



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EFFECTOS DE LA MUTACIÓN EN EL GEN
LPP3 EN LA SEÑALIZACIÓN DE
FOSFOLÍPIDOS BIOACTIVOS

T E S I S

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

P R E S E N T A :

BIÓL. ALEJANDRO RUIZ MARTÍNEZ

Tutor: DRA. DIANA M. ESCALANTE ALCALDE



MÉXICO, D. F.

NOVIEMBRE 2006



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.

EFFECTOS DE LA MUTACIÓN EN EL GEN LPP3 EN LA SEÑALIZACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS BIOACTIVOS

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Diana Escalante Alcalde en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

Dra. Diana María Escalante Alcalde	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Jesús Adolfo García Sáinz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos	Facultad de Química, UNAM

El proyecto fue apoyado por CONACYT (39995) y DGAPA (IN215605). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Jesús Adolfo García Sáinz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. Susana Castro Obregón	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dra. Marina Macías Silva	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Maria Elena Ibarra Rubio	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Química, UNAM

ÍNDICE.

1. Introducción

1.1. Generalidades de las fosfatasa de lípidos fosfatados.....	6
1.2. LPA y S1P.....	8
1.3. Vasculogénesis y angiogénesis.....	11
1.4. El papel de los receptores para LPA y S1P en el desarrollo embrionario.....	13
1.5. Proliferación y migración: eventos clave para la vasculogénesis.....	14

2. Antecedentes

2.1. Las LPPs en el desarrollo embrionario.....	18
---	----

3. Hipótesis.....20

4. Objetivos.....20

5. Material y Métodos

5.1. RT-PCR.....	21
5.2. Detección de proteínas mediante anticuerpos específicos (<i>Western Blot</i>).....	23
5.3. Preparación de reactivos para el análisis de proteínas.....	24
5.4. Protocolo de cuantificación de proteína.....	25
5.5. Procedimientos generales.....	26

6. Resultados

6.1. Expresión de receptores LPA y S1P en MEFs.....	27
6.2. Expresión de receptores para LPA y S1P en sacos vitelinos.....	28
6.3. Expresión de genes involucrados en los morfogénesis vascular.....	31
6.4. Estado de activación de la vía de MAPK.....	33
6.5. Respuestas en proteínas asociadas a la dinámica del citoesqueleto.....	34

7. Discusión

7.1. Expresión de receptores LPA y S1P en Fibroblastos Embrionarios Murinos...36
7.2. Expresión de receptores para LPA y S1P en sacos vitelinos.....37
7.3. Expresión de genes involucrados en la morfogénesis vascular.....39
7.4. Estado de activación de la vía de MAPK, FAK y Paxilina.....41

8. Conclusiones.....42

9. Perspectivas.....43

10. Referencias.....44

Resumen

La mutación nula de la Fosfatasa de Lípidos Fosfatados tipo 3 (LPP3) es letal en etapas tempranas del desarrollo embrionario en ratón. Uno de los fenotipos más notorios son deficiencias en la formación de vasos sanguíneos en el saco vitelino. En este trabajo exploramos posibles alteraciones en la expresión de genes y en la señalización de LPA y S1P, sustratos de la LPP3. Se encontró que el receptor LPA₃ tiene deficiencias en su expresión en fibroblastos embrionarios de ratón y sacos vitelinos mutantes en LPP3. Así mismo en estos últimos se encontró una sobreexpresión de los genes involucrados en la morfogénesis vascular Ang1, Ang2, Flt1, Tie1, Tie2 VE-Cadherina y VEGF. Es posible que la combinación de estas alteraciones a nivel de señalización, regulación transcripcional y en algunos eventos tempranos del desarrollo embrionario provoquen el fenotipo vascular deficiente de los embriones mutantes en LPP3. Se hicieron también ensayos para analizar la señalización de LPA y S1P hacia la vía de MAPK y otras proteínas reguladoras de la actividad del citoesqueleto, sin embargo las condiciones metodológicas no permitieron la obtención de datos concluyentes para determinar la participación de LPP3 en la regulación de estas vías.

Abreviaturas usadas en este trabajo (inglés y español).

AC: Adenylate Cyclase/Adenilato ciclasa
bFGF: Basic Fibroblastic Growth Factor/Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico
C1P: Ceramide-1-Phosphate/Ceramida-1-fosfato
COX-2: Cyclooxygenase type 2/Ciclooxigenasa tipo 2
DAG: Diacyl Glycerol/Diacil Glicerol
d. g. : días de gestación
DMEM: Dubelcco's Modified Eagle Medium/Medio *Eagle* Modificado de Dubelcco
EDG: Endothelial Differentiation Gene/Gen de diferenciación endotelial
EGF: Epidermal Growth Factor/Factor Epidérmico de Crecimiento
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase/Cinasa regulada por señal extracelular
FAK: Focal Adhesion Kinase/Cinasa de Adhesión Focal
FGF2: Fibroblast Growth Factor type 2/Factor de Crecimiento de Fibroblastos tipo 2
GPCR: G-protein Coupled Receptor/Receptor acoplado a proteínas G
HIF: Hipoxia-Inducible Factor/Factor inducible por hipoxia
HPRT: Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase
HRE: Hipoxia-Responsive Elements/Elementos que responden a hipoxia
LPA: Lysophosphatidic Acid/Ácido Lisofosfatídico
LPP1: Lipid Phosphate Phosphatase type 1/ Fosfatasa de Lípidos Fosfatados tipo 1
LPP2: Lipid Phosphate Phosphatase type 2/ Fosfatasa de Lípidos Fosfatados tipo 2
LPP3: Lipid Phosphate Phosphatase type 3/ Fosfatasa de Lípidos Fosfatados tipo 3
MAG: Monoacyl Glycerol/Monoacil Glicerol
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase/Cinasa Activada por Mitógenos
MEF: Murine Embryonic Fibroblast/Fibroblastos Embrionarios de Ratón
PA: Phosphatidic Acid/Ácido Fosfatídico
PDGF: Platelet Derived Growth Factor/Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PECAM: Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1/Molécula de adhesión de Células endoteliales/plaquetas
PI3K: Phosphoinositide-3 Kinase/Cinasa de Fosfatidil Inositol-3
PKB: Protein kinase B/Proteína Cinasa B
PKC: Protein Kinase C/Proteínas Cinasa C
PLA: Phospholipase A/Fosfolipasa A
PLC: Phospholipase C/Fosfolipasa C
PLD: Phospholipase D/Fosfolipasa D
PTX: *Pertussis* Toxin/Toxina *Pertussis*
RT-PCR: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction/Reacción en Cadena de la Polimerasa por Transcripción Reversa
S1P: Sphingosine-1-Phosphate/Esfingosina-1-fosfato
SBF: Suero bovino fetal
SK: Sphingosine Kinase/ Cinasa de Esfingosina
SPP: Sphingosine-1-Phosphate Phosphatase/Fosfatasa de esfingosina-1-fosfato
TGF- β : Transforming Growth Factor type beta/Factor de Crecimiento transformante tipo beta
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor/Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular

1. INTRODUCCIÓN.

La mutación homociga de la fosfatasa de lípidos fosfatados tipo 3 (LPP3) es letal en etapas tempranas del desarrollo embrionario en ratón. El fenotipo más notorio es una deficiente vasculogénesis (formación de vasos sanguíneos) en tejidos extra-embrionarios como el saco vitelino, así como defectos en los patrones de desarrollo subsecuente (Escalante-Alcalde et al., 2003). En este trabajo se estudiará el efecto de la deficiencia en LPP3 en posibles alteraciones en la regulación de las respuestas involucradas en el fenotipo LPP3^{-/-}.

1.1. Generalidades de las Fosfatasas de Lípidos Fosfatados.

Las fosfatasas de lípidos fosfatados o LPPs son enzimas encargadas de desfosforilar lípidos fosfatados activadores de procesos como la proliferación celular, migración, ciclo celular y apoptosis. Durante los últimos años han sido tema de intenso estudio ya que pueden constituir blancos de regulación para la actividad de sus sustratos y productos en los procesos mencionados.

Se han descrito dos grupos de LPPs en mamíferos: LPPs tipo 1 (antes Phosphatidic Acid Phosphatases o Pap1), que se encuentran en citoplasma, dependen de Mg²⁺ para su actividad catalítica y son sensibles al inhibidor N-etilmaleimida. Las LPPs de tipo 2 (antes Pap2) son proteínas integrales de membrana cuyo peso molecular está cerca de los 35 KDa, son independientes de Mg²⁺ e insensibles a N-etilmaleimida. En esta última familia se han identificado en mamíferos tres subtipos hasta la fecha: LPP1, LPP2 y LPP3 (Sciorra y Morris, 2002).

Estos tres subtipos de LPPs tipo 2 son capaces de desfosforilar lípidos fosfatados bioactivos como el ácido fosfatídico (PA), el ácido lisofosfatídico (LPA), la esfingosina-1-fosfato (S1P) y la ceramida-1-fosfato (C1P) (Brindley y Waggoner, 1998), algunos de los cuales ejercen efectos sobre la proliferación celular, migración, quimiotaxis y modificaciones de la forma celular por rearrreglos del citoesqueleto de actina, entre otros (Mills y Moolenaar, 2003). Las tres LPPs conocidas hasta la fecha son parte de una superfamilia de fosfatasas conservadas filogenéticamente junto con proteínas como las fosfatasas bacterianas, la Glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) de mamíferos, Wunen y Wunen 2 en *Drosophila melanogaster* y Dri42 en *Rattus norvegicus*. Aunque experimentalmente solo se ha demostrado la topología de la LPP3 (Barilá et al., 1996), se asume que el resto también posee 6 dominios transmembranales, con sus extremos amino y carboxilo en la cara intracelular y un sitio consenso de glicosilación en la segunda asa extracelular (fig. 1) (Brindley y Waggoner, 1998). El sitio activo está conformado por tres dominios de fosfatasa ubicados en la segunda y tercera asas

extracelulares que se encuentran conservados en el resto de su superfamilia de fosfatasa. Durante la catálisis de la desfosforilación una histidina en el tercer dominio de fosfatasa actúa como nucleófilo para el grupo fosfato, formando una fosfo-histidina intermediaria. Otra histidina en el segundo dominio de fosfatasa facilita el rompimiento del enlace fosfato y participa en el segundo paso de la reacción en donde la fosfo-histidina se hidroliza, liberando así el sitio activo para una nueva reacción de desfosforilación. Otros residuos en los dominios de fosfatasa como lisina, arginina, serina y glicina actúan formando puentes de hidrógeno con el fosfato y con el oxígeno para estabilizar el estado de transición de la reacción (Sigal *et al.*, 2005).

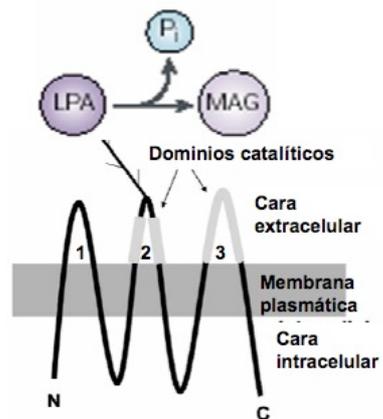


Fig. 1. Topología propuesta para las LPPs de tipo 2 en membrana plasmática. LPA: ácido lisofosfatídico; MAG: monoacil glicerol, Pi: fosfato inorgánico. Modificado de Sciorra y Morris, 2002.

La LPP3, a diferencia de las otras dos LPPs, se localiza en la membrana plasmática y del retículo endoplásmico, con el sitio activo en orientación opuesta al citosol. Originalmente fue descrita como el producto del gen *Dri42* cuya expresión aumentaba durante la diferenciación de células epiteliales de intestino de rata (Barilá *et al.*, 1996). Ahora se sabe que se expresa en casi todos los tejidos humanos (con excepción del bazo y del timo al igual que las otras LPPs) (Sigal *et al.*, 2005) y se diferencia de LPP1 y LPP2 en sus regiones amino y carboxilo principalmente así como por ser regulada por el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), por el Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF) y el Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (bFGF) (Kai *et al.*, 1997; Wary y Humtsoe, 2005). Aunque las LPPs poseen diferencias discretas en sus parámetros enzimáticos, todas son capaces de desfosforilar PA, LPA, S1P y C1P (Brindley y Waggoner, 1998). De éstos sustratos los más estudiados recientemente son el LPA y la S1P debido a que sus efectos están relacionados con la actividad proliferativa y migratoria de las células, involucradas evidentemente en patologías tumorales humanas.

Se han propuesto dos funciones principales para las LPPs. Una es un papel en la regulación del metabolismo de lípidos controlando el balance entre PA, LPA, S1P y C1P y sus productos desfosforilados DAG (Diacilglicerol), MAG (Monoacilglicerol), esfingosina y ceramida, respectivamente. Otra de las funciones atribuidas a las LPPs, en virtud de su localización en la membrana y en su capacidad para funcionar como ecto-enzimas, es la capacidad de regular negativamente la señalización mediada por receptores para LPA y S1P (Sigal *et al.*, 2005). La evidencia experimental que apoya esta idea ha mostrado como la sobreexpresión de LPP1 y LPP2 puede llevar a la disminución de la activación de ERK/MAPK, así como atenuar la vía PLD-Calcio activada por LPA (rev. en Brindley, 2004). En el caso de la LPP3 se ha visto que su sobreexpresión disminuye el crecimiento, sobrevivencia y tumorigénesis de células de cáncer de ovario, correlacionando esto con el incremento en la degradación del LPA extracelular (Tanyi *et al.*, 2003). Aunque la sobreexpresión de LPP1 (Alderton *et al.*, 2001; Leung *et al.*, 1998; Leung *et al.*, 1999; Yue *et al.*, 2004) y la sobreexpresión (Sciorra y Morris, 1999) y mutación nula (Escalante-Alcalde *et al.*, 2003) de LPP3 tienen claros efectos sobre el metabolismo de lípidos en algunos tipos celulares, los mecanismos y relevancia de estas observaciones aún no son del todo conocidos, por lo que la información a nivel celular obtenida en un sistema carente de LPP3 contribuirá de forma importante al conocimiento del papel de esta enzima en un sinnúmero de respuestas celulares.

1.2. LPA y S1P.

El LPA y la S1P son lípidos fosfatados bioactivos producidos por todas las células (especialmente plaquetas) y que se encuentran en el suero sanguíneo a concentraciones del rango micromolar y nanomolar, respectivamente (Moolenaar, 1995; Yatomi *et al.*, 2001). Estructuralmente poseen un esqueleto de glicerol como base con un grupo hidroxilo, un grupo fosfato y un ácido graso de cadena larga que puede o no tener insaturaciones (Anliker y Chun, 2004). El LPA es generado por las fosfolipasas PLA₁ y PLA₂ con la deacilación del ácido fosfatídico o bien mediante la lisofosfolipasa D (lysoPLD) que hidroliza a la lisofosfatidilcolina a LPA, aunque también puede formarse mediante la acilación del glicerol-3-fosfato por la glicerofosfato acil-transferasa, o bien mediante la reducción de acil hidroxil-acetona o por la fosforilación del monoacilglicerol por la monoacil-glicerol cinasa (Pages *et al.*, 2001). De forma similar la S1P tiene un esqueleto esfingoide con un grupo amino, el grupo fosfato y la cadena acil, así como el grupo hidroxilo en posición 2. Su síntesis ocurre a través de la esfingosina cinasa SK1 y SK2 que fosforilan la esfingosina y su desfosforilación ocurre mediante las fosfohidrolasas específicas SPP1 y SPP2 así como por las LPP (fig. 2).

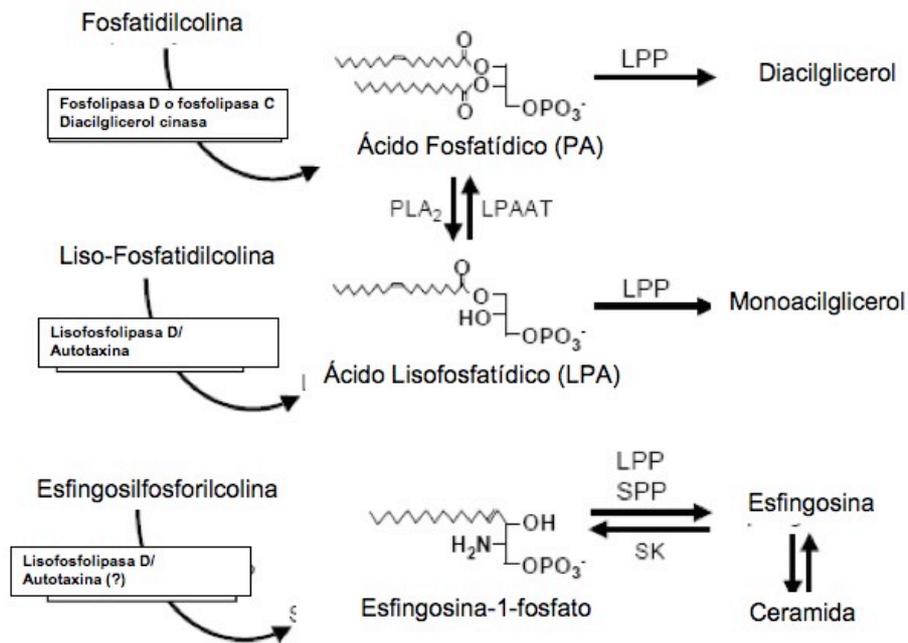


Fig. 2. Vías de síntesis del PA, LPA y S1P y productos de la actividad catalítica de las LPPs. Modificado de Pyne *et al.*, 2004.

LPA y S1P son agonistas de receptores de 7 dominios transmembranales acoplados a proteínas G (GPCRs) denominados en función de su ligando. Hasta la fecha están descritos 4 receptores para LPA: LPA₁, LPA₂, LPA₃ y LPA₄, este último de distinto origen filogenético que los otros de LPA y S1P (Noguchi *et al.* 2003). Para S1P hay descritos 5 receptores: S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1P₄ y S1P₅ (Anliker and Chun, 2004) y, junto con los de LPA (a excepción del LPA₄) conformaban la antes llamada familia de receptores EDG (de *Endothelial Differentiation Gene*). Estos receptores pueden activar varias vías de señalización mediante su acoplamiento a prácticamente todas las proteínas G heterotriméricas. Todos los receptores, a excepción del LPA₄, pueden acoplarse a la proteína G_i mediante la cual pueden regular la actividad de efectores bioquímicos como la adenilato ciclasa (AC) así como activar la vía de la fosfatidil inositol-3 cinasa (PI3K) y la GTPasa Rac y así regular respuestas en citoesqueleto como la morfología y migración celular (Ishii *et al.*, 2000; van Leeuwen *et al.*, 2003a); pueden regular la vía de proliferación Ras/MAPK, activada por LPA₁₋₃ y S1P₁₋₄ pero inhibida por S1P₅; pueden provocar la liberación de calcio mediante la acción de la fosfolipasa C (PLC) que se activa mediante la proteína G_q, lo que lleva a la activación de la proteína cinasa C (PKC), así como regular respuestas celulares como la dinámica del citoesqueleto mediante la GTPasa Rho vía la proteína G_{12/13} mediante LPA₁₋₂ y S1P₁₋₄ (rev. en Moolenaar *et al.*, 2004) (fig. 3).

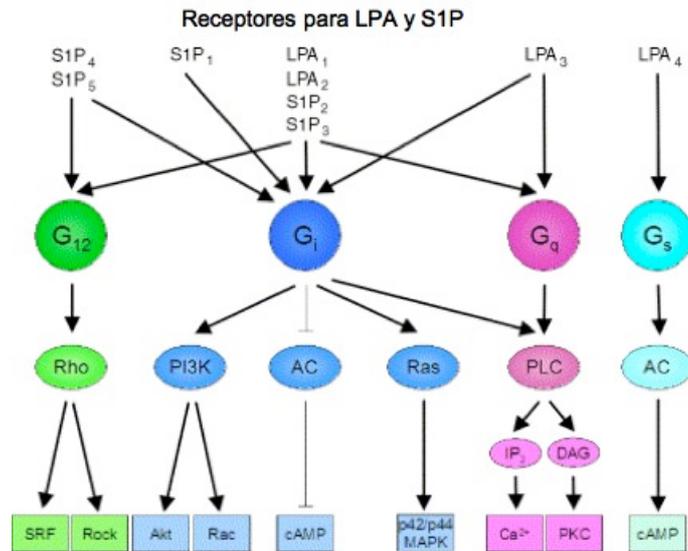


Fig. 3. Esquema general de las vías de señalización activadas por LPA y S1P y sus respectivos receptores. Modificado de Anliker y Chun, 2004.

La activación de PLC, MAPK y Rho vía receptores LPA y S1P inducen la proliferación celular, sobrevivencia y cambios en la morfología celular. La actividad de la AC es regulada diferencialmente: LPA₁, LPA₂, S1P₁ y S1P₅ la inhiben mientras que S1P₂ y S1P₄ la activan mediante un mecanismo independiente de G_s. Para LPA₃ y S1P₃ se ha reportado tanto la activación como inhibición de AC (Fukushima *et al.*, 2001; Kluk y Hla, 2002; Siehler y Manning, 2002). Al recientemente descrito LPA₄ se le ha reportado activación de AC así como movilización de Ca²⁺ (Noguchi *et al.*, 2003). LPA₁ también puede activar a PI3K y por ende a AKT/PKB (Weiner y Chun, 1999), la cual también puede ser activada por LPA₂ y S1P₃ (Contos *et al.*, 2002; Baudhuin *et al.*, 2004). S1P₁ y S1P₃ pueden inducir la migración vía activación de Rac y S1P₂ puede inhibirla mediante el bloqueo de Rac (Takuwa, 2002). Todas estas evidencias demuestran un fino mecanismo de regulación por parte de LPA y S1P para producir sus efectos en la célula.

Como se ha mencionado ya, ambos fosfolípidos están implicados en respuestas celulares críticas para el desarrollo y fisiología normales de un organismo. Los mecanismos que regulan están involucrados en el desarrollo embrionario y determinan la correcta organogénesis y maduración de tejidos. LPA y S1P se han visto implicados en la migración de células endoteliales así como en la maduración vascular durante la angiogénesis, los cuales son procesos esenciales para el desarrollo. Su participación en la formación y regulación de funciones del sistema vascular ha sido estudiada con especial atención durante los últimos años reportando importantes hallazgos como el requerimiento esencial del receptor S1P₁ en la maduración de los vasos sanguíneos durante el desarrollo temprano del ratón (Allende *et al.*, 2003). También puede

participar de forma cooperativa con S1P₂ y S1P₃ en la coordinación del desarrollo vascular en embriones mutantes dobles y triple para estos receptores (Kono *et al.*, 2004).

La participación de estos fosfolípidos en el saco vitelino ha sido poco explorada. Este órgano es el primero en formarse durante el desarrollo y es de suma importancia ya que constituye el primer sitio de formación de tejido hematopoyético durante la embriogénesis. Su origen ocurre a partir de precursores celulares llamados hemangioblastos que, por diferenciación celular, darán lugar tanto a células sanguíneas como a las precursoras vasculares llamadas angioblastos (Ema y Rossant, 2003). Estos últimos se diferenciarán a su vez en células endoteliales y murales (pericitos y células de músculo liso), las cuales mediante los fenómenos de migración y polarización formarán los vasos sanguíneos *de novo* o vasculogénesis y vasos derivados de aquellos pre-formados o angiogénesis.

1.3. Vasculogénesis y angiogénesis.

La vasculogénesis es el primer proceso morfogénico durante el desarrollo vascular, el cual ocurre poco después de la gastrulación en el embrión de mamífero. En el ratón, alrededor de los 7.5 días de gestación (7.5 dg), los angioblastos (células progenitoras de endoteliales y murales) se derivan del mesodermo paraxial y de la placa lateral. Las células generadas en esta etapa embrionaria contribuirán principalmente a la vasculatura del saco vitelino, para lo cual comienzan a organizarse en cúmulos denominados islas sanguíneas para posteriormente formar una red vascular primordial llamada plexo vascular primario, el cual se puede identificar alrededor de los 8.0 dg tanto en el saco vitelino como en la región cefálica del embrión. Posteriormente comienza la formación de mas vasos sanguíneos a partir de los que ya están formados, en un proceso denominado angiogénesis. Se considera que la morfogénesis vascular termina hasta que los vasos formados sufren además un proceso de remodelación y maduración (Sato y Loughna, 2002). La estabilización y maduración de los vasos sanguíneos ya formados a través de la interacción de las células endoteliales con las murales determinará la red vascular definitiva en el embrión en desarrollo (fig. 4).

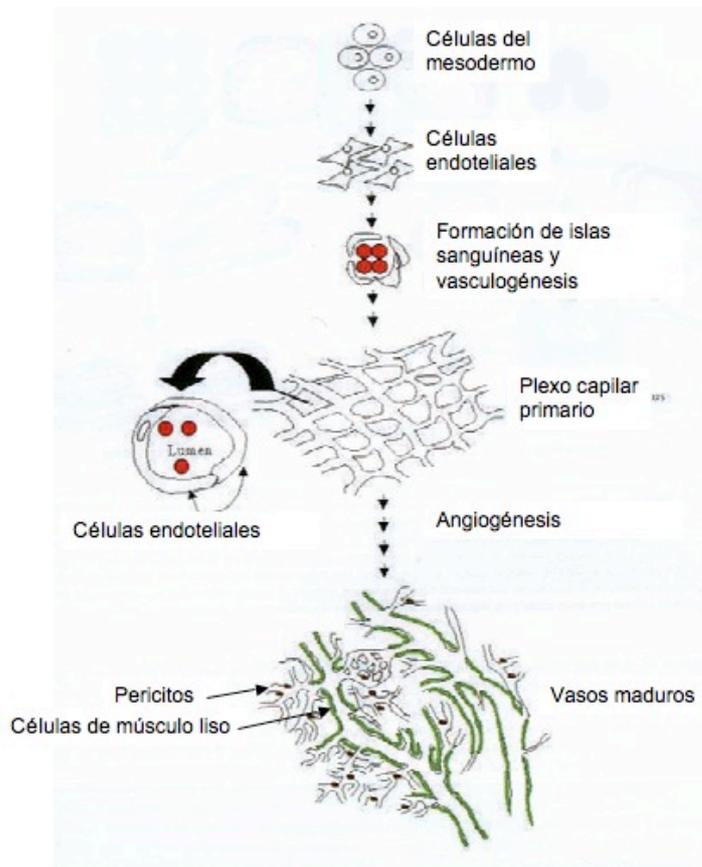


Fig. 4. Esquema del proceso de vasculogénesis, angiogénesis y maduración de los vasos sanguíneos. Tomado de Sato and Loughna, 2002.

En la morfogénesis vascular se ha estudiado la participación de numerosas proteínas regulatorias. Por ejemplo se sabe que el FGF-2 (Fibroblast Growth Factor type 2) participa para dirigir la formación de hemangioblastos desde el mesodermo. Posteriormente el VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor), secretado por células del mesénquima cerca de las isletas sanguíneas, permite la diferenciación de los angioblastos hacia células endoteliales (Rossant and Howard, 2002) y se ha demostrado que tanto el VEGF como sus receptores Flt1 y Flk1 son esenciales para que ocurra la vasculogénesis y que su deficiencia provoca letalidad durante el desarrollo en el ratón (Fong *et al.*, 1995; Shalaby *et al.*, 1995; Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996, Allende and Proia, 2002). Otras proteínas, como Angiopietina-1 (Ang1) y su receptor Tie2, también promueven la vasculogénesis regulando las interacciones entre las células endoteliales y las murales. La deficiencia en su actividad provoca malformaciones en los vasos sanguíneos y en el proceso de recubrimiento por parte de las células murales (Davis *et al.*, 1996; Suri *et al.*, 1996; Vikkula *et al.*, 1996).

Para que ocurra el proceso de angiogénesis se requieren cambios en la dinámica de adhesión entre las células endoteliales así como en el arreglo de la matriz extracelular.

En este proceso el VEGF tiene una participación importante dado que las células endoteliales responden a este factor de crecimiento proliferando y formando nuevas ramificaciones en el endotelio que darán lugar a nuevos vasos sanguíneos. Al mismo tiempo los cambios en la adhesión de las células endoteliales permite la fusión de nuevos capilares a vasos ya formados, para organizar la red vascular típica de los sistemas arterio-venosos donde también participa el VEGF (Carmeliet *et al.*, 1999). Eventualmente los vasos serán estabilizados por el recubrimiento por parte de las células murales (pericitos y células de músculo liso). En este proceso el TGF- β es un gen esencial durante el desarrollo (Dickson *et al.*, 1995) que induce el reforzamiento de la matriz extracelular, mientras que el PDGF (Platelet Derived Growth Factor) induce el reclutamiento de los pericitos que contribuirán a la flexibilidad mecánica de la pared del capilar (Lindahl *et al.*, 1997). Se sabe que las células murales también reciben señales de las células endoteliales, las cuales son estimuladas a recubrir los capilares para su maduración. En este proceso la participación de S1P es esencial, ya que se ha reportado que la mutación nula de su receptor S1P₁ es letal durante el desarrollo del ratón (Allende *et al.*, 2003), ocasionando defectos en el recubrimiento de los endotelios por las células murales.

1. 4. El papel *in vivo* de los receptores para LPA y S1P.

Este ha sido estudiado mediante la mutagénesis dirigida de los receptores LPA₁ y LPA₂ y S1P₁, S1P₂ y S1P₃ (Contos *et al.*, 2000, 2002; MacLennan *et al.*, 2001; Kono *et al.*, 2004; Kupperman *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000; Ishii *et al.*, 2001; 2002).

Los ratones mutantes LPA₁^{-/-} revelan una mortalidad del 50% durante las primeras 3 semanas de vida, al parecer por deficiencias conductuales de alimentación y los que llegan a sobrevivir presentan malformaciones craneofaciales (Contos *et al.*, 2000); en contraste, los ratones LPA₂^{-/-} no muestran anomalías fenotípicas (Contos *et al.*, 2002), al igual que los ratones mutantes S1P₂^{-/-} (Ishii *et al.*, 2002; MacLennan *et al.*, 2001) y S1P₃^{-/-} (Ishii *et al.*, 2001). Los embriones mutantes LPA₃^{-/-} tampoco presentan fenotipo distinguible aunque las hembras gestantes mutantes LPA₃^{-/-} generan camadas 50% mas pequeñas, producto de deficiencias en el proceso de implantación de los embriones así como en su ubicación en el útero (Ye *et al.*, 2005). Sin embargo, de todas las mutaciones individuales de los receptores para LPA y S1P, solamente aquella para el receptor S1P₁ tiene un fenotipo letal embrionario entre los 12.5 y 14.5 dg. En este caso es de destacar que los embriones presentan defectos en el proceso de maduración de los vasos sanguíneos, no así en la vasculogénesis, lo que se manifiesta con graves hemorragias internas en el embrión (Liu *et al.*, 2000). Estudios *in vitro* sobre esta mutación muestran defectos en la activación de la GTPasa Rac, lo

que se traduce como alteraciones en la migración de las células murales (pericitos y de músculo liso) de tal forma que no pueden recubrir correctamente las paredes de los vasos sanguíneos (rev. en Saba, 2004).

Los receptores S1P₁, S1P₂ y S1P₃ funcionan de manera coordinada para promover la estabilidad de los vasos sanguíneos durante la angiogénesis, ya que al analizar la mutaciones dobles (S1P_{1/2}^{-/-}, S1P_{1/3}^{-/-} y S1P_{2/3}^{-/-}) y triple (S1P₁^{-/-}-S1P₂^{-/-}-S1P₃^{-/-}) en embriones de ratón, se encontró mayor severidad en el fenotipo del último caso (Kono *et al.*, 2004). Todas las mutaciones se han correlacionado con otros defectos ya sea durante el desarrollo, en la supervivencia o bien a nivel celular con alteraciones en respuestas como rearrreglos del citoesqueleto, formación de fibras de estrés o la movilización de calcio intracelular.

1.5. Proliferación y Migración: eventos clave para la vasculogénesis.

Como ya se ha mencionado, la formación de los vasos sanguíneos requiere de la coordinación precisa entre los procesos de migración y proliferación tanto de células endoteliales como de células murales. LPA y S1P son conocidos por estimular estas respuestas celulares, donde las LPPs son capaces de ejercer un efecto atenuador en la señalización de ambos fosfolípidos.

Estimulan la proliferación activando la vía de ERK/MAPK mediante sus receptores específicos localizados en la membrana celular. Pueden activarla mediante la proteína Gi, cuyo dímero βγ puede activar a la PI3K y esta a su vez activar la vía de Ras-Raf-MAPK. Así mismo, se tienen evidencias de mecanismos de transactivación de receptores para factores de crecimiento, como el receptor para EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico), a partir de la estimulación de receptores para LPA y con la participación de metaloproteasas en la membrana celular, que por su actividad catalítica liberan un ligando del receptor para EGF llamado HB-EGF (Gschwind *et al.*, 2002; Casas-González *et al.*, 2003; Santiskulvong y Rozengurt, 2003; Liu y Armant, 2004; Miyamoto *et al.*, 2004; van Leeuwen *et al.*, 2003b; Zhao *et al.*, 2006). Así mismo puede ocurrir la transactivación por receptores de S1P mediante proteínas de tipo Gi en algunos tipos celulares (Kim *et al.*, 2000; Tanimoto *et al.*, 2004).

Tanto ERK/MAPK como p38/MAPK son importantes efectores celulares a nivel de proliferación y migración y pueden responder a la activación por LPA y S1P (Baudhuin *et al.*, 2004; Spiegel y Milstien, 2003; Huang *et al.*, 2004; Radeff-Huang *et al.*, 2004). Se ha demostrado que las LPPs son capaces de regular la señalización de estos fosfolípidos a nivel de proliferación celular; LPP1, LPP2 (Alderton *et al.*, 2001) y LPP3 (Long *et al.*, 2005) atenúan la activación de ERK1/2 MAPK en respuesta a LPA y S1P. De igual forma, evidencia fisiológica señala que la sobreexpresión de LPP3 en células

de cáncer de ovario disminuye la formación de colonias tumorales, incrementando la apoptosis y reduciendo la formación de tumores *in vivo* e *in vitro* (Tanyi *et al.*, 2003).

ERK tiene un papel esencial en la formación de vasos sanguíneos ya que es capaz de controlar la expresión del VEGF, el cual como ya se ha mencionado, estimula la migración y proliferación endotelial ejerciendo una actividad angiogénica *in vivo* (Zachary, 2003). ERK ha sido involucrada además en la remodelación del citoesqueleto y en el ensamble de los focos de adhesión requeridos para la movilidad celular (Fincham *et al.*, 2000; Klemke *et al.*, 1997). Se sabe además que la vía Ras-Raf-MEK-ERK regula la activación de integrinas (Chou *et al.*, 2003), aunque los mecanismos aún permanecen desconocidos. Debido a que se requiere de la dinámica de activación de las integrinas para la migración celular, es posible que ERK también desempeñe un papel importante en este proceso (Huang *et al.*, 2004).

La migración es activada tanto por LPA como por S1P. El LPA es capaz de regular la permeabilidad vascular y la migración endotelial mediante la formación de fibras de estrés y focos de adhesión mediante la proteína $G_{12/13}$ la cual, a su vez, activa al menos a tres diferentes RhoGEFs (Rho-Guanine nucleotide Exchange Factors) que inducen el estado activo de la GTPasa RhoA (unido a GTP o RhoA-GTP) y esto lleva a la activación de la cinasa de Rho (Rho-K) la cual, a su vez, induce eventos contráctiles como la retracción de neuritas, cambios en el contorno celular (*cell rounding*) y apertura de uniones estrechas (*tight junctions*) (van Leeuwen *et al.*, 2003b). LPA también puede inducir la activación de Rac mediante PI3K a través del dímero $G_{\beta\gamma}$ de la proteína G_i vía el receptor LPA_1 , llevando a la formación de *lamelipodia* y a la migración celular en un proceso mediado por PI3K y Tiam1 (van Leeuwen *et al.*, 2003a).

De manera similar S1P también puede inducir la proliferación endotelial, migración, quimiotaxis, reorganización de citoesqueleto, ensamble de uniones adherentes y formación de estructuras vasculares (tubo/lumen) en células endoteliales (Argraves *et al.*, 2004). S1P puede activar a Rac mediante su receptor $S1P_1$ a través de una vía aún no identificada para inducir la formación de actina cortical, así como la activación de Rho mediante G_i para llevar a la formación de fibras de estrés y el ensamble de uniones adherentes (Lee *et al.*, 1999). Mediante $S1P_3$ puede activar a Rho vía G_{13} o G_q , pero inhibe la migración y a Rac mediante el receptor $S1P_2$ (Okamoto *et al.*, 2000). $S1P_2$ también puede activar a la AC, c-Jun y p38/MAPK mediante un mecanismo aún desconocido (Gonda *et al.*, 1999). Aunque $S1P_4$ y $S1P_5$ tienen una expresión mas restringida en tejido hematopoyético y neuronal, también pueden regular la motilidad y la forma celular vía $G_{12/13}$ (en el caso de $S1P_4$) (Graler *et al.*, 2003) y el contorno celular y retracción de neuritas vía G_{12} y G_i (en el caso de $S1P_5$) (Im *et al.*, 2000).

Los defectos en vasculogénesis que muestran los embriones mutantes LPP3^{-/-} señalan posibles alteraciones en el fenómeno de migración celular (Escalante-Alcalde *et al.*, 2003). En este proceso participa una proteína esencial: la cinasa de focos de adhesión o FAK (por Focal Adhesion Kinase). FAK es una proteína de unos 125 kDa localizada abundantemente en los focos de adhesión, los cuales constituyen los puntos de anclaje celular esenciales para la migración. Su sobreexpresión estimula la migración de células de ovario de hámster (CHO) en asociación con Src (Cary *et al.*, 1996), aunque hay reportes que indican que PI3K podría también estar implicada en este fenómeno (Reiske *et al.*, 1999). FAK es un punto de control en la transducción de señales para este proceso tanto a nivel de cascadas de señalización activadas por lípidos fosfatados como para las integrinas que determinan las condiciones adecuadas de la matriz extracelular para la migración (Sieg *et al.*, 2000). En este punto, una proteína sustrato del complejo Src-FAK llamada paxilina, se fosforila en los residuos Tyr31, Tyr118, Ser188 y Ser 190 que son claves para la dinámica de desensamble de los focos de adhesión (Hunger-Glaser *et al.*, 2004; Webb *et al.*, 2004). Paxilina también actúa como proteína de andamiaje con una subunidad α de las integrinas para reclutar a FAK a los focos de adhesión, por lo que paxilina es una molécula adaptadora que recluta a otras moléculas de señalización y estructurales que regulan tanto la dinámica del citoesqueleto como la de adhesión, como se evidencia en células derivadas de embriones de ratón mutantes paxilina^{-/-} que muestran defectos en la migración y alteraciones en la morfología de los focos de adhesión (rev. Carragher y Frame, 2004). Los embriones mutantes nulos para paxilina no sobrepasan los 9.5 dg, son mas pequeños que los silvestres, presentan acortamiento del eje antero-posterior, defectos en el desarrollo de estructuras como el corazón, las somitas y en regiones donde paxilina se expresa ampliamente durante el desarrollo temprano como el amnios y el alantoides (Hagel *et al.*, 2002).

FAK es activada por LPA en un mecanismo independiente de calcio y PKC (Seufferlein y Rozengurt, 1994, Hunger-Glaser *et al.*, 2003) pero via G_{12/13} y la GTPasa RhoA, como lo demuestran ensayos de la incubación de células con la toxina C3 de *Clostridium botulinum*, la cual ADP-ribosila a RhoA en la Asn41 y bloquea su capacidad catalítica (Rankin *et al.*, 1994). Hasta la fecha se han descrito 6 sitios de fosforilación en FAK, las Tyr397, 407, 576, 577, 681 y 925. Los sitios Tyr407, 576, 577 y 925 parecen fosforilarse en respuesta a la interacción de FAK con Src, lo cual forma un sitio de unión a Grb2 que liga a FAK con la vía de Ras/MAPK (Schlaepfer *et al.*, 1994). FAK tiene la capacidad de autofosforilarse después de su activación por Rho y es ampliamente expresada y activada durante el desarrollo embrionario, donde se ha demostrado que su mutación nula es letal alrededor de los 8.5 dg por defectos en la

vasculogénesis y angiogénesis, afectándose la formación de vasos importantes como la aorta dorsal y la unión entre las vasculaturas embrionarias y extraembrionarias (rev. en Ilic *et al.*, 1997). Las células nulas para FAK presentan un número incrementado de focos de adhesión mas no un incremento en la migración, efecto que se ve revertido al restituirles la expresión de FAK (Sieg *et al.*, 1999), sugiriendo que regula la dinámica de ensamble y desensamble de los focos de adhesión más que su formación (Ilic *et al.*, 1995). La abundancia de los focos de adhesión y los defectos en su dinámica hace que las células permanezcan más tiempo adheridas al sustrato, disminuyendo así su capacidad de migrar. De igual forma se ha visto que los tejidos más afectados por la deficiencia de FAK son estructuras del mesodermo o derivados, por ejemplo el saco vitelino, lo cual probablemente obedezca a que las células de este tejido son las que poseen mayor capacidad migratoria durante el desarrollo embrionario.

2. ANTECEDENTES.

2.1. Las LPPs en el desarrollo embrionario.

Hasta la fecha se han generado ratones mutantes nulos para las LPP2 y LPP3. A diferencia de la mutación en LPP2, cuya mutación nula LPP2^{-/-} no produce un fenotipo distinguible (Zhang *et al.*, 2000), la de LPP3^{-/-} produce un fenotipo embrionario letal en etapas tempranas del desarrollo (alrededor de los 9.5-10.5 dg). La inactivación génica de LPP3 se hizo anulando la región del gen que codifica para los residuos de aminoácidos 214-268, lo que abarca parte del cuarto, quinto y sexto dominio transmembranal así como la segunda asa intracelular y la tercera asa extracelular, donde se encuentra uno de los dominios del sitio catalítico de la enzima. Células madre embrionarias portadoras de la mutación fueron inyectadas en blastocistos silvestres para obtener ratones quiméricos de los cuales se seleccionaron aquellos que incorporaron la mutación en las células germinales y se transmitió a la descendencia. Mediante cruces de ratones heterocigos LPP3^{+/-} se obtuvieron embriones mutantes nulos LPP3^{-/-} en las proporciones mendelianas esperadas. Se comprobó la anulación de su actividad de fosfatasa así como el bloqueo total de la expresión de proteína en fibroblastos derivados de embriones nulos LPP3^{-/-} (Escalante-Alcalde *et al.*, 2003).

Se ha determinado que LPP1 y LPP2 se expresan de manera uniforme en gran parte del embrión, sin embargo la LPP3 tiene un patrón temporal y tejido específico. La expresión de LPP3 se restringe al ectodermo extraembrionario en etapas muy tempranas del desarrollo (embriones de 6.5 dg); para los 7.5 dg se expresa en la parte anterior del embrión, en el mesodermo paraxial, las somitas, primordios del intestino y el canal pericardio-peritoneal, el sistema nervioso periférico, nervios craneales, primordios de la glándula mamaria, cordón umbilical así como en tejido extraembrionario incluyendo el corion, alantoides y la placenta corio-alantoidea en las etapas posteriores del desarrollo (Escalante-Alcalde *et al.*, 2003).

Dentro de las características fenotípicas que presentan los embriones nulos para LPP3 se observan principalmente defectos en la organización vascular del saco vitelino así como defectos en el desarrollo del alantoides, lo que provoca que no se forme la placenta del embrión probablemente debido a deficiencias en la migración de las células endoteliales durante la estructuración de los vasos sanguíneos (Escalante-Alcalde *et al.*, 2003).

Además del fenotipo ya mencionado, son notables los defectos de gastrulación en el 30% de los embriones mutantes nulos y, con mayor penetrancia (100%), el retraso generalizado en el desarrollo de los embriones mutantes LPP3^{-/-}. Parecen ser dos las

causas principales de la muerte de los embriones mutantes: primero, las membranas extraembrionarias corion y alantoides son incapaces de fusionarse para formar lo que posteriormente daría lugar a la placenta, proceso que requiere de la expresión de LPP3 en ambas membranas (según experimentos con quimeras en ese mismo estudio). El otro defecto que lleva a la muerte de los embriones mutantes es la deficiente vascularización del saco vitelino, que es el primer órgano hematopoyético en formarse y de cuyo desarrollo depende el aporte de nutrientes vía sanguínea al resto del embrión. Ambos procesos morfogénicos se ven comprometidos probablemente por deficiencias en la migración de las células endoteliales y/o murales durante la estructuración de los vasos sanguíneos en las etapas tempranas del desarrollo, por lo que será necesario indagar las posibles alteraciones en la migración provocadas por la mutación LPP3^{-/-} para poder determinar su participación en la regulación de este proceso celular.

Una posible causa del fenotipo embrionario causado por la mutación en LPP3 apunta hacia defectos ocasionados por alteraciones en la concentración de sus sustratos en el espacio extracelular. Se ha demostrado que en fibroblastos derivados de embriones deficientes en LPP3 hay una elevación de 2.5 veces en los niveles extracelulares de LPA con respecto a los silvestres, los niveles de ácido fosfatídico (PA) aumentaron poco más del 40% con una disminución casi a la mitad en la concentración de diacilglicerol (DAG, producto de la acción de la LPP3 sobre el ácido fosfatídico) y también presentan una disminución del 50% en la activación de PKC (proteína cinasa C). La elevación en los niveles extracelulares de LPA sugiere la posibilidad de que las células puedan estar acumulando también mayores cantidades de S1P o bien perdiendo el balance entre los sustratos activos y sus productos desfosforilados, lo que podría provocar alteraciones en las respuestas inducidas por tales fosfolípidos. Estas evidencias sugieren que la mutación en LPP3 podría estar generando, directa o indirectamente, alteraciones en las respuestas celulares reguladas por fosfolípidos bioactivos involucradas en los procesos de vasculogénesis y angiogénesis.

3. HIPÓTESIS

La deficiencia en la actividad de LPP3 provoca alteraciones en la señalización y respuestas celulares reguladas por LPA y S1P.

4. OBJETIVOS.

Para identificar estas alteraciones se ha planteado estudiar en células y tejidos de embriones de ratón mutantes los efectos de la deficiencia en la actividad de LPP3 en respuestas como la proliferación y la migración celular para compararlas con aquellas en ratones silvestres. Los objetivos contemplados en este proyecto incluyen:

- a) Caracterizar la distribución de los receptores para LPA y S1P en células y sacos vitelinos silvestres y mutantes nulos en LPP3.
- b) Determinar el estado de activación de la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) silvestres y mutantes nulos en LPP3.
- c) Estudiar el estado de fosforilación de FAK y paxilina en MEFs silvestres y mutantes nulos para LPP3.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. RT-PCR: se extrajo RNA de Fibroblastos Embrionarios Murinos (MEFs) y de sacos vitelinos silvestres y mutantes de 8.0 dg con Trizol (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante. Aproximadamente 100 µg de RNA se trataron con DNasa libre de RNasas (Roche) utilizando 10 unidades (1µl) de la enzima, incubando a 37°C durante 30 minutos en un *buffer*/amortiguador conteniendo Tris-HCl 40mM pH 7.9, MgCl₂ 6mM, espermidina 2mM y NaCl 10mM (concentraciones presentes en el buffer de transcripción de la T7 RNA polimerasa, Promega). Este tratamiento se hizo en presencia de 20 unidades (0.5 µl) de Inhibidor de RNasas RNAsin (Promega) todo en agua libre de RNasas. Posteriormente se purificó el RNA con el RNeasy Mini Kit (QIAGEN) según indicaciones del fabricante para el protocolo de limpieza de RNA. Al volumen final de RNA en agua se le agregaron 20 unidades de inhibidor de RNasa. Al final se cuantificó la concentración de RNA por espectrofotometría de una dilución 1:100 en agua tratada con DEPC (Dietil-Pirocarbonato) y factor de conversión= 40 (1 OD₂₆₀ = 40 µg).

Posteriormente 1µg de RNA purificado y libre de DNA se usó para el proceso de transcripción reversa utilizando el sistema *First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* (Roche) utilizando como cebadores/primers los Oligo p(dT)₁₅ del kit. La reacción de PCR se realizó con 3µl de cDNA, 30 pmolas de primers, 1 unidad de Taq DNA Polimerasa por reacción, 1x de buffer de reacción, 0.2 mM de dNTPs y 1.5 mM de MgCl₂ (Promega). Como control positivo se amplificó un fragmento de 344 pb del gen HPRT (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase) con los siguientes oligonucleótidos: sentido: 5'-CCT GCT GGA TTA CAT TAA AGC ACT-3' (335) y antisentido: 5'-GCT AAG GGC ATA TCC AAC AAC AAA C-3' (361) (Ta=57°C). Para los controles negativos se utilizaron los oligo-nucleótidos: sentido: 5'-GCC TTC TAC ACG GGA TTG TCA C-3' y antisentido: 5'-TTG TGC TCA CAG AGA AGA GGA TTC-3' (Ta=57°C) que amplifican un producto de 302 pb del gen de LPP3 en DNA genómico de ratón. Para los controles negativos se utilizaron 3 µl de una dilución de 1 µg de RNA en 20 µl de agua para simular las condiciones de dilución del templado en las demás muestras.

Para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizó el siguiente programa: 1 ciclo de 1 min a 95°C como desnaturalización inicial; 30 ciclos a 45 seg a 95°C para desnaturalización en cada ciclo, 30 seg en la temperatura indicada para cada par de oligos; 1 min a 72°C de extensión y 1 ciclo de extensión final de 5 min a 72°C.

Todos los productos se corrieron en un gel de agarosa en TAE 1x al 2% (genes de receptores LPA/S1P) o en TBS 0.5x al 3% (genes de morfogénesis vascular) preparados con bromuro de etidio (12µl/L de un stock 10 mg/ml). Se cargaron 10µl del producto de PCR con 3µl de buffer de carga (urea 10M y azul de bromofenol). Los geles se corrieron a 50 Volts por 30 min en TAE 1X o TBS 0.5 X con bromuro de etidio.

Se diseñaron los siguientes oligonucleótidos para amplificar específicamente fragmentos de los genes de ratón que codifican para los receptores LPA₁₋₃ y S1P₁₋₅:

Gen	Oligo Sentido (5'-3')	Oligo Antisentido (5'-3')	Ta (°C)	pb
LPA ₁	367-GGAACACAGTGAGCAAGCTGG	CTCATCATGGTGTCCCGATTC-957	58	590
LPA ₂	414-CATCAAAGGCTGGTTCCTGCG	CTAGGCTGAGTGTGGTCTCTC-791	62	400
LPA ₃	479-CCGGTGTGCGAAAACGTTGACC	CTGGTGTGTGGAGATAAGACG-839	62	360
S1P ₁	849-GGCCACCACTTACAAGCTCAC	GACTTCTCAGAAGTGC GACTG-1243	57	512
S1P ₂	645-CTCGCCAAGGTCAAGCTCTAC	GACCACTGTGTTACCCTCCAG-1261	57	616
S1P ₃	649-CAGGAAGACGTTCAAGTCTGTC	CTCTCAGAGTTGTGGTTGGCC-1016	57	367
S1P ₄	738-CATCGCCATCTACATGCGGTC	CGTGGAGACTTCTGCCATTG-1201	61	463
S1P ₅	257-CGGTGAGTGAGGTTATTGTCC	CAGGTTTCCAGGCGTCCTAAG-733	58	476

Para diseñar estos oligonucleótidos se realizó un alineamiento de los 7 receptores para LPA y S1P para escoger zonas poco conservadas con la intención de que se reconozcan regiones específicas de cada receptor. En estas regiones se diseñaron los oligos contemplando criterios como la longitud (21-24 nucleótidos), la proporción de GC (50-60%), que los extremos de los oligos terminen en G/C, que no formen estructura secundaria y que el tamaño del producto no sea mucho mayor a las 600 bp. Para evaluar la expresión de los marcadores de angiogénesis se utilizaron los siguientes oligonucleótidos reportados por Shih *et al.*, 2002:

Gen	Oligo Sentido (5'-3')	Oligo Antisentido (5'-3')	Ta	bp
Tie1	742-CAAGGTCACACACACGGTGAA	GCCAGTCTAGGGTATTGAAGTAGGA-839	58	121
Tie2	1804-AGTTGGAAGTCGAGAGGCGAT	CGAATAGCCATCCACTATTGTCC-2059	58	228
Ang1	329-CATTCTTCGCTGCCATTCTG	GCACATTGCCCATGTTGAATC-411	58	102
Ang2	1478-TTAGCACAAAGGATTCGGACAAT	TTTTGTGGGTAGTACTGTCCATTCA-1574	57	120
Flt-1	2421-GACGAGGATGAGGGTGTCTATAGGT	GTGATCAGCTCCAGGTTTACTT-2514	57	115
VEC	1853-TCCTCTGCATCCTCACCATCACA	GTAAGTGACCAACTGCTCGTGAAT-1951	62	121
Vegf	805-GGAGATCCTTCGAGGAGCACTT	GGCGATTTAGCAGCAGATATAAGAA-909	58	128

Todos los oligonucleótidos se recibieron liofilizados (Invitrogen) y se diluyeron en TE a una concentración stock de 100 pmoles/ μ l y a una dilución de trabajo de 10 pmoles/ μ l en agua.

Los oligonucleótidos para TGF- β 1 fueron donados por el Dr. Fernando López Casillas y poseen las siguientes secuencias: Sentido 5'-AGG GCT ACC ATG CCA ACT TTC T-3'. Antisentido 5'-CCG GGT TGT TGG TTG TAC A-3' (Juarez *et al.*, 2006).

Para genotipificar a los embriones se obtuvo un fragmento del endodermo visceral el cual se sometió a digestión a 56°C durante toda la noche en un *buffer*/amortiguador compatible con PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3, 2 mM MgCl₂, 0.01% Gelatina, 0.45% Igepal, 0.45% Tween-20 y 100 μ g/ml Proteinasa K). La proteinasa K se inactivó a 95°C por 10 min. 2 μ l de la mezcla de digestión se sometieron a 30 ciclos de PCR con un conjunto de 3 oligonucleótidos para distinguir a los alelos mutantes de los silvestres. Tipo silvestre: sentido 5'-GCC TTC TAC ACG GGA TTG TCA C-3'; Mutante con PGK: Sentido: 5'-CAG AAA GCG AAG GAA CAA AGC TG-3'; antisentido común: 5'-TTG TGC TCA CAG AGA AGA GGA TTC-3' (Ta=57°C) (Escalante-Alcalde *et al.*, 2003).

5.2. Ensayos de detección de proteínas mediante el uso de anticuerpos

específicos (*Western blot*): para las inmunorrélicas tipo *western* se usaron extractos totales de MEFs (Fibroblastos Embrionarios Murinos) silvestres y mutantes (LPP3^{-/-}) los cuales se obtuvieron cultivando las células en cajas Petri de 100mm en 10ml de medio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium) (Gibco) con SBF 10% (Wisent Inc.) hasta alcanzar el 80% de confluencia. Previo a los tratamientos experimentales se sometieron a las células a un ayuno de suero durante 4 horas. Los tratamientos se hicieron en medio sin suero agregando toxina *Pertussis* (PTX) (100 ng/ml durante toda la noche), S1P (0.1 μ M por 5 min) (obtenidos por donación del Dr. Adolfo García Sainz) o LPA (1 μ M por 5min) (Sigma). La reacción fue detenida en hielo y lavando con PBS frío (*ice-cold PBS*). Se despegaron las células de la superficie de cultivo y se hicieron los extractos en *buffer*/amortiguador de lisis conteniendo Tris-HCl pH 8.0 50mM, NaCl 150mM, Igepal/NP-40 1% (Sigma) e inhibidores de proteasas en tabletas "*Complete*" (Roche). La homogeneización se realizó con jeringas insulínicas haciendo 4-6 pases con fuerza en el émbolo para luego congelarlos (-20°C). Se descongelaron sobre hielo y se clarificaron por centrifugación (14000rpm x 1min). Se cuantificó la concentración de proteína usando el *DC Protein Assay* (BioRad) y se alicuotaron 40 μ g de proteína con buffer Laemmli 2X (Tris-HCl 62.5 mM pH 8.8, Glicerol 25%, SDS 2%, Azul de bromofenol 0.01%). Se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su uso, para lo cual

se les agregó β -ME 5%. Los extractos se desnaturalizaron por ebullición en baño maría durante 5 min y con choque térmico en hielo. Después de centrifugarlos 5 min a 14000rpm se resolvieron con SDS-PAGE (geles de 1.5 mm al 8%) aplicando 25 mA por gel durante 90 min. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore) previamente incubadas en metanol por 1 min. La transferencia se realizó a 4°C durante toda la noche con 15 Volts por gel. Las membranas se lavaron 1 min en TBS-T para después bloquear con leche libre de grasa al 5% por 1 hr en agitación constante a temperatura ambiente.

Los anticuerpos utilizados fueron para las especies basal y fosforilada de ERK1/2 (Cell signaling), de Paxilina (Cell signaling), de p38 (Cell signaling), FAK (BD Biosciences), anti-pFAK (Cell Signaling) y actina (Santa Cruz Biotechnology). El anticuerpo primario (1:1000) se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente en TBS-T/leche 5%. Se hicieron 3 lavados de 5 min en 25 ml de TBS-T previamente a la incubación del anticuerpo secundario (1:5000) (anti IgG de conejo hecho en cabra/*Goat-anti rabbit*, anti IgG de cabra hecho en burro/*Donkey-anti goat*, anti IgG de ratón hecho en cabra/*goat-anti mouse*, Santa Cruz Biotech, todos conjugados con peroxidasa) el cual se incubó durante 1 hr en TBS-T/leche 5%. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 5 min en 25 ml de TBS-T. La reacción de la peroxidasa se realizó utilizando los reactivos de quimioluminiscencia *ECL* (actina, ERK) o *ECL plus* (pERK, pP38, pFAK, FAK, pPaxilina, Paxilina) *Western Blotting Detection System* (Amersham Biosciences). Las membranas se expusieron de 5 a 30 min en películas autorradiográficas de alta sensibilidad (KODAK). El análisis densitométrico se realizó utilizando el software Image J (NIH, USA).

5.3. PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.

-Buffer/amortiguador de lisis NP-40: para preparar 100 ml:

5 ml Tris-HCl 2.5 M pH 8.0 (final 50mM)
3 ml NaCl 5M (final 150 mM)
1 ml Igepal (NP-40) (final al 1%).

Para 1 ml de **buffer/amortiguador NP-40 + inhibidores de proteasas “Complete”**:

Agregar 40 μ l de “Complete” (Roche) 25x en 960 μ l de buffer/amortiguador de lisis NP-40 estéril. Queda 1x (preparar solo la cantidad necesaria).

-Buffer/amortiguador de carga para proteínas Laemmli 2x: para preparar 20 ml:

0.5 ml Tris-HCl 2.5 M pH 6.8

5 ml glicerol
 4 ml SDS 10%
 2 μg azul de bromofenol
 10.5 ml agua estéril.

-Acrilamida 30% (para 30 ml):

9.0 g Acrilamida
 0.24 g Bis N,N'-metileno-bis-acrilamida

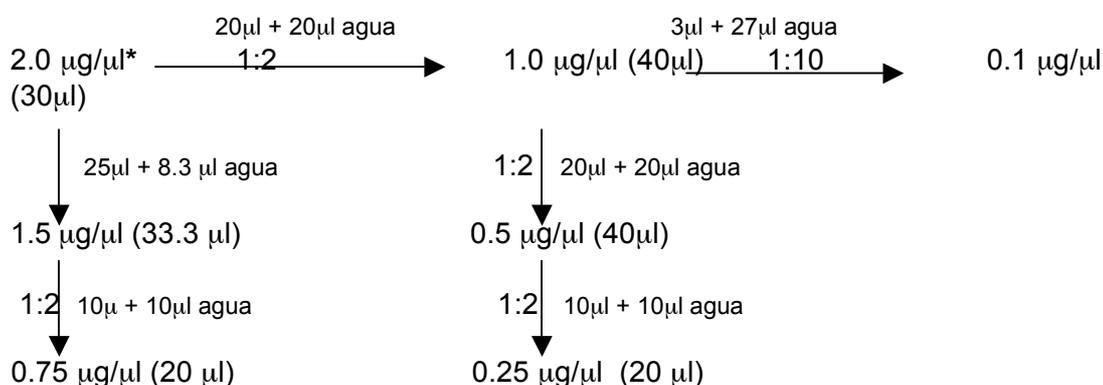
Buffer inferior pH 8.8 (para 30 ml)	Buffer superior pH 6.8 (para 30 ml)
5.44 g Tris (final 1.5 M)	1.81 g Tris (final 0.5 M)
1.2 ml SDS 10% (final 0.4%)	1.2 ml SDS 10% (final 0.4%)

-Buffer/amortiguador de corrida (para 1 litro):

14.4 g Glicina
 3.0 g Tris
 10 ml SDS10%

5.4. Protocolo de cuantificación de proteínas con el sistema "DC Protein Assay" de BioRad.

1. Preparar una curva-patrón con α -globulina (puede usarse albúmina) a concentraciones de 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 y 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se pueden realizar diluciones seriadas como se indica a continuación:



*El *stock* esta a 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y debe descongelarse en hielo. Puede tardar varios minutos dependiendo del volumen.

2. Preparar el volumen necesario de sol. **A'** (75 μl por cada muestra). Es decir preparar para 8 muestras de curva-patrón + número de extractos a cuantificar. Esta solución se prepara en proporción de 20 μl de sol. **S** en 1 ml de sol. **A**.
3. Para cargar las celdas para la cuantificación seguir el siguiente orden:
 - a) Agregar 15 μl de buffer NP-40 en un extremo del fondo de las celdas que serán para la curva-patrón (para compensar la absorbancia del detergente en los extractos de proteína).

- b) Añadir 75 µl de sol. **A'** en el fondo de las celdas.
 - c) Agregar 15 µl de alícuota de proteína en concentración conocida (curva-patrón) o bien de la muestra de proteína a determinar. Agitar en Vortex.
4. Agregar 600 µl de sol. **B**. Agitar en Vortex.
 5. Dejar 15 minutos en oscuridad. Verificar visualmente un gradiente de intensidad del color azul en función de la concentración de proteína de la curva-patrón.
 6. Leer absorbancia a 750 nm.
 7. Obtener concentración de proteína de las muestras por regresión lineal de la absorbancia de la curva-patrón (según la ecuación de la recta $y=mx+b$) y alicuotar la proteína en la cantidad deseada.

5.5. Procedimientos Generales.

Para alicuotar la proteína:

1. Agregar en tubos de 100 µl el volumen de extracto con la cantidad deseada de proteína (20 µg, 40 µg, etc.).
2. Mezclar con un volumen equivalente de buffer/amortiguador de carga Laemmli 2x + β-ME al 5% recién preparado.
3. Si se tienen extractos con diferentes concentraciones de proteína y se quiere alicuotar el mismo volumen para realizar ensayos para efectos de comparación, se deberá agregar el volumen necesario de buffer/amortiguador de lisis NP-40 en las alícuotas que tengan menos volumen para hacerlo equivalente al de las muestras con mayor volumen (para cargar el mismo volumen en el gel).
4. Etiquetar las alícuotas y mantenerlas a -20°C.

Para preparar las muestras para SDS-PAGE:

1. Descongelar en hielo las alícuotas de proteína.
2. Desnaturalizar las proteínas por ebullición en baño maría durante 5 min y aplicar un choque térmico en hielo.
3. Centrifugar las alícuotas 1 min a 14000 rpm antes de cargar en el gel.

Para preparar geles de poli-acrilamida al 8% con grosor de 1.5 mm.

Gel separador (inferior) 8%	Vol.	Gel concentrador (superior) 5%	Vol.
Acrilamida	1.36 ml	Acrilamida	0.5 ml
Buffer inferior	1.35 ml	Buffer superior	410 µl
Agua	2.24 ml	Agua	2.1 ml
Persulfato de amonio (100mg/ml)	50 µl	Persulfato de amonio (100 mg/ml)	30 µl
TEMED	5 µl	TEMED	3 µl

Correr los geles a 25 mA fijos por cada gel durante 90 minutos.

6. RESULTADOS.

6.1. Expresión de receptores para LPA y S1P en Fibroblastos Embrionarios Murinos.

Como ya se ha mencionado, el LPA y S1P ejercen sus funciones mediante la activación de receptores específicos en la membrana celular. Un nivel inicial de información acerca de las posibles alteraciones en la señalización de estos fosfolípidos podría evidenciarse en la expresión de sus receptores de membrana. Para estudiar ésto se utilizaron ensayos de RT-PCR en MEFs silvestres y mutantes $LPP3^{-/-}$ cultivados a un 90% de confluencia. Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar fragmentos específicos de los genes que codifican para los receptores de LPA y S1P de la familia EDG, es decir LPA_1 - LPA_3 y $S1P_1$ - $S1P_5$. Al comparar el producto amplificado de cada gen, se observó que los MEFs silvestres y mutantes expresan el transcrito de todos los receptores para LPA y S1P, aunque en menor grado los receptores $S1P_4$ y $S1P_5$ en células de ambos genotipos (fig. 5). En general el nivel de expresión detectado para todos los receptores analizados es muy similar entre MEFs silvestres y mutantes, a excepción del receptor LPA_3 , el cual fue considerablemente menor en los MEFs deficientes en LPP3.

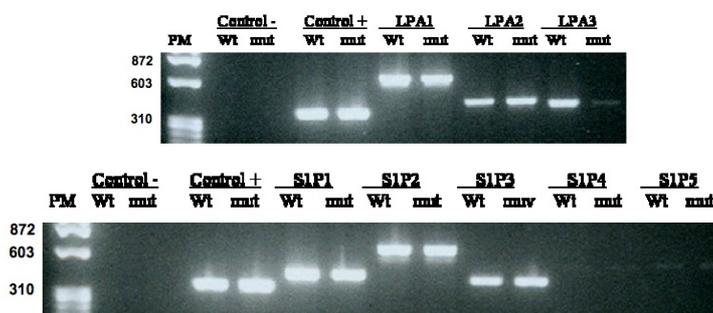


Fig. 5. Expresión por RT-PCR de receptores para LPA (panel superior) y S1P (panel inferior) en MEFs silvestres (WT) y mutantes $LPP3^{-/-}$ (mut). PM (peso molecular), C- (control sin RT), C+ (control HPRT).

Para obtener datos mas refinados se realizaron experimentos de PCR semi-cuantitativos sobre cDNA de los MEFs silvestres y mutantes en LPP3, para lo cual se tomaron muestras del producto amplificado a ciclos intermedios de amplificación (20, 25 y 30 ciclos). Al observar los datos obtenidos en estos ensayos, se puede confirmar la diferencia de expresión del receptor LPA_3 , la cual se encuentra disminuida en los MEFs mutantes desde los 20 ciclos en comparación con los silvestres (fig. 6), mientras que en el resto de los receptores no hay diferencias notables. Para cuantificar con mas precisión los receptores $S1P_4$ y $S1P_5$ (los cuales se expresan muy poco en los MEFs de ambos genotipos) se utilizaron 30, 35 y 40 ciclos de amplificación para facilitar la detección de posibles diferencias en su expresión.

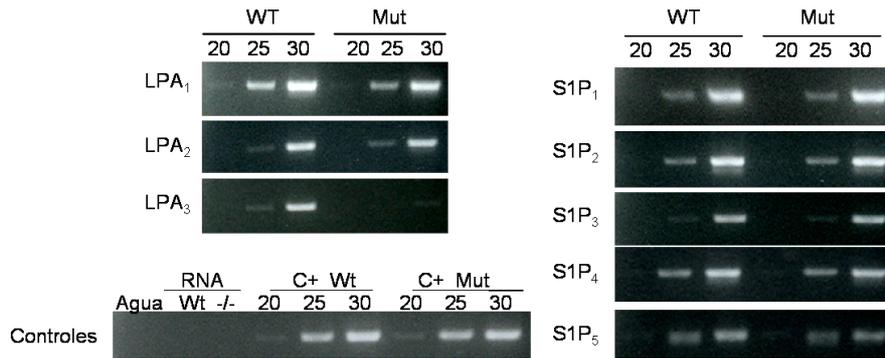


Fig. 6. Ensayos de RT-PCR semi-cuantitativos para determinar la expresión por de receptores para LPA y S1P en Fibroblastos Embrionarios Murinos (MEFs) silvestres (WT) y mutantes LPP3^{-/-} (Mut). Se indica el número de ciclos para los receptores y los controles: 20, 25 y 30, excepto S1P₄ y S1P₅: 30, 35 y 40. C+ (control HPRT), RNA (control sin RT).

Previamente se ha reportado la existencia de variaciones en la expresión del receptor LPA₃ la cual disminuía con el aumento en la confluencia de células mesangiales en cultivo (Xing *et al.*, 2004). Para estudiar la posible participación de este fenómeno en la disminución de la expresión del receptor LPA₃, se hicieron ensayos de RT-PCR de MEFs cultivados a 25% y 50% de confluencia. Al comparar el nivel de expresión del receptor LPA₃ entre MEFs silvestres y mutantes al 50% de confluencia se observó que los MEFs mutantes expresan menor cantidad de transcrito de este receptor, mientras que la expresión en MEFs mutantes fue indetectable al 25% (fig. 7).

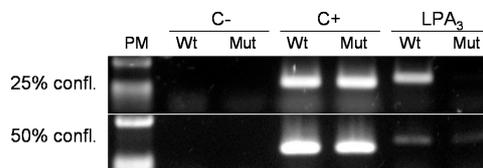


Fig. 7 Expresión por RT-PCR del receptor LPA₃ en Fibroblastos Embrionarios Murinos silvestres (WT) y mutantes (mut) cultivados al porcentaje de confluencia indicado. PM (peso molecular), C- (control sin RT), C+ (control HPRT).

6.2. Expresión de receptores para LPA y S1P en sacos vitelinos.

Como ya se ha mencionado, una de las principales diferencias fenotípicas que se observan en los embriones mutantes en LPP3 ocurre en el saco vitelino, cuyos defectos vasculares contribuyen a la letalidad de la mutación. En este tejido se caracterizó la expresión de receptores para LPA y S1P en este tejido mediante ensayos de RT-PCR. Se caracterizó la expresión de receptores durante el periodo del desarrollo embrionario donde ocurre la vasculogénesis y remodelación del plexo capilar primario, es decir durante los 8, 9 y 10 dg. Se obtuvo el tejido requerido para estos ensayos colectando entre 6 y 8 embriones de 8, 9 y 10 dg silvestres, de los cuales se colectó el saco vitelino (SV) para las reacciones de RT-PCR como se menciona en la sección de materiales y

métodos. Los datos obtenidos muestran que los receptores principalmente expresados son los de LPA₁₋₃ y S1P₁₋₃ y en menor proporción los receptores S1P₄ y S1P₅. Además la expresión relativa entre los receptores se mantuvo constante durante los periodos analizados (fig. 8).

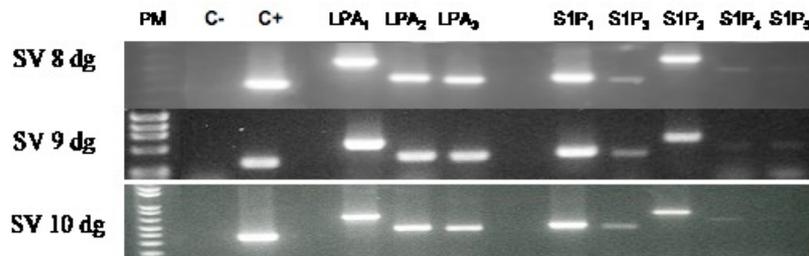


Fig. 8. Expresión por RT-PCR de receptores para LPA y S1P en sacos vitelinos (SV) silvestres a los 8, 9 y 10 dg. PM (peso molecular), C- (control sin RT), C+ (control positivo HPRT).

Para saber si este patrón de expresión en sacos vitelinos se ve afectada por la mutación en LPP3 como ocurrió en los MEFs, se estudió también la expresión de receptores para LPA y S1P en sacos vitelinos mutantes en LPP3. Para lograr esto se obtuvieron 5 embriones mutantes homocigotos LPP3^{-/-} de 9 dg de 3 camadas logradas de la cruce de ratones heterocigotos LPP3^{+/-}. Los embriones mutantes fueron identificados inicialmente por su fenotipo con evidencias como retraso en el desarrollo, menor talla que los silvestres, defectos en la forma de los pliegues neurales, un bajo número de somitas (de 5 a 7, en comparación con los silvestres que tienen de 10 a 11), forma y estado del alantoides (curvo y sin fusionarse con el corion) así como en la disposición corporal de los embriones, los cuales en general aún no realizaban el proceso de giro corporal (“turning”) mediante el cual obtienen la posición fetal típica sino que aún permanecían en forma de “U” (“U-shape”). Para comprobar los genotipos se hicieron ensayos de PCR como se indica en la sección de material y métodos y se observó la amplificación de productos de los alelos silvestres y mutantes de 302 pb y 500 pb, respectivamente (fig. 9).

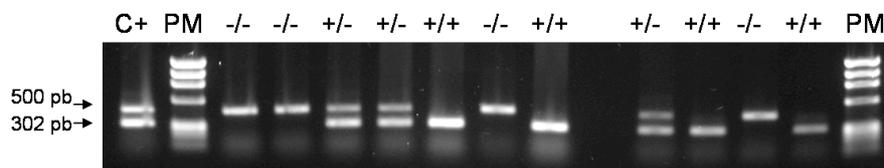


Fig. 9. Genotipificación de embriones por PCR. Se indica el genotipo +/+ (wt), +/- (wt) y -/- (mut) obtenidos con el uso de 3 oligos como se indica en material y métodos. PM (peso molecular). C+ (Control positivo: DNA de genotipo conocido +/-). Producto de alelo wt= 302 pb; producto de alelo mut= 500 pb).

La caracterización de los receptores LPA y S1P realizada en los sacos vitelinos reveló que en ambos genotipos los receptores con mayor expresión son LPA₁ y S1P₁ (fig. 10).

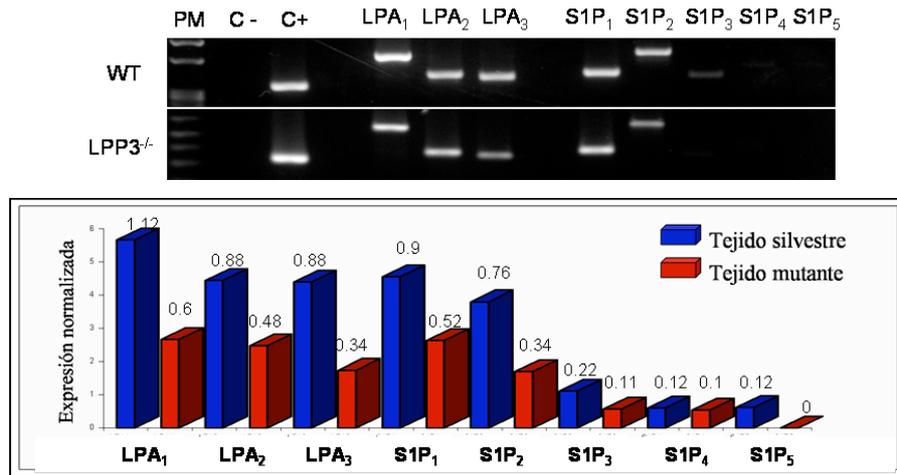


Fig. 10. Expresión por RT-PCR de receptores para LPA y S1P en sacos vitelinos silvestres (WT) de 8 dg y mutantes ($LPP3^{-/-}$) de 9 dg. PM (peso molecular), C- (control sin RT), C+ (control HPRT). Barras azules: tejido silvestres. Barras rojas: tejido mutante. Se muestran los valores de expresión normalizada con respecto al control positivo HPRT. Ensayo único. Densitometría realizada con software Image J (NIH, USA).

Si tomamos como referencia los valores de expresión de estos dos receptores en cada genotipo entre sí, entonces podemos ver que el resto de los receptores LPA y S1P se expresan en menor proporción como se muestra en la tabla 1.

Receptores LPA	% de expresión de receptores LPA		Receptores S1P	% de expresión de receptores S1P	
	Wt	Mut		Wt	Mut
LPA ₁	100	100	S1P ₁	100	100
LPA ₂	79.6	80.0	S1P ₂	84.5	57.8
LPA ₃	79.6	56.9	S1P ₃	30.0	12.3
			S1P ₄	13.4	11.2
			S1P ₅	13.6	0

Tabla1. Diferencias de expresión de receptores LPA y S1P en sacos vitelinos silvestres y mutantes con respecto a la expresión de LPA₁ y S1P₁ en cada genotipo. Relación obtenida comparando los datos en tejido silvestre o tejido mutante entre sí.

Como puede observarse en los receptores de LPA, es el receptor LPA₃ el que cuenta con la menor expresión en tejido mutante con respecto al silvestre (56.9% vs 79.6%). En el caso de los receptores S1P las mayores diferencias de expresión en tejido mutante las poseen S1P₃ (12.3% vs 30%) y S1P₅ (0% vs 13.6%) según los ensayos de RT-PCR (Tabla 1).

Si ahora se comparan las diferencias de expresión de receptores entre sacos vitelinos silvestres y mutantes en cada receptor se obtienen los datos de la tabla 2.

Receptores LPA	Disminución de expresión en Mut (%)	Receptores S1P	Disminución de expresión en Mut (%)
LPA ₁	46.4	S1P ₁	42.2
LPA ₂	45.4	S1P ₂	55.2
LPA ₃	61.3	S1P ₃	50.0
		S1P ₄	83.3
		S1P ₅	100

Tabla 2. Disminución en la expresión de receptores LPA y S1P en sacos vitelinos mutantes comparados con los silvestres.

Los receptores LPA₁ y LPA₂ en los sacos vitelinos mutantes tuvieron una disminución similar del 46.4% y 45.4% respectivamente con respecto al tejido silvestre, sin embargo de nueva cuenta se observó un mayor decremento (61.3%) del receptor LPA₃ en el tejido mutante. Los receptores S1P₄ y S1P₅ en tejido mutante son los que sufren la mayor disminución del 83.3% y 100% según los datos obtenidos por RT-PCR, aunque esto puede estudiarse con mas precisión si se utiliza un ensayo de medición de expresión mas sensible y con mas repeticiones.

6.3. Expresión de genes involucrados en la morfogénesis vascular.

Los defectos en la vascularización del saco vitelino pueden ser debidos a alteraciones en la señalización de sus sustratos afectando otros procesos. La vasculogénesis es un proceso muy sensible al nivel de expresión de los genes que controlan la formación de los vasos sanguíneos. El gen del VEGF ha sido utilizado frecuentemente como indicador de la formación de vasos sanguíneos, sin embargo el análisis de un solo gen no proporcionaría información suficiente sobre posibles alteraciones en la regulación de la vasculogénesis. Por tal motivo se evaluó un conjunto de genes que codifican para proteínas asociadas estrechamente con la modulación de la formación de vasos sanguíneos. Además de la expresión del VEGF (principal regulador de la formación de vasos sanguíneos), se evaluó la expresión de VE-Cadherina (proteína de unión específica endotelial), Angiopoietinas 1 y 2 (citocinas asociadas con la angiogénesis), Tie1 y Tie2 (receptores con actividad de cinasa de tirosina esenciales en la estabilidad vascular) y Flt1 (receptor 2 del VEGF, esencial en la diferenciación y organización de las células endoteliales) (Sato *et al.*, 1995; Fong *et al.*, 1995, 1999; Gory-Faure *et al.*, 1999; Dejana *et al.*, 2000; Tsiamis *et al.*, 2002; Ward y Dumont, 2002).

La expresión de estos marcadores fue estudiada mediante ensayos semi-cuantitativos de RT-PCR en sacos vitelinos de embriones silvestres y mutantes LPP3^{-/-}. Los datos normalizados a 25 ciclos muestran que en la expresión de los genes analizados en

tejido mutante se encuentra aumentada tales como Ang1 (25%), Ang2 (33%), Flt1 (35.8%), Tie1 (40%), Tie2 (44%), VE-Cadherina (46%) y VEGF (26%) (fig. 11).

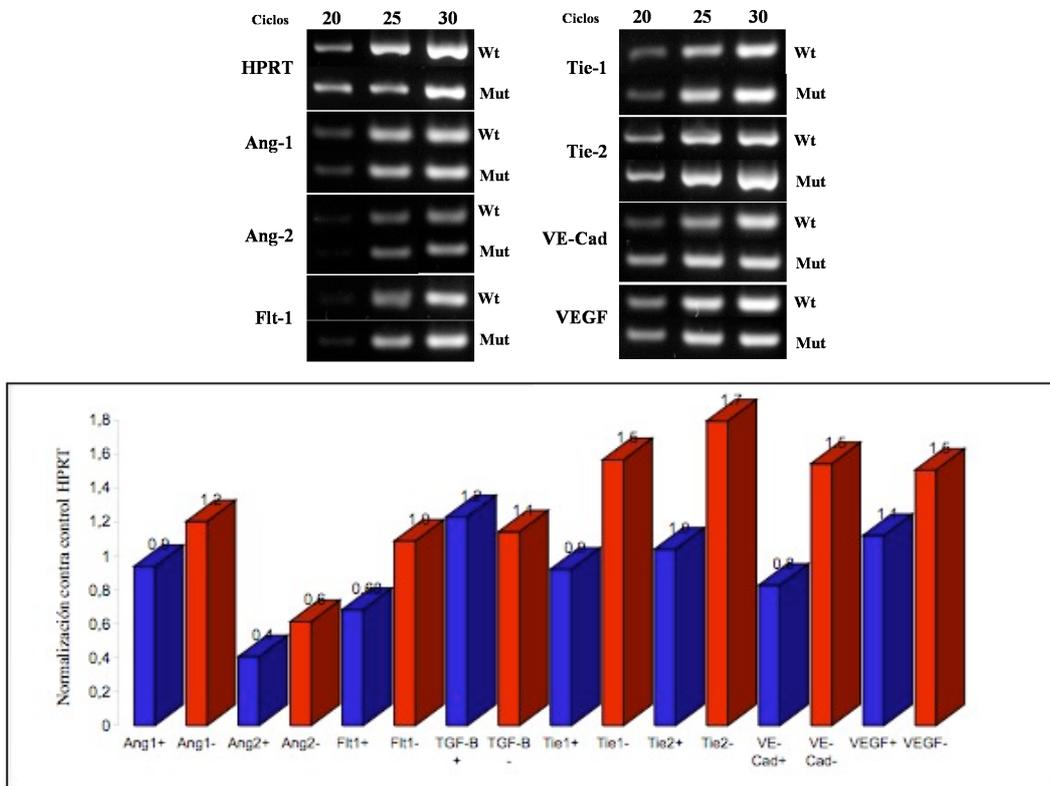


Fig. 11. Ensayo semi-cuantitativo de RT-PCR de la expresión de genes marcadores de angiogénesis en sacos vitelinos silvestres (+) de 8 dg y mutantes (-) de 9 dg. Barras azules: tejido silvestres. Barras rojas: tejido mutante. Se muestran los valores de expresión normalizada con respecto al control positivo (HPRT). Experimento único.

Así mismo se analizó la expresión del gen de TGF-β, el cual participa como importante regulador de la diferenciación endotelial, formación de la red vascular y mantenimiento de la integridad de las paredes de los vasos sanguíneos (Marchuk *et al.*, 2003; Pepper, 1997). Se sabe además que el TGF-β es capaz de regular genes involucrados con la angiogénesis como Angiopietina-2, bFGF2, paxilina, PECAM y VEGF (Wu *et al.*, 2006). Los datos obtenidos por ensayos semi-cuantitativos de RT-PCR no muestran diferencias importantes en los sacos vitelinos mutantes LPP3^{-/-} con respecto a los silvestres en cuanto a la expresión del mRNA de TGF-β1 (figs.11 y 12).

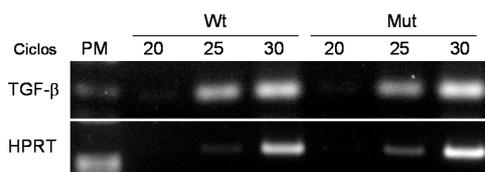


Fig. 12. Ensayo semi-cuantitativo de RT-PCR de la expresión del gen marcadores de TGF-β1 en sacos vitelinos silvestres (Wt) de 8 dg y mutantes (Mut) de 9 dg. Experimento único. Cuantificación en fig. 11.

6.4. Estado de activación de la vía de MAPK.

Para evaluar si existen alteraciones en la señalización de LPA y S1P provocadas por la deficiencia en LPP3, se analizó la respuesta de efectores de ambos fosfolípidos como la vía de MAPK a nivel de ERK1/2 y p38 por detección de proteínas mediante el uso de anticuerpos (*western blot*). Dada la escasez de tejido embrionario y extraembrionario mutante para los experimentos, se utilizaron extractos proteicos totales de MEFs silvestres y mutantes en condiciones de estimulación con LPA y S1P como se detalla en la sección de materiales y métodos. Como control positivo de la activación de ERK se observó su fosforilación en MEFs bajo estimulación con VEGF (datos no mostrados).

Los datos arrojados en estos ensayos mostraron una mayor activación de ERK1/2 en los MEFs mutantes con respecto a los silvestres en condiciones basales en ausencia de suero, proceso que se ve inhibido por la incubación con toxina *pertussis* (PTX), mientras que en los MEFs silvestres esta activación fue independiente de proteínas G sensibles a PTX (fig. 13). En la incubación durante 5 minutos con LPA o S1P se observó, inesperadamente, una disminución en la activación de ERK1/2 en células de ambos genotipos en comparación con la actividad basal, aunque en las mutantes la activación mantuvo un mayor grado que en las silvestres. La incubación con PTX en presencia de LPA llevó a una inhibición en la activación de ERK1/2 siendo mas sensible aquella de los MEFs mutantes. En presencia de S1P, el efecto inhibitorio observado fue revertido parcialmente en MEFs silvestres por la incubación con PTX.

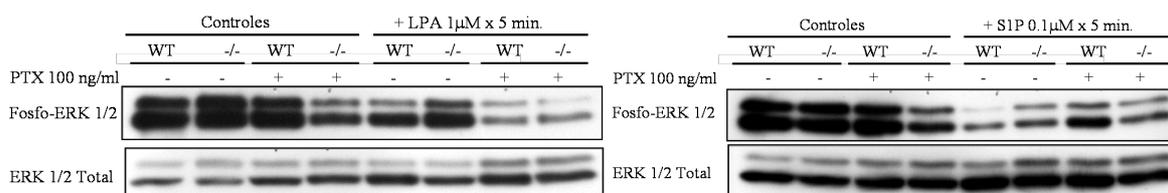


Fig. 13. Activación de ERK1/2 en MEFs silvestres (wt) y mutantes (-/-) en LPP3, en presencia y ausencia de toxina *pertussis* (PTX) y estimuladas con LPA y S1P a las concentraciones y tiempos indicados. Se muestra el representativo de tres experimentos.

En el caso de p38/MAPK, se encontró que la estimulación con LPA y S1P no produjo diferencias importantes en su activación y al parecer tampoco están interviniendo proteínas de tipo G_i ya que las células incubadas con PTX no muestran signos de sensibilidad a la toxina (fig. 14).

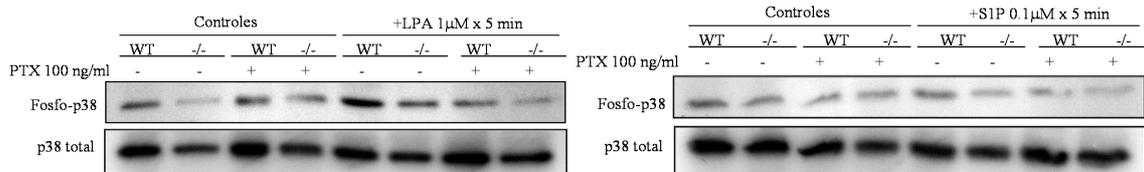


Fig. 14. Activación de p38 en MEFs de tipo silvestres (wt) y mutante (-/-) en LPP3, en presencia y ausencia de toxina *pertussis* (PTX) y estimuladas con LPA y S1P a las concentraciones y tiempos indicados. Se muestra el representativo de tres experimentos.

6.5. Respuestas en proteínas asociadas a la dinámica del citoesqueleto.

Como ya se ha mencionado, LPA y S1P tienen una importante participación en los rearrreglos del citoesqueleto de actina controlando respuestas como la migración celular, proceso en el cual participan dos proteínas esenciales asociadas a la dinámica de formación de focos de adhesión, los cuales junto con las fibras de estrés son estructuras necesarias para el desplazamiento de las células sobre una superficie. Una de estas proteínas es la Cinasa de Focos de adhesión o FAK (Focal Adhesión Kinase) y Paxilina. Ambas interactúan con una gran variedad de proteínas involucradas en el proceso de migración mediante la activación de las vías de señalización de LPA y S1P (Seufferlein y Rozengurt, 1994; Lee *et al.*, 2000; Salazar *et al.*, 2003; Shikata *et al.*, 2003a y 2003b). Para analizar si hay alteraciones en la activación de FAK y paxilina en respuesta a LPA y S1P en ausencia de LPP3, se hicieron ensayos de detección de proteínas mediante anticuerpos (*western blot*) en MEFs sometidos a la estimulación por ambos fosfolípidos. Datos obtenidos en estos ensayos revelan que los MEFs mutantes tuvieron deficiencias en la activación de FAK en presencia de LPA y de S1P en comparación con los silvestres, donde la estimulación con LPA y S1P indujo la activación de FAK, mediante proteínas de tipo G_i ya que la incubación con PTX inhibió su fosforilación prácticamente a los niveles basales (fig. 15).

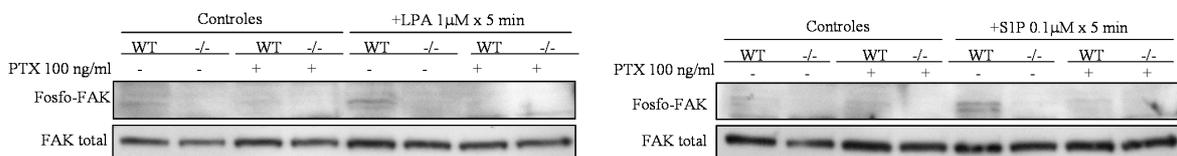


Fig. 15. Activación de FAK en MEFs de tipo silvestre (wt) y mutantes (-/-) en LPP3, en presencia y ausencia de toxina *pertussis* (PTX) y estimuladas con LPA y S1P a las concentraciones y tiempos indicados. Se muestra el representativo de tres experimentos.

En el caso de paxilina, el dato más sobresaliente fue la diferencia en los niveles de expresión de proteína en los MEFs mutantes con respecto a los silvestres, en los cuales en condiciones basales la expresión fue prácticamente nula y este efecto no mostró sensibilidad a PTX (fig. 16). Tal efecto en la expresión de paxilina fue revertido bajo la estimulación con S1P pero no con LPA y con la estimulación con LPA en presencia de

PTX. Otro resultado que llamó la atención fue que en los MEFs mutantes tanto en ausencia como en presencia de LPA y S1P, el grado de fosforilación de paxilina fue el mismo y esta respuesta no se vio afectada por la incubación con PTX.

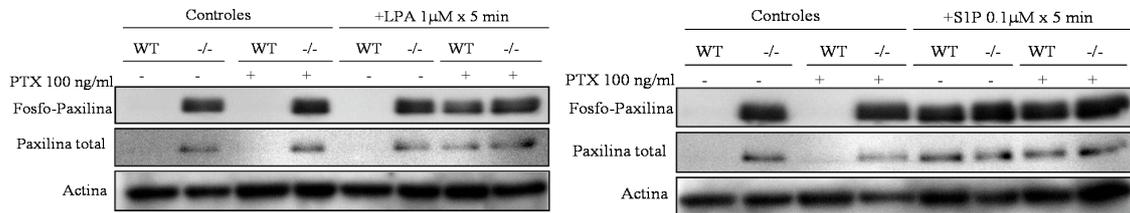


Fig. 16. Activación de paxilina en MEFs de tipo silvestre (wt) y mutantes (-/-) en LPP3, en presencia y ausencia de toxina *pertussis* (PTX) y estimuladas con LPA y S1P a las concentraciones y tiempos indicados.

7. DISCUSIÓN.

Los defectos vasculares como consecuencia de la deficiencia de LPP3 podrían ser debidos a alteraciones en respuestas celulares provocadas por el desbalance en la disponibilidad de LPA y S1P. Esto también podría tener consecuencias sobre la transcripción de genes involucrados en su señalización, por lo que es importante explorar si la mutación en LPP3 tiene efectos sobre el nivel de expresión de los receptores para estos fosfolípidos. Para esto se caracterizó la expresión de los receptores LPA₁₋₃ y S1P₁₋₅ tanto en fibroblastos embrionarios murinos (MEFs), que es donde se han demostrado alteraciones en la concentración de LPA por deficiencia de LPP3, así como en sacos vitelinos silvestres y mutantes en LPP3, que es uno de los tejidos embrionarios con evidentes defectos vasculares provocados por la deficiencia en LPP3.

7.1. Expresión de receptores para LPA y S1P en Fibroblastos Embrionarios Murinos.

Existen reportes sobre la expresión de receptores para LPA y S1P en MEFs (Liu *et al.*, 2000; Ishii *et al.*, 2001; Contos *et al.*, 2002; Ishii *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002; Anliker y Chun, 2004) por lo que se sabía de la expresión de los receptores LPA₁, LPA₂ y S1P₁₋₃, sin embargo hasta la fecha no había sido reportada la expresión del receptor LPA₃. En este trabajo se determinó que en MEFs silvestres se expresan, además de los receptores ya reportados, también receptores LPA₃. A diferencia del resto de los receptores cuyos niveles de expresión son similares en células de ambos genotipos, los de LPA₃ sufren de una disminución importante en los MEFs mutantes en LPP3 en comparación con los silvestres (figs. 5-7). Aunque la expresión del receptor se ve afectada por el nivel de confluencia celular en ambos genotipos, en MEFs mutantes hubo menor expresión del transcrito de LPA₃ a los diferentes grados de confluencia estudiados (25%, 50% y 100%) (figs. 5-7). Desconocemos si esta deficiencia de expresión pueda estar contribuyendo a las diferencias fenotípicas encontradas en los MEFs mutantes, como su mayor capacidad de migración y proliferación, así como su menor tamaño y duración del ciclo celular (Arenas-Huertero, Dector-Vega y Escalante-Alcalde, datos no publicados). Tampoco sabemos si la disminución observada en la expresión en LPA₃ en MEFs mutantes puede estar ocurriendo en todos los tipos celulares.

La disminución en la expresión del receptor LPA₃ puede ser consecuencia de los elevados niveles de LPA que presentan los MEFs mutantes en LPP3, lo que implica una regulación negativa de la transcripción del receptor por el propio LPA. La regulación

transcripcional de LPA₃ dependiente de ligando se ha sugerido también en embriones de ratón deficientes en autotaxina (enzima que se encarga de sintetizar LPA de forma extracelular), los cuales muestran bajos niveles de LPA y un aumento en la transcripción solo de LPA₃ (van Meeteren *et al.*, 2006). Un fenómeno de regulación transcripcional también se ha observado *in vivo* en patologías como el cáncer de ovario, en donde existen niveles elevados de LPA que correlacionan con incrementos en la expresión de los receptores LPA₂ y LPA₃ (Mills *et al.*, 2002; Mills and Moolenaar, 2003; Tanyi *et al.*, 2003), indicando una posible regulación transcripcional también dependiente del contexto celular. Interesantemente otra posibilidad en el efecto observado en LPA₃ es que la mutación en LPP3 esté provocando alteraciones en la regulación transcripcional de este u otros genes por otros mecanismos diferentes a los provocados por las alteraciones en los niveles de LPA. Se sabe, por ejemplo, que S1P también puede regular varios factores transcripcionales mediante vías como la de Ca²⁺, PI3K/AKT, Rho, citoesqueleto y con la participación de la vía de MAPK o a través de citocinas como TGF-β (Coussin *et al.*, 2003; Chowdhury and Chaqour, 2004; Lockman *et al.*, 2004; Usui *et al.*, 2004; Hsieh *et al.*, 2006). También otros sustratos de la LPP3 como C1P o PA y productos de su actividad como DAG pueden regular la expresión génica (Zhong *et al.*, 2002; Temes *et al.*, 2004; Xin *et al.*, 2004; Gómez-Muñoz *et al.*, 2005; Le Houx *et al.*, 2006). LPP3 incluso puede regular la transcripción mediante mecanismos independientes de sus sustratos a través de la vía canónica Wnt/β-Catenina y los factores Tcf/Lef por mecanismos aún desconocidos (Escalante-Alcalde *et al.*, 2003).

7.2. Expresión de receptores para LPA y S1P en sacos vitelinos.

Como ya se ha mencionado, en el saco vitelino abundan poblaciones de células endoteliales y murales las cuales son afectadas en el fenotipo vascular de la mutación en LPP3. Para conocer la expresión de los receptores para LPA y S1P en el contexto vascular se realizaron ensayos de RT-PCR en el saco vitelino de embriones silvestres y mutantes en LPP3. Hasta la fecha no existía ningún reporte sobre la caracterización de receptores para LPA en saco vitelino y había solo uno sobre la caracterización de los receptores para S1P en tejidos embrionarios y extraembrionarios de ratón (Argraves *et al.*, 2004), donde se reportan proporciones en la expresión de receptores S1P similares a las encontradas en este trabajo.

Se observó que, durante el periodo en el que ocurre la formación y remodelación del plexo capilar primario (días 8, 9 y 10 de gestación), los receptores con mayor nivel de expresión en los sacos vitelinos silvestres fueron S1P₁ y LPA₁. S1P₁ participa de manera importante en la angiogénesis, ya que puede regular las vías de proliferación y

supervivencia, así como respuestas en el citoesqueleto de actina, formación de fibras de estrés, focos de adhesión e induce fuertemente la migración de células endoteliales y su comunicación con las células murales (Lee *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 2000; Paik *et al.*, 2001; Allende and Proia, 2002; Allende *et al.*, 2003; Argraves *et al.*, 2004; Paik *et al.*, 2004; Waeber *et al.*, 2004). LPA₁ también favorece la angiogénesis mediante la síntesis de prostaglandina E₂ vía la regulación transcripcional de COX-2 (Hahn *et al.*, 2002; Sakurai *et al.*, 2003; Marrache *et al.*, 2005; Tamura *et al.*, 2006).

La caracterización en sacos vitelinos mutantes contó con la limitante del bajo volumen de tejido que se puede obtener por la baja frecuencia con la que se obtienen embriones homócigos nulos para LPP3, así como por sus defectos en el desarrollo, por lo que se estudió sólo una ventana de tiempo, que fue a los 9 dg, para compararla con sacos vitelinos silvestres de 8 dg. Tal diferencia en la etapa de gestación fue para compensar el retraso en el desarrollo que muestran los embriones mutantes con respecto a los silvestres (Escalante-Alcalde *et al.*, 2003). Aquí se encontró que los receptores más expresados también fueron S1P₁ y LPA₁, aunque en menor grado que en los silvestres (fig. 10 y tabla 1). En este tejido S1P₁ se expresa solo el 42.2% con respecto al tejido silvestre (tabla 2). También se observó la expresión de S1P₂ desde los 8 dg y en mayor proporción que S1P₃ (fig. 10). El balance en la expresión de estos tres receptores parece ser importante durante la angiogénesis embrionaria (Kono *et al.*, 2004). Sin embargo, a pesar de la disminución tan temprana observada en su expresión, las evidencias *in vivo* indican que su participación en la vascularización deficiente de los sacos vitelinos de embriones mutantes en LPP3 es poco probable dada la expresión tan tardía del fenotipo vascular de embriones nulos en S1P₁ (Liu *et al.*, 2000) y sin fenotipo de embriones nulos en S1P₂ y S1P₃ (Kono *et al.*, 2004).

Por otra parte, el receptor de LPA más expresado en tejido mutante fue LPA₁, aunque con deficiencias con respecto al silvestre. Al comparar la expresión de los receptores LPA entre sí en tejido mutante, se observa que el que menos se expresa, al igual que en los MEFs mutantes, es LPA₃ (fig. 10 y Tabla 1) y, al comparar su expresión entre tejido silvestre y mutante, se encontró que tuvo la mayor disminución (61.3%) (Tabla 2). Los demás receptores para LPA también sufren de una disminución en el tejido mutante en diversas magnitudes (fig, 10, tablas 1 y 2), aunque de igual forma es poco probable que este efecto tenga participación en el fenotipo vascular deficiente de los embriones mutantes en LPP3 dada la nula influencia de los receptores en la vasculatura de los embriones de ratón nulos para estos 3 receptores.

Existe la posibilidad de que la disminución en la expresión de receptores LPA y S1P en sacos vitelinos mutantes pueda ser debida al retraso generalizado en el desarrollo que

presentan los embriones deficientes en LPP3. Tampoco se descartan alteraciones en su regulación transcripcional, sobre todo cuando en condiciones *in vivo* existen factores endógenos que pueden influir en la expresión génica como la comunicación con otros tipos celulares, niveles de oxígeno en el tejido, diferenciación celular, etc., por lo que es probable que las causas de la disminución en la expresión de los receptores LPA y S1P sea multifactorial.

7.3. Expresión de genes involucrados en la morfogénesis vascular.

Para buscar indicios a nivel transcripcional de las causas de los defectos vasculares de los embriones mutantes en LPP3, se analizó la expresión de 8 genes considerados esenciales para la formación de vasos sanguíneos en los sacos vitelinos de embriones silvestres y mutantes en LPP3. Todos los genes estudiados, con excepción de TGF- β , presentaron una expresión transcripcional aumentada en los sacos vitelinos mutantes, a pesar de sus defectos en la vascularización: Ang1 (25%), Ang2 (33%), Flt1 (35.8%), Tie1 (40%), Tie2 (44%), VE-Cadherina (46%) y VEGF (26%) (figs. 11 y 12). Se sabe que las deficiencias en la vasculogénesis pueden llevar a este fenómeno. Por ejemplo, el fenotipo vascular deficiente de sacos vitelinos de embriones de ratón nulos para el factor transcripcional HAND1 (expresado ampliamente en membranas extra-embrionarias) correlaciona con la sobre-expresión de los genes de VEGF, Flt1, Flk1, Ang1, Tie1, entre otros (Morikawa y Cserjesi, 2004). De igual forma se han descrito incrementos en los niveles de VEGF en concordancia con los defectos en la formación de vasos sanguíneos en embriones de ratón mutantes nulos para Flt1 (receptor tipo 1 de VEGF) (Fong *et al.*, 1999), CD148 (receptor endotelial con actividad de fosfatasa de tirosinas) (Takahashi *et al.*, 2003) y Dicer (Ribonucleasa tipo III) (Yang *et al.*, 2005).

El aumento en los niveles de VEGF puede llevar a un aumento en la transcripción de su propio gen (Vega-Díaz *et al.*, 2001) y puede incrementar la expresión de otros genes como Flt1, Flk1, Tie1, Ang1 y Ang2 (Barleon *et al.*, 1997; Kremer *et al.*, 1997; McCarty *et al.*, 1998; Hangai *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 1999).

Es posible que las condiciones del tejido embrionario mutante en LPP3 sea una de las razones de estas variaciones en la expresión génica. Dada la condición deficiente temprana del plexo capilar primario en los sacos vitelinos mutantes en LPP3, la falta de oxigenación puede llevar a una condición de hipoxia en el tejido, la cual se ha visto que es capaz de aumentar los niveles de VEGF (Iyer *et al.*, 1998) por la activación de miembros de la familia de factores inducibles por hipoxia o HIF (Hipoxia-Inducible Factors). Estos factores se unen a elementos que responden a hipoxia o HRE (Hipoxia-Responsive Elements) que se localizan en las regiones promotoras de diversos genes (Maxwell y Ratcliffe, 2002). Durante el desarrollo embrionario, así como en ciertas

patologías tumorales, hay tejidos que crecen a una tasa mas alta que la de vascularización, por lo que normalmente existe la transcripción de ciertos genes vía HIF. Como consecuencia, las células en los tejidos que sufren de una disminución en la concentración de oxígeno tienen un incremento en la transcripción de genes como el de VEGF, entre otros. En los sacos vitelinos mutantes es clara la deficiencia en vascularización, por lo que la condición de hipoxia pudo llevar al incremento en la transcripción de VEGF, Ang1, Ang2, Flt1, Tie1, Tie2 y VE-Cadherina (fig. 11). Aunque este aumento en la expresión puede llevar a señales de supervivencia y crecimiento endotelial (Freeburg y Abrahamson, 2003), es evidente que existen otros factores que no permiten el correcto desarrollo de la red vascular. De hecho es muy probable que las deficiencias desde etapas tempranas en el desarrollo en la formación de estructuras capilares sea una causa fundamental para el fenotipo definitivo del saco vitelino deficiente en LPP3. Tales defectos impedirían los subsecuentes procesos vasculogénicos llevando a la muerte temprana de los embriones.

Otra posibilidad es que la misma sobreexpresión de los genes esté llevando a defectos en la formación de los vasos sanguíneos. Por ejemplo, la sobre-expresión de VEGF puede generar defectos en la morfología final de los vasos sanguíneos (Drake and Little, 1995) o la de Ang2 puede provocar un detenimiento en el ciclo celular de células endoteliales (Calvi *et al.*, 2004). La sobreexpresión de Tie2, receptor de Ang1 y Ang2, podría estar generando un desbalance en la regulación diferencial que tienen ambos ligandos sobre este receptor, la cual se requiere para el correcto ensamble de los vasos sanguíneos (Scharpfenecker *et al.*, 2005). Tie1, receptor cuyo ligando aún no ha sido determinado, promueve la supervivencia de las células endoteliales y el crecimiento de la red vascular. Tie1 interactúa físicamente con Tie2 para regular su función, por lo que el aumento en su expresión en tejido mutante en LPP3 podría alterar el efecto de Tie2 sobre el mantenimiento de los capilares sanguíneos. A su vez, la sobre-expresión de VE-Cadherina lleva al incremento de los niveles de proteína del receptor Flk1 (Calera *et al.*, 2004), lo que se podría traducir en un desequilibrio en la señalización de VEGF. La actividad de este ligando también es regulada por Flt1, el cual se cree que ejerce una regulación de tipo negativa sobre la de Flk1 en un fino balance durante la organización de células endoteliales recién diferenciadas en etapas tempranas del desarrollo embrionario (Hiratsuka *et al.*, 2005).

En conjunto, estas evidencias sugieren una posible participación de alteraciones a nivel de señalización, transcripción y del desarrollo que provocan el fenotipo vascular deficiente de los embriones mutantes en LPP3.

7.4. Estado de activación de la vía de MAPK, FAK y Paxilina.

Los datos arrojados por los ensayos para analizar la activación de ERK y p38 son difíciles de interpretar, dado que la exposición de los MEFs a los factores presentes en el suero bovino fetal del medio de cultivo pudieron haber provocado efectos alternos sobre la vía de MAPK a los generados por efecto del LPA y S1P. A pesar de estas condiciones experimentales, al estudiar la activación de FAK en los MEFs silvestres se observa una disminución en su fosforilación aún en presencia de los factores del SBF, que fue sensible a PTX en presencia de LPA y S1P, mientras que los deficientes en LPP3 no mostraron esta misma respuesta. En este caso la deficiencia en la fosforilación de FAK en los MEFs mutantes nulos pudiera revelar alteraciones en la señalización cuyo efecto en la migración puede estar modulado por vías reguladas por otros factores no exploradas en este estudio. Así mismo, al analizar la activación de paxilina se observaron importantes diferencias en la abundancia de la proteína, donde los MEFs silvestres sin tratamiento presentan muy bajos niveles de paxilina total con respecto a los mutantes. De forma interesante, la adición de S1P a los MEFs silvestres provoca un aumento en la cantidad de proteína de paxilina total a los niveles de paxilina encontrados en los MEFs mutantes en condiciones basales. Esta observación podría sugerir una acumulación en los niveles extracelulares de S1P en los MEFs mutantes, por lo cual los niveles de paxilina se encuentran incrementados con respecto a los silvestres, además de la existencia de un mecanismo de control traduccional de paxilina dependiente de la acción de S1P. Para poder realizar una exploración precisa de todos estos mecanismos es necesario suprimir la reexposición de la células a los factores presentes en el SBF después de la estimulación con los fosfolípidos.

8. CONCLUSIONES.

En este trabajo se caracterizó la expresión de receptores para LPA y S1P en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) silvestres y mutantes en LPP3 mediante ensayos de RT-PCR. Se reporta por primera vez la expresión del receptor LPA₃ en estas células y se determinó que en MEFs deficientes en LPP3 existe una disminución en su expresión transcripcional. Se reporta también por primera vez la caracterización de la expresión de receptores para LPA en sacos vitelinos silvestres y mutantes LPP3^{-/-}. Así mismo, se observó una disminución generalizada en la expresión de todos los receptores para LPA y S1P analizados, siendo ésta más pronunciada sobre la expresión del receptor LPA₃. Estos resultados dan indicios de defectos a nivel de regulación transcripcional de estos receptores en sacos vitelinos mutantes LPP3^{-/-}.

Un análisis semicuantitativo de RT-PCR de la expresión de genes involucrados en la morfogénesis vascular indicó que en los sacos vitelinos mutantes LPP3^{-/-} existe una sobre-expresión de los genes de Ang1, Ang2, Tie1, Tie 2, Flt1, VE-Cadherina y VEGF con respecto a los silvestres. Es probable que alteraciones en la transcripción y señalización de estos factores, en combinación con los defectos tempranos en la formación de vasos sanguíneos de los sacos vitelinos deficientes en LPP3, contribuyan al fenotipo vascular deficiente de este tejido extraembrionario

El análisis de detección de proteínas mediante anticuerpos específicos (*western blot*) sobre la activación de ERK/MAPK, p38/MAPK no pudieron interpretarse con certeza debido a las condiciones metodológicas con las que se realizaron los experimentos.

En los ensayos para analizar la activación de FAK tampoco se pudieron recabar datos concluyentes, aunque se observó que en los MEFs mutantes hay una disminución en su fosforilación, aún en presencia de agonistas. En los silvestres esta respuesta parece estar mediada por proteínas de tipo Gi, aún en presencia de factores de crecimiento del suero bovino fetal. No sabemos las consecuencias de este efecto en el fenotipo migratorio de los MEFs mutantes en LPP3. Así mismo los ensayos sobre la activación de paxilina mostraron diferencias en la expresión de la proteína, en donde los MEFs silvestres presentan una disminución importante en comparación con los mutantes. Sin embargo, no se encontraron diferencias en el grado de fosforilación de esta proteína entre ambos genotipos, probablemente como efecto de los factores en el suero bovino fetal.

9. PERSPECTIVAS.

La expresión de receptores LPA y S1P en los sacos vitelinos mostraron una disminución en su expresión en tejido mutante en LPP3^{-/-}. Dada la letalidad de la mutación en LPP3 es difícil evaluar si esta disminución se modifica con el posterior desarrollo de los embriones. Sin embargo se podría estudiar la expresión de estos receptores sobre células endoteliales y murales, silvestres y deficientes en LPP3, así como en un sistema *in vitro* que simule la formación de vasos sanguíneos, para explorar el origen de tales alteraciones transcripcionales.

Para determinar mas finamente las diferencias de expresión en los genes involucrados en la morfogénesis vascular se podrían realizar ensayos de RT-PCR en tiempo real. De igual forma el estudiar la expresión de estos genes en un sistema de morfogénesis vascular *in vitro* permitiría determinar a detalle el papel de estas alteraciones transcripcionales en el fenotipo vascular de los embriones mutantes en LPP3.

Es posible que una condición de hipoxia esté colaborando a las alteraciones transcripcionales observadas en los genes vasculogénicos. Para comprobar esto se podrían realizar ensayos de detección de hipoxia sobre sacos vitelinos mutantes en LPP3, como con la inmunodetección de la proteína marcadora de hipoxia EF5 (Ryan *et al.*, 1998) o bien mediante el análisis de la expresión de genes regulables típicamente por hipoxia como Glut1, Hif1 α o iNOS.

Para estudiar correctamente las posibles alteraciones en la señalización de LPA y S1P provocadas por la ausencia de LPP3 en los MEFs, se deben modificar las condiciones experimentales suprimiendo el uso de tripsina y del SBF, así como la complementación del buffer/amortiguador de lisis con inhibidores de fosfatasa de amplio espectro. Además, estos ensayos también se podrían realizar en el contexto vascular para estudiar la actividad de ERK/MAPK, p38/MAPK, FAK, Paxilina y otras proteínas con participación vasculogénica en tejidos como el saco vitelino y alantoides o directamente en células endoteliales y murales silvestres y mutantes homócigas en LPP3.

Otro punto interesante será explorar otras vías de señalización importantes como la de PI3K, la actividad de las GTPasas Rho y Rac y su señalización hacia el citoesqueleto. Se pueden evaluar respuestas como la migración, formación de fibras de estrés y focos de adhesión en cultivos celulares o explantes de tejido extraembrionario, usando fármacos para evaluar vías de señalización. Así mismo se pueden estudiar otras proteínas a otros niveles de las cascadas para detectar el origen y destino de las alteraciones en señalización provocadas por la deficiencia en LPP3.

10. REFERENCIAS.

- Allende ML, Proia RL. (2002). Sphingosine-1-phosphate receptors and the development of the vascular system. *Biochim Biophys Acta*. **1582** (1-3): 222-7.
- Allende ML, Yamashita T, Proia RL. (2003). G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood*. **102** (10): 3665-7.
- Alderton F, Darroch P, Sambhi B, McKie A, Ahmed IS, Pyne N, Pyne S. (2001). G-protein-coupled receptor stimulation of the p42/p44 mitogen-activated protein kinase pathway is attenuated by lipid phosphate phosphatases 1, 1a, and 2 in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem*. **276** (16): 13452-60.
- Anliker B, Chun J. (2004). Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Semin Cell Dev Biol*. **15** (5): 457-65.
- Argraves KM, Wilkerson BA, Argraves WS, Fleming PA, Obeid LM, Drake CJ. (2004). Sphingosine-1-phosphate signaling promotes critical migratory events in vasculogenesis. *J Biol Chem*. **279** (48): 50580-90.
- Barila D, Plateroti M, Nobili F, Muda AO, Xie Y, Morimoto T, Perozzi G. (1996). The Dri 42 gene, whose expression is up-regulated during epithelial differentiation, encodes a novel endoplasmic reticulum resident transmembrane protein. *J Biol Chem*. **271** (47): 29928-36.
- Barleon B, Siemeister G, Martiny-Baron G, Weindel K, Herzog C, Marme D. (1997). Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells. *Cancer Res*. **57** (23): 5421-5.
- Baudhuin LM, Jiang Y, Zaslavsky A, Ishii I, Chun J, Xu Y. (2004). S1P3-mediated Akt activation and crosstalk with platelet-derived growth factor receptor (PDGFR). *FASEB J*. **18**:341-3
- Brindley DN. (2004). Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *J Cell Biochem*. **92** (5): 900-12.
- Brindley DN, Waggoner DW. (1998). Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases. *J Biol Chem*. **273** (38): 24281-4
- Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. (1995). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol*. **15** (2): 954-63.
- Calera MR, Venkatakrishnan A, Kazlauskas A. (2004). VE-cadherin increases the half-life of VEGF receptor 2. *Exp Cell Res*. **300** (1): 248-56.
- Calvi C, Dentelli P, Pagano M, Rosso A, Pegoraro M, Giunti S, Garbarino G, Camussi G, Pegoraro L, Brizzi MF. (2004). Angiopoietin 2 induces cell cycle arrest in endothelial cells: a possible mechanism involved in advanced plaque neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **24** (3): 511-8.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. **380** (6573): 435-9.
- Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E. (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*. **98** (2): 147-57.
- Cary LA, Chang JF, Guan JL. (1996). Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J Cell Sci*. **109** (Pt 7): 1787-94.
- Carragher NO, Frame MC. (2004). Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol*. **14** (5): 241-9.

- Casas-Gonzalez P, Ruiz-Martinez A, Garcia-Sainz JA. (2003). Lysophosphatidic acid induces alpha1B-adrenergic receptor phosphorylation through G beta gamma, phosphoinositide 3-kinase, protein kinase C and epidermal growth factor receptor transactivation. *Biochim Biophys Acta*. **1633** (2): 75-83.
- Chou FL, Hill JM, Hsieh JC, Pouyssegur J, Brunet A, Glading A, Uberall F, Ramos JW, Werner MH, Ginsberg MH. (2003). PEA-15 binding to ERK1/2 MAPKs is required for its modulation of integrin activation. *J Biol Chem*. **278** (52): 52587-97.
- Chowdhury I, Chaqour B. (2004). Regulation of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) gene transcription and mRNA stability in smooth muscle cells. Involvement of RhoA GTPase and p38 MAP kinase and sensitivity to actin dynamics. *Eur J Biochem*. **271** (22): 4436-50.
- Contos JJ, Ishii I, Chun J. (2000). Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol*. **58** (6): 1188-96.
- Contos JJ, Ishii I, Fukushima N, Kingsbury MA, Ye X, Kawamura S, Brown JH, Chun J. (2002). Characterization of Ipa(2) (Edg4) and Ipa(1)/Ipa(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to Ipa(2). *Mol Cell Biol* **22**: 6921-9.
- Coussin F, Scott RH, Nixon GF. (2003). Sphingosine 1-phosphate induces CREB activation in rat cerebral artery via a protein kinase C-mediated inhibition of voltage-gated K⁺ channels. *Biochem Pharmacol*. **66** (9): 1861-70.
- Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. (1996). Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*. **87** (7): 1161-9.
- Dejana E, Lampugnani MG, Martinez-Estrada O, Bazzoni G. (2000). The molecular organization of endothelial junctions and their functional role in vascular morphogenesis and permeability. *Int J Dev Biol*. **44** (6): 743-8.
- Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ. (1995). Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development*. **121** (6): 1845-54.
- Drake CJ, Little CD. (1995). Exogenous vascular endothelial growth factor induces malformed and hyperfused vessels during embryonic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92** (17): 7657-61.
- Ema M, Rossant J. (2003). Cell fate decisions in early blood vessel formation. *Trends Cardiovasc Med*. (6): 254-9.
- Escalante-Alcalde D, Hernandez L, Le Stunff H, Maeda R, Lee HS, Jr-Gang-Cheng, Sciorra VA, Daar I, Spiegel S, Morris AJ, Stewart CL. (2003). The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning. *Development*. **130** (19): 4623-37.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. **380** (6573): 439-42.
- Fincham VJ, James M, Frame MC, Winder SJ. (2000). Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. *EMBO J*. **19** (12): 2911-23.
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. **376** (6535): 66-70.
- Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. (1999). Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development*. **126** (13): 3015-25.
- Freeburg PB, Abrahamson DR. (2003). Hypoxia-inducible factors and kidney vascular development. *J Am Soc Nephrol*. **14** (11): 2723-30.
- Fukushima N, Ishii I, Contos JJ, Weiner JA, Chun J. (2004). Lysophospholipid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **41**: 507-34.

- Gomez-Munoz A, Kong JY, Parhar K, Wang SW, Gangoiti P, Gonzalez M, Eivemark S, Salh B, Duronio V, Steinbrecher UP. (2005). Ceramide-1-phosphate promotes cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *FEBS Lett.* **579** (17): 3744-50.
- Gonda K, Okamoto H, Takuwa N, Yatomi Y, Okazaki H, Sakurai T, Kimura S, Sillard R, Harii K, Takuwa Y. (1999). The novel sphingosine 1-phosphate receptor AGR16 is coupled via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins to multiple signalling pathways. *Biochem J.* **337** (Pt 1): 67-75.
- Gory-Faure S, Prandini MH, Pointu H, Roullot V, Pignot-Paintrand I, Vernet M, Huber P. (1999). Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development.* **126** (10): 2093-102.
- Graler MH, Grosse R, Kusch A, Kremmer E, Gudermann T, Lipp M. (2003). The sphingosine 1-phosphate receptor S1P4 regulates cell shape and motility via coupling to Gi and G12/13. *J Cell Biochem.* **89** (3): 507-19.
- Gschwind A, Prenzel N, Ullrich A. (2002). Lysophosphatidic acid-induced squamous cell carcinoma cell proliferation and motility involves epidermal growth factor receptor signal transactivation. *Cancer Res.* **62** (21): 6329-36.
- Hagel M, George EL, Kim A, Tamimi R, Opitz SL, Turner CE, Imamoto A, Thomas SM. (2002). The adaptor protein paxillin is essential for normal development in the mouse and is a critical transducer of fibronectin signaling. *Mol Cell Biol.* **22** (3): 901-15.
- Hahn A, Barth H, Kress M, Mertens PR, Goppelt-Struebe M. (2002). Role of Rac and Cdc42 in lysophosphatidic acid-mediated cyclo-oxygenase-2 gene expression. *Biochem J.* **362** (Pt 1): 33-40.
- Hangai M, Murata T, Miyawaki N, Spee C, Lim JI, He S, Hinton DR, Ryan SJ. (2001). Angiopoietin-1 upregulation by vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **42** (7):1617-25.
- Hiratsuka S, Nakao K, Nakamura K, Katsuki M, Maru Y, Shibuya M. (2005). Membrane fixation of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligand-binding domain is important for vasculogenesis and angiogenesis in mice. *Mol Cell Biol.* **25** (1): 346-54.
- Hsieh HL, Wu CB, Sun CC, Liao CH, Lau YT, Yang CM. (2006). Sphingosine-1-phosphate induces COX-2 expression via PI3K/Akt and p42/p44 MAPK pathways in rat vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* **207** (3): 757-66.
- Huang C, Jacobson K, Schaller MD. (2004). MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci.* **117** (Pt 20): 4619-28.
- Hunger-Glaser I, Salazar EP, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. (2003). Bombesin, lysophosphatidic acid, and epidermal growth factor rapidly stimulate focal adhesion kinase phosphorylation at Ser-910: requirement for ERK activation. *J Biol Chem.* **278** (25): 22631-43.
- Hunger-Glaser I, Salazar EP, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. (2004). PDGF and FGF induce focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation at Ser-910: dissociation from Tyr-397 phosphorylation and requirement for ERK activation. *J Cell Physiol.* **200** (2): 213-22.
- Ilic D, Damsky CH, Yamamoto T. (1997). Focal adhesion kinase: at the crossroads of signal transduction. *J Cell Sci.* **110** (Pt 4): 401-7
- Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, Nomura S, Fujimoto J, Okada M, Yamamoto T. (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature.* **377** (6549): 539-44.
- Im DS, Heise CE, Ancellin N, O'Dowd BF, Shei GJ, Heavens RP, Rigby MR, Hla T, Mandala S, McAllister G, George SR, Lynch KR. (2000). Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. *J Biol Chem.* **275** (19): 14281-6.
- Ishii I, Contos JJ, Fukushima N, Chun J. (2000). Functional comparisons of the 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** (5): 895-902.

- Ishii I, Friedman B, Ye X, Kawamura S, McGiffert C, Contos JJ, Kingsbury MA, Zhang G, Brown JH, Chun J. (2001). Selective loss of sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LP(B3)/EDG-3. *J Biol Chem.* **276** (36): 33697-704.
- Ishii I, Ye X, Friedman B, Kawamura S, Contos JJ, Kingsbury MA, Yang AH, Zhang G, Brown JH, Chun J. (2002). Marked perinatal lethality and cellular signaling deficits in mice null for the two sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors, S1P(2)/LP(B2)/EDG-5 and S1P(3)/LP(B3)/EDG-3. *J Biol Chem.* **277** (28): 25152-9.
- Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL. (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* **12** (2): 149-62.
- Juarez P, Vilchis-Landeros MM, Ponce-Coria J, Mendoza V, Hernandez-Pando R, Bobadilla NA, Lopez-Casillas F. (2006). Soluble betaglycan reduces renal damage progression in db/db mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* En prensa.
- Kai M, Wada I, Imai S, Sakane F, Kanoh H. (1997). Cloning and characterization of two human isozymes of Mg²⁺-independent phosphatidic acid phosphatase. *J Biol Chem.* **272** (39): 24572-8.
- Kim JH, Kim JH, Song WK, Kim JH, Chun JS. (2000). Sphingosine 1-phosphate activates Erk-1/2 by transactivating epidermal growth factor receptor in rat-2 cells. *IUBMB Life.* **50** (2): 119-24.
- Kim GS, Hong JS, Kim SW, Koh JM, An CS, Choi JY, Cheng SL. (2003). Leptin induces apoptosis via ERK/cPLA2/cytochrome c pathway in human bone marrow stromal cells. *J Biol Chem.* **278** (24): 21920-9.
- Kimura T, Watanabe T, Sato K, Kon J, Tomura H, Tamama K, Kuwabara A, Kanda T, Kobayashi I, Ohta H, Ui M, Okajima F. (2000). Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochem J.* **348** Pt 1: 71-6.
- Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, Cheresh DA. (1997). Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol.* **137** (2): 481-92.
- Kluk MJ, Hla T. Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* **1582**: 72-80
- Kono M, Mi Y, Liu Y, Sasaki T, Allende ML, Wu YP, Yamashita T, Proia RL. (2004). The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis. *J Biol Chem.* **279** (28): 29367-73
- Kremer C, Breier G, Risau W, Plate KH. (1997). Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system. *Cancer Res.* **57** (17): 3852-9.
- Kupperman E, An S, Osborne N, Waldron S, Stainier DY. (2000). A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development. *Nature.* **406** (6792): 192-5.
- Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, Hla T. (1999). Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell.* **99** (3): 301-12.
- Lee OH, Lee DJ, Kim YM, Kim YS, Kwon HJ, Kim KW, Kwon YG. (2000). Sphingosine 1-phosphate stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and chemotactic motility of endothelial cells via the G(i) protein-linked phospholipase C pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* **268** (1): 47-53.
- LeHoux JG, Lefebvre A. (2006). Novel protein kinase C-epsilon inhibits human CYP11B2 gene expression through ERK1/2 signalling pathway and JunB. *J Mol Endocrinol.* **36**(1): 51-64.
- Leung DW, Tompkins CK, White T. (1998). Molecular cloning of two alternatively spliced forms of human phosphatidic acid phosphatase cDNAs that are differentially expressed in normal and tumor cells. *DNA Cell Biol.* **17** (4): 377-85.
- Leung DW, Tompkins CK, White T. (1999). Characterization of two spliced variants of human phosphatidic acid phosphatase cDNAs that are differentially expressed in normal and tumor cells. *Adv Exp Med Biol.* **469**: 639-46.

- Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C. (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*. **277** (5323): 242-5.
- Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, Rosenfeldt HM, Nava VE, Chae SS, Lee MJ, Liu CH, Hla T, Spiegel S, Proia RL. (2000). Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest*. **106** (8): 951-61.
- Liu Z, Armant DR. (2004). Lysophosphatidic acid regulates murine blastocyst development by transactivation of receptors for heparin-binding EGF-like growth factor. *Exp Cell Res*. **296** (2): 317-26.
- Liu ZX, Yu CF, Nickel C, Thomas S, Cantley LG. (2002). Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association. *J Biol Chem*. **277** (12): 10452-8.
- Lockman K, Hinson JS, Medlin MD, Morris D, Taylor JM, Mack CP. (2004). Sphingosine 1-phosphate stimulates smooth muscle cell differentiation and proliferation by activating separate serum response factor co-factors. *J Biol Chem*. **279** (41): 42422-30.
- Long J, Darroch P, Wan KF, Kong KC, Ktistakis N, Pyne NJ, Pyne S. (2005). Regulation of cell survival by lipid phosphate phosphatases involves the modulation of intracellular phosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate pools. *Biochem J*. **391** (Pt 1): 25-32.
- MacLennan AJ, Carney PR, Zhu WJ, Chaves AH, Garcia J, Grimes JR, Anderson KJ, Roper SN, Lee N. (2001). An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability. *Eur J Neurosci*. **14** (2): 203-9
- Marchuk DA, Srinivasan S, Squire TL, Zawistowski JS. (2003). Vascular morphogenesis: tales of two syndromes. *Hum Mol Genet*. **12** (Spec No 1): R97-112.
- Marrache AM, Gobeil F, Zhu T, Chemtob S. (2005). Intracellular signaling of lipid mediators via cognate nuclear G protein-coupled receptors. *Endothelium*. **12** (1-2): 63-72.
- Maxwell PH, Ratcliffe PJ. (2002). Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. **13** (1): 29-37.
- McCarthy MJ, Crowther M, Bell PR, Brindle NP. (1998). The endothelial receptor tyrosine kinase tie-1 is upregulated by hypoxia and vascular endothelial growth factor. *FEBS Lett*. **423** (3): 334-8.
- Mills GB, Eder A, Fang X, Hasegawa Y, Mao M, Lu Y, Tanyi J, Tabassam FH, Wiener J, Lapushin R, Yu S, Parrott JA, Compton T, Tribble W, Fishman D, Stack MS, Gaudette D, Jaffe R, Furui T, Aoki J, Erickson JR. (2002). Critical role of lysophospholipids in the pathophysiology, diagnosis, and management of ovarian cancer. *Cancer Treat Res*. **107**: 259-83.
- Mills GB, Moolenaar WH. (2003). The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer*. **3** (8): 582-91.
- Miyamoto S, Yagi H, Yotsumoto F, Kawarabayashi T, Mekada E. (2004). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a novel targeting molecule for cancer therapy. *Cancer Sci*. **97** (5): 341-7.
- Moolenaar WH. (1995). Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J Biol Chem*. **270** (22): 12949-52.
- Moolenaar WH, van Meeteren LA, Giepmans BN. (2004). The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays*. (8): 870-81.
- Morikawa Y, Cserjesi P. (2004). Extra-embryonic vasculature development is regulated by the transcription factor HAND1. *Development*. **131** (9): 2195-204.
- Noguchi K, Ishii S, Shimizu T. (2003). Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J Biol Chem*. **278** (28): 25600-6

- Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Matsumura M, Honda Y. (1999). Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiotensin II in bovine microvascular endothelial cells. *J Biol Chem.* **274** (22): 15732-9.
- Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, Sugimoto N, Sakurada S, Shigematsu H, Takuwa Y. (2000). Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol Cell Biol.* **20** (24): 9247-61.
- Owen JD, Ruest PJ, Fry DW, Hanks SK. (1999). Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Mol Cell Biol.* **19** (7): 4806-18.
- Pages C, Simon MF, Valet P, Saulnier-Blache JS. (2001). Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **64** (1-4): 1-10.
- Paik JH, Chae Ss, Lee MJ, Thangada S, Hla T. (2001). Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of alpha vbeta3- and beta1-containing integrins. *J Biol Chem.* **276** (15): 11830-7.
- Paik JH, Skoura A, Chae SS, Cowan AE, Han DK, Proia RL, Hla T. (2004). Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization. *Genes Dev.* **18** (19): 2392-403.
- Parsons JT. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci.* **116** (Pt 8): 1409-16.
- Pepper MS. (1997). Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* **8** (1): 21-43.
- Pyne S, Kong KC, Darroch PI. (2004). Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate biology: the role of lipid phosphate phosphatases. *Semin Cell Dev Biol.* **15** (5): 491-501.
- Radeff-Huang J, Seasholtz TM, Matteo RG, Brown JH. (2004). G protein mediated signaling pathways in lysophospholipid induced cell proliferation and survival. *J Cell Biochem.* **92** (5): 949-66.
- Rankin S, Morii N, Narumiya S, Rozengurt E. (1994). Botulinum C3 exoenzyme blocks the tyrosine phosphorylation of p125FAK and paxillin induced by bombesin and endothelin. *FEBS Lett.* **354** (3): 315-9.
- Reiske HR, Kao SC, Cary LA, Guan JL, Lai JF, Chen HC. (1999). Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Biol Chem.* **274** (18): 12361-6.
- Rossant J, Howard L. (2002). Signaling pathways in vascular development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **18**: 541-73.
- Ryan HE, Lo J, Johnson RS. (1998). HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J.* **17** (11): 3005-15.
- Saba JD. (2004). Lysophospholipids in development: Miles apart and edging in. *J Cell Biochem.* **92** (5): 967-92.
- Sakurai T, Tamura K, Okamoto S, Hara T, Kogo H. (2003). Possible role of cyclooxygenase II in the acquisition of ovarian luteal function in rodents. *Biol Reprod.* **69** (3): 835-42.
- Salazar EP, Hunger-Glaser I, Rozengurt E. (2003). Dissociation of focal adhesion kinase and paxillin tyrosine phosphorylation induced by bombesin and lysophosphatidic acid from epidermal growth factor receptor transactivation in Swiss 3T3 cells. *J Cell Physiol.* **194** (3): 314-24.
- Santiskulvong C, Rozengurt E. (2003). Galardin (GM 6001), a broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor, blocks bombesin- and LPA-induced EGF receptor transactivation and DNA synthesis in rat-1 cells. *Exp Cell Res.* **290** (2): 437-46.
- Sardar VM, Bautista DL, Fischer DJ, Yokoyama K, Nusser N, Virag T, Wang DA, Baker DL, Tigyi G, Parrill AL. (2002). Molecular basis for lysophosphatidic acid receptor antagonist selectivity. *Biochim Biophys Acta.* **1582** (1-3): 309-17.

- Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y. (1995). Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*. **376** (6535): 70-4.
- Sato TN, Loughna S (2002). Vasculogenesis and angiogenesis. In: Mouse Development. Rossant J and Tam PPL, editors. Academic Press, USA. 211-233 pp
- Schaller MD. 2004. FAK and paxillin: regulators of N-cadherin adhesion and inhibitors of cell migration? *J Cell Biol*. **166** (2): 157-9.
- Scharpfenecker M, Fiedler U, Reiss Y, Augustin HG. (2005). The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *J Cell Sci*. **118** (Pt 4): 771-80.
- Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* **372** (6508): 786-91.
- Sciorra VA, Morris AJ. (1999). Sequential actions of phospholipase D and phosphatidic acid phosphohydrolase 2b generate diglyceride in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. **10** (11): 3863-76.
- Sciorra VA, Morris AJ. (2002). Roles for lipid phosphate phosphatases in regulation of cellular signaling. *Biochim Biophys Acta*. **1582** (1-3): 45-51.
- Seufferlein T, Rozengurt E. (1994). Lysophosphatidic acid stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and p130. Signaling pathways and cross-talk with platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*. **269** (12): 9345-51.
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. **376** (6535): 62-6.
- Shih SC, Robinson GS, Perruzzi CA, Calvo A, Desai K, Green JE, Ali IU, Smith LE, Senger DR. (2002). Molecular profiling of angiogenesis markers. *Am J Pathol*. **161** (1): 35-41.
- Shikata Y, Birukov KG, Garcia JG. (2003a). S1P induces FA remodeling in human pulmonary endothelial cells: role of Rac, GIT1, FAK, and paxillin. *J Appl Physiol*. **94** (3): 1193-203.
- Shikata Y, Birukov KG, Birukova AA, Verin A, Garcia JG. (2003b). Involvement of site-specific FAK phosphorylation in sphingosine-1 phosphate- and thrombin-induced focal adhesion remodeling: role of Src and GIT. *FASEB J*. **17** (15): 2240-9.
- Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD. (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol*. **2** (5): 249-56.
- Sieg DJ, Hauck CR, Schlaepfer DD. (1999). Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J Cell Sci*. Pt (16): 2677-91.
- Siebler S, Manning DR. (2002). Pathways of transduction engaged by sphingosine 1-phosphate through G protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* **1582**: 94-9.
- Sigal YJ, McDermott MI, Morris AJ. (2005). Integral membrane lipid phosphatases/ phosphotransferases: common structure and diverse functions. *Biochem J*. **387** (2):281-93.
- Spiegel S, Milstien S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **4** (5): 397-407.
- Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*. **87** (7): 1171-80.
- Takahashi T, Takahashi K, St John PL, Fleming PA, Tomemori T, Watanabe T, Abrahamson DR, Drake CJ, Shirasawa T, Daniel TO. (2003). A mutant receptor tyrosine phosphatase, CD148, causes defects in vascular development. *Mol Cell Biol*. **23** (5): 1817-31.

- Takuwa Y. (2002). Subtype-specific differential regulation of Rho family G proteins and cell migration by the Edg family sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim Biophys Acta* **1582**:112–20.
- Tamura K, Sakurai T, Kogo H. (2006). Relationship between prostaglandin E2 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in angiogenesis in human vascular endothelial cells. *Vascul Pharmacol.* **44** (6): 411-6.
- Tanimoto T, Lungu AO, Berk BC. (2004). Sphingosine 1-phosphate transactivates the platelet-derived growth factor beta receptor and epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* **94** (8): 1050-8.
- Tanyi JL, Morris AJ, Wolf JK, Fang X, Hasegawa Y, Lapushin R, Auersperg N, Sigal YJ, Newman RA, Felix EA, Atkinson EN, Mills GB. (2003). The human lipid phosphate phosphatase-3 decreases the growth, survival, and tumorigenesis of ovarian cancer cells: validation of the lysophosphatidic acid signaling cascade as a target for therapy in ovarian cancer. *Cancer Res.* **63** (5): 1073-82.
- Temes E, Martin-Puig S, Aragonés J, Jones DR, Olmos G, Merida I, Landazuri MO. (2004). Role of diacylglycerol induced by hypoxia in the regulation of HIF-1 α activity. *Biochem Biophys Res Commun.* **315** (1): 44-50.
- Tsiamis AC, Morris PN, Marron MB, Brindle NP. (2002). Vascular endothelial growth factor modulates the Tie-2:Tie-1 receptor complex. *Microvasc Res.* **63** (2): 149-58.
- Usui S, Sugimoto N, Takuwa N, Sakagami S, Takata S, Kaneko S, Takuwa Y. (2004). Blood lipid mediator sphingosine 1-phosphate potently stimulates platelet-derived growth factor-A and -B chain expression through S1P1-Gi-Ras-MAPK-dependent induction of Kruppel-like factor 5. *J Biol Chem.* **279** (13): 12300-11.
- van Leeuwen FN, Giepmans BN, van Meeteren LA, Moolenaar WH. (2003b). Lysophosphatidic acid: mitogen and motility factor. *Biochem Soc Trans.* **31** (Pt 6): 1209-12.
- van Leeuwen FN, Olivo C, Grivell S, Giepmans BN, Collard JG, Moolenaar WH. (2003a). Rac activation by lysophosphatidic acid LPA1 receptors through the guanine nucleotide exchange factor Tiam1. *J Biol Chem.* **278** (1): 400-6.
- van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, Pradere JP, Pettit TR, Wakelam MJ, Saulnier-Blache JS, Mummery CL, Moolenaar WH, Jonkers J. (2006). Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol.* **26** (13): 5015-22.
- Vega-Diaz B, Herron GS, Michel S. (2001). An autocrine loop mediates expression of vascular endothelial growth factor in human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol.* **116** (4): 525-30.
- Vikkula M, Boon LM, Carraway KL 3rd, Calvert JT, Diamonti AJ, Goumnerov B, Pasyk KA, Marchuk DA, Warman ML, Cantley LC, Mulliken JB, Olsen BR. (1996). Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. *Cell.* **87** (7): 1181-90.
- Waeber C, Blondeau N, Salomone S. (2004). Vascular sphingosine-1-phosphate S1P1 and S1P3 receptors. *Drug News Perspect.* **17** (6): 365-82.
- Wang F, Van Brocklyn JR, Hobson JP, Movafagh S, Zukowska-Grojec Z, Milstien S, Spiegel S. (1999). Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *J Biol Chem.* **274** (50): 35343-50.
- Ward NL, Dumont DJ. (2002). The angiopoietins and Tie2/Tek: adding to the complexity of cardiovascular development. *Semin Cell Dev Biol.* **13** (1): 19-27.
- Wary KK, Humtsoe JO. (2005). Anti-lipid phosphate phosphohydrolase-3 (LPP3) antibody inhibits bFGF- and VEGF-induced capillary morphogenesis of endothelial cells. *Cell Commun Signal.* **3**: 9.
- Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, Horwitz AF. (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol.* **6** (2): 154-61.
- Weiner JA, Chun J. (1999) Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 5233–8.

- Wu X, Ma J, Han JD, Wang N, Chen YG. (2006). Distinct regulation of gene expression in human endothelial cells by TGF-beta and its receptors. *Microvasc Res.* **71** (1):12-9.
- Xin C, Ren S, Kleuser B, Shabahang S, Eberhardt W, Radeke H, Schafer-Korting M, Pfeilschifter J, Huwiler A. (2004). Sphingosine 1-phosphate cross-activates the Smad signaling cascade and mimics transforming growth factor-beta-induced cell responses. *J Biol Chem.* **279** (34): 35255-62.
- Xing Y, Ganji SH, Noh JW, Kamanna VS. (2004). Cell density-dependent expression of EDG family receptors and mesangial cell proliferation: role in lysophosphatidic acid-mediated cell growth. *Am J Physiol Renal Physiol.* **287** (6): F1250-7.
- Yamagishi S, Matsumoto T, Numakawa T, Yokomaku D, Adachi N, Hatanaka H, Yamada M, Shimoke K, Ikeuchi T. (2005). ERK1/2 are involved in low potassium-induced apoptotic signaling downstream of ASK1-p38 MAPK pathway in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res.* **1038** (2): 223-30.
- Yang AH, Ishii I, Chun J. (2002). In vivo roles of lysophospholipid receptors revealed by gene targeting studies in mice. *Biochim Biophys Acta.* **1582** (1-3): 197-203.
- Yang WJ, Yang DD, Na S, Sandusky GE, Zhang Q, Zhao G. (2005). Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem.* **280** (10): 9330-5.
- Yano H, Mazaki Y, Kurokawa K, Hanks SK, Matsuda M, Sabe H. (2004). Roles played by a subset of integrin signaling molecules in cadherin-based cell-cell adhesion. *J Cell Biol.* **166** (2): 283-95.
- Yatomi Y, Ozaki Y, Ohmori T, Igarashi Y. (2001) Sphingosine 1-phosphate: synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediators.* **64**, 107-122.
- Ye X, Hama K, Contos JJ, Anliker B, Inoue A, Skinner MK, Suzuki H, Amano T, Kennedy G, Arai H, Aoki J, Chun J. (2005). LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature* **435** (7038): 104-8.
- Yue J, Yokoyama K, Balazs L, Baker DL, Smalley D, Pilquil C, Brindley DN, Tigyi G. (2004). Mice with transgenic overexpression of lipid phosphate phosphatase-1 display multiple organotypic deficits without alteration in circulating lysophosphatidate level. *Cell Signal.* **16** (3): 385-99.
- Zachary I. (2003). VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans.* **31** (Pt 6): 1171-7.
- Zhang N, Sundberg JP, Gridley T. (2000). Mice mutant for Ppap2c, a homolog of the germ cell migration regulator wunen, are viable and fertile. *Genesis* **27** (4): 137-40.
- Zhao Y, He D, Saatian B, Watkins T, Spannhake EW, Pyne NJ, Natarajan V. (2006). Regulation of lysophosphatidic acid-induced epidermal growth factor receptor transactivation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells by protein kinase Cdelta, Lyn kinase, and matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* **281** (28): 19501-11.
- Zhong XP, Hainey EA, Olenchock BA, Zhao H, Topham MK, Koretzky GA. (2002). Regulation of T cell receptor-induced activation of the Ras-ERK pathway by diacylglycerol kinase zeta. *J Biol Chem.* **277** (34): 31089-98.