

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**Facultad de Medicina**

**Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas**

**Estudio de la regulación funcional por fosforilación del receptor  
LPA1 inducida por el EGF y la Angiotensina II**

**Tesis para obtener el grado de Doctor en ciencias Biomédicas.**

**Alumno:**

**Christian Cedrick Colin Santana**

**Tutor:**

**Jesús Adolfo García Saínz**



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.

<b>INDICE.....</b>	<b>2</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
1.1 Receptores acoplados a proteínas G.....	6
1.2 Proteínas G.....	7
1.3 Sistemas Efectores.....	8
1.4 Desensibilización.....	9
1.5 Acido Lisofosfatidico.....	10
1.6 Receptores LPA.....	12
1.7 Angiotensina.....	15
1.8 Receptores para Angiotensina II.....	16
1.9 Factor de Crecimiento Epidermal.....	17
1.10 Receptor de Factor de Crecimiento Epidermal.....	19
<b>2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION.....</b>	<b>21</b>
<b>3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>4. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>24</b>
4.1 Cultivo Celular.....	25
4.2 Determinación de la concentración de calcio intracelular Ca <sup>2+</sup> .....	25
4.3 Fosforilación de los receptores.....	26
4.5 Ensayo de “Western blot”.....	26
4.6 Estudios de microscopia confocal.....	27
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
5.1 Medición de [Ca <sup>2+</sup> ] intracelular liberado.....	30
5.2 Inmunoprecipitación del receptor LPA1-eGFP fosforilado.....	31
5.3 Internalización del receptor LPA1-eGFP.....	36
5.4 Segunda Etapa (transactivación del EGFR).....	38
5.5 Inmunoblot de enzima pAkt.....	38
5.6 Fosforilación de tirosinas del receptor para EGF.....	39
<b>6. DISCUSION Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>43</b>
<b>7. REFERENCIAS.....</b>	<b>47</b>

## **ABREVIATURAS**

GPCRs - Receptores Acoplados a Proteínas G

PKC - Proteína Cinasa C

PI3K - Fosfoinositido 3 Cinasa

PLC – Proteína Fosfolipasa C

PLD – Proteína Fosfolipasa D

GRKs – Proteína Cinasa de Receptores Acoplados a Proteínas G

LPA – Acido Lisofosfatidico

EGF – Factor de Crecimiento Epidermal

eGFP – Proteína Verde Fluorescente

DAG – Diacil Glicerol

IP3 - Insositol 4,5 trifosfato

LDL – Lipoproteína de Baja Densidad

## **ABSTRACT**

### **BACKGROUND:**

Lysophosphatidic acid (LPA) is a local mediator that exerts its actions through G protein coupled receptors. Knowledge on the regulation of such receptors is scarce to date. Here we show that bidirectional cross-talk exists between LPA<sub>1</sub> and EGF receptors.

### **METHODS:**

C9 cells expressing LPA<sub>1</sub> receptor fused to the enhanced green fluorescent protein were used. We studied intracellular calcium concentration, Akt/PKB phosphorylation, LPA<sub>1</sub> and EGF receptor phosphorylation.

### **RESULTS:**

EGF diminished LPA-mediated intracellular calcium response and induced LPA<sub>1</sub> receptor phosphorylation, which was sensitive to protein kinase C inhibitors. Angiotensin II and LPA induced EGF receptor transactivation as evidenced by Akt/PKB phosphorylation through metalloproteinase-catalyzed membrane shedding of heparin-binding EGF and autocrine/paracrine activation of EGF receptors. This process was found to be of major importance in angiotensin II-induced LPA<sub>1</sub> receptor phosphorylation. Attempts to define a role for EGF receptor transactivation in homologous LPA<sub>1</sub> receptor desensitization and phosphorylation suggested that G protein-coupled receptor kinases are the major players in this process, overshadowing other events.

### **CONCLUSIONS:**

EGF receptors and LPA<sub>1</sub> receptors are engaged in an intense liaison, in that EGF receptors are capable of modulating LPA<sub>1</sub> receptor function through phosphorylation cascades. EGF transactivation plays a dual role: it mediates some LPA actions, and it modulates LPA<sub>1</sub> receptor function in inhibitory fashion.

### **GENERAL SIGNIFICANCE:**

EGF and LPA receptors coexist in many cell types and play key roles in maintaining the delicate equilibrium that we call health and in the pathogenesis of many diseases. The intense cross-talk described here has important physiological and pathophysiological implications.

## INTRODUCCIÓN

Los seres vivos tienen la capacidad de ajustarse a las condiciones presentadas por el medio ambiente. Esto se da gracias a que las células son capaces de responder organizadamente y establecer las condiciones fisiológicas necesarias para mantener al organismo con vida. De este modo, dentro de un organismo pluricelular las funciones celulares se distribuyen entre diferentes poblaciones de células en donde cada célula depende de otra. Para coordinar estas funciones deben existir mecanismos de comunicación intercelular que permitan intercambiar información fisicoquímica con el medio ambiente y con otras células. Y así, cuando las células reciban algún estímulo podrán responder dependiendo de las características del mismo y el tipo de célula receptora.

La señalización celular ocurre a través de rutas en las que las proteínas transducen la señal inicial en el interior de la célula, siendo así los principales efectores y actuando como receptores, enzimas, canales y proteínas reguladoras que reconocen, amplifican e integran las diversas señales externas; generando así una respuesta celular.

Las moléculas de señalización son muy variables de acuerdo a su naturaleza, pueden ser péptidos, polipéptidos, glucopéptidos, aminoácidos, derivados de aminoácidos, proteínas o de estructura esteroidea, entre muchas otras, de acuerdo a esta naturaleza química y propiedades y características fisicoquímicas pueden o no atravesar la membrana celular, las moléculas hidrosolubles por ejemplo no pueden atravesar la membrana por lo que las células deben expresar receptores en la superficie celular para poder recibir la señal de activación e inactivación. Para las moléculas liposolubles que pueden atravesar la membrana las células expresan receptores que se encuentran dentro de ella.

Los receptores de la superficie celular o de membrana citoplasmática se pueden clasificar en cuatro tipos básicos:

- 1.- Receptores acoplados a proteínas G
- 2.- Receptores canales iónicos
- 3.- Receptores con actividad enzimática

## RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) constituyen una gran familia de receptores sobre la superficie celular, con más de mil miembros constituyen aproximadamente el 2% de los genes presentes en el genoma de mamíferos. Estos receptores celulares median respuestas a su interacción con diversas moléculas de señalización como los neurotransmisores, neuropéptidos, hormonas, péptidos vasoactivos, aromatizantes, saborizantes, glucoproteínas y otros mediadores locales.

Estos receptores se componen de una estructura formada por 7 dominios transmembranales conectados por 3 asas extracelulares y 3 asas intracelulares. Las asas extracelulares y todas las porciones de los dominios que apuntan hacia el exterior de la célula son potenciales dominios de unión al ligando; Por otro lado, las asas citoplasmáticas y el extremo carboxi-terminal contienen potenciales sitios de unión a la proteína G y los de fosforilación para la cascada de desensibilización (Vassilatis et al., 2003 y Strotmann et al., 2011)

### PROTEÍNAS G.

Debido a su estructura molecular, las proteínas G se clasifican en dos tipos: monoméricas y heterotriméricas. Las primeras, pequeñas o monoméricas, con una única subunidad, se encuentran libres en el citosol y nucleoplasma. Las segundas, son heterotrímeros (tres subunidades) que se encargan de regular los efectos de una gran cantidad de señales biológicas. Las subunidades que las conforman son  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , con estas dos últimas funcionando como una sola unidad (un heterodímero) al formar un complejo estrechamente asociado. La subunidad  $\alpha$  de las proteínas G posee un sitio de unión con alta afinidad por nucleótidos de guanina, así como actividad de GTPasa, hidrolizando el GTP a GDP (De Vires et al., 2000). Gracias a esta característica, las proteínas G pueden encontrarse en dos estados: con la subunidad  $\alpha$  asociada a GDP y unida al complejo  $\beta\gamma$  en un estado inactivo, y con la subunidad  $\alpha$  asociada a GTP y dissociada del complejo  $\beta\gamma$  teniendo como consecuencia su activación (figura 1). Una vez que el heterotrímero es activado, tanto la subunidad  $\alpha$  como el complejo  $\beta\gamma$  actúan sobre proteínas efectoras. Los sistemas efectoras a los que están asociadas las proteínas G son diversos, por ejemplo, se sabe que las proteínas Gq estimulan a la fosfolipasa C (PLC) induciendo la formación

de dos segundos mensajeros, el 1,4,5-trifosfato de inositol [Ins(1,4,5)P3 ó IP3] y el diacilglicerol (DAG), mientras que las proteínas Gs y Gi estimulan e inhiben, respectivamente, la formación del monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) por acción sobre la enzima adenilil ciclase (AC). (Tuteja et al., 2009 y Johnson et al., 2002).

También se sabe que receptores de familias de diversas estructuras moleculares y vías de señalización diferentes se pueden comunicar unos con otros compartiendo componentes de señalización, como por ejemplo una misma proteína G. Como resultado, las células pueden registrar y procesar simultáneamente estímulos distribuidos en un complejo medio ambiente, de una manera eficiente y ordenada (Gautam et al., 1998).

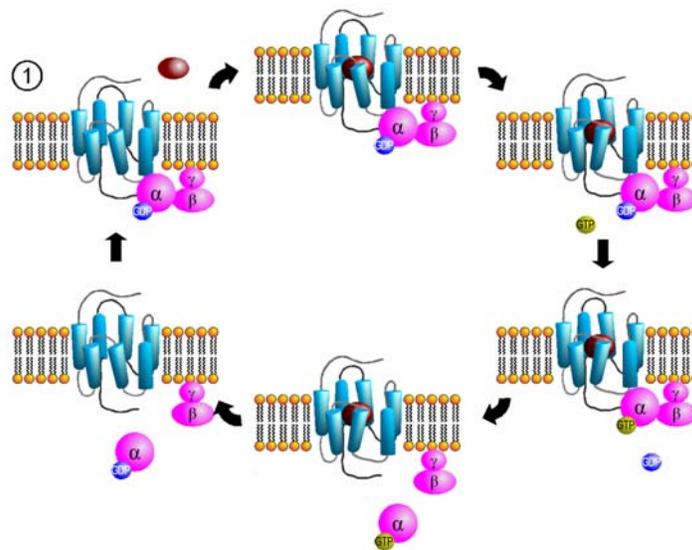


Fig 1. Asociación de las proteínas G a la activación de los GPCRs. La llegada de la hormona al receptor provoca la activación de la proteína G, lo que trae como consecuencia la disociación de la subunidad  $\alpha$  y las subunidades  $\beta\gamma$ . La subunidad  $\alpha$ , con actividad GTPasa, incorpora GTP, lo que a su vez da lugar a la activación de proteínas efectoras. La posterior hidrólisis del GTP devuelve a la proteína G a su conformación original.

## **SISTEMAS EFECTORES**

### **Adenil ciclasa**

Existen ligandos que ejercen su acción celular mediante la activación o inhibición de la enzima adenil ciclasa, cuya función es generar AMP cíclico a (AMPc) partir de ATP. El AMPc activa de manera específica la proteína cinasa A, la cual provoca la fosforilación de varias proteínas modificando la función de éstas y teniendo como consecuencia la respuesta celular a la acción del ligando. Los ligandos que tienen acción inhibitoria sobre la formación de AMPc actúan a través de una proteína Gi; dicha acción es contraria a la producida por un ligando estimulante de la formación de AMPc vía proteína Gs. El AMPc formado es hidrolizado por una fosfodiesterasa que lo inactiva.

### **Fosfoinositoles y movilización de Ca<sup>2+</sup>**

La hidrólisis de fosfoinosítidos parte de fosfolípidos de membrana generan productos con diversa actividad biológica como la movilización de Ca<sup>2+</sup>. El efector catalítico es una fosfoinositidasa, la fosfolipasa C (PLC), capaz de hidrolizar el fosfadilinositol-4,5-bifosfato y generar el diacilglicerol (DAG) que permanece en la membrana, así como el inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) que se libera al citoplasma. El IP3 tiene la capacidad de movilizar el Ca<sup>2+</sup> desde los depósitos intracelulares al citoplasma. Esta liberación del calcio de los depósitos del retículo promueve la entrada del Ca<sup>2+</sup> extracelular hacia el interior de la célula a través de canales de Ca<sup>2+</sup>. Como resultado de la unión del DAG con la PLC y en presencia del Ca<sup>2+</sup> la proteína cinasa C es activada, proteína, encargada de modificar diversos procesos celulares.

### **Fosfolipasa A2.**

La enzima fosfolipasa A2 libera ácido araquidónico (AA) a partir de fosfolípidos de membrana como la fosfatidilcolina y el ácido fosfatídico. Como consecuencia el ácido araquidónico puede activar a la PKC y a la PLC, de igual manera aumenta la concentración de Ca<sup>2+</sup> y modula la actividad de algunos canales de K<sup>+</sup>.

### **Canales iónicos.**

Las proteínas G pueden activar canales iónicos por mecanismos directos e indirectos. En la activación directa la proteína G activada actúa sobre la molécula del canal sin compuestos intermedios. La activación indirecta implica que la proteína G activada provoca la liberación de segundos mensajeros y sus respectivos sistemas efectores, los que actúan sobre el canal, modulando su apertura o cierre (Alberts et al, 2002).

## **DESENSIBILIZACIÓN**

Los receptores de siete dominios transmembranales, como todas las proteínas, sufren un ciclo biológico determinado que comienza con su síntesis, seguido de su ensamblaje dentro de la membrana plasmática y de su posterior degradación dentro de la célula. No obstante este reciclaje natural, hay determinadas situaciones en las cuales los receptores son regulados en función de la homeostasis celular. La desensibilización de receptores es un proceso que se caracteriza por la pérdida de respuesta celular ante la acción de un ligando endógeno o de un fármaco sobre la célula. Se trata de un fenómeno que tiene como consecuencia mantener la homeostasis celular, es decir, la desensibilización tiene como objetivo proteger a la célula de alguna estimulación excesiva o prolongada (Lefkowitz et al, 1998).

El proceso de desensibilización comienza cuando el receptor es fosforilado. Una vez fosforilado, las proteínas citosólicas beta-arrestinas se unen al receptor impidiendo un mayor acoplamiento con las proteínas G (desensibilización). Posteriormente comienza el proceso de endocitosis del receptor lejos de la superficie celular por un evento conocido como internalización o secuestro. Una vez internalizados los receptores son transportados a compartimientos intracelulares especializados, donde pueden ser defosforilados y reciclados hacia la membrana plasmática o enviados al camino de la degradación (Lefkowitz et al, 1998).

### **Tipos de desensibilización.**

Desensibilización homóloga. Ocurre en presencia del ligando y es un proceso de pérdida de la capacidad de respuesta celular, frecuentemente asociada a una disminución de la afinidad del receptor por modificaciones de la conformación molecular. Dicha modificación puede ser ocasionada por la adición de grupos fosfato al receptor a través de las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs). De igual manera la desensibilización

puede ser por inhibición de la síntesis de novo de receptores, o bien por una disminución en el número total de receptores funcionales en la membrana celular.

Desensibilización heteróloga. La pérdida de la capacidad de respuesta celular ocurre en ausencia del ligando y es debido a cambios que modifican el funcionamiento del complejo fármaco-receptor. Dicho cambio es ocasionado por la fosforilación del receptor llevada a cabo por cinasas dependientes de segundos mensajeros, puede incluir la imposibilidad de formar el complejo activo de una proteína G, o la incapacidad de liberar un segundo mensajero intracelular esencial en la cadena de señalización del sistema efector (Ferguson et al., 1998).

### **ACIDO LISOFOSFATIDICO**

El monoacil-glycerol-3-fosfato, conocido como ácido lisofosfatídico (LPA), es un fosfolípido con propiedades de mensajero intercelular con diversos efectos biológicos. El suero sanguíneo, la saliva (Tigy et al., 1992; Sano et al., 2002; Aoki et al., 2002 y Eichholtz et al., 1993), las plaquetas activadas (Schumacher et al., 1979; Simon, et al., 1982; Watson et al., 1985 y Mauco et al., 1978), el fluido folicular (Tokumura et al., 1999) y el líquido de ascitis son las principales fuentes de este fosfolípido hasta ahora identificadas (Zheng et al., 2001).

El conocimiento sobre cómo y dónde se origina este fosfolípido, en condiciones fisiológicas normales, es aún incierto. Hasta ahora se ha demostrado que las fosfolipasas A y D están involucradas en la biosíntesis de este fosfolípido generado a partir de la degradación de fosfatidilcolina, la hidrólisis del ácido fosfatídico, la hidrólisis de lisofosfolípidos por la fosfolipasa-D (PLD) y la oxidación de las proteínas de baja densidad (LDL) (Tigy et al., 2003 y S. Okudaira et al., 2010).

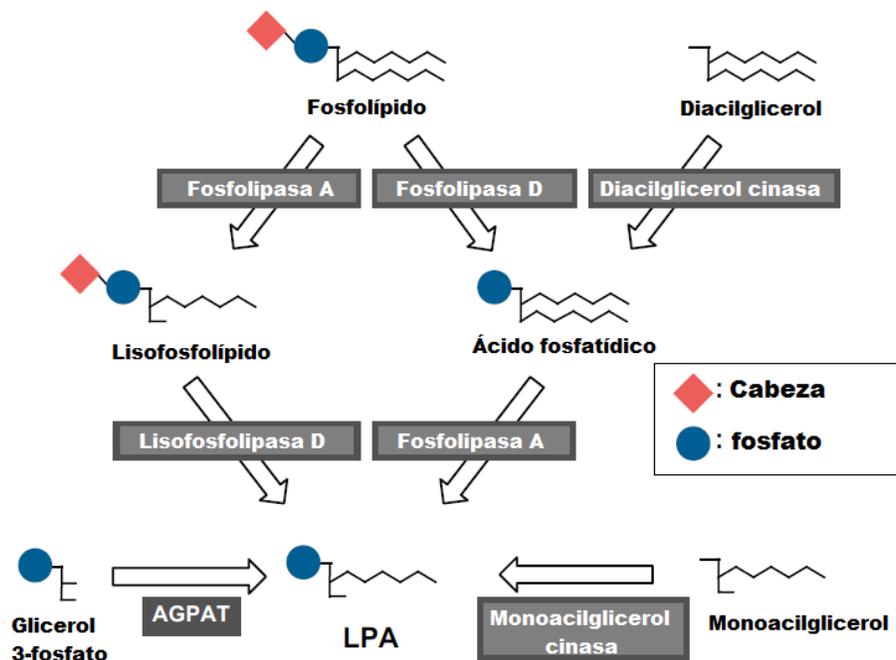


Figura 2. Vía Síntesis del LPA. El LPA puede ser producido por diferentes vías. Las cabezas de de los fosfolípidos son cortadas por las lisofosfolipasa D, generando acido fosfatídico, el cual es hidrolizado por la fosfolipasa A. El Acido fosfatídico también puede ser producido por la cianasa de diacilglicerol. La cadena acil del fosfolípido es hidrolizada por la fosfolipasa A y posteriormente las cabezas de los lisofosfolípidos son cortadas por la lisofosfolipasa D teniendo como consecuencia al LPA. Otra manera de generar LPA, es mediante la adición de un grupo fosfato al monoacilglicerol, esto mediante la monoacilglicerol cinasa. La aciltransferasa puede generar LPA del glicerol 3-fosfato.

Desde el descubrimiento del papel del LPA como factor de crecimiento, la lista de repuestas celulares en las que interviene este fosfolípido se ha elevado considerablemente. Dentro de los diversos efectos descritos se encuentran: La proliferación celular, la sobrevivencia celular, la migración celular (Tigy et al., 2003), la invasión de células tumorales (carcinomas, hepatomas y células T) (Fang et al., 2000), cicatrización (Balazs et al., 2001), el crecimiento y el plegamiento de la corteza cerebral durante el desarrollo (Kingsbury et al., 2003), agregación de las plaquetas (Tigy et al., 2003), la remodelación vascular (Fang et al., 2000), la retracción de neuritas (Contos et al., 2000; Yuan et al., 2003), la contracción del músculo liso (Tigy et al., 2003), la diferenciación celular, la depolarización de la membrana (Tigy et al., 2003), el incremento en la permeabilidad endotelial (Tigy et al., 2003), la inhibición en la comunicación tipo “gap junction” (Postma et al., 1998) y la maduración de ovocitos de mamíferos (Hinokio et al., 2002); entre muchos otros.

Los diversos efectos inducidos por el LPA se llevan a cabo mediante la activación de seis diferentes subtipos de receptores de siete dominios transmembranales: LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub>, LPA<sub>3</sub>, LPA<sub>4</sub> (Tigy et al., 2003), LPA<sub>5</sub> (Chun et al., 2005) y LPA<sub>6</sub> (Pasternak et al., 2008 y Lee et al., 2009). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) o de siete dominios transmembranales.

## **RECEPTORES LPA**

Se sabe que la señal del ácido lisofosfatídico (LPA) ocurre a través de receptores de pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G. El primero en describir la existencia de receptores para LPA fue el grupo de Moolenaar. Con base en los resultados obtenidos de ensayos de fotoafinidad el grupo de Moolenaar pudo demostrar la existencia de una proteína de membrana de entre unos 38-40 kDa presente en neuronas, fibroblastos y algunos tipos de células cancerígenas (Postma et al, 1996).

El primer receptor identificado de lisofosfolípidos fue el gen de la zona ventricular 1 (vzg-1, del inglés, ventricular zone gene 1). Este gen se identificó en 1996 durante el estudio de la neurogénesis en mamíferos, en el cual se clonó un receptor huérfano que se había aislado por su expresión en la zona neurogénica de la corteza cerebral embrionaria (Hecht et al, 1996 y Chun et al, 1999). Este gen vzg-1 codifica un receptor acoplado a proteínas G que tiene alta afinidad por el LPA. Actualmente se sabe que este gen se encuentra localizado en el locus del cromosoma 9q31.3 del humano (y en mamífero) codifica para una proteína de 41 kDa constituida por 364 aminoácidos, con siete dominios transmembrana, y que comparte homología con otros dos receptores conocidos, el receptor de cannabinoides y el de melanocortina (30 % y 32 % de identidad de aminoácidos, respectivamente). Sin embargo, la mayor similitud la comparte con otro gen para un receptor huérfano clonado de células endoteliales humanas edg-1 (37% de identidad de aminoácido) (Hla T., y Maciag T., 1990).

Basándose en la secuencia de nucleótidos obtenida del receptor LPA<sub>1</sub>, aparecieron en la base de datos de secuencias de ADN otros receptores huérfanos o fragmentos de secuencia de expresión los cuales interactuaban también con LPA o con lisofosfolípidos similares tales como esfingosina 1-fosfato (S1P). Hasta la fecha se han identificado al menos seis receptores de LPA (LPA<sub>1</sub>-6) (Bandoh et al, 2000; Fukushima et al, 2001;

Anliker y Chun 2004; Noguchi et al, 2009; Yanagida et al, 2009 y Choi et al, 2010) y otros dos receptores adicionales (GPR87 y P2Y10) han mostrado cierta sensibilidad a LPA (Tabata et al, 2007 y Murakami et al, 2008). Tres de ellos, originalmente denominados EDG-2/VZG-1/rec1.3, EDG-4 (no-mutante) y EDG-7 están íntimamente relacionados con la familia EDG de receptores de proteína G (Kupperman et al, 2000). Estos receptores fueron más tarde renombrados siguiendo la normativa de la IUPHAR recibiendo así los nombres LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub> y LPA<sub>3</sub> respectivamente (Ishii et al, 2002).

Más tarde, se clonó un cuarto receptor en humanos, el LPA4/GPR23/P2Y6. Este receptor tiene sólo un 20-24 % de identidad de aminoácidos con LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub> y LPA<sub>3</sub>, lo cual significa que existe una mayor distancia evolutiva entre LPA4 y los otros receptores; de hecho, LPA<sub>4</sub> se encuentra más relacionado con los receptores de la familia P2Y GPRC (Candelore et al, 2002) que con la familia EDG. Uno de los últimos receptores identificados, LPA5, también tiene una secuencia de aminoácidos bastante diferente, la cual muestra sólo un 35 % aproximadamente de identidad con LPA<sub>4</sub>. Por otro lado, el alineamiento de la secuencia de los receptores LPA<sub>5</sub> /GPR92 de ratón y de humano mostró una equivalencia del 80 % apuntando que dicho receptor está filogenéticamente muy bien conservado (Fig 1).

En resumen los receptores LPA<sub>4</sub> y LPA<sub>5</sub> están más relacionados filogenéticamente entre si, mientras que los tres primeros LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub> Y LPA<sub>3</sub> están más cercanos unos a otros (lee et al 2006). Recientemente un último receptor de LPA fue descubierto (Pasternak et al 2008) y ha sido denominado LPA<sub>6</sub> y se encuentra asociado a los receptores LPA<sub>4-5</sub>.

Nombre receptor	Nombre de los genes (sinónimos históricos)		Num. de aminoácidos		Masa mol. kDa
	Humano	Ratón	Humano	Ratón	
LPA <sub>1</sub>	<i>LPAR1</i>	<i>Lpar1</i>	364	364	41.0
	(EDG2; VZG1; LP <sub>A1</sub> , GPR26; edg-2; vzg-1; Gpcr26; Mrec1.3; rec0.1.3)	(Edg2; Kdt2; lp <sub>A1</sub> ; vzg-1; Gpcr26; AI326300; MGC29102; 5031439C20)			
LPA <sub>2</sub>	<i>LPAR2</i>	<i>Lpar2</i>	351	348	38.9
	(EDG4; EDG-4; LP <sub>A2</sub> , LPA-2; FLJ93869)	(Edg4; lp <sub>A2</sub> )			
LPA <sub>3</sub>	<i>LPAR3</i>	<i>Lpar3</i>	353	354	40.0
	(EDG7; Edg-7; LP <sub>A3</sub> ; HOFNH30; FLJ98231; RP4-678I3)	(Edg7; lp <sub>A3</sub> )			
LPA <sub>4</sub>	<i>LPAR4</i>	<i>Lpar4</i>	370	370	41.8

	(P2Y9; GPR23; P2RY9; P2Y5-LIKE)	(p2y9; Gpr23; 5730485F04Rik)			
<b>LPA<sub>5</sub></b>	<i>LPAR5</i>	<i>Lpar5</i>	372	384	41–43
	(GPR92; GPR93; KPG_010)	(GPR93; Gpr92; Gm1072)			
<b>LPA<sub>6</sub></b>	<i>LPAR6</i> (proposed)	<i>Lpar6</i> (proposed)	344	344	39.3
	(LAH3; P2Y5; P2RY5; MGC120358)	(P2y5; P2ry5; 2610302I02Rik)			

Fig 3. Nombre, numero de aminoácidos y masa molecular de los receptores LPA conocidos y propuestos (Chun et al., 2010).

Alternativamente, en algunos tipos celulares, los efectos de LPA fueron independientes de los receptores GPRC. Esta observación se pudo explicar tras los resultados que demostraron que el LPA también es capaz de atravesar la membrana celular y actuar como agonista del receptor nuclear gamma activado (PPAR $\gamma$ ) (McIntyre et al, 2003).

Se sabe que los receptores para LPA pertenecientes al grupo de GPCRs pueden estar acoplados a tres familias de proteínas G: Gai, Gaq, y G $\alpha$ 12/13. LPA<sub>1</sub> y LPA<sub>2</sub> son conocidos por interactuar con estas tres familias de proteínas G. Mientras LPA<sub>3</sub> interactúa con Gai y Gaq, pero no con proteínas G $\alpha$ 12/13. Adicionalmente, LPA<sub>4</sub> puede ser una excepción ya que parece acoplarse con un cuarto tipo de familia de proteínas G, las Gas (Fig 4). Recientemente se descubrió que el LPA puede modular también directamente algunos canales iónicos (Nieto, P., et al 2011).

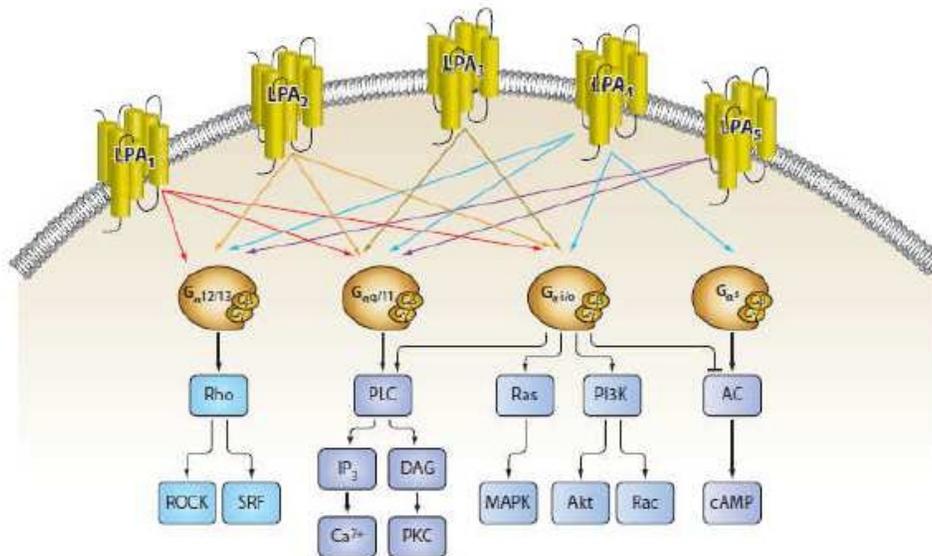


Fig 4. Rutas de señalización activadas por los distintos receptores de LPA. Los diferentes subtipos de receptores LPA pueden activar diversos efectores ya que se encuentran acoplados a uno o mas subtipos de proteínas G.

En el caso de los receptores acoplados a proteínas G, la unión del ligando a su receptor causa un cambio conformacional que induce la correspondiente respuesta de la proteína G.

Esta cadena de eventos activa los procesos regulados por estas proteínas G:

- Activación de Rho vía G $\alpha$ 12/13. Teniendo como consecuencia la migración celular.
- Activación vía G-( $\alpha$ ) q/11, de fosfolipasa C (PLC) con la subsecuente activación final de la proteína (cinasa) C (PKC, del ingles, protein kinase C) y movilización Ca<sup>2+</sup>.
- Activación, vía Gi/o mediada, bien por las GTPasas Ras, con cambio en la actividad de proteína cinasas activadas por MAPK (mitogen activated protein kinases) con subsiguiente activación de la serina/treonina cinasa Akt, ambas con consecuencias en la proliferación, supervivencia y apoptosis.
- Inhibición/activación vías Gs, de adenil ciclasa (AC) resultando en la activación de la acumulación de AMPc y la movilización de Ca<sup>2+</sup>.

La variedad de mecanismos generados por el LPA subyacen en los diferentes tipos de acoplamientos que pueden formar con distintas proteínas G dependiendo del contexto celular (Gudermann et al., 1996).

## ANGIOTENSINA II

Actualmente sabemos que hay tres tipos de angiotensinas: la I, la II y la III. Las angiotensinas parten de un péptido de 14 aminoácidos que va siendo digerido por la enzima proteolítica renina en productos cada vez más pequeños variando sus efectos y los receptores a través de los cuales actúan; Dicho de otra manera, la angiotensina I parte del angiotensinógeno, de ella la angiotensina II y de ésta a su vez la angiotensina III; siendo la angiotensina II (octapeptido) la más potente de ellas; estimulando la sed, ingesta de líquido, aumento de la presión sanguínea y secreción de aldosterona (Gavras et al., 1997).

La angiotensina II desencadena respuestas tanto centrales como periféricas, estimula intensamente la sed, libera vasopresina, ACTH y aldosterona, además de ejercer su conocido efecto de elevación de la presión sanguínea del que deriva su nombre. La

angiotensina II es el agente vasoconstrictor más potente que se conoce hasta la fecha; además es un importante regulador de la secreción de la hormona aldosterona actuando a través de la corteza de la glándula suprarrenal. En el corazón, la angiotensina II incrementa el flujo de calcio aumentando la contracción del músculo. Finalmente, se ha reportado que este polipéptido es capaz de alterar el metabolismo hepático así como de favorecer la secreción de la vasopresina (Gavras et al, 1997).

## **RECEPTORES PARA ANGIOTENSINA II**

Actualmente se sabe que la angiotensina II ejerce sus efectos a través de receptores tisulares específicos: los receptores tipo 1 o AT1 y los receptores tipo 2 o AT2 (5, 6). La activación del receptor AT1 promueve la liberación del calcio almacenado en el retículo sarcoplásmico y la posterior entrada de calcio extracelular a través de canales de calcio dependientes de voltaje, produciendo contracción de las células musculares lisas, liberación de aldosterona de la zona glomerulosa suprarrenal o liberación de noradrenalina de los terminales simpáticos periféricos. Además estimula la expresión de diversos factores de transcripción (c-myc, c-fos, c-jun), favoreciendo la síntesis de ADN y proteínas y con ello el crecimiento y la proliferación celular (Timmermans et al., 1991).

El receptor AT2 presenta una homología de sólo un 34 % con el receptor AT1. La activación de los receptores AT2 conduce a la estimulación de la enzima tirosina fosfatasa que regula la actividad de diversas proteínas relacionadas con la expresión de protooncógenes (Bottari et al., 1992). En cultivos celulares donde se expresan los receptores AT2 se ha demostrado también que la estimulación de estos receptores por la AII puede afectar a la actividad guanilato ciclasa y a la producción de GMP cíclico (Mukoyama et al, 1993).



epidermis, motivo por el cual se le denominó factor de crecimiento epidérmico (Mroczkowski et al, 1990). No está de más mencionar que 24 años después les fue otorgado el premio Nobel de Medicina por dicho descubrimiento.

Actualmente se acepta que el gen del EGF (120 kilobases en el cromosoma 4) se traduce en un precursor de transmembrana de 1.217 aminoácidos y que la secuencia del EGF maduro (53 aminoácidos) es liberada mediante un proceso proteolítico que es común con el que sucede en las moléculas precursoras de otros miembros de la familia, como el TGF- $\alpha$ . Esta proteólisis es relativamente lenta y consta de dos etapas; primero se produce una escisión sobre los residuos de alanina o valina más próximos al extremo carboxiterminal del péptido maduro 9, y luego una segunda proteólisis sobre un residuo de valina del extremo carboxiterminal de la cadena intracitoplasmática, que se supone permitiría un control intracelular sobre la liberación del EGF maduro al medio (Bell et al, 1986).

El EGF induce una serie de respuestas biológicas que son mediadas a través de un receptor con actividad de tirosina cinasa localizado en la superficie celular. Dentro de estas respuestas biológicas se encuentran: la proliferación celular, la diferenciación, la organogénesis, la angiogénesis y acelera la cicatrización; actúa como un inhibidor de la secreción de ácido en estomago, estimula la proliferación de células embrionarias e incrementa la liberación de calcio del hueso. También promueve la reabsorción ósea y es un potente agente quimiotáctico para fibroblastos y células epiteliales (Barchman et al, 1989)

El EGF está ampliamente distribuido en casi todos los fluidos y secreciones corporales, se encuentran altos niveles del mismo en orina, fluidos y secreciones mamarias, fluidos prostáticos y seminales, saliva, lágrimas, líquido amniótico, sudor de la mama, y jugo gástrico (Mroczkowski et al, 1990).

La forma madura y soluble de EGF es una proteína de 6,4 kDa que es detectable en muchos tejidos y prácticamente todos los fluidos humanos, por ejemplo: orina (80 ng/mL), jugos gástricos (0.3 ng/mL), fluidos seminales (25 ng/mL), sudor axilar (1 ng/mL), líquido amniótico de tercer trimestre de embarazo (3 ng/mL) y leche materna (50 ng/mL) (Mroczkowski et al., 1990).

## **Receptor EGF (Epidermal Growth Factor Receptor EGFR)**

El receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) pertenece a la superfamilia de receptores localizados en la membrana plasmática que presentan actividad intrínseca de tirosina cinasa. El receptor es una glicoproteína integral de membrana de 170 kDa que está constituida por un dominio extracelular amino terminal, un único dominio transmembranal y un dominio citoplasmático carboxilo terminal en el que se localiza el sitio catalítico responsable de la actividad de tirosina cinasa (Carpenter et al., 1979).

Más de la mitad de la cadena polipeptídica del EGFR forma su dominio extracelular. Este dominio, que contiene múltiples residuos N-glicosilados ricos en manosa, presenta dos zonas en las que existen un gran número de residuos de cisteína, entre las que se encuentra el sitio de unión al ligando. (Carpenter et al., 1979; Schlessinger et al., 1987)

El dominio transmembranal, como otros segmentos proteicos helicoidales que atraviesan membranas biológicas, es rico en aminoácidos hidrofóbicos. Este dominio juega un papel fundamental en la transmisión de información a través de la membrana plasmática, ya que comunica el sitio de unión al ligando extracelular con el sitio catalítico tirosina cinasa intracelular (Schlessinger et al., 1986).

En el dominio citoplasmático del EGFR se encuentra localizado el sitio catalítico responsable de su actividad de tirosina cinasa. Este sitio está altamente conservado entre los receptores de tirosina cinasa y las diferentes tirosinas cinasas que no son receptores. En este dominio se encuentra un residuo de lisina, el cual está implicado en la unión del ATP al receptor y cinco residuos de tirosina, que son susceptibles de ser fosforilados después de producirse la dimerización del receptor. Los residuos de fosfotirosina así generados sirven como sitios de reclutamiento y anclaje de proteínas que contienen dominios SH2 (Src homology domain 2) o dominios PTB (phospho-tyrosine-binding-domains) que inician las múltiples vías de señalización intracelular (Pawson T and Van Der Geer P., 1995).

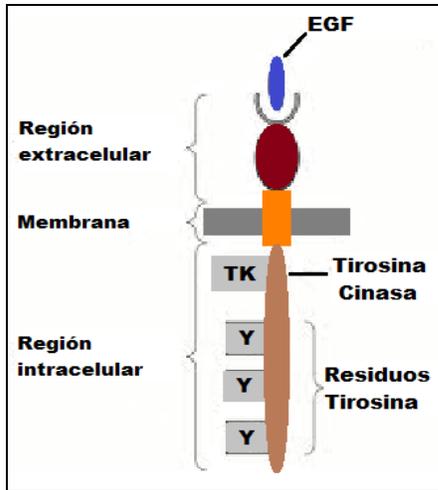


Fig 6. Estructura del Receptor de crecimiento epidermal. El receptor para EGF se compone de 3 secciones, la región extracelular (reconocimiento del ligando), la membranal y la región intracelular (donde se encuentran la Tirosina cinasa).

## ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Una de las características de las vías de transducción de señales de la célula, es que éstas están interconectadas y forman complejos entramados que juegan un papel muy importante en la plasticidad de la respuesta celular. Así, la redundancia y cooperatividad de estas vías son elementos evolutivos utilizados por la célula para asegurar su supervivencia, disminuyendo la posibilidad de daños irreparables en vías esenciales de señalización. Además, estas interconexiones generan respuestas celulares más complejas y adaptables a las diversas condiciones fisiológicas. Así, no es de extrañar que recientemente se hayan puesto en evidencia conexiones mutuas entre señales provenientes de receptores GPCR y receptores pertenecientes a otras familias no relacionadas.

Uno de los hallazgos más interesantes en el campo de la transducción de señales ha sido la demostración de que el EGFR puede ser también transactivado por diferentes miembros de la numerosa familia de GPCRs, como son los receptores de ácido lisofosfatídico, de adrenalina, de acetilcolina, de endotelina 1, de trombina y de ATP extracelular (Daub et al., 1996, 1997; Luttrell et al., 1997; Soltoff, 1998). Así, en fibroblastos de rata, se ha observado que tras la estimulación de las células con ácido

lisofosfatídico, endotelina 1 o trombina ocurre una rápida fosforilación del EGFR y del receptor ErbB2/Neu, así como la activación de la vía de las (quinasas activadas por mitogenos) (MAPKs). Esta activación y la subsecuente activación de la síntesis de ADN se suprimen en gran medida cuando las células son tratadas con inhibidores

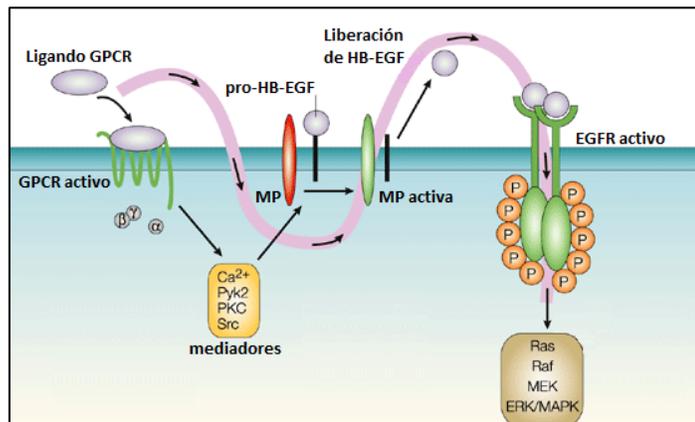


Fig 7. Transactivación del EGFR inducida por GPCRs. La liberación del HB-EGF es inducida por la activación del GPCR. Teniendo como consecuencia la activación del EGFR

específicos del EGFR, lo cual sugiere que éste está implicado en la activación de la vía de la MAPK mediada por agonistas de los GPCRs (Daub et al., 1996). En ciertos casos, estos procesos están mediados por el dímero formado por la subunidad ( $G\beta\gamma$ ) de las proteínas G heterotriméricas, que es liberado tras la activación de los GPCRs.  $G\beta\gamma$  activa

a Src y esta tirosina cinasa fosforila al EGFR quién induce el reclutamiento de la proteína adaptadora Shc, la cual a su vez se une al complejo Grb2/Sos activando así la vía Ras/MAPK (Luttrell et al., 1997). La transactivación del EGFR por GPCRs ha sido también observada en otros tipos celulares como son queratinocitos, astrocitos y células COS-7. En estas últimas, la inhibición de la PI3K no afecta a la fosforilación del EGFR mediada por el GPCR, pero sí se inhibe la estimulación de la vía de la MAPK (Daub et al., 1997). Otros autores han descrito la dimerización y activación del EGFR inducida por el receptor m1 muscarínico de la acetilcolina en un proceso independiente de EGF en el que interviene la PKC. Las vías que conectan los GPCRs con el EGFR no están aún bien definidas, y es posible que sean más complejas de lo esperado, ya que en la región citosólica yuxtamembranal del EGFR existe una secuencia de reconocimiento e interacción con la subunidad  $\alpha$  de la proteína Gs (Sun et al., 1997).

La interacción entre los RTK y los GPCRS no esta limitada a la transactivación, la actividad de estos receptores puede ser regulada de un tipo de receptor a otro. Tal es el caso del receptor  $\alpha$ -1B adrenérgico, del cual se reportó en nuestro laboratorio que puede ser fosforilado como consecuencia de la activación del receptor para IGF (IGF de *Insulin Like Growth Factor*). Regulando así, su intensidad de respuesta (Molina, et al 2006). Otro caso de interacción entre receptores de diferentes familias de receptores, reportado en el laboratorio, es el de la fosforilación del receptor  $\alpha$ -1B adrenérgico, inducido por la activación del receptor EGF (de *Epidermal Growth Factor*) que a su vez es transactivado por el LPA (Casas et al., 2003). Teniendo así, otro ejemplo de desensibilización de un receptor como consecuencia de la activación de otro tipo de receptor (inclusive de diferente familia).

También se ha reportado la intervención del EGFR en la activación de Erk inducida por IGF, teniendo así, una evidencia más de la importancia que tiene EGFR al ser activado y su capacidad de interactuar con otras vías de señalización. (Roudabush F., 2000)

Hasta ahora no se ha reportado si la activación del receptor para EGF (o de algún otro receptor con actividad de tirosina cinasa), trae como consecuencia la fosforilación y desensibilización de los receptores para LPA. Por otro lado se desconoce si en la desensibilización de los receptores para LPA por otros factores participa el receptor para EGF como intermediario al ser transactivado.

El conocimiento sobre la regulación de receptores para LPA es aun escaso. Existen pocos trabajos sobre la forma en que el estímulo de LPA es regulado. Se sabe que la señal generada por el LPA es modulada por la acción del PMA, un éster de forbol que activa directamente a la PKC (Avendaño et al., 2005). También se ha encontrado que la respuesta a LPA está regulada por la intervención de GRKs y  $\beta$ -arrestinas y que el receptor LPA1 es endocitado vía dinamin2- y Rab-5 (Murph et al. 2003). Recientemente se ha reportado que la internalización y desensibilización del receptor LPA1 es inducida por la activación de la PKC (Avendaño et al., 2005).

Dado los diversos y potentes efectos que tiene el LPA en casi todas las células de los mamíferos, sumado con el considerable incremento de nuevas vías en las que se ve involucrado este mensajero lipídico, resulta importante entender la manera en que esta señal es regulada. Y ya que recientemente se han reportado regulaciones cruzadas entre receptores de distintas familias, una posible vía de regulación puede ser generada por la activación del receptor para EGF. Además, estos dos receptores participan en distintas vías involucradas en el control de crecimiento celular, por lo que nos parece indispensable tratar de describir la manera en que estos dos receptores se regulan. Razón por la cual este proyecto tratara de definir si existe algún tipo de regulación en la actividad del receptor LPA1 generada por la activación del receptor para EGF y saber si dentro de la regulación de dichos receptores participa la transactivación del LPA1 hacia el receptor para EGF.

## **HIPOTESIS.**

- La fosforilación y desensibilización del receptor LPA1 para ácido lisofosfatídico puede involucrar la activación de los receptores EGFR o para Angiotensina II.

## **OBJETIVO.**

- Estudiar la regulación funcional por fosforilación del receptor LPA1 como consecuencia de la activación del EGFR.
- Estudiar la regulación funcional por fosforilación del receptor LPA1 como consecuencia de la activación del receptor para angiotensina II.

### Objetivos particulares

- Estudiar la desensibilización del receptor LPA1 y su posible fosforilación, como consecuencia de una activación del receptor para EGF o Angiotensina II.
- Estudiar si las cinasas PI3K y PKC participan en dicha desensibilización-fosforilación del receptor LPA1.
- Estudiar si el receptor para LPA1 se internaliza como consecuencia de la acción del EGF o la angiotensina II.

## **MATERIALES Y METODOS**

El L-ácido Lisofosfatídico (oleoil-sn-glicerol-3-fosfato) (LPA), el tetradecanoil-forbol acetato (TPA), estaurosporina, wortmanina, angiotensina II, toxina diftérica (CRM) y los inhibidores de proteasas se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. Los inhibidores LY294002, AG1478 y la Bisindolilmaleimida I se obtuvieron de Calbiochem. La proteína agarosa A acoplada sefarosa fue obtenida de Upstate Biotechnology y las membranas de nitrocelulosa fueron de la marca Bio-Rad. El medio de cultivo F12K modificado por Kaighns (F12K) fue obtenido de In Vitro. Suero fetal bovino, tripsina, antibióticos, fura 2-AM (acetoxi-metil-ester) y Lipofectamina<sup>TM</sup> 2000 fueron obtenidos de Invitrogen Life Technologies. El [<sup>32</sup>P]Pi (8500–9120 Ci/mmol) se obtuvo de Perkin Elmer Life Sciences. El EGF fue obtenido de PreproTech. A excepción del anticuerpo contra la proteína verde fluorescente que fue obtenida en el laboratorio, todos los anticuerpos primarios utilizados fueron de la marca Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos secundarios fueron obtenidos de Zymed. Los kits de quimioluminiscencia fueron de las marcas Pierce y Millipore. El BB94 fue generosamente donado por el Dr. S. Mobashery (Universidad de Notre Dame EU). El anticuerpo neutralizante anti-HB-EGF fue de la marca Millipore.

### **Cultivo celular**

Se utilizaron células C9 (epitelio de hígado de rata) transfectadas establemente con la construcción del receptor LPA1 unido a la proteína eGFP (proteína verde fluorescente variante enhance) mediante el uso de lipofectamina 2000<sup>®</sup>. Las células transfectadas fueron seleccionadas por citometría de flujo y por resistencia a G418.

Las células se cultivaron en medio F12K con glucosa y glutamina adicionado con 10% de suero fetal bovino, 600µg/ml de análogo de neomicina G-1418 sulfato, 100µg/ml de estreptomina, 100U/ml de penicilina a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Determinación de la concentración de calcio intracelular**

Se crecieron las células en medio F12K (con suero fetal bovino, antimicótico y geneticina G418) hasta tener una confluencia del 80%. Se incubaron durante 12hrs con medio F12K sin suero fetal bovino. Posteriormente se incubaron durante 1hr a 37°C con buffer Krebs-Hepes y el fluoróforo Fura 2 AM. Se lavaron las células con PBS (buffer de fosfatos) y se levantaron con tripsina. Se lavaron las células 3 veces con buffer Krebs-Hepes y se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 min con buffer Krebs-Hepes. Se resuspendieron en

Krebbs-hepes y se leen en el espectrofluorometro. Las mediciones de la concentración intracelular de calcio  $[Ca^{2+}]_i$  se hicieron en un espectrofluorometro AMINCO-Bowman serie-2, con longitudes de onda de 340nm y 380nm de excitación y 510nm de emisión, finalmente la concentración intracelular de calcio se calculo según Grynkiewicz usando el software de AMINCO-Bowman (Grynkiewicz et al., 1995).

### **Fosforilación del receptor**

Se crecieron las células en medio F12K hasta tener una confluencia del 80%. Se ayunaron durante 1hr con medio F12K sin fosfatos, posteriormente se incubaron en medio con  $P^{32}$  durante 4hrs. Una vez cumplidas las 4hrs se estimularon las células (LPA 15 min, EGF 15 min, AG1478 30 min, y TPA 5min), se lavaron con PBS frío y se incubaron con buffer de lisis durante 1hr. El buffer de lisis consistió de: Tris-HCL 50mM, NaCl 150mM, Nonidet 1%, Triton 1%, NaF 50mM,  $Na_3VO_4$ , 100 $\mu$ M,  $\beta$ -glicerofosfato 10mM,  $Na_4P_2O_7$  10mM, p-Serina 1MM, p-Tirosina 1mM, p\_treonina 1mM, EDTA 5mM, leupeptina 20  $\mu$ g/ml, aprotinina 20  $\mu$ g/ml, fluoruro de fenilsulfonio (PMSF) 100  $\mu$ M/ml y con inhibidor de tripsina 50  $\mu$ g/ml. Las células lisadas se centrifugaron a 12,700 $\times$ g durante 15 min. a 4 °C. Los sobrenadantes fueron incubados con anticuerpos anti-eGFP y proteína sefarosa durante toda la noche a 4°C. Posteriormente el complejo de anticuerpo, proteína sefarosa y receptor, fueron lavados 5 veces con, (Hepes 100 mM,  $NaHPO_4$  50 mM, NaF 10 mM, Tritón 1%, SDS 0.5% a pH 7.2) desnaturalizados hirviéndolos en buffer de cargado (SDS al 10%, Tris 1M pH 6.8, 10% de glicerol, 10% de  $\beta$ -mercapto etanol y 0.01% de azul de bromofenol) y corridos en geles de poliacrilamida al 10%. Los geles se secaron y se expusieron en placas durante 12 hrs. Las placas fueron leídas en el Molecular Dynamics PhosphorImager y calculadas con el software Imagequant. Los datos fueron graficados y analizados con el software Prism 4.

### **Ensayos de “Western Blot”**

Se utilizaron anticuerpos contra distintas enzimas (activadas e inactivadas) involucradas en la vía de señalización del EGF y LPA. Las células se crecieron en medio F12K (con suero fetal bovino, antimicótico y geneticina G418) hasta una confluencia del 80%, se estimularon las células con (LPA 15min, TPA 5min, EGF 15min, AG 1478 30 min, BB94 30min y Toxina difterica 1hr. Se lavaron las células con PBS (buffer de fosfatos) y se incubaron con buffer de lisis (Tris-HCL 50mM, NaCl 150mM, Nonidet 1%, Triton 1%, NaF 50mM,  $Na_3VO_4$ , 100 $\mu$ M,  $\beta$ -glicerofosfato 10mM,  $Na_4P_2O_7$  10mM, p-Serina 1MM, p-

Tirosina 1mM, p\_treonina 1mM, EDTA 5mM, leupeptina 20 µg/ml, aprotinina 20 µg/ml, fluoruro de fenilsulfonio (PMSF) 100 µM/ml y con inhibidor de tripsina 50 µg/ml) durante 45 min. Los lisados de células se centrifugaron 10min, 14000rpm a 4°C. Los sobrenadantes se incubaron con el anticuerpo anti-EGFP y proteína sefarosa. Posteriormente el complejo anticuerpo, proteína sefarosa y receptor se centrifugaron durante 5 min a 14 000rpm. El complejo se desnaturaliza hirviéndolo en buffer de cargado (SDS al 10%, Tris 1M pH 6.8, 10% de glicerol, 10% de β-mercapto etanol y 0.01% de azul de bromofenol) y se corre en geles de poliacrilamida 10%, se transfieren las proteínas a una membrana de nitrocelulosa durante 2hrs a 60mAmp por gel. Posteriormente las membranas se bloquean durante 1 hr con TBS-Tween 20% + BSA 1%. Se incubaron las membranas con el anticuerpo específico durante 12hrs a 4°C. Posteriormente se lavaron las membranas con TBS-tween 20% 5 veces durante 3 min y se incubaron 30 min con el anticuerpo secundario anti-conejo que está conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP-Rabbit). Finalmente se lavó la membrana otras 5 veces con el TBS-tween 20%, se realizó un último lavado con TBS solo, y la membrana esta lista para revelarse. Las membranas se revelan usando un kit de quimioluminiscencia.

### **Imágenes de Microscopía confocal**

Las imágenes obtenidas son de células adheridas en cajas de 6 pozos y cajas de 35mm con fondo de vidrio en 1ml de medio F12K por pozo. Se estimularon las células directamente mientras las imágenes eran capturadas. Se utilizo el marcador de membrana plasmática FM 4-64 de invitrogene, (N-(-3-trietilamonio)propil)-4-(6-(4-dietilamino) fenil-hexatenil piridiniumdibromido) el cual se adicionó directamente a la muestra después de cada estímulo, siendo excitado a 543 nm. La proteína verde fluorescente fue excitada a 475nm y la fluorescencia emitida se detecto entre 555 y 655 nm. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal Olympus Fluoview FV 1000 con un sistema de escaneo de laser espectral, acoplado a un microscopio de luz invertida Olympus IX81. Se utilizó un objetivo de inmersión en glicerol a 60X 1.35 N.A. Todas las imágenes se conectaron con una apertura numérica de 1.3, el mismo porcentaje de láser, la misma apertura de iris y las misma ganancia. Las imágenes se procesaron usando el programa FV10-ASW.

### **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados y graficados utilizando el software prisma versión 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A los datos se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), prueba de Bonferroni comparando estadísticamente todos los grupos. Un valor menos de  $p < 0.05$  se consideró como significativo.

## RESULTADOS

Se amplificó la secuencia completa que codifica para el receptor LPA<sub>1</sub> por PCR. El producto de PCR que codifica para el receptor LPA<sub>1</sub> se logró clonar en el vector peGFP-N1, esto con la finalidad de crear una proteína de fusión con la eGFP, lo que nos facilitara 2 cosas: monitorear la localización del receptor mediante microscopia confocal e inmunoprecipitar la proteína de fusión LPA<sub>1</sub>-eGFP utilizando anticuerpos contra la eGFP (los cuales son mucho mas eficientes que los que reconocen al LPA<sub>1</sub>).

### Transfección en células C9.

La construcción del receptor LPA<sub>1</sub> fusionada a la eGFP, se logró transfectar dentro de la línea celular C9 (Hígado de rata). Se comprobó su transfección mediante microscopia de fluorescencia e inmunoprecipitación utilizando anticuerpos que reconozcan a la proteína eGFP (Fig. 8).

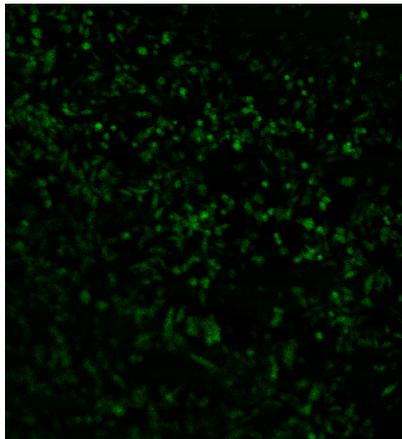


Fig.8. Imagen de células C9 transfectadas con la construcción LPA1-eGFP.

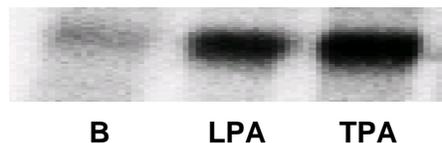


Fig.9. Fosforilación del receptor LPA1 (Basal (B), LPA y TPA preincubado 15min (acetato de forbol, un activador directo de la proteína PKC)) marcado metabólicamente con P<sup>32</sup>, e inmunoprecipitado con anticuerpos anti-EGFP.

Las imágenes de microscopia, la inmunoprecipitación del receptor LPA<sub>1</sub> utilizando anticuerpos que reconozcan a la proteína eGFP y las pruebas funcionales en la liberación de calcio intracelular nos permitieron asegurarnos de que la transfección del gen que codifica para la proteína de fusión LPA1-EGFP dentro de las células C9 fue exitosa. Teniendo así un modelo experimental seguro y poder establecer las condiciones necesarias para la parte experimental.

### Medición de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> intracelular liberado.

A las células transfectadas con la proteína de fusión LPA1-eGFP se les midió la concentración Ca<sup>2+</sup> liberado al ser estimuladas con LPA. Como se observa en la figura 10, el LPA induce una rápida y fuerte liberación de calcio intracelular en las células C9 transfectadas con el receptor LPA<sub>1</sub>-eGFP. La rápida respuesta es seguida de una rápida caída, casi hasta los niveles basales en la concentración del calcio. Por otro lado, La desensibilización homologa es demostrada ya que al añadir LPA seguido de una previa estimulación del mismo, la respuesta es inhibida manteniendo la liberación del calcio intracelular en niveles basales (Fig 10). Dicha falta de respuesta no está relacionada con la depleción de calcio intracelular, ya que al agregar Angiotensina II la respuesta celular se desarrollaba de manera normal (Fig. 11).

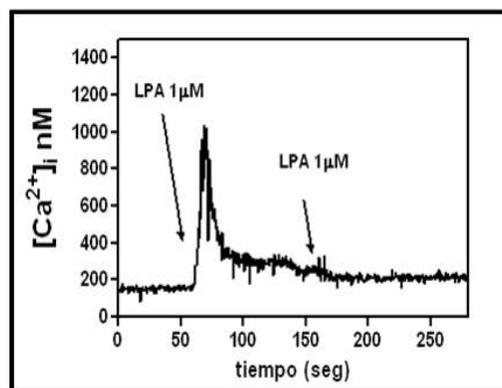


Fig. 10. Medición de la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular estimulado por LPA, en células C9, transfectadas con la proteína de fusión LPA1-eGFP, así como la comprobación de su desensibilización homologa. La liberación de calcio es atenuada al estimular por segunda ocasión con LPA 1μM.

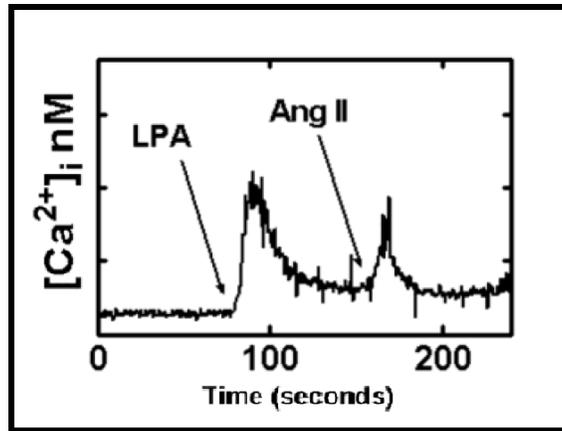


Fig. 11. Estimulación de las células C9 con LPA 1mM seguido de una estimulación de Angiotensina II. La estimulación con LPA no depletó los reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

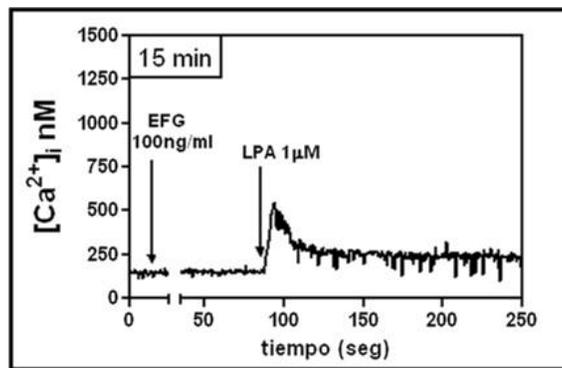


Fig. 12. Inhibición del EGF 100ng/ml en de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular estimulado por LPA. Al estimular las células preincubadas 15min con EGF 100ng/ml, la estimulación del LPA 1  $\mu\text{M}$  se ve abatido hasta casi la mitad.

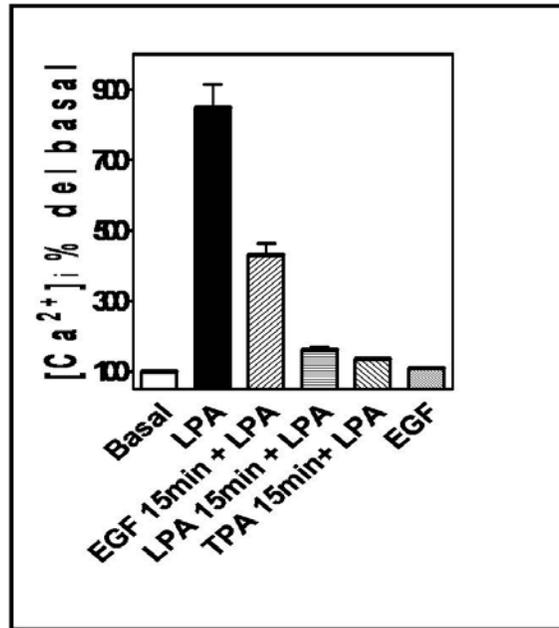


Fig. 13. Estimulación con LPA 1 $\mu$ M, EGF 100ng y TPA 1 $\mu$ M. La respuesta del generada por el LPA se ve disminuida por diferentes vías de desensibilización (homóloga y heteróloga).

La desensibilización heteróloga inducida mediante la activación de PKC inducida por el TPA es casi inmediata, necesitando solo de un min de pre-incubación (dato no mostrado). De forma interesante, nuestros resultados muestran que el EGF no induce la liberación de calcio intracelular, pero por otro lado si induce la desensibilización de la respuesta inducida por el receptor de LPA<sub>1</sub> (figura 12 y 13). La desensibilización del receptor LPA<sub>1</sub> inducida por el EGF requiere de 5 a 10 min de preincubación para ejercer su efecto inhibitorio (datos no mostrados).

Una vez comparados los patrones de inhibición se estableció una curva dosis respuesta del poder de inhibición del EGF sobre el efecto del LPA.

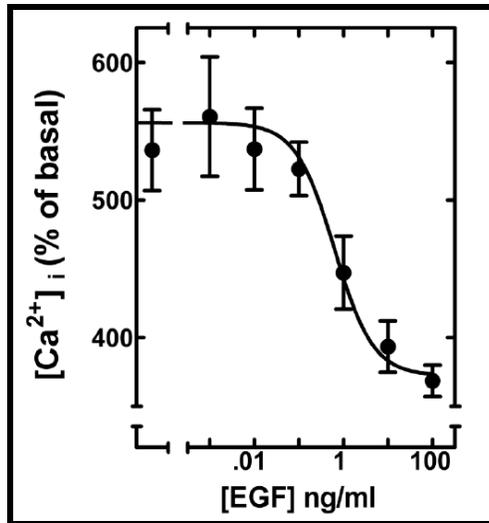


Fig. 14. Curva dosis respuesta del efecto de la inhibición del EGF a diferentes concentraciones sobre la respuesta a LPA 1 $\mu$ M.

La figura 14 muestra la respuesta inducida con 1mM de LPA en células preincubadas con diferentes concentraciones de EGF. En ella se puede observar que el EGF induce un decremento en la respuesta al estímulo de LPA de un 35-40% con una EC50 de 1ng/ml.

Una vez comprobado el poder de inhibición del EGF sobre la respuesta a LPA, se comprobó si esta desensibilización es a causa de la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub>. Esto mediante ensayos de marcaje metabólico.

### **Inmunoprecipitación del receptor LPA<sub>1</sub>-eGFP fosforilado.**

La fosforilación parece ser una evento que dicta el comienzo de la desensibilización de los receptores acoplados a proteínas G. Razón por la cual evaluamos la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub> inducida por el EGF.

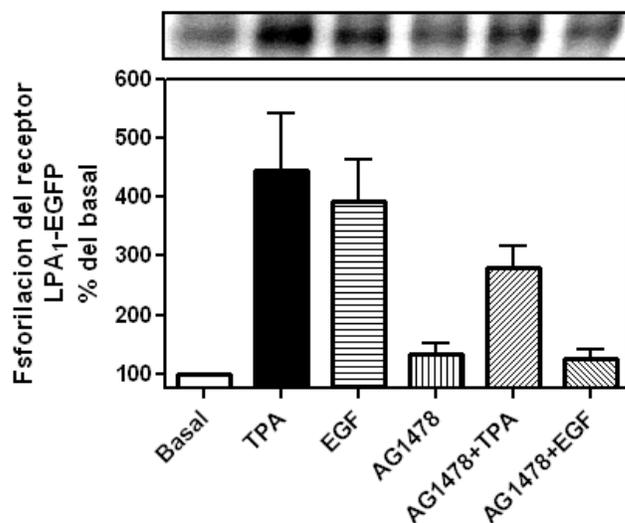


Fig. 15. Fosforilación del receptor LPA1-EGFP estimulado con: TPA 1 $\mu$ M, EGF 100ng y AG1478 1 $\mu$ M (inhibidor selectivo del receptor para EGF) preincubado 30 min antes de la estimulación con EGF.

Se logró comprobar que el receptor LPA se comporta como lo reportado anteriormente (Avendaño et al., 2005) al poder fosforilarse heterológamente con el TPA. Por otro lado se demostró que la activación del EGFR trae como consecuencia la fosforilación del receptor LPA1, demostrando así la posible regulación por fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub> mediante la activación del receptor para EGF. Al utilizar el AG1478 (inhibidor selectivo del receptor para EGF) disminuye la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub> al estimular con EGF teniendo así otra prueba adicional de que la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub> es consecuencia de la activación del EGFR (figura 15).

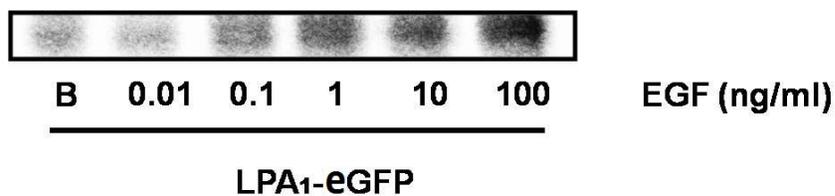


Fig. 16. Dosis respuesta del receptor LPA<sub>1</sub> transfectado en células C9 y estimulado con diferentes concentraciones de EGF.

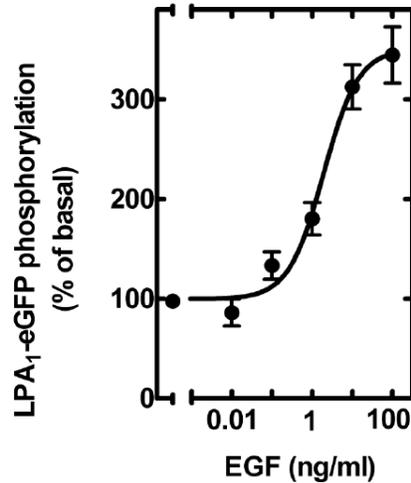


Fig. 17. Curva dosis respuesta de la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub>-EGFP estimulado por EGF.

Como se puede observar en la figura 16, la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub> inducida por el EGF es dependiente de la concentración. Dicha fosforilación inducida por el EGF, es 3 veces mayor con una EC<sub>50</sub> de 3ng/ml (figura 17).

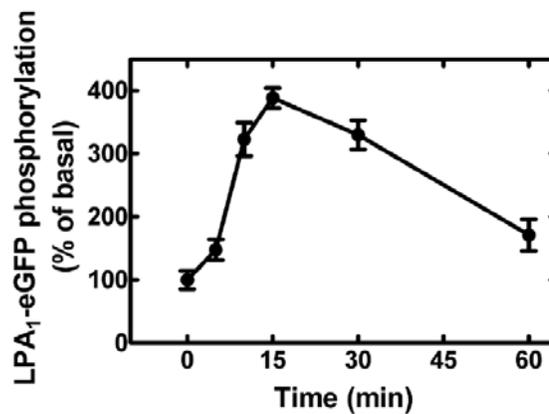


Fig 18. Curso temporal del receptor LPA<sub>1</sub> activado por la estimulación del receptor para EGF.

Con respecto al tiempo, se puede observar que el receptor tiene una máxima fosforilación a los 15min, la cual va disminuyendo posteriormente (Fig 18).

Tomando en cuenta estos resultados se utilizó una concentración de 100ng/ml de EGF y estimulaciones por 15min en los experimentos posteriores, esto con la finalidad de tener las mejores condiciones de fosforilación del receptor. Partiendo de estas condiciones se realizaron los experimentos necesarios para tratar de establecer la posible participación

de cinasas como PI3K y PKC en la regulación por fosforilación del receptor LPA1 inducido por la activación del EGFR.

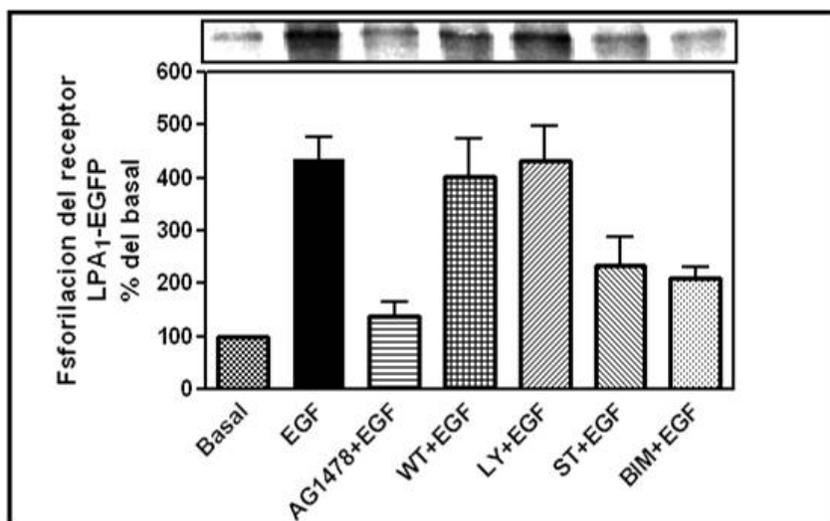


Fig 19. Representación grafica de los resultados obtenidos en la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub>. EGF 100ng/ml, AG1478 1 $\mu$ M preincubación 30min antes de la estimulación con EGF; WT, wortmanina preincubación 30 min antes de la estimulación con EGF; LY 1 $\mu$ M; ST, staurosporina 300nM preincubación 30min antes de la estimulación con EGF; BIM, bisindolilmaleimida 1 $\mu$ M preincubacion 30min antes de la estimulación con EGF.

Se sabe que la cinasas PKC y PI3K están involucradas en la regulación cruzada de receptores acoplados a proteínas G. Por esta razón evaluamos su participación en la desensibilización del receptor LPA<sub>1</sub> utilizando inhibidores de PKC como la Staurosporina (poco selectiva) y el Bisindolilmaleimide I (selectivo), los cuales parecieron tener un efecto sobre la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub>. De manera contraria, los inhibidores de PI3K (Wortmanina y LY29402) no alteraron la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub> inducida por el EGF (Fig. 19). Estos resultados sugieren que la PKC está involucrada en la desensibilización del receptor LPA<sub>1</sub> inducida por EGF.

#### **Internalización del receptor LPA1-eGFP.**

Las imágenes de microscopia confocal con fluorescencia muestran al receptor LPA<sub>1</sub>-eGFP situado en la membrana plasmática (fig. 20). Al sobreponer la imagen del receptor

LPA<sub>1</sub>-eGFP y el marcador de membrana rojo FM<sup>®</sup> 4-64 se puede visualizar al receptor localizado en gran parte en membrana plasmática.

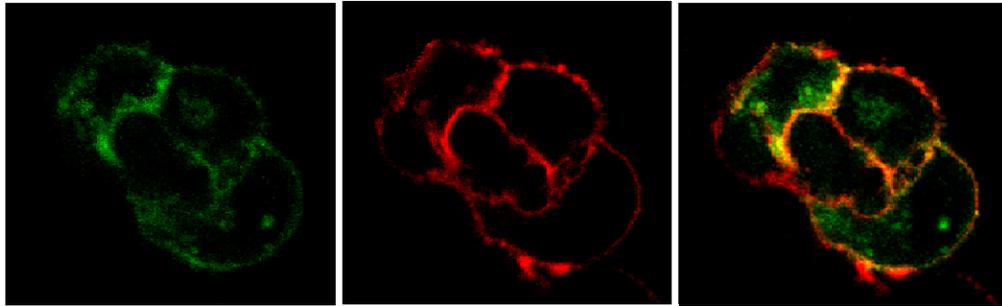


Fig 20. Imagen de microscopia confocal por fluorescencia de células C9 transfectadas con el receptor LPA<sub>1</sub>-eGFP. En la izquierda se muestra al receptor LPA1-EGFP. Al centro se muestra la membrana marcada con rojo FM<sup>®</sup> 4-64. Y en la imagen derecha se muestra la sobreposición de las dos imágenes.

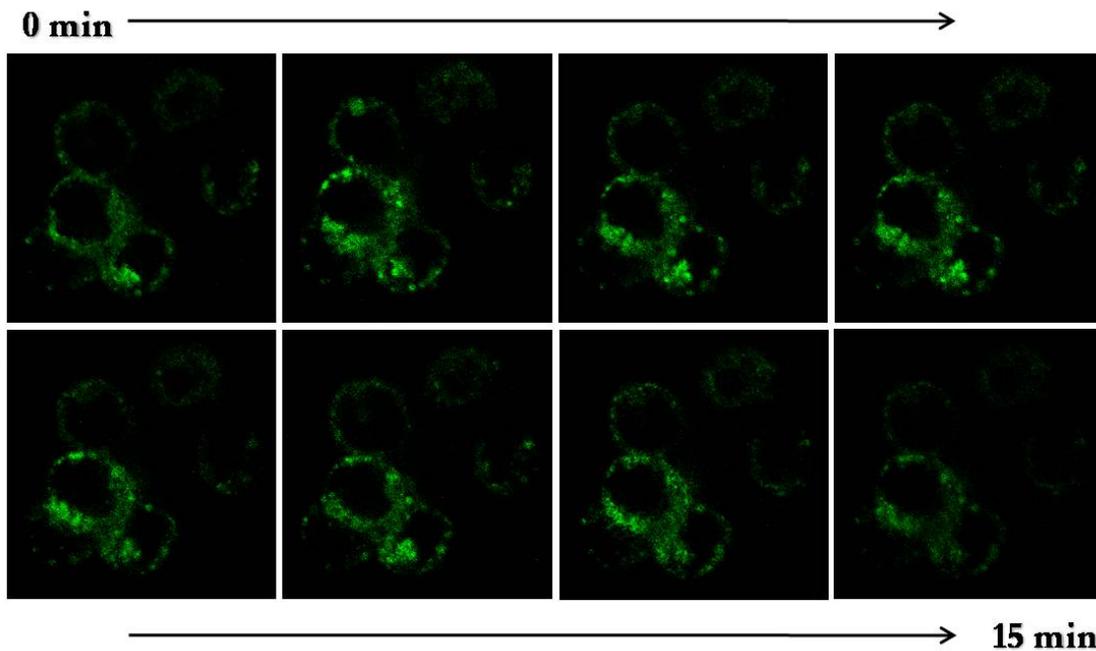


Fig. 21. Imagen de microscopia confocal por fluorescencia de células C9 transfectadas con el receptor LPA<sub>1</sub>-eGFP. Se estimularon las células con EGF 100ng/ml y se monitoreo la localización del receptor durante 15min.

Como se puede observar en la Fig. 21, la estimulación con EGF (100ng/ml) provocó la formación de vesículas y la internalización del receptor LPA<sub>1</sub>-eGFP. Las imágenes fueron tomadas en tiempo real, lo que permitió visualizar la internalización del receptor a lo largo de 15min. Estos resultados sugieren que la activación del EGFR trae como consecuencia, la fosforilación, desensibilización y finalmente la internalización del receptor LPA<sub>1</sub>-eGFP.

**La activación del EGFR induce la fosforilación, desensibilización e internalización del receptor LPA<sub>1</sub>.**

La activación del EGFR favoreció la inhibición de la liberación de calcio intracelular, la fosforilación e internalización del receptor LPA<sub>1</sub>. Así mismo el uso de inhibidores farmacológicos de la PKC en el ensayo de fosforilación abatió parcialmente (~50%) la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub> inducida por EGF, por otro lado los inhibidores de la PI3K no evitaron la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub> inducida por EGF por lo que estos resultados en conjunto sugieren la participación de PKC pero no la de PI3K, por lo que se podría pensar en la participación de alguna otra cinasa en este proceso de fosforilación mediada por EGF.

**SEGUNDA ETAPA (transactivación del EGFR):**

Demostrada la regulación cruzada entre el EGFR y el de LPA<sub>1</sub>, el siguiente objetivo fue estudiar si la activación del LPA<sub>1</sub> media la transactivación del EGFR y saber si ésta, es responsable de la desensibilización del LPA<sub>1</sub>.

El siguiente paso fue averiguar si la liberación del HB-EGF y la transactivación del HB-EGF estaban involucrados en la regulación de los receptores LPA<sub>1</sub> y angiotensina II (AT2). Para comprobar esto, nosotros estudiamos la fosforilación de la cinasa Akt utilizando diferentes inhibidores que actúan en distintos puntos de la transactivación como el inhibidor de metaloproteinasas BB94, la toxina diftérica (CRM) inhibitoria de la proteólisis del HB-EGF, el anticuerpo neutralizante contra HB-EGF y el inhibidor de la actividad de tirosina cinasa del receptor EGF (AG1478).

### Inmunoblot de la enzima Akt.

Con la finalidad de poder comprobar la transactivación del receptor EGF inducida por LPA se midió la concentración de pAkt (Akt fosforilado) y Akt total mediante ensayos de inmunoblot usando distintos inhibidores de la transactivación que actúan en diferentes niveles de dicho proceso.

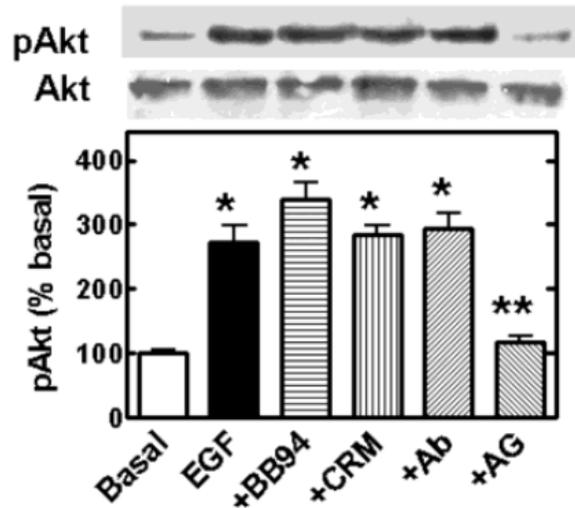


Fig 22. Western Blot contra pAKT (phospho-AKT). Se trataron a las células con EGF 100ng/ml, BB94 1 $\mu$ M (inhibidor de metaloproteasas), toxina Difterica 200ng/ml (inhibidor de la liberación y de la acción del HB-EGF), anticuerpo anti-HB-EGF 5 $\mu$ /ml (anticuerpos dirigidos contra HB-EGF) y AG1478 10 $\mu$ M (inhibidor del receptor EGFR).

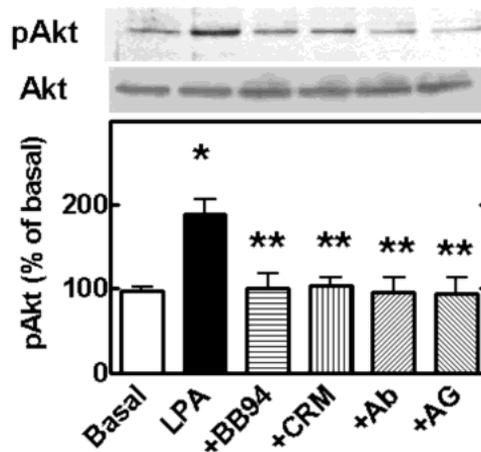


Fig 23. Western Blot contra pAKT (phospho-AKT). Se trataron a las células con LPA 1 $\mu$ M, BB94 1 $\mu$ M (inhibidor de metaloproteasas), toxina Difterica 200ng/ml (inhibidor de la liberación y de la acción del HB-EGF), anticuerpo anti-HB-EGF 5 $\mu$ /ml (anticuerpos dirigidos contra HB-EGF) y AG1478 10 $\mu$ M (inhibidor del receptor EGFR).

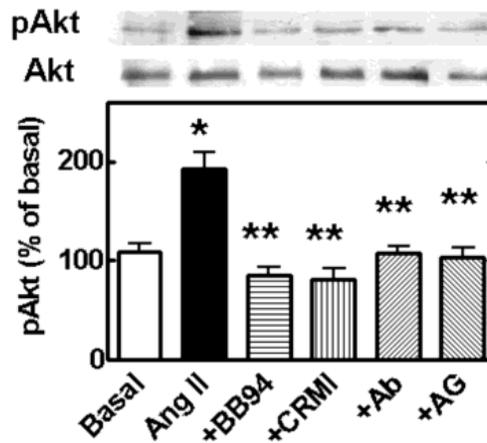


Fig 24. Western Blot contra pAKT (phospho-AKT). Se estimularon las células con Angiotensina II, se preincubaron con BB94 1 $\mu$ M (inhibidor de metaloproteasas), toxina Difterica 200ng/ml (inhibidor de la liberación y de la acción del HB-EGF), anticuerpo anti-HB-EGF 5 $\mu$ /ml (anticuerpos dirigidos contra HB-EGF) y AG1478 10 $\mu$ M (inhibidor del receptor EGFR).

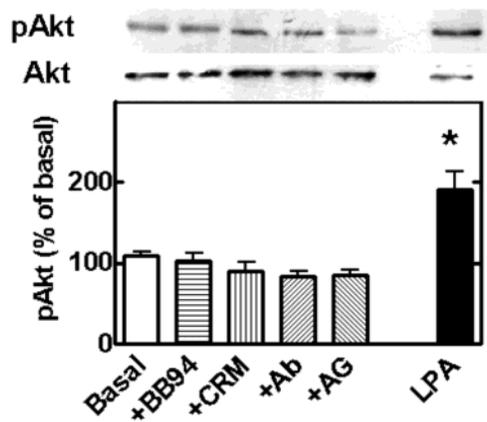


Fig 25. Western Blot contra pAKT (phospho-AKT). Se incubaron las células con BB94 1 $\mu$ M (inhibidor de metaloproteasas), toxina Difterica 200ng/ml (inhibidor de la liberación y de la acción del HB-EGF), anticuerpo anti-HB-EGF 5 $\mu$ /ml (anticuerpos dirigidos contra HB-EGF), AG1478 10 $\mu$ M (inhibidor del receptor EGFR) y LPA 1 $\mu$ M como control.

Como lo muestran las figuras 22, 23 y 24 el EGF, el LPA y la angiotensina son capaces de activar la fosforilación de la cinasa AKT, siendo el EGF el causante de la mayor respuesta. Como era de esperarse el AG1478 bloqueo la fosforilación de la AKT en los experimentos donde se estimulo con EGF (Fig 22), pero de forma muy interesante, los inhibidores de la transactivación inhibieron la fosforilación de AKT inducida por el LPA y la

Angiotensina II (figura 23 y 24). Estos resultados sugieren un evento de “cross-talk” en donde el receptor EGF participa en las respuestas celulares generadas por el LPA y la angiotensina II, esto mediante la transactivación del receptor EGF.

### Fosforilación de tirosinas del receptor para EGF

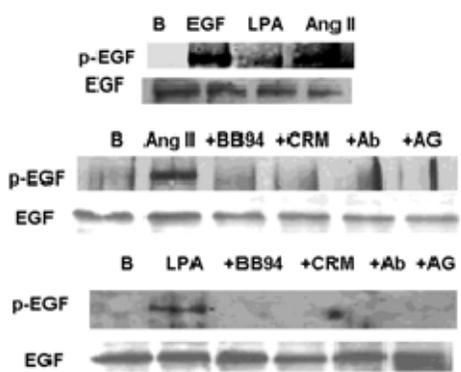


Figura 26. Western Blot contra tirosinas fosforiladas (Y1173) del receptor EGF (pEGF). Se estimuló a las células con EGF 100ng/ml, con LPA 1 $\mu$ M y Angiotensina II. Se incubaron las células con BB94 1 $\mu$ M (inhibidor de metaloproteasas), toxina Difterica 200ng/ml (inhibidor de la liberación y de la acción del HB-EGF), anticuerpo anti-HB-EGF 5 $\mu$ g/ml (anticuerpos dirigidos contra HB-EGF), AG1478 10 $\mu$ M (inhibidor del receptor EGFR).

Medimos la fosforilación de tirosinas con la finalidad de comprobar de otra manera la relación entre el receptor LPA1 y el de EGFR. Como se puede observar en la figura 26, tanto el LPA como la angiotensina II activan la fosforilación de tirosinas del receptor EGF, sugiriendo una activación del mismo. Los diferentes inhibidores de la transactivación bloquearon la fosforilación de tirosinas del receptor EGF al estimular las células con LPA y Angiotensina II, siendo consistentes estos resultados con los obtenidos anteriormente.

El siguiente paso a seguir fue comprobar si los inhibidores de la transactivación tenían algún efecto sobre la fosforilación del receptor LPA1 al ser estimular con LPA o Angiotensina II. Como se puede observar en la figura 26, los diferentes inhibidores: BB94, CMR 197, el anti-HB-EGF y el AG1478 claramente reducen, pero no abaten la fosforilación del receptor LPA1 inducida por la angiotensina II. Por otro lado, la fosforilación del receptor LPA1, no se vio afectada al estimular las células con LPA.

Se sabe que la desensibilización homologa de los receptores acoplados a proteínas G está regulada por las cinasas de receptores acopladas a proteínas G (GRK). Consistente con lo reportado anteriormente (Avenidaño et al., 2005), la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub> inducida por el TPA se ve abatida al utilizar un inhibidor de la PKC (BIM I), no así, la fosforilación inducida por el LPA (figura 27, izquierda).

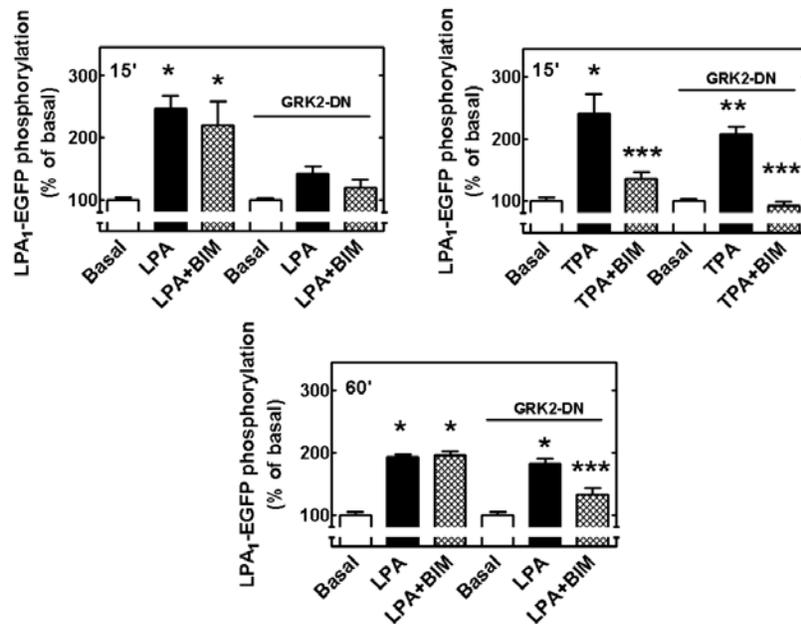


Fig 27. Efecto de la expresión de GRK 2 DN en la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub>-eGF. Las células fueron transfectadas 3 días antes con el vector de la GRK 2 DN. El día del experimento fueron preincubadas por 15 min con 1mM de BIM y posteriormente estimuladas con 1mM de LPA (15 min, panel superior izquierdo o 60 min, panel inferior). \* p < 0.001 vs. basal; \*\* p < 0.01 vs basal; \*\*\* p < 0.001 vs TPA o LPA solo.

Con la finalidad de disminuir los efectos generados por la GRK, se transfectaron las células con una mutante dominante negativa de la GRK2, cinasa involucrada en la fosforilación de una gran cantidad de receptores acoplados a proteínas G. La expresión de dicha mutante redujo de manera notable la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub> inducida por LPA en estímulos menores a 15min. Como era de esperarse la utilización del inhibidor de PKC (BIM I) bloqueó la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub> inducida por TPA (figura 27, superior derecha). De manera interesante, el efecto de BIM se pudo observar hasta el minuto 60 en células transfectadas con la dominante negativa de GRK2, no así en las células control (figura 27, panel inferior), sugiriendo la participación de la PKC en la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub> inducida por LPA a tiempos largos como 60 minutos.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los reportes sobre la participación del LPA en diversos efectos fisiológicos han aumentado en los últimos años. Sin embargo, los procesos que ocurren a través de sus receptores son escasamente descritos. Dentro del grupo de los receptores LPA, el receptor LPA<sub>1</sub> es el mejor caracterizado hasta la fecha, (Avendaño et al., 2007; Murph et al., 2008; Avendaño et al. 2005; González et al., 2005; Murph et al., 2003; Urs et al., 2005; Urs et al., 2008), sin embargo, la forma en cómo es regulado este receptor es aún imprecisa. Hasta ahora se sabe que cuando el receptor LPA<sub>1</sub> es activado por el LPA, su regulación es a través de las GRKs y que una vez fosforilado el receptor es desensibilizado e internalizado. De igual manera se ha reportado que el TPA, la Angiotensina II y los receptores nucleares de estrógenos, son capaces de activar el mismo evento de fosforilación-desensibilización-internalización (Avendaño et al., 2007; Murph et al., 2008; Avendaño et al. 2005; González et al., 2005; Murph et al., 2003; Urs et al., 2005; Urs et al., 2008).

Existen una variedad de trabajos que sugieren una estrecha relación entre los receptores con actividad de tirosina cinasa (RTKs) y los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), a esta relación se le conoce comúnmente como "Cross Talk". Los resultados aquí presentados muestran claramente que el EGF tiene la capacidad de regular la actividad del receptor LPA<sub>1</sub>, dicha regulación se lleva a cabo a través de la cinasa PKC. De igual manera pudimos demostrar que tanto la Angiotensina II como el LPA incrementan la fosforilación de Akt mediante la activación de las metaloproteinasas, es decir, mediante la proteólisis de HB-EGF y la subsecuente activación del receptor EGF. Asimismo, nuestros resultados sugieren que la Angiotensina II puede inducir la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub> mediante la activación del receptor EGF y la subsecuente activación de PKC. Dicho sistema está representado en la figura 28.

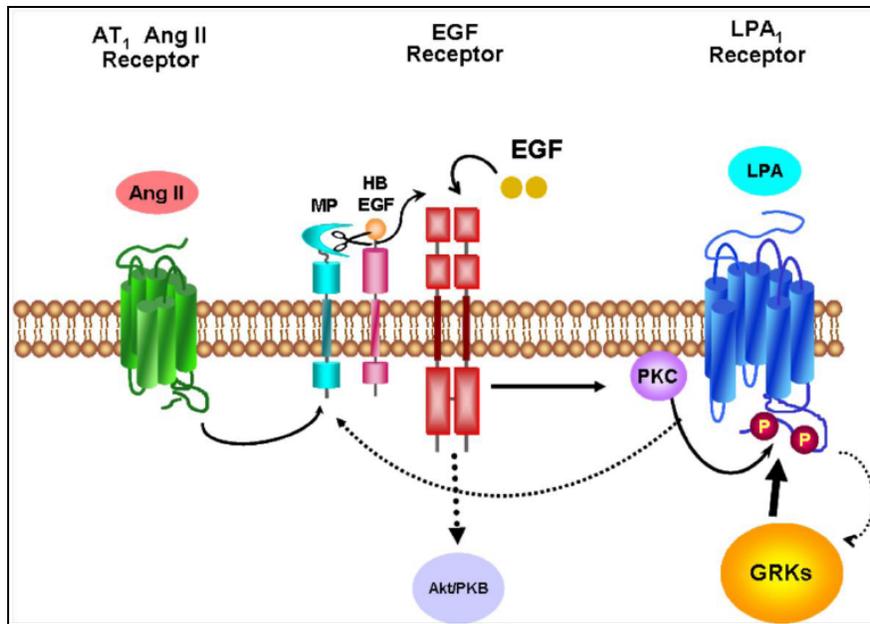


Fig. 28. La transactivación del receptor EGF inducida por el LPA o la angiotensina inducen la fosforilación del receptor LPA1 a través de la PKC.

Cuando la fosforilación, desensibilización e internalización del receptor LPA1 es inducida por los esteres de forbol es claramente mayor que cuando es inducida por el EGF. Sin embargo la inhibición de la respuesta a LPA inducida por el EGF es de hasta casi un 50%, lo que representa una importante disminución en la respuesta inducida por el LPA.

La acción del TPA es casi inmediata, necesitando de tan solo 1 minuto de pre-incubación para ejercer su efecto inhibitorio, por lo contrario el EGF requiere de por lo menos 15 min para poder ejercer su inhibición. La diferencia de tiempos requerida para que el EGF tenga su efecto inhibitorio sugiere la activación de diferentes cascadas de señalización, el reclutamiento de elementos moleculares y la formación de complejos de señalización (fig. 28). Cuando la desensibilización del receptor LPA1 es inducida por el TPA, se mantiene hasta los 60 min (Avendaño et al., 2005), por otro lado la acción inhibitoria generada por el EGF tiene una duración de 30 min. Lo cual se puede ser consecuencia del proceso de desensibilización del receptor y/o la degradación del agonista.

El efecto inhibitorio del EGF es abatido al utilizar el AG1478 y en menor grado, al utilizar la estaurosporina y el BIM. Por lo contrario, los inhibidores de la PI3K no fueron capaces de inhibir el efecto del EGF, sugiriendo así, la participación de PKC y no de PI3K en el proceso de desensibilización del receptor LPA1 inducido por el EGF.

En algunos trabajos anteriores se pudo demostrar la participación de PI3K en la fosforilación de diversos GPCRs como consecuencia de la activación de receptores con

actividad de tirosina cinasa (Casas P., et al., 2003. Molina T., 2006. Rodriguez E., 2009 y Medina L., et al. 2000). Sin embargo la fosforilación de estos receptores no es completamente bloqueada al utilizar inhibidores de PI3K como el LY sugiriendo la participación de alguna o de algunas otras cinasas, como lo demuestran nuestros resultados al involucrar a la PKC. Tomando en cuenta los estudios anteriores y que en nuestros resultados la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub> no es completamente abatida al usar los inhibidores de PKC, no podemos dejar de lado la posible participación de PI3K en dicha fosforilación.

Se sabe que la activación de RTKs como el EGF trae como consecuencia la activación de la fosfolipasa C<sub>γ</sub>, teniendo como consecuencia la generación de diacilglicerol y la subsecuente activación de PKC (Zwick E., et al., 1999 y Schneider M., 2009), estos resultados, junto con los obtenidos por nosotros nos invitan a presentar la siguiente secuencia de eventos representados en la figura número 29. La activación del receptor EGF trae como consecuencia la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub>, dicha fosforilación se lleva a cabo a través de la PKC. Generando la desensibilización e internalización del mismo.

En el laboratorio se demostró anteriormente que la activación del receptor angiotensina II induce la fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub> a través de la PKC. De esta manera es fácil suponer que la activación del receptor AT<sub>1</sub> genera la liberación de IP<sub>3</sub> y diacilglicerol, teniendo como consecuencia la activación de PKC. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la transactivación del receptor para EGF está involucrada en el proceso de fosforilación del receptor LPA<sub>1</sub> inducida por la angiotensina II. Además, nuestros resultados muestran que la estimulación del receptor para Angiotensina II trae como consecuencia la activación del receptor de EGF, como se demostró en la fosforilación de la tirosina (Y1173) del receptor y en la activación de Akt/PKB fosforilada en T308. La complejidad de estas interacciones están demostradas en la capacidad del EGF para regular algunas acciones generadas de la activación de los receptores LPA<sub>1</sub> o Angiotensina II. Esto mediante la cascada de señalización que involucra a la Akt/PKB y participando en la desensibilización de los mismos receptores. (29, 31 y los resultados presentados en este trabajo).

La señalización a través de receptores acoplados a proteína G está involucrada en las respuestas celulares a estímulos extracelulares esenciales para el óptimo funcionamiento celular, por lo cual su señalización debe estar extremadamente regulada a corto y largo

plazo. Nosotros estamos presentando un nuevo modelo en donde posiblemente la regulación del receptor LPA<sub>1</sub> inducida por el EGF es a largo plazo. Contribuyendo así, a la precisa regulación del receptor LPA<sub>1</sub>.

## REFERENCIAS

- Anklesaria P, Teixido J, Laiho M, Pierce JH, Greenberger JS, Massague J. Cell-Cell adhesion mediated by binding membrane- anchored transforming growth factor  $\alpha$  to EGF receptors promotes cell proliferation. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:3289-93.
- Anliker B, Chun J. (2004) Lysophosphatidic G protein-coupled receptors. Journal of Biological Chemistry; 279: 20555-20558.
- Aoki, J., Taira, A., Takanezawa, Y., Kishi, Y., Hama, K., Kishimoto, T., Mizuno, K., Saku, K., Taguchi, R. and Arai, H. (2002) Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. J Biol Chem, 277, 48737-44.
- Avendaño-Vázquez S.E., A. Cabrera-Wrooman, C.C. Colín-Santana, J.A. García-Sáinz, Lysophosphatidic acid LPA1 receptor close-up, Signal transduct., 7 (2007) 351-363.
- Avendaño-Vázquez S.E., A. García-Caballero, J.A. García-Sáinz, Phosphorylation and desensitization of the lysophosphatidic acid receptor LPA1, Biochem. J., 385 (2005) 677-684.
- Balazs, L., Okolicany, J., Ferrebee, M., Tolley, B. and Tigyi, G. (2001) Topical application of the phospholipid growth factor lysophosphatidic acid promotes wound healing in vivo. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 280, R466-72.
- Bandoh K, Aoki J, taira A, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. (2000) Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species-structure-activity relationship of cloned LPA receptors. FEBS Letters.. 478:159-165.
- Barchman R, Lindquist PB, Nagashima M, Kohr W, Lipan T, Napier M., (1989) Transmembrane TGF- $\alpha$  precursors activate EGF/TGF- $\alpha$  receptors. Cells;56:691-700.
- Bell GI, Fong NM, Wornstead MA, Coput DF, Ku L, Urden MS (1986) Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression in vitro and gene organization. Nucleic Acid Res;14:8427-46.
- Bottari SP, King IN, Reichlin S, Dahlstroem I, Lydon N, DeGasparo M., (1992) The angiotensin AT2 receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate guanylate cyclase. Biochem Biophys Res Commun; 183:206-211.

- Bringman TS, Linndquist PB, Derynck R. (1987) Different TGF- $\beta$  species are derived from a glycosylated and palmitoylated transmembrane precursor. *Cell*;48:429-40.
- Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, y Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. 2002. Capitulo 15. pp.
- Candelore MR, Wright MJ, Tota LM, Milligan j, Shei GJ, Bergstrom JD, Mandala SM. (2002) Phytosphingosine 1-phosphate: a high affinity ligand for the S1P(4)/Edg-6 receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 27;297:600-606.
- Carpenter, G., Cohen, S., (1979) Epidermal Growth Factor. *Annu Rev Biochem.* 48: 193-216.
- Casas G., Ruiz, M, A., Garcia-Sainz J, A., (2003) Lysophosphatidic acid induces alpha 1B-adrenergic receptor phosphorylation through G beta gamma, phosphoinositide 3-kinase, protein kinase C and epidermal growth factor receptor transactivation. *Biochim Biophys Acta.* Jul 21;1633(2):75-83.
- Casas-González P., A. Ruiz-Martínez, J.A. García-Sáinz, Lysophosphatidic acid induces alpha-1badrenergic receptor phosphorylation through G-beta-gamma, phosphoinositide 3-kinase, protein kinase C and epidermal growth factor receptor transactivation, *Biochim. Biophys. Acta*, 1633 (2003) 75-83.
- Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee CW, Mutoh T, Lin ME, Teo ST, Park KE, Mosley AN, Chun J. (2010) LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.*; 50:157-186.
- Chun J, Hla T, Lynch KR, Spiegel S, Moolenaar WH., (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 62: 579–587.
- Chun J, Jaenisch R. (1996). Clonal cell lines produces by infection of neocortical neuroblasts using multiple oncogenes transduced by retrovirus. *Molecular and Celullar Neuroscience*; 7: 304-321.
- Chun J. (1999) Lysophospholipid receptors: implications for neuronal signaling. *Critical Reviews in Neurobiology*; 13:151-168
- Chun, J., Dubin E., Gardell, S., Rivera, R., Lee, C., (2005) GPR92 as a new G12/13- and Gq- coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. *J Biol Chem.* Aug 18;281 (33):23 589-9

- Contos, J.J., Fukushima, N., Weiner, J.A., Kaushal, D. and Chun, J. (2000) Requirement for the IpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling - behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13384-9.
- Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. (1996) The of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*.. 8;379(6565):557-60
- De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E and Farquhar M G. (2000) The regulator of G protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 40: 235-271
- Druey, K. M. Bridging with GAPs: receptor communication through RGS proteins. *Science's STKE* 2001; *Sci. STKE*, 16 October 2001 Vol. 2001, Issue 104, p. re14
- Eichholtz, T., Jalink, K., Fahrenfort, I. and Moolenaar, W.H. (1993) The bioactive phospholipids lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J*, 291 ( Pt 3), 677-80.
- Fang, X., Gaudette, D., Furui, T., Mao, M., Estrella, V., Eder, A., Pustilnik, T., Sasagawa, T., Lapushin, R., Yu, S., Jaffe, R.B., Wiener, J.R., Erickson, J.R. and Mills, G.B. (2000) Lysophospholipid growth factors in the initiation, progression, metastases, and management of ovarian cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 905, 188-208.
- Ferguson SS, Zhang J, Barak LS, Caron MG. (1998). Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization. *Life Sci*. 62(17-18):1561-5.
- Fukushima N, Ishii I, Contos JA, Weiner JA, Chun J. (2001) Lysophospholipid receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*.; 41: 507-534.
- Gautam N, Downes GA, Yan K, Kisselev O. (1998) The G-protein complex. *Cell Signal*; 10: 447-55
- Gavras H. (1997) Angiotensin II antagonismo: a new avenue of hypertension management. *Blood Press Suppl.*;1:52-5.
- González-Arenas A., S.E. Avendaño-Vázquez, A. Cabrera-Wrooman, D. Tapia-Carrillo, F. Larrea, R. García-Becerra, J.A. García-Sáinz, Regulation of LPA receptor function by estrogens, *Biochim. Biophys. Acta*, 1783 (2008) 253-262.
- Gudermann T, Kalkbrenner F, Schultz G. (1996) Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu Rev. Pharamacol Toxicol.*; 36: 42959.
- Hecht JH, Weiner JA, Post SR, Chun L., (1996) Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *Journal of cell Biology*; 135: 1071-1083.

- Hinokio, K., Yamano, S., Nakagawa, K., Iraharaa, M., Kamada, M., Tokumura, A. and Aono, T. (2002) Lysophosphatidic acid stimulates nuclear and cytoplasmic maturation of golden hamster immature oocytes in vitro via cumulus cells. *Life Sci*, 70, 759-67.
- Hla T, Maciag T. (1990) An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein coupled receptors. *The Journal os Biological Chemistry*; 265: 9308-9313.
- Ishii I, Ye X, Fried152-25159.man B, Kawamura S, Contos J, Kingsbury MA, Yang AH, Zhang G, Brown JH and Chun J. (2002) Marked perinatal lethality and cellular signaling deficits in mice null for the two sphingosine 1-phosphate (S1) receptors, S1P(2)/EDG-5 and S1P(3)/EDG-3. *The journal of Biological Chemistry*; 277: 25.
- Jerold Chun, Timothy Hla, Kevin R. Lynch, Sarah Spiegel, and Wouter H. Moolenaar. (2010). *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid Receptor Nomenclature. Pharmacological Reviews* December 2010 vol. 62no. 4 579-587
- Johnson EN and Druey K M. (2002) Heterotrimeric G protein signaling: role in asthma and allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*; 109: 592-602.
- Kingsbury, M.A., Rehen, S.K., Contos, J.J., Higgins, C.M. and Chun, J. (2003) Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding. *Nat Neurosci*, 6, 1292-9.
- Kupperman E, An S, Osborne N, Waldron S, Stainer DY. (2000) A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development. *Nature*; 191.195.
- Medina L. C., J. Vázquez-Prado, J.A. García-Sáinz, Cross-talk between receptors with intrinsic tyrosine kinase activity and alpha1b-adrenoceptors, *Biochem. J.*, 350 Pt 2 (2000) 413-419.
- Lee CW, Rivera R, Gardell S, Dubin AE, Chun J. (2006) GPR92 as a new G12/13 and Gq coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. *Journal of Biological Chemistry.*; 281: 23589-23597.
- Lee M, Choi S, Hallde´ n G, Yo SJ, Schichnes D, and Aponte GW (2009) P2Y5 is a G(alpha)i, G(alpha)12/13 G protein-coupled receptor activated by lysophosphatidic acid that reduces intestinal cell adhesion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297:G641–G654

- Lefkowitz RJ. (1998) G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and -arrestines in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem*; 73: 18677-80.
- Luttrell LM, Della Rocca GJ, van Biesen T, Luttrell DK, Lefkowitz RJ. (1997) Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem*. . 272(7):4637-44
- lysophosphatidic acid-coupled LPA1/EDG-2 receptors via a dynamin2- and Rab5-dependent pathway, *J. Cell Sci.*, 116 (2003) 1969-1980.
- Mauco, G., Chap, H., Simon, M.F. and Douste-Blazy, L. (1978) Phosphatidic and lysophosphatidic acid production in phospholipase C-and thrombin-treated platelets. Possible involvement of a platelet lipase. *Biochimie*, 60, 653-61.
- McIntyre TM, Postler AV, Silva AR, St Hilaire A, Xu Y, Hinshaw JC, Zimmerman GA, Hama K, Aoki J, Arai H, Prestwich GD. (2003) Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPAR gamma agonist. *Proceeding of National Academy of Sciences USA.*;100:131-136.
- Molina, T., Romero, A., Garcia-Sainz, J, A., (2006) Insulin-like growth factor-I induces alpha(1B)-adrenergic receptor phosphorylation through G beta gamma and epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol Endocrinol.* Nov;20(11):2773-83.
- Mroczkowski B, Ball R. (1990) EGF: biology and properties of its gene and protein precursor. En: Habenicht A (ed). *Growth Factors, Differentiation Factors and Cytokine*. New York: Springer-Verlag;.p.18-30.
- Mukoyama M, Nakagima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ., (1993). Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem*; 268:24.539-24.542.
- Murakami M, Shiraishi A, Tabata K, Fujita N. (2008) Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 371:707-712.
- Murph M.M., G.H. Nguyen, H. Radhakrishna, G.B. Mills, Sharpening the edges of understanding the structure/function of the LPA1 receptor: expression in cancer and mechanisms of regulation, *Biochim. Biophys.Acta*, 1781 (2008) 547-557.

- Murph MM, Scaccia LA, Volpicelli LA, Radhakrishna H. (2003). Agonist-induced endocytosis of lysophosphatidic acid-coupled LPA1/EDG-2 receptors via a dynamin2- and Rab5-dependent pathway. *J Cell Sci.* May 15;116(Pt 10):1969-80.
- Noguchi K, Herr D, Mutoh T, Chun J. (2009) Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Current Opinion in Pharmacology.*; 9:15-23.
- Nieto-Posadas A, Picazo-Juárez G, Llorente I, Jara-Oseguera A, Morales-Lázaro S, Escalante-Alcalde D, Islas LD, Rosenbaum T. (2011). Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site. *Nat Chem Biol.* Nov 20;8(1):78-85. doi: 10.1038/nchembio.712.
- Nieto-Posadas A, Picazo-Juárez G, Llorente I, Jara-Oseguera A, Morales-Lázaro S, Escalante-Alcalde D, Islas LD, Rosenbaum T.
- Pasternack SM, von Kugelgen I, Aboud KA, Lee YA, Ruschendorf F, Voss K, Hillmer AM, Molderings GJ, Franz T, Ramirez A, et al. (2008) G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nat Genet* 40:329–334
- Pawson, T. and Van Der Geer, P., (1995) The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem Sci.* Jul; 20(7): 277-80.
- Postma FR, Jalink K, Hengeveld T, Bot AG, Alblas J, de Jonge HR, Moolenaar WH. (1996). Serum-induced membrane depolarization in quiescent fibroblasts: activation of a chloride conductance through the G protein-coupled LPA receptor. *EMBO J.* Jan 2;15(1):63-72.
- Postma, F.R., Hengeveld, T., Alblas, J., Giepmans, B.N., Zondag, G.C., Jalink, K. and Moolenaar, W.H. (1998) Acute loss of cell-cell communication caused by G protein-coupled receptors: a critical role for c-Src. *J Cell Biol*, 140, 1199-209.
- Rodríguez-Pérez C.E., E. Calvo-Ochoa, E.V. Kalashnikova, G. Reyes-Cruz, M.T. Romero-Ávila, J.A. García-Sáinz, Receptor tyrosine kinases regulate alpha1D-adrenoceptor signaling properties: phosphorylation and desensitization, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 41 (2009) 1276-1283.
- Roudabush, F., Pierce, K., Maudsley, S., Khan, K.D., Luttrell, L.M., (2000). Transactivation of the EGF receptor mediates IGF-1-stimulated shc phosphorylation and ERK 1/2 activation in COS-7 cells. *J Biol Chem* Jul 21;275(29):22583-9.
- Sano, T., Baker, D., Virag, T., Wada, A., Yatomi, Y., Kobayashi, T., Igarashi, Y. and Tigyi, G. (2002) Multiple mechanisms linked to platelet activation result in

- lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *J Biol Chem*, 277, 21197-206.
- Schlessinger, J., Ullrich, A., Berent, E., (1987) An insertional mutant of epidermal growth factor allows dissection of diverse receptor functions. *EMBO J. Sep*; 6 (9):2669-76.
  - Schneider M.R., E. Wolf, The epidermal growth factor receptor ligands at a glance, *J. Cell. Physiol.*, 218 (2009) 460-466.
  - Schumacher, K.A., Classen, H.G. and Spath, M. (1979) Platelet aggregation evoked in vitro and in vivo by phosphatidic acids and lysoderivatives: identity with substances in aged serum (DAS). *Thromb Haemost*, 42, 631-40.
  - Simon, M.F., Chap, H. and Douste-Blazy, L. (1982) Human platelet aggregation induced by 1-alkyl-lysophosphatidic acid and its analogs: a new group of phospholipid mediators? *Biochem Biophys Res Commun*, 108, 1743-50.
  - Soltoff SP, Avraham H, Avraham S, Cantley LC. (1998) Activation of P2Y2 receptors by UTP and ATP stimulates mitogen-activated kinase activity through a pathway that involves related adhesion focal tyrosine kinase and protein kinase C. *J Biol Chem. Jan 30*;273(5):2653-60.
  - Strotmann R, Schröck K, Bösel I, Stäubert C, Russ A, Schöneberg T. (2011) Evolution of GPCR: change and continuity. *Mol Cell Endocrinol*. 331(2):170-8
  - Tabata k, Baba K, Shiraishi A, Ito M, Fujita N. (2007) The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 36:861-866.
  - Tigyi, G. and Miledi, R. (1992) Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem*, 267, 21360-7.
  - Tigyi, G. and Parrill, A.L. (2003) Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action. *Prog Lipid Res*, 42, 498-526.
  - Timmermans PB, Carini DJ, Chiu AT, Duncia JV, Price WA, Wells GJ., (1991) Angiotensin II receptor antagonists: from discovery to antihypertensive drugs. *Hypertension*; 18 (suppl II):136-142.
  - Tokumura, A., Miyake, M., Nishioka, Y., Yamano, S., Aono, T. and Fukuzawa, K. (1999) Production of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in human follicular fluids of In vitro fertilization patients. *Biol Reprod*, 61, 195-9.

- Tuteja N. (2009) Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal Behav.* 4(10):942-7.
- Urs N.M., A.P. Kowalczyk, H. Radhakrishna, Different mechanisms regulate lysophosphatidic aciddependent
- Urs N.M., K.T. Jones, P.D. Salo, J.E. Severin, J. Trejo, H. Radhakrishna, A requirement for membrane cholesterol in the beta-arrestin- and clathrin-dependent endocytosis of LPA1 lysophosphatidic acid receptors, *J. Cell Sci.*, 118 (2005) 5291-5304.
- Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT and Gaitanaris GA. (2003). The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci.* 100(8):4903-8
- versus phorbol ester-dependent internalization of the LPA1 receptor, *J. Biol. Chem.*, 283 (2008)
- Watson, S.P., McConnell, R.T. and Lapetina, E.G. (1985) Decanoyl lysophosphatidic acid induces platelet aggregation through an extracellular action. Evidence against a second messenger role for lysophosphatidic acid. *Biochem J*, 232, 61-6.
- Yanagida K, Masafo K, Nakanishi H, Kihara Y, Hamano F, Tajima Y, Taguchi R, Shimizu T, Ishii S. (2009) Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *Journal of Biological Chemistry.*; 284: 17731-17741.
- Yuan, X.B., Jin, M., Xu, X., Song, Y.Q., Wu, C.P., Poo, M.M. and Duan, S. (2003) Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nat Cell Biol*, 5, 38-45.
- Zheng, Y., Kong, Y. and Goetzl, E.J. (2001) Lysophosphatidic acid receptor-selective effects on Jurkat T cell migration through a Matrigel model basement membrane. *J Immunol*, 166, 2317-22.
- Zwick E., P.O. Hackel, N. Prenzel, A. Ullrich, The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems, *Trends Pharmacol. Sci.*, 20 (1999) 408-412.