</p>

Dedico este trabajo a mis padres Cruz Tapia Herrera y Félix Balleza Cruz, mi mayor admiración y ejemplo en la vida, en quienes siempre he encontrado apoyo incondicional. Que me han guiado a través de mi formación personal y académica. Por su amor, confianza y paciencia. Por su apoyo en los momentos mas críticos, los más difíciles que he vivido. Por todos los momentos felices que hemos pasado juntos. Gracias a ellos he llegado a este momento y seguiré adelante.

A mi hermano César, por compartir toda una vida llena de momentos felices y difíciles. Por su cariño, confianza y alegría.

A toda mi familia

Agradecimientos

A mi mentora y amiga la Dra. Selma Eréndira Avendaño Vázquez, por su tiempo y dedicación en mi formación científica. Por compartir su experiencia, confianza y alegría en mi estancia en el laboratorio. Por esos comentarios acertados en etapas difíciles de mi vida.

Al Dr. Jesús Adolfo García Sáinz por haberme acogido en su grupo de trabajo y proporcionarme apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A la Biol. María de Lourdes Roque Hernández, por su amistad y su enorme aporte en mi formación académica. Por todo su apoyo durante mi licenciatura y la excelente revisión crítica de la presente tesis y sugerencias que me ayudaron a mejorar mi trabajo. Gracias por todo.

A mis sinodales, la M. en C. Paola Moreno Álvarez, el Dr. Arturo Carlos II Becerra Bracho y la Dra. Laura Kawasaki Watanabe por sus comentarios y ayuda para la elaboración de ésta tesis.

A mis amigos de combate y de siempre Arnulfo Estrada, Juan Vences, Israel Rodríguez, Isaac Pérez, Karen Contreras, Miguel Palacios, Mónica Díaz, Héctor Segura, Ricardo Rodríguez, Erika, Gorge, Sandra, Eduardo, Memo, Anselmo, Omar, Romy, Beatriz y los que se me olvidaron por las prisas, por esas desveladas interminables, esos viajes destructivos, esos golpes de la vida y por formar parte importante de mi.

A mis amigos de la Facultad Alberto Pinal, Celia Sanginés, Anita Soto, Guillermo Hernández, Yadira Hernández, Aleida Martínez, Eric Flores, Carlos Gaona, Ricardo Torres, Ivette Arredondo, Javier Martínez y demás banda que falta por todas esas peripecias, aventuras y desveladas.

A Libertad Aguilera por su amistad incondicional y esos momentos maravillosos, por enseñarme de la vida las cosas más importantes. Por creer en mí.

A Nancy Palacios por los mejores momentos de mi vida, por su apoyo incondicional en las situaciones difíciles, su dedicación, gran ánimo y cariño. Por su incomparable personalidad que me enseñó a sonreírle de nuevo a la vida.

A mi amiga Karla Valles Escobar, quien a pesar de la distancia siempre ha estado ahí para no dejarme caer, impulsándome siempre con su amistad y consejos oportunos.

Índice

1. Tabla de abreviaturas	1
2. Introducción	2
2.1. Sistemas de transducción de señales	3
2.2. Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)	5
2.2.1. Proteínas G heterotriméricas y vías de señalización	7
2.2.2. Regulación funcional de los GPCRs	9
2.3. LPA	10
2.3.1. Síntesis del LPA	11
2.3.2. Degradación del LPA	12
2.3.3. Tipos de LPA	12
2.4. Vías de señalización	13
2.5. Receptores para LPA	15
2.5.1. LPA ₁	16
2.5.2. LPA ₂	17
2.5.3. LPA ₃	18
2.5.4. LPA ₄	18
2.5.5. LPA ₅	19
2.6. Angiotensina II (Ang II).....	19
2.6.1. Síntesis y degradación de la angiotensina.....	20
2.7. Receptores para la Ang II	21
2.7.1. Antagonistas selectivos para los receptores de AT ₁ y AT ₂	21
2.7.2. Receptor AT ₁	22
2.7.3. Receptor AT ₂	22
3. Justificación y antecedentes.....	24
4. Hipótesis	25
5. Objetivos	26
6. Materiales y métodos	27
6.1. Cultivo celular	27
6.2. Construcción y expresión estable de mutantes del receptor	
LPA ₁ en células C9.....	28

6.3. Medición del calcio intracelular	30
6.4. Ensayos de fosforilación	30
6.5. Microscopía confocal de fluorescencia	31
7. Resultados	32
7.1. Expresión estable de 3 mutantes del receptor LPA ₁ en sitios posibles de fosforilación por PKC en células C9	32
7.2. Caracterización de la movilización de Calcio intracelular en presencia de PMA y Ang II	34
7.3. Respuesta de las diferentes líneas estables al LPA	41
7.4. Desensibilización del receptor LPA ₁ por el PMA	42
7.5. Desensibilización del receptor LPA ₁ por la Ang II	43
7.6. Regulación diferencial del receptor LPA ₁ por la AngII y el PMA	44
7.7. La regulación del receptor LPA ₁ por la Ang II requiere la activación del receptor AT ₁	46
7.8. Fosforilación de los diferentes receptores mutantes	48
7.9. El receptor LPA ₁ es fosforilado por la Ang II y el PMA	49
7.10. La fosforilación inducida por la Ang II no internaliza a los receptores LPA ₁	50
7.11. La regulación del receptor LPA ₁ por la Ang II es independiente de la activación de PKC	50
7.12. El receptor LPA ₁ media la actividad del receptor AT ₁	52
7.13. Efecto de los receptores mutantes del LPA ₁ en la morfología de las células C9	54
8. Discusión	55
9. Conclusiones	64
10. Literatura citada	67

1. Tabla abreviaturas

Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang III	Angiotensina III
Ang IV	Angiotensina IV
ATP	Adenosin trifosfato
cAMP	Adenosin monofosfato cíclico
cGMP	Guanosin monofosfato cíclico
DG	Diacil glicerol
EGFP	Proteína verde fluorescente sobreexpresada en <i>E. coli</i>
EDG	Gen de diferenciación endotelial
G3P	Glicerol-3-fosfato
GDP	Guanosin difosfato
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G.
GRKs	Cinasas de GPCRs
GTP	Guanosin trifosfato
IP3	Trifosfato de inositol o Inositol 1, 4, 5-trifosfato
lysoPLD	Lisofosfolipasa D
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPA₁-WT	Receptor LPA ₁ fusionado a la EGFP
LPA₁-S₃₄₁A	Receptor LPA ₁ -EGFP mutante S ₃₄₁ A
LPA₁-SA	Receptor LPA ₁ -EGFP mutante S _{240, 244} A
LPA₁-T₃₂₁V	Receptor LPA ₁ -EGFP mutante T ₃₂₁ V
LPLs	Lisofosfolípidos
MAPK	Cinasa activada por mitógenos
PMA (TPA)	forbol-miristato-acetato
PLA₁ y PLA₂	Fosfolipasa A1 o A2, respectivamemnte.
PLC	Fosfolipasa C
PI3K	Fostatidilinositol 3 cinasa
SRE	Elementos de Respuesta a Suero
SRF	Factores de Respuesta a Suero

2. Introducción

Entre las características distintivas de los seres vivos se encuentra la capacidad de comunicación. La comunicación celular es un proceso presente en todos los sistemas vivos, desde seres unicelulares hasta los complejos sistemas de los seres pluricelulares que involucra órganos secretores de moléculas que regulan dicha comunicación; es una necesidad que permite mantener la homeostasis y establecer una relación con el medio externo. La comunicación celular inicia con los diversos estímulos que activan la producción, activación y/o liberación de los mediadores químicos y las diferentes formas en que estos actúan sobre las células blanco o diana. Las formas en que actúan las moléculas de señalización, también conocidas como mensajeros químicos, se clasifican en seis grandes grupos [4] (figura1):

1. *Comunicación endocrina u hormonal*, en este caso existen órganos especializados que producen los mensajeros u hormonas conocidos como glándulas, las hormonas son vertidas al torrente sanguíneo por el cual llegan a las células blanco [1, 4].
2. *Neurotransmisión*, característica de las células neuronales, ésta se lleva a cabo a través de una estructura específica llamada sinapsis que consiste en un espacio entre la célula señalizadora o presináptica, la cual libera los mensajeros denominados neurotransmisores, y la célula receptora o postsináptica, sobre la cual actúan los mensajeros [1, 4, 5].
3. *Secreción neuroendocrina*, este tipo de comunicación consiste en un cuerpo de neuronas que vierten los mensajeros al torrente sanguíneo y que actuarán sobre las células diana [1, 4], característico de las hormonas secretadas por la neurohipófisis conocidas como neurohormonas.
4. *Comunicación paracrina*, se realiza de manera local y tiene efecto sobre células cercanas. Las moléculas señalizadoras liberadas por la célula secretora actúan sobre las células vecinas [1, 4].
5. *Comunicación yuxtacrina*, esta comunicación se realiza entre células adyacentes, en este caso la molécula señalizadora esta anclada al exterior de la membrana de la célula secretora por tanto no difunde [4].

6. *Comunicación autocrina*, se produce cuando el mensajero actúa sobre la célula que lo secretó [1, 4].

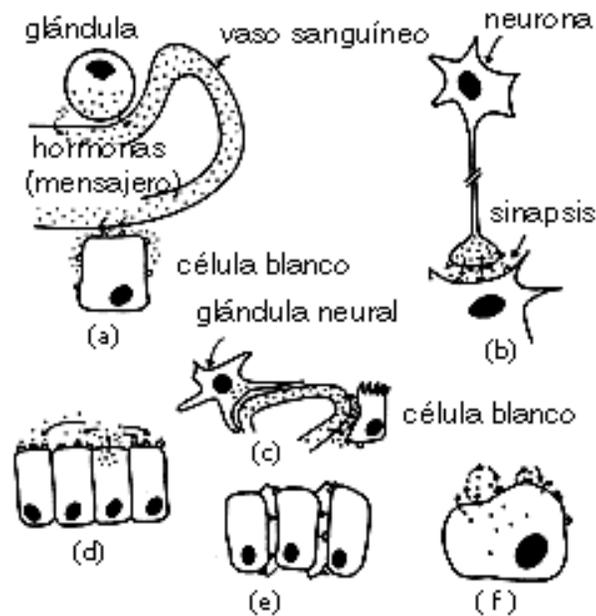


Figura 1. Formas de comunicación por mensajeros químicos: a) comunicación endocrina, b) neurotransmisión, c) neurosecreción, d) comunicación paracrina, e) comunicación yuxtacrina y f) comunicación autocrina.
* Tomada de García-Sáinz, 1996 [1].

2.1. Sistemas de transducción de señales

La membrana plasmática tiene la característica de ser semipermeable, esto quiere decir que el intercambio de moléculas entre el medio externo e interno a través de ella es selectivo. La membrana es permeable solo a pequeñas moléculas no polares, como hormonas esteroideas, las cuales pueden difundir a través de ella hacia el medio interno. Las sustancias polares como iones, moléculas orgánicas de bajo peso molecular, péptidos y proteínas no pueden difundir a través de la membrana, por tanto, la respuesta a un estímulo con este tipo de moléculas depende de una interacción entre éstas y proteínas integrales de membrana. La molécula extracelular es comúnmente llamada ligando y la proteína integral de membrana con la cual interacciona se denomina receptor [1, 4].

Existen 2 tipos de mecanismos de interacción entre los ligandos y sus respectivos receptores: 1) una molécula o macromolécula es físicamente transportada hacia el interior celular; y 2) el ligando funciona como una señal que se transmite hacia el interior celular mediante un mecanismo que involucra la activación del receptor de membrana por el ligando o señal [1], la conversión de ésta en una señal interna y una consecuente cascada de señalización; a este mecanismo se le conoce como transducción de señales [1].

La transducción de señales requiere de ciertos elementos básicos: un ligando, un receptor específico y moléculas señalizadoras. Una vez que el receptor es activado por su ligando, éste transduce la señal y es capaz de activar una cascada de señalización amplificando la señal original que va a modular respuestas celulares según el tipo de ligando o señal externa. De acuerdo a las características del receptor y la cascada de señalización que activan se pueden clasificar en:

- 1. Receptores con actividad enzimática intrínseca.** Como su nombre lo indica, estos receptores tienen actividades como tirosina cinasa, serina/treonina cinasa, guanilil ciclasa, fosfatasa, etc.
- 2. Receptores acoplados a enzimas citoplasmáticas.** Estos receptores una vez unidos a su agonista, promueven el reclutamiento y activación de enzimas, principalmente.
- 3. Receptores canal.** Estos receptores promueven un cambio en la permeabilidad de la membrana celular a través de diversos estímulos, como cambios en la polaridad de la membrana, señales químicas y/o mecánicas.
- 4. Receptores intracelulares.** Estos receptores generalmente son activados por un ligando de naturaleza lipídica, como las hormonas esteroideas y se distribuyen en el citoplasma celular y el núcleo.

5. Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Estos receptores poseen la característica de acoplarse, generalmente, a un grupo de proteínas denominadas proteínas G heterotriméricas las cuales activan diferentes efectores (canales o enzimas) que regulan la respuesta celular.

2.2. Receptores acoplados a proteínas G

Los GPCRs forman una familia de receptores que se encuentra prácticamente en todos los grupos taxonómicos. Estos pueden transducir señales de diversos estímulos externos como fotones, moléculas odorantes, nucleótidos, nucleósidos, péptidos, lípidos, neurotransmisores y proteínas [1, 5, 6] por lo cual median una gran variedad de procesos celulares.

Una característica distintiva de estos receptores es que atraviesan la membrana celular siete veces por lo cual se les denomina también receptores de 7 dominios transmembranales. Estructuralmente están formados por un extremo amino extracelular, siete segmentos transmembranales hidrofóbicos (TM-I, TM-II, TM-III, TM-IV, TM-V, TM-VI y TM-VII), 3 asas extracelulares (e1, e2 y e3) y 3 intracelulares (i1, i2 e i3), así como un extremo carboxilo localizado hacia el interior celular en el cual se puede formar una cuarta asa intracelular debido a la palmitoilación de una cisteína [5, 6] (figura 2). Otras características comunes de los GPCRs son: la presencia de un puente disulfuro entre el dominio transmembranal TM-III y la 2da asa extracelular (e2); un motivo DRY (Asp-Arg-Tyr) en el TM-III involucrado en el acoplamiento a las proteínas G heterotriméricas; y un motivo NPxxY (Asn-Pro-x-x-Tyr) en el dominio TM-VII que participa en la transducción de las señales extracelulares y/o en la internalización del receptor inducida por su agonista [7].

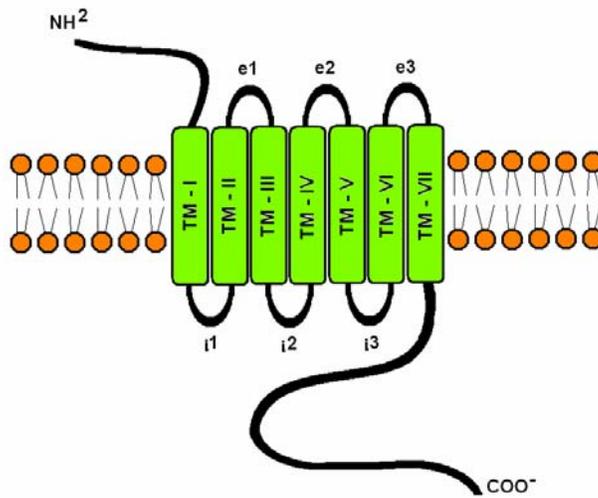


Figura 2. Estructura general de un receptor acoplado a proteínas G. NH²⁺, terminal amino; TM – I a VII, dominios transmembranales; e1-3, asas extracelulares; i1-3, asas intracelulares; COO⁻, terminal carboxilo.

La forma en que estos receptores transmiten la señal extracelular es a través de unas proteínas acopladas llamadas “Proteínas de unión a nucleótidos de guanina”, por su capacidad de hidrolizar trifosfatos de guanina (GTP), o “Proteínas G”. La determinación del papel de las Proteínas G se desarrolló a partir del estudio de mecanismos de acción hormonal que regulaban la síntesis de AMP cíclico (cAMP) en las células blanco [1, 5].

A pesar de que la mayoría de los GPCRs se acoplan a las proteínas G, no es la única vía de señalización que son capaces de activar. Se ha reportado que los GPCRs también pueden activar vías independientes de las proteínas G heterotriméricas [8]. Los dominios intracelulares de diversos GPCRs se unen a proteínas que pueden funcionar como vías de transducción alternativas, algunas de las cuales incluyen factores de intercambio de nucleótidos de guanina, de proteínas G pequeñas (como Ras o Rho), cinasas de tirosinas (como Src) y diversas proteínas que funcionan como adaptadores o proteínas de andamiaje [9-12].

2.2.1. Proteínas G heterotriméricas

Las Proteínas G son una gran familia de proteínas señalizadoras que se acoplan a los receptores de siete dominios transmembranales y activan diferentes proteínas efectoras, enzimas y canales iónicos [13]. Estructuralmente, estas proteínas están formadas por 3 subunidades denominadas α , β y γ por lo cual se les conoce como proteínas heterotriméricas (figura 3A).

En su estado basal, la subunidad α de la proteína G esta asociada a una molécula de GDP (guanosin difosfato), la activación de la proteína G se podría considerar como el cambio conformacional inducido por el receptor. Cuando se activa el receptor, la proteína G se disocia del GDP e incorpora una molécula de GTP (guanosin trifosfato), consecuentemente se divide en 2 subunidades funcionales, la subunidad α y el complejo $\beta\gamma$ (figura 3B), cada una de éstas es capaz de activar cascadas de señalización. La subunidad α además, tiene actividad de GTPasa, por tanto hidroliza a ésta molécula; una vez que el GTP pasa a GDP, la proteína $G\alpha$ se inactiva y se reasocia con el complejo $\beta\gamma$ [1, 5] (figura 3B).

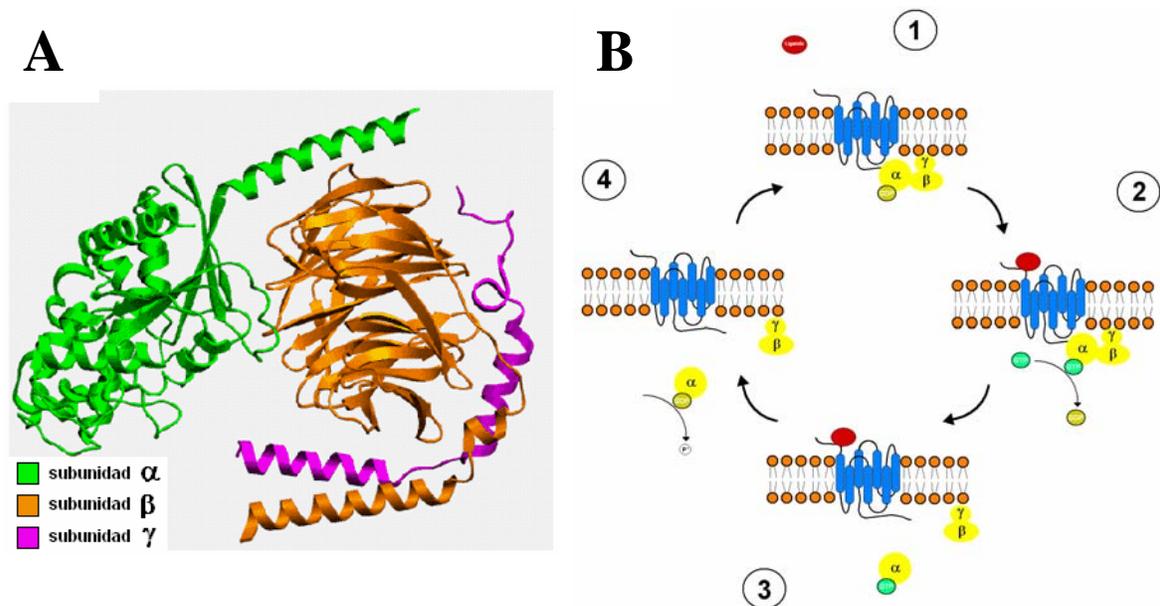


Figura 3. A. Estructura de una proteína G heterotrimérica. B. Mecanismo de activación e inactivación de las proteínas G. Imagen A tomada de "The Image Library of Biological Macromolecules"

La clasificación usual de las proteínas G heterotrimericas se basa en la subunidad α , debido a esto, se han propuesto 4 familias que activan vías efectoras muy bien caracterizadas:

1. **Familia G_s**. En esta se incluyen las proteínas G α_s , que activan las diferentes isoformas de la enzima adenilato ciclasa; sin embargo, se ha reportado que puede activar a la cinasa de tirosinas Src [14]. En esta familia también se incluye la proteína G α_{olf} [13].
2. **Familia G_i**. Incluye las proteínas G α_{i1} , G α_{i2} y G α_{i3} , que inhiben las isoformas de la adenilato ciclasa 1, 2, 3, 5 y 6. También tienen la capacidad de activar a las cinasas de tirosinas de la familia Src. A esta familia también pertenecen las proteínas G α_{t1} y G α_{t2} (transducinas) quienes activan a la cGMP-fosfodiesterasa. Las proteínas G $\alpha_{o1/A}$, G $\alpha_{o2/B}$, G α_z y G α_{gust} se incluyen en esta familia [13].
3. **Familia G_q**. Incluye las proteínas G α_q , G α_{11} , G α_{14} , G α_{15} y G α_{16} quienes activan a la PLC β y las cinasas de tirosinas de la familia Bruton (Btk) [13].
4. **Familia G_{12/13}**. Incluye las proteínas G α_{12} , quienes activan las cinasas Btk y la proteína activadora de Rho Gap1; y las proteínas G α_{13} , quienes activan la subunidad p115 de la proteína RhoGEF Lsc [13].

Como se mencionó anteriormente, cada proteína G heterotrimérica puede iniciar al menos dos vías de señalización, una dirigida por la subunidad α y la otra por el complejo $\beta\gamma$. Sin embargo, el complejo $\beta\gamma$ que activa la mayoría de las vías de señalización pertenece a la familia G_i [13]. Las principales moléculas efectoras sobre las que actúa el complejo $\beta\gamma$ son: la activación de la PLC β ; inhibición de las adenilil ciclasas 1, 5, 6 y la activación de las isoformas 2, 4 y 7; activación de canales de potasio GIRK (Canales de potasio activados por proteínas G) Kir3.1 y Kir3.4; la inhibición de canales de calcio CaV 2; y, la activación de la PI3K [13].

2.2.2. Regulación funcional de los GPCRs

La regulación de las vías de transducción de señales es un proceso fisiológico necesario para mantener la homeostasis de la célula y en niveles de organización mayores (ej. tejidos) de lo contrario las respuestas celulares se mantendrían operantes de manera “indefinida” lo cual traería problemas sobre todo en seres multicelulares. De hecho, en diversos padecimientos como el cáncer, existen alteraciones en las vías de transducción que han sido implicadas no solo en el origen, sino en el mantenimiento y desarrollo de los tumores, entre otros padecimientos.

La regulación de los GPCRs está dada a varios niveles (receptor, proteínas G o proteínas de la cascada de señalización). Entre las proteínas que participan en la regulación de los GPCRs se encuentran las cinasas GRK, PKA, PKC, Akt/PKB, PI3K y de la familia Src; fosfatasas (de la familia de fosfatasas de serina/treonina); β -arrestinas y RGS (reguladores de la señalización de proteínas G) [7]. Existen otros procesos que regulan la actividad de éstos receptores como la desensibilización (heteróloga y homóloga), el “cross talk” y la formación de dímeros.

La desensibilización (o “taquifilaxia”) es un fenómeno adaptativo observado como la disminución gradual de la respuesta celular [7]. Puede llevarse a cabo mediante dos mecanismos denominados desensibilización homóloga, cuando está mediada por la unión del agonista al receptor; y desensibilización heteróloga, cuando éste ocurre en ausencia del agonista [3]. Este último puede estar regulado por otro receptor ya sea de la misma familia o de receptores de otro tipo, es decir, que la activación de otro receptor conlleva a la desensibilización de algún GPCR en cuestión. La desensibilización puede involucrar la fosforilación del receptor y su internalización [7].

La internalización del receptor se puede realizar a través de vesículas recubiertas de clatrina o caveolina [3, 7]. Posteriormente los receptores pueden ser desfosforilados y reciclados a la membrana plasmática o ser ubiquitinados para su posterior degradación vía endosomas y proteosomas [3, 7].

2.3. LPA

El ácido lisofosfatídico (LPA) o monoacil-*sn*-glicero-3-fosfato, es un fosfolípido bioactivo que media una amplia gama de funciones celulares. Inicialmente el LPA se caracterizó como un agente mitogénico en fibroblastos, razón por la cual se denominó como un factor de crecimiento. Estudios posteriores demostraron que el LPA media otras funciones no proliferativas [15]. El LPA está compuesto por un grupo funcional fosfato, un esqueleto de glicerol y una cadena de ácido graso (figura 5A). Debido al grupo fosfato y a un hidroxilo libre, el LPA es más soluble en agua comparado con otros fosfolípidos bioactivos; sin embargo, generalmente se asocia a proteínas como la albúmina y gelsolina plasmática, entre otras [3]. Se ha establecido que el di-anión fosfato del LPA es crucial para su actividad, mientras que la longitud de la cadena del ácido graso, su grado de insaturación y la unión de éste al glicerol solo modulan la actividad del LPA [3].

Entre las funciones celulares que media el LPA se encuentran la proliferación celular, tanto de células normales como cancerígenas [16-19], la prevención de la apoptosis [20-24], la migración celular, la agregación de plaquetas, contracción del músculo liso, maduración de ovocitos de mamífero *in vitro* [25], cambios de permeabilidad vascular [26], retracción de neuritas y redondeo neuronal [27], despolarización de la membrana celular [28, 29], liberación de neurotransmisores [30], formación de fibras de estrés y adhesiones focales [31, 32]. Además el LPA participa en funciones sistémicas como la neurogénesis [33], mielinización [34-36], angiogénesis y progresión de algunos tipos de cáncer [37]. También interviene en procesos patológicos como las respuestas pro-inflamatorias (secreción de citocinas) y aterogénicas [38, 39].

El LPA está presente en muchos fluidos biológicos, la mayor concentración (en un orden de aproximadamente 2-20 μM [3]) se encuentra en el suero [40, 41] y plasma [42-44]; sin embargo, también se encuentra en la saliva [35], fluido folicular [45], fluido cerebroespinal [46], fluido seminal [47], clara de huevo de gallina [48] y líquido de ascitis de pacientes con carcinoma ovárico [49].

2.3.1. Síntesis del LPA

Existen 2 vías principales de síntesis del LPA, una mediada por plaquetas y la otra independiente de éstas. En la primera, reportada inicialmente en 1978 [50], se observó que las plaquetas producían LPA cuando eran tratadas con PLC de *Clostridium welchii* por lo cual se propuso que una vía de síntesis involucraba enzimas de tipo fosfolipasas A (PLA₁ o PLA₂). Aunque las plaquetas son las células principales que producen LPA, no son las únicas. Se ha reportado que los eritrocitos y células blancas tienen esta capacidad, así como numerosas líneas celulares cancerígenas como las HEY y OCCI o las PC-3 y DU145, las primeras son células de cáncer de ovario y las segundas de próstata [51]. En la vía de síntesis mediada por plaquetas, y otras células cancerosas, el LPA se genera a partir del ácido fosfatídico (PA). Esta vía requiere inicialmente la actividad de la fosfolipasa D (PLD) más la actividad de la PLA₁/PLA₂. En la vía independiente de células, se ha demostrado que el LPA se sintetiza a partir de lisofosfolípidos (LPLs), principalmente de LPC (lisofosfatidil colina) que se encuentra presente a altas concentraciones en el plasma. En este caso inicialmente actúan la PLA₁ o PLA₂ y subsecuentemente la LysoPLD para producir al ácido lisofosfatídico [52]. Recientemente se ha identificado que la LysoPLD, que es la responsable de generar al LPA en el suero, es la autotaxina o nucleotido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 2 (NPP2), una enzima con un papel relevante descrito para tumores cancerígenos [53-55].

En resumen, desde el punto de vista molecular las vías consisten en: A) la síntesis de LPA a partir de LPLs (principalmente) vía PLA₁/PLA₂-LysoPLD; y B) la síntesis a partir del PA vía PLD-PLA₁/PLA₂ [52] (figura 4).

Se han identificado otras enzimas que participan en la síntesis del LPA que comprenden al menos 7 grupos de isoenzimas de PLA₂: citosólicas (cPLA₂), intracelulares (iPLA₂), lectina-colesterol aciltransferasas (LCAT), diversas isoformas del factor activador de plaquetas acetilhidrolasa (PAF-AH) y PLA secretadas (sPLA₂) [52].

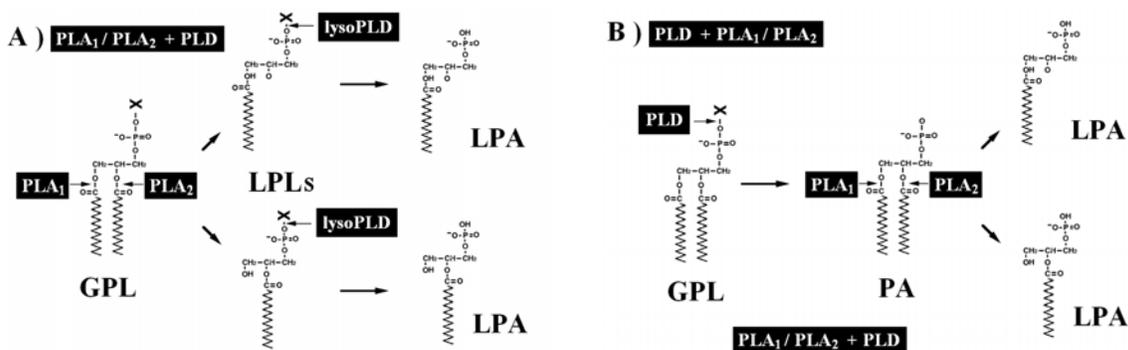


Figura 4 – Vías de síntesis de LPA. A) A través de esta vía se sintetiza LPA en suero y plasma. Sobre las moléculas de glicerofosfolípidos (GPL) actúan la PLA₁ o PLA₂ para cortar un grupo acilo del esqueleto de glicerol generando lisofosfolípidos (LPLs), posteriormente la lisofosfolipasa D (lysoPLD) cataliza la hidrólisis del grupo polar (X) unido al fosforilo de los LPLs para generar LPA; B) Por esta vía se sintetiza LPA a través de plaquetas y células cancerosas. La fosfolipasa D (PLD) remueve el grupo unido al fosforilo de moléculas de GPL para generar ácido fosfatídico (PA), posteriormente actúan la PLA₁ o PLA₂ para generar LPA. El grupo polar (X) unido al grupo fosforilo, puede ser colina (LPC), etanolamina (LPE) o serina (LPS) [3].

2.3.2. Degradación del LPA

Existen 3 vías principales de degradación del LPA: 1) Mediada por las enzimas lípido fosfato fosfohidrolasas (LPP), éstas enzimas pertenecen a la familia de las fosfatidato fosfatasas (PAP-2). En este mecanismo se remueve el grupo fosfato del LPA para formar monoacilglicerol (MAG) [56, 57]; 2) el LPA se convierte en ácido fosfatídico (PA) por acción de las LPA-aciltransferasas (LPAAT), en ésta reacción se transfiere un grupo acilo al esqueleto de glicerol. Las LPAAT son enzimas importantes en la síntesis *de novo* de glicerolípidos y en la renovación de fosfolípidos de la membrana celular [58, 59] y 3) la remoción del grupo funcional acilo [59, 60]; la mayoría de las lisofosfolipasas que median esta reacción actúan tanto en el LPC como el LPA, no obstante, se ha reportado que existe una enzima específica para el LPA en el cerebro de rata [59].

2.3.3. Tipos de LPA

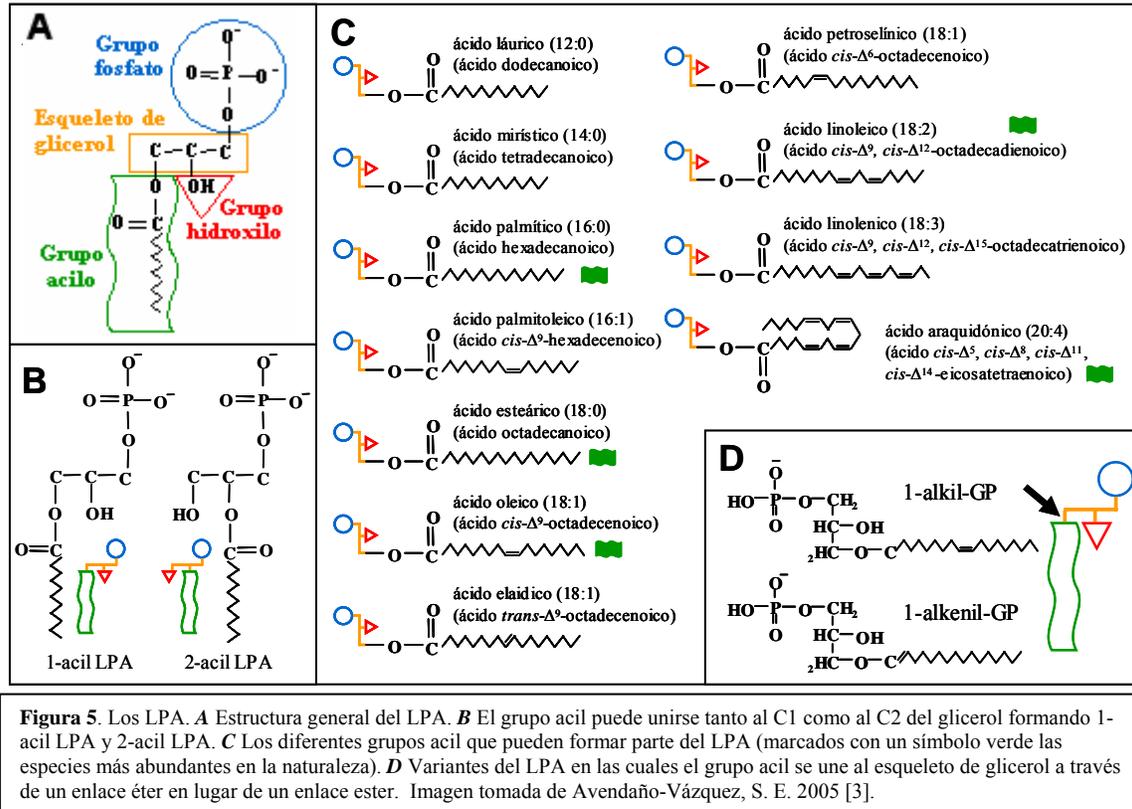
LPA es el nombre común para el compuesto monoacil-*sn*-glicero-3-fosfato, sin embargo, existen naturalmente diversas formas del LPA dependiendo del tipo de ácido

graso que contienen (figuras 4 y 5). De las diferentes especies de LPA, la especie oleoil-LPA (18:1) es la que se emplea regularmente como agonista en procesos experimentales debido a su eficiencia en la activación de diversas respuestas celulares [3].

Se ha identificado que las especies de LPA liberadas cuando las plaquetas se activan son: el estearoil (18:0), palmitoil (16:0), ambos poseen sustituyentes acil saturados; el oleoil (18:1), linoleoil (18:2) y araquidonil (20:4) con sustituyentes insaturados [3, 52]. Estas especies también se han detectado en el suero y plasma así como en otros fluidos biológicos como la saliva y la clara de huevo de gallina [52]. Sin embargo en el suero las especies con mayor frecuencia son el 1-oleoil-LPA y 1-palmitoil-LPA, en el líquido de ascitis la especie 2-acil-LPA es la predominante [3]. Cada uno de los sustituyentes de las especies 16:0, 18:0, 18:1, 18:2 y 20:4 pueden unirse tanto a la posición sn-1 como a la sn-2 del esqueleto de glicerol, agregando diversidad a las especies de LPA [3]. Existen especies de LPA en las que el grupo acil se asocia al grupo glicerol mediante un enlace éter en lugar de un enlace éster en la posición sn-1 originando las especies 1-alkil-2-liso-sn-glicerol-3-fosfato y 1-alkenil-2-liso-sn-glicerol-3-fosfato (figura 5D) [3].

2.4. Vías de señalización

Las vías generales que se activan con el LPA son (figura 6): 1) la activación de las proteínas G_q y la subsecuente activación de la PLC (vía la subunidad α o la $\beta\gamma$ de la proteína G_q), la PLC hidroliza al fosfolípido de membrana PIP2 en DG e IP3 lo cual estimula la movilización de calcio intracelular; 2) la activación de las proteínas G_i y la consecuente inhibición de la actividad de la Adenilato ciclasa y disminución en la concentración de cAMP; 3) la activación de la cascada de señalización de las Ras MAP cinasas vía las proteínas G_i ; 4) a través de las proteínas $G_{\alpha_{12/13}}$ se activa RhoA, la cual regula los movimientos vía el citoesqueleto, acompañada de una despolarización de la membrana (mediada por G_{13}); y, 5) las proteínas G_i activan a la PI3K (fosfatidil inositol 3 cinasa) y posteriormente se activa Rac y las cinasas PKC/Akt [15].



Las vías de señalización que activa el LPA así como las respuestas que media se ilustran en la figura 6. El LPA estimula la proliferación celular a través de la activación de cinasas de tirosinas y de las MAP cinasas [61] probablemente mediada por las proteínas Gi/o [62]. Las respuestas morfológicas están mediadas principalmente a través de la activación de Rho por medio de las proteínas $G_{12/13}$ [63]. La prevención de la apoptosis es promovida a través de la activación de la vías PI3K/PDK/Akt [15]. También se ha reportado la activación de Factores de Respuesta a Suero (SRF) y la subsecuente activación de Elementos de Respuesta a Suero (SER), presente en las zonas reguladoras de los genes con lo cual participa en la regulación de la expresión génica [64, 65], como en el caso del gen 1 de crecimiento temprano (Egr-1) [66], entre otros.

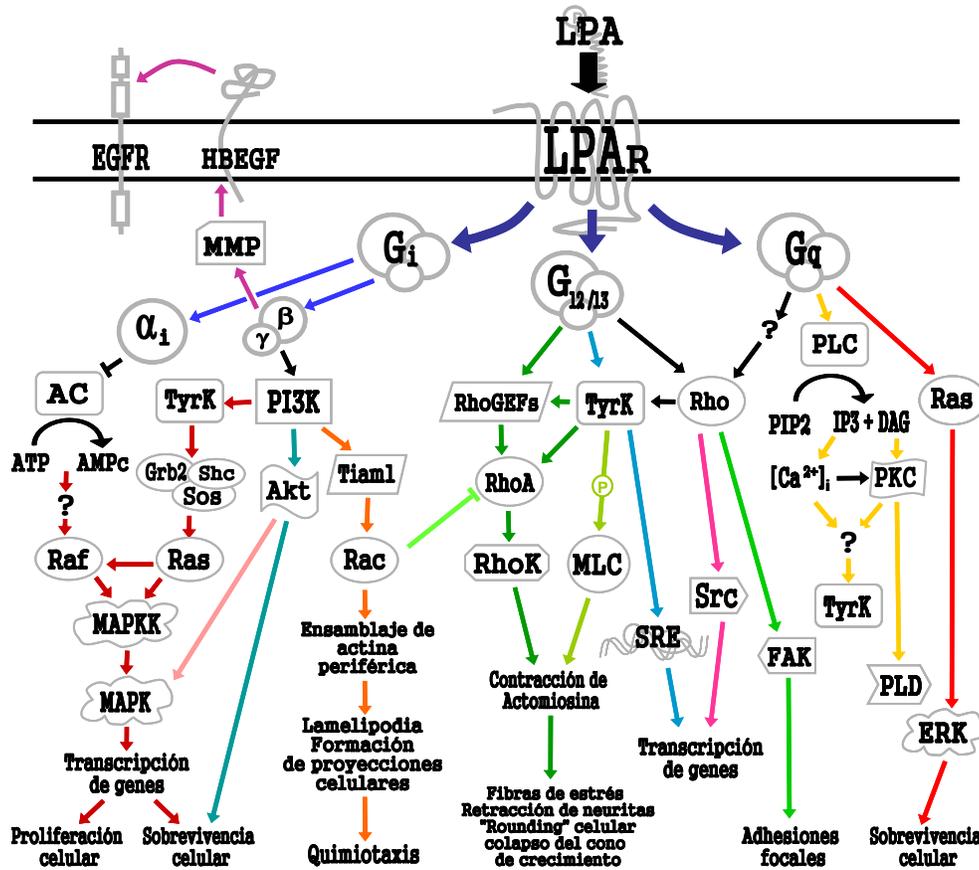


Figura 6. Los receptores para LPA se pueden acoplar a las proteínas G heterotriméricas, Gi, Gq y G_{12/13}, a través de las cuales el LPA modifica la estructura del citoesqueleto y tiene efecto en la proliferación y sobrevivencia celular. EGFR, epidermal growth factor receptor, HBEGF heparin-binding EGF, MMP, matrix metalloproteinases, AC, adenylyl cyclase, PLC, phospholipase C, PLD, phospholipase D, MAPK, mitogen-activated protein kinase MAPKK, MAPK kinase, ERK, extracellular signal-regulated kinase, TyrK, tyrosine kinase, PI3K phosphatidylinositol 3-kinase, PKC, protein kinase C, RhoK, Rho kinase, FAK, focal adhesion kinase, SRE, serum response element, MLC, myosin light-chain GEF, guanine nucleotide exchange factor, Tiam1 (Rac GEF). Frecuentemente se reporta la participación de MEK como MAPKK y p38 MAPK y ERK como MAPK activadas por el LPA. Imagen tomada de Avendaño-Vázquez, S. E. 2005 [3].

2.5. Receptores para LPA

Se han descrito 5 tipos de receptores en mamíferos que son activados por el LPA. Los receptores LPA₁₋₃ pertenecen a la familia de los EDG (Genes de diferenciación endotelial) y poseen un porcentaje de homología de aproximadamente 50 – 57 % [67]. Los receptores LPA₄₋₅ presentan una identidad del 35 % en la secuencia de aminoácidos [67, 68], poca en relación a los 3 receptores de la familia EDG. El receptor LPA₅ está más relacionado con la familia de receptores para nucleótidos (P2Y₁, P2Y₄ y P2Y₆) y el LPA₄ a la familia de receptores para lípidos (G2A, GPR4, GPR65/TDAG8,

humano como el de ratón tienen una cadena peptídica de 364 aminoácidos (*aa*) con pesos moleculares de aproximadamente 41.1 y 41.2 kDa respectivamente [62, 71] y comparten una homología del 97.3 % [62].

El receptor LPA₁ se distribuye ampliamente en diversos órganos del ratón, tales como testículos, cerebro, pulmones, corazón, bazo e intestino; en los riñones, timo, estómago y músculo se tiene una expresión moderada [70]. En humanos, la mayor expresión se ubica en el cerebro, corazón, colon, placenta, próstata, ovarios, páncreas, testículos y bazo. En el músculo esquelético y riñón de humano, la expresión es moderada [70].

El receptor LPA₁ se acopla a las proteínas G_{i/o}, G_q y G_{12/13} [69, 72-76]. También se ha reportado que activa a las MAPK cinasas y Rho.

2.5.2. LPA₂

El gen que codifica al receptor LPA₂ se identificó en 1998 a través de la comparación de secuencias del LPA₁ en el GenBank y estudios funcionales [77], se denominó EDG-4 por su relación filogenética con ésta familia. El gen del LPA₂ conserva el intrón en el dominio transmembranal 6 [71]. El receptor tiene una longitud de 348 aa en ratón con un peso molecular aproximado de 38.9 kDa y 351 aa para el receptor humano con 39.1 kDa aproximadamente y comparten un 90.8 % de homología [62, 71].

El receptor LPA₂ se expresa principalmente en testículos y riñón del ratón adulto, mientras que existe una expresión moderada en cerebro, corazón, pulmón, bazo, timo y estómago. A diferencia del tejido adulto, el cerebro de ratones en etapa embrionaria muestra altos niveles de mRNA de éste receptor [70]. Los testículos y leucocitos son los que presentan un alto nivel de expresión en humano; en el páncreas, timo, bazo y próstata la expresión es moderada [70].

El receptor LPA₂ se acopla a las proteínas G_{i/o}, G_q y G_{12/13} [76-79] así como a las vías de Rho y MAP cinasas.

2.5.3. LPA₃

El gen que codifica al receptor LPA₃ se identificó en 1999 [80] de manera similar al LPA₂. Este receptor también conserva la estructura del intrón en el 6to dominio transmembranal dentro del gen [71]. Este receptor posee una cadena polipeptídica de 354 aa en el caso del ratón con un peso aproximado de 40.3 kDa y una cadeba de 353 aa para el receptor humano con 40.1 kDa, entre ellos existe una homología del 90.7 % [62, 71].

La expresión de éste receptor en ratón posee niveles altos en riñón, testículos y pulmón; en corazón, bazo, timo y estómago la expresión es moderada [70]. En los tejidos humanos la expresión más alta se ubica en el corazón, próstata, páncreas y testículos, mientras que en el pulmón y ovarios es moderada, también se expresa en el cerebro principalmente en la amígdala, corteza frontal e hipocampo[70].

El receptor LPA₃ interactúa con las proteínas G_i y G_q [79, 80].

2.5.4. LPA₄

El receptor LPA₄ se identificó en 2003, mediante experimentos funcionales se determinó que el receptor p2y₉/GPR23 respondía funcionalmente al LPA por lo cual se denominó como el receptor LPA₄ [67]. Al parecer este receptor está codificado por un gen con un solo exón, tanto el receptor humano como el de ratón poseen una cadena polipeptídica de 370 aa y una masa molecular de aproximadamente 42 kDa [71]. El receptor LPA₄ se expresa principalmente en los ovarios a diferencia de otros tejidos humanos donde la expresión es baja [67].

El receptor LPA₄ interactúa con las proteínas G_s, G_i, G_q y G_{12/13} [67, 71]

2.5.5. LPA₅

El último receptor para LPA reportado, el LPA₅, se identificó en el 2006 [2, 68]. El receptor LPA₅ originalmente era parte de los llamados receptores huérfanos y en éste grupo de receptores se había denominado como GPR92. El gen del receptor humano codifica un polipéptido de 372 aa [2], éste y su homólogo en ratón comparten una identidad del 80 %. En humano, se expresa principalmente en el intestino delgado, ganglio de la raíz dorsal sensorial y células madre embrionarias [68], así como en el corazón, placenta, bazo, cerebro, pulmón y el intestino [2]. También se expresa ampliamente en células del sistema inmunológico asociadas al tracto gastrointestinal [2].

El receptor LPA₅ se acopla a las proteínas G_{12/13} y G_q [2, 68].

2.6. Angiotensina II (Ang II)

La angiotensina II (Ang II) es una hormona de naturaleza peptídica que regula principalmente la presión sanguínea y el balance de agua a través del sistema renina-angiotensina-aldosterona [81]. No obstante, ésta hormona también participa en la regulación de otras funciones como son: la contracción del músculo liso vascular, la estimulación de la liberación de la hormona aldosterona y la reabsorción de sodio vía túbulo proximal e indirectamente vía la nefrona distal por aldosterona [82]. También participa en las funciones renal, cardiovascular, endocrina, reproductiva y a nivel del sistema nervioso central, donde actúa como neurotransmisor e induce la liberación de las hormonas adrenocorticotrópica y vasopresina [81, 82]. Además, la Ang II es importante durante la recuperación del miocardio posterior a un infarto y en las respuestas vasculares a la hipertensión [82]. La Ang II junto con la hormona Bradicinina, son potentes reguladores de la angiogénesis y por tanto, importantes durante el desarrollo de padecimientos como el cáncer [83].

2.6.1. Síntesis y degradación de la angiotensina

Se han caracterizado tres tipos de angiotensinas (I, II y III) y se sintetizan secuencialmente a partir de una proteína α -globulina muy abundante en el plasma, el angiotensinógeno, que es producido por los hepatocitos y liberado al torrente sanguíneo [82]. Inicialmente, la renina cataliza la conversión del angiotensinógeno en una molécula poco activa denominada angiotensina I (Ang I), a partir de ésta se sintetiza la angiotensina II (Ang II), un octapéptido que fisiológicamente es el más activo de las angiotensinas, por la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) que es producida por las células endoteliales de capilares y liberada al torrente sanguíneo. La Ang II es sensible a la aminopeptidasa específica para aspártico, una enzima que hidroliza a la Ang II originando la angiotensina III (Ang III) (figura 8). Tanto la Ang II como la Ang III tienen propiedades fisiológicas similares, como la estimulación de la liberación de la aldosterona; sin embargo, existen funciones donde la Ang II tiene mayor efecto como en el caso de la elevación de la presión sanguínea y la estimulación de la medula suprarrenal para la liberación de catecolaminas [82].

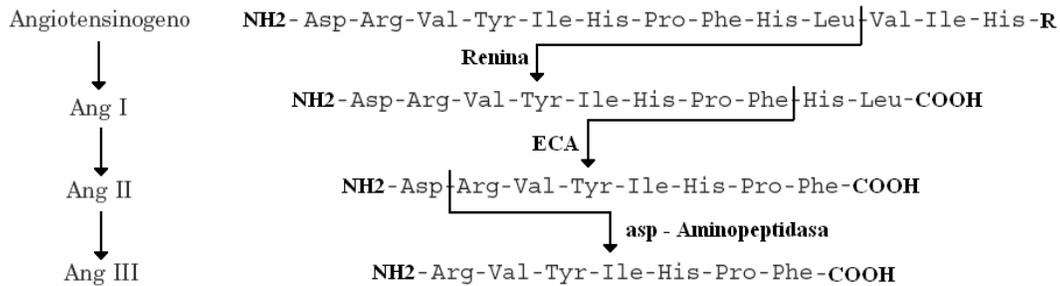


Figura 8. Síntesis de las angiotensinas.

Existen otros fragmentos que se ha observado poseen actividad biológica importante: la angiotensina 3-8 (residuos 3-8) o angiotensina IV (figura 9), producto de la degradación de la Ang II, tiene acción sobre la vasculatura renal, cerebral y del músculo liso, donde se ha propuesto que regula la vasodilatación y el flujo sanguíneo; la angiotensina 1-7 (residuos 1-7) (figura 9) se origina a partir de la Ang I y Ang II, regula

la liberación de vasopresina y la estimulación de la síntesis de prostaglandinas [82, 84-88]. Las diferentes angiotensinas son degradadas finalmente por la acción de varias peptidasas [81].

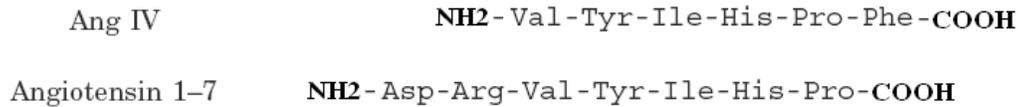


Figura 9. Angiotensinas 1-7 y IV.

2.7. Receptores para Ang II

Los efectos fisiológicos de la Ang II son regulados por los receptores específicos AT₁ y el AT₂ localizados principalmente en la membrana celular; sin embargo, se ha reportado que existen receptores para éste péptido en el núcleo celular [81]. Los receptores para Ang II pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G.

La Ang II es capaz de activar diversas vías de transducción de señales, como: la activación de la PLC, el consecuente recambio de fosfoinosítidos y la movilización del calcio intracelular; inhibición de la adenilato ciclasa vía proteínas G_i; activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) y como consecuencia el aumento en la síntesis de eicosanoides; activación de la PLC, y apertura de canales de calcio [81].

2.7.1. Antagonistas selectivos para los receptores de AT₁ y AT₂

Una de las razones que impulsaron el desarrollo de antagonistas selectivos para los receptores de la Ang II, fue la necesidad de obtener compuestos con capacidad potencial en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares [81]. En 1990, se sintetizaron dos antagonistas no peptídicos que demostraban ser selectivos para los receptores para Ang II, el Losartan (DUP753) y el EXP655 (PD123177). Durante los

estudios con éstos antagonistas, se observaron diferencias en la inhibición de las funciones mediadas por la Ang II, éstas permitieron identificar los subtipos de los receptores para Ang II denominados AT₁ y AT₂. Estudios posteriores demostraron que el Losartan es el antagonista selectivo para el receptor AT₁ y el EXP655 para el receptor AT₂ [81].

2.7.2. Receptor AT₁

Los receptores AT₁ regulan la mayoría de los efectos fisiológicos de la Ang II en el sistema cardiovascular, renal, neuronal, endócrino y hepático [89]. Entre las acciones en las que participa se encuentran la regulación de la presión arterial, el balance de electrolitos y agua, la sensación de sed, la secreción de hormonas y la función renal [90]. El gen que codifica para éste receptor tiene 1077 pb y su producto es un polipéptido de 359 aa con un peso molecular de aproximadamente 41 kDa [89]. Este receptor se distingue farmacológicamente de los AT₂ por su alta afinidad a los compuestos bifenilimidazoles, como es el losartan (DUP753) [82].

El receptor AT₁ se acopla a las proteínas G_q, G_i y G_{12/13}, activando diferentes efectores como las PLA₂, PLC y PLD, canales de calcio dependientes de voltaje, inhibición de la adenilato ciclasa, activación de PKC y las cinasas MAP [89]. También activa a cinasas de tirosinas de la familia c-Src y Pyk2, la cinasas de adhesión focal (FAK) y la cinasa Janus (JAK), así como la transactivación o “cross talk” con los receptores con actividad intrínseca de cinasa de tirosinas como el EGFR (receptor para el factor de crecimiento epidérmico), el PDGF (receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas) y el receptor para insulina [89].

2.7.3. Receptor AT₂

A pesar de ser un receptor de 7 dominios transmembranales y que responde fisiológicamente a la Ang II, muestra una homología en aminoácidos de solo 32 % con el receptor AT₁ [90]. Se ha observado que el receptor AT₂ promueve efectos

anti-proliferativos y cambios pro-apoptóticos en células vasculares del músculo liso [89]. Se expresa altamente en tejido fetal (la aorta fetal, mesénquima gastrointestinal, tejido conectivo, sistema óseo, cerebro y médula suprarrenal) con lo cual indica que juega un papel importante durante el desarrollo embrionario [89]. La expresión del receptor AT₂ disminuye dramáticamente después del nacimiento, restringiéndose a células vasculares endoteliales, distintas áreas del cerebro, estructuras cardíacas y renales, miometrio y ovarios [91]. En la fase adulta del desarrollo se ha observado que los receptores AT₂ se reexpresan bajo condiciones patofisiológicas [91].

El marco de lectura abierta del gen que codifica el receptor AT₂, da como resultado una proteína con 363 aa [89]. Estos receptores son más sensibles a los compuestos bifenilimidazopiridinas, como es el EXP655 (PD123177).

Se ha demostrado que los receptores AT₂ pueden acoplarse a las proteínas G_{i2} y G_{i3} [82]. También activa fosfatasa de tirosinas o de serinas/treoninas, mediante esta vía de señalización antagoniza los efectos del receptor AT₁ [89]. Se ha reportado que la señalización del AT₁ se interrumpe cuando se forman heterodímeros entre éste y los receptores AT₂ [92]. También se ha observado que el receptor AT₂ disminuye la producción de cGMP y activa canales de potasio [81, 82, 90].

3. Antecedentes y Justificación

En los últimos años, el LPA se ha convertido en una molécula muy estudiada, no sólo por la variedad de funciones celulares que modula, sino por su implicación en diversos padecimientos, como en el sistema cardiovascular, nervioso y principalmente en diversos tipos de cáncer (ej. Cáncer de ovario, próstata, mama, pulmón, páncreas y colon entre otros) [93]. Como se indicó, a la fecha se han identificado 5 receptores específicos para el LPA y se conoce mucho sobre las vías de señalización a través de las cuales modulan las respuestas celulares; sin embargo, poco se conoce sobre la regulación funcional de sus receptores.

Una de las vías de regulación de los receptores acoplados a proteínas G es la fosforilación, lo cual lleva a la desensibilización, ya sea de manera homóloga o heteróloga. El extremo carboxilo de los receptores tiene relevancia en la regulación por fosforilación en residuos de serinas y/o threoninas [82].

Se ha reportado que el receptor LPA₁ es fosforilado en presencia de su agonista (LPA) y la Ang II [94], y puede estar sujeto tanto a desensibilización homóloga como heteróloga. También se ha reportado que la fosforilación del receptor es inducida por la activación de la PKC ya que el éster de forbol PMA (un activador general de PKC) fosforila e internaliza al receptor [94]. Además, cuando se emplea el inhibidor BIM (general para PKC) se revierte la fosforilación promovida por la Ang II [94].

Se tiene evidencia de que las isoformas de la PKC que medían la fosforilación del receptor LPA₁ son la PKC α y PKC β I; sin embargo la identificación de éstas se realizó empleando el PMA [7]. Hasta ahora, no se ha estudiado un mecanismo natural de activación de la PKC con la posterior fosforilación y desensibilización del receptor LPA₁.

Otro antecedente importante es que el mecanismo de señalización de la Ang II a través de la activación de su receptor AT_1 en las células C9, es capaz de activar tanto a la cinasa PKC como a la PI3K [82].

El estudio del receptor LPA_1 proporcionará una visión mas detallada de su mecanismo de señalización y principalmente la parte referente a su regulación. La implicación inmediata de este conocimiento es que puede aplicarse para el entendimiento de su mecanismo funcional en diversos tipos de cáncer donde se ha descrito un papel relevante del sistema de transducción de señales del LPA, así como el aporte al cuerpo de conocimientos científicos sobre la biología de la comunicación celular.

4. Hipótesis

Si la regulación funcional del receptor LPA_1 involucra la participación de alguna(s) de las isoformas de la proteína cinasa C (PKC), entonces la selección de sitios posibles de fosforilación por ésta cinasa y la generación de receptores mutantes para dichos sitios, permitirán evaluar la relevancia de cada uno de ellos en la regulación funcional del receptor.

5. Objetivo general

Caracterizar tres mutantes puntuales de cuatro sitios probables de regulación por PKC del receptor tipo 1 para LPA (LPA₁)

Objetivos particulares

- Analizar por métodos bioinformáticos la secuencia de aminoácidos del receptor LPA₁ e identificar los sitios con la mayor probabilidad de fosforilación por la cinasa PKC.
- Generar receptores mutantes en los sitios de fosforilación por PKC seleccionados del receptor LPA₁ que permitan determinar experimentalmente si éstos son importantes para la regulación funcional del receptor.
- Estudiar a las células que expresan los diferentes receptores mutantes mediante la microscopía confocal de fluorescencia para analizar la expresión y distribución de los receptores.
- Caracterizar funcionalmente a los receptores mutados. Medir la movilización del calcio intracelular en respuesta a diferentes tratamientos y determinar el papel de los sitios mutantes en la regulación del receptor.
- Evaluar la fosforilación del receptor para observar su papel en la regulación.

6. Materiales y métodos

El ácido lisofosfatídico (LPA: $L\text{-}\alpha\text{-Lysophosphatidic acid [oleoyl (C18: 1, [cis]-9) (oleoyl-sn-glycero-3-phosphate)]$), la angiotensina II (Ang II), el miristoil forbol acetato (PMA) y los inhibidores de proteasas se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. Los antagonistas Dup753 y PD123177 fueron comprados de E. I. Du pont de Nemours & Co. (Inc.). El inhibidor estaurosporina se obtuvo de Calbiochem[®] Biochemicals.

El medio Ham's F12 (Kaighn's modification, F12K) se compró a *in vitro* S.A. El suero fetal bovino, la tripsina, genitcina, antibióticos y otros reactivos utilizados para el cultivo celular provienen de Gibco BRL (Gaithersburg, MD, U.S.A.). 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) se obtuvo de Molecular Probes.

El anticuerpo policlonal Anti-EGFP fue purificado de conejos inmunizados. La proteína A-sefarosa se obtuvo de Upstate. El plásmido pcDNA3 con la secuencia completa del receptor $mLPA_1$ fue donado por el Dr. Kevin R. Lynch y el pEGFP-N1 fue comprado en Clontech BD Biosciences

6.1. Cultivo celular

Para este trabajo se utilizó la línea celular epitelial de hígado de rata C9, así como las líneas estables C9 que sobrepresaban el receptor LPA_1 de ratón común (*Mus musculus*) fusionado a la proteína verde fluorescente, $mLPA_1$ -EGFP y las 3 construcciones de esta proteína de fusión con mutaciones puntuales en sitios posibles de fosforilación por PKCs: $mLPA_1$ -EGFP S₃₄₁A, $mLPA_1$ -EGFP T₃₂₁V y $mLPA_1$ -EGFP S₂₄₀A, S₂₄₄A, denominadas en este trabajo como LPA_1 -WT, LPA_1 -S₃₄₁A, LPA_1 -T₃₂₁V y LPA_1 -S_{240, 244}A respectivamente.

Las células C9 de tipo silvestre (WT) se mantuvieron en medio Ham's F12 modificado por Kaighn (F12-K), complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%,

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina y 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B a 37° C en una atmósfera con 5% de CO_2 . Las líneas estables se cultivaron con el medio F12-K complementado al cual se agregó geneticina (G418) como selección de la expresión de las diferentes proteínas de fusión.

6.2. Construcción y expresión estable de mutantes del receptor LPA_1 en células C9.

Se realizó un análisis del receptor LPA_1 de sitios posibles de fosforilación por PKC con los servidores NetPhosK 1.0 y NetPhos 2.0. También se analizó la estructura tridimensional del receptor para ubicar espacialmente los sitios, esto se hizo en TMHMM y con la información en UniprotKB/Swiss-Prot entry P61793. Se escogieron 4 sitios que se ubican en la terminal carboxilo (treonina 321 y serina 341) y la tercer asa intracelular (serinas 240 y 244) ya que estas regiones son relevantes para la regulación de los receptores de 7 dominios transmembranales.

Una vez determinados los sitios, se mutaron los codones correspondientes a los aminoácidos seleccionados. Cada aminoácido se cambió por otro no fosforilable, para ello, se elaboraron oligonucleótidos con la secuencia genética correspondiente al aminoácido final (tabla 1). Acto seguido se realizó una mutagénesis puntual utilizando el Kit QuikChange® Site-Directed Mutagenesis. Se obtuvieron 3 receptores mutantes finales: $\text{LPA}_1\text{-S}_{341}\text{A}$, $\text{LPA}_1\text{-T}_{321}\text{V}$ y $\text{LPA}_1\text{-S}_{240, 244}\text{A}$. La secuencia de cada uno de los receptores mutantes se comprobó por secuenciación.

El $\text{LPA}_1\text{-EGFP}$ y los mutantes obtenidos, se transfectaron en las células C9 utilizando Lipofectamina™ 2000 de acuerdo a las instrucciones del proveedor, de igual manera se transfectó el vector pEGFP-N1 vacío. Las células que expresaron las diferentes proteínas de fusión y la EGFP, fueron seleccionadas por resistencia a la geneticina (G418) y por citometría de flujo empleando un FACS (FACS Calibur, BD Biosciences) y apoyándose con el software Cell Quest (BD Biosciences, Palo Alto, CA).

- **Serinas 240 y 244 por Alaninas (S_{240,244}A)**

Secuencia original

5' CT ATG AGG ATG **TCT** CGG CAT AGT **TCT** GGA CCC AGG AG 3'

Oligos mutantes (T_m = 82.23). Secuencia final.

5' CT ATG AGG ATG **GCT** CGG CAT AGT **GCT** GGA CCC AGG AG 3'
3' GA TAC TCC TAC **CGA** GCC GTA TCA **CGA** CCT GGG TCC TC 5'

- **Threonina 321 por Valina (T₃₂₁V)**

Secuencia original

5' G ATG AGC GCC **ACC** TTC AGG CAG ATC 3'

Oligos mutantes (T_m = 78.5). Secuencia final.

5' G ATG AGC GCC **GTC** TTC AGG CAG ATC 3'
3' C TAC TCG CGG **CAG** AAG TCC GTC TAG 5'

- **Serina 341 por Alanina (S₃₄₁A)**

Secuencia original

5' CCC ACG GAA GGC **TCT** GAC CGC TCT GCC 3'

Oligos mutantes (T_m = 83.17). Secuencia final.

5' CCC ACG GAA GGC **GCT** GAC CGC TCT GCC 3'
3' GGG TGC CTT CCG **CGA** CTG GCG AGA CGG 5'

Tabla 1 – Mutaciones realizadas al LPA₁. Se eligieron 4 sitios posibles de fosforilación por PKC y se mutaron por otros aminoácidos no fosforilables y con las mismas propiedades fisicoquímicas. En la tabla se presenta la secuencia original del receptor LPA₁, y los oligonucleótidos diseñados para las mutaciones (que también será la secuencia final): en negritas, los codones seleccionados para la mutación; en gris, las mutaciones diseñadas.

6.3. Medición del calcio intracelular.

Las células se sembraron en cajas petri estériles de 100mm x 20mm y se dejaron 1 día de confluencia al 100%, posteriormente se ayunaron por 18 hrs con medio F12-K sin complementar. Transcurrido este tiempo se incubaron con 2.5 µM de Fura-2/AM por 45 minutos. Posteriormente se lavaron 3 veces con 4 mL de PBS 1X pH 7.5 a temperatura ambiente y se incubaron por 1 minuto con tripsina, inmediatamente se resuspendieron en

6 mL de Krebs-Hepes-BSA (D-Dextrosa 10 mM, Hepes 20 mM, BSA 0.05%, NaCl 120 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM y KCl 4.75 mM). Las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos y agregaron 5 mL de buffer Krebs-Hepes-BSA para lavar el remanente de fura, esto se realizó 3 veces. Finalmente se resuspendieron en 2.5 mL de Krebs-Hepes-BSA y reposaron por 15 minutos a 37°C previos a la medición.

Las mediciones se realizaron en un espectrofluorómetro AMINCO-Bowman Serie-2 a 340 nm de excitación y 510 nm de emisión, el cálculo de la concentración de calcio intracelular se realizó con el software AMINCO-Bowman según Grynkiewicz.

6.4. Ensayos de Fosforilación

Estos experimentos se realizaron en pozos de 35 mm con cultivos al 100% de confluencia. Las células se incubaron durante una hora en medio DMEM sin fosfatos, acto seguido se marcaron metabólicamente en medio DMEM sin fosfatos con 75 µCi/mL de [³²P]Pi por 4 horas a 37°C. Posteriormente se estimularon las células por 5 minutos y se lavaron dos veces con PBS a 4°C para detener la estimulación.

Las células se lisaron en frío durante una hora con buffer RIPA (100 mM de NaCl, 20 mM de NaF, 10 mM de pirofosfato de Na, 50 mM de Tris pH 8, 5 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 0.1% de SDS, 10 mg/mL de desoxicolato de Na, 100 nM de ácido okadaico y los inhibidores de proteasas leupeptina 20 µg/mL, 100 µg/mL de PMSF, 500 µg/mL de bacitracina y 50 µg/mL de inhibidor de tripsina). Posteriormente se centrifugaron los lisados a 14 000 rpm durante 10 minutos, los sobrenadantes se incubaron toda la noche a 4°C en agitación con 12.5 µL del suero que contenía el anticuerpo anti-EGFP y 45 µL de proteína A- sefarosa.

Al día siguiente se lavaron tres veces con buffer WB1 (50 mM de Tris HCl, 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 12 mM de desoxicolato de Na, pH 7.5), dos con buffer WB2 (50 mM de Tris HCl, 500 mM de NaCl, 0.1% de Triton X-100, 1.2 mM de desoxicolato de Na, pH 7.5) y una vez con buffer WB3 (50 mM de Tris HCl, 0.1% de

Triton X-100, 1.2 mM de desoxicolato de Na, pH 7.5). Finalmente, las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm por 10 min, y se resuspendieron en buffer de cargado (120 mM de Tris pH 6.8, 4% de SDS, 0.2% de glicerol, 5% de β -mercapto etanol, 7 M de urea, 1 mM de DTT y 10 mg/mL de azul de bromofenol), se hirvieron por 10 minutos y se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 % (SDS/PAGE). Los geles se secaron y expusieron durante 48 hrs en pantallas amplificadoras. Las imágenes de los niveles de fosforilación de los receptores se capturaron en un PhosphorImager (Typhoon 8600) y se cuantificaron apoyándose con el programa Image Quant.

6.5. Microscopía confocal de fluorescencia

Para este protocolo, las células se resembraron en platos de 10 mL y se dejaron 1 día de confluencia al 100%, se ayunaron 18 hrs con medio F12-K sin complementar, posteriormente se resembraron en cajas petri de 2 mL con fondo de vidrio y se incubaron a 37 °C por 80 minutos, tiempo suficiente para que las células se adhieran parcialmente a la base de la caja. Las observaciones se realizaron en un equipo confocal Bio-Rad MR1024 acoplado a un microscopio de luz invertido Nikon TMD 300 con el objetivo de 10X, 30% de intensidad de láser de argón/criptón a 488 nm (la fluorescencia emitida se detectó a 522 nm), y la misma apertura numérica de iris y ganancia.

7. Resultados

7.1. Expresión estable de 3 mutantes del receptor LPA₁ en sitios posibles de fosforilación por PKC en células C9.

La expresión de los mutantes del receptor LPA₁ se verificó mediante ensayos de fluorescencia con la ayuda de un microscopio confocal. De la misma forma se monitoreó si las células C9 con el receptor LPA₁-WT seguían expresando esta proteína de fusión. Durante el desarrollo de los experimentos se utilizaron células C9 de tipo silvestre como control negativo a la expresión de las proteínas de fusión y células transfectadas con el vector vacío como control positivo.

Como se observa en la figura 1, todas las líneas transfectadas con las diferentes proteínas de fusión (figuras 1C – D) y las células transfectadas con el vector vacío, que expresan solo la EGFP, (figura 1B) fluorescen en comparación con las células control WT (figura 1A), confirmándose así expresión de la EGFP. En las células con el vector vacío se observa que la señal de fluorescencia se distribuye de manera homogénea en todo el citoplasma. En el caso de las células que sobreexpresan el receptor LPA₁-WT (figura 1C), la fluorescencia se distribuye tanto en la membrana celular como en el citoplasma, sin embargo, ésta última es heterogénea observándose en vesículas y notablemente en la zona perinuclear. Probablemente la distribución citoplasmática se deba a diferentes estados en la síntesis del receptor y a la propia morfología de las células ya que al ser epiteliales poseen una morfología aplanada. Para el receptor LPA₁-S_{341A} (figura 1D) la distribución es similar a la del LPA₁-WT, la fluorescencia en la membrana plasmática es más definida, se observa en la zona perinuclear una región que quizá corresponde al retículo endoplásmico donde se está sintetizando el receptor; cabe mencionar que la fluorescencia en general es más intensa; la expresión de los receptores en este caso parece ser mayor comparado con las demás líneas, algo distintivo en estas células. La fluorescencia para las células que sobreexpresan el receptor LPA₁-S_{240, 241A} (figura 1E) es menor que la observada en las células anteriores; sin embargo, se puede apreciar la distribución en la membrana celular, la región perinuclear,

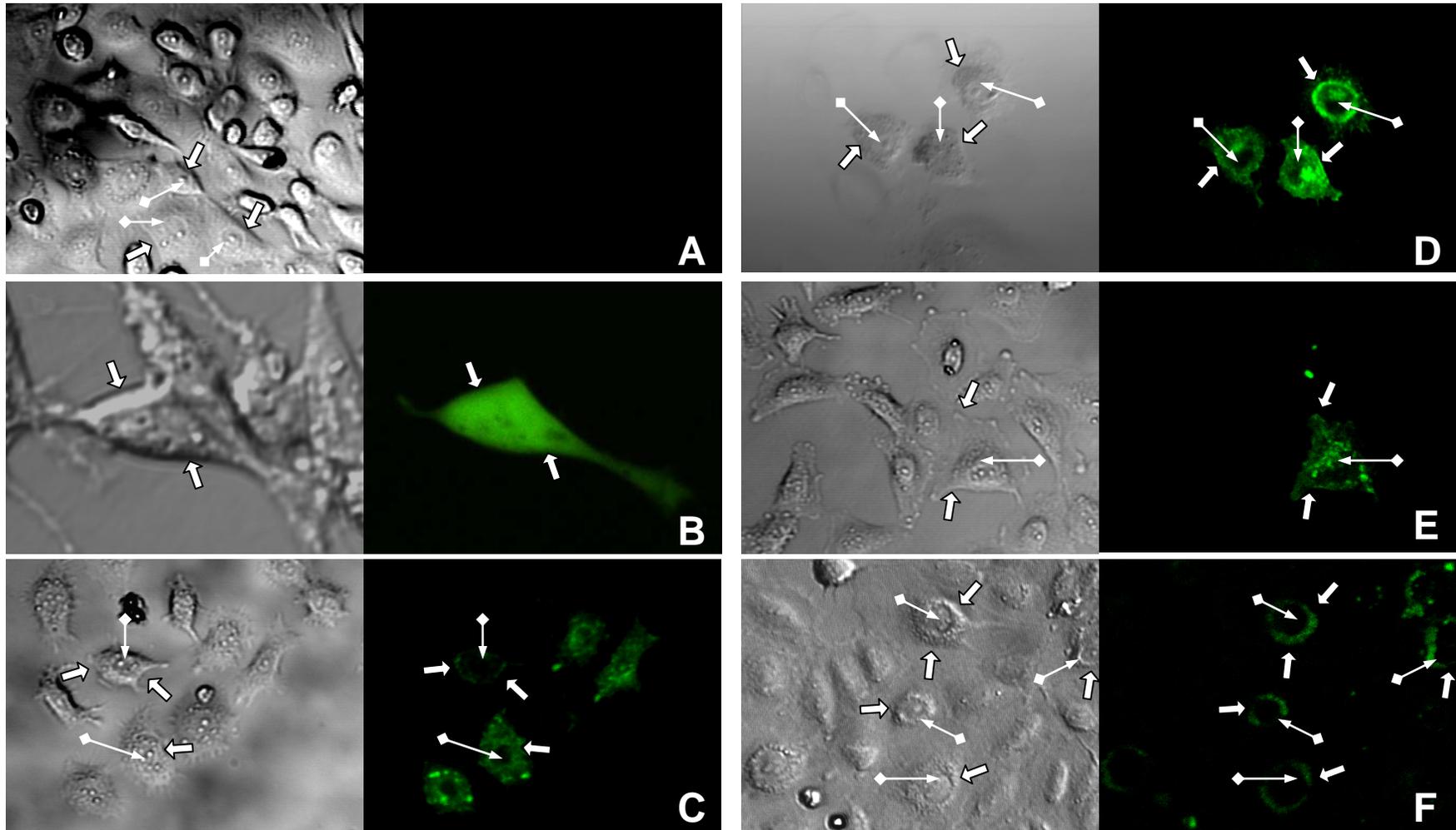


Figura 1 - Análisis de fluorescencia de las diferentes líneas estables. En La figura se muestra la imagen de luz transmitida (izquierda) y la fluorescencia producto de la EGFP (derecha) para cada una de las líneas estables: A) Control, células C9 de tipo silvestre (WT); B) células transfectadas solo con la EGFP; C) células que sobreexpresan el receptor LPA₁-WT; D) células que sobreexpresan el receptor LPA₁-S₃₄₁A; E) células que sobreexpresan el receptor LPA₁-S_{240, 244}S; y F) células que sobreexpresan el receptor LPA₁-T₃₂₁V. Para esto, las células se sembraron en pozos de 350 mm², antes de su análisis en el microscopio confocal, éstas fueron lavadas y mantenidas en PBS 1X estéril. El análisis se llevó a cabo con el objetivo de 10x, zoom de 4.53 y una intensidad de láser del 30%. Membrana celular (⇒); Núcleo (↔).

y en el citoplasma. En general, la distribución de la fluorescencia es mas homogénea, empero se observan diferencias con respecto a las células WT, lo cual provee evidencia de que el receptor LPA₁-S_{240, 244}A se sobreexpresa. La fluorescencia para el receptor LPA₁-T₃₂₁V (figura 1F) muestra una distribución total en la zona perinuclear, no se observa en la membrana plasmática ni en la región del citoplasma; sin embargo la diferencia con respecto a la distribución en las células WT sugiere que los receptores se están expresando (ya que no se observa homogénea) pero éstos no son transportados a la membrana plasmática. Estos datos sugieren la posibilidad de un plegamiento inadecuado incompatible con su migración a la superficie celular.

Las diferencias en la distribución de la fluorescencia en las células que expresan las diferentes proteínas de fusión comparadas con aquellas que solo expresan la EGFP (la presencia en la membrana plasmática, la visualización de vesículas citoplasmáticas, así como la ausencia de fluorescencia en la región que correspondería al núcleo), sugiere que las proteínas de fusión se sobreexpresan en las células y que la fluorescencia no corresponde a la expresión de la EGFP solamente, ya que en las células transfectadas con el vector vacío la distribución es totalmente homogénea y no se distinguen estructuras celulares. Por otro lado, el sitio T-321 (del receptor LPA₁-T₃₂₁V), parece jugar un papel importante en el procesamiento natural del receptor a la membrana.

7.2. Caracterización de la movilización de calcio intracelular en presencia de PMA y Ang II.

Los resultados obtenidos por Avendaño-Vázquez *et al.*, 2005 [94], demostraron que la PCK tiene un papel relevante en la regulación del receptor LPA₁, vía su activación por el PMA, más aún, se ha identificado que las isoformas de PKC que participan en esta regulación son la PCK α y PCK β I [7]. El desarrollo de los sitios mutantes del receptor LPA₁ se realizó para determinar que sitios pueden ser blancos en la regulación por la PKC promovida por el éster de forbol (PMA), para ello se caracterizó la movilización del calcio intracelular en presencia del agonista (LPA) y el PMA.

En el trabajo de Avendaño-Vázquez *et al.*, 2005 [94], se reporta que la Ang II fosforila al receptor LPA₁ y que ésta disminuye en presencia del inhibidor de PKC BIM, mimetizando los efectos del PMA. Además, al analizar meticulosamente los registros en la movilización del calcio intracelular en el mismo trabajo, se observó que ésta respuesta celular mediada por la Ang II se incrementaba en las células que sobreexpresaban el receptor LPA₁-WT en comparación con las células WT. Dados éstos hechos, se caracterizó la respuesta en calcio mediada por el LPA en presencia de la Ang II para determinar si esta hormona regulaba de manera natural al receptor LPA₁ y si los sitios mutados jugaban un papel en ésta regulación y por tanto, la PKC, así como también caracterizar la propia respuesta en la movilización de calcio intracelular de la Ang II.

Cuando las células WT son estimuladas con LPA se observa un incremento en la concentración del calcio (figura 2A) aproximadamente de 330 % con respecto al basal (figura 2D). Sin embargo, cuando son pretratadas con PMA (5 minutos) la respuesta celular se abate completamente (figuras 2D, 2A vs. 2B). Ya que el sistema de transducción de señales de la Ang II mediada por los receptores AT₁ está acoplada a la señalización vía calcio se puede observar el efecto fisiológico cuando se estimulan las células con esta hormona. Cuando las células son estimuladas con la Ang II la respuesta registrada (figura 2C) es alrededor de 200 % con respecto al basal (figura 2D). La movilización del calcio intracelular en respuesta al LPA cinco minutos posteriores a la estimulación con Ang II disminuye (figura 2C) aproximadamente a 180% (figura 2D). Mientras la inhibición de la movilización del calcio intracelular promovida por el PMA es total, la Ang II no abate por completo ésta respuesta (figuras 2D, 2B vs. 2C).

Las células que sobreexpresan el receptor LPA₁-WT presentan una respuesta mayor al tratamiento con LPA (figura 3A) comparadas con las WT (figura 2A), esta respuesta es aproximadamente de un 800 % con respecto al basal (figura 3D), muy probablemente debido a la sobreexpresión del receptor. A diferencia de lo que ocurre en las células WT, en éstas el PMA no abate completamente la respuesta (figura 2B vs. 3B),

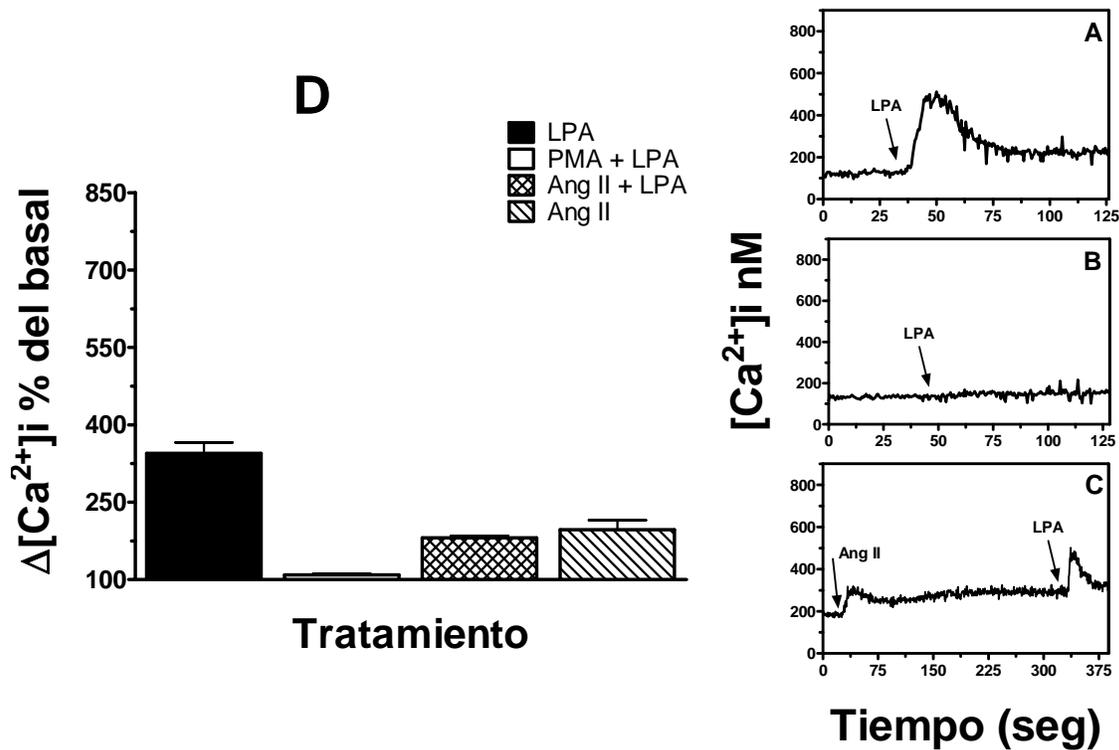


Figura 2 - Células C9 WT. Incremento en la movilización de Calcio intracelular en respuesta a diferentes tratamientos. A) Trazo representativo en respuesta a LPA 1 μ M; B) trazo representativo del tratamiento con PMA 1 μ M 5 minutos previos a la estimulación con LPA 1 μ M; C) trazo representativo del efecto de la Ang II 100nM (5 minutos) sobre la respuesta a LPA 1 μ M. D) Representación en barras de la caracterización en Calcio, se graficaron los promedios \pm el error estándar (n= 4 a 6 experimentos).

observándose un incremento en la concentración del calcio intracelular alrededor de 200 % (figura 3D). El tratamiento con la Ang II también abate el efecto del LPA (figura 3C) limitándola a un 200 % aproximadamente (figura 3D) de manera similar al tratamiento con el PMA. La respuesta observada cuando se estimulan las células con la Ang II es aproximadamente de 500 % (figuras 3C y 3D), mayor a la observada en las células WT (figura 2C).

Debido a que el extremo carboxilo de los receptores de 7 dominios transmembranales es importante para su regulación, se estudiaron los sitios S-341 (serina) y T-321 (treonina) ya que en el análisis Bioinformático obtuvieron una probabilidad alta de fosforilación por la PKC.

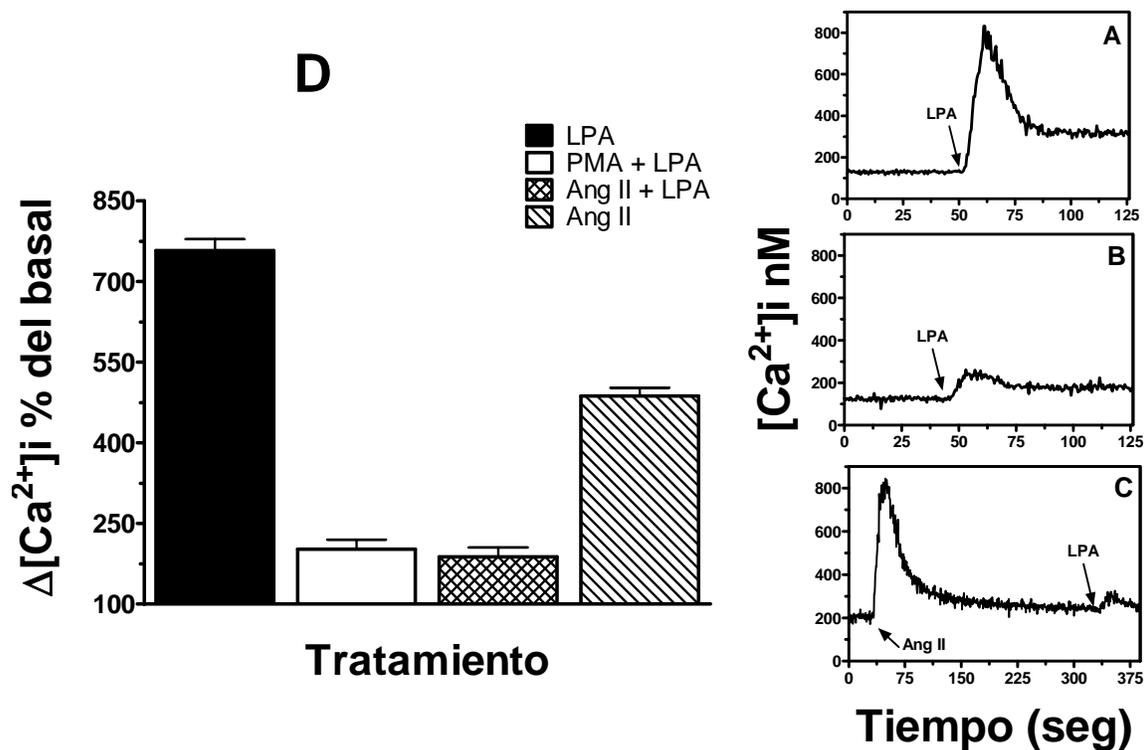


Figura 3 – Células C9 que sobreexpresan el receptor LPA₁-WT. Movilización de Calcio intracelular en respuesta a diferentes tratamientos. A) Trazo representativo en respuesta a LPA 1 μ M; B) trazo representativo del tratamiento con PMA 1 μ M 5 minutos previos a la estimulación con LPA 1 μ M; C) trazo representativo del efecto de la Ang II 100nM (5 minutos) sobre la respuesta a LPA 1 μ M. D) Representación en barras de la caracterización en Calcio. se graficaron los promedios \pm el error estándar (n= 6 a 10 experimentos).

En las células con el receptor LPA₁-S₃₄₁A, el tratamiento con LPA incrementa la movilización de calcio intracelular (figura 4A) en un 600 % aproximadamente (figura 4D). Cuando se tratan las células con PMA (5 minutos), disminuye esta respuesta celular (figura 4B) a un 400 % aproximadamente (figura 4D), esta respuesta es diferente a la observada para el receptor LPA₁-WT, ya que la inhibición de la movilización de calcio es menor (figuras 3B vs. 4B). El tratamiento con 100 nM de Ang II por 5 minutos, disminuye la movilización del calcio intracelular mediada por el LPA (figura 4C) en un porcentaje respecto al basal de aproximadamente 250 (figura 4D), similar a las células WT y las que sobreexpresan el receptor LPA₁-WT. También se observa que la respuesta inducida por la Ang II (figura 4C) es aproximadamente de 220 % (figura 4D). Aquí existe

una clara diferencia con respecto al PMA comparado con la Ang II ya que este sitio (S-341) es parcialmente resistente al PMA y no a la Ang II.

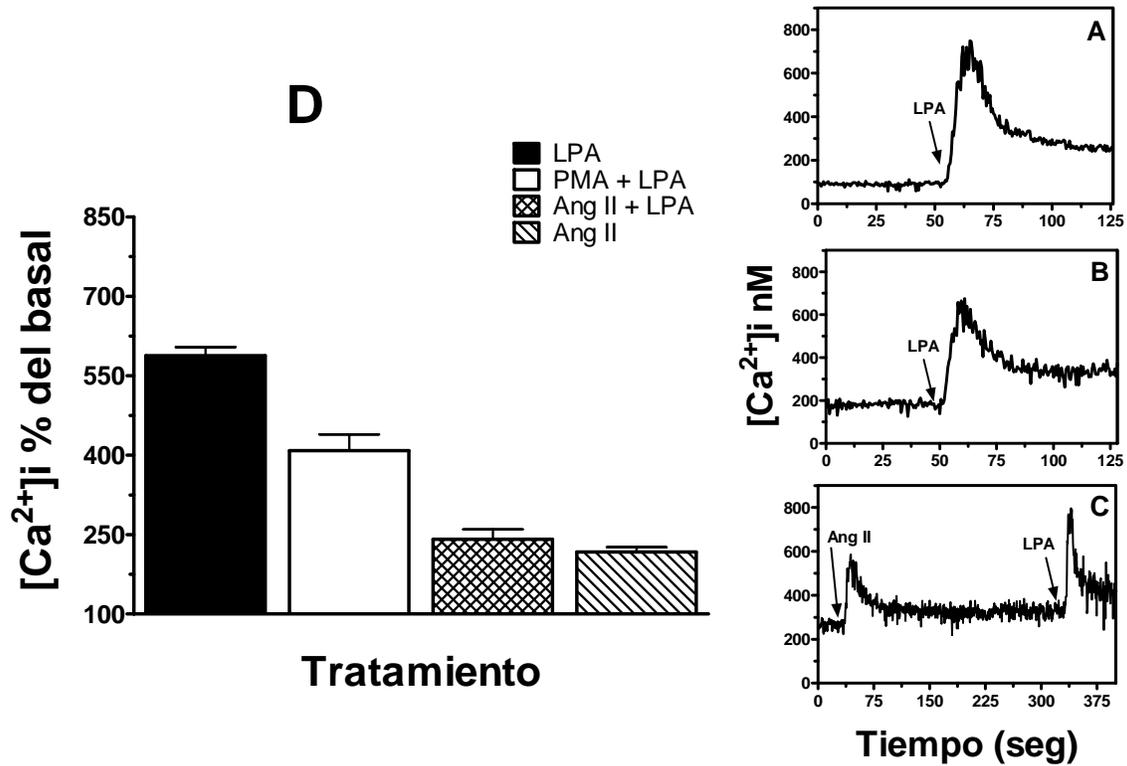


Figura 4 – Células C9 que sobreexpresan el receptor LPA₁-S₃₄₁A. Incremento en la movilización de Calcio intracelular en respuesta a diferentes tratamientos. A) Trazo representativo en respuesta a LPA 1 μ M; B) trazo representativo del tratamiento con PMA 1 μ M 5 minutos previos a la estimulación con LPA 1 μ M; C) trazo representativo del efecto de la Ang II 100nM (5 minutos) sobre la respuesta a LPA 1 μ M. D) Representación en barras de la caracterización en Calcio. se graficaron los promedios \pm el error estándar (n= 4 a 6 experimentos).

En el caso del otro sitio en el extremo carboxilo del receptor, el T-321, la respuesta del receptor mutante LPA₁-T₃₂₁V por su agonista (LPA) se observa alrededor de un 250 % (figuras 5A y 5D), muy por debajo de las células WT. Esta respuesta se abate por completo cuando las células son tratadas con el PMA por 5 minutos (figuras 5B y 5D) de manera similar a las WT. Sin embargo, tras 5 minutos de incubación con la Ang II, el estímulo con LPA muestra una respuesta similar a al tratamiento con LPA (figuras 5C y 5A respectivamente), de aproximadamente 250 % (figura 5D). A diferencia de la respuesta dada por los otros receptores, cuando las células que sobreexpresan el

receptor LPA₁-T₃₂₁V son estimuladas con la Ang II, no se observa respuesta en la movilización del calcio intracelular mediada por esta hormona (figura 5C y D).

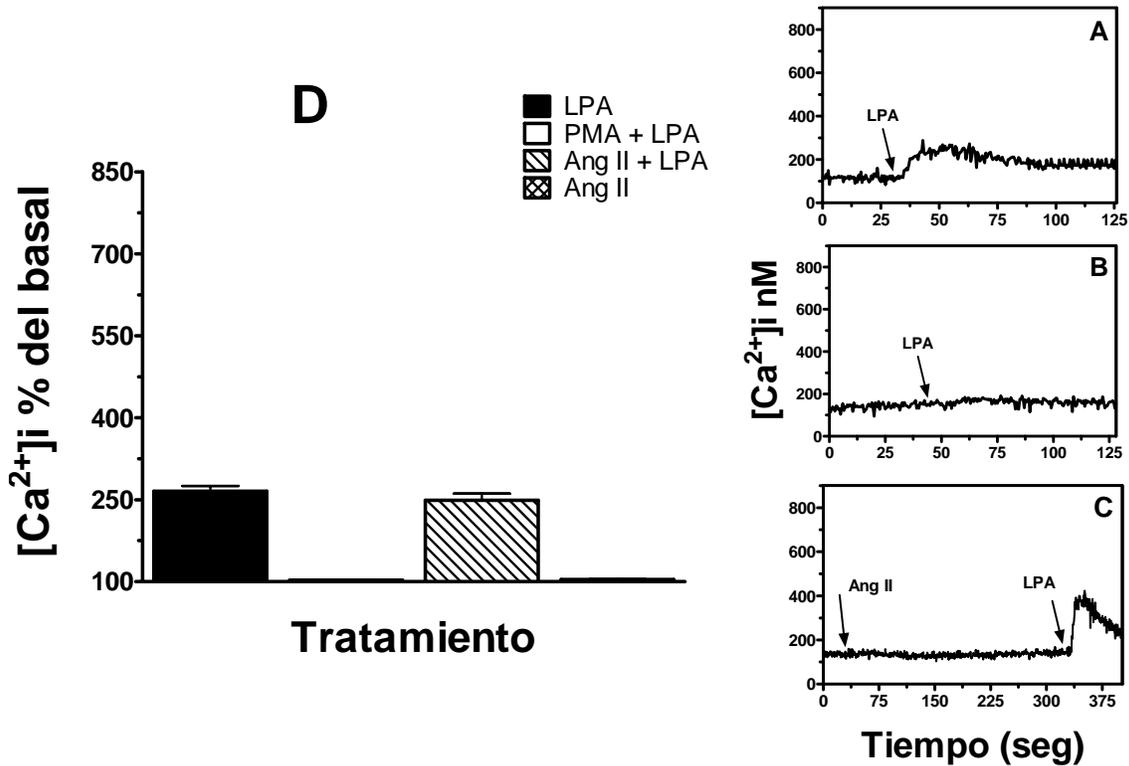


Figura 5 – Células C9 que sobreexpresan el receptor LPA₁-T₃₂₁V. Incremento en la movilización de Calcio intracelular en respuesta a diferentes tratamientos. A) Trazo representativo en respuesta a LPA 1 μ M; B) trazo representativo del tratamiento con PMA 1 μ M 5 minutos previos a la estimulación con LPA 1 μ M; C) trazo representativo del efecto de la Ang II 100nM (5 minutos) sobre la respuesta a LPA 1 μ M. D) Representación en barras de la caracterización en Calcio, se graficaron los promedios \pm el error estándar (n= 4 a 7 experimentos).

Finalmente se exploraron 2 sitios en la tercera asa intracelular (S-240 y 244) del receptor LPA₁, ya que esta región también participa en la regulación de los receptores de 7 dominios transmembranales. Las células C9 que sobreexpresan el receptor con la doble mutación LPA₁-S_{240, 244}A, presentaron una respuesta en la movilización de calcio similar a las células WT en presencia del LPA (figura 6A) de aproximadamente 300 % (figura 6D). Cuando son pretratadas con el PMA no se registra un incremento en la movilización del calcio intracelular (figuras 6B y 6D). Al estimular a las células con Ang II se observa un incremento (figura 6C) de aproximadamente 120 % con respecto al basal (figura 6D), esta respuesta está por debajo de la registrada en las células WT (figura 2D). Sin

embargo, la Ang II no tiene un efecto aparente sobre la respuesta al LPA (figura 6C), la cual una vez cuantificada se observa alrededor de 280 % (figura 6D), a diferencia del receptor LPA₁-T₃₂₁V, éste es sensible al PMA e insensible a la Ang II.

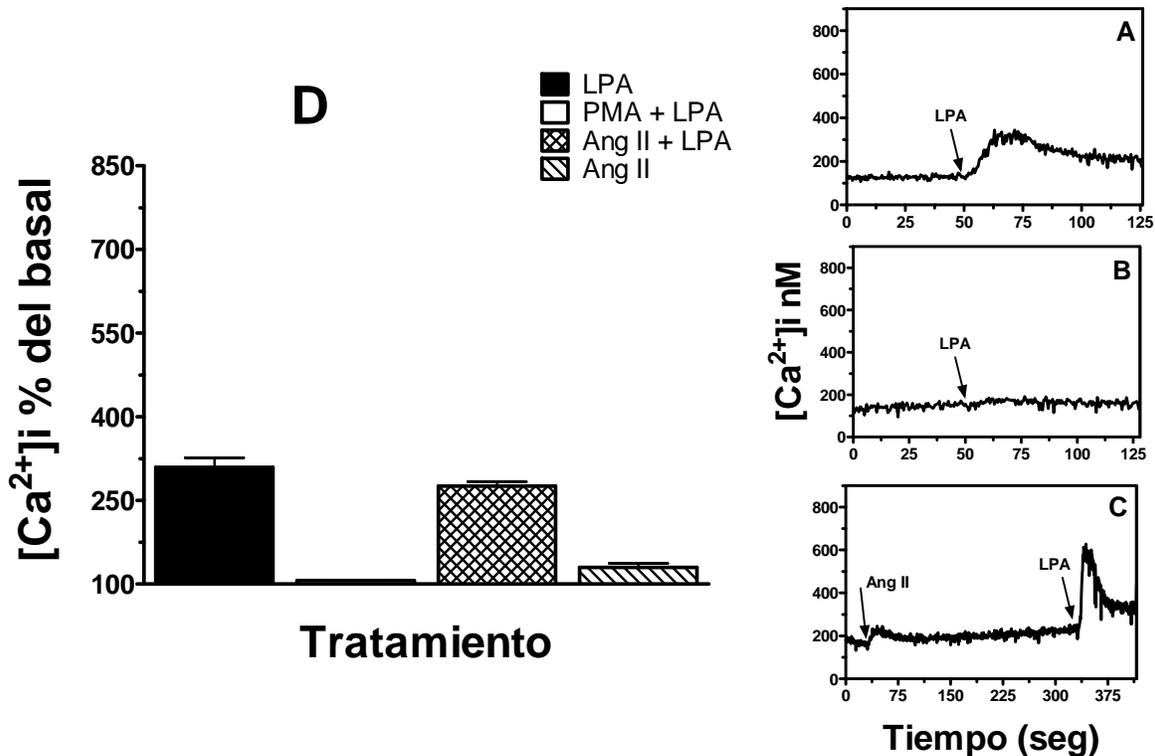


Figura 6 – Células C9 que sobreexpresan el receptor LPA₁- S_{240, 244}S. Incremento en la movilización de Calcio intracelular en respuesta a diferentes tratamientos. A) Trazo representativo en respuesta a LPA 1 μM; B) trazo representativo del tratamiento con PMA 1 μM 5 minutos previos a la estimulación con LPA 1 μM; C) trazo representativo del efecto de la Ang II 100nM (5 minutos) sobre la respuesta a LPA 1 μM. D) Representación en barras de la caracterización en Calcio, se graficaron los promedios ± el error estándar (n= 3 a 6 experimentos).

La respuesta de las líneas estables, comparada con la respuesta dada por las células WT, confirma la expresión de las proteínas de fusión y que cada receptor presenta efectos diferentes sobre la respuesta en la movilización del calcio intracelular no solo del receptor LPA₁, sino también, sobre la respuesta a la Ang II, indicando una relación entre las dos vías de transducción de señales.

7.3. Respuesta de las diferentes líneas estables al LPA.

Una vez terminada la caracterización, se analizó por separado cada tratamiento comparando la respuesta dada por cada línea celular que sobreexpresaban las diferentes proteínas de fusión del receptor LPA₁. Primero, se evaluó la respuesta al estimular las células con LPA 1 μ M (figura 7). Tal como reportaron Avendaño-Vázquez *et al.*, en el 2005, las células que sobreexpresan el receptor LPA₁-WT presentan un incremento en la movilización del calcio intracelular comparada con las células WT. Las células que sobreexpresan el receptor LPA₁-S₃₄₁A también poseen una respuesta significativamente mayor a las WT; sin embargo, está por debajo de la registrada para el receptor LPA₁-WT. En el caso del receptor LPA₁-T₃₂₁V, se puede observar un decremento en la respuesta basal de las células (comparada con las células WT) comportándose como dominantes negativas. La respuesta mediada por el receptor LPA₁-S_{240, 244}A es similar a la obtenida por las células WT es decir, no existe una diferencia significativa en la movilización del calcio intracelular.

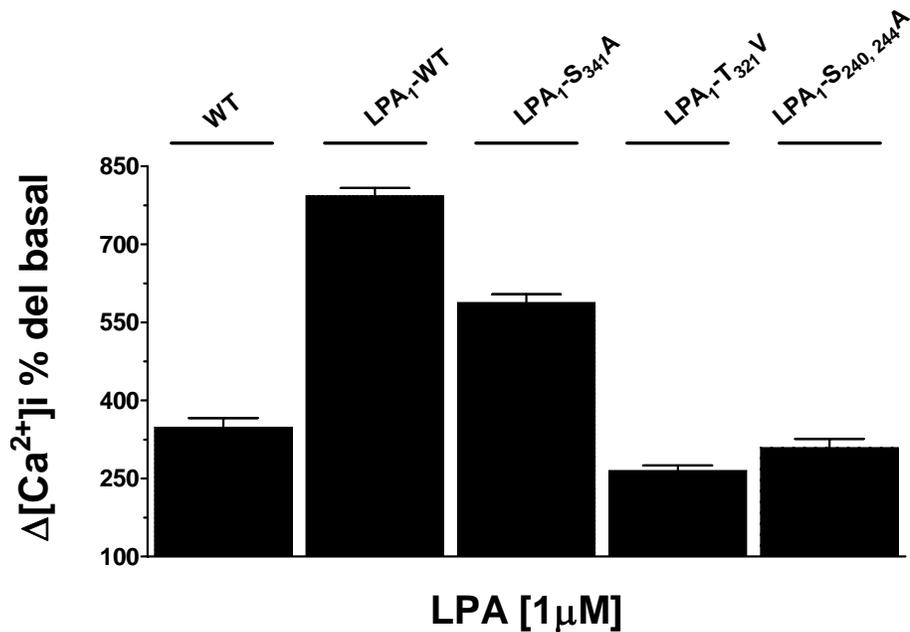


Figura 7 – Respuesta diferencial de las diferentes construcciones del receptor LPA₁. Se tomó como control el incremento de las células de tipo silvestre (WT) que expresan endógenamente los receptores tipo 1 y 2 para LPA y se comparó con la respuesta de las otras líneas celulares para evaluar el comportamiento de la sobreexpresión y diferentes mutaciones puntuales del receptor. Se graficaron los promedios \pm el error estándar (n= 6 a 10 experimentos). Se aplicó una prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni: existen diferencias estadísticamente significativas para WT versus LPA₁-WT con una $P < 0.001$; WT versus LPA₁-S₃₄₁A con una $P < 0.001$; y WT versus LPA₁-T₃₂₁V con una $P < 0.01$. Para WT versus LPA₁-S_{240, 244}S no existen diferencias significativas ($P > 0.05$).

El análisis de los datos obtenidos al comparar la respuesta de las diferentes construcciones del receptor LPA₁ sugieren en primera instancia que los receptores LPA₁-WT, LPA₁-S₃₄₁A y LPA₁-T₃₂₁V se expresan en las células C9 (lo cual correlaciona con los ensayos de fluorescencia); segundo, son funcionales, ya que responden al LPA; y tercero, cada uno responde en forma diferente, lo cual indica que cada uno de los sitios mutados posiblemente regulan diferentes puntos de la fisiología del receptor. En el caso del receptor LPA₁-S_{240, 244}A, los resultados muestran que los receptores si bien se expresan (figura 1E), parecen no ser funcionales ya que no modifican la respuesta en presencia del LPA en comparación con las células WT.

7.4. Desensibilización del receptor LPA₁ por el PMA.

Una vez confirmada la expresión y la respuesta funcional de los receptores mutantes al estímulo con LPA, se empleó el éster de forbol PMA para evaluar el posible papel de cada sitio en la regulación del receptor LPA₁ por la PKC. Cuando las células WT son tratadas con el PMA, la respuesta al LPA se abate por completo (figura 8WT), también las células que sobreexpresan el receptor LPA₁-WT presentan un comportamiento similar; sin embargo, la movilización del calcio intracelular no se abate completamente (figura 8LPA₁-WT), ambos datos correlacionan con lo reportado por Avendaño-Vázquez *et al.*, en el 2005. Los receptores LPA₁-S₃₄₁A no son completamente sensibles al PMA (figura 8LPA₁-S₃₄₁A), ya que no se observa el decremento abrupto en la respuesta al LPA como en el caso de los receptores LPA₁-WT. Existe la posibilidad de que el decremento registrado en la respuesta al LPA para estos receptores (LPA₁-S₃₄₁A), sea producto de la acción del PMA sobre los receptores endógenos de las células C9. Tanto los receptores LPA₁-T₃₄₁V como los LPA₁-S_{240, 244}A son sensibles al PMA (figura 8LPA₁-T₃₄₁V y 8LPA₁-S_{240, 244}A SS) ya que la respuesta decae por completo con el tratamiento con el éster de forbol, de manera similar que la respuesta en las células WT.

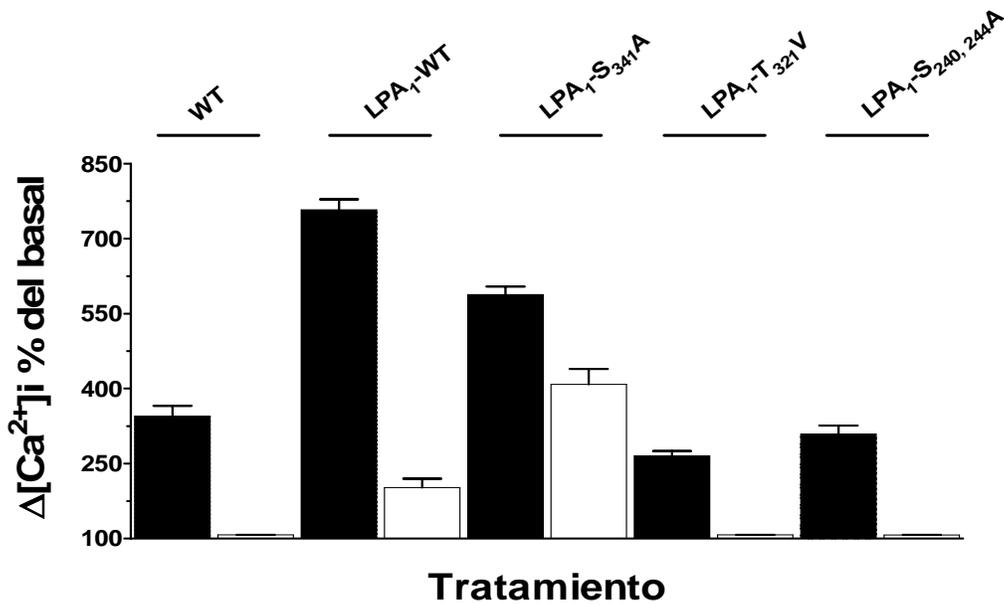


Figura 8 - Inhibición de la respuesta a LPA en la concentración de calcio intracelular mediada por PMA. Las células fueron tratadas 5 minutos con PMA 1 μ M en agitación constante y estimuladas posteriormente con LPA 1 mM (□); se observa también la respuesta de las células al LPA 1mM (■). Se graficaron los promedios \pm el error estándar (n= 4 a 10 experimentos). Se aplicó una prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni: WT, LPA vs. PMA P < 0.001; receptor LPA₁-WT, LPA vs. PMA P < 0.001; receptores LPA₁-S₃₄₁A, LPA vs. PMA P < 0.001; receptores LPA₁-S_{240, 244}A, LPA vs. PMA P < 0.001; y receptores LPA₁-T₃₂₁V, LPA vs. PMA P < 0.001.

7.5. Desensibilización del receptor LPA₁ por la Ang II.

Al estimular las células WT con la Ang II, la respuesta a los 5 minutos posteriores a este primer estímulo decae comparada con la respuesta solo al LPA (figura 9WT). De igual forma se determinó que en las células que sobreexpresan tanto el receptor LPA₁-WT como el LPA₁-S₃₄₁A también decae la respuesta al LPA al ser previamente estimuladas con la Ang II (figura 9LPA₁-WT y 9LPA₁-S₃₄₁A). Los receptores LPA₁-T₃₂₁V y LPA₁-S_{240, 244}A no son sensibles al tratamiento con la AngII (figura 9LPA₁-T₃₂₁V y LPA₁-S_{240, 244}A). Hay 2 puntos a resaltar de estos experimentos: 1) el mecanismo de transducción de señales del receptor LPA₁ es sensible a la Ang II, y además parece que actúa por mecanismos diferentes al PMA; y 2) éste mecanismo de regulación se desarrolla de manera fisiológica, a diferencia del PMA que regula al receptor LPA₁ de manera artificial.

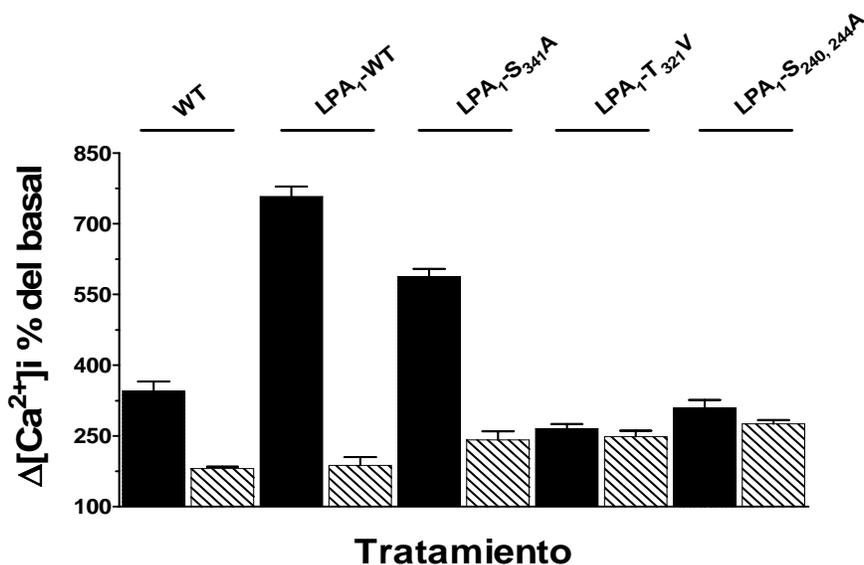


Figura 9 - Inhibición de la respuesta al LPA en la concentración de calcio intracelular mediada por la Ang II. Las células fueron estimuladas con Ang II 100nM e incubadas en agitación por 5 minutos, acto seguido se estimularon con LPA 1 μM (▨), se observa también la respuesta de las células al LPA 1mM (■). Se graficaron los promedios ± el error estándar (n= 3 a 10 experimentos). Se aplicó una prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni: existen diferencias significativas entre los 2 tratamientos (LPA 1 μM y AngII 100 nM + LPA 1μM): WT con una P < 0.001, los receptores LPA₁-WT con una P < 0.001 y los LPA₁-S₃₄₁A con P < 0.001. Los receptores LPA₁-T₃₂₁V y LPA₁-S_{240, 244}A no muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con una P > 0.05 para ambos casos.

7.6. Regulación diferencial del receptor LPA₁ por la AngII y el PMA

A partir de los resultados obtenidos en la caracterización funcional (movilización del calcio intracelular) en presencia de la Ang II y el PMA en los diferentes receptores mutantes, se realizó un análisis de los registros de estos tratamientos para comparar sus efectos sobre el receptor LPA₁.

Cuando se compara el efecto de la Ang II y el PMA sobre la movilización del calcio intracelular promovida por el receptor LPA₁ se detecta que tanto en las células WT como en las que sobreexpresan el receptor LPA₁-WT, tienen la capacidad de inhibir la respuesta celular (figura 10WT y 10LPA1-WT). En las células WT, el PMA provoca un decremento total de la movilización de calcio mientras que con la Ang II se registra una pequeña respuesta comparada con la registrada para el LPA. En el caso de las células LPA₁-WT, ambos tratamientos promueven un decremento significativo en la

movilización del calcio intracelular; sin embargo, todavía existe una pequeña respuesta (figura 10 LPA₁-WT), a diferencia de las WT donde se abate por completo la respuesta en el caso del PMA.

Al analizar las células que sobreexpresan establemente los receptores mutantes, se observa que las que expresan el receptor LPA₁-S₃₄₁A no son completamente sensibles al PMA, en comparación con las células WT y LPA₁-WT, pero sí al tratamiento con la Ang II (figura 10 LPA₁-S₃₄₁A); de tal forma que el sitio S-341 es relevante para la regulación del receptor LPA₁ vía el PMA pero no así para la regulación promovida por la Ang II. En el caso de los receptores LPA₁-S_{240, 244}A y LPA₁-T₃₂₁V, son completamente sensibles al PMA, sin embargo, el tratamiento con la Ang II no induce un decremento en la respuesta celular; de tal manera que estos sitios no son importantes en la regulación vía PMA, pero aparentemente están implicados en la regulación promovida por la Ang II (figura 10 LPA₁-S_{240, 244}A y 10 LPA₁-T₃₂₁V).

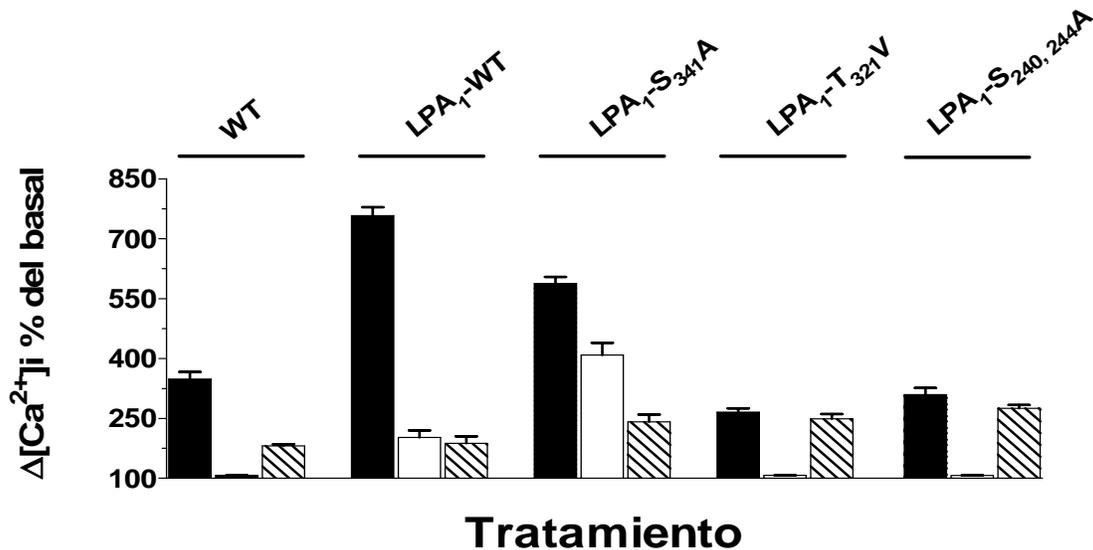


Figura 10 - Inhibición de la respuesta en calcio mediada por PMA y AngII. Se comparan los efectos de los tratamientos en las 5 líneas celulares. Tratamientos: LPA 1 μM (■); TPA 1 μM + LPA 1 μM (□); Ang II 100nM + LPA 1 μM (▨).

7.7. La regulación del receptor LPA₁ por la Ang II requiere la activación del receptor AT₁.

Para empezar a indagar el punto posible de regulación de la vía de señalización del receptor LPA₁ por el AT₁, se utilizaron los antagonistas selectivos Dup753 y PD123177 para los receptores AT₁ y AT₂ respectivamente con el fin de evaluar si dicha regulación requiere la activación del receptor AT₁, ya que se ha confirmado fisiológicamente que las células C9 expresan endógenamente solo este receptor [82]; el antagonista para el receptor AT₂ se utilizó en este caso como control.

En las tres líneas celulares se observa que el incremento en la movilización del calcio intracelular no decae cuando las células son preincubadas con el Dup753 (figura 11C y E), antagonista para el receptor AT₁, en comparación con las células tratadas solo con la Ang II (figura 11B y E); de tal manera que la respuesta celular observada se revierte en la presencia de éste antagonista ya que ésta es similar cuando se estimula solo con LPA (figura 11). Cuando las células WT y las que sobreexpresaban el receptor LPA₁-WT son preincubadas con el PD123177, antagonista del receptor AT₂, se observa que la respuesta celular decae de manera similar al tratamiento con Ang II (figura 11D y E). No obstante, este efecto no se observa para el receptor LPA₁-S₃₄₁A, donde la inhibición de la movilización del calcio intracelular promovida por la Ang II se revierte casi en su totalidad con respecto al estímulo con LPA (figura 11SA) en presencia del PD123177.

El análisis de estos datos sugiere que la activación del receptor AT₁ por su agonista es fundamental para la regulación del receptor LPA₁, además da un indicio de la participación del receptor AT₂ en esta regulación en el contexto celular para el receptor LPA₁-S₃₄₁A y, que en dicho efecto es importante el sitio S-431.

7.8. Fosforilación de los diferentes receptores mutantes

Se ha reportado que tanto el LPA como el PMA inducen la fosforilación del receptor LPA₁ [7, 94] y que en el caso del PMA, esta fosforilación participa en la regulación del receptor vía desensibilización e internalización [94]. Por lo tanto, se evaluó el nivel de

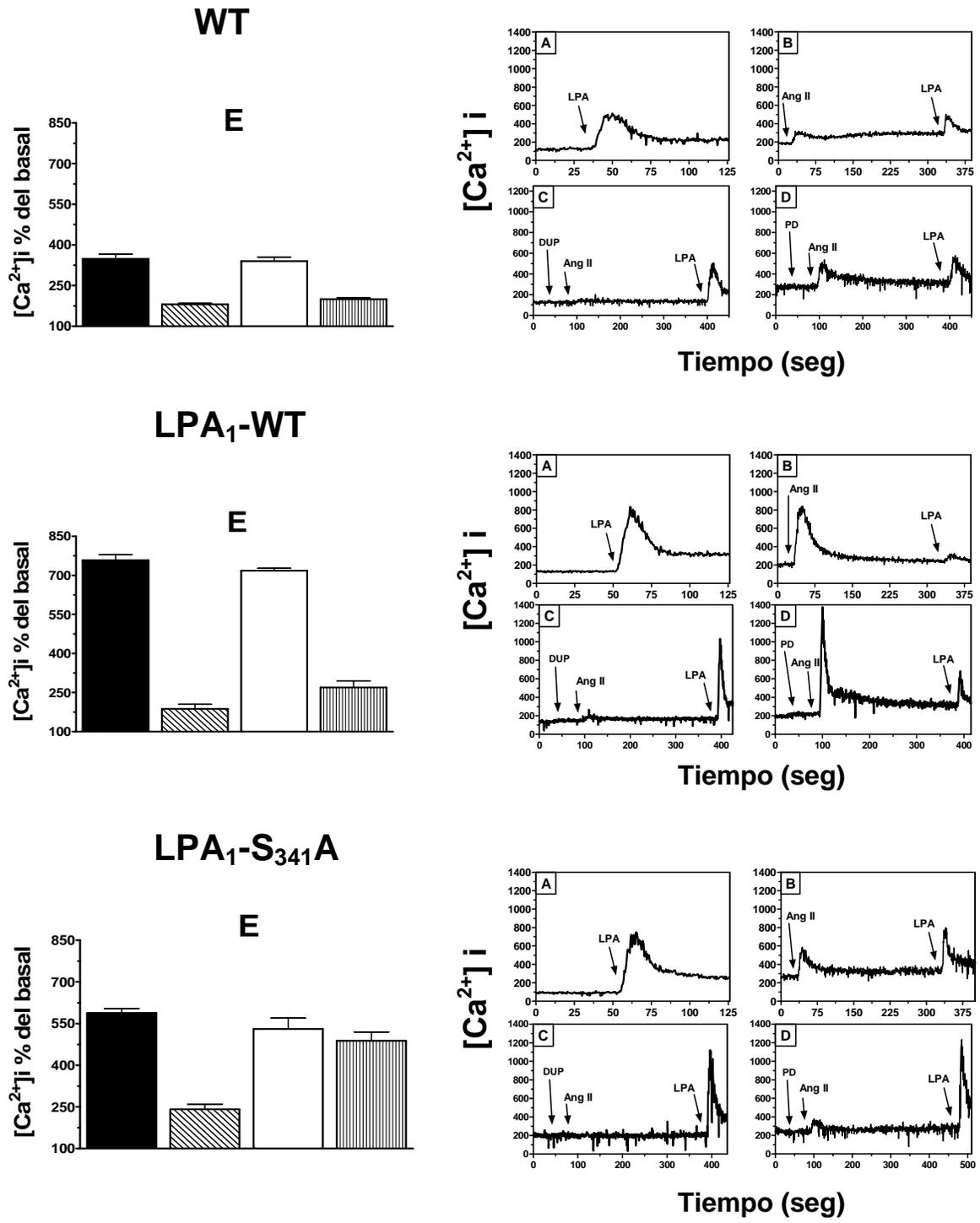


Figura 11 – Efecto de los antagonistas para los receptores AT₁ y AT₂. Paneles A-D, trazos representativos de la movilización del calcio intracelular. Panel E, representación en barras de la caracterización. Tratamientos: LPA (Ay ■); Ang II + LPA (B y ▨); Dup753 + Ang II + LPA (C y □); Pd123177 + Ang II + LPA (D y ▩). Las concentraciones de los reactivos fueron 1μM para el caso del LPA , 100nM para la Ang II y 10 μM para los antagonistas; en el caso de la Ang II las células se incubaron 5 minutos previos a la estimulación con LPA, para los antagonistas el tiempo de incubación fue de 90 seg previos a la estimulación con Ang II. Se graficaron los promedios ± el error estándar (n= 3 a 10 experimentos). Se aplicó una prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni: No existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos LPA (■) y Dup753 + Ang II + LPA (□) para las 3 líneas celulares con una P > 0.05.

fosforilación de los receptores mutantes para evaluar su papel en función de los sitios mutados.

En la figura 12 se muestra una imagen representativa del grado de fosforilación de los receptores mutantes. Se observa que el receptor LPA₁-WT se fosforila con el estímulo de LPA en comparación con el basal (figura 12A-1 y 2) y ésta aumenta en el tratamiento con PMA (figura 12A-3). En el caso del receptor LPA₁-S₃₄₁A se encuentra en un estado sobrefosforilado en su estado basal comparado con el LPA₁-WT (figura 12B-1), esta fosforilación aumenta con el tratamiento con LPA y aun más con el PMA (figura 12B-2 y 3). El receptor LPA₁-T₃₂₁V presenta un patrón de fosforilación similar al LPA₁-WT (figura 12C). En el receptor LPA₁-S_{240, 244}A la fosforilación aumenta ligeramente con el LPA y PMA (figura 12D-2 y 3) con respecto a su basal; sin embargo, la fosforilación en generales es aparentemente menor comparada con las LPA₁-WT.

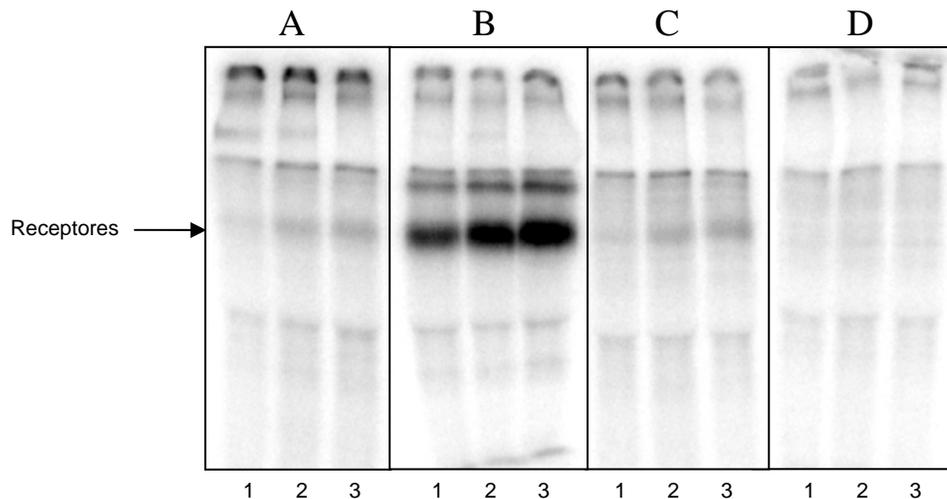


Figura 12 – Fosforilación de los receptores mutantes. Las células fueron estimuladas con LPA 1 μ M y PMA 1 μ M antes de agregar el buffer de lisado. A) LPA₁-WT; B) LPA₁-S₃₄₁A; C) LPA₁-T₃₂₁V; y, D) LPA₁-S_{240, 244}A. 1) Basal; 2) LPA; y, 3) PMA.

Estos datos son preliminares, el grado de fosforilación de cada receptor no se puede determinar con exactitud ya que los resultados estarían sesgados por el nivel de expresión de cada receptor y/o las interacciones entre los receptores mutantes y los

endógenos de las células C9, por lo cual se tendría que realizar experimentos que permitieran evaluar esta variable y así comparar el nivel de fosforilación de cada mutante.

7.9. El receptor LPA₁ es fosforilado por la Ang II y el PMA

Ya que en el análisis de la fosforilación de los receptores mutantes el LPA₁-S₃₄₁A está notablemente sobrefosforilado, y que tanto el LPA como la Ang II promueven la fosforilación del receptor LPA₁ [94], se analizó la fosforilación en los receptores LPA₁-S₃₄₁A comparados con los LPA₁-WT en presencia del LPA y Ang II.

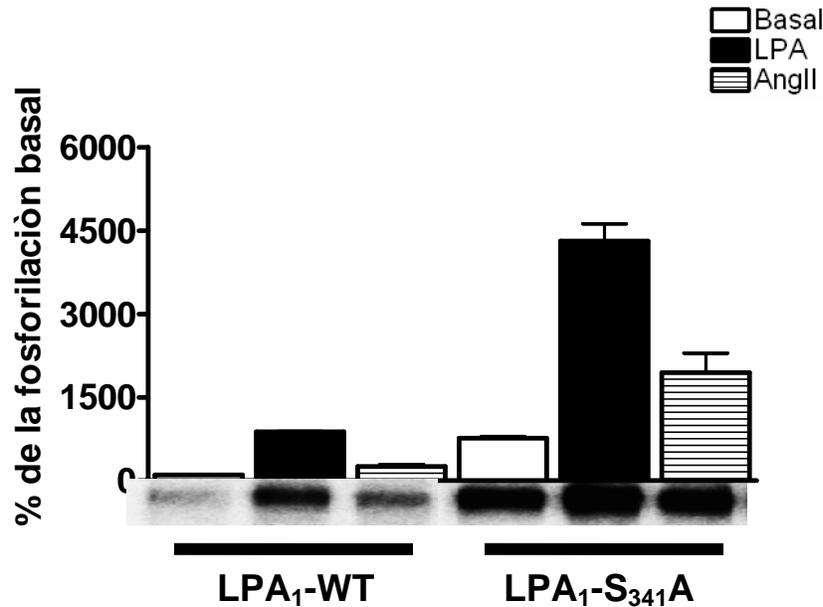


Figura 13 – Fosforilación del receptor LPA₁-WT y el mutante LPA₁-S₃₄₁A. Las células fueron estimuladas con LPA 1μM y Ang II 100nM 5 minutos + LPA 1μM, antes de agregar el buffer de lisado. La determinación de la fosforilación se realizó en un fosforimager. Se graficaron los promedios ± el error estándar (n= 2 experimentos).

Para el caso del receptor LPA₁-WT, tanto el LPA como la Ang II los fosforilan, sin embargo, en presencia del LPA ésta se incrementa considerablemente, mientras que la Ang II fosforila al receptor LPA₁ en una proporción menor comparada con el estímulo de LPA (figura 13). Al igual que en los resultados anteriores de fosforilación (figura 12),

los receptores LPA₁-S₃₄₁A se encuentran sobrefosforilados en su estado basal comparado con los LPA₁-WT, ésta aumenta considerablemente cuando las células son tratadas con el LPA y también se detecta que la Ang II fosforila al receptor (figura 13) empero, es menor en comparación con el LPA.

7.10. La fosforilación inducida por la Ang II no internaliza a los receptores LPA₁.

Ya que la fosforilación de un receptor de siete dominios transmembranales es un mecanismo de regulación que en ciertos casos involucra la internalización del receptor y además se ha observado que el PMA actúa vía este mecanismo sobre el receptor LPA₁ (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2005; Martínez-Ortiz, 2007), se probó si la fosforilación inducida por la Ang II tiene el mismo efecto.

En las imágenes de microscopía confocal se observa que la distribución de los receptores LPA₁-WT no presenta cambios después de los 5 minutos de incubación con la Ang II (figura 14, panel derecho) con respecto a las células control (figura 14, panel izquierdo). Es decir, los receptores LPA₁-WT no se internalizan cuando las células son estimuladas con la Ang II ya que colocalizan con el marcador de membrana FM4-64, y no se observa un desplazamiento de la fluorescencia hacia el interior de la célula. Estos resultados sugieren que la regulación del receptor LPA₁ inducida por la Ang II se lleva a cabo de una manera independiente a la internalización y la fosforilación observada anteriormente del receptor LPA₁.

7.11. La regulación del receptor LPA₁ por la Ang II es independiente de la activación de PKC.

Ya se tenía un indicio de que la PKC no participaba en la regulación funcional del receptor LPA₁ promovida por la activación del receptor AT₁, ya que las células con los receptores mutantes son sensibles diferencialmente al PMA y la Ang II. Sin embargo, ya que en los datos reportados por Avendaño-Vázquez *et al.*, en el 2005 [94] se observa que

Control

Ang II

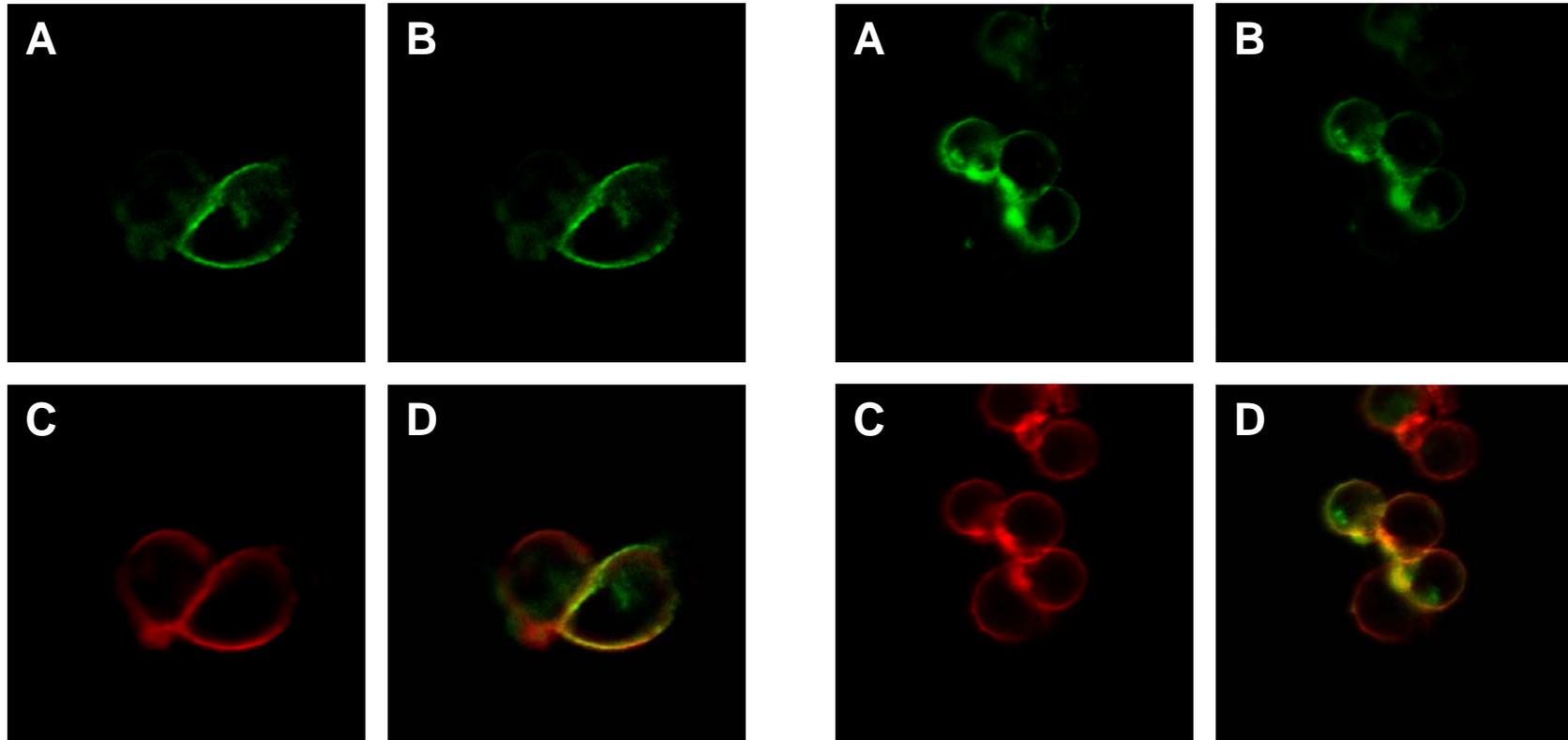


Figura 14 – Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de los receptores LPA₁-WT. Las células que sobreexpresaban el receptor fueron lavadas y mantenidas en PBS estéril, posteriormente se incubaron 5 minutos con Ang II 100nM y en el caso de las control se incubaron los 5 minutos pero sin estímulo. Acto seguido se agregó el marcador de membrana FM4-64 y dejó un minuto. A) células sin estimular, B – C) 5 minutos posteriores a la estimulación con Ang II: B) imagen de la fluorescencia en verde producto de la proteína de fusión LPA₁-EGFP; C) imagen de fluorescencia en rojo producto del FM4-64; y D) merge de las imágenes B y C para observar la colocalización. Las imágenes fueron tomadas con una intensidad de láser del 30 % y misma apertura numérica.

en la fosforilación del receptor participa la PKC, ya que se revierte con el inhibidor BIM para esta cinasa, se utilizó el inhibidor de amplio espectro estaurosporina.

Mientras el efecto inhibitor sobre la movilización del calcio intracelular promovido por el PMA es revertido cuando las células son tratadas con estaurosporina, comparado con el estímulo de LPA (figura 15 □), no se detecta un incremento en la movilización del calcio cuando las células son tratadas previamente con la Ang II (figura 15 ▨). Estos datos indican que a pesar de que la Ang II promueve la fosforilación del receptor LPA₁-WT vía la activación de la PKC, ésta no parece jugar un papel importante en la regulación del receptor LPA₁.

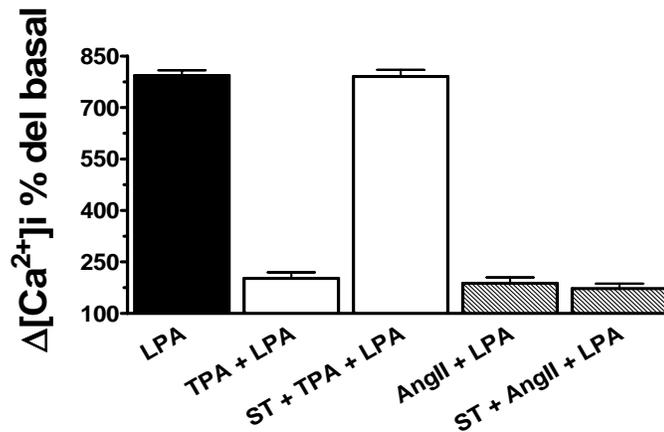


Figura 15 – Efecto de la estaurosporina sobre la regulación del receptor LPA₁ promovida por el PMA y Ang II. Las células fueron tratadas 15 minutos con las estaurosporina 1μM y 5 minutos tanto para el PMA 1μM como para la Ang II 100 nM previos a las estimulación con el LPA 1 μM; la barra oscura representa el control con LPA, las barras blancas representan las células que fueron tratadas con el PMA y las barras rayadas el tratamiento con la Ang II. Se graficaron los promedios ± el error estándar (n= 3 experimentos). Se aplicó una prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni: no existe diferencia significativa entre el tratamiento LPA versus ST + TPA + LPA con una P > 0.05. Entre los tratamientos LPA versus ST + Ang II + LPA existe diferencia estadísticamente significativa con una P < 0.001.

7.12. El receptor LPA₁ afecta la actividad del receptor AT₁.

Al analizar la movilización del calcio intracelular promovida por las diferentes construcciones del receptor LPA₁ en respuesta al LPA, se detecta que responden diferencialmente a este estímulo (figura 16A). Sin embargo, si se compara la respuesta inducida por la Ang II y la dada por el LPA, se puede ver que existe una correlación entre

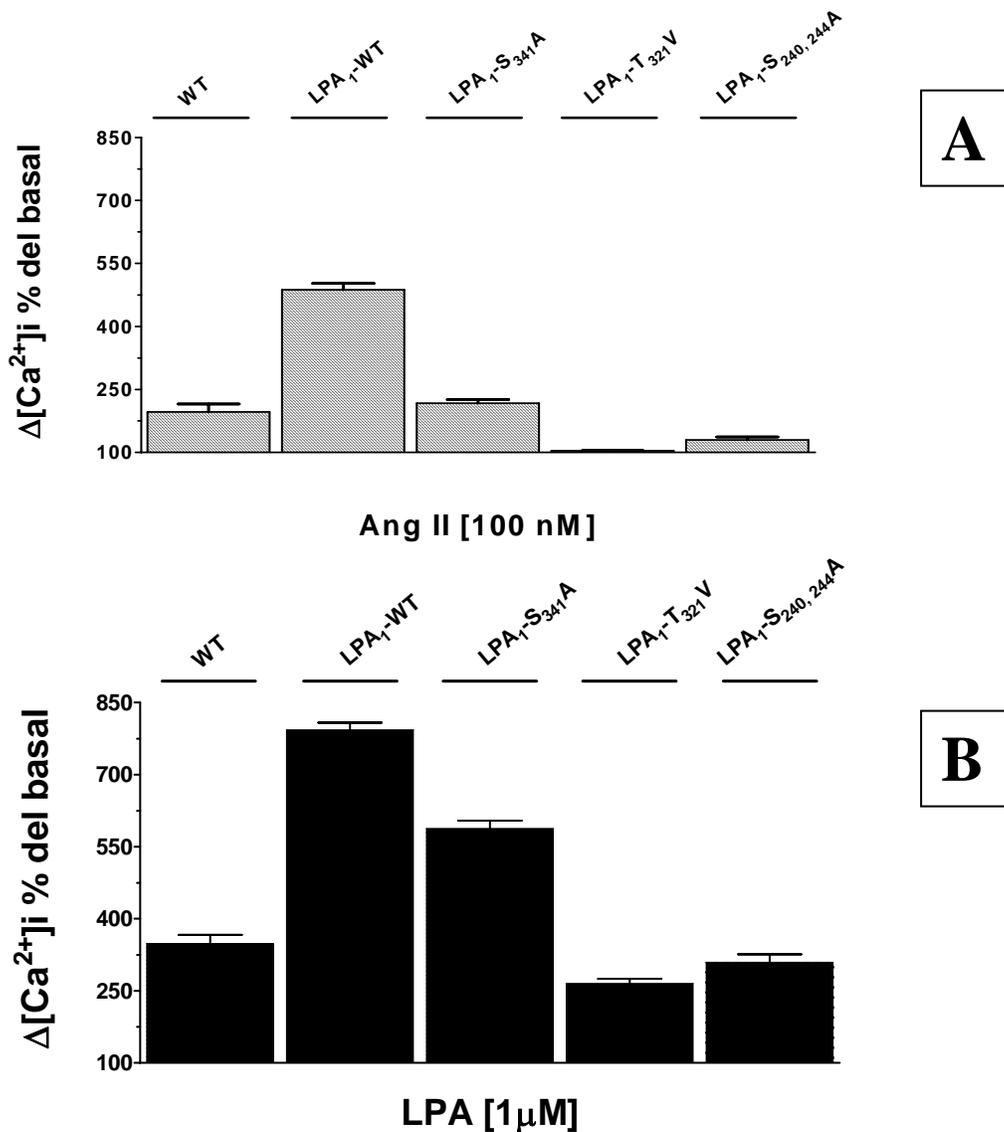


Figura 16 – Correlación entre la respuesta a LPA y AngII. A) incremento en la concentración del Ca²⁺ intracelular en respuesta a LPA 1 mM. B) incremento en la concentración del Ca²⁺ intracelular en respuesta a la AngII 100 nM. Se graficaron los promedios \pm el error estándar (n= 3 a 10 experimentos). Se aplicó una prueba de ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple de Bonferroni: Panel A, existen diferencias estadísticamente significativas para WT vs. LPA₁-WT con una P < 0.001; WT vs. LPA₁-S_{240,244}S con una P < 0.05 y WT vs. LPA₁-T₃₂₁V con una P < 0.001. Para WT vs. LPA₁-S₃₄₁A, no existen diferencias significativas P > 0.05. Panel B, existen diferencias estadísticamente significativas para WT versus LPA₁-WT con una P < 0.001; WT versus LPA₁-S₃₄₁A con una P < 0.001; y WT versus LPA₁-T₃₂₁V con una P < 0.01. Para WT versus LPA₁-S_{240,244}S no existen diferencias significativas (P > 0.05).

ellas (figura 16A y B). Las células que sobreexpresan el receptor LPA₁-WT presentan una respuesta aumentada comparada con las células WT, tanto para el LPA como la Ang II (figura 16WT A y B), mientras que la respuesta mediada por el receptor LPA₁-

S₃₄₁A es similar a la observada en las células WT solo para la Ang II (figura 16 LPA₁-S₃₄₁A), pero si se incrementa para el LPA. En el caso del receptor LPA₁-S_{240, 244}A, la respuesta a la Ang II decae considerablemente (figura 16 LPA₁-S_{240, 244}A) y la respuesta al LPA se mantiene en los mismos parámetros que las WT. Las células que sobreexpresan el receptor mutante LPA₁-T₃₂₁V no movilizan calcio cuando son estimuladas con las Ang II y en el caso de la respuesta al LPA este receptor se comporta como dominante negativa (figura 16 LPA₁-T₃₂₁V, A y B). Estos resultados proveen evidencia de que la activación del receptor LPA₁ también regula la actividad del receptor AT₁.

7.13. Efecto de los receptores mutantes del LPA₁ en la morfología de las células C9.

A pesar de que el efecto de los receptores mutantes sobre la morfología celular no es parte de los objetivos del presente, durante el desarrollo de este trabajo se observó que los receptores LPA₁ mutantes influyen de manera notable sobre la morfología de las células C9. Las células que sobreexpresan los receptores LPA₁-S₃₄₁A y LPA₁-T₃₂₁V presentaban una morfología alargada en comparación con las células C9 WT que son compactas. Las células que sobreexpresan los receptores LPA₁-WT y LPA₁-S_{240, 244}A siguen el mismo patrón que las WT.

Es importante resaltar que en las imágenes de los ensayos de fluorescencia (figura 1) no se pueden apreciar bien éstas diferencias morfológicas; este efecto se observa en cultivos celulares a máxima confluencia. Las características morfológicas descritas para las células con los receptores mutantes se observaron durante el cultivo celular y da pie a investigaciones posteriores para evaluar el papel del receptor LPA₁ en esta respuesta celular.

8. Discusión

El LPA se ha convertido en el objeto de estudio de varios grupos de investigación debido a la variedad de respuestas celulares en las que está implicado, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Aunque su estudio como molécula señalizadora comenzó en los años 80, fue hasta finales de los 90 cuando el conocimiento sobre el LPA tuvo grandes avances. Desde entonces, se han generado numerosas publicaciones sobre diferentes aspectos en la fisiología y mecanismos de señalización del LPA; entre los cuales se encuentra la identificación de 5 receptores de membrana específicos para esta molécula. A pesar del gran desarrollo en el conocimiento del LPA, un campo de estudio donde existe poca información es sobre los mecanismos de regulación de sus receptores.

El principal interés en este trabajo fue estudiar la importancia de 4 sitios probables de fosforilación por PKC en la regulación funcional del receptor LPA₁; ya que estudios previos demostraron que la PKC y en especial las isoformas PKC α y PKC β 1 participan en la regulación de este receptor [7, 94]. Para lo cual se diseñaron y generaron mutantes específicos del receptor LPA₁ para estos sitios a partir de la proteína de fusión LPA₁-WT generada en un estudio previo [3] y se sobreexpresaron en células C9.

En el análisis de la distribución de los receptores mutantes, se detecta que parte de la fluorescencia se ubica en la periferia en las células C9 que sobreexpresan los receptores LPA₁-WT, LPA₁-S₃₄₁A y LPA₁-S_{240, 244}A, debido a que estas células son epiteliales y su morfología es aplanada, parte de la fluorescencia se observa hacia el interior celular, sin embargo probablemente esto sea efecto de dicha morfología ya que no existe una homogeneidad en la fluorescencia como en el caso de las células transfectadas solo con la EGFP. Existen zonas en la periferia celular con una fluorescencia muy marcada que al contrastar con las imágenes de luz transmitida correlaciona con la membrana celular, de tal forma que se considera que los receptores no solo se expresan, sino también, que se ubican en la membrana plasmática. Además se pueden visualizar pequeñas vesículas en el interior celular, así como zonas fluorescentes en las proximidades del núcleo, que quizá correspondan a distintas etapas de síntesis y

procesamiento del receptor LPA₁. El caso más notable de estos ensayos es la distribución del receptor LPA₁-T₃₂₁V, ya que la fluorescencia en las células se distribuye de manera perinuclear, lo cual podría considerarse que la proteína de fusión no es funcional, empero, una vez que las células que sobreexpresan éste receptor son estimuladas con LPA 1µM se observa que el incremento en la movilización de calcio es menor comparado con las WT de tal forma que se comporta como dominante negativa. La parte notable del receptor LPA₁-T₃₂₁V por tanto es su distribución, ya que no se ubica en la membrana plasmática, lo cual lleva a pensar que el sitio mutado en este receptor, el T-321 juega un papel importante en su incorporación a la membrana celular y, además, que a pesar de localizarse al interior celular, regula negativamente la respuesta normal de las células C9 al LPA.

Cuando las células que expresan las diferentes proteínas de fusión son estimuladas con LPA 1 µM, se observa que movilizan el calcio intracelular de manera diferente, salvo el receptor LPA₁-S₃₄₁A, cuya respuesta no difiere significativamente de la dada por las células WT. El receptor LPA₁-WT, como ya se había reportado [3], incrementa la movilización del calcio intracelular considerablemente en comparación de las células de tipo silvestre, de tal manera que se asegura que la mayoría de los efectos observados para los diferentes tratamientos son producto de la activación del mecanismo de transducción de señales del receptor LPA₁. El receptor LPA₁-S₃₄₁A, también presenta una respuesta aumentada pero inferior a las células con el receptor LPA₁-WT. El receptor LPA₁-T₃₂₁V, como ya se mencionó, se comporta como dominante negativa. Estos resultados de los receptores LPA₁-S₃₄₁A y LPA₁-T₃₂₁V pueden llevar a una conclusión inferida subjetivamente pero quizá no errada: se sabe de la formación de homo- y heterodímeros funcionales entre receptores de 7 dominios transmembranales [95-98] y además, se ha reportado la formación de éstos para los diferentes isotipos de receptores para LPA [99]. Por tanto, no se descarta la posibilidad de que las respuestas celulares puedan ser producto de la homo- y/o heterodimerización de los receptores para LPA (y probablemente por eso parezcan redundantes las respuestas mediadas por cada isotipo). Retomando, la movilización diferencial del calcio intracelular que se observa en las células que sobreexpresan los receptores LPA₁-S₃₄₁A y LPA₁-T₃₂₁V, puede ser producto

de la formación de homodímeros (entre los receptores fusionados a la proteína fluorescente o con el receptor LPA₁ endógeno), y/o heterodímeros con los receptores LPA₂, que también se expresan en éstas células. Quizá esta relación no permita un acoplamiento óptimo de las proteínas G al receptor LPA₁ (figura 17); sin embargo, se necesita diseñar estrategias que permitan reconocer estos multímeros entre los receptores para LPA.

En el tratamiento con PMA, el dato sobresaliente es el registrado para el receptor LPA₁-S₃₄₁A ya que son parcialmente resistentes a su efecto, mientras que en las otras células que expresan los otros receptores mutantes, el LPA₁-WT y las células C9 WT, la respuesta al LPA decae en presencia del PMA. El ligero decremento de la movilización del calcio intracelular por los receptores LPA₁-S₃₄₁A puede deberse a la acción del PMA sobre los receptores endógenos más que a los mutantes sobreexpresados, pero no se tiene la certeza ya que no se puede diferenciar la respuesta dada por cada tipo de receptor. Con la ayuda de alguna estrategia experimental (como el uso de RNA de interferencia) que de cierta manera silencie tanto a los receptores LPA₁ y LPA₂ endógenos para abatir su participación en la movilización de calcio intracelular o encontrar un modelo celular adecuado donde no se expresen receptores endógenos para LPA, se podrá determinar si el decremento en presencia del PMA se debe a su efecto sobre los receptores endógenos. El sitio S-341 posiblemente participa en la desensibilización del receptor LPA₁ vía activación de la PKC por el PMA.

El incremento registrado en la movilización de calcio intracelular en las células que sobreexpresan el receptor LPA₁-WT para el tratamiento con PMA, puede deberse a que el pool de PKC celular es menor al del receptor sobreexpresado, es decir, no fosforila a la totalidad de los receptores, no obstante, el efecto de PMA sobre la respuesta celular sigue siendo muy notable.

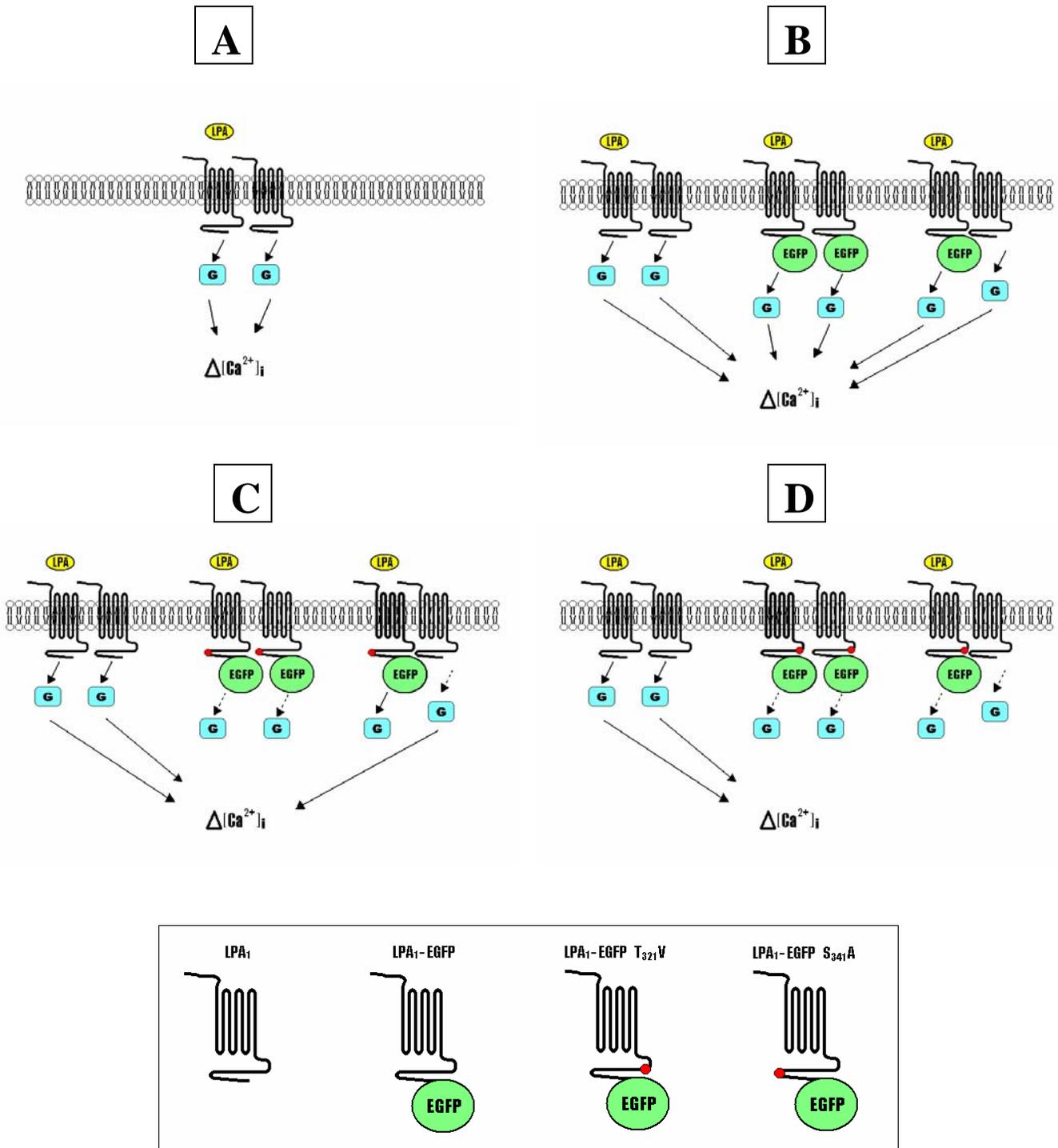


Figura 17 - Formación de homodímeros del receptor LPA₁. Se muestra la posible causa por la cual se observan las diferencias de las células que expresan establemente las proteínas de fusión, las líneas puntuadas representan una posible falla en el acoplamiento de la proteína G (G) al receptor una vez activado por su ligando (LPA). Los posibles heterodímeros formados con el receptor LPA₂ no se consideran en éste modelo ya que no se sabe si en éstas células esta acoplado a la vía del calcio. A) células WT, B) células que sobreexpresan el receptor LPA₁-WT, C) células que sobreexpresan el receptor LPA₁-S₃₄₁A, y D) células que sobreexpresan el receptor

La regulación a través de la activación de la PKC por el PMA es un mecanismo artificial ya que el éster de forbol actúa directamente sobre la cinasa. Actualmente no se conoce un mecanismo de desensibilización vía la activación de la PKC en condiciones fisiológicas. En los resultados presentados por Avendaño-Vázquez *et al.*, en el 2005, se observó que la Ang II fosforila al receptor LPA₁ y este efecto se revierte cuando se utiliza un inhibidor de amplio espectro para PKC, el BIM. Además la movilización de calcio inducida por la Ang II aumenta en las células que sobreexpresan el receptor LPA₁-WT, de tal forma que probablemente existe una relación funcional entre estas vías de señalización, por tal motivo se buscó si la Ang II podía regular la actividad del receptor LPA₁.

Cuando las células WT son tratadas 5 minutos con la hormona Ang II, se detecta un decremento en la movilización de calcio tanto en las células WT como en las que sobreexpresan el receptor LPA₁-WT, indicando que si existe una desensibilización heteróloga de la Ang II hacia el receptor LPA₁. Por otro lado, cuando se analiza éste efecto con los receptores LPA₁-T₃₂₁V y LPA₁-S_{240, 244}A, los resultados indican que son totalmente resistentes a ésta regulación, a diferencia de los receptores LPA₁-S₃₄₁A que tienen una respuesta similar a la dada por las células WT y las que sobreexpresan el receptor LPA₁-WT. Estos resultados sugieren que los sitios S₂₄₀ y S₂₄₄ probablemente participan en la regulación del receptor LPA₁ por la Ang II.

En las células que sobreexpresan el receptor LPA₁-T₃₂₁V no se detecta un incremento en la movilización del calcio intracelular cuando éstas son estimuladas con la Ang II, de tal forma que, posiblemente al no existir una señalización vía calcio de la Ang II no se puede dar la regulación negativa del receptor LPA₁; lo cual indica que posiblemente es necesario que se active esta cascada de señalización u otras cinasas para la regulación del receptor LPA₁. Por otro lado, ya que el receptor LPA₁-T₃₂₁V se comporta como dominante negativo en la respuesta al estímulo con LPA, quizá este efecto se relaciona con la falta de respuesta al estímulo de Ang II; lo cual sugiere una regulación de la vía de la Ang II por el receptor LPA₁.

En este punto se tiene por lo tanto que:

- 1) El receptor LPA₁ es regulado tanto por el PMA como la Ang II, ya que ambos tienen la capacidad de inhibir la movilización del calcio intracelular.
- 2) Ubicando estructuralmente la regulación, posiblemente la mediada por la Ang II se lleva a cabo en la tercer asa intracelular ya sea por la serina 240, 244 o ambas, ya que ambos sitios fueron mutados en éste receptor (LPA₁-S_{240, 244}A) y las células que lo expresan son resistentes al tratamiento con Ang II.
- 3) La regulación por el PMA posiblemente se lleva a cabo en el extremo carboxilo donde se encuentra la serina 341.
- 4) Que al parecer la activación por Ang II de la vía de señalización por calcio es necesaria para la regulación del receptor LPA₁, por lo observado en las células que sobreexpresan el receptor LPA₁-T₃₂₁V.
- 5) En el caso del receptor LPA₁-T₃₂₁V que se comporta como dominante negativo, no hay movilización de calcio por Ang II, es decir que la actividad del receptor LPA₁ puede estar regulando al sistema de transducción de señales de la Ang II.

Para determinar si la activación del receptor AT₁ por su agonista es necesaria para la regulación del LPA₁, se utilizaron antagonistas selectivos tanto para el receptor AT₁ como el AT₂. Cuando las células que sobreexpresan los receptores LPA₁-WT, LPA₁-S₃₄₁A y las células C9 WT, son tratadas con el antagonista selectivo para el receptor AT₁ Dup753, el efecto de la Ang II sobre la respuesta al LPA no se detecta; por tanto, el receptor AT₁ tiene que ser activado para que la regulación heteróloga se efectúe. Por otro lado, la reversión del efecto de la Ang II sobre la movilización del calcio promovida por el LPA en presencia del antagonista PD123177 en las células que sobreexpresan el receptor LPA₁-S₃₄₁A, sugiere que el receptor AT₂ posiblemente se está expresando en las células C9; es necesario realizar un análisis tipo RT-PCR para determinar si el gen para el receptor AT₂ se está expresando en las células C9. El papel que pudiera estar jugando el receptor AT₂, si es que se expresa, en la desensibilización heteróloga del receptor LPA₁ no es muy clara, ya que solo en los receptores LPA₁-S₃₄₁A se observa éste efecto; de tal

forma que la mutación en este sitio (S-341) quizá promueve la expresión del AT₂. Una posible explicación de la participación del receptor AT₂ en la regulación podría ser la formación de heterodímeros funcionales entre el receptor LPA₁-S₃₄₁A y el AT₂. Se ha reportado que los receptores para Ang II pueden formar estos conglomerados entre ellos, o con otros receptores como el de bradicinina (miembro de la familia de los GPCRs), y además, que el receptor AT₂, regula negativamente las funciones del AT₁ y el receptor para bradicinina [100, 101]. Tal vez, la mutación de la serina 341 en el receptor LPA₁ promueve la asociación entre el receptor AT₂ y el LPA₁, sin embargo, es necesario corroborar esta hipótesis con otros experimentos.

Como ya habían reportado Avendaño-Vázquez *et al.*, en el 2005, el LPA, el PMA y la Ang II fosforilan al receptor LPA₁. Cuando se analizó la fosforilación comparada de los diferentes receptores mutantes se observó sorprendentemente que el receptor LPA₁-S₃₄₁A se encuentra sobrefosforilado en su estado basal en comparación con el LPA₁-WT (figura 12B) y cuando se tratan las células con el LPA, la fosforilación se incrementa aun más que en las células LPA₁-WT. Éste efecto no correlaciona con la regulación clásica de fosforilación-desensibilización observada para otros receptores de 7 dominios transmembranales. Se esperaba que los receptores LPA₁-S₃₄₁A presentaran una fosforilación menor a los LPA₁-WT ya que habían demostrado insensibilidad al PMA en la movilización del calcio intracelular y por lo tanto, si éste sitio (S-341) está participando en la regulación por la activación y fosforilación del receptor LPA₁ por la PKC, la fosforilación debería ser más baja (tomando en cuenta la regulación clásica de fosforilación-desensibilización). Para el receptor LPA₁-T₃₂₁V la fosforilación es similar a la observada para el receptor LPA₁-WT, en éste caso, correlaciona con los registros de la caracterización funcional ya que éste receptor es sensible al PMA. En el caso del receptor LPA₁-S_{240, 244}A se observa un fosforilación menor comparada con el LPA₁-WT, tanto el basal como los tratamientos con LPA y PMA. No obstante, como ya se había comentado, no se conoce el grado de expresión de cada receptor ni el grado de fosforilación de cada receptor con exactitud; ya que se tendrían que realizar experimentos donde se pudieran determinar los fosfatos añadidos vs. moles de receptor. Además, las interacciones entre los receptores mutantes y los endógenos (en la formación de homo- y/o

heteromultímeros) puede sesgar también éste análisis. En el caso de la fosforilación por la Ang II, esta se incrementa respecto al basal, tanto en los receptores LPA₁-WT como los LPA₁-S₃₄₁A, con lo que se reafirma que ésta hormona fosforila al receptor LPA₁. Al parecer el hecho de que el receptor LPA₁-S₃₄₁A se encuentre en ese estado de sobrefosforilación, no impide su funcionalidad, ya que al ser estimulados con LPA, movilizan el calcio, este caso particular sugiere que la fosforilación no siempre implica la desensibilización del receptor, al menos para el caso del receptor LPA₁.

En los experimentos con microscopía confocal de fluorescencia para observar si la Ang II inducía la internalización de los receptores LPA₁-WT, de manera similar al efecto de PMA [94], los resultados obtenidos demostraron que la Ang II desensibiliza al receptor LPA₁ por una vía que no involucra la internalización, ya que la incubación de 5 minutos con Ang II de las células que sobreexpresan el receptor LPA₁-WT no demostró inducir la internalización de los receptores LPA₁.

Los resultados de los experimentos de microscopía confocal de fluorescencia llevaron al empleo de un inhibidor de amplio espectro para PKC (estaurosporina) para determinar si la regulación en la movilización del calcio intracelular del receptor LPA₁ por el receptor AT₁ está mediada por la PKC. Mientras que el efecto del PMA es revertido por la estaurosporina, no se observa éste para el tratamiento con la Ang II. Estos datos, junto con los de microscopía confocal y fosforilación, indican que si bien, la Ang II fosforila al receptor LPA₁ vía la PKC, esta fosforilación no participa en la regulación funcional y tampoco involucra la internalización de receptor LPA₁; un indicio más de que la fosforilación no implica la desensibilización y/o la internalización. Es posible que la fosforilación del LPA₁ por la Ang II a través de su receptor AT₁ provoque que las proteínas G no puedan asociarse al receptor LPA₁ y de esa manera regular su actividad o que no juegue un papel relevante en la desensibilización. Sin embargo, hace falta emplear estrategias que permitan discernir entre estas hipótesis; como la inmunoprecipitación del receptor LPA₁ cuando las células son estimuladas con la Ang II y tratar de detectar en un ensayo tipo “western blot” a las proteínas G asociadas u otras cinasas involucradas en la regulación del receptor LPA₁.

Finalmente, cuando se analiza la movilización de calcio en respuesta a la Ang II en las diferentes líneas celulares se observa que existe una correlación de ésta con la dada por el estímulo de LPA. En las células que sobreexpresan el receptor LPA₁-WT, donde la respuesta al LPA es mayor en la movilización del calcio intracelular, también se observa la máxima respuesta en la movilización inducida por la Ang II. En el caso de los receptores LPA₁-S_{341A}, no promueven un incremento en la respuesta comparada con las células WT; empero, los receptores LPA₁-S_{240, 244A} presentan una respuesta menor a las WT, en las células que sobreexpresan el receptor LPA₁-T_{321V} no hay respuesta a la Ang II. Estos resultados sugieren que el receptor LPA₁ regula al receptor AT₁, ésta regulación quizá sea a nivel de la expresión génica al receptor AT₁; ya que éstos últimos se encuentran endógenamente en las células y el hecho de que aumente la movilización de calcio promovida por la Ang II es resultado muy probablemente de una regulación a éste nivel.

Se ha reportado que el LPA induce la activación de Factores de Respuesta a Suero (SRF) y que éstos tienen su blanco de acción en zonas del promotor de genes que poseen secuencias que reconocen estos factores conocidas como Elementos de Respuesta a Suero (SER) [65]. Aunque no se sabe si el promotor del gen para el receptor AT₁ posee estos elementos SER, quizá éste sea el posible mecanismo de regulación por parte del receptor LPA₁. Esta hipótesis de la regulación de la expresión podría explicar parte de lo mencionado anteriormente, sobre la posible resistencia del receptor LPA₁-T_{321V} a la regulación por la Ang II. Debido a la distribución del receptor LPA₁-T_{321V} y al hecho de que el receptor LPA₁ regula probablemente la expresión del receptor AT₁, el sitio T-321 quizá tenga un papel relevante en la expresión del receptor para la Ang II, razón por la cual, no se observa la movilización del calcio intracelular cuando las células son estimuladas con la Ang II.

9. Conclusiones

Por las observaciones obtenidas durante la caracterización de los tres receptores mutantes del LPA₁, se tiene evidencia del probable papel que los sitios mutados juegan en algunas fases de la fisiología del receptor, principalmente referente a su regulación. Tales hechos o evidencias se mencionan a continuación:

1. En la regulación del LPA₁ mediada por el PMA y por consiguiente por las cinasas PKC α y PKC β 1 [7], la serina 341 (S-341) que se ubica en el extremo carboxilo del receptor podría ser el sitio que está participando en esta regulación ya que el receptor con esta mutación (LPA₁-S₃₄₁A) demostró ser resistente a los efectos del PMA. El pequeño decremento en la respuesta observada es debido muy probablemente a los efectos del PMA sobre los receptores endógenos de las células C9 (LPA₁ y LPA₂). Además esta regulación implica la fosforilación e internalización del receptor LPA₁ como demostraron Avendaño-Vázquez *et al* en el 2005 [94].
2. En la regulación del LPA₁ mediada por la Ang II, los sitios que posiblemente participan en esta función son la serina 240 y la 244 (S₂₄₀ y S₂₄₄) que se ubican en la tercera asa intracelular del receptor LPA₁; ya que el receptor con estas mutaciones (LPA₁-S_{240, 244}A) demostró ser resistente al tratamiento con la Ang II. A pesar de que la Ang II fosforila al receptor LPA₁ vía la activación de PKC, esta fosforilación no es relevante para la desensibilización y la Ang II tampoco induce la internalización de receptor LPA₁.
3. La regulación del PMA y la Ang II del receptor LPA₁ se lleva a cabo de manera diferente y probablemente los sitios que participan en cada uno de estos procesos son diferentes. El PMA promueve una inhibición total de la respuesta en la movilización de calcio en respuesta al LPA, mientras la Ang II promueve solo una inhibición parcial de esta respuesta; sin embargo, la importancia que tiene la Ang

II es que su regulación se lleva a cabo de manera fisiológica a diferencia del PMA, quién activa artificialmente a la PKC.

4. La mutación en la treonina 321 altera el transporte y/o la incorporación del receptor LPA_1 a la membrana celular, quizá por un plegamiento inadecuado del receptor. Además el receptor que tiene esta mutación ($LPA_1-T_{321}V$) opera como dominante negativo en la movilización del calcio intracelular. La homo- y/o heterodimerización es un mecanismo tentativo para explicar este fenómeno.
5. El receptor LPA_1 parece ser capaz de regular la actividad del receptor para Ang II AT_1 , por lo menos en la vía de señalización de calcio. Probablemente esta regulación se lleva a cabo a nivel de expresión génica del receptor AT_1 , quizá por medio de un SRE en el promotor del gen del AT_1 . La treonina 321 del receptor LPA_1 podría ser relevante en esta regulación ya que las células que sobreexpresan el receptor $LPA_1-T_{321}A$, no movilizan calcio cuando son estimuladas con la Ang II.
6. La participación del receptor AT_2 para Ang II en la regulación funcional del receptor LPA_1 , apoyándose en el efecto de la Ang II sobre el receptor $LPA_1-S_{341}A$ que se revierte cuando se utiliza el antagonista PD12177 (selectivo para el AT_2). Estos datos sugieren que el receptor AT_2 se expresa en las células C9, aunque hace falta verificar este dato con un análisis como el RT-PCR.

El estudio de la relación funcional que existe entre los receptores LPA_1 y AT_1 tiene relevancia para la comprensión del origen, mantenimiento y progresión de diversos tipos de cáncer, ya que se sabe que estos sistemas de transducción de señales están implicados en este padecimiento. Como se demostró en este trabajo, la regulación de los receptores es recíproca y por tanto, constituyen un sistema complejo en la regulación del crecimiento celular, morfogénesis, proliferación, etc. La investigación sobre el mecanismo por el cual se regulan recíprocamente estos sistemas, seguramente proveerá la información necesaria para entender y posteriormente tratar una parte de la fisiología de

éste tipo de padecimientos. Como punto final, es importante señalar la posible formación de heterodímeros o heteromultímeros entre los receptores para LPA y los de Ang II; ya que ésta es una forma por la cual se median respuestas celulares y posiblemente expliquen algunos de los fenómenos que se observaron en el transcurso de este trabajo, así como esclarecer el papel que juega el receptor AT_2 en la regulación del LPA_1 .

9. Literatura citada

1. Lewin, B., *Genes VII*, ed. O.U. Press. 2000, USA. 990.
2. Kotarsky, K., Boketoft, A., Bristulf, J., Nilsson, N. E., Norberg, A., Hansson, S., Owman, C., Sillard, R., Leeb-Lundberg, M. L. F., & Olde B., *Lysophosphatidic Acid Binds to and Activates GPR92, a G Protein-Coupled Receptor Highly Expressed in Gastrointestinal Lymphocytes*. THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, 2006. **318**(2): p. 619–628.
3. Avendaño-Vázquez, S.E., *Fosforilación y desensibilización del receptor LPA₁ para el ácido lisofosfatídico.*, in *Tesis de Doctorado*. 2005, Facultad de Química, UNAM: México.
4. García-Saíenz, J.A., *Hormonas: mensajeros químicos y comunicación celular*. Segunda edición ed, ed. F.D.C. ECONOMICA. 1996
5. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. , *Molecular Biology of the Cell*. 4th Edition ed, ed. G.S.T.F. Group. 2002, New York: 1500 p.
6. Bockaert, J.I., & Pin, J. P., *Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success*. The EMBO Journal, 1999. **18**(7): p. 1723–1729.
7. Martínez-Ortíz, J., *Participación de PKC α y PKC β 1 en la desensibilización funcional del receptor LPA₁ en células C9.*, in *Tesis de Licenciatura*. 2007, Facultad de Ciencias, UNAM.: México. p. 75.
8. Schnitzler, G.R., Briscoe, C., Brown, J .M., & Firtel, R. A. , *Serpentine cAMP receptors may act through a G protein-independent pathway to induce postaggregative development in Dictyostelium*. Cell., 1995. **81**(5): p. 737-745.
9. Seta, K., Nanamori, M., Modrall, J. G., Neubig, R. R., & Sadoshima, J. , *AT1 receptor mutant lacking heterotrimeric G protein coupling activates the Src-Ras-ERK pathway without nuclear translocation of ERKs*. . J. Biol. Chem. , 2002. **277**(11): p. 9268-9277.
10. Maudsley, S., Martin, B., & Luttrell, L. M., *The Origins of Diversity and Specificity in G Protein-Coupled Receptor Signaling*. THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, 2005. **314**(2): p. 485–494.
11. Gsandtner, I., Charalambous, C., Stefan, E., Ogris, E., Freissmuth, M. & Zezula, J., *Heterotrimeric G Protein-independent Signaling of a G Protein-coupled Receptor. Direct binding of ARNO/Cytohesin-2 to the carboxyl terminus of the A2 adenosine receptor is necessary for sustained activation of ERK/MAP kinase pathway*. J. Biol. Chem. , 2005. **280**: p. 31898–31905.
12. Rajagopal, K., Lefkowitz, R. J., y Rockman, H. A. , *When 7 transmembrane receptors are not G protein-coupled receptors*. . J. Clin. Invest. , 2005. **115**: p. 2971-2974.
13. Landry, Y., Niederhoffer, N., Sick E., & Gies, J. P., *Heptahelical and Other G-Protein-Coupled Receptors (GPCRs) Signaling*. Current Medicinal Chemistry, 2006. **13**(1): p. 51-63.
14. Ma, Y.C., Huang, J., Ali, S., Lowry, W., & Huang, X.Y., *Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins*. Cell, 2000. **102**(5): p. 635-646.

15. Moolenaar W. H., v.M., L. A., & Giepmans, B. N.G. , *The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling*. BioEssays, 2004. **26**: p. 870–881.
16. Van Corven, E.J., Groenink, A., Jalink, K., Eichholtz, T. y Moolenaar, W.H., *Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins*. . Cell, 1989. **59**: p. 45-54.
17. Tokumura, A., Iimori, M., Nishioka, Y., Kitahara, M., Sakashita, M. y Tanaka, S. , *Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta*. . Am J Physiol., 1994. **267**: p. C204-10.
18. Gibbs, T.C., Y. Xie, and Meier, K. E., *Regulation of expression of EDG family receptors in human prostate cancer cell lines*. Ann. NY Acad. Sci. , 2000. **905**: p. 290–293.
19. Budnik, L.T., Brunswig-Spickenheier, B. & Mukhopadhyay, A.K. , *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., 2003. **17**: p. 1593-1606.
20. Jalink, K., Moolenaar, W.H. y Van Duijn, B. , *Lysophosphatidic acid is a chemoattractant for Dictyostelium discoideum amoebae*. . Proc Natl Acad Sci U S A., 1993. **90**: p. 1857-1861.
21. 188. Pietruck, F., Busch, S., Virchow, S., Brockmeyer, N. y Siffert, W. , *Signalling properties of lysophosphatidic acid in primary human skin fibroblasts: role of pertussis toxin-sensitive GTP-binding proteins*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1997. **355**: p. 1–7.
22. Van Dijk, M.C., Postma, F., Hilkmann, H., Jalink, K., van Blitterswijk, W.J. y Moolenaar, W.H. , *Exogenous phospholipase D generates lysophosphatidic acid and activates Ras, Rho and Ca²⁺ signaling pathways*. Curr. Biol. , 1998 **8** p. 386-392.
23. Zheng, Y., Kong, Y. y Goetzl, E.J., *Lysophosphatidic acid receptor-selective effects on Jurkat T cell migration through a Matrigel model basement membrane*. J. Immunol., 2001 **166**: p. 2317-2322.
24. Van Leeuwen, F.N., Olivo, C., Grivell, S., Giepmans, B.N., Collard, J.G. y Moolenaar, W.H., *Rac activation by lysophosphatidic acid LPA1 receptors through the guanine nucleotide exchange factor Tiam1*. . J. Biol. Chem. , 2003 **278**(1): p. 400-406.
25. Hinokio, K., Yamano, S., Nakagawa, K., Iraharaa, M., Kamada, M., Tokumura, A. y Aono, T. , *Lysophosphatidic acid stimulates nuclear and cytoplasmic maturation of golden hamster immature oocytes in vitro via cumulus cells*. . Life. Sci. , 2002. **70**: p. 759-767.
26. Van Nieuw Amerongen, G.P., Vermeer, M.A. & van Hinsbergh, V.W. , *Role of RhoA and Rho kinase in lysophosphatidic acid-induced endothelial barrier dysfunction*. . Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. , 2000. **20**: p. E127-33.
27. Jalink, K., van Corven, E.J., Hengeveld, T., Morii, N., Narumiya, S. y Moolenaar, W.H., *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., 1994. **126**: p. 801-810.

28. Dubin, A.E., Bahnson, T., Weiner, J.A., Fukushima, N. y Chun, J., *Lysophosphatidic acid stimulates neurotransmitter-like conductance changes that precede GABA and L-glutamate in early, presumptive cortical neuroblasts.* . J. Neurosci. , 1999. **19**: p. 1371-1381.
29. Postma, F.R., Jalink, K., Hengeveld, T., Offermanns, S. y Moolenaar, W.H. , *Gα(13) mediates activation of a depolarizing chloride current that accompanies RhoA activation in both neuronal and nonneuronal cells.* . Curr. Biol. , 2001. **11**: p. 121-124.
30. Renback, K., Inoue, M. & Ueda, H. , *Lysophosphatidic acid-induced, pertussis toxin-sensitive nociception through a substance P release from peripheral nerve endings in mice.* . Neurosci. Lett. , 1999. **270** p. 59-61.
31. Kumagai, N., Morii, N., Fujisawa, K., Yoshimasa, T., Nakao, K. y Narumiya, S. , *Lysophosphatidic acid induces tyrosine phosphorylation and activation of MAP-kinase and focal adhesion kinase in cultured Swiss 3T3 cells.* . FEBS Lett. , 1993. **329**: p. 273-276.
32. Sawada, K., Morishige, K., Tahara, M., Ikebuchi, Y., Kawagishi, R., Tasaka, K. & Murata, Y., *Lysophosphatidic acid induces focal adhesion assembly through Rho/Rho-associated kinase pathway in human ovarian cancer cells.* . Gynecol. Oncol., 2002. **87**: p. 252-259.
33. Chun, J., *Lysophospholipid receptors: implications for neural signaling.* . Crit. Rev. Neurobiol., 1999. **13**(2): p. 151-168.
34. Weiner, J.A., Hecht, J.H. & Chun, J. , *Lysophosphatidic acid receptor gene vzg-1/lpA1/edg-2 is expressed by mature oligodendrocytes during myelination in the postnatal murine brain.* . J. Comp. Neurol. , 1998. **398**: p. 587-598.
35. Sugiura, T., Nakane, S., Kishimoto, S., Waku, K., Yoshioka, Y., & Tokumura, A. , *Lysophosphatidic acid, a growth factor-like lipid, in the saliva.* J Lipid Res, 2002. **43**: p. 2049–2055.
36. Li, Y., Gonzalez, M.I., Meinkoth, J.L., Field, J., Kazanietz, M.G. & Tennekoon, G.I. , *Lysophosphatidic acid promotes survival and differentiation of rat Schwann cells.* . J. Biol. Chem. , 2003. **278** p. 9585-9591.
37. Mills, G.B.M., W.H. , *The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer.* . Nat. Rev. Cancer. , 2003. **3**: p. 582-591.
38. Zhao, Y.H., D., Saatian, B., Watkins, T., Spannhake, E. w., Pyne, N. J. y Natarajan, V. , *Regulation of Lysophosphatidic Acid-Induced Epidermal Growth Factor receptor Transactivation and Interleukin-8 Secretion in Human Bronchial Epithelial Cells by Protein Kinase Cδ, Lyn Kinase, and Matrix Metalloproteinases.* . J. Biol. Chem. , (2006). . **281**: p. 19501-19511.
39. Siess, W., *Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate.* . Biochim. Biophys. Acta. , 2002. **1582**(1-3): p. 204–215.
40. Tigyi, G., & Miledi, R., *Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in Xenopus oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells.* J Biol Chem, 1992. **267**: p. 21360–21367.
41. Baker, D.L., Umstot, E. S., Desiderio, D. M., & Tigyi, G. J., *Quantitative analysis of lysophosphatidic acid in human blood fractions.* Ann. NY. Acad. Sci., 2000. **905**: p. 267–269.

42. Tigyi, G. and R. Miledi, *Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in Xenopus oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(30): p. 21360-7.
43. Sano, T., et al., *Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21197-206.
44. Aoki, J., et al., *Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways*. J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48737-44.
45. Tokumura, A., et al., *Production of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in human follicular fluids of In vitro fertilization patients*. Biol Reprod, 1999. **61**(1): p. 195-9.
46. Tigyi, G., et al., *Lysophosphatidic acid alters cerebrovascular reactivity in piglets*. Am J Physiol, 1995. **268**(5 Pt 2): p. H2048-55.
47. Hama, K., Bando, K., Kakehi, Y., Aoki, J., & Arai, H. , *Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids: possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors*. FEBS Lett, 2002. **523**: p. 187-192.
48. Nakane, S., Tokumura, A., Waku, K., & Sugiura, T. , *Hen egg yolk and white contain high amounts of lysophosphatidic acids, growth factor-like lipids: distinct molecular species compositions*. Lipids 2001. **36**: p. 413-419.
49. Xu, Y., Gaudette, D. C., Boynton, J. D., Frankel, A., Fang, X. J., Sharma, A., Hurteau, J., Casey, G., Goodbody, A., Mellors, A., et al., *Characterization of an ovarian cancer activating factor in ascites from ovarian cancer patients*. Clin Cancer Res, 1995. **1**(10): p. 1223-1232.
50. Mauco, G., Chap, H., Simon, M. F., & Douste, B. L. , *Phosphatidic and lysophosphatidic acid production in phospholipase C- and thrombintreated platelets. Possible involvement of a platelet lipase*. Biochimie, 1978. **60**: p. 653-661.
51. Aoki, J., Taira, A., Takanezawa, Y., Kishi, Y., Hama, K., Kishimoto, T., Mizuno, K., Saku, K., Taguchi, R., & Arai, H., *Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways*. . J Biol Chem, 2002. **277**: p. 39696-39702.
52. Aoki, J., *Mechanisms of lysophosphatidic acid production*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2004. **15**: p. 477-489.
53. Stracke, M.L., Clair, T., & Liotta, L. A., *Autotaxin, tumor motilitystimulating exophosphodiesterase*. . Adv Enzyme Regul, 1997. **37**: p. 135-144.
54. Umezu-Goto, M., Kishi, Y., Taira, A., Hama, K., Dohmae, N., Takio, K., Yamori, T., Mills, G. B., Inoue, K., Aoki, J., & Arai, H., *Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production*. The Journal of Cell Biology, 2002. **158**(2): p. 227-233.
55. Tokumura, A., Majima, E., Kariya, Y., Tominaga, K., Kogure, K., Yasuda, K., & Fukuzawa, K., *Identification of Human Plasma Lysophospholipase D, a Lysophosphatidic Acid-producing Enzyme, as Autotaxin, a Multifunctional Phosphodiesterase*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(42): p. 39436-39442.

56. Roberts, R., V.A. Sciorra, and A.J. Morris, *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, 1998. **273**(34): p. 22059-67.
57. Brindley, D.N. and D.W. Waggoner, *Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases.* J Biol Chem, 1998. **273**(38): p. 24281-4.
58. Eberhardt, C., Gray, P.W. y Tjoelker, L.W. , *Human lysophosphatidic acid acyltransferase cDNA cloning, expression, and localization to chromosome 9q34.3.* . J. Biol. Chem. , 1997. **272**: p. 20299-20305.
59. Thompson, F.J.C., M.A., *Purification of a lysophosphatidic acid-hydrolysing lysophospholipase from rat brain.* . Biochem. J. , 1994 **300**(Pt 2): p. 457-461.
60. Tigyi, G.a.A.L.P., *Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action.* . Prog. Lipid. Res., 2003. **42**(6): p. 498-526.
61. Moolenaar, W.H., Kranenburg, O., Postma, F. R., & Zondag, G. C., *Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses.* Curr. Opin. Cell. Biol., 1997. **9**: p. 168–173.
62. CONTOS, J.J.A., ISHII, I., & CHUN J., *Lysophosphatidic Acid Receptors.* Mol Pharmacol, 2000. **58**(6): p. 1188–1196.
63. Buhl, A.M., Johnson, N. L., Dhanasekaran, N., & Johnson, G. L. and *G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly.* J. Biol. Chem., 1995. **270**: p. 24631–24634.
64. Chai, J., & Tarnawski, A. S., *Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing.* Journal of Phisiology and Pharmacology, 2002. **53**(2): p. 147-157.
65. Perkins, L.M., Ramirez, F.E., Kumar, C.C., Thomson, F.J. and Clark, M.A. , *Activation of serum response element-regulated genes by lysophosphatidic acid.* . Nucleic. Acids. Res., 1994 **22**: p. 450-452.
66. Cui, M.-Z., Laag, E., Sun, L., Tan, M., Zhao, G., & Xu, X., *Lysophosphatidic Acid Induces Early Growth Response Gene 1 Expression in Vascular Smooth Muscle Cells: CRE and SRE Mediate the Transcription.* Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2006. **26**: p. 1029-1035.
67. Noguchi, K., Ishii, S., & Shimizu, T., *Identification of p2y9/GPR23 as a Novel G Protein-coupled Receptor for Lysophosphatidic Acid, Structurally Distant from the Edg Family.* J. Biol. Chem., 2003. **278**(28): p. 25600–25606.
68. Lee, C.-W., Rivera, R., Gardell, S., Dubin, A. E., & Chun J., *GPR92 as a New G12/13- and Gq-coupled Lysophosphatidic Acid Receptor That Increases cAMP, LPA5.* J. Biol. Chem., 2005. **281**(33): p. 23589–23597.
69. Hecht, J.H., Weiner, J. A., Post, S. R., & Chun J., *Ventricular Zone Gene-1 (vzg-1) Encodes a Lysophosphatidic Acid Receptor Expressed in Neurogenic Regions of the Developing Cerebral Cortex.* Journal of Cell Biology, 1996. **135**(4): p. 1071-1083.
70. Anliker, B., & Chun, J., *Cell surface receptors in lysophospholipid signaling.* Seminars in Cell & Developmental Biology, 2004. **15**: p. 457–465.
71. Anliker, B., & Chun, J., *Lysophospholipid G Protein-coupled Receptors.* J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 20555–20558.

72. Hecht, J.H., Weiner, J.A., Post, S. R., & Chun, J., *Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex.* . J Cell Biol, 1996. **135**: p. 1071–1083.
73. An, S., Bleu, T., Huang, W., Hallmark, O. G., Coughli, S. R., & Goetzl, E. J., *Identification of cDNAs encoding two G protein-coupled receptors for lysophingolipids.* FEBS Lett, 1997. **417**: p. 279–282.
74. An, S., Dickens, M. A., Bleu, T., Hallmark, O. G., & Goetzl, E. J., *Molecular cloning of the human Edg2 protein and its identification as a functional cellular receptor for lysophosphatidic acid.* Biochem Biophys Res Commun 1997. **231**: p. 619–622.
75. Fukushima, N., Kimura, Y., & Chun, J., *A single receptor encoded by vzg-1/lpA1/edg-2 couples to G proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid.* Proc Natl Acad Sci USA, 1998. **95**: p. 6151–6156.
76. Ishii, I., Contos, J. J., Fukushima, N., & Chun, J. , *Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors, LPA1/VZG-1/EDG-2, LPA2/EDG-4 and LPA3/EDG-7 in neuronal cell lines using a retrovirus expression system.* . Mol. Pharmacol., 2000. **58**: p. 895–902.
77. An, S., Bleu, T., Hallmark, O. G., & Goetzl, E. J., *Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid.* J. Biol. Chem., 1998. **273**: p. 7906–7910.
78. An, S., Bleu, T., Zheng, Y., & Goetzl, E. J., *Recombinant human G protein-coupled lysophosphatidic acid receptors mediate intracellular calcium mobilization.* Mol. Pharmacol. , 1998. **54**: p. 881–888.
79. Im, D.S., Heise, C. E., Harding, M. A., George, S. R., O’Dowd, B. F., Theodorescu, D. & Lynch, K. R., *Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate.* Mol. Pharmacol., 2000. **57**: p. 753–759.
80. Bando, K., Aoki, J., Hosono, H., Kobayashi, S., Kobayashi, T., Murakami-Murofushi, K., Tsujimoto, M., Arai, H., & Inoue, K., *Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid.* J. Biol. Chem., 1999. **274**: p. 27776–27785.
81. Macías-Silva, M., *Angiotencina II: Receptores y mecanismo de acción.* Ciencia, 1993. **44**: p. 351-362.
82. García-Caballero, A., *Regulación del receptor AT₁ para la angiotensina II,* in *Tesis de Doctorado.* 2001, Facultad de Química, UNAM: Mexico D.F. p. 60 p.
83. Heffelfinger, S.C., *The renin angiotensin system in the regulation of angiogenesis.* Curr Pharm Des., 2007. **13**(12): p. 1215-1229.
84. Ferrario, C.M., Brosnihan, K. B., Diz, D. I., Jaiswal, N., Khosla. M. C., Milsted, A., & Tallant, E. A. , *Angiotensin (1-7): a new hormone of the angiotensin system.* Hypertension, 1991. **18**(5): p. III126-III133.
85. Hall, K.L., Hanesworth, J. M., Ball, A. E., Felgenhaner, G. O., Hossick, H. L., & Harding J. W., *Identification and characterization of a novel angiotensin binding site in a cultured vascular smooth muscle cells that is specific for the hexapeptide (3-8) fragment of angiotensin II, angiotensin IV.* Regul. Pept., 1993. **44**: p. 225-232.

86. Roberts, K.A., Krebs, L. T., Kramár, E. A., Shaffer, M. J., Harding, J. W., & Wright, J. W., *Autoradiographic identification of brain angiotensin IV binding site and differential c-fos expression following intracerebroventricular injection of angiotensin II and IV in rats*. *Brain Res*, 1995. **682**(13-21): p. 13.
87. Schiavone, M.T., Khosla, M. C., & Ferrario, C. M. , *Angiotensin-(1-7): Evidence for novel actions in the brain*. . *J. Cardiovasc. Pharmacol.* , 1990. **16** (Suppl 4): p. 19-24.
88. Wright, J.W., & Harding, J. W. , *Important roles for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system*. . *Brain. Res. Rev.* , 1997 **25**: p. 96-124.
89. Mehta, P.K., & Griendling, K. K., *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system*. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* , 2007. **292**: p. C82-C97.
90. De Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W., & Unger, T. H., *International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors*. *Pharmacol. Rev.*, 2000. **52**(3): p. 415-472.
91. Steckelings, U.M., Kaschina, E., & Unger, T., *The AT₂ receptor—A matter of love and hate*. *Peptides*, 2005. **26** p. 1401-1409.
92. Abdalla, S., Lothar, H., Abdel-tawab, A. M., Qwitterer, U., , *The angiotensin II AT₂ receptor is an AT₁ receptor antagonist*. . *J. Biol. Chem.*, 2001. **276**: p. 39721-39726.
93. Sengupta, S., Wang, Z., Tipps, R., & Xu, Y., *Biology of LPA in Health and disease*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2004. **15**: p. 503-512.
94. Avendaño-Vázquez, S.E., García-Caballero, A., & García-Sáinz, J. A., *Phosphorylation and desensitization of the lysophosphatidic acid receptor LPA₁*. *Biochem. J.*, 2005. **385**: p. 677-684.
95. Minneman, K.P., *Heterodimerization and surface localization of G protein coupled receptors*. *Biochem Pharmacol.*, 2007 **73**(8): p. 1043-1050.
96. Maggio, R., Novi, F., Scarselli, M., & Corsini, G. U., *The impact of G-protein-coupled receptor hetero-oligomerization on function and pharmacology*. *FEBS. J.*, 2005 **272**(12): p. 2939-2946.
97. Kroeger, K.M., Pflieger, K. D., & Eidne, K. A., *G-protein coupled receptor oligomerization in neuroendocrine pathways*. *Front. Neuroendocrinol.*, 2003 **24**(4): p. 254-278.
98. Breitwieser, G.E., *G protein-coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling*. *Circ. Res.*, 2004 **94**(1): p. 17-27.
99. Zaslavsky, A., Singh, L. S., Tan, H., Ding, H., Liang, Z., & Xu, Y., *Homo- and hetero-dimerization of LPA/SIP receptors, OGR1 and GPR4*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2006 **1761**(10): p. 1200-12.
100. Abdalla, S., Lothar, H., El Massiery, A., & Qwitterer, U., *Increased AT₁ receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness*. *NATURE MEDICINE*, 2001. **7**(9): p. 1003 - 1009.
101. Abadir, P.M., Periasamy, A., Carey, R. M., & Siragy, H. M., *Angiotensin II Type 2 Receptor-Bradykinin B₂ Receptor Functional Heterodimerization*. *Hypertension*, 2006. **48**: p. 316-322.