



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

UNAM
POSGRADO
Ciencias Bioquímicas

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE
LOS RECEPTORES PARA ÁCIDO
LISOFOSFATÍDICO: LPA₂ Y LPA₃**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:
AURELIO HERNÁNDEZ MÉNDEZ

TUTOR: DR. JESÚS ADOLFO GARCÍA SÁINZ



MÉXICO, D. F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, en el departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (proyecto IN200206), el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto 79908), beca CONACYT número 208187 y de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la UNAM (programa de fomento a la graduación de los alumnos de posgrado).

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de este proyecto estuvo integrado por:

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Marina Gavilanes Ruiz	Facultad de Química, UNAM
Dr. Jorge Vázquez Ramos	Facultad de Química, UNAM

El jurado de examen de Maestría estuvo formado por:

Presidente	Dra. Rosario Muñoz Clares	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Carlos Rosales Ledesma	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Dra. Marina Gavilanes Ruiz.	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Dr. Marco A. Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Jesús Adolfo García Sáinz por guiarme durante el desarrollo de mi proyecto de maestría y permitirme aprender en su laboratorio la forma en que se hace la ciencia.

A mi comité tutorial, por el apoyo y sugerencias hechas durante el desarrollo del proyecto.

A los Doctores Rosario Muñoz Clares, Carlos Rosales Ledezma, Marina Gavilanes Ruiz, Alejandro Zentella Dehesa y Marco A. Cerbón Cervantes, por la lectura y correcciones hechas a esta tesis.

A la Dra. M. Teresa Romero por la dedicación que tuvo durante mi entrenamiento en el laboratorio y por la ayuda brindada para la realización de este proyecto.

A la Dra. Erendira Avendaño por su ayuda y enseñanzas acerca de los receptores de LPA.

A la Dra. Rocío Alcántara por su ayuda y amistad

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Christian Colin, Jean Castillo, Erica Calvo, Ekaterina Rodríguez, Tzindilu Molina, Omar y Aleida, por su amistad y por la ayuda que recibí de ellos.

A Alejandro Cabrera y Marco Morquecho por la ayuda y amistad brindada a lo largo de todo este tiempo en el laboratorio y por la lectura y comentarios sobre esta tesis.

A Guadalupe Jiménez por su apoyo como laboratorista.

A la Dra. Claudia Ribera y al Dr. Héctor Malagón del bioterio del Instituto de Fisiología Celular, por su ayuda en la manipulación de los animales para la obtención de anticuerpos.

A la unidad de microscopia del instituto de fisiología celular.

Abreviaturas

ATP	adenosina trifosfato
ATX	autotaxina
$[Ca^{2+}]_i$	concentración intracelular de calcio
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
DAG	diacilglicerol
Edg	gen de diferenciación endotelial
GTP	guanosina trifosfato
GDP	guanosina difosfato
GPCRs	receptores acoplados a proteínas G
GRKs	quinasas de los GPCRs
LPA	ácido lisofosfatídico
LPA ₂	receptor para ácido lisofosfatídico 2
LPA ₃	receptor para ácido lisofosfatídico 3
PLPs	fosfolípidos
PLA ₁	fosfolipasa A1
PKC	proteína cinasa C
PA	ácido fosfatídico
PI3K	3 fosfatidilinositol cinasa
PLC	fosfolipasa C
lyso PLD	lisofosfolipasa D
SDS	dodecil sulfato de sodio
TPA	éster de forbol activador de la PKC (12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato)
Vzg-1	gen 1 de la zona ventricular.

INDICE

I. Resumen.....	7
II. Introducción.....	8
II. 1 Comunicación celular.....	8
II. 2. Ácido lisofosfatídico.....	11
II. 3. Receptores acoplados a proteínas G.....	13
II. 4. Receptores para LPA.....	15
II. 5. Desensibilización.....	20
II. 6. Desensibilización de los receptores de LPA.....	22
III. Hipótesis.....	27
IV. Objetivos.....	28
V. Materiales y Métodos.....	29
V. 1. Reactivos.....	29
V. 2. Línea celular.....	29
V. 3. Vectores de clonación.....	29
V. 4. Generación de células transfectadas con los receptores LPA ₂ y LPA ₃ fusionados con Myc.....	30
V. 5. Medición de Ca ²⁺ intracelular.....	31
V. 6. Generación de anticuerpos.....	32
V. 7. Ensayo de fosforilación de receptores.....	32
V. 8. Replica en Western.....	33
V. 9. Microscopía confocal.....	34
V. 10. Análisis estadístico.....	34

VI. Resultados.....	35
VI. 1. Fosforilación del receptor LPA ₁	35
VI. 2. Respuesta de células C9 transfectadas con los receptores LPA ₂ -GFP y LPA ₃ -GFP.	36
VI. 3. Respuesta de células C9 transfectadas con los receptores LPA ₂ -Myc y LPA ₃ -Myc.....	38
VI. 4. Desensibilización homóloga de los receptores LPA ₂ y LPA ₃	40
VI. 5. Desensibilización heteróloga de los receptores LPA ₂ y LPA ₃	41
VI. 6. Fosforilación de los receptores LPA ₂ -Myc y LPA ₃ -Myc.....	44
VII. Discusión y Conclusiones.....	48
VIII. Perspectivas.....	53
IX. Bibliografía.....	54

I. INTRODUCCIÓN

II. 1 Comunicación celular

La comunicación celular es un fenómeno que se considera universal, pues desde las bacterias, pasando por los eucariontes unicelulares, las plantas, los hongos y los animales superiores, todos somos capaces de percibir el medio que nos rodea y responder a estímulos o cambios que sucedan en éste y así ajustarnos a las necesidades del momento.

La célula, que es la unidad fundamental de los seres vivos, también puede considerarse como la unidad fundamental para la percepción y respuesta a cambios del entorno, y es que es en ella en donde se encuentran las antenas que detectan los cambios del medio, los cuales pueden ser físicos (por ejemplo luz o temperatura) o químicos (como nutrientes y hormonas); estas antenas o receptores, son proteínas que detectan la señal y la transmiten al interior de la célula, en un proceso conocido como transducción de señales. El receptor promueve la activación de enzimas que generan mensajeros intracelulares (también llamados segundos mensajeros), los cuales a su vez activarán a enzimas que serán las encargadas de dar una respuesta celular a la señal externa. Así pues, en los organismos pluricelulares, la respuesta de cada una de las células que conforman un tejido o un órgano se integran para dar una respuesta global que repercutirá en todo el organismo.

Pero los organismos pluricelulares no sólo detectan los cambios en el medio externo, sino que también las diferentes células que los conforman detectan los cambios del microambiente que las rodea, y responden a ellos tratando de mantener constantes las condiciones internas para el buen funcionamiento del organismo (homeostasis). Para mantener la homeostasis, las células se encuentran en una comunicación constante a través de mensajeros químicos, los cuales varían en su naturaleza química, pues pueden ser lípidos, compuestos derivados del colesterol, derivados de aminoácidos, péptidos e incluso proteínas (Lodish *et al.*, 2003).

Considerando el tamaño pequeño de una célula, en los organismos pluricelulares se conocen diferentes tipos de señalización, dependiendo del lugar desde donde se genera la señal y el lugar donde se encuentre la célula que detecta la señal (célula blanco). En las señales conocidas como endocrinas las glándulas producen hormonas, las cuales son secretadas al torrente sanguíneo por donde se transportan hasta llegar a los sitios en donde se encuentran las células blanco, que puede estar a una distancia lejana.

En la señalización paracrina que es la segunda forma de comunicación, una célula secreta la molécula señal y sólo afecta a las células adyacentes. Una tercera forma de señalización es la autocrina, que es una forma curiosa de comunicación pues la célula se comunica consigo misma; la señal liberada afecta a la célula que la libera (Lodish *et al.*, 2003).

Existe otra forma de señalización la cual se da por contacto (yuxtacrina), aquí las proteínas que se encuentran en la superficie membranal externa de una célula, tienen contacto con receptores presentes en la membrana de otra célula adyacente; este contacto también puede desencadenar eventos de señalización intracelular (Jiménez L. F., y Merchant H., 2003).

Los receptores se han clasificado en cinco grupos principales, dependiendo de su estructura y la forma en que transducen la señal al interior de la célula.

El primero de estos grupos es el de los receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina (RTKs). Generalmente estos receptores actúan en forma de dímeros inducidos por la acción de su ligando y son capaces de autofosforilarse para poder activarse y a su vez, activar por fosforilación a proteínas que se encargaran de amplificar la señal hacia el interior de la célula. Ejemplos de estos receptores son el del factor de crecimiento epidérmico (EGF), el del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF).

El segundo grupo es el de los receptores sin actividad enzimática pero que se asocian con proteínas citosólicas para transducir la señal. Estos receptores poseen en su región citoplasmática sitios de anclaje para otras proteínas que son las encargadas de transmitir la

señal al interior de la célula, un ejemplo de estos receptores son los receptores para interleucinas y la eritropoyetina.

Los receptores canal forman el tercer grupo; éstos cambian su conformación cuando son ocupados por su ligando, formando una especie de poro o canal por donde iones específicos fluyen, alterando de esta forma el potencial eléctrico existente a través de la membrana plasmática; los canales activados por acetilcolina son un ejemplo de este tipo de receptores canal.

Los receptores nucleares forman el cuarto grupo de receptores; esta última clase de receptores se encuentra en el citoplasma y son activados por moléculas de señalización de carácter lipofílico que son capaces de cruzar la membrana plasmática. Estos receptores pueden translocarse al núcleo celular y regular la transcripción de sus genes blanco, el receptor de estrógenos es un ejemplo de receptor nuclear (Lodish *et al.*, 2003).

Por último los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) son el quinto grupo en que se clasifica a los receptores de membrana; estos receptores se asocian a proteínas heterotriméricas que intercambian nucleótidos de guanina, por lo que reciben el nombre de proteínas G y son necesarias para transmitir la señal captada por los GPCRs (Kobilka, 2007).

Actualmente se está dedicando un gran esfuerzo en conocer los distintos mecanismos de señalización celular, especialmente porque las alteraciones en algunos de los componentes de los sistemas de señalización llevan a la aparición de patologías muy graves como el cáncer (Sun *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009).

El ácido lisofosfatídico o LPA, cuyo sistema de señalización y forma de regulación se estudian en este trabajo, es un lípido bioactivo muy potente e importante en lo que a señalización celular se refiere, pues media una gran cantidad de efectos celulares y procesos fisiológicos que mantienen la homeostasis en los animales superiores. También se ha encontrado relacionado con la aparición de algunos tipos de cáncer como el de ovario y el

de colon. El descubrimiento del primer receptor para LPA a mediados de los 90, abrió un gran panorama para el estudio de la función, mecanismos de señalización y regulación de la señalización del LPA. En la actualidad el descubrimiento de nuevos receptores para LPA hace necesario un estudio minucioso de la forma de regulación de cada uno de estos receptores, pues varios de ellos pueden expresarse en una misma célula y ampliar así el espectro de señalización y respuesta celular (Contos *et al.*, 2000; Fukushima y Chun, 2001; Mills y Moolenaar, 2003).

II. 2. Ácido lisofosfatídico

La molécula de ácido lisofosfatídico es relativamente soluble en agua y está compuesta de un glicerol, un ácido graso y un grupo fosfato (1-acil-2-sn-glicerol-3-fosfato). Se sabe que este lípido se encuentra en niveles altos en el suero (1-5 μM) y que puede viajar de forma activa unido a albúmina. Además también se conoce que está presente en otros fluidos como la saliva, líquido de ascitis, plasma seminal y el fluido folicular. Se ha demostrado que estos fluidos pueden activar de forma diferencial a células transfectadas con distintos receptores para LPA (Moolenaar, 1994; Hama *et al.*, 2002; Aoki, 2004).

Para la generación de LPA se han postulado dos vías: en la primera (Fig. 1A), los lisofosfolípidos (LPLs) lisofosfatidilcolina (LPC), lisofosfatidiletanolamina (LPE) y lisofosfatidilserina (LPS) se producen por la acción de las enzimas fosfolipasa A1 (PLA₁) ó fosfolipasa A2 (PLA₂) sobre fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina respectivamente, y la posterior conversión a LPA por acción de una enzima que se encuentra en el medio extracelular, en el plasma, conocida como autotaxina (ATX), que hidroliza el grupo alcohol en cada uno de estos LPLs, en forma similar a lo que hace la lisofosfolipasa D (lyso PLD). Este mecanismo fue descrito para la producción de LPA por plaquetas activadas por trombina; pero las plaquetas no son el único tipo celular capaz de generar LPA, pues células como los eritrocitos, fibroblastos y células cancerosas también son capaces de producirlo (Aoki, 2004).

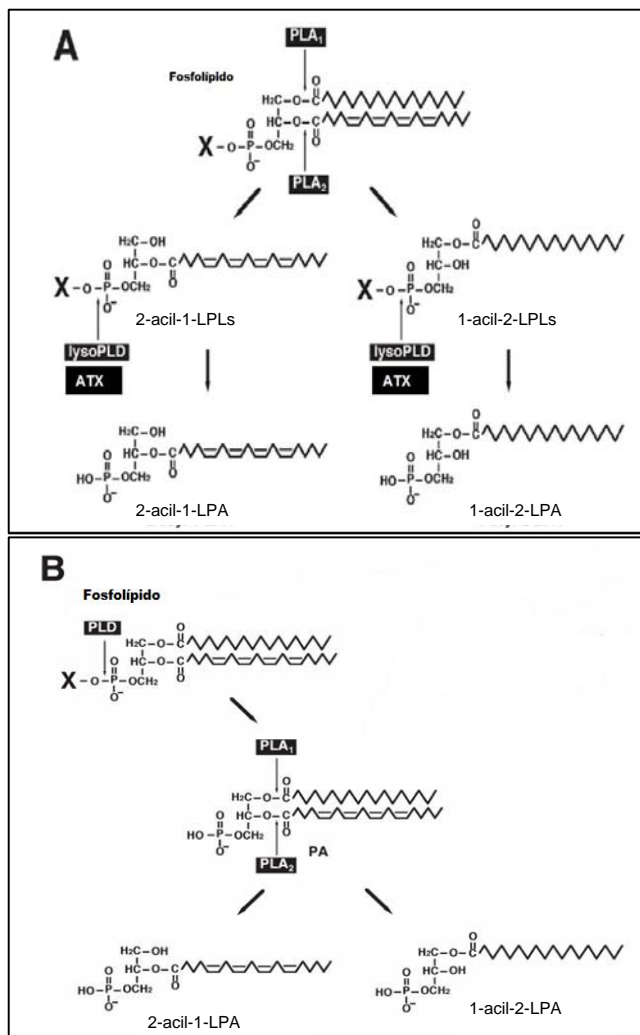


Figura.1. Vías de producción de LPA. A) el LPA se genera en el medio extracelular a partir de fosfolípidos por la acción de las fosfolipasas A₁ o A₂ (PLA) para formar un lisofosfolípido (LPL), posteriormente la autotaxina (ATX) que actúa como una lisofosfolipasa D (LysoPLD) separa el grupo alcohol (X), para formar finalmente LPA. B), la generación intracelular de LPA se da gracias a la fosfolipasa D (PLD), que separa en grupo alcohol (X) de los fosfolípidos, para formar ácido fosfatídico (PA), el cual puede ser convertido por alguna de las fosfolipasas 1 o 2, en LPA (tomado de Aoki *et al.*, 2008).

La segunda vía involucra a la lyso PLD citosólica, que genera ácido fosfatídico (PA) a partir de LPLs y a la intervención de la cinasa de diacilglicerol que genera PA a partir de diacilglicerol, con la posterior hidrólisis de una de las cadenas de ácido graso en el PA por parte de PLA₁ ó PLA₂ para dar como producto final LPA (Fig. 1B; Aoki *et al.*, 2008).

Existen diferentes especies de LPA; ésto se debe al grupo acilo que los compone. Se han encontrado especies de ácidos grasos saturados (16:0, 18:0), así como especies insaturadas (16:1, 18:1, 18:2, 20:4) en la estructura del LPA, además el grupo acilo puede estar en la

posición 1 o 2 de la molécula de glicerol, lo cual dependerá de qué PLA actúe sobre el PA (Tigyi y Parrill, 2003; Aokin, 2004).

El LPA ejerce y promueve distintos efectos, como inducir la proliferación y sobrevivencia celular, migración celular y la implantación y distribución de embriones de roedores. Todos estos efectos del LPA se llevan a cabo tras la unión del lípido y activación de un grupo de receptores para LPA que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Weiner y Chun, 1999; Ribera y Chun, 2006).

El papel bioactivo del LPA y de otros lisofosfolípidos como la esfingosina 1 fosfato (S1P) puede ser regulado por un grupo de proteínas integrales de membrana conocidas como fosfatasas de los lípidos fosfato (LPPs). Este grupo de fosfatasas está conformado por 3 miembros en mamíferos (LPP1-3), presentan el sitio activo en la región extracelular o hacia el lumen de las membranas intracelulares (retículo endoplasmático), por lo que pueden afectar al LPA extracelular e intracelular, removiendo el grupo fosfato del LPA para degradarlo a monoacilglicerol (Tigyi y Parrill, 2003; Pyne *et al.*, 2004). La remoción del grupo acilo del glicerolfosfato por lisofosfolipasas es otra de las formas de degradación del LPA y que regula la cantidad de LPA disponible; adicional a esto, las aciltransferasas pueden volver a generar PA a partir de LPA integrándole una cadena más de ácido graso (Tigyi y Parrill, 2003).

II. 3. Receptores acoplados a proteínas G

Los GPCRs son un grupo muy importante de proteínas receptoras presentes en los organismos eucariontes. La principal característica de estos receptores es presentar en su estructura 7 hélices α hidrofóbicas que se insertan en la membrana y que están unidas por tres asas intracelulares y tres extracelulares alternadas (Alexander *et al.*, 2007).

Estos receptores se encuentran acoplados a proteínas heterotriméricas intercambiadoras de nucleótidos de guanina, conocidas como proteínas G. Las proteínas G heterotriméricas se componen de tres subunidades: una subunidad α , una β y una γ .

La unión de una molécula señal o ligando a su GPCR específico, induce en éste un cambio conformacional que lleva a la activación de la proteína G, que en su estado inactivo tiene unido a una molécula de guanosina difosfato (GDP). La activación del receptor hace que la proteína G intercambie GDP por guanosina trifosfato (GTP), lo que hace que la proteína G se disocie en las subunidades $G\alpha$ unida a GTP y $G\beta\gamma$, las cuales pueden activar a distintas moléculas efectoras en la célula (Hamm, 1998).

Las proteínas G heterotriméricas se han clasificado de acuerdo a su subunidad α en cuatro familias: G_s , que activa a la adenilato ciclasa; $G_{i/o}$, que inhiben a la adenilato ciclasa; $G_{q/11}$, que activan a la isoforma β de la fosfolipasa C y $G_{12/13}$ que es capaz de activar a la proteína G monomérica Rho. Además, el dímero $G\beta\gamma$ también puede activar a algunas moléculas efectoras (Milligan y Kostenis, 2006).

La unión de una molécula señal a su receptor activará una cascada de señalización que conduce a una respuesta específica en la célula blanco; esta respuesta, así como la vía de señalización que siga la activación de un receptor determinado dependerá del tipo celular que se trate, dado el repertorio de proteínas que exprese la célula.

Una de las vías de señalización mejor caracterizada, y que parece estar conservada en muchos GPCRs, es la llamada vía de fosfoinosítidos calcio, en la cual interviene la proteína G_q . Cuando un mensajero extracelular se une a su GPCR específico, la interacción ligando receptor produce un cambio conformacional en el receptor que activa a una proteína G_q ; la proteína G_q intercambia GDP por GTP, disociándose así las subunidades $G\beta\gamma_q$ y $G\alpha_q$. La subunidad $G\alpha_q$ activa a su proteína efectora conocida como fosfolipasa C (PLC) que es una enzima que rompe al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2), produciéndose inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG).

El IP₃ por un lado difunde en el citosol y se une a canales en el retículo endoplasmático que se abren y liberan calcio hacia el citosol. El diacilglicerol por su parte es capaz junto con el calcio liberado del retículo de activar a la proteína cinasa C (PKC), la cual puede fosforilar y activar distintas moléculas que llevan a una respuesta celular.

La activación de los GPCRs también inicia otro proceso que parece ser muy conservado que se revisará más adelante; éste es el proceso de desensibilización, con lo cual la señal se apaga y posteriormente el receptor se internaliza (Marinissen y Gutkind, 2001).

II. 4. Receptores para LPA

Históricamente, los receptores para ácido lisofosfatídico fueron clasificados en una familia de GPCRs conocida como EDG que son las siglas en inglés para genes de diferenciación endotelial; en esta familia también se agruparon a los receptores de otro lisofosfolípido muy importante, la esfingosina-1-fosfato. Actualmente, el nombre que se emplea para designar a los EDGs es simplemente las siglas o nombre abreviado de sus ligandos naturales, LPA₁₋₆ para los receptores de ácido lisofosfatídico y S1P₁₋₅ para los de esfingosina -1- fosfato.

Hasta la fecha se han identificado 7 receptores para LPA, dentro de los cuales los subtipos 1, 2 y 3 tienen una identidad del 50 %, y se encuentran más relacionados filogenéticamente a los receptores para esfingosina-1-fosfato, mientras que los otros cuatro se encuentran más relacionados a una familia de receptores de adenosina conocida como P2Y. Cada uno de estos receptores se puede acoplar a diferentes proteínas G, dependiendo del tipo celular que se trate y seguir distintas vías de señalización como se puede observar en la Tabla 1 y en la Figura 2 (Chun *et al.*, 2002; Anliker y Chun, 2004; Gardel, *et al.*, 2006).

Tabla 1. Principal función de los receptores para LPA

RECEPTOR	PROTEINA G ACOPLADA	FUNCION PRINCIPAL
LPA ₁	G _{i/o} , G _{q/11} , G _{12/13}	Desarrollo cerebral
LPA ₂	G _{i/o} , G _{q/11} , G _{12/13}	Proliferación y quimiotaxis
LPA ₃	G _{i/o} , G _{q/11} , G _s	Implantación del embrión
LPA ₄	G _{q/11} , G _s	Adhesión celular
LPA ₅	G _{i/o} , G _q	Formación de fibras de estrés
GPR87		Proliferación
P2Y5/LPA ₆	G _s , G _{i/o}	Crecimiento del cabello

El primero en describirse fue el receptor LPA₁, originalmente nombrado Vzg-1. Se detectó con ayuda de oligonucleótidos degenerados contra secuencias de los segmentos transmembranales 2 y 7 (TM II y TM VII) de la familia de receptores acoplados a proteínas G, como uno de los genes que se expresaban en la zona ventricular durante el desarrollo de la corteza cerebral en embriones de ratones (Hecht *et al.*, 1996). Posteriormente fue caracterizado en humanos recibiendo el nombre de Edg2. Está compuesto por 364 aminoácidos, tiene una masa molecular estimado de 41,109 Da (An *et al.*, 1997), y se expresa en una gran cantidad de órganos humanos como el corazón, cerebro, placenta, páncreas, próstata, testículo, ovario y colon (An *et al.*, 1998). Las proteínas G acopladas a este receptor pueden ser G_{i/o}, G_{12/13} y G_q; teniendo así una gran gama de vías de señalización intracelular que se activan cuando el LPA se le une.

Este receptor parece ser el encargado de la adhesión celular en células endoteliales de cordón umbilical, además de controlar su actividad quimiotáctica, contrario a lo que sucede en células T en donde la sobreexpresión del LPA₁ inhibe la respuesta quimiotáctica inducida por la quimiocina RANTES (Chi-Iou *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2001). Su expresión en la línea celular de neuroblastoma B103 induce la contracción de la célula tras ser estimulada con 1 μ M de LPA (Ishii *et al.*, 2000); en células de Schwann la

sobreexpresión del LPA₁ media la sobrevivencia celular (Weiner y Chun, 1999). El LPA₁ ha mostrado ser un receptor muy importante para el desarrollo, pues en ratones “knockout” *lpa₁* (-/-) del gen que codifica para este receptor se presenta 50% de letalidad neonatal, esto debido a malformaciones craneofaciales, hemorragias en la parte frontal del cráneo y a que los ratones *lpa₁* (-/-) tienen problemas para alimentarse, pues se les dificulta encontrar las mamas de la madre, y los que logran sobrevivir presentan un tamaño muy reducido en comparación con los ratones silvestres (Contos *et al.*, 2000).

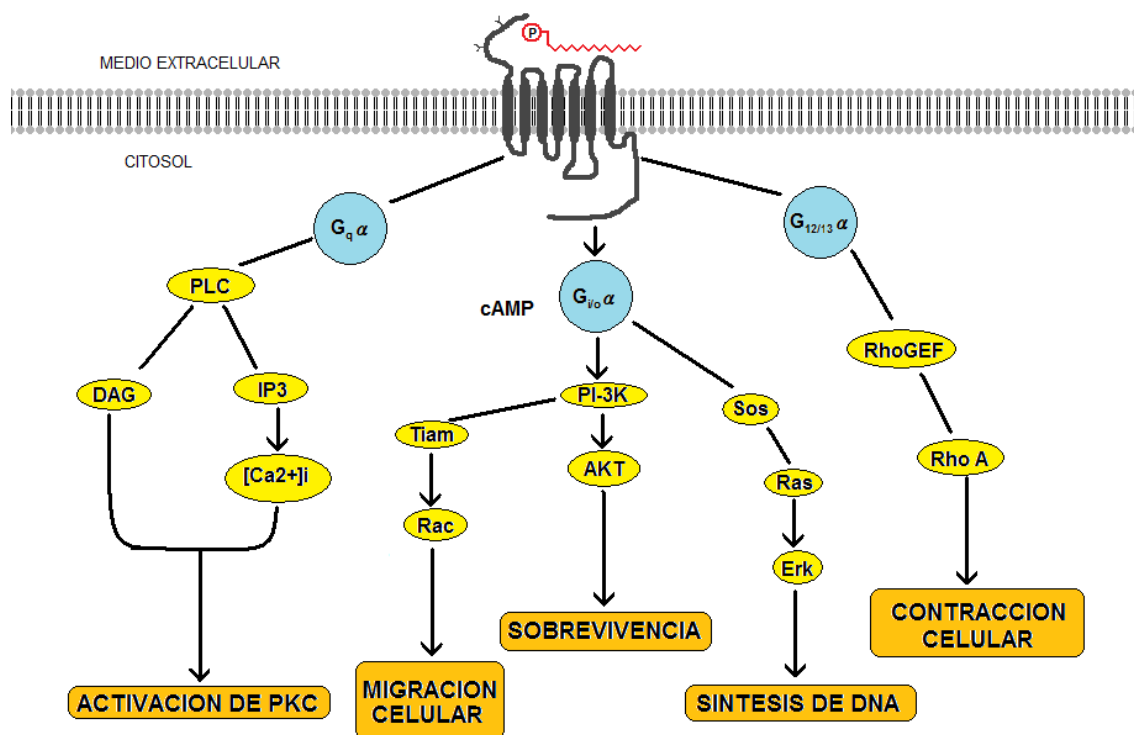


Figura. 2. principales vías de señalización del LPA. Los receptores de LPA se acoplan principalmente a las proteínas G mostradas en el esquema. G_q que activa la vía de fosfoinosítidos-calcio (ver en el texto); G_{i/o} que involucra la activación de la cinasa de fosfoinosítidos (PI3K), que lleva a la activación de la cinasa AKT en una vía que promueve la sobrevivencia celular, y la activación del factor intercambiador de nucleótidos de guanina Tiam que activa a la proteína G monomérica Rac, en una vía que induce la migración celular; además G_{i/o} también activa a la vía de las MAP quinasas que inducen la síntesis de DNA. Por su parte los receptores acoplados a G_{12/13} promueven la activación de la proteína G monomérica Rho A que induce la contracción celular (basado en Moolenaar *et al.*, 2004).

El LPA₂ o Edg4 fue el segundo receptor caracterizado para LPA, esta vez en humanos, encontrado por comparación de secuencias de cDNA humano muy parecidas a la secuencia

del *edg2*. Este receptor consta de 351 aminoácidos, con una masa molecular estimado de 39,084 Da y al contrario del LPA₁ su expresión es muy baja, pues sólo se ha encontrado en el timo, el bazo y en leucocitos (An *et al.*, 1998). También se acopla a las proteínas G_{i/o}, G_{12/13} y G_q. Las células T que sobreexpresan al Edg4 incrementan su migración en ensayos *in vitro* en respuesta a un estímulo de LPA y potencian el efecto de RANTES (Zheng *et al.*, 2001), además se ha propuesto que el LPA₂ tiene un efecto transformante al igual que el LPA₁ y el LPA₄ en ensayos de formación de colonias *in vitro* con fibroblastos embrionicos de ratón (Taghavi *et al.*, 2008). En las células B103 transfectadas con el LPA₂ también se produce contracción ante un estímulo de LPA (Ishii *et al.*, 2000), mientras que los ratones “knockout” del PLA₂ parecen no mostrar alteraciones fenotípicas comparados con los ratones silvestres. El doble “knockout” *lpa1* (-/-) *lpa2* (-/-) presenta el mismo fenotipo que los ratones *lpa1* (-/-) con un incremento en la frecuencia de hemorragia en la parte frontal del cráneo (Contos *et al.*, 2002; Fang-tsy y Yun-Ju, 2008).

El tercer receptor descrito para LPA fue el LPA₃ o Edg7. Para su descubrimiento se usaron oligonucleótidos degenerados correspondientes a dos bloques de aminoácidos muy conservados en el Edg2 y Edg4: uno está en el segundo dominio transmembranal y el otro en el sexto dominio transmembranal de ambos receptores. El LPA₃ es una proteína de 353 aminoácidos con una masa molecular estimado de 40,128 Da. En humanos se expresa en corazón, placenta, pulmón, páncreas, próstata, testículo y ovario (Bandoh *et al.*, 1999). Se acopla a las proteínas G_{i/o}, G_q y G_s. Al igual que el LPA₁ regula la actividad quimiotáctica en células endoteliales de cordón umbilical (Chi-Iou *et al.*, 2007) y junto con el LPA₁ puede regular la expresión de genes inflamatorios como la Interleucina 8 y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (IL-8 y MCP-1 respectivamente) y jugar un papel crítico en la quimioatracción de los monocitos al endotelio (Chi-Iou *et al.*, 2007). El LPA₃ también juega un papel muy importante en la implantación y distribución de los embriones en roedores; la delección del LPA₃ en ratones genera organismos viables, aunque las hembras se encuentran un poco reducidas en talla en comparación con las silvestres. Sin embargo, los cambios más dramáticos se observan en la implantación de los embriones ya que en las hembras *lpa3* (-/-) no se distribuyen a lo largo del útero, sino que se acumulan en un solo

punto, produciéndose una implantación múltiple y presentándose una hipertrofia de la placenta (Ye *et al.*, 2005; Hama *et al.*, 2007).

Existe un grupo de aproximadamente 100 receptores conocidos como “receptores huérfanos” cuya estructura es similar a otros GPCRs, pero de los cuales se desconoce su ligando natural (IUPHAR, 2009). El LPA₄ fue descubierto durante un proyecto de “adopción” de GPCRs huérfanos; el GPR23 (los genes que codifican a los GPCRs se conocen como familia de genes GPR) resultó ser un receptor filogenéticamente muy cercano a otra subfamilia de GPCRs llamados P2Y, los cuales son receptores purinérgicos por lo que también se le conoce al LPA₄ como P2Y₉; sorpresivamente este receptor de 370 aminoácidos con una masa de 41,895 Da, resultó ser un receptor al que se unía el LPA e incrementaba la concentración de Ca²⁺ intracelular en células CHO transfectadas con este receptor. Se expresa en timo, próstata, páncreas, corazón, intestino delgado y predominantemente en ovario; se acopla a las proteínas G_q y G_s (Noguchi *et al.*, 2003).

El receptor GPR92, otro receptor huérfano, fue identificado como el receptor LPA₅ por unir LPA y aumentar la concentración de cAMP en células HeLa transfectadas con este receptor, además participa en la formación de fibras de estrés, que son grupos de microfilamentos de actina necesarios para que la célula se ancle al substrato y permitir su desplazamiento. Presenta una homología del 31% con el LPA₄ y 22% con la familia clásica de receptores de LPA. Está constituido de 372 aminoácidos y su masa es de 41,347 Da. Se acopla a G_s y G_q; se encuentra en el hígado, colon, intestino delgado cerebro, corazón y bazo (Kotarski *et al.*, 2006).

El siguiente receptor identificado para LPA es el receptor P2Y₅ ahora también llamado LPA₆. Este receptor consta de 344 aminoácidos y una masa molecular de 39,392 Da. Fue descrito como un gen involucrado en un tipo de alopecia humana, donde una mutación en la secuencia del gen resulta en un codón de término que hace que el receptor se traduzca de forma incompleta, con lo cual pierde su función; el LPA₆ se puede acoplar a G_{12/13} y G_s (Pasternack *et al.*, 2008; Yanagida *et al.*, 2009).

GPR87, una proteína de 358 aminoácidos y 41,436 Da, es otro receptor rescatado de la orfandad, muy parecido a la familia de los receptores P2Y. Es capaz de unir LPA e incrementar la concentración de Ca^{2+} intracelular en células CHO transfectadas con este receptor (Tabata *et al.*, 2007).

Adicional a estos receptores en membrana, se sabe que el LPA puede unirse a un receptor nuclear conocido como PPAR- γ que regula la expresión de CD36; además este receptor regula genes que tienen que ver con el control de la energía y el metabolismo celular, aunque los efectos que tiene el LPA al unirse a este receptor nuclear aún no están claros (Bensinger y Tonttonoz, 2008).

II. 5. Desensibilización

La presencia de señales químicas en el medio extracelular tiene como consecuencia la activación de células que posean receptores para ellas, encendiendo cascadas de señalización intracelulares que alteran el estado inicial en que se encontraban las células blanco. Así pues, es evidente que la célula responde a la señal, pero también resulta lógico que la célula no deba mantener encendida la maquinaria de respuesta intracelular por largos periodos de tiempo, debido al gasto energético que esto implica, por lo que la señal tiene que ser modulada de forma rápida y eficiente.

En el caso de los GPCRs la modulación de la señal se asocia a ciclos de fosforilación y desfosforilación de los receptores, en un evento primario conocido como desensibilización (Vázquez-Prado *et al.*, 2003). La desensibilización regula de forma negativa la acción de una molécula señal en la célula blanco; para que este evento se lleve a cabo se requiere de la fosforilación de sitios consenso en la tercera asa intracelular y/o en el extremo carboxilo terminal de los GPCRs.

Existen dos tipos de cinasas que fosforilan y participan en la desensibilización de los GPCRs. El primer tipo es el grupo de cinasas de los GPCRs conocido como GRKs que

están involucradas en la llamada desensibilización homóloga. Ésta ocurre cuando el receptor es ocupado por su ligando, lo que activa a las GRKs que fosforilan al receptor en residuos de serina y treonina en la tercera asa intracelular y/o extremo carboxilo lo que promueve su posterior internalización, mediante la unión de la proteína β -arrestina y el reclutamiento de moléculas de clatrina que hacen posible la formación de una vesícula (Pierce y Lefkowitz, 2001). En este caso el receptor se automodula, pues al activarse también se activarán las cinasas que lo fosforilan y disminuye la cantidad de receptor en la membrana por endocitosis (Fig. 3A).

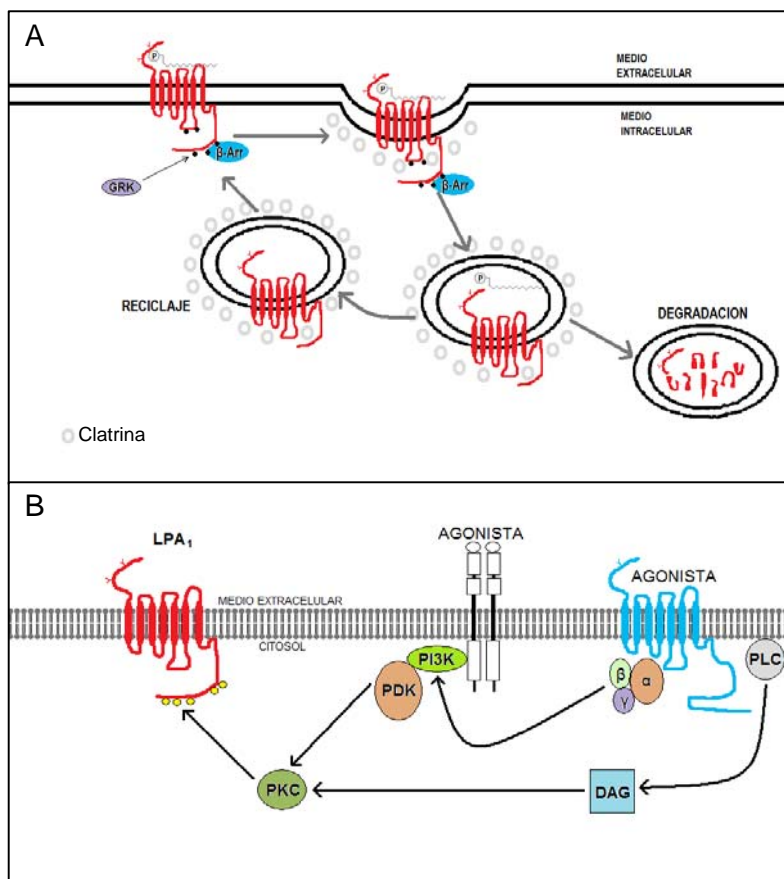


Figura. 3. A. Desensibilización homóloga. En este tipo de desensibilización el complejo formado por el receptor-ligando es fosforilado por una GRK en el extremo carboxilo terminal; la fosforilación del receptor permite la unión a los sitios fosforilados de la β -arrestina que recluta al complejo AP-2 y moléculas de clatrina que son necesarios para la formación de una vesícula endocítica que internaliza al receptor (basado en Pierce y Lefkowitz, 2001). **B. Desensibilización heteróloga.** Aquí la activación de algunos receptores como RTKs o GPCRs puede llevar a la activación de PKC ya sea por vía PI3K o PLC. De esta forma PKC puede fosforilar a los GPCRs, sin necesidad de que estos sean ocupados por su ligando (basado en de Vázquez-Prado *et al.*, 2003).

El segundo tipo de desensibilización no requiere de la ocupación del receptor por un agonista, sino que se induce por la activación de cinasas dependientes de segundos mensajeros como la proteína cinasa A (PKA, dependiente de cAMP) y la proteína cinasa C (PKC, dependiente de Ca^{2+} y DAG), las cuales están involucradas en la llamada

desensibilización heteróloga (Fig. 3B), que se da cuando se activa un receptor diferente, como por ejemplo receptores de factores de crecimiento (que son RTKs) u otros GPCRs; es decir un receptor modula la actividad de otro distinto (García-Sáinz *et al.*, 2008).

Se ha observado que la activación de receptores acoplados a G_q (por ejemplo el receptor de endotelina) puede inducir la fosforilación del receptor α_{1B} adrenérgico por la activación de PKC. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) también induce la fosforilación del receptor α_{1B} adrenérgico por activación de la PKC con participación de la fosfatidilinositol 3 cinasa (García-Sáinz *et al.*, 2008).

Una vez que los receptores se internalizan se presenta otro evento clave en la modulación de su señalización, que es la distribución de las vesículas. En este punto se decide el destino de los receptores internalizados, pues pueden ser marcados con ubiquitina para ser transportados al proteasoma para su degradación, o pueden ser desfosforilados para regresar a la membrana celular y seguir funcionando como antenas. Aunque este evento no está del todo claro, se incrementa la evidencia de que depende mas bien del propio receptor, el cual presenta algún motivo de unión a proteínas como el dominio PDZ que permitiría al receptor desfosforilarse y reciclarse, e incluso se habla de diferencias entre las vesículas de los receptores que se van a reciclar y las vesículas de los receptores que van a degradarse.

El tiempo que una célula queda desensibilizada dependerá de la suerte que corra el receptor, pues si es reciclado, éste regresa a la membrana en aproximadamente 30-50 min, mientras que si es degradado la recuperación de la población de receptores en la membrana tardará varias horas pues es necesario la síntesis *de novo* (Marchese *et al.*, 2008).

II. 6. Desensibilización de los receptores de LPA

En nuestro laboratorio se logró demostrar que el receptor LPA_1 es fosforilado e internalizado bajo la acción del agonista y por la activación directa de la proteína cinasa C

(usando ésteres de forbol). Además, sabemos que la activación de otros receptores acoplados a proteínas G (específicamente el receptor de angiotensina tipo 1, AT-1) también inducen su desensibilización. Lo anterior se demostró usando una construcción del receptor LPA₁ con la proteína verde fluorescente, que nos permitió detectar cambios de localización celular en tiempo real.

Estudios posteriores han demostrado la existencia de sitios específicos en el extremo carboxilo del LPA₁ que pueden ser claves para la unión de las cinasas que fosforilan y desensibilizan al receptor, como un grupo de serinas (³⁴¹SDRSASS³⁴⁷) que se requiere para la asociación de β-arrestinas, y un motivo dileucina (³⁵²IL³⁵³) que es requerido para la internalización inducida por el éster de forbol.

Utilizando ensayos *in vitro*, se ha propuesto que la delección del motivo dileucina incrementa la acumulación de fosfatos de inositol por activación con LPA y que la delección de este motivo, más la delección del grupo de serinas, aumenta en mayor medida la acumulación de fosfatos de inositol, lo que se ha interpretado como una ausencia de la desensibilización de estos receptores de LPA truncados por no poseer los sitios de regulación, lo que los deja en la membrana plasmática sin ser internalizados y en contacto continuo con el ligando, con ello la célula aumenta progresivamente la cantidad de segundos mensajeros (Urs *et al.*, 2008).

También se ha visto que la mutación o delección de los últimos 3 aminoácidos (³⁶¹SVV³⁶³) del extremo carboxilo, considerado como un dominio de unión a proteínas con sitios PDZ, hace que el receptor permanezca constitutivamente activo, incrementando significativamente la capacidad proliferativa de células B103 transfectadas con estos receptores mutados (Shano *et al.*, 2008).

En el presente trabajo se ha tratado de estudiar si existe un mecanismo de desensibilización de los receptores LPA₂ y PLA₃. Sin embargo, como se verá más adelante, han surgido una serie de obstáculos que han hecho difícil el estudio de la desensibilización de estos dos receptores. Como se mencionó anteriormente los receptores LPA₂ y LPA₃ cumplen

funciones cruciales en los organismos superiores; es por eso que es importante conocer la forma cómo estos dos receptores se regulan. El LPA₂ y el LPA₃ son los receptores más relacionados filogenéticamente al LPA₁ y en muchos casos se encuentran expresados en una misma célula. Por eso a menudo se piensa que las cascadas de señalización de estos tres receptores convergen en una misma respuesta que se potencia. En algunos casos, el papel de los receptores de LPA parece redundante, pero existe evidencia que indica que puede existir antagonismo funcional entre estos receptores en una misma célula (Zheng *et al.*, 2001).

Analizando la secuencia de aminoácidos con la ayuda de los programas de cómputo NetPhosK 1.0 y GPS 2.1 (Blom, 2004; Xue, 2008) se predijeron sitios importantes de fosforilación. Se encontró que existen en el extremo carboxilo del LPA₂ humano sitios con alta probabilidad de ser blanco de cinasas activadas por segundos mensajeros como PKC. Además de un sitio con alta probabilidad de ser fosforilados por GRKs, también en el extremo carboxilo terminal. Para el LPA₃ humano se encontraron sitios que pueden ser blanco de PKC o PKA en la tercera asa intracelular y en el extremo carboxilo terminal, igualmente se encontraron sitios probables de fosforilación para GRKs en ambas regiones del receptor. Estos datos sugieren que estos tres receptores pueden ser regulados tanto de forma homóloga como heteróloga (Figs. 4 y 5).

En nuestro laboratorio se ha logrado obtener la construcción de los receptores LPA₂ y LPA₃ con la proteína verde fluorescente y el epitope *c-myc* fusionados al extremo carboxilo terminal de los receptores (Avendaño-Vázquez *et al.*, 2005). Por tal motivo para el proyecto de tesis de maestría se planteó usar estas construcciones para estudiar el mecanismo de desensibilización de las mismas, y saber si existen diferencias con respecto al receptor LPA₁ o si es que se regulan de forma similar.

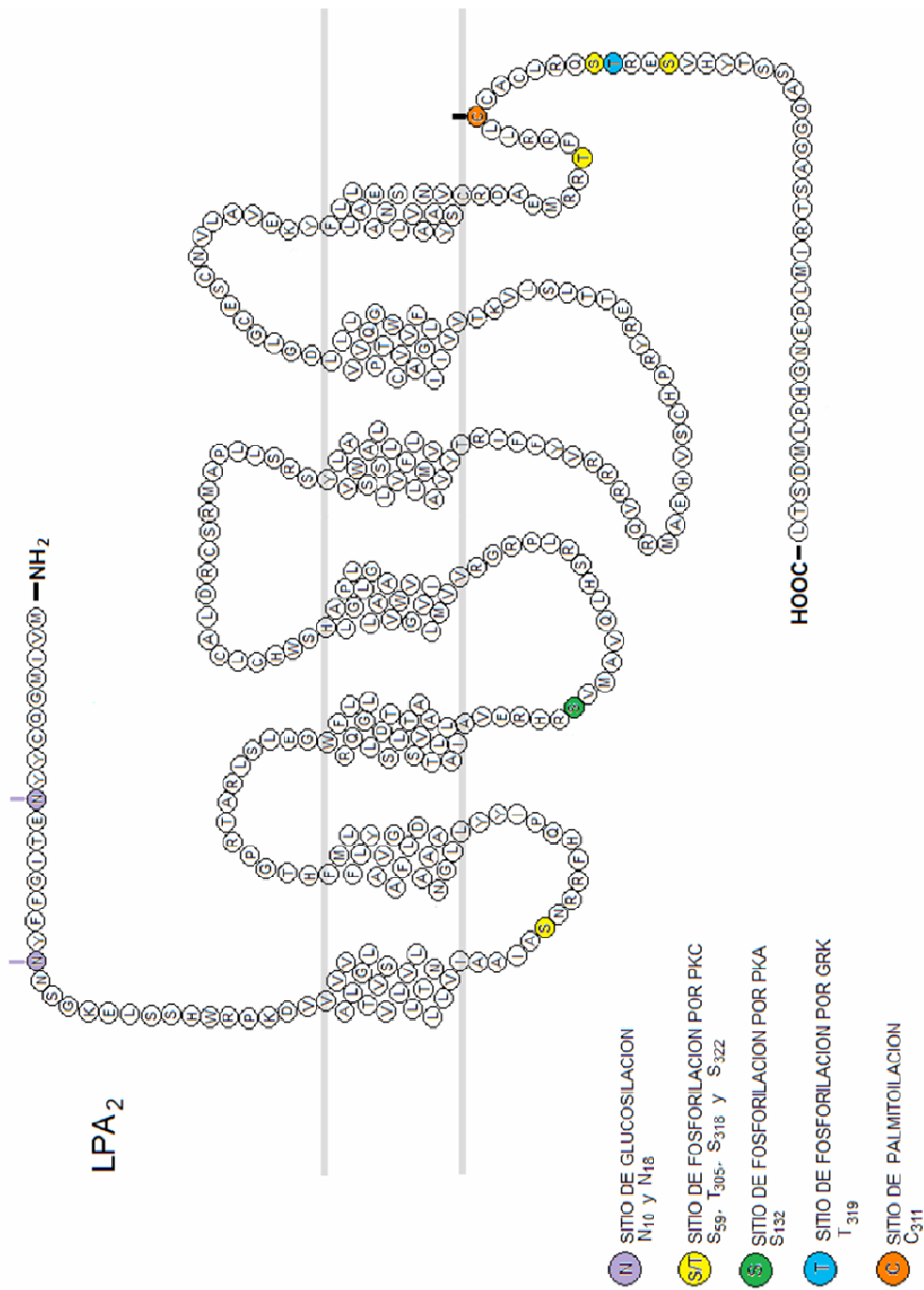


Fig. 4. Estructura del receptor LPA₂ humano. El receptor LPA₂ es una proteína que tiene siete dominios transmembranales, tiene una masa molecular de 39 kDa y consta de 351 aminoácidos. Posee 2 sitios probables de glucosilación que son las asparaginas 10 y 18, también un sitio probable de fosforilación por GRKs en la cola carboxilica y varios sitios de fosforilación por cinasas dependientes de segundos mensajeros como PKC o PKA en la primera y segunda asas intracelulares y el extremo carboxilo terminal; la cisteína 311 es un sitio probable de S-palmitoilación que se ancla a la cara interna de la membrana plasmática (NefPhosK 1.0, GPS 2.1).

III. HIPOTESIS

Los receptores LPA2 y LPA3 se desensibilizan de forma homóloga por fosforilación e internalización inducida por la unión de su ligando y de forma heteróloga por la fosforilación e internalización inducida directamente por PKC.

IV. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue determinar si existen desensibilizaciones homóloga y heteróloga de los receptores LPA₂ y LPA₃. Para esto se realizaron los siguientes pasos:

- Generar células C9 transfectadas con los receptores LPA₂ y LPA₃ que sean estables.
- Caracterizar la respuesta a LPA de las células transfectadas con cada uno de los dos receptores, mediante la medición del aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular.
- Determinar si existe un incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular en respuesta a un estímulo de LPA en las células transfectadas con los receptores LPA₂ y LPA₃ pretratadas con TPA.
- Analizar si existe fosforilación de los receptores LPA₂ y LPA₃ en respuesta a LPA.
- Analizar si existe fosforilación de los receptores LPA₂ y LPA₃ en respuesta a la activación de PKC por TPA.

V. Materiales y Métodos

V. 1. Reactivos

El ácido lisofosfatídico (oleoil-sn-glicero-3-fosfato), 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), el medio de cultivo F12 Ham's (Kaighn's modification: F12-K) y los inhibidores de proteasas se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El suero fetal bovino, la tripsina, el anticuerpo acoplado a la peroxidada de rabano (HRP- de conejo anti-raton IgG+A+M (H+L)), el Fura-2 AM, LipofectamineTM 2000 reagent, se obtuvieron de Invitrogen; el medio DMEM, la geneticina (G418) y el Opti-MEM^R se obtuvieron de Gibco BRL Life Technologies, Inc.

V. 2. Líneas celulares

Se utilizó la línea celular C9 de hígado de rata de la American Type Culture Collection (ATCC). Las células C9 se crecieron en medio F12-K (Kaighn's modification) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), en una incubadora a temperatura de 37°C y con una atmósfera de 5% de CO₂.

V. 3. Vectores de clonación

Las secuencias de nucleótidos que codifica para cada uno de los receptores LPA₂ y LPA₃ se encuentran insertados en el vector pEGFP-N1, que permiten fusionar los receptores con la proteína verde fluorescente y el vector pcDNA 3.1/ Myc-Hys (+) C, que permite fusionar el epítipo de *c-myc* (EQKLISEEDL), en el extremo carboxilo intracelular de los receptores.

Los plásmidos contienen un gen de resistencia para poder seleccionarlos en bacterias: el de kanamicina en el pEGFP-N1 y el de resistencia a ampicilina en el pcDNA 3.1/ Myc-Hys (+) C. Ambos vectores poseen resistencia a neomicina (geneticina), que permite la selección de

células de mamífero transfectadas para generar cultivos que expresen el inserto, en este caso, los correspondientes a LPA, de manera estable.

Se utilizaron estos plásmidos para transformar bacterias de la cepa DH5 α , las cuales se hicieron competentes mediante el método de CaCl₂.

V. 4. Generación de células transfectadas con los receptores LPA₂ y LPA₃ fusionados con Myc

Las células C9 se transfectaron con lipofectamina 2000, para lo cual se prepararon diferentes soluciones:

Una solución A que contiene: 5 μ l de lipofectamina + 20 μ l de Opti-MEM.

Una solución B con: 3 μ g del plásmido de interés + Opti-MEM necesario para tener un volumen final de 25 μ l.

Y finalmente una solución C, que es la mezcla de las soluciones A y B en tubo de 1.5 ml incubada por 30 minutos. Después de ese tiempo se adicionaron 550 μ l de Opti-MEM al tubo con la solución C, para tener un volumen de 600 μ l.

A células C9 sembradas en cajas petri de 3 cm de diámetro con una confluencia entre el 90-100% se les retiró el medio de cultivo y se lavaron 2 veces con 2 ml de Opti-MEM, para después dejarlas incubando toda la noche con la solución C previamente preparada; al día siguiente se les retiró la solución C o de transfección y se dejaron un día con medio F12-K complementado con SFB al 10% para su recuperación. Al siguiente día se cambió el medio por uno que contiene G418 (300 μ g/ml) para seleccionar por resistencia a las células transfectadas con el vector.

V. 5. Medición de Ca^{2+} intracelular

Como el LPA se encuentra en el suero que complementa el medio de cultivo, para medir la movilización de calcio, las células de una caja petri con una confluencia de 90-100% se dejaron toda la noche con medio F12-K sin suero para evitar que estuvieran preestimuladas. Al siguiente día se les retiró el medio y se lavaron 2 veces con PBS; después se incubaron 1 hora con el fluoróforo Fura 2 AM 2.5 μM en solución amortiguadora Krebs-Ringer-Hepes con 0.05% (p/v) de BSA (albúmina de suero bovino) a 37°C. Pasado este tiempo se les retiró la solución amortiguadora y se trataron con tripsina (10 mg/ml) por 1 min para despegarlas de la caja, la acción de la tripsina se detuvo con solución amortiguadora Krebs-Ringer-Hepes con 0.05% (p/v) de BSA. Las células se pasaron a un tubo cónico de 15 ml y se centrifugaron a 3000 rpm durante 2 min; luego se retiró el amortiguador y se resuspendió la pastilla de células de nuevo en Krebs. Esto se repitió dos veces y al final las células se resuspendieron en 3.5 ml de Krebs-Ringer-Hepes con 0.05% (p/v) de BSA.

La movilización de Ca^{2+} intracelular se observa a través de la estimulación con LPA 1 μM , mediante cambios en la fluorescencia manteniendo a las células (0.5 ml de células resuspendidas + 1.5 ml de Krebs-Ringer-Hepes en una celda), en agitación constante utilizando un espectrofluorómetro AMINCO-Bowman serie 2, usando una longitud de onda de excitación de 340 nm y una longitud de onda de emisión de 510 nm del fluoróforo Fura 2 AM.

La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se cuantificó utilizando un programa de cómputo incluido en el espectrofluorómetro a partir de la relación entre la fluorescencia máxima y mínima de acuerdo a la ecuación $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d [(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)] [Sf_2 / Sb_2]$, donde la K_d representa la constante de afinidad del fluoróforo por el Ca^{2+} ; R es la lectura de la fluorescencia en unidades arbitrarias, R_{\min} representa la fluorescencia mínima obtenida al adicionar el quelante de Ca^{2+} EGTA (5 mM) y R_{\max} es la fluorescencia máxima obtenida al lisar las células con Tritón-X-100 al 10% (v/v). Sf_2 y Sb_2 son los coeficientes de proporcionalidad del fluoróforo libre (Sf_2) y el unido al calcio (Sb_2) en la longitud de onda 2.

V. 6. Generación de anticuerpos

En el laboratorio hemos generado anticuerpos monoclonales anti-Myc usando el hibridoma 9E10 de ATCC. Las células de hibridoma se crecieron en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%, a 37°C en un atmósfera de CO₂ al 5%. Éstas se colectaron para inyectarlas en los ratones de la línea balb/c, los cuales se pretrataron con “Pristane” (SIGMA) una semana antes de recibir las células del hibridoma. Medio millón de células de hibridoma se inyectaron intraperitonealmente a los ratones y se esperó hasta una semana para que los ratones generaran líquido de ascitis. El líquido de ascitis obtenido de los ratones se centrifugó 5 min a 3000 rpm para separar las células contenidas en él y recolectar el sobrenadante en donde se encuentran los anticuerpos.

El anticuerpo policlonal contra la proteína verde fluorescente se obtuvo del suero de conejos inmunizados con la proteína verde fluorescente fusionada a la glutation-S-transferasa purificada (Colin, 2005).

V. 7. Ensayo de fosforilación de receptores

Las células C9 que expresan de manera estable los receptores para LPA (C9 PLA₂-Myc y C9 LPA₃-Myc) en confluencia se mantuvieron toda una noche en medio F12-K sin suero; al día siguiente se incubaron en medio F12-K libre de fosfatos por 1 h, y después se incubaron con 1 ml de este mismo medio pero ahora conteniendo [³²P]Pi 50 µCi/ml (Perkin-Elmer), durante 4 hrs a 37 °C (marcaje metabólico).

Las células marcadas metabólicamente se estimularon con LPA 1 µM por 5 min y con TPA 1 µM por 15 min; posteriormente se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos-salino (PBS) frío y se resuspendieron en 750 µl de solución amortiguadora de lisis (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; SDS 0.1% (p/v); tritón 1% (v/v); NaF 50 mM; Na₃VO₄ 100 µM; β-glicerofosfato 10 mM; Na₄P₂O₇ 10 mM; P-serina 1 mM; P-tirosina 1 mM; P-treonina 1

mM; EDTA 5 mM; leupeptina 20 µg/ml; aprotinina 20 µg/ml, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 µg/ml y de inhibidor de tripsina de soya 50 µg/ml a pH 7.5 final) durante 1 h sobre hielo. Los extractos se colectaron y centrifugaron a 10,000 x g o 13,000 rpm por 15 min a 4°C.

Los sobrenadantes de las muestras se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 ml, teniendo 20 µl del líquido de ascitis contra el epítipo de *c-myc*; luego se les adicionó a los tubos 40 µl de proteína G-sefarosa.

Se incubaron toda la noche a 4°C con agitación constante; al día siguiente los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 min y se eliminó el sobrenadante. Las esferas de proteína G-sefarosa se lavaron 4 veces por resuspensión-centrifugación, con solución amortiguadora de: Hepes 100 mM, NaHPO₄ 50 mM, NaF 10 mM, Tritón 10 %, SDS 5 % a pH 7.2 (solución de lavado). A las esferas lavadas se les agregó solución de Laemmli (15 µl) más 20 µl de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% (p/v) y 20 µl de urea 7 M y se sometieron a ebullición durante 10 min. Posteriormente las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes de las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 o 7 % en condiciones reductoras.

Los geles una vez secos se expusieron sobre una placa del sistema PhosphorImager de Molecular Dynamics con el software Image Quant, para la cuantificación de la fosforilación.

V. 8. Replica en Western

Las muestras de los ensayos de fosforilación se corrieron en geles SDS-PAGE y después se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a 60 mA/gel durante 1 h. Las membranas se bloquearon con leche libre de grasa al 5 % en TBS durante 1 h a temperatura ambiente. Después las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti- Myc en una dilución 1:500 TBS-Tween 0.1% (v/v) toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron con TBS-

Tween 0.1%, y se incubaron con el anticuerpo secundario de conejo que está conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP-Rabbit) y que esta dirigida contra los anticuerpos de ratón anti-Myc en una dilución 1:10,000 en TBS-Tween por 1 h a temperatura ambiente; después se lavaron con TBS-Tween 1.0% tres veces y se utilizó un kit de quimioluminiscencia de PIERCE para detectar la peroxidasa de rábano.

V. 9. Microscopía confocal

Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio Olympus 1X81 de luz invertida (Olympus corporation, Tokio, Japon) con el objetivo de 60X. La GFP fue excitada usando luz a una longitud de onda de 488 nm, y la fluorescencia se detectó a 500-530 nm.

V. 10. Análisis estadístico

Los datos fueron graficados y analizados utilizando el software Prisma 4 para windows (GraphPad Software) y se presentan los promedios \pm el error estándar (SEM). A los datos se les aplicó la prueba t de Student para comparaciones simples y análisis de varianza con prueba de Bonferroni para análisis múltiples.

VI. Resultados

VI. 1. Fosforilación del receptor LPA₁

El receptor LPA₁ se fosforila y se desensibiliza de forma homóloga y heteróloga, como ya se ha demostrado anteriormente en el laboratorio (Avendaño –Vázquez *et al.*, 2005). Con la intención de comprobar estos datos y después compararlos con los receptores LPA₂ y LPA₃, se utilizó la línea celular de hígado de rata C9 transfectada con la construcción del receptor LPA₁ fusionado a la proteína verde fluorescente (LPA₁-GFP), mismas que respondieron con una liberación de calcio intracelular mayor (casi del doble de liberación de Ca²⁺ intracelular), ante un estímulo de LPA 1 μM, comparado con las células C9 tipo silvestre (WT) (Fig. 6A). La incubación de estas células con LPA 1 μM por 5 min y de TPA 1 μM por 15 min, induce la fosforilación del receptor LPA₁-GFP (Fig. 6B).

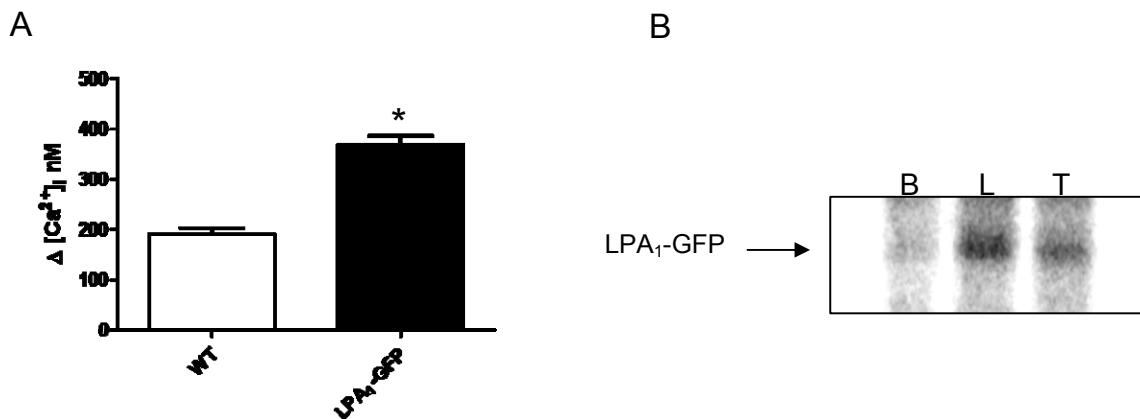


Figura. 6. liberación de Ca²⁺ intracelular y fosforilación de células C9 transfectadas con el LPA₁-GFP. A) Liberación de Ca²⁺ intracelular de células C9 tipo silvestre (WT) y células C9 transfectadas con el receptor LPA₁-GFP en respuesta a un estímulo de LPA 1 μM. * P<0.05 vs. WT. se presentan los promedios ± SEM, n=3. **B)** fosforilación del receptor LPA₁-GFP en respuesta a un estímulo de 1 μM de LPA por 5 min (L) y TPA por 15 min (T) en células C9 transfectadas con el receptor LPA₁-GFP. B (basal).

VI. 2. Respuesta de células C9 transfectadas con los receptores LPA2-GFP y LPA3-GFP

En el laboratorio también se hicieron junto con el LPA₁-GFP las construcciones de los receptores LPA₂ y LPA₃ fusionados a la GFP (LPA₂-GFP y LPA₃-GFP). Al inicio se transfectaron estos dos receptores en células de la línea CFSC-2G (células de ITO o estrelladas), las cuales no presentan movilización de Ca²⁺ por un estímulo de LPA, pero sí cuando se estimula a otro GPCR como es el de bradicinina. Desafortunadamente estas células transfectadas no movilizaron Ca²⁺ (datos no mostrados); es por eso que se decidió transfectar las células C9 con ambas construcciones y se pudieron generar líneas estables de células C9 LPA₂-GFP y C9 LPA₃-GFP. Si los dos receptores pueden acoplarse a la vía de señalización que promueven la liberación de Ca²⁺ intracelular (ver Tabla 1), entonces esperábamos obtener una liberación de Ca²⁺ mayor que en las células silvestres al estimularlas con LPA, como sucede con las células C9 LPA₁-GFP.

Esperando que la sobreexpresión del receptor LPA₂ y la expresión del receptor LPA₃ (las células C9 no expresan este último receptor, Avendaño-Vazquez *et al.*, 2005) incrementara la movilización de Ca²⁺ intracelular en respuesta a LPA, se hicieron ensayos de medición de Ca²⁺ estimulando a las células con LPA (1 μM) y TPA (1 μM). Las células C9 transfectadas con el receptor LPA₂-GFP y las células con el receptor LPA₃-GFP presentaron una movilización de Ca²⁺ similar al de las células tipo silvestre cuando se estimularon con LPA, es decir no se vió el incremento que se esperaba (Fig. 7).

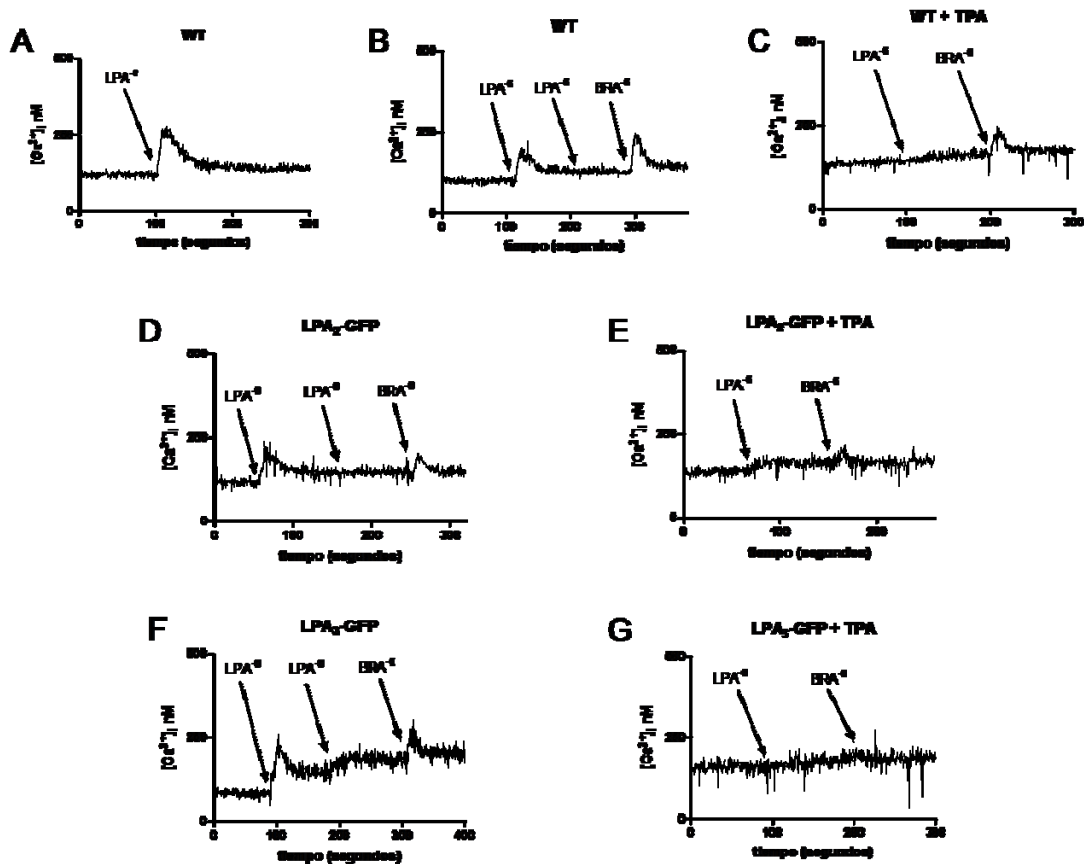


Figura. 7. Movilización de Ca^{2+} en células C9. Células C9 tipo silvestre (A, B y C) y transfectadas con los receptores LPA₂-GFP (D y E) y LPA₃-GFP (F y G), fueron estimuladas con 1 μ M de LPA, presentando todas una pequeña respuesta de liberación de Ca^{2+} (D y F), similar a la presentada por las células WT (A); posteriormente 100 segundos después, se aplicó un nuevo estímulo de LPA a la misma concentración en todas las células, pero la respuesta fue muy baja o nula, lo que muestra una desensibilización por parte de las células. Pero si hubo respuesta a bradicinina (BRA), por lo que se deduce que esta desensibilización es específica para el LPA (B, C y F). La incubación por 5 min de las tres líneas de C9 con TPA 1 μ M abatió casi por completo la movilización de calcio inducida por LPA al igual que la de bradicinina (C, E y G). Trazos representativos de 4 experimentos independientes.

Al observar las células C9 LPA₂-GFP y C9 LPA₃-GFP en el microscopio confocal con el objetivo de 60X, se detectó a los receptores en vesículas alrededor del núcleo y no en la membrana plasmática como se esperaba (Fig.8), lo que explica por qué las células transfectadas no presentan el aumento en la liberación de Ca^{2+} intracelular, como lo hacen las células transfectadas con el receptor LPA₁-GFP que sí presentan predominantemente el receptor en la membrana (Avenidaño –Vázquez *et al.*, 2005). Estos datos sugieren que la presencia de la proteína verde fluorescente en el extremo carboxilo terminal de estos receptores impide al receptor llegar a la membrana plasmática. Posiblemente la GFP

interfiera en el plegamiento correcto de nuestros receptores, por lo que son retenidos en el retículo endoplasmático para después ser degradados.

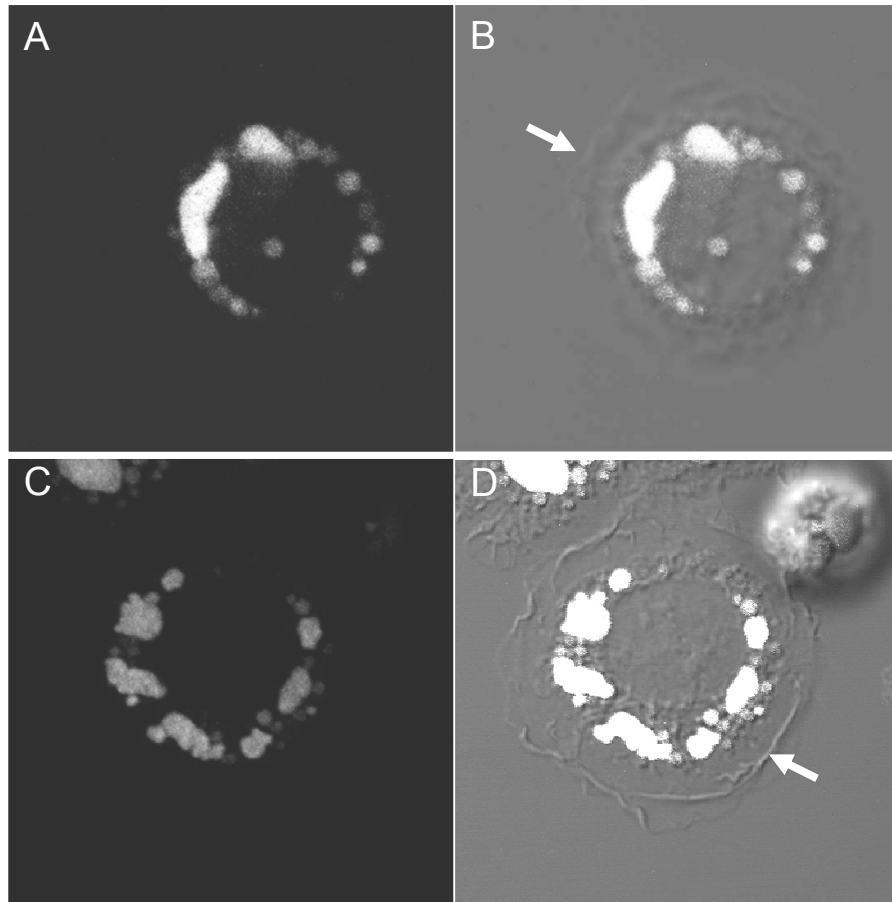


Figura. 8. Localización intracelular de los receptores LPA₂ y LPA₃ unidos a la GFP. Las células C9 fueron transfectadas con cada uno de los receptores (LPA₂ y LPA₃) unidos a la proteína verde fluorescente en el extremo carboxilo terminal; ambos receptores se localizan en vesículas de forma intracelular vistas con el microscopio confocal. Imágenes de células transfectadas con el LPA₂-GFP (A) y LPA₃-GFP (C), sin que se vea expresado en la membrana, como lo muestra la sobreposición de las imágenes del microscopio confocal y la luz transmitida LPA₂-GFP (B) y LPA₃-GFP (D). Las flechas blancas indican la posición de la membrana plasmática.

VI. 3. Respuesta de células C9 transfectadas con los receptores LPA₂-Myc y LPA₃-Myc

Al ver que los receptores fusionados con la GFP se quedaban atrapados en vesículas, decidimos usar otra de las construcciones, esta vez con el epítipo de Myc que consiste de 10 aminoácidos (EQKLISEEDL) fusionados en el extremo carboxilo terminal de los

receptores de LPA. Los receptores con el epítoto de Myc se transfectaron en células C9 para generar líneas estables utilizando el medio F12-K con G418. Las células seleccionadas se caracterizaron para determinar la concentración de LPA a la cual se obtiene la máxima respuesta en liberación de Ca^{2+} intracelular. Así observamos que las células C9 LPA₂-Myc movilizan Ca^{2+} a concentraciones superiores a 10 nM de LPA, obteniendo con 1 μM la máxima respuesta en liberación de Ca^{2+} , misma que se mantiene al aumentarla a 10 μM en células transfectadas (Fig. 9).

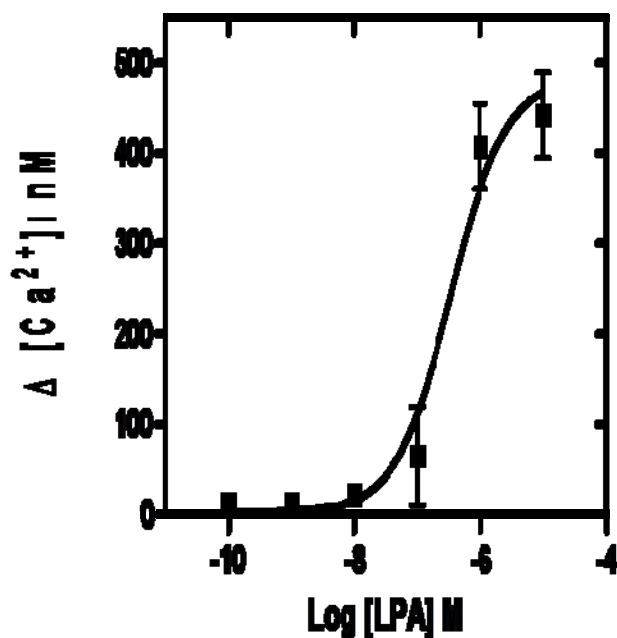


Figura. 9. Efecto del LPA sobre las células C9 LPA₂-Myc. Curva dosis-respuesta de la liberación de Ca^{2+} intracelular inducida por concentraciones crecientes de LPA en células C9 transfectadas con el receptor LPA₂-Myc. LOG EC50= -6.4. n=3, se presenta \pm el S.E.M.

Al hacer la comparación con las células silvestre observamos un aumento significativo en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a un estímulo de 1 μM de LPA en las células transfectadas con los receptores LPA₂-Myc y LPA₃-Myc, cosa que no habíamos observado con las células transfectadas con los receptores fusionadas a la proteína verde fluorescente (Fig. 10)

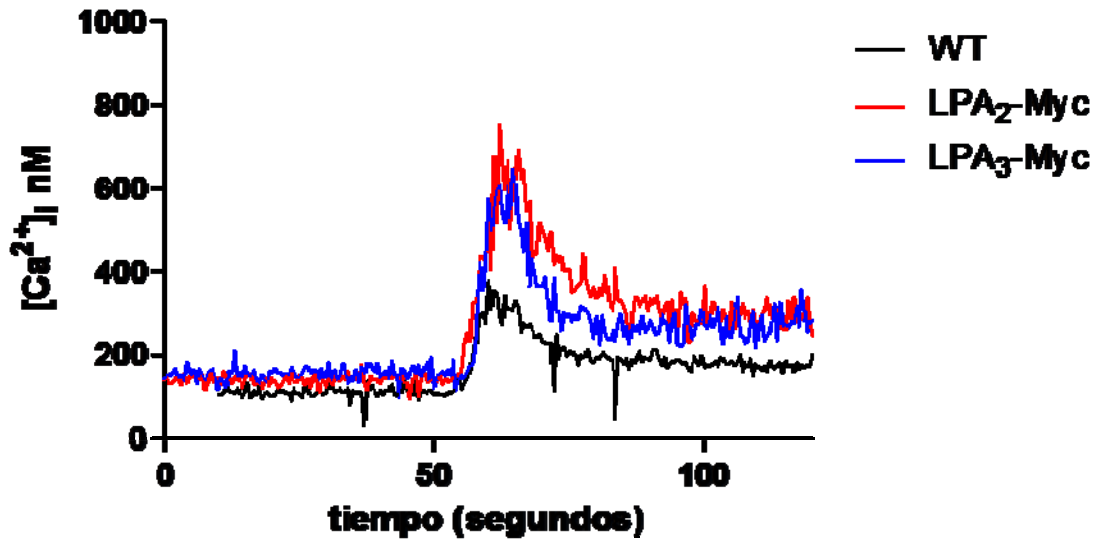


Figura. 10. incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por LPA. Células C9 WT (línea negra), C9 transfectadas con el LPA_2 -Myc (línea roja) y célula C9 transfectadas con el receptor LPA_3 -Myc (línea azul), fueron estimuladas con $1 \mu M$ de LPA. Trazos representativos de cinco experimentos independientes.

VI. 4. Desensibilización homóloga de los receptores LPA_2 y LPA_3

El siguiente paso, después de comprobar que nuestras células C9 LPA_2 -Myc y C9 LPA_3 -Myc responden ante un estímulo de LPA, fue preguntarnos si se podían desensibilizar de forma homóloga, para esto se incubaron las células con LPA $1 \mu M$ 5 minutos antes de colocarlas en el espectrofluorómetro para detectar la movilización de Ca^{2+} intracelular, y recibir un segundo estímulo de LPA $1 \mu M$. Como se esperaba las células no movilizaron Ca^{2+} ante el segundo estímulo de LPA, es decir se desensibilizaron de forma homóloga al igual que pasa con el LPA_1 , e incluso no hay que esperar los 5 min para ver que los células C9 LPA_2 -Myc y C9 LPA_3 -Myc se desensibilizan al LPA, pues basta esperar algunos segundos a que la $[Ca^{2+}]_i$ se estabilice para ver que el LPA ya no es capaz de provocar la respuesta hecha por el primer estímulo (Fig. 11).

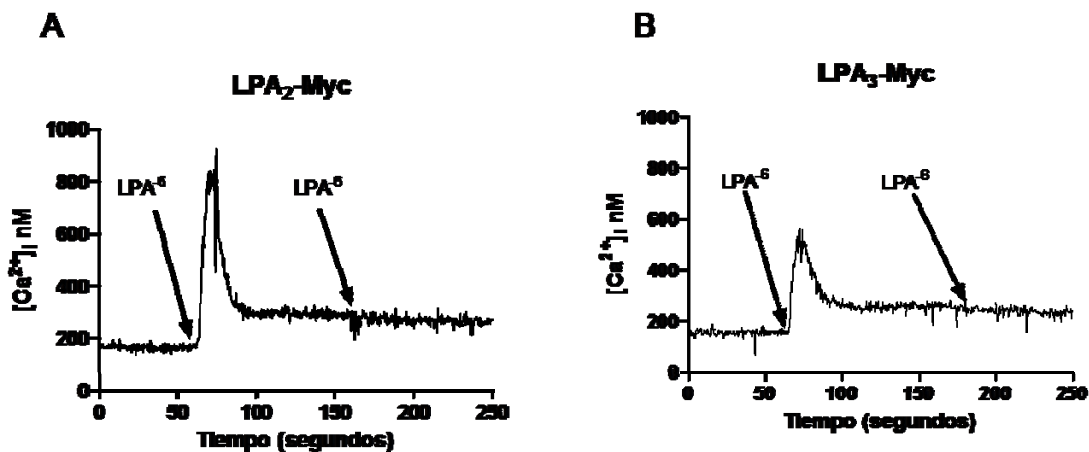


Fig. 11. Desensibilización homogénea de los receptores LPA₂-Myc y LPA₃-Myc. Células C9 transfectadas con los receptores LPA₂-Myc (A) y LPA₃-Myc (B), fueron retadas con un segundo estímulo de LPA 1 μ M que no desencadenó la liberación de Ca²⁺, aproximadamente 100 seg después de un primer estímulo con 1 μ M de LPA. Los trazos son representativos de 5 experimentos independientes.

VI. 5. Desensibilización heteróloga de los receptores LPA₂ y LPA₃

La siguiente incógnita a despejar fue saber si las células C9 LPA₂-Myc y C9 LPA₃-Myc, al igual como ocurre con el LPA₁, eran blanco de la PKC activada por ésteres de forbol, que supone una desensibilización heteróloga.

Para resolver esta cuestión ambas clonas se incubaron 5 min con TPA 1 μ M para ver su efecto en ensayos de medición de la liberación de Ca²⁺ intracelular. Después del tiempo de incubación con TPA las células se estimularon con LPA 1 μ M, la respuesta al LPA de las células C9 transfectadas con cada uno de los receptores de LPA con el epítipo de Myc, al igual que la de las C9 silvestres, se ve abatida casi totalmente en los tres casos por el TPA (Fig. 12A).

Mostrando que la activación de PKC lleva posiblemente a la fosforilación de los receptores, lo que tiene como consecuencia su desensibilización y posiblemente su internalización, lo que hace que no estén presentes para cuando la célula recibe el estímulo de LPA; esto

quiere decir que los receptores LPA₂ y LPA₃ son desensibilizados por PKC de manera heteróloga como le pasa al receptor LPA₁.

Para corroborar el papel directo que juega la PKC sobre la desensibilización de los receptores LPA₂ y LPA₃ se usaron de los inhibidores de PKC (staurosporina 100 nM y bisindolilmaleimida 1 μM). Se observó que estos inhibidores revierten el efecto del TPA en la activación de PKC para la desensibilización de los receptores de LPA (Figs. 12B y 12C), además el uso de inhibidores de la PI3K, otra cinasa también involucrada en eventos de desensibilización heteróloga de GPCRs, que son Wortmanina y LY294002, no impidieron que los receptores de LPA se desensibilizaran por TPA (datos no mostrados).

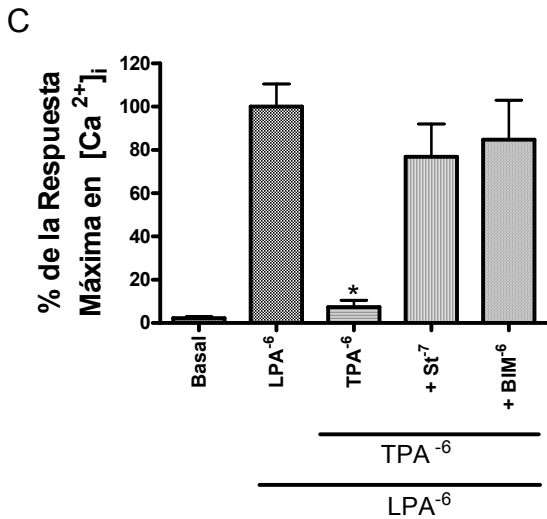
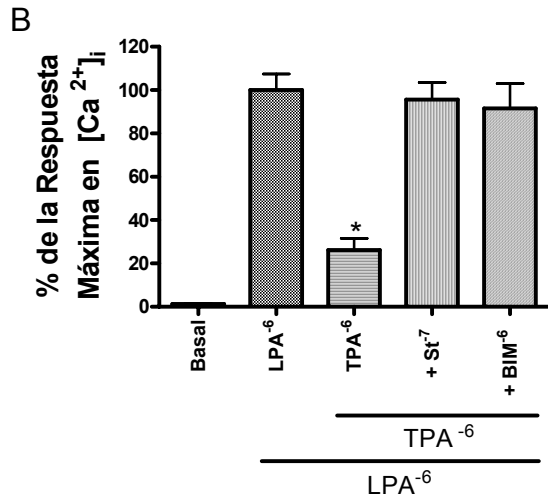
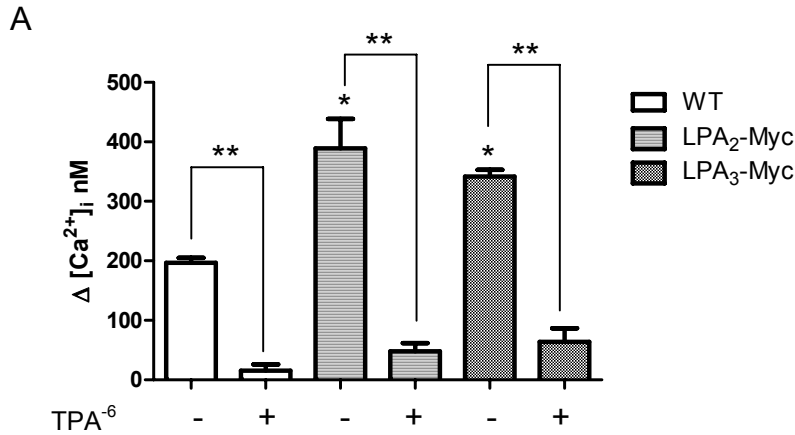


Fig. 12. Desensibilización heteróloga de los receptores LPA₂ y LPA₃. A) Células C9 WT, con el LPA₂-Myc y con el LPA₃-Myc, fueron incubadas en presencia (+) o en ausencia (-) de TPA 1 μ M por 5 min, para luego ser estimuladas con 1 μ M de LPA. La liberación de Ca²⁺ intracelular de las células con el LPA₂-Myc y LPA₃-Myc es significativamente más alta que las WT. Se aplicó una ANOVA de una vía, *P<0.05 vs WT sin TPA. ** P<0.05, S.E.M., n=4. respuesta a LPA en las células C9 tranfectadas con el LPA₂-Myc (B) y las células C9 LPA₃-Myc (C) después ser tratadas con los Inhibidores de PKC, staurosporina (St) y bisindolilmaleimida (BIM) por 15 min, seguida de la incubación con TPA 5 min. La respuesta de las células tratadas con St y BIM no es significativamente diferente a las que sólo son activadas con LPA 1 μ M. *P<0.05 vs LPA solo. S.E.M., n=4.

VI. 6. Fosforilación de los receptores LPA₂-Myc y LPA₃-Myc

Por los resultados con los experimentos previos de desensibilización de los receptores LPA por determinación de la movilización de Ca²⁺ intracelular era evidente que el siguiente punto a explorar era la fosforilación de los receptores LPA₂-Myc y LPA₃-Myc. Para ello se obtuvieron anticuerpos monoclonales presentes en el líquido de ascitis de ratones inoculados peritonealmente con el hibridoma 9E10 que produce un anticuerpo anti-Myc. Este anticuerpo se utilizó para tratar de inmunoprecipitar a los receptores LPA₂-Myc y LPA₃-Myc de las células C9 activadas con 1μM de LPA por 5 min y 1μM de TPA por 15 min, en ensayos de fosforilación; pero desafortunadamente no lo conseguimos.

Para saber si eran los anticuerpos que estábamos usando los que no estaban reconociendo el epítotope de Myc se probó y comparó con un anticuerpo comercial purificado de Sigma, en experimentos de Western blot (Fig. 13A), usándolo como primer anticuerpo para reconocer una proteína de aproximadamente 94 KDa, que nosotros sabemos que está marcada con el epítotope de Myc conocida como β-glicano. El resultado indicó que para detectar una proteína marcada con Myc nuestro anticuerpo es igual de eficiente que el anticuerpo comercial.

Para probar si nuestro anticuerpo era bueno para inmunoprecipitar a una proteína marcada con Myc, usamos el mismo β-glicano como control positivo, esta vez diluido en la solución amortiguadora de lisis utilizado en experimentos de fosforilación de los receptores; siguiendo la misma metodología que se sigue en los ensayos de fosforilación, poniendo la muestra de β-glicano en ausencia o presencia de anticuerpo. Encontrando que el anticuerpo generado en nuestro laboratorio es capaz de inmunoprecipitar al β-glicano marcado con el epítotope de Myc (Fig. 13B).

A

WB: anti-Myc

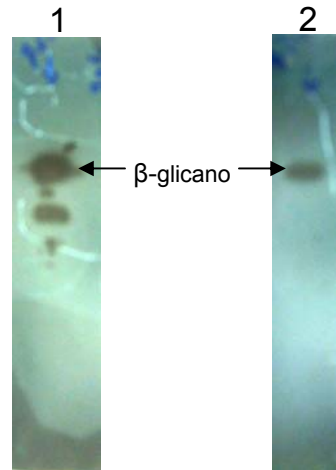


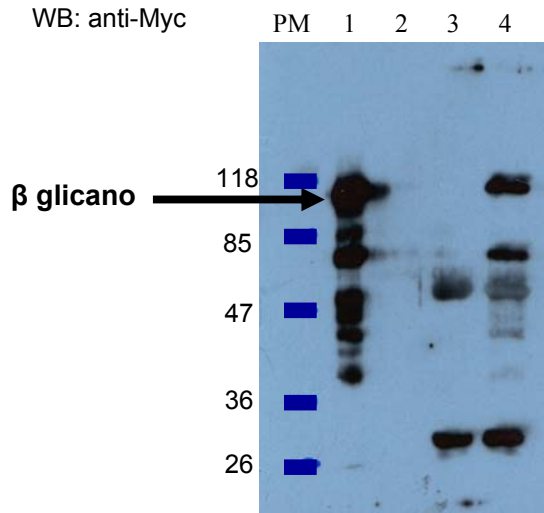
Fig. 13. Inmunoprecipitación de β -glicano. **A)** Replica en Western para detectar al β -glicano marcado con Myc, usando el anticuerpo anti-Myc generado en los ratones inoculados con el hibridoma 9E10 (1, dilución 1:500), y un anticuerpo comercial de Sigma (2, dilución 1:1000).

B) El β -glicano fue disuelto en la solución de lisis para quedar a una concentración de 0.5 μ g/ml; de esta muestra se pusieron 500 μ l en tubos de 1.5 ml en presencia de proteína G-sefarosa (segundo carril), solución amortiguadora de lisis sin β -glicano con Ig anti-Myc y proteína G (carril tres), muestra con β -glicano mas ig anti-Myc y proteína G (cuarto carril), finalmente el inmunoprecipitado se corrió en un gel de poliacrilamida junto con 500 μ g de proteína β -glicano purificada (carril uno), se hizo un inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-Myc comercial de Sigma. Peso molecular (PM).

B

IP: anti-Myc

WB: anti-Myc



β glicano	+	+	-	+
Anti- Mvc	-	-	+	+
Proteína G	-	+	+	+

Aunque nuestro anticuerpo anti-Myc parecía funcionar de forma aceptable, aún teníamos la dificultad de inmunoprecipitar a nuestros receptores, por eso se echó mano de otro anticuerpo, uno anti-poli Histidinas, ya que en el plásmido pcDNA 3.1/ Myc-Hys (+) C, aparte del epítipo de Myc se adicionan 6 histidinas, por lo que es posible que los pudiéramos inmunoprecipitar con anticuerpos contra éstas.

Después de superar varias dificultades técnicas, al fin parecía que podíamos ver algo interesante, aunque nuestros datos resultaban un poco extraños, pues las bandas de fosforilación en los carriles, que consideramos podrían ser nuestros receptores de LPA no se presentaban en las células silvestres, cosa que era de esperarse, pero en las transfectadas con el LPA2-Myc y LPA3-Myc, parecían estar constitutivamente fosforilados. Sin embargo, para estar seguros de que fueran nuestros receptores los que veíamos se hicieron experimentos de replica en Western usando los mismos anticuerpos anti-Myc que habíamos generado; para detectar a los receptores en un Western, utilizando las células silvestres como control, ya que éstos no presentan el receptor marcado con Myc y por lo tanto nos ayudaría a descartar si era nuestro receptor o no el que estábamos viendo fosforilado (Fig. 14).

Lo que se encontró fue que esta banda también estaba presente en las células silvestres, pero curiosamente no se fosforila en presencia de LPA, por lo que no la detectamos en los ensayos de fosforilación. Con esto demostramos que la banda que nosotros inicialmente creímos eran nuestros receptores en realidad no lo eran, sino más bien alguna otra proteína que al parecer se fosforila con el simple hecho de que los receptores LPA₂ y LPA₃ se sobreexpresen en las células C9.

IP: anti-Poli-His

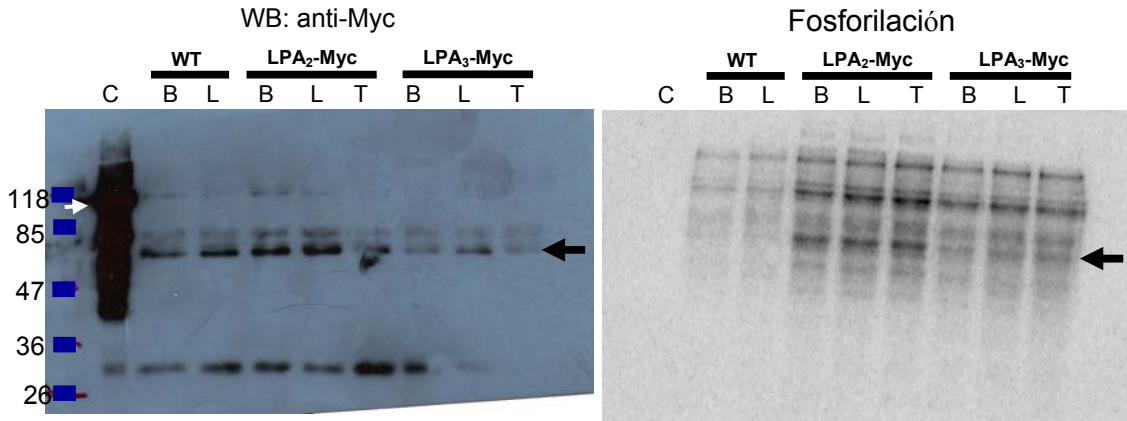


Fig. 14. Inmunoprecipitación con anticuerpos anti-poli-histidinas. Las células C9 WT, LPA₂-Myc y LPA₃-Myc fueron usadas en ensayos de fosforilación estimuladas por: basal (B), 5 minutos con LPA 1 μ M y 15 minutos con TPA 1 μ M (T); e inmunoprecipitadas usando un anticuerpo anti-poli-histidinas de Sigma (Derecha). Después las mismas muestras fueron usadas para un inmunoblot utilizando el anticuerpo anti-Myc generado en el laboratorio (izquierda). Las flechas indican la banda que se pensó podrían ser los receptores para LPA. Se usó como control para el Western blot el β -glicano marcado con Myc (C, flecha blanca).

VII. Discusión y conclusiones

El estudio de los mecanismos de señalización del ácido lisofosfatídico ha cobrado gran interés recientemente debido al gran número de procesos biológicos en que este lípido aparentemente simple se encuentra implicado. El descubrimiento de siete receptores que son los encargados de detectar y transmitir la señal del LPA al interior celular, sin duda abre un panorama muy extenso para explorar los distintos caminos de señalización que sigue el LPA. Además surge la necesidad de conocer los distintos elementos que protagonizan esas vías de señalización, pero también los que las regulan, y es este último punto el que toma especial interés para nosotros.

El receptor LPA₁ se desensibiliza por fosforilación y posteriormente se internaliza, como ya ha sido demostrado por trabajo previo en el laboratorio; el estudio de la desensibilización del receptor LPA₁ dictó la pauta a seguir para el estudio de la desensibilización de los receptores LPA₂ y LPA₃. Sin embargo, la fusión de los receptores con la proteína verde fluorescente resultó en un receptor que no llega a la membrana plasmática, probablemente por un mal plegamiento.

Las células CFSC-2G y C9 transfectadas con los receptores no presentaron el incremento en la liberación del Ca²⁺ intracelular (datos no mostrados), como lo reportado para el LPA₁-GFP en las células C9. Las células C9 LPA₂-GFP y C9 LPA₃-GFP movilizaron calcio de la misma manera que lo hacen las células C9 silvestres; la explicación a esto la encontramos gracias a las imágenes obtenidas con el microscopio confocal que nos permitió ver dónde se encuentran localizados los receptores de LPA unidos a la GFP. En ambos casos sorpresivamente a los receptores los encontramos dentro de la célula en vesículas alrededor del núcleo (Fig. 8), y no en la membrana celular como lo esperábamos. Este fenómeno resultó curioso y decepcionante a la vez, pues truncó nuestro trabajo por algún momento. Posiblemente lo sucedido tenga su explicación en las modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas para alcanzar su conformación óptima, la cual les permite realizar sus funciones de manera adecuada. En la célula existe algo conocido como el sistema de control de calidad que determina si una proteína está bien plegada o presenta defectos en su

plegamiento, lo cual impedirá que cumpla con su función de forma adecuada. El reconocimiento de un mal plegamiento se basa en criterios químicos estructurales, como por ejemplo, la presencia de una superficie hidrofóbica expuesta, que será un determinante para considerar un mal plegamiento de una proteína. El sistema celular de control de calidad reconoce a una proteína mal plegada, y la marca con ubiquitina para ser llevada al proteasoma, en donde será degradada. Las proteínas de membrana como los GPCRs y las proteínas extracelulares son sintetizadas en el retículo endoplasmático; allí la maquinaria encargada del control de calidad decidirá si existe un mal plegamiento y si será enviada al proteasoma. Algunos factores causantes de plegamientos anómalos pueden ser mutaciones, exceso de proteína, cambios de temperatura y algunas señales celulares (Conn y Janovick, 2006).

Un ejemplo de lo estricto que puede ser en sistema de control de calidad es el del receptor para la hormona liberadora de gonadotropina (un GPCR). Una mutación puntual en el aminoácido 90 (un ácido glutámico cambiado por una lisina) que se encuentra en la segunda región transmembranal es suficiente para que el receptor no se exprese en la membrana celular (Conn y Janovick, 2006). Por eso no es raro pensar que probablemente la proteína verde fluorescente le esté causando problemas de plegamiento a nuestros receptores de LPA.

Por otro lado, las construcciones de los receptores LPA₂ y LPA₃ con el epítipo de Myc afortunadamente no presentaron este problema. La transfección de las células C9 con los receptores que tienen fusionado el epítipo de Myc en el extremo carboxilo terminal produjo un aumento en la liberación de calcio intracelular en comparación con las células silvestres en respuesta a un estímulo de LPA (Fig. 10), de la misma forma que las células transfectadas con el LPA₁-GFP (Fig. 6A).

La curva dosis-respuesta a LPA en células C9 transfectadas con cada uno de los receptores, mostró que a partir de la concentración de 1 μ M se presenta la máxima respuesta de movilización de Ca²⁺ intracelular, de la misma forma que lo antes reportado para el LPA₁. Por tal motivo, para los experimentos posteriores se decidió utilizar esta concentración de

LPA para obtener la máxima respuesta y así ver de forma más clara el efecto que hay sobre los receptores cuando son desensibilizados.

Los receptores LPA₂-Myc y LPA₃-Myc se desensibilizan totalmente de forma homóloga, como lo muestran nuestros resultados (Fig. 11A y 11B). La señalización al interior de la células es realmente rápida, pues en menos de 5 segundos ya podemos ver el pico con la máxima liberación de Ca²⁺ intracelular inducida por el LPA, y en aproximadamente cuarenta segundos la [Ca²⁺]_i disminuye y se estabiliza. Lo anterior evidencia que la regulación intracelular de la señalización del LPA es un evento rápido, la explosión en la generación de segundos mensajeros como el Ca²⁺ detonada por la unión del LPA a sus receptores es rápidamente apagada, y posterior a esa explosión, el LPA ya no es una señal capaz de ser reconocida por la célula; un segundo estímulo no es detectado cien segundos después de la estimulación con LPA en las células C9.

Para conocer si los receptores de nuestro modelo se desensibilizan de forma heteróloga, se utilizó TPA que es capaz de activar directamente a la PKC, cinasa que se ha visto implicada en la desensibilización heteróloga de varios GPCRs, como los receptores adrenérgicos (García-Sainz *et al.*, 2008). La incubación de las células C9 LPA₂-Myc y C9 LPA₃-Myc por 5 minutos con TPA produjo una inhibición de la liberación de Ca²⁺ como respuesta de las células al LPA. Aunque ésta no fue total, si si fue muy acentuada, lo que sugiere que la PKC es fundamental en la desensibilización de los receptores de LPA, por lo menos para los tipos 1, 2 y 3, pues en un trabajo previo en el laboratorio se demostró que la PKC también se encarga de desensibilizar al LPA₁ (Avendaño-Vázquez, 2005).

Otros datos obtenidos en el laboratorio han revelado que los inhibidores de la PKC (staurosporina, y bisindolilmaleimida) son capaces de bloquear la activación de PKC por TPA, pues las células tratadas primero con los inhibidores de PKC y luego incubadas con TPA aumentan de manera normal la [Ca²⁺]_i en respuesta a un estímulo de 1 µM de LPA (Figs. 12B y 12C). Otra cinasa, la de fosfoinosítidos conocida como PI3K es una cinasa que tiene un papel clave junto con PKC en la regulación de los receptores adrenérgicos (García-Sainz *et al.*, 2008). El uso de inhibidores de PI3K como wortmanina y LY294002 no alteró

la desensibilización provocada por el TPA en las C9 LPA₂-Myc y C9 LPA₃-Myc, lo que nos sugiere que en la desensibilización heteróloga de los receptores LPA₂ y LPA₃ la PKC es la única que está actuando.

Lo siguiente fue establecer si la desensibilización de los receptores 2 y 3 del LPA se debía a la fosforilación de los mismos. Como se ha mencionado, se sabe poco acerca de los sitios de fosforilación de estos receptores, por tal razón se realizó un estudio colateral de análisis informático de los sitios probables de fosforilación utilizando programas como el NetPhosK 1.0 y GPS 2.1. Los resultados sugirieron diversos sitios probables de ser fosforilados por cinasas activadas por segundos mensajeros y por GRKs en la tercera asa intracelular y el extremo carboxilo terminal de ambos receptores, apoyando nuestra hipótesis de que los receptores para LPA son homóloga y heterológamente regulados por fosforilación.

Para poder evidenciar este fenómeno, en el laboratorio se generaron anticuerpos monoclonales anti-Myc que obtuvimos de ratones inoculados con el hibridoma 9E10. El anticuerpo se recuperó del líquido de ascitis producido por los ratones. Desafortunadamente los experimentos de fosforilación en las células C9 LPA₂-Myc y C9 LPA₃-Myc no nos permitieron ver la fosforilación de los receptores. Al principio, se pensó que se debía a errores en la ejecución de la técnica de fosforilación, por lo que se hicieron ensayos de fosforilación con las células C9 LPA₁-GFP, siguiendo la misma metodología (Fig. 6B). Los resultados indicaron que la metodología estaba siendo seguida correctamente; por lo que se hicieron varias modificaciones al protocolo de la técnica, tratando de resolver el problema, lo cual fue infructuoso.

La posibilidad que brinda el plásmido pcDNA 3.1/ Myc-Hys (+) C de poder usar otro anticuerpo capaz de reconocer un sitio de polihistidina, que se encuentra al final del epítipo de Myc en nuestros receptores, y que produjo la aparición de una banda fosforilada, que fue interpretada como la correspondiente a los receptores de LPA (Fig. 14, derecha). Sin embargo no resultó ser el caso, dada la aparición de esta banda en las células silvestres en experimentos de Western dirigidos contra el epítipo de Myc (Fig. 14, izquierda).

Curiosamente, como ya se comentó en los resultados, esta banda aparece constitutivamente fosforilada en las células C9 transfectadas con los receptores LPA 2 y 3, mientras que permanece sin fosforilar en las células silvestres, aún activadas con LPA.

Las pruebas posteriores para determinar si el problema era el anticuerpo utilizado, revelaron un desempeño aceptable del anticuerpo anti-Myc del líquido de ascitis de los ratones, tanto para experimentos de Western como para inmunoprecipitación de proteínas marcadas con el epítipo de Myc (Fig. 13).

Una posible explicación al hecho de no poder inmunoprecipitar a los receptores y poder ver su fosforilación podría ser por presentarse una muy baja cantidad de receptores en las membranas celulares de las células C9, pero que a pesar de su baja densidad sean suficientes para que la señal de $[Ca^{2+}]_i$ por LPA sea potenciada al doble. La cuantificación de los receptores en la membrana no es posible debido a que no se cuenta aún con agonistas o antagonistas selectivos para cada uno de los receptores de LPA.

Otra posibilidad es que el epítipo de Myc unido al extremo carboxilo a pesar de ser pequeño (apenas de 10 aminoácidos) sufra de algún tipo de modificación postranscripcional, (proteólisis) o cambiar de conformación, lo que le impida ser reconocido por el anticuerpo para poder ser inmunoprecipitado.

En conclusión, este estudio ha cumplido una parte de los objetivos planteados al comienzo, pero que deja claro que los receptores LPA₂ y LPA₃ son desensibilizados de manera homóloga por la adición de su ligando, y que además estos dos receptores también son desensibilizados por la activación de PKC con TPA de forma heteróloga. Estos hechos confirman parte de nuestra hipótesis, pero sin duda aún queda pendiente la parte más importante, que es saber si es que esta desensibilización es debida a su fosforilación e internalización. A pesar de que los eventos de desensibilización homóloga y heteróloga parecen ser muy conservados en los GPCRs, existen modelos que proponen la inhibición de la señal de los GPCRs no por fosforilación e internalización, sino más bien por la ocupación de sitios importantes en el receptor para la unión y activación de las proteínas G,

por lo que éstas no podrían unirse para transducir la señal (Ferguson, 2008). Es por esto que se hace de gran importancia conocer si los receptores para LPA se fosforilan.

VIII. Perspectivas

El principal reto en estos momentos es el de vencer las dificultades técnicas para conseguir ver la fosforilación de los receptores LPA₂ y LPA₃ en la desensibilización. Para ello se tendrá que trabajar en la generación de nuevas construcciones de los receptores que se puedan expresar en la membrana plasmática, que señalicen de buena manera al interior de la célula y que se puedan inmunoprecipitar. Una vez conseguido lo anterior, lo siguiente será buscar y reconocer dentro de cada uno de los receptores (LPA₂ y LPA₃) los sitios que sean los responsables de la interacción entre las distintos componentes de la maquinaria de desensibilización, para lo que se tendrán que construir receptores que presenten mutaciones en los sitios probables de fosforilación y analizarlos, o deletar parte de la estructura del receptor que pudiera ser importante para la interacción con proteínas reguladoras, como lo han hecho el grupo de Rahdrakrishna y Fukushima con el LPA₁ (Urs *et al.*, 2008; Shano *et al.*, 2008). Algo muy interesante sería explorar lo que sucede con cada uno de los receptores internalizados, ¿se degradan o se reciclan? Aún falta mucho para comprender el mecanismo de modulación de la señalización del LPA en la célula. Este trabajo ha contribuido en apoyar la evidencia básica que señalan la posible vía de regulación de los receptores para LPA.

IX. Bibliografía:

Alexander S.P.H., Mathie, A. y Peters, J.A., "Guide to Receptors and Channels (GRAC)", 2nd edition. Br. J. Pharmacol. 150 (Suppl. 1), S50, 2007.

An S., Bleu T., Zheng Y. y Goetzl E., "Recombinant human G protein-coupled lysophosphatidic acid receptors mediate intracellular calcium mobilization". Mol. Pharmacol. 54: 881-888, 1998.

An S., Bleu T., Hallmark O. y Goetzl E., "Characterization of a novel subtype of human G-protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid". J. Biol. Chem. 14: 7906-7910, 1997.

Anliker B. y Chun J., "Lysophospholipid G protein-coupled receptors", J. Biol. Chem. 279: 20555-20558, 2004.

Aoki J., Inoue A. y Okudaira S., "Two pathways for lysophosphatidic acid production", Biochim. Biophys. Acta. 1781: 513-518, 2008.

Aoki J., "Mechanisms of lysophosphatidic acid production". Semin. Cell. Dev. Biol. 15: 477-489, 2004.

Avendaño-Vazquez S. E., Garcia -Caballero A. y Garcia-Sainz A., "Phosphorylation and desensitization of the lysophosphatidic acid receptor LPA1". Biochem. J. 385: 677-684, 2005.

Bandoh K., Aoki J., Hosono H., Kobayashi S., Kobayashi T., Murakami-Murofushi K., Tsujimoto M., Arai H. y Inoue K., "Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid". J. Biol. Chem. 39: 27776-27785, 1999.

Besinger S. y Tontonoz P., "Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors". Nature. 452: 470-476, 2008.

Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S. *Proteomics*. 4(6): 1633-1649, 2004

Colin Santana C., "Obtención de anticuerpos dirigidos hacia la proteína verde fluorescente GFP". Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. 33 Págs. México, 2005.

Conn P. y Janovick J., "Rescate de proteínas aberrantes". *Investigación y Ciencia*. 46-55, enero, 2006.

Contos J., Fukushima. N., Weiner J., Causal D. y Chun J., "Requirements for the lp_{A1} lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior". *PNAS*. 24: 13384-13389, 2000.

Contos J, Ishii I., y Chun J., "Lysophosphatidic acid receptors". *Mol. Pharmacol*. 58: 1188-1196, 2000.

Contos JJ., Ishii I., Fukushima N., Kingsbury M., Ye X., Kawamura S., Brown J. y Cun J., "Characterization of $lpa(2)$ ($Edg4$) and $lpa(1)/lpa(2)$ ($Edg2/Edg4$) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to $lpa(2)$ ". *Mol. Cell. Biol*. 22(19):6921-6929, 2002.

Chi-Iou L., Chiung-Nie C., Po-Wei L., King-Jen C., Fong-Jou H. y Hsinyu L., "Lysophosphatidic acid regulates inflammation-related genes in human endothelial cells through LPA_1 and LPA_3 ". *Biochem. Biophys. Res. Comm*. 363: 1001-1008, 2007.

Chun J., Goetzi E. J., Hla T., Igarashi Y., Lynch K. R., Moolenaar W., Pyne S. y Tigyi G., "International union of pharmacology. XXXIV. Lysophosphatidic receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev*. 54: 265-269, 2002.

Chun J. y Rivera R., “Biological effects of lysophospholipids”. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 160: 25-46, 2006.

Fang-tsy L. y Yun-Ju L., “Regulation of LPA2 receptor signaling through the carboxyl-terminal tail-mediated protein-protein interactions”. *Biochim. Biophys. Acta.* 1781: 558-562, 2008.

Ferguson S., “Phosphorylation-independent attenuation of GPCR signalling”. *Trends Pharmacol. Sci.* 4: 173-179, 2008.

Fokushima N. y Chun J., “The LPA receptors”. *Prostaglandins.* 64: 21-32, 2001.

García-Sáinz J. A., Romero-Avila M. T., Molina-Muñoz T. y García-Pasquel M., “G protein-coupled receptor-receptor tyrosine kinase receptor crosstalk: regulation of receptor sensitivity and roles of autocrine feedback loops and signal integration”. *Curr. Signal Transduct. Ther.* 3: 174-182, 2008.

Gardell S. Dubin A. y Chun J., “Emerging medicinal roles for lysophospholipid signaling”. *Trends Mol. Med.* 2: 65-75, 2006.

Hamm H. “The many faces of G protein signaling”. *J. Biol. Chem.* 2: 669-672, 1998.

Hama K., Aoki J., Inoue A., Endo T., Amano T., Motoki R., Kanai M., Ye X., Chun J., Matsuki N., Suzuki H., Shibasaki M. y Arai H., “Embryo spacing and implantation timing are differentially regulated by LPA3-mediated lysophosphatidic acid signaling in mice”. *Biol. Reprod.* 77: 954-959, 2007.

Hama K., Bandoh K., Kakehi Y., Aoki J. y Arai H., “Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids: possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors”. *FEBS Letters.* 523: 187-192, 2002.

Hecht J., Weiner J., Post S. y 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.* 4: 1071-1083, 1996.

Ishii I., Contos J., Fukushima N. y Chun J., "Functional comparisons of lysophosphatidic acid receptors, LP_{A1}/VZG-1/EDG-2, LP_{A2}/EDG-4, and LP_{A3}/EDG-7 in neuronal cell lines using a retrovirus expression system". *Mol. Pharmacol.* 58: 895-902, 2000

IUPHAR. The International Union of Basic and Clinical Pharmacology.
<http://www.iuphar.org>

Jiménez L. F., y Merchant H. "Biología celular y molecular". PEARSON Educación. México, 2003.

Kotarsky K., Boketoft A., Bristulf J., Nilsson N., Norberg A., Hansson S., Owman C., Sillard R., Leeb-Lundberg L. y Olde B. "Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318(2): 619-28, 2006.

Kobilka B. "G protein coupled receptor structure and activation". *Biochim. Biophys. Acta.* 1768: 794-807, 2007.

Li H., Wang D., Zhang H., Kirmani K., Zhao Z., Steinmetz R y Xu Y. "Lysophosphatidic acid stimulates cell migration, invasion, and colony formation as well as tumorigenesis/metastasis of mouse ovarian cancer in immunocompetent mice". *Mol Cancer Ther.* 8(6):1692-701, 2009.

Lodish H., Berk A., Zipursky S., Matsudaira P., Baltimore D. y Darnell J. "Biología celular y molecular". Editorial Médica Panamericana. Mexico, 2003.

Marchese A., Paing M., Temple B. y Trejo J. "G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48: 601-629, 2008.

Marinissen M. J. y Gutkind J. S., "G-protein-coupled receptors and signaling networks : emerging paradigms ". Trends Pharmacol. Sci. 22: 368-376, 2001.

Milligan G. y Kostenis E., "Heterotrimeric G-proteins; a short history". Br. J. Pharmacol. 147: S46-S55, 2006.

Mills G. y Moolenaar W. H., "The emerging role of lysophosphatidic Acid in cancer". Nat. Rev. Cancer. 3: 582-591, 2003.

Moolenaar W. H., "LPA: a novel lipid mediator with diverse biological actions". Trends Cell. Biol. 4: 213-219, 1994.

Moolenaar W. H., Van Meeteren L. A. y Giepmans B. N. G. "The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling". BioEssays. 26: 870-881, 2004.

Noguchi K, Ishii S. y 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. 278(28): 25600-25606, 2003.

Pasternack S., Kügelgen I., Aboud K., Lee Y., Rüschenhoff F., Voss K., Hillmer A., Molderings G., Franz T., Ramirez A., Nürnberg P., Nöthen M. y Betz R., "G- protein – coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth". Nat. Gen. 3: 329-334, 2008.

Pierce K. L. y Lefkowitz R. J., "Classical and new roles of β -arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors", Nat. Rev. Neurosci. 2: 727-733, 2001.

Pyne S., Kong K., y Darroch P., "Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate biology: the role of lipid phosphate phosphatases". Semin. Cell. Dev. Biol. 15: 491-501, 2004.

Ribera R. y Chun J., "biological effects of lysophospholipids". *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 160: 25-46, 2006.

Shano S., Hatanaka K., Ninose S., Moriyama R., Tsujiuchi T. y Fukushima R., "A lysophosphatidic acid receptor lacking the PDZ-binding domain is constitutively active and stimulates cell proliferation". *Biochim. Biophys. Acta.* 1783: 748-759, 2008.

Sun H, Ren J, Zhu Q, Kong FZ, Wu L, Pan B. "Effects of lysophosphatidic acid on human colon cancer cells and its mechanisms of action". *World J. Gastroenterol.* 15(36):4547-55, 2009.

Tabata K., Baba K., Shiraishi A., Ito M. y Fujita N. "The orphan GPCR GPR87 was orphanized and show to be a lysophosphatidic acid receptor". *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 363: 861-866, 2007.

Taghavi P., Verhoeven E., Jacobs J., Lambooi J., Stortelers C., Tanger E., Moolenaar W. y van Lohuizen M., "In vitro genetic screen identifies a cooperative role for LPA signaling and c-Myc in cell transformation". *Oncogene.* 294: 1-11, 2008.

Tigyi G. y Parrill A., "Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action". *Prog. Lipid. Res.* 42: 498-526, 2003.

Urs N. M., Kowalczyk A. P. y Radhakrishna H. "Different mechanisms regulate lysophosphatidic acid (LPA)-dependent versus phorbol ester-dependent internalization of the LPA₁ receptor". *J. Biol. Chem.* 9: 5249-5257, 2008.

Vazquez-Prado J., Casas-Gonzalez P. y Garcia-Sáinz J. A., "G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions". *Cell. Signal.* 15: 549-557, 2003.

Weiner J. A. y Chun J., "Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 5233-5238, 1999.

Xue Y., Ren J., Gao X., Jin C., Wen L., y Yao X., “GPS 2.0, a Tool to Predict Kinase-specific Phosphorylation Sites in Hierarchy”. *Mol. Cell. Proteomics*. 7: 1598-1608, 2008.

Yanagida K., Masago K., Nakanishi H., Kihara Y., Hamano F., Tajima Y., Taguchi R., Shimizu T. y Ishii S., “Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6”. *J. Biol. Chem.* 284(26): 17731-417741, 2009.

Ye X., Hama K., Contos J., Anliker B., Inoue A., Skinner M., Suzuki H., Amano T., Kennedy G., Arai H. y Chun J., “LPA₃-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing”. *Nature*. 435: 104-108, 2005.

Zheng Y., Kong Y. y Goetzl E., “Lysophosphatidic acid receptor-selective effects on jurkat T cell migration through a matrigel model basement membrane”. *J. Immunol.* 166: 2317-2322, 2001.