



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Fosforilación del receptor de esfingosina-1 fosfato tipo 1  
mediada por isoformas de la proteína cinasa C**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Marco Antonio Morquecho León

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz

[Instituto de Fisiología Celular UNAM](#)

Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares

[Facultad de química UNAM](#)

Dra. Marina Macías Silva

[Instituto de Fisiología Celular UNAM](#)

MÉXICO, D. F. junio, 2014



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.

**La presente investigación fue llevada a cabo en el laboratorio 303 del edificio sur del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del doctor Jesús Adolfo García Sáinz. Esta investigación fue financiada por el fondo sectorial SEP/CONACYT clave 177556 y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) clave IN200812 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA). Marco Antonio Morquecho León fue estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y apoyado por una beca del CONACyT.**

**Los resultados de la presente investigación fueron publicados en la revista internacional arbitrada *Biochemica et Biophysica Acta*, con factor de impacto 4.947.**

**Marco Antonio Morquecho-León, Silvana Bazúa-Valenti, M. Teresa Romero-Ávila, J. Adolfo García-Sáinz. Isoforms of protein kinase C involved in phorbol ester-induced sphingosine 1-phosphate receptor 1 phosphorylation and desensitization. *Biochemica et Biophysica Acta*. 2014. 1843; 327-334.**

## **Agradecimientos**

**Al Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, por el ejemplo constante que representa para todos sus alumnos y ex alumnos, y por brindarme la oportunidad de colaborar en su equipo de trabajo.**

**A la Doctora María Teresa Romero Ávila por el gran apoyo técnico que me brindó, a Silvana Bazúa Valenti, quien fue responsable de la obtención de los datos de liberación de calcio intracelular y las inmunoprecipitaciones de las isoformas de la PKC y al Dr. Jean Alberto Castillo Badillo por su apoyo en la microscopía confocal.**

**A las Doctoras Marina Macías Silva y Rosario Adelaida Muñoz Clares, de quienes los consejos y el impulso en los momentos difíciles fueron fundamentales para llegar al final de este camino.**

**A los revisores de mi tesis: Dra. Victoria Chagoya Hazas, Dra. Marietta Tuena Sangri, Dra. Marina Gavilanes Ruiz, Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez y Dr. Félix Recillas Targa, por los valiosísimos comentarios y correcciones hechos al trabajo.**

**A mi esposa Karolina Gilas, me faltaría espacio para agradecer plenamente, te amo.**

**A mi adorado hijo Gustavo, por llegar justo a tiempo, darme la alegría de verlo crecer y por el orgullo de ser su papi.**

**A mis amados padres Bonifacio y Ernestina por el amor que demuestran y por estar siempre ahí.**

**A mis hermanas Liliana, Claudia y Sonia, porque siguen siendo grandes ejemplos para mí.**

**A mis queridos suegros Jolanta y Jerzy Gilas, por su presencia aún a tanta distancia.**

**A mis sobrinos Gabriela, Julieta, Samantha, Paloma, Ángel y Danna, porque al paso de los años me hacen sentir más orgulloso de ser su tío.**

**A mis compañeros en el laboratorio: Aurelio, Germán, Jean, Marco Alfonzo, Omar, Rocío Alcántara, Silvana y Tere Romero, por los buenos tiempos que pasamos juntos en el 303 sur.**

**A mis mejores amigos Francisco Juárez y Cristina Moctezuma, por seguir siendo mis compañeros de ruta después de tanto tiempo.**

**A todos aquellos que no menciono de nombre pero que estás siempre conmigo, gracias por la tracción a sangre.**

## Índice de contenido

1. Abstract.....	8
2. Resumen.....	9
3. Introducción.....	10
3.1 Esfingosina 1-fosfato.....	10
3.2 Función biológica de la esfingosina-1 fosfato.....	13
3.3 Distribución tisular y estudios de <i>knock out</i> de los receptores de S1P.....	13
3.4 Receptor de esfingosina fosfato-1 tipo 1.....	15
3.5 Señalización mediada por el receptor S1P <sub>1</sub> .....	17
3.6 Regulación de los GPCRs.....	20
3.7 La proteína cinasa C.....	22
3.7.1 Estructura de las isoformas de la PKC.....	23
3.7.2 Clasificación de las isoformas de PKC.....	24
3.7.3 Funciones de la PKC.....	24
3.8 Patologías relacionadas con el receptor S1P <sub>1</sub> .....	25
3.8.1 Cáncer.....	25
3.8.2 Enfermedades autoinmunes.....	25
4. Marco teórico.....	28
5. Justificación.....	29
6. Hipótesis.....	29
7. Objetivo general.....	30
7.1 Objetivos particulares.....	30
8. Materiales y métodos.....	31
8.1. Cultivo celular.....	31
8.2. Transfección de células LNCaP.....	31
8.3. Selección de las líneas celulares estables.....	32
8.4. Determinación de la concentración de calcio intracelular.....	32
8.5. Marcaje metabólico con [ <sup>32</sup> P]Pi.....	33
9. Resultados.....	34
9.1. Caracterización del receptor para esfingosina fosfato tipo 1.....	35

9.2. Efecto de la degradación de las isoformas de la PKC en la fosforilación del receptor S1P <sub>1</sub> .....	38
9.3. Efecto de inhibidores de las isoformas de la PKC sobre la fosforilación y desensibilización del receptor S1P <sub>1</sub> .....	39
9.4. Efecto de inhibidores de las isoformas de la PKC sobre la fosforilación inducida por S1P, y de factores de crecimiento sobre la desensibilización y fosforilación del receptor S1P <sub>1</sub> .....	41
9.5. Efecto de la transfección de dominantes negativas de PKC $\alpha$ y PKC $\beta$ II sobre la fosforilación del receptor S1P <sub>1</sub> .....	45
9.6. Efecto de la transfección de shRNA PKC $\alpha$ y PKC $\beta$ II sobre la fosforilación del receptor S1P <sub>1</sub> .....	46
9.7. Especificidad de los shRNA PKC $\alpha$ y $\beta$ II.....	47
9.8. Caracterización de las mutantes del receptor S1P <sub>1</sub> .....	49
10. Discusión .....	51
11. Conclusiones .....	56
12. Bibliografía .....	58

## Índice de figuras

Figura 1. Generación de la molécula de esfingosina 1-fosfato.....	11
Figura 2. Representación de la estructura de los GPCRs. ....	17
Figura 3. Vía de señalización intracelular del receptor S1P <sub>1</sub> . ....	19
Figura 4. Vías de desensibilización de los GPCRs. ....	22
Figura 5. Representación esquemática de la estructura de las isoformas de PKC .....	23
Figura 6. Esquema del receptor de esfingosina-1 fosfato fusionado a la proteína verde fluorescente. ....	34
Figura 7. Efecto de la S1P en la concentración de calcio intracelular y la fosforilación del receptor S1P <sub>1</sub> -GFP. ....	35
Figura 8. Autoradiografía y Western blot de la fosforilación del receptor S1P <sub>1</sub> . ....	36
Figura 9. Efecto del PMA en la concentración de calcio intracelular mediada por S1P y en la fosforilación del receptor S1P <sub>1</sub> -GFP. ....	37
Figura 10. Efecto de la degradación de las isoformas de la PKC en la fosforilación del receptor S1P <sub>1</sub> .....	38
Figura 11. Efecto de inhibidores de las isoformas de la PKC sobre la fosforilación y desensibilización del receptor S1P <sub>1</sub> .....	40

Figura 12. Efecto de inhibidores de las isoformas de la PKC sobre la fosforilación inducida por S1P, y de factores de crecimiento sobre la desensibilización y fosforilación del receptor S1P <sub>1</sub> .....	42
Figura 13. Asociación de las isoformas de PKC al receptor S1P <sub>1</sub> . .....	43
Figura 14. Efecto de la transfección de dominantes negativas de PKC $\alpha$ y PKC $\beta$ II sobre la fosforilación del receptor S1P <sub>1</sub> .....	44
Figura 15. Sobreexpresión de las dominantes negativas de PKC.....	45
Figura 16. Efecto de la transfección de shRNA PKC $\alpha$ y PKC $\beta$ II sobre la fosforilación del receptor S1P <sub>1</sub> .....	46
Figura 17. Especificidad de los shRNA PKC $\alpha$ y $\beta$ II. ....	47
Figura 18. Internalización del receptor S1P <sub>1</sub> inducida por S1P y PMA. ....	48
Figura 19. Fosforilación de las mutantes del receptor S1P <sub>1</sub> .....	49
Figura 20. Conclusión gráfica.....	57

## Índice de tablas

Tabla 1. Receptores de S1P, proteínas G a las que se acoplan, vías de señalización, distribución tisular, efectos fisiológicos y agonistas/antagonistas.....	14
--	----

## Abreviaturas

<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Concentración intracelular de calcio
<b>BSA</b>	(Bovine Serum Albumin) Albúmina Sérica Bovina
<b>cAMP</b>	(Cyclic Adenosyl Monophosphate) Adenosin monofosfato cíclico
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>GFP</b>	(Green Fluorescent Protein) Proteína verde fluorescente
<b>GPCRs</b>	(G Protein Coupled Receptors) Receptores Acoplados a Proteínas G
<b>GRKs</b>	(G Protein Coupled Receptor Kinases) Cinasas de los Receptores Acoplados a Proteínas G
<b>GTP</b>	(Guanosine triphosphate) Guanosina trifosfato
<b>IP3</b>	Inositol trifosfato
<b>KRH</b>	(Krebs Ringer Hepes Glucose) Amortiguador Krebs-Hepes-Glucosa
<b>LPA</b>	(Lysophosphatidic acid) Ácido lisofosofatídico
<b>mRNA</b>	(Messenger Ribonucleic acid) Ácido ribonucleico mensajero
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>p42/p44</b>	Cinasa de ERK
<b>PI3K</b>	Cinasa de fosfatidil inositol 3
<b>PKA</b>	(Protein Kinase A) Proteína Cinasa A
<b>PKC</b>	(Protein Kinase C) Proteína Cinasa C
<b>PLC<math>\beta</math></b>	Fosfolipasa C $\beta$
<b>PMA</b>	Forbol-12miristrato 13-acetato
<b>shRNA</b>	Short hairpin RNA
<b>SK</b>	Esfingosina cinasa
<b>S1P<sub>1</sub>-S351A</b>	Receptor S1P <sub>1</sub> mutante, cambiada la serina 351 por alanina
<b>S1P<sub>1</sub>-S355A</b>	Receptor S1P <sub>1</sub> mutante, cambiada la serina 355 por alanina
<b>ERK 1/2</b>	(Extracellular Regulated Kinase) Cinasas reguladas extracelularmente
<b>S1P</b>	Esfingosina 1-fosfato
<b>S1P<sub>1</sub></b>	Receptor de esfingosina 1-fosfato tipo 1
<b>S1P<sub>1</sub>-5A</b>	Receptor S1P <sub>1</sub> mutante, cambiadas las serinas 351, 353, 355, 358 y 359 por alaninas
<b>HDL</b>	(High Density Lipoprotein) Lipoproteínas de alta densidad

<b>EDG</b>	(Epitelial Differentiation Gen) Gen de diferenciación epitelial
<b>ML056</b>	Ácido (R)-3-amino-(3-hexifenilamino)-4-oxobutilfosfónico
<b>NK</b>	(Natural Killer cells) Células asesinas naturales
<b>RTK</b>	(Receptor with Tyrosine Kinase activity) Receptores con actividad de tirosina cinasa
<b>PDGF</b>	(Platelet Derived Growth Factor) Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>EGF</b>	(Endothelial Growth Factor) Factor de crecimiento endotelial
<b>VEGF</b>	(Vascular Endothelial Growth Factor) Factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>PKB/Akt</b>	(Protein Kinase B/Akt) Proteína cinasa B/Akt
<b>eNOS</b>	(epitelial Nitric Oxide Sintase) Óxido nítrico sintasa epitelial
<b>PKA</b>	(Protein Kinase A) Proteína cinasa A
<b>FTY720</b>	2-amino-2-(2-[4-octofenil]-1, 3-propanodiol

## 1. Abstract

The role of protein kinase C (PKC) isozymes in phorbol myristate acetate (PMA)-induced sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor 1 (S1P<sub>1</sub>) phosphorylation was studied. Activation of S1P<sub>1</sub> receptors induced an immediate increase in intracellular calcium, which was blocked by preincubation with PMA. Both S1P and PMA were able to increase S1P<sub>1</sub> phosphorylation in a concentration- and time-dependent fashion. Down-regulation of PKC (overnight incubation with PMA) blocked the subsequent effect of the phorbol ester on S1P<sub>1</sub> phosphorylation, without decreasing that of the natural agonist. Pharmacological inhibition of PKC  $\alpha$  prevented the effects of PMA on S1P-triggered intracellular calcium increase and on S1P<sub>1</sub> phosphorylation; no such effect was observed on the effects of the sphingolipid agonist. The presence of PKC  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms in S1P<sub>1</sub> immunoprecipitates was evidenced by Western blotting. Additionally, expression of dominant-negative mutants of PKC  $\alpha$  or  $\beta$  and knockdown of these isozymes using short hairpin RNA, markedly attenuated PMA-induced S1P<sub>1</sub> phosphorylation. Our results indicate that the classical isoforms, mainly PKC  $\alpha$ , mediate PMA-induced phosphorylation and desensitization of S1P<sub>1</sub>.

## 2. Resumen

Se estudió el papel de las isoformas de la proteína cinasa C (PKC) en la fosforilación del receptor de esfingosina 1-fosfato tipo 1 (S1P<sub>1</sub>) inducida por forbol miristrato acetato (PMA). La activación del receptor S1P<sub>1</sub> indujo un incremento inmediato en los niveles de calcio intracelular, el cual fue bloqueado por la preincubación con PMA. Tanto la S1P como el PMA fueron capaces de incrementar la fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub> de manera dependiente de la dosis y con respecto al tiempo. La regulación negativa de la PKC (inducida por una incubación de toda la noche con PMA) bloqueó el efecto subsecuente del éster de forbol en la fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub>, sin afectar la fosforilación inducida por el ligando natural. La inhibición farmacológica de la PKC  $\alpha$  evitó los efectos del PMA sobre el aumento de calcio intracelular inducido por S1P y la fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub>. Dichos efectos no fueron observados en la activación del receptor S1P<sub>1</sub> por S1P. La presencia de PKC $\alpha$  y  $\beta$  en inmunoprecipitados del receptor S1P<sub>1</sub> fue evidenciada por Western blot. Adicionalmente, la expresión de mutantes dominantes negativas de PKC $\alpha$  y  $\beta$  y el "knockdown" de dichas isoformas usando "short hairpin RNA", atenuaron notablemente la fosforilación del S1P<sub>1</sub> inducida por PMA. Nuestros resultados indican que isoformas clásicas de la PKC, principalmente la  $\alpha$ , median la fosforilación y desensibilización del receptor S1P<sub>1</sub>.

### **3. Introducción**

#### **3.1 Esfingosina 1-fosfato**

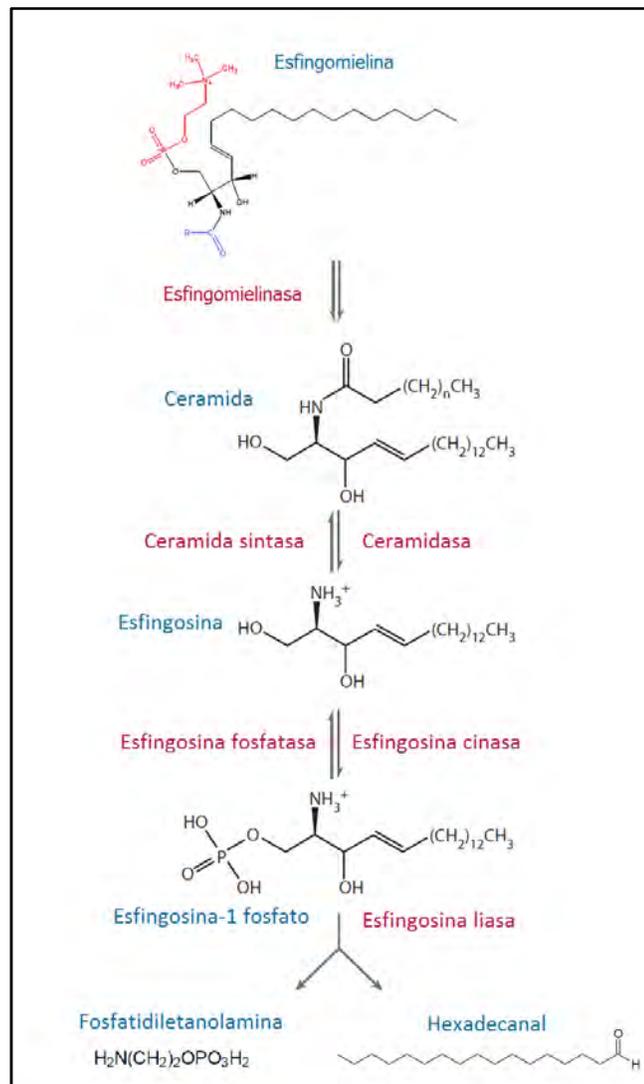
La esfingosina-1 fosfato (S1P) es un lisofosfolípido zwitteriónico con actividad biológica que es producida en grandes cantidades por plaquetas activadas y eritrocitos. Se trata de un metabolito que tiene como precursor a la esfingomielina, un componente abundante de la membrana plasmática. La esfingomielinasa cataliza la reacción de hidrólisis irreversible de la esfingomielina, liberando fosfocolina y ceramida. La ceramida es a su vez degradada por la ceramidasa, que libera a la esfingosina y un ácido graso. La posterior fosforilación de la esfingosina es llevada a cabo por la esfingosina cinasa (SK). La esfingosina 1-fosfato puede ser desfosforilada por la fosfatasa de esfingosina, y degradada por la esfingosina liasa (Figura 1) (Brinkmann *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2006; Rosen *et al.*, 2009).

Existen dos isoformas de la esfingosina cinasa, designadas como esfingosina cinasa tipo 1 y tipo 2 (SK1 y SK2); pertenecen a la familia de cinasas de lípidos, las cuales incluyen a la ceramida cinasa y a la diacilglicerol cinasa. Están distribuidas ubicuamente en los tejidos, aunque son especialmente abundantes en eritrocitos y células epiteliales. Ambas enzimas difieren sustancialmente en tamaño, así como en niveles de expresión y distribución tisular, indicando diferentes funciones fisiológicas, aun cuando comparten grandes secuencias de aminoácidos que están altamente conservadas (Rose *et al.*, 2009).

La SK1 es una enzima predominantemente citosólica, una vez activada tiene como efecto fisiológico la supervivencia celular, probablemente por la inhibición de la biosíntesis de ceramida. Se ha observado que se expresa en altos niveles en células cancerosas y tumorales, y que cuando se inhibe farmacológicamente, se inducen un bloqueo de la proliferación celular y la apoptosis. La SK1 regula los niveles tanto citosólicos como extracelulares de S1P. Por su parte, la SK2 es capaz de traslocarse al núcleo, en donde puede inducir apoptosis, por el incremento en los niveles de enzimas que sintetizan ceramida (French *et al.*, 2006; Blaho *et al.*, 2011).

Una vez que la S1P es producida dentro de la célula, tiene que ser transportada a través de la membrana plasmática por la acción de la proteína transportadora ABCC1

(Mitra *et al.*, 2006), para así unirse a sus receptores en la cara externa de la membrana. La unión de la S1P a sus receptores puede ser en la misma célula que la produjo (acción autocrina), células cercanas (paracrina) o bien, ser transportada por la circulación hasta tejidos distantes (endocrina) (Álvarez *et al.*, 2007). Además, la S1P puede ser producida en el plasma por la hidrólisis de la esfingosil-fosforilcolina mediada por enzima autotaxina (Clair *et al.*, 2003).



**Figura 1. Generación de la molécula de esfingosina 1-fosfato.** La esfingosina 1-fosfato es generada a través de la vía metabólica productora de ceramida intracelular. La ceramida es obtenida a partir de la esfingomielina membranaral. La ceramida es *N*-desacetilada por la enzima ceramidasa, liberando a la esfingosina. Una vez liberada, la esfingosina es fosforilada por la esfingosina cinasa, dando lugar a la esfingosina 1-fosfato, que es biológicamente activa. La S1P es degradada por la esfingosina liasa, los productos de la degradación son el hexadecanal y la fosfatidiletanolamina (Figura modificada de Rosen *et al.*, 2009; Brinkmann *et al.*, 2004).

La S1P es liberada hacia el torrente sanguíneo después de la activación de algún sistema fisiológico, como pueden ser factores de crecimiento, citocinas, agonistas de receptores acoplados a proteínas G y antígenos. La S1P puede a su vez estimular las cascadas de señalización de factores de crecimiento, y citocinas. Tiene un papel crítico en la agregación plaquetaria y la trombosis, así como en el agravamiento de los padecimientos cardiovasculares. Por otro lado, la concentración relativamente alta de S1P en las lipoproteínas de alta densidad (HDL) disminuye el riesgo de aterogénesis. Existe evidencia de que la S1P a través de sus receptores es capaz de regular el ritmo cardiaco, el flujo de sangre en las arterias coronarias y la presión sanguínea. Se ha sugerido que la S1P en conjunto con otros lípidos como la esfingosilfosforilcolina y el lisosulfátido son responsables de los efectos clínicos benéficos de las HDL, a través de activación de la producción de óxido nítrico, un vasodilatador con potente acción anti aterogénica y anti inflamatoria (Nofer, 2008; Argraves *et al.*, 2007).

La S1P se encuentra en concentraciones intracelulares bajas, aproximadamente 10-100 nM. Sin embargo, en el plasma la S1P puede alcanzar concentraciones de 350 nM a 1  $\mu$ M, está asociada en un 98.5% a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y en cantidades pequeñas a la albúmina. Los eritrocitos expresan esfingosina cinasas muy activas y carecen de las enzimas degradativas de la S1P, por lo que se cree que dichas células son su fuente principal en plasma. La S1P también es liberada por las plaquetas después de ser estimuladas por la trombina durante la cascada de coagulación; también se ha observado que los mastocitos y monocitos secretan S1P (Murata *et al.*, 2000; Argraves *et al.*, 2007; Hänel *et al.*, 2007; Wilkerson *et al.*, 2012).

En mamíferos, los niveles de S1P en el flujo linfático son cuatro o cinco veces menores que en plasma, mientras que en el líquido intersticial la concentración es mil veces menor. La diferencia de concentraciones genera un gradiente entre los compartimentos vasculares y los no vasculares, el cual es utilizado por los linfocitos como una señal para egresar de regiones de baja concentración (nódulos linfáticos, del timo y tejidos periféricos) a regiones de alta concentración (linfa y plasma). El receptor S1P<sub>1</sub> es esencial para el correcto egreso de los linfocitos, en un mecanismo regulatorio muy fino, que incluye la fosforilación del receptor, endocitosis, reciclaje a la membrana y la unión

directa con proteínas reguladoras, como la CD69 (Blaho *et al.*, 2011; Pitson, 2011; Oo *et al.*, 2011).

### **3.2 Función biológica de la esfingosina-1 fosfato**

Originalmente se pensaba que la S1P era un segundo mensajero intracelular, más tarde se descubrió que se trataba de un ligando para un receptor acoplado a proteínas G, que primero fue incluido en la familia de receptores del Gen de Diferenciación Epitelial (EDG), posteriormente la familia de receptores EDG fue dividida en 2 y sus miembros renombrados de acuerdo al lisofosfolípido que las activa: S1P o ácido lisofosfatídico (Watterson *et al.*, 2001; Chun *et al.*, 2002).

La S1P ejerce sus acciones celulares a través de la unión con receptores específicos de superficie, denominados receptores de esfingosina fosfato (S1P<sub>1-5</sub>), a través de los cuales desencadena una gran cantidad de fenómenos celulares, incluyendo el tráfico linfocitario, el desarrollo e integridad del endotelio vascular, la modulación de la frecuencia cardíaca, la maduración vascular, la proliferación y supervivencia celulares, la prevención o supresión de la apoptosis y la quimiotaxis, entre otros (Chun *et al.* 2002, Wilkerson *et al.*, 2012).

### **3.3 Distribución tisular y estudios “knock out” de los receptores de S1P**

En mamíferos los receptores S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> y S1P<sub>3</sub> están distribuidos ubicuamente en el organismo, aunque se expresan en mayor cantidad en cerebro, corazón, bazo, hígado, pulmón, timo, riñón, músculo esquelético; además, el receptor S1P<sub>1</sub> se expresa en grandes cantidades en órganos linfoides y el receptor S1P<sub>3</sub> en testículos. El receptor S1P<sub>4</sub> está restringido a los órganos linfoides y pulmón, y el receptor S1P<sub>5</sub> se encuentra en cerebro, piel y bazo (Rosen *et al.*, 2009).

Las pruebas hechas en ratones “knock out” mostraron que la delección del receptor S1P<sub>1</sub> es letal en ratones en etapa embrionaria, ya que sufren un severo defecto en la migración del músculo liso de las arterias dorsal y cerebral, lo que ocasiona una ruptura vascular a gran escala. Estudios posteriores en los que se deletó *in vivo* al

receptor S1P<sub>1</sub> en células endoteliales y en células de músculo liso vascular, se encontró que la presencia del receptor S1P<sub>1</sub> es crucial para que las células de músculo liso vascular recubran a las células endoteliales, asegurando así el reforzamiento correcto de la pared vascular.

La delección de los receptores S1P<sub>2</sub> y S1P<sub>3</sub> no es letal, sin embargo, las crías con el receptor S1P<sub>2</sub> deletado presentan baja viabilidad, convulsiones y sordera; mientras que las crías con el receptor S1P<sub>3</sub> deletado son poco viables y tienen baja resistencia a infecciones sistémicas. El hecho de que la delección de los receptores S1P<sub>2</sub> y S1P<sub>3</sub> no resulte letal para las crías, sugiere que el receptor S1P<sub>1</sub> estaría compensando algunas de las funciones perdidas con la delección de los otros dos receptores (Rosen *et al.*, 2009; Blaho *et al.*, 2011).

Receptor	Proteína G acoplada	Vías de señalización	Distribución tisular	Efectos fisiológicos	Agonistas/ antagonistas
S1P <sub>1</sub>	G <sub>i/o</sub> , G <sub>12/13</sub>	↓AC, ↑ERK, ↑PLC, ↑PI3K/Akt, ↑eNOS, ↑Rac, ↑Rho	Ubicuo	Movilidad celular, tráfico de linfocitos, angiogénesis, maduración vascular y tono, neurogénesis	FTY720-P, KRP-203, SEW2871, VPC 23019
S1P <sub>2</sub>	G <sub>i/o</sub> , G <sub>q</sub> , G <sub>12/13</sub>	↓AC, ↑PLC, ↑JNK, ↑p38, ↓Rho, ↓Rac	Ubicuo	Inhibe movilidad y proliferación, excitación neural, sistema auditivo	JTE 013
S1P <sub>3</sub>	G <sub>i/o</sub> , G <sub>q</sub> , G <sub>12/13</sub>	↓AC, ↑ERK, ↑PLC, ↑Rac, ↑Rho	Ubicuo	Bradycardia, barrera epitelial pulmonar, sistema auditivo	FTY720-P, VPC 23019
S1P <sub>4</sub>	G <sub>i/o</sub> , G <sub>s</sub> , G <sub>12/13</sub>	↑AC, ↑ERK, ↑PLC	Pulmón, órganos linfoides	Citocinas, diferenciación de células dendríticas	FTY720-P
S1P <sub>5</sub>	G <sub>i/o</sub> , G <sub>12</sub>	↓AC, ↓ERK, ↑JNK, ↑p54JNK	Células NK, piel, bazo, sistema nervioso	Movilidad de células NK	FTY720-P

**Tabla 1. Receptores de S1P, proteínas G a las que se acoplan, vías de señalización, distribución tisular, efectos fisiológicos y agonistas/antagonistas** (Modificada de Takabe *et al.*, 2008).

Los ratones con el receptor S1P<sub>4</sub> deletado mostraron una cantidad normal de linfocitos en circulación periférica, y una arquitectura regular en los órganos linfoides secundarios. Se observaron efectos marginales en el funcionamiento de los linfocitos T *in vivo*. Sin embargo, la migración de las células dendríticas y la secreción de citocinas fueron profundamente afectadas por la ausencia del receptor S1P<sub>4</sub>. La pérdida de la expresión del

receptor S1P<sub>4</sub> en células dendríticas reduce significativamente la diferenciación a TH17 por parte de los linfocitos TH (Schulze *et al.*, 2011). La delección del receptor S1P<sub>5</sub> induce una egresión defectuosa de las células NK desde los nódulos linfáticos y la médula ósea (Velocigene, 2008). Se puede observar un resumen de las características más relevantes de los receptores para S1P en la Tabla 1.

### **3.4 Receptor de esfingosina fosfato-1 tipo 1**

El receptor S1P<sub>1</sub> fue identificado por primera vez como una proteína de aparición inmediata en células del endotelio venoso del cordón umbilical, en respuesta a un estímulo con forbol miristrato acetato (PMA). En un principio el receptor fue denominado gen de la diferenciación endotelial tipo 1 (EDG1), y posteriormente cambió su nombre a receptor de esfingosina 1-fosfato tipo 1 (Watterson *et al.*, 2001). Estructuralmente, el receptor S1P<sub>1</sub> pertenece a la superfamilia de los receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (GPCRs).

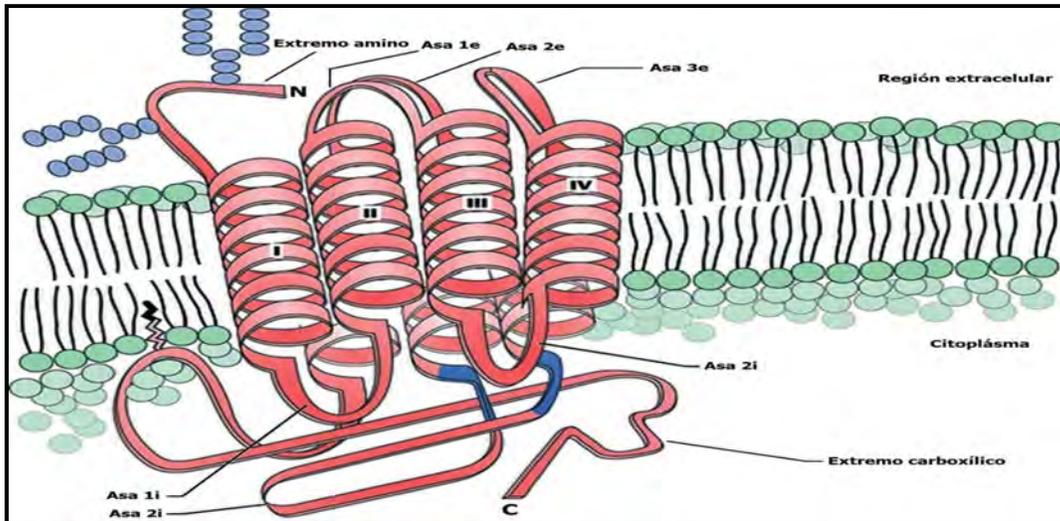
En 2012 se determinó la estructura a nivel atómico del receptor S1P<sub>1</sub>, los investigadores responsables utilizaron una proteína quimérica del receptor S1P<sub>1</sub> fusionado con la lisozima T4 (S1P<sub>1</sub>-T4L), usando al antagonista selectivo ácido (R)-3-amino-(3-hexilfenilamino)- 4-oxobutilfosfónico (ML056) como ligando para la cristalografía de rayos X. La estructura del receptor S1P<sub>1</sub>, como la de todos los GPCRs, consta de un extremo amino extracelular, 3 asas extracelulares, tres asas intracelulares y un extremo carboxilo intracelular; el plegamiento tridimensional del conjunto de asas forma la bolsa de unión del ligando (Figura 2). Una de las características interesantes de la formación de la bolsa del ligando, es que hay participación del extremo amino del receptor, el cual se dobla sobre la región superior del receptor, contribuyendo a formar interacciones débiles con el ligando, a la vez que forma una especie de compuerta, la cual limita el acceso del ligando a la bolsa de unión. Esto explica por qué los ligandos del receptor S1P<sub>1</sub> muestran una saturación lenta del receptor cuando hay exceso de ligando, ya que experimentan dificultades físicas para acceder al sitio de unión. Aparentemente, el ligando tendría acceso a la bolsa de unión desde dentro de la membrana, tal como se ha propuesto que ocurre

con el cargado covalente del retinal en los receptores de luz, así como la entrada de la anandamina en los receptores de cannabinoides (Hanson *et al.*, 2012).

Estudios recientes han demostrado que la palmitoilación es una modificación postraduccional que tiene un papel muy importante en la señalización de los GPCRs. La mayoría de los GPCRs es palmitoilada en uno o más residuos de cisteína, usualmente de 10 a 14 residuos después de la región yuxtamembranal del receptor (Qanbar *et al.*, 2003; Escribá *et al.*, 2007). La palmitoilación de los GPCRs regula su localización y asociación a la membrana, las interacciones proteína-proteína y lípido proteína, así como la actividad enzimática. También puede afectar los patrones de fosforilación de los GPCRs, debido a la cercanía de los sitios de palmitoilación y de los sitios de fosforilación de algunos receptores. Se ha observado que receptores no palmitoilables tampoco son fosforilados (Hawtin *et al.* 2001).

El receptor S1P1 es palmitoilado en las cisteínas 328, 329 y 331 del extremo carboxilo; cuando se utilizaron mutantes no palmitoilables del receptor S1P1, se observó que la afinidad por la S1P no varió, sin embargo la afinidad del receptor por el ligando sintético FTY720-P disminuyó notablemente. La señalización del receptor fue afectada por la ausencia de la palmitoilación: tanto en presencia de S1P como de FTY720-P se observó una activación disminuida de ERK. También la internalización del receptor fue afectada, mostrando una ralentización en el proceso de inclusión en vesículas recubiertas de clatrina (Ohno *et al.*, 2009).

En una investigación de 2005 se encontró que el receptor es sulfatado en las tirosinas 19 y 22, correspondientes al extremo amino extracelular. La pérdida de la sulfatación disminuye notablemente la afinidad del receptor por la S1P, además de afectar considerablemente la señalización del receptor; un receptor mutante que no puede ser sulfatado, es incapaz de inducir la quimiotaxis en linfocitos T y de generar citosinas. La inhibición de la sulfatación del receptor S1P1 o de la delección de la sulfatasa en ratones, provoca la supresión de la respuesta inmunológica (Fieger *et al.*, 2005)



**Figura 2. Representación de la estructura de los GPCRs.** Se puede observar el extremo amino extracelular, la formación de 3 asas extracelulares (e), de 3 asas intracelulares (i) y el extremo carboxilo intracelular. Las asas extracelulares, en conjunto con el extremo amino forman el sitio de unión al ligando (Modificada de Malbon *et al.*, 2001).

### 3.5 Señalización mediada por el receptor S1P<sub>1</sub>

La activación del receptor S1P<sub>1</sub> por su ligando natural es de vital importancia para el funcionamiento del organismo en su totalidad, sus funciones más importantes son regular los sistemas vascular e inmune. En el sistema vascular, el receptor S1P<sub>1</sub> regula la angiogénesis, la estabilidad y permeabilidad vascular. En el sistema inmune es el principal regulador del tráfico de los linfocitos T y B. La interacción entre la S1P y el receptor S1P<sub>1</sub> es necesaria para la migración de las células inmunes desde los órganos linfoides (como timo y nódulos linfáticos) hacia el torrente sanguíneo y los vasos linfáticos. La regulación negativa de los distintos receptores de la S1P es crítica en la inmunoregulación (Hla *et al.*, 1990; Watterson *et al.*, 2001; Álvarez *et al.*, 2007; Fyrst *et al.*, 2008).

La S1P a través del receptor S1P<sub>1</sub> impide la acumulación intracelular de AMP cíclico (cAMP), inhibiendo a la adenilil ciclasa a través la activación de la proteína G<sub>i/o</sub>. También moviliza calcio, induciendo la activación de la fosfolipasa C $\beta$ , que hidroliza fosfolípidos de membrana, produciendo diacilglicerol (DAG) y 1,4,5 inositol trifosfato (IP3). El IP3 se une y activa canales de calcio en el retículo endoplásmico, produciendo la liberación de calcio al citoplasma. El aumento en la concentración de calcio intracelular induce la activación de

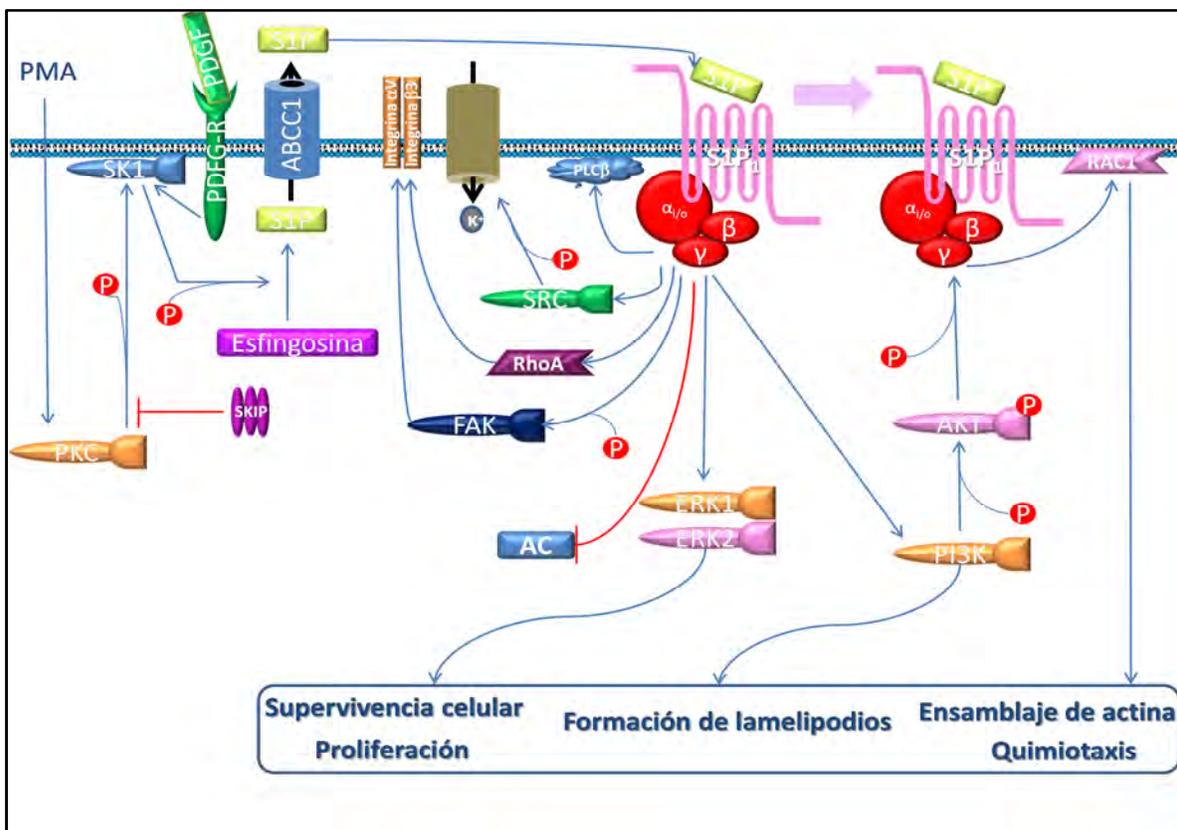
la PI3K y ERK1/2 y la subsecuente activación de la proteína cinasa B (PKB/Akt). La migración de las células del endotelio vascular mediada por la S1P requiere que el receptor S1P<sub>1</sub> sea fosforilado por Akt en el residuo de treonina 236, en un evento que involucra la unión directa de la cinasa activa al receptor. La fosforilación del S1P<sub>1</sub> por Akt es una señal que no es requerida para la activación y señalización de la proteína G<sub>i</sub>, sin embargo, es clave para la activación de la proteína G pequeña Rac, el ensamblaje de la actina cortical y la quimiotaxis. Si la treonina 236 es cambiada por valina, el receptor secuestra a Akt, y pierde su capacidad de activar la vía de Rac, inducir quimiotaxis y angiogénesis (Lee *et al.*, 2001; Spiegel *et al.*, 2002; Blaho *et al.*, 2011). Un panorama general de las vías de señalización que se activan a través del receptor S1P<sub>1</sub> se muestra en la figura 3.

La migración de las células del endotelio vascular es un proceso crítico en la angiogénesis, fenómeno que da lugar a la formación de nuevas vasculaturas en estados normales y patológicos. La quimiotaxis de las células endoteliales es controlada diversos factores angiogénicos, entre ellos receptores para factores de crecimiento con actividad de tirosina cinasa (RTKs), como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento epitelial (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el receptor S1P<sub>1</sub> (Takabe *et al.*, 2008).

El receptor S1P<sub>1</sub> puede transactivar a los receptores para VEGF, EGF, y PDGF a través de tres diferentes mecanismos: 1) comunicación intracelular entre los receptores y fosforilación directa de los RTKs por cinasas de tirosina, 2) inducción de la producción o secreción de los factores de crecimiento, 3) participación del receptor S1P<sub>1</sub> y del RTK en un complejo de señalización, ya sea por interacción directa o por la unión de ambos receptores a proteínas adaptadoras. En el caso particular del receptor para PDGF, la activación por su ligando induce la traslocación de la SK1 hacia el borde creciente de la membrana plasmática de las células endoteliales, lo que promueve la producción local de S1P; que a su vez activa al receptor S1P<sub>1</sub>, favoreciendo así la migración celular, aun cuando el crecimiento endotelial se dirija a regiones con concentraciones bajas de S1P (Takabe *et al.*, 2008).

En determinados casos el receptor S1P<sub>1</sub> también se puede acoplar a las proteínas G<sub>12/G13</sub>, que activan directamente a las proteínas G pequeñas Rho y Rac, muy importantes

en eventos de migración celular. Se ha demostrado que el S1P<sub>1</sub> en conjunto con el S1P<sub>3</sub> controla las vías de señalización necesarias para inducir la migración celular y la morfogénesis en las redes capilares. El papel de los receptores S1P<sub>1</sub> y S1P<sub>3</sub> en la angiogénesis sugiere que la regulación defectuosa de dichos receptores puede contribuir a la aparición excesiva de vasculaturas, asociada a enfermedades como la artritis reumatoide, la retinopatía diabética y la progresión de tumores sólidos. Lo anterior también implica que tanto el receptor S1P<sub>1</sub> como el receptor S1P<sub>3</sub> son blancos terapéuticos con un enorme potencial clínico para el tratamiento de dichas enfermedades (Liu *et al*, 2000; Lee, *et al*, 2001; Watterson *et al*, 2001; Paik *et al*, 2004).



**Figura 3. Vía de señalización intracelular del receptor S1P<sub>1</sub>.** La unión de la S1P a su receptor induce la activación la proteína G<sub>1/0</sub> heterotrimérica, la cual intercambia GDP por GTP y se separa en las subunidades G $\alpha_{i/o}$  y G $\beta\gamma$ . La subunidad G $\alpha_{i/o}$  inactiva a la adenilato ciclasa, impidiendo la acumulación de cAMP. El receptor también activa a la fosfolipasa C $\beta$  (PLC $\beta$ ), que hidroliza fosfolípidos de membrana, produciendo diacilglicerol (DAG) y 1,4,5 inositol trifosfato (IP3). El IP3 se une y activa canales de calcio en el retículo endoplásmico, produciendo la liberación de calcio al citoplasma. El aumento en la concentración de calcio intracelular induce la activación da la PI3K y ERK1/2, y la subsecuente activación de Akt, la cual fosforila al receptor en el residuo 236, produciendo quimiotaxis (Modificada de [www.biocarta.com](http://www.biocarta.com)).

La S1P asociada a las HDL, a diferencia de la S1P asociada a albúmina, es capaz de prolongar la integridad de la barrera endotelial. Este efecto de la S1P-HDL se debe a la señalización a través del receptor S1P<sub>1</sub>, e involucre una activación constante de Akt, de la óxido nítrico sintasa epitelial (eNOS) y de la guanilato ciclasa soluble (sGC) (Wilkerson *et al.*, 2012).

### **3.6 Regulación de los GPCRs**

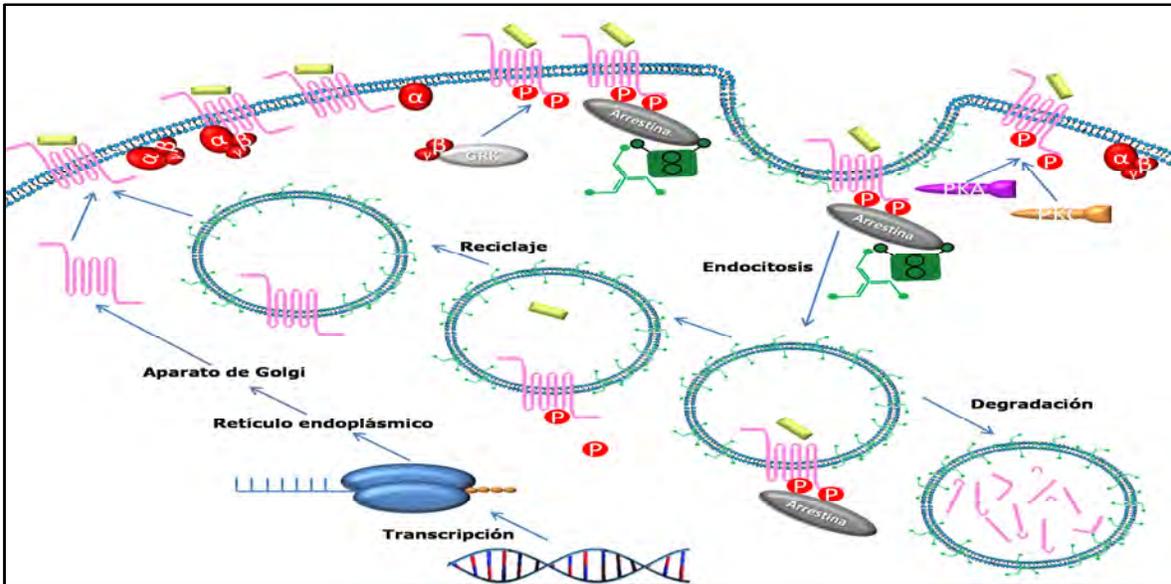
La estimulación crónica de los GPCRs provoca a largo plazo la regulación negativa de la expresión genética, mediante mecanismos transcripcionales que reducen la cantidad de mRNA de los receptores. A corto plazo ocurre una atenuación reversible de la señalización, que desensibiliza a la vía por la estimulación continua con el agonista. La reversibilidad refleja la modificación post-traducciona, que es la característica de la desensibilización, y por lo tanto, de la fosforilación de proteínas (Hausdorff *et al.*, 1990).

Existen dos modos básicos de desensibilización por fosforilación para los GPCRs: la heteróloga, que consiste en la unión de un GPCR a su ligando, evento que da pie a una cascada de señalización que activa, entre otros efectores, a diversas familias de proteínas cinasas (PKC, PKA, Akt). Dichas cinasas fosforilan tanto al receptor que fue activado por su ligando como a otros receptores que no están relacionados, inactivándolos. Por ejemplo, la estimulación por agonista de GPCRs acoplados a la proteína G<sub>s</sub>, que activa a la adenilil ciclasa, puede desensibilizar a receptores que también están acoplados a la proteína G<sub>s</sub>, pero que no son los receptores que reconocen al agonista. La activación de la adenilil ciclasa promueve la acumulación de cAMP y la activación de la PKA, la cual fosforilará a los GPCRs que contengan en sus secuencias sitios consenso para esta cinasa, induciendo el desacoplamiento de la proteína G, no sólo en el receptor activado por ligando, sino en cualquier receptor que haya sido fosforilado por PKA. Ocurre una situación muy similar con receptores que tienen como efector a alguna isoforma de la PKC, la cual será capaz de fosforilar a cualquier GPCR que contenga un sitio consenso para PKC, produciendo el desacoplamiento de la proteína G y la desensibilización del receptor (Billington *et al.*, 2003).

La desensibilización homóloga ocurre cuando un GPCR activado por su ligando es desensibilizado como consecuencia de la unión del ligando. Solamente los receptores ocupados por el agonista son blancos para la desensibilización homóloga, en contraste con la heteróloga, que se puede extender a GPCRs no ocupados por ligando e incluso a los no relacionados con la vía activada, pero que contienen sitios consenso para la fosforilación. Aunque ambas formas de desensibilización funcionan a través de la fosforilación de proteínas, los mecanismos son distintos. La fosforilación de los GPCRs ocupados por el agonista es catalizada por la familia de cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs). Se ha observado que el receptor S1P<sub>1</sub> es fosforilado en residuos de serina y treonina y desensibilizado por acción de la GRK2; evento que es crucial en la modulación de la respuesta quimiotáctica de los linfocitos, pues regula su egreso desde los órganos linfoides hasta el torrente sanguíneo en contra del gradiente de S1P (Krupnick *et al.*, 1998; Watterson *et al.*, 2002; Arnon *et al.*, 2011).

A diferencia de la desensibilización heteróloga, en la cual la fosforilación por PKC o PKA es suficiente para producir una atenuación en la señalización del receptor, la fosforilación mediada por las GRKs no es suficiente para inactivar la función del receptor; el proceso requiere de la participación de otras proteínas accesorias. Los GPCRs fosforilados por GRKs aumentan su afinidad por una familia de proteínas denominadas arrestinas, las cuales fueron descritas por primera vez en la vía de fototransducción visual, en donde el receptor de luz denominado rodopsina, es fosforilado por GRK1, señal que conduce al reclutamiento de la arrestina-1, imposibilitando el acoplamiento y la activación de la proteína G (Tran *et al.*, 2004).

Las arrestinas además, son un elemento muy importante en el proceso de internalización de los GPCRs. Existe evidencia de que la  $\beta$ -arrestina funciona como una proteína adaptadora, que vincula a los GPCRs fosforilados a una proteína del citoesqueleto llamada clatrina. La clatrina recubre vesículas en la membrana plasmática, las cuales son endocitadas por acción de la dinamina y el citoesqueleto. La vesícula endocítica puede fusionarse con lisosomas, conduciendo a la degradación del receptor, o bien puede permear protones, acidificando el medio intravesicular y promoviendo la disociación del ligando, para posteriormente reciclar al receptor a la membrana celular (Figura 4) (Kohout *et al.*, 2003; Marchese *et al.*, 2003).



**Figura 4. Vías de desensibilización de los GPCRs.** Una vez que el ligando se ha unido a su receptor, pueden ocurrir 3 diferentes eventos de fosforilación: 1. La subunidad  $\beta\gamma$  de la proteína G activa a GRK, que a su vez fosforila al receptor y promueve el reclutamiento de las arrestinas. Las arrestinas reclutan clatras, que forman una vesícula en la membrana, que es endocitada por la acción de la dinamina y el citoesqueleto (desensibilización homóloga). La vesícula endocítica puede fusionarse con lisosomas, conduciendo al receptor a la degradación, o bien puede permear protones, acidificando el medio intravesicular y promoviendo la disociación del ligando, para posteriormente reciclar al receptor a la membrana celular. 2. El receptor puede ser fosforilado por PKC, imposibilitando la unión de la proteína G heterotrímica por impedimento estérico (desensibilización heteróloga). 3. El receptor puede ser fosforilado por PKA, imposibilitando la unión de la proteína G heterotrímica por impedimento estérico (desensibilización heteróloga). Los tres procesos de fosforilación son reversibles, mediante la acción de fosfatasa de serina y treonina, como PP2A, posibilitando así la resensibilización del receptor. También existe la síntesis *de novo* de receptores (Modificada de Billington *et al.*, 2003).

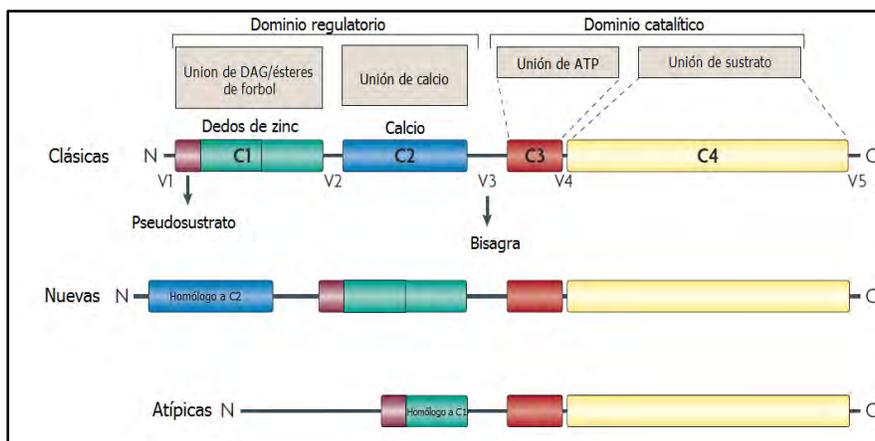
### 3.7 La proteína cinasa C

La familia de la proteína cinasa C es efectora de una gran cantidad de señales. Existen muchas vías de señalización que tienen como finalidad la generación del activador de las PKCs, el diacilglicerol (DAG). Las señales que estimulan la activación de GPCRs o de RTKs o de cinasas de tirosinas solubles pueden causar la producción de DAG, de forma rápida por la activación de fosfolipasas C, o lentamente por la activación secuencial de la fosfolipasa D y la fosfatidato fosfohidrolasa. Los ésteres de forbol son potentes promotores de tumores, pueden sustituir al DAG y activar directamente a la PKC, aunque a diferencia

del DAG, los ésteres de forbol no son metabolizados rápidamente, y las células que son tratadas con estos compuestos experimentan una activación prolongada de la PKC. Debido a sus características, los ésteres de forbol se han convertido en una herramienta muy útil para la investigación de vías que involucran la participación de la PKC.

### 3.7.1 Estructura de las isoformas de la PKC

Los miembros de la familia de la PKC constan de un solo polipéptido, que se compone de una región regulatoria en el extremo amino (aproximadamente 20-40 kDa) y una región catalítica en el extremo carboxilo (aproximadamente 45 kDa). Las diversas isoformas clonadas mostraron cuatro dominios conservados, denominados C1-C4, cada uno de los cuales es un módulo funcional. El dominio C1 contiene al menos un motivo rico en cisteína, presente en la mayoría de las isoformas, que conforma un sitio de unión al DAG, este dominio es precedido por una región de pseudosustrato que es autoinhibitoria. El dominio C2 contiene una región de unión para lípidos ácidos, y en algunas de las isoformas, un sitio de unión a iones de calcio. Los dominios C3 y C4 forman los sitios de unión al ATP y al sustrato, es decir, conforman al dominio catalítico. Los dominios regulatorio y catalítico están separados por una región de bisagra, la cual es susceptible de corte proteolítico cuando la cinasa se encuentra anclada a la membrana. La cinasa generada por el corte proteolítico es constitutivamente activa.



**Figura 5. Representación esquemática de la estructura de las isoformas de PKC.** Las isoformas clásicas de PKC contienen un dominio de unión a DAG, un dominio de unión a iones de calcio y un dominio catalítico. Las isoformas nuevas de la PKC no presentan el dominio de unión a iones de calcio, pero conservan el dominio de unión a DAG. Las isoformas atípicas no presentan dominio de unión a DAG ni a iones de calcio (Tomada de Mackay *et al.*, 2007).

### 3.7.2 Clasificación de las isoformas de PKC

Hasta la fecha, se han descrito 11 isoformas de la PKC, las cuales están clasificadas en tres grupos, basados en su estructura y en sus características regulatorias. Las primeras isoformas en ser caracterizadas fueron las convencionales o clásicas:  $\alpha$ , las variantes del procesamiento alternativo  $\beta$ I y  $\beta$ II y  $\gamma$ . Este grupo se distingue de los otros por ser regulado por iones de calcio, ya que su dominio C2 contiene un sitio de unión a este catión.

El grupo de las PKC nuevas incluye a las isoformas  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\eta$  y  $\theta$ . Son similares estructuralmente al grupo de las isoformas clásicas, la diferencia radica en que no contienen el sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ . Las isoformas atípicas son PKC  $\zeta$  y  $\lambda$ ; difieren significativamente de los otros dos grupos en estructura: el dominio C1 contiene una, no dos regiones ricas en cisteínas; los residuos que mantienen al dominio C2 doblado no están presentes. Además, se ha reportado que estas isoformas no se activan en respuesta a los ésteres de forbol (Newton, 1995) (Figura 5).

### 3.7.3 Funciones de la PKC

La PKC fosforila residuos de serina o treonina en secuencias de naturaleza básica, aunque su acción no es altamente específica. Existen una gran cantidad de substratos para la PKC, dentro de sus acciones más importantes se cuentan la modulación de eventos en la membrana plasmática, como la desensibilización de receptores; la regulación de la transcripción, mediación de respuestas inmunológicas, regulación de la proliferación celular y participación en el aprendizaje y la memoria, entre muchas otras funciones. Las isoformas de la PKC están distribuidas de manera diferencial en los tejidos, y se han descrito proteínas que son fosforiladas específicamente por una isoforma de la PKC y no por las demás (Newton, 1995).

## **3.8 Patologías relacionadas con el receptor S1P<sub>1</sub>**

### **3.8.1 Cáncer**

Como en el caso del ácido lisofosfatídico, la S1P es un marcador para ciertos tipos de cáncer, campo en el que cada vez existe mayor evidencia de su papel en la estimulación de la proliferación y la división celular. En contraste con la ceramida, estimula proliferación, supervivencia y migración de células tumorales, y es abundante en el tejido maligno, especialmente en cáncer de mama. Este es un tema que resulta muy atractivo para la investigación médica, por el potencial para la intervención terapéutica en el metabolismo de la S1P (Watterson *et al.*, 2002; French *et al.*, 2006; Shida *et al.*, 2008).

La concentración de S1P está aumentada entre 5 y 10 veces en el líquido de ascitis de pacientes con cáncer de ovario. La S1P a altas concentraciones estimula la migración e invasión de las células epiteliales ováricas cancerosas, pero inhibe la migración de las células epiteliales normales. (Wang *et al.*, 2008).

### **3.8.2 Enfermedades autoinmunes**

En individuos sanos, el sistema inmunológico protege al organismo de agentes extraños: toxinas, virus, bacterias y parásitos, entre otros. El reconocimiento rápido de patógenos por el sistema inmunológico innato es la primera línea de defensa en los organismos superiores. Sin embargo, la activación excesiva del sistema inmunológico como respuesta a determinados agentes patógenos, puede desencadenar procesos inflamatorios patológicos (Iwasaki *et al.*, 2011).

La desregulación del sistema inmunológico conduce a defectos en el discernimiento del tejido propio y de un agente extraño. El resultado es una respuesta inmunitaria descontrolada, que es capaz de atacar a los tejidos propios, produciendo diversas enfermedades. Existen diversas teorías para explicar por qué el sistema inmune se desregula: desde infecciones y tratamientos farmacológicos, que desencadenan cambios en la estructura y función de anticuerpos, hasta los que se asocian a la predisposición genética (Goronzy *et al.*, 2007). Sin embargo, no todos los trastornos autoinmunes tienen un origen conocido, tal es el caso de la esclerosis múltiple.

La esclerosis múltiple es una patología neuroinflamatoria idiopática, en la que el sistema inmunológico del individuo enfermo reconoce a la mielina como un antígeno, atacando a las vainas axonales de las neuronas cerebrales, de la médula espinal y del nervio óptico. Se trata de un padecimiento que aparece en adultos jóvenes de ambos sexos, aunque ocurre con mayor frecuencia en mujeres. Se manifiesta y evoluciona en formas diversas: desde una sintomatología leve que incluye dolores musculares, cosquilleo y entumecimiento de extremidades, coordinación motora deficiente, visión doble y mareo, hasta sintomatologías muy severas, que incluyen frecuentes episodios de dolor incapacitante, parálisis parcial o completa y reducción de la corteza cerebral, con la consecuente pérdida de la función cognoscitiva. A pesar de tratarse de una enfermedad neurodegenerativa y altamente incapacitante, no es un padecimiento fatal, los pacientes llegan a tener una expectativa de vida normal, aunque la calidad de la misma puede llegar a ser baja.

Al tratarse de una enfermedad de origen desconocido, no se ha desarrollado un tratamiento eficaz para curarla, sin embargo, las terapias que se han desarrollado consisten en disminuir la respuesta inflamatoria, por ejemplo, mediante la administración constante de inmunosupresores esteroideos. Desafortunadamente la exposición prologada a los inmunosupresores tiene efectos secundarios indeseables, como el síndrome de Cushing o depresión (National Institutes of Health, 2012).

La búsqueda de tratamientos menos nocivos para los pacientes con esclerosis múltiple ha conducido al desarrollo de fármacos antiinflamatorios de nueva generación. En 2010 la FDA de los Estados Unidos de América aprobó el uso como medicamento controlado del fármaco FTY720 o Fingolimod®.

El FTY720 (2-amino-2-(2-[4-octilfenil]etil)1,3-propanodiol) es un análogo de la esfingosina-1 fosfato (S1P) desarrollado por la farmacéutica Novartis; fue sintetizado a partir de la miriocina (ISP-1), un metabolito proveniente del ascomiceto *Isaria sinclairii*. La membrana celular es permeable al FTY720, una vez dentro de la célula, el FTY720 es fosforilado por la esfingosina cinasa 2 (SK2), dando lugar al FTY720-P, el cual se une con una afinidad 10 veces mayor que la de la S1P al receptor S1P<sub>1</sub> (FTY720-P EC<sub>50</sub>=300-600pM; S1P EC<sub>50</sub>=4.4nM). El mecanismo de acción del FTY720-P consiste en unirse al receptor S1P<sub>1</sub>, induciendo la fosforilación en las serinas 336, 351 y 353 y la ubiquitinación

por la ligasa de ubiquitinas de la familia E3 WWP2 en las lisinas 330, 339, 341 y 354. Estas modificaciones postraduccionales dan lugar a la degradación del receptor por la vía proteasomal, evitando así la propagación de la señal quimiotáctica que moviliza a los linfocitos desde los nódulos linfáticos hasta el torrente sanguíneo. La linfopenia transitoria que resulta del secuestro de los linfocitos en los nódulos linfáticos, reduce significativamente la sintomatología de la esclerosis múltiple, pues se evita que el sistema inmunológico del paciente ataque las vainas de mielina de las neuronas (Kennedy *et al.*, 2011; Brinkmann *et al.*, 2004; Oo *et al.*, 2007).

La regulación correcta del receptor S1P<sub>1</sub> es clave para asegurar una respuesta inflamatoria controlada. La fosforilación de los receptores es un evento regulatorio temprano, el cual determina la ruta que seguirán dentro de la célula. Se ha estudiado ampliamente el papel de la fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub> mediada por su ligando natural o por análogos sintéticos como el FTY720; sin embargo, la fosforilación del receptor mediada por hormonas o ligandos de receptores acoplados a proteínas G diferentes a la S1P está todavía en fase de estudio.

#### 4. Marco teórico

Estudios recientes muestran que el receptor S1P<sub>1</sub> puede ser regulado negativamente por la acción de la PKC y la GRK2. En 2001 Watterson y colaboradores mostraron que el receptor S1P<sub>1</sub> es fosforilado por acción de PMA, dicha fosforilación ocurre en residuos de serina y treonina, pero no en residuos de tirosina. La fosforilación inducida por PMA no bloqueó la fosforilación inducida por S1P. Usando un receptor S1P<sub>1</sub> al cual le fueron truncados los últimos 12 aminoácidos del extremo carboxilo, observaron que la fosforilación inducida por PMA no fue afectada, sin embargo, la fosforilación y la internalización inducidas por S1P fueron notablemente afectadas, sugiriendo mecanismos regulatorios diferentes. También encontraron que la GRK 2 es responsable de la fosforilación del receptor cuando éste es activado por S1P (Watterson *et al.*, 2001).

En una investigación de 2003 se encontró que el receptor S1P<sub>1</sub> en linfocitos T es desensibilizado por acción de la S1P, y que dicha desensibilización es independiente de la PKC. Sin embargo, la activación directa de la PKC con ésteres de forbol mostró una desensibilización del receptor, impidiendo la quimiotaxis de los linfocitos T; tal efecto se bloqueó usando inhibidores de la PKC. La fosforilación en treonina del receptor S1P<sub>1</sub> también fue bloqueada por inhibidores de PKC después de 24 h de incubación, efecto que no se observó con una hora de tratamiento (Graeler *et al.*, 2003).

En 2006 Thompson y colaboradores encontraron que las isoformas de PKC  $\alpha$  y  $\epsilon$  tienen una actividad aumentada en cultivos de células endoteliales. Ambas isoformas de PKC son activadas por acción de los receptores S1P<sub>1</sub> y S1P<sub>3</sub>. Utilizando una dominante negativa de la PKC $\alpha$  demostraron que la morfogénesis y migración de las células inducidas por S1P, fueron notablemente inhibidas. El uso del inhibidor BIM I también bloqueó ambas respuestas. El pretratamiento con PMA bloqueó la respuesta en el aumento del calcio intracelular mediado por S1P, efecto que fue revertido con el uso de BIM I o de las dominantes negativas de PKC  $\alpha$  y  $\epsilon$  (Thompson *et al.*, 2006).

## **5. Justificación**

Las acciones de la SP1, a través de sus receptores, son de gran importancia en la regulación de eventos tales como el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, maduración vascular, desarrollo cardíaco, inmunidad y direccionamiento de la movilidad celular. Una deficiencia en la regulación del receptor S1P<sub>1</sub> puede provocar trastornos en la salud, tales como el desarrollo de padecimientos autoinmunes o la formación de nueva vasculatura en tumores sólidos.

Aunque se sabe que la PKC fosforila y posiblemente regula al receptor S1P<sub>1</sub>, se desconocen las isoformas que están implicadas en dicho proceso, así como los sitios blanco.

## **6. Hipótesis**

La fosforilación y desensibilización heteróloga del S1P<sub>1</sub> puede ser mediada por la activación directa de alguna de las isoformas de PKC, en sitios específicos de la región del extremo carboxilo del receptor.

## 7. Objetivo general

Estudiar la fosforilación y la desensibilización del receptor S1P<sub>1</sub> mediadas por isoformas de PKC.

### 7.1 Objetivos particulares

- Caracterizar funcionalmente al receptor S1P<sub>1</sub>-GFP que se expresa de forma estable en la línea celular humana de cáncer de próstata LNCaP, mediante la medición de la liberación de calcio intracelular.
- Evaluar los efectos del activador de PKC -PMA- en la fosforilación y desensibilización del receptor.
- Usar inhibidores isoforma específicos de PKC, para determinar la o las isoformas clave en la fosforilación del receptor.
- Inducir la regulación a la baja del receptor mediante la incubación toda la noche con PMA, y evaluar la fosforilación inducida con S1P y PMA.
- Determinar las isoformas de PKC que son reguladas a la baja por la acción de PMA toda la noche mediante Western blot.
- Transfectar de forma transitoria mutantes dominantes negativas de las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ II de la PKC, posteriormente evaluar la fosforilación y la liberación de calcio intracelular del receptor S1P<sub>1</sub> mediada por S1P y PMA.
- Transfectar shRNA para silenciar a las isoformas PKC  $\alpha$  y  $\beta$ , posteriormente evaluar la fosforilación y la liberación de calcio intracelular del receptor S1P<sub>1</sub> mediada por S1P y PMA.
- Generar un receptor mutante, cambiando los residuos de serina 351, 353, 355, 358 y 359 por alanina, así como receptores con una única mutación en el residuo 351 o bien en el residuo 355.
- Evaluar la fosforilación y la liberación de calcio intracelular de las mutantes del receptor, ya sea mediada por S1P o por PMA.

## **8. Materiales y métodos**

### **8.1. Cultivo celular**

Se usaron células de cáncer de próstata de origen humano LNCaP, que no expresan endógenamente al receptor S1P<sub>1</sub> y que expresan cantidades mínimas del receptor S1P<sub>2</sub>. Las células transfectadas con el receptor S1P<sub>1</sub> silvestre o con los receptores mutantes fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, en medio de cultivo RPMI con alta concentración fosfatos, suplementado con suero bovino fetal al 10%, 100 µg/mL de estreptomicina, 100 µg/mL de penicilina y 0.25 µg/mL de anfotericina B.

### **8.2. Transfección de células LNCaP**

Se usaron células LNCaP a una confluencia de entre 60-80%, para una placa de 6 pozos. Se prepararon las soluciones A y B:

- Solución A: se agregaron 120 µL de medio de cultivo bajo en suero Optimem (Life technologies) y 30 µL de lipofectamina<sup>®</sup> 2000 (Life technologies) a un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL, la mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 5 min.
- Solución B: se agregaron 140 µL de medio de cultivo bajo en suero Optimem y 1µg de DNA plasmídico/pozo (aproximadamente 10 µL de suspensión de DNA purificado) a un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL.

Se mezclaron perfectamente las soluciones A y B, la mezcla resultante fue incubada durante 40 min a temperatura ambiente. Una vez transcurridos los 40 min, se lavaron las células con buffer salino de fosfatos (PBS) estéril a 37°C y se sustituyó el medio de cultivo RPMI por 0.5 mL de Optimem. Finalmente, se agregaron 50µL de la mezcla A+B a cada pozo. Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> durante 6 h, después de las cuales se sustituyó el medio de cultivo Optimem por medio RPMI completo. Las células fueron incubadas durante 18 h a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>.

### **8.3. Selección de las líneas celulares estables**

Para seleccionar clonas estables, la transfección se hizo en cajas de 6 pozos. La selección se llevó a cabo mediante la adición de medio RPMI completo + 300 ó 600 ng/mL del antibiótico G418 (geneticina), la concentración de 600 ng/mL se usó para hacer más estricta la selección de las clonas transfectadas. Las células no transfectadas no sobrevivieron en presencia del antibiótico G418, únicamente las que incorporaron el DNA plasmídico (que contiene un gen que confiere la resistencia al G418) a su genoma fueron viables. Para obtener una clona estable genéticamente homogénea se realizó una dilución limitante, que consistió en calcular el volumen de suspensión celular en el que se encuentre únicamente una célula. Posteriormente se colocó dicho volumen en cada uno de los 12 pozos de una caja de cultivo celular, siguiendo la selección el tiempo necesario, hasta que se obtuvo una monocapa de células. Para asegurar que el receptor se expresaba, las células se observaron en el microscopio de epifluorescencia, a fin de visualizar a la proteína verde fluorescente que se expresa en el extremo carboxilo del receptor.

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

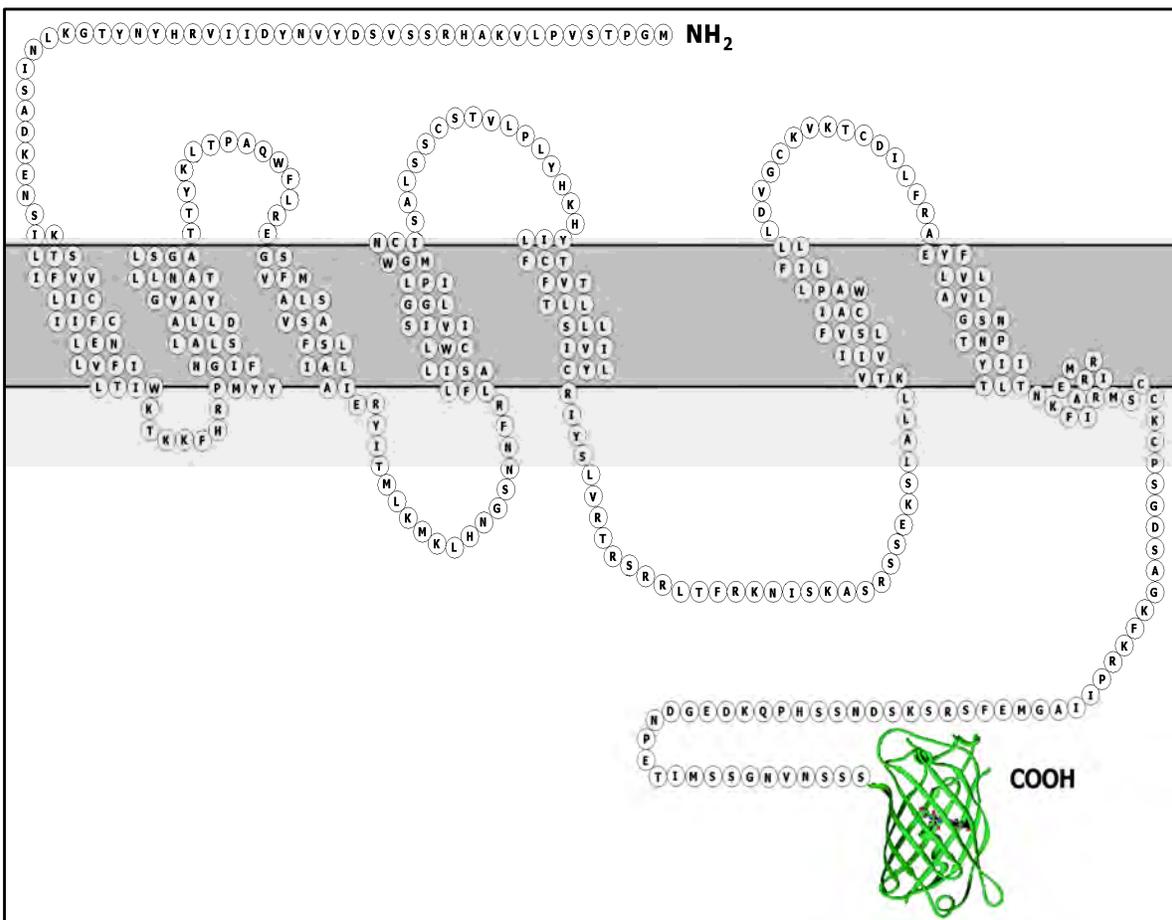
Las células LNCaP transfectadas con las diferentes construcciones del S1P<sub>1</sub> humano fueron incubadas con 4 mL de buffer Krebs-Hepes-glucosa (KRH) (NaCl 130 mM, KCl 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.2 mM, Hepes 20 mM, 1.2 Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mM, glucosa 10 mM, BSA 0.1% [w/v], pH 7.4) con 2.5 μM de Fura-2/AM durante una h a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Después de la incubación, las células fueron despegadas de la caja de cultivo con tripsina, mediante resuspensión con KRH, y transferidas a un tubo de ensaye cónico de 15 mL. Las células fueron lavadas 3 veces con 12 mL de KRH, centrifugadas y resuspendidas en 6 mL de KRH. La medición de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se realizó a 37°C y en agitación constante en un espectrofluorómetro AMINCO-Bowman Serie-2, adicionando las hormonas y demás reactivos durante la medición. Los registros se hicieron a 340 nm de excitación y 510 nm de absorción. La [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se calculó usando el software de AMINCO-Bowman de acuerdo a (Grynkiewicz *et al.* 1985).

### 8.5. Marcaje metabólico con [<sup>32</sup>P]Pi

Cada caja de 6 pozos con células en ayuno de 18 h se incubó durante 1 h en medio libre de fosfatos (DMEM phosphate free, Gibco BRL). En una zona para manejo de radiactividad, se preparó una solución 50  $\mu$ Ci/mL de [<sup>32</sup>P]Pi en medio libre de fosfatos, de la cual se adicionó 1 mL en cada pozo, las células se dejaron incubando durante 4 h, al término de las cuales se realizaron las incubaciones con hormonas, inhibidores y/o antagonistas correspondientes. Una vez transcurrido el tiempo de los estímulos, la reacción hormonal se detuvo haciendo 3 lavados con PBS frío y adicionando 500  $\mu$ l de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Tritón X-100, 0.1% SDS, 10 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 10 mM pirofosfato de sodio, 1 mM p-serina, 1 mM p-threonina, 1 mM p-tirosina e inhibidores de proteasas) y dejándose durante 1 h en baño de hielo. Las muestras se recuperaron en tubos eppendorf de 1.5 mL, se centrifugaron a 14500 rpm a 4° C durante 15 min, se recuperó el sobrenadante en tubos eppendorf nuevos y se descartó el precipitado. Se adicionaron 10  $\mu$ l de antisuero anti-GFP por muestra, se incubaron a 4° C durante 1 h en agitación lenta y constante. Terminada la incubación con el anticuerpo, se adicionaron a cada tubo 20  $\mu$ l de proteína A agarosa (Invitrogen Life Technology) y se incubaron durante toda la noche a 4° C en agitación lenta y constante. Una vez concluida la incubación, se lavaron las partículas de agarosa 3 veces con 1 mL de buffer de lavados pH 8.3 (50 mM de Tris y 600 mM de NaCl), en el último lavado se retiró el exceso de buffer y se adicionaron en cada tubo 20  $\mu$ l de buffer de cargado Laemmli 1X al 10 % de  $\beta$ -mercaptoetanol (Laemmli *et al.*, 1970). Las muestras se calentaron a 92° C durante 5 min, se centrifugaron durante 5 min a 14500 rpm y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10%. Los geles fueron secados en papel celofán y expuestos en una pantalla de autoradiografía durante toda la noche. La detección de la señal se realizó con el aparato *Variable Mode Imager* modelo *Typhoon 8600* (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech™) que lee la radiación a una longitud de onda de 633 nm y cuantifica las bandas (Sonada *et al.*, 1983).

## 9. Resultados

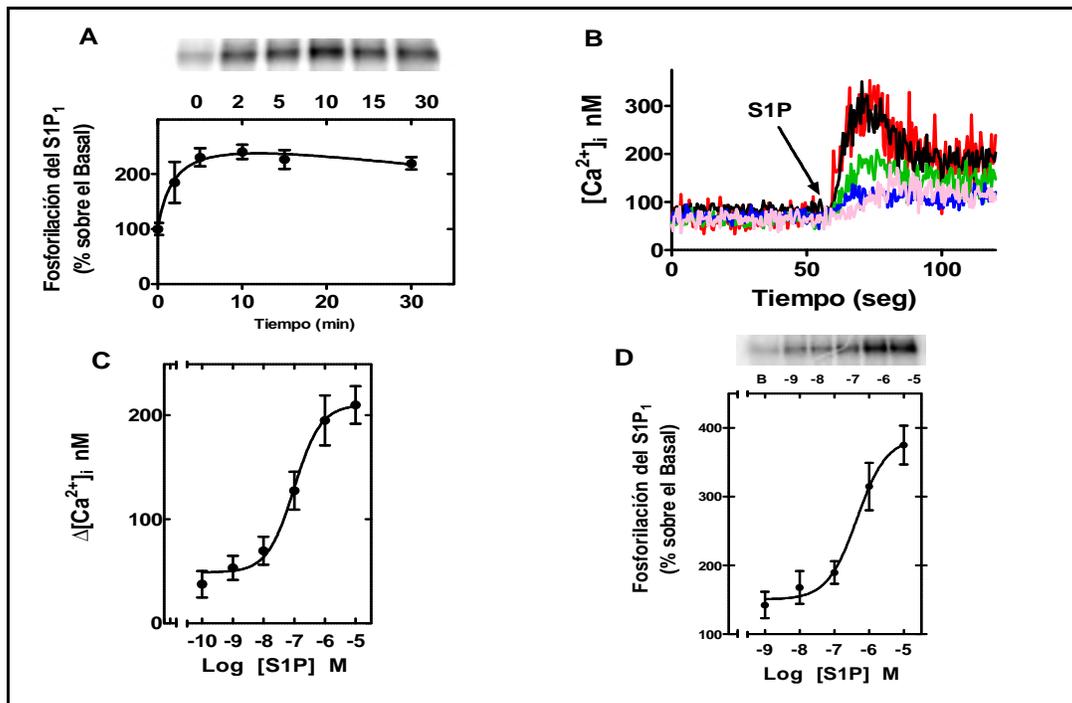
En esta investigación se utilizó la línea celular LNCaP, que proviene de cáncer de próstata humano y no expresa de forma endógena receptores S1P<sub>1</sub>. Dicha línea celular expresa establemente al receptor S1P1-GFP (Figura 6). Después del marcaje metabólico con [<sup>32</sup>P]Pi se realizan los estímulos con los diferentes compuestos (S1P, PMA, inhibidores de PKC) durante los tiempos marcados, se lavaron con PBS frío para eliminar el exceso y se lisaron. Después de 1 h de lisis se recuperó el sobrenadante por centrifugación y se inmunoprecipitó con una mezcla de proteína A agarosa y antisuero anti-GFP durante 18 h.



**Figura 6. Esquema del receptor de esfingosina-1 fosfato fusionado a la proteína verde fluorescente.** La secuencia lineal de aminoácidos y la información de la localización de los extremos carboxilo y amino, las asas intracelulares y extracelulares, así como las regiones transmembranales y los sitios de palmitoilación fueron obtenidas del sitio electrónico de ExPASy ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)).

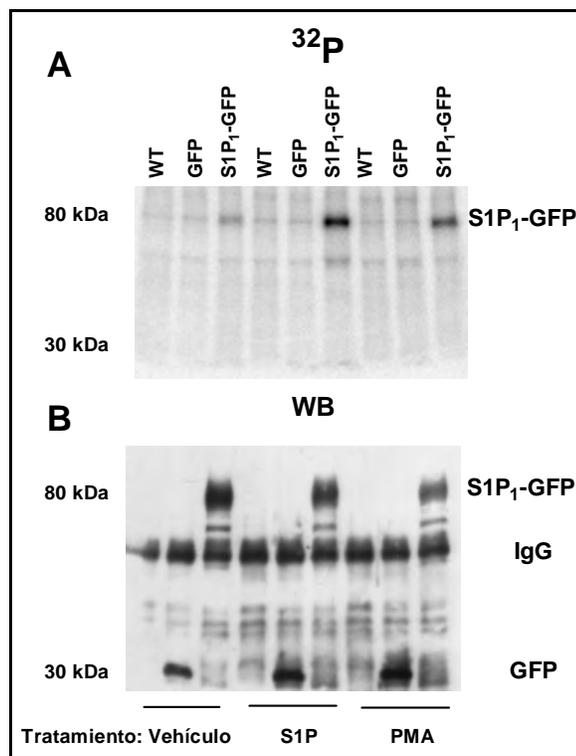
## 9.1. Caracterización del receptor para esfingosina fosfato tipo 1

Se evaluó la funcionalidad del receptor  $S1P_1$ , en el curso temporal con una concentración de  $1\mu\text{M}$  de S1P se observó que el receptor tuvo un nivel máximo de fosforilación a los 10 min de estimulación, y que dicha fosforilación, aunque decreció a partir de los 15 min, no regresó a su nivel basal cuando el estímulo se prolongó hasta los 60 min (tiempo no mostrado) (Fig. 7A). También se realizaron curvas dosis respuesta para evaluar la liberación de calcio intracelular y la fosforilación del receptor en respuesta a concentraciones crecientes de S1P durante 10 min, en donde se observó que la liberación máxima de calcio intracelular, así como la fosforilación máxima ocurrieron a concentraciones de entre  $1$  y  $10\mu\text{M}$  (Figura 7B, C y D).



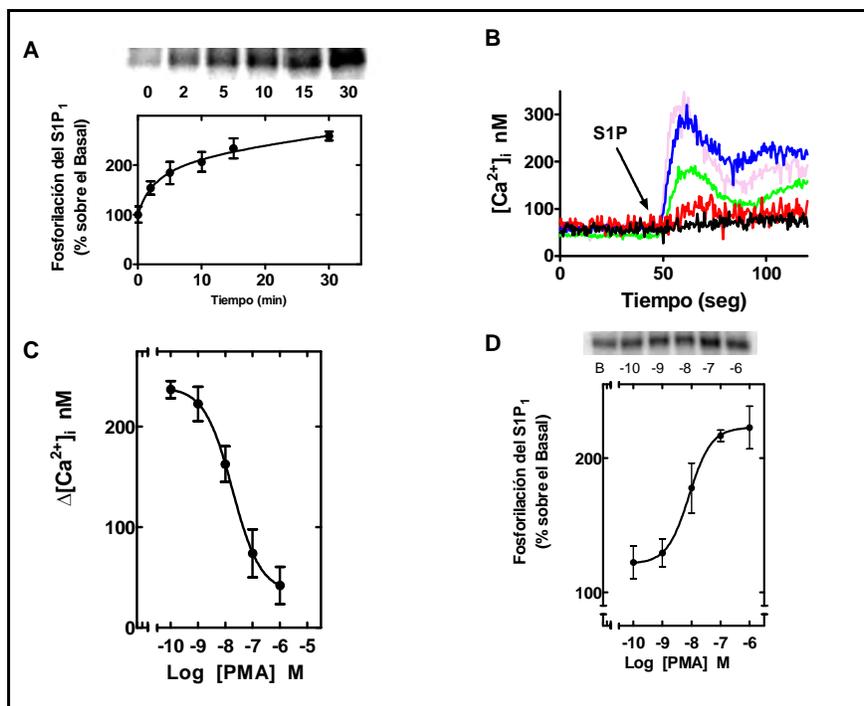
**Figura 7. Efecto de la S1P en la concentración de calcio intracelular y la fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub>-GFP.** A) Curso temporal en respuesta a S1P, las células LNCaP fueron marcadas metabólicamente con [<sup>32</sup>P]Pi y estimuladas con S1P  $1\mu\text{M}$  a los tiempos indicados (n=4-7). B) Trazos de calcio representativos, las células LNCaP fueron estimuladas con concentraciones crecientes de S1P, el incremento en la concentración de calcio intracelular fue medido por espectrofluorimetría C) Incremento en la concentración de calcio intracelular ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) mediada por concentraciones crecientes de S1P (n=5-7). D) Incremento de fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub> mediado por las concentraciones crecientes de S1P (n=4-6). Los datos de densitometría de las autorradiografías fueron obtenidos con el programa de análisis de imagen ImageJ, las curvas se generaron a partir de los datos con el programa Prism Graphpad 5.0. Las líneas verticales representan el error estándar medio.

Como un control de que la fosforilación receptor S1P<sub>1</sub> detectada en la figura 7 no es debida a la fosforilación artefactual de la etiqueta GFP, se utilizaron células sin transfectar (wt), transfectadas con la GFP o transfectadas con el receptor S1P<sub>1</sub>-GFP, las cuales fueron sometidas a un tratamiento de 10 min con S1P 1μM o de 15 min con PMA 1μM. Los estados de fosforilación del receptor y de la GFP fueron detectados por autoradiografía, como se observa en el panel superior de la figura 8, la banda correspondiente al receptor S1P<sub>1</sub>-GFP (80kDa) apareció únicamente en células que fueron estimuladas por S1P y por PMA, pero no por el vehículo. No se observaron bandas a los 30 kDa, peso molecular en el que la GFP sola es detectada. En el Western blot (panel inferior figura 8) se evidenció la presencia de la proteína verde fluorescente sola a los 30 kDa y del receptor S1P<sub>1</sub>-GFP a los 80 kDa. Con estos resultados se descarta la fosforilación de la GFP por estímulos con S1P y PMA.



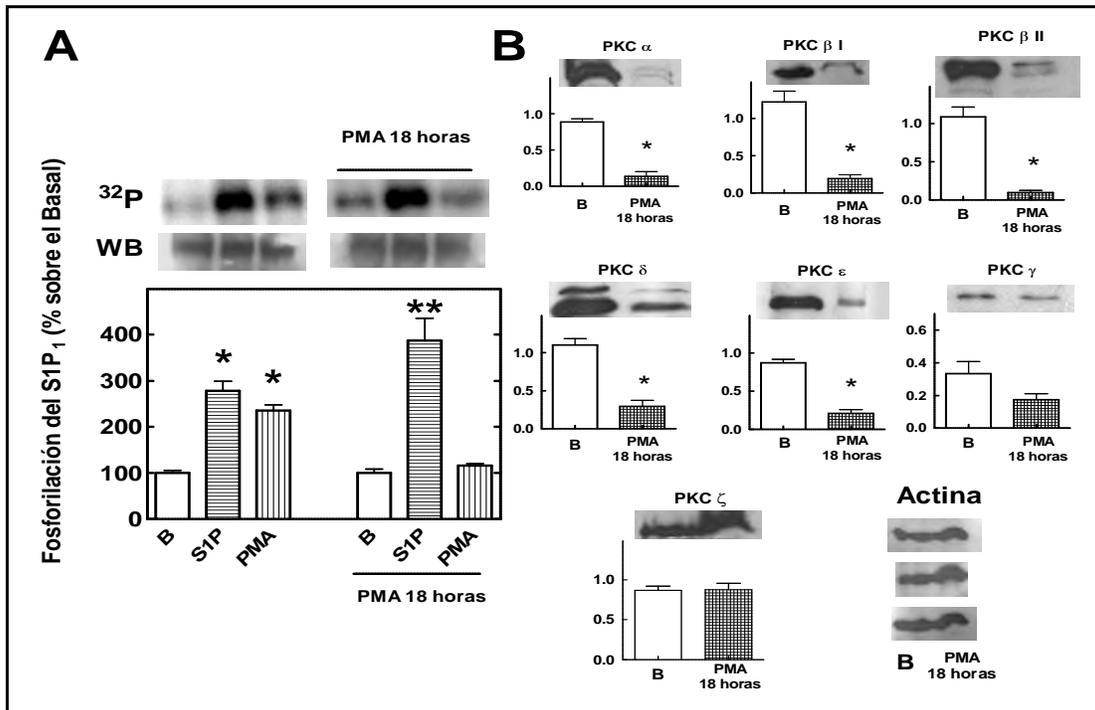
**Figura 8. Autoradiografía y Western blot de la fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub>.** Células LNCaP no transfectadas (WT), transfectadas únicamente con la GFP (GFP) y transfectadas con el receptor S1P<sub>1</sub>-GFP (S1P<sub>1</sub>-GFP) fueron estimuladas con el vehículo, S1P 1μM durante 10 min o PMA 1μM durante 15 min en experimentos de marcaje metabólico y Western blot. A) La autoradiografía muestra la banda correspondiente al receptor S1P<sub>1</sub> aproximadamente a los 80 kDa (n=3) B) Se inmunoprecipitó la GFP en lisados totales de las tres líneas celulares, se observó la presencia de la GFP sola (30kDa) y del receptor S1P<sub>1</sub>-GFP (80kDa), (n=8).

Para determinar si el PMA induce la fosforilación del receptor  $S1P_1$ , se realizó un curso temporal en experimentos de fosforilación por marcaje metabólico con  $[^{32}P]Pi$ . En la curva (Fig. 9A) se observa que el PMA a una concentración fija de  $1\mu M$  induce la fosforilación del receptor desde los 5 min, y que alcanza su máximo a los 30 min. También se hicieron curvas dosis-respuesta en ensayos de liberación de calcio intracelular y de fosforilación, en los cuales las células fueron incubadas o preincubadas, según el caso, durante 15 min a concentraciones crecientes de PMA. El pico máximo de liberación de calcio fue alcanzado cuando las células fueron estimuladas con S1P en ausencia de PMA (control positivo).



**Figura 9. Efecto del PMA en la concentración de calcio intracelular mediada por S1P y en la fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub>-GFP** A) Curso temporal en respuesta a PMA, las células LNCaP fueron marcadas metabólicamente con  $[^{32}P]Pi$  y estimuladas con PMA  $1\mu M$  a los tiempos indicados ( $n=3$ ). B) Trazos de calcio representativos, las células LNCaP fueron preincubadas durante 5 minutos con PMA  $1\mu M$  y estimuladas con concentraciones crecientes de S1P, el incremento en la concentración de calcio intracelular fue medido por espectrofluorimetría C) Desensibilización del receptor S1P<sub>1</sub>, se calculó la diferencia de concentraciones de calcio intracelular ( $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ) mediada por concentraciones crecientes de S1P después de la preincubación con PMA  $1\mu M$  durante 5 min ( $n=4$ ). D) Incremento de la fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub> mediada por las concentraciones crecientes de S1P ( $n=4$ ). Los datos de densitometría de las autorradiografías fueron obtenidos con el programa de análisis de imagen ImageJ, las curvas se generaron a partir de los datos con el programa Prism Graphpad 5.0. Las líneas verticales representan el error estándar medio.

Se observó una atenuación en la liberación de calcio intracelular dependiente de la dosis de PMA, mostrando claramente la desensibilización del receptor por la activación directa de la PKC (Fig. 9B y C). En los ensayos de fosforilación se observó que el PMA indujo la fosforilación del receptor a partir de una concentración de 10nM, y que el máximo de fosforilación fue alcanzado a una concentración de 10 $\mu$ M (Fig. 9D).



**Figura 10. Efecto de la degradación de las isoformas de la PKC en la fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub>.** A) Las células LNCaP fueron incubadas con el vehículo o con PMA 1 $\mu$ M durante 18 h, posteriormente fueron marcadas metabólicamente con [<sup>32</sup>P]Pi y estimuladas con S1P 1 $\mu$ M durante 10 min o PMA 1 $\mu$ M durante 15 min (n=5-9). B) Detección por Western blot de las isoformas de PKC en extractos de células incubadas 18 h con vehículo o PMA 1 $\mu$ M (n=3). Los datos de densitometría de las autorradiografías y Western blots fueron obtenidos con el programa de análisis de imagen ImageJ, las gráficas y la estadística se generaron a partir de los datos con el programa Prism Graphpad 5.0. Las líneas verticales representan el error estándar medio. \*Estadísticamente diferente con P<0.01; \*\* estadísticamente diferente con P<0.001.

## 9.2. Efecto de la degradación de las isoformas de la PKC en la fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub>.

Es sabido que las isoformas de la PKC son degradadas después de la exposición prolongada a PMA (Favaron *et al.*, 1990), este efecto se ha usado como un método para determinar la participación de PKC en eventos de fosforilación. Para confirmar la

participación de la PKC en la regulación del receptor S1P<sub>1</sub>, se hicieron ensayos de degradación de las isoformas de PKC, en los cuales las células LNCaP fueron preincubadas con PMA 1μM durante 18 h, después de las cuales las células fueron estimuladas con PMA 1μM durante 15 min o con S1P 1μM durante 10 min. Como se puede observar en la figura 10A, cuando las células no fueron pretratadas con PMA, la S1P 1μM durante 10 min indujo que el receptor fuera fosforilado 3 veces más que el basal, mientras que el PMA 1μM durante 15 min indujo un aumento de 2.5 veces la fosforilación del receptor con respecto al basal.

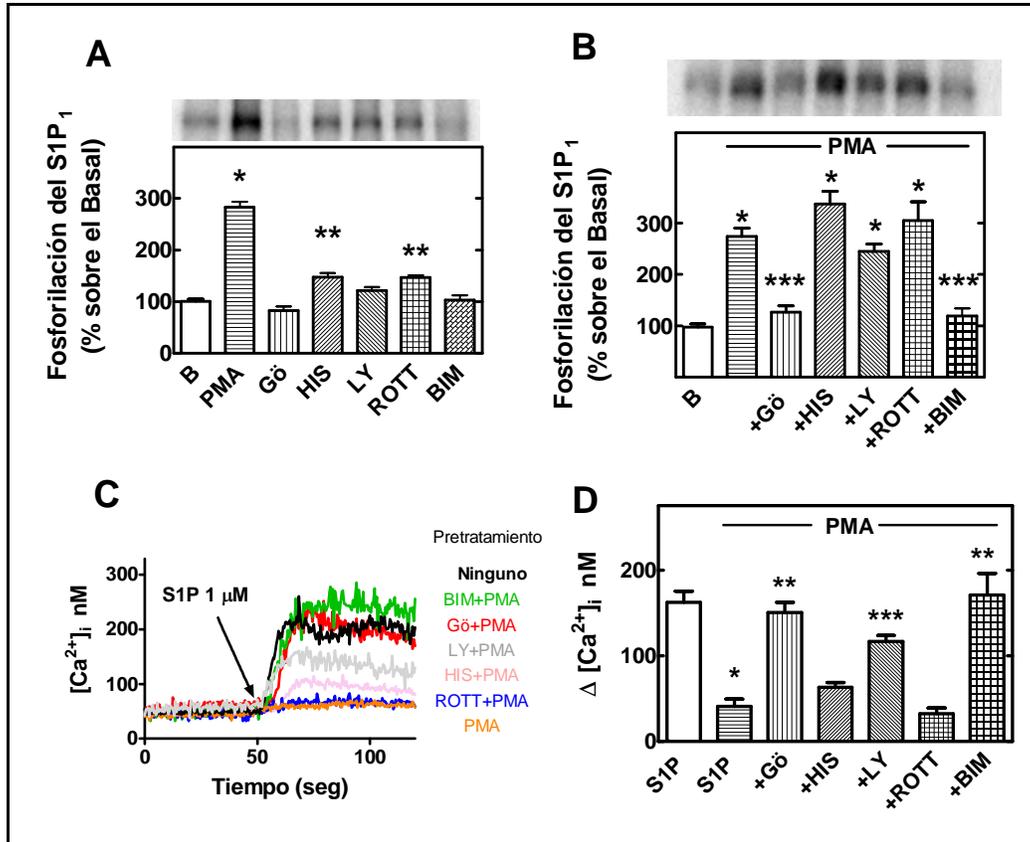
Cuando las células fueron pretratadas con PMA durante 18 h, un estímulo con S1P 1μM durante 10 min indujo una fosforilación del receptor de 4 veces sobre el basal, siendo un incremento estadísticamente significativo con respecto a la misma condición en células sin el pretratamiento con PMA. Por otra parte, cuando las células pretratadas con PMA durante 18 h fueron estimuladas con PMA 1μM durante 15 min, no fue posible detectar la fosforilación del receptor, lo que indica que las isoformas de PKC fosforilan al receptor tras un estímulo con PMA, y que la inducción de la degradación de las isoformas de la PKC debido al tratamiento prolongado con PMA impide fosforilación del receptor por acción del PMA (Figura 10A).

Para determinar cuáles fueron las isoformas de la PKC degradadas por el tratamiento de 18 h con PMA 1μM, se realizaron Western blots de las diferentes isoformas de PKC, en células con o sin tratamiento de 18 h con PMA 1μM. Se observó una disminución en la expresión de las isoformas clásicas α, β1, β2 y γ; y nuevas δ, ε, mientras que la isoforma ζ (atípica) se mantuvo sin cambios aparentes (Figura 10B). Estos datos nos condujeron a investigar la participación específica de alguna de las isoformas clásicas y nuevas de la PKC.

### **9.3. Efecto de inhibidores de las isoformas de la PKC sobre la fosforilación y desensibilización del receptor S1P<sub>1</sub>**

Se utilizaron inhibidores isoforma específicos para determinar la participación de las distintas isoenzimas de la PKC en la fosforilación y desensibilización del receptor S1P<sub>1</sub>. Los inhibidores utilizados fueron Gö 6973 1μM (inhibe específicamente a PKC<sub>α, β</sub>), Hispidina

1 $\mu$ M y LY333531 100nM (inhiben específicamente a PKC  $\beta$ ), Rottlerina 1 $\mu$ M (inhibe específicamente a PKC  $\delta$ ) y BIM 1 $\mu$ M, un inhibidor inespecífico de cinasas de serinas treoninas.



**Figura 11. Efecto de inhibidores de las isoformas de la PKC sobre la fosforilación y desensibilización del receptor S1P<sub>1</sub>.** A) Las células LNCaP fueron marcadas metabólicamente con [<sup>32</sup>P]Pi e incubadas durante 15 min con el vehículo, PMA 1 $\mu$ M o inhibidores específicos para isoformas: Gö 6976 1 $\mu$ M (Gö) para PKC $\alpha$  y  $\beta$ , hispidina 1 $\mu$ M (His) y LY 333531 100nM (LY) para PKC $\beta$ , rottlerina 1 $\mu$ M (Rott) para PKC  $\delta$  y BIM 1 $\mu$ M para todas las isoformas (n=7-11). B) Las células LNCaP fueron marcadas metabólicamente con [<sup>32</sup>P]Pi, preincubadas con los inhibidores de la PKC durante 15 min a las concentraciones indicadas y estimulados durante 15 min con PMA 1 $\mu$ M (n=6-8). C) Trazos de calcio representativos, el incremento en la concentración de calcio intracelular fue medido por espectrofluorimetría D) Las células LNCaP fueron preincubadas durante 15 min con los inhibidores de las isoformas de la PKC a las concentraciones indicadas, posteriormente preincubadas con PMA 1 $\mu$ M durante 5 min y finalmente estimuladas con S1P 1 $\mu$ M, el incremento en la concentración de calcio fue medido por espectrofluorimetría (n=5-7). Los datos de densitometría de las autorradiografías fueron obtenidos con el programa de análisis de imagen ImageJ, las gráficas y la estadística se generaron a partir de los datos con el programa Prism Graphpad 5.0. Las líneas verticales representan el error estándar medio. \* Estadísticamente diferente con P<0.001; \*\* estadísticamente diferente con P<0.01. \*\*\*estadísticamente diferente con P<0.05.

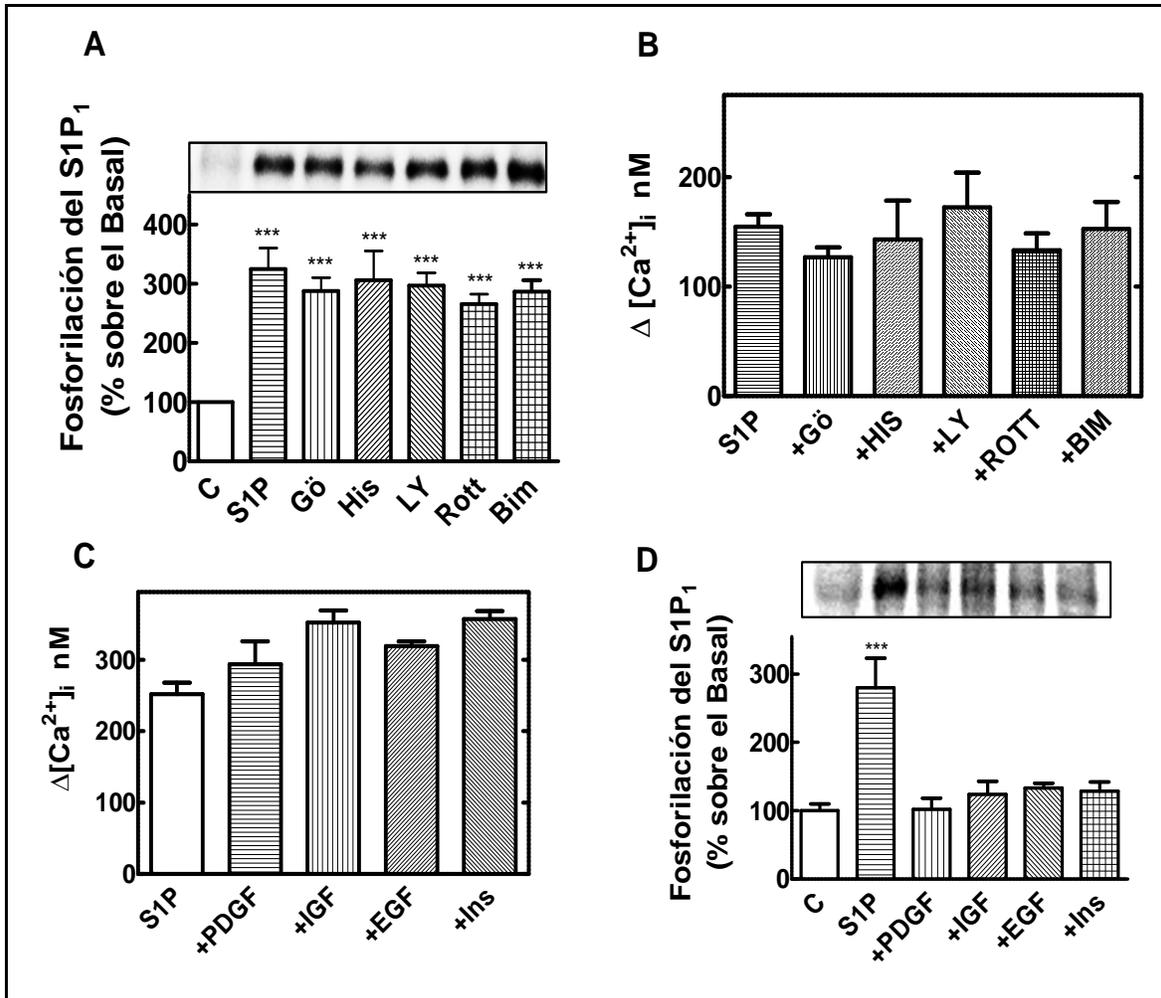
Cuando las células fueron incubadas únicamente con los inhibidores se observó que Gö 6976, rottlerina y BIM no tuvieron efecto sobre la fosforilación del receptor, mientras que la hispidina indujo una fosforilación discreta, aunque estadísticamente significativa (Fig. 11A). Cuando las células fueron preincubadas con los inhibidores de PKC durante 15 min y posteriormente estimuladas con PMA 1 $\mu$ M se observó que la hispidina, el LY333531 y la rottlerina no tuvieron efecto sobre la fosforilación del receptor inducida por PMA, mientras que Gö 6976 y BIM inhibieron la fosforilación del receptor inducida por PMA (Fig. 11B), indicando una clara participación de la PKC $\alpha$ .

En los ensayos de liberación de calcio intracelular se observó que hispidina, y rottlerina no fueron capaces de revertir la desensibilización del receptor mediada por PMA. Sin embargo, Gö 6976 y BIM revertieron los efectos del PMA (Fig. 11C y D), confirmando de manera funcional que la PKC $\alpha$  es la isoforma predominantemente involucrada en la regulación negativa del receptor.

#### **9.4. Efecto de inhibidores de las isoformas de la PKC sobre la fosforilación inducida por S1P, y de factores de crecimiento sobre la desensibilización y fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub>**

Se evaluó el efecto de los inhibidores de PKC sobre la fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub> cuando las células fueron estimuladas con el agonista natural (S1P). En los ensayos de marcaje metabólico con [<sup>32</sup>P]Pi, las células fueron preincubadas durante 15 min con los distintos inhibidores de las isoformas de la PKC y posteriormente se realizó un estímulo con S1P 1 $\mu$ M durante 10 min. Como se observa en la figura 12A, los inhibidores no tuvieron efecto sobre la fosforilación del receptor inducida por S1P, lo que indica que la activación de la vía de señalización del receptor S1P<sub>1</sub> involucra a cinasas diferentes a las isoformas de la PKC, tales como Akt, GRK y PKA; es también probable que la fosforilación por cinasas diferentes a las isoformas de la PKC ocurra en regiones y residuos diferentes.

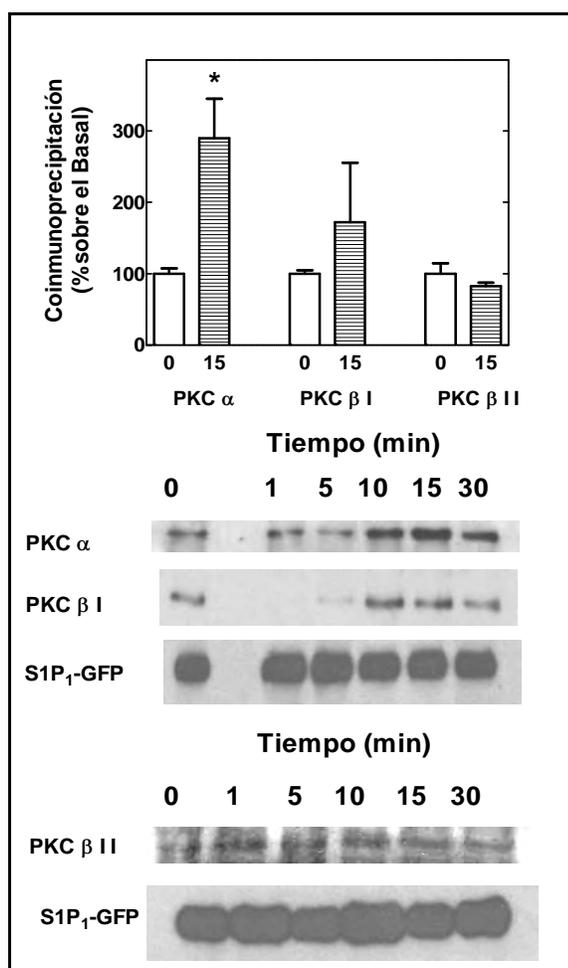
Cuando las células fueron incubadas únicamente con inhibidores de la PKC, no se observaron cambios en la liberación de calcio intracelular (Figura 12B), lo que descartó efectos artefactuales por el uso de los inhibidores de las isoformas de la PKC.



**Figura 12. Efecto de inhibidores de las isoformas de la PKC sobre la fosforilación inducida por S1P, y de factores de crecimiento sobre la desensibilización y fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub>.**

A) Las células LNCaP fueron marcadas metabólicamente con [<sup>32</sup>P]Pi e incubadas con el vehículo (C), estimuladas con S1P 1 $\mu$ M durante 10 min o incubadas con los inhibidores indicados durante 15 min (n=4-5). B) Las células LNCaP fueron estimuladas con S1P 1 $\mu$ M durante 10 min o incubadas con los inhibidores indicados, el incremento en la concentración de calcio intracelular fue medido por espectrofluorimetría (n=3-18). C) Las células LNCaP fueron estimuladas con S1P 1 $\mu$ M durante 10 min o con los factores de crecimiento indicados a una concentración de 1 $\mu$ M durante 15 min; el incremento en la concentración de calcio intracelular fue medido por espectrofluorimetría (n=4-7). D) Las células LNCaP fueron marcadas metabólicamente con [<sup>32</sup>P]Pi y estimuladas con S1P 1 $\mu$ M durante 10 min o con los factores de crecimiento indicados a una concentración de 1 $\mu$ M durante 15 min (n=5-6). Los datos de densitometría de las autorradiografías fueron obtenidos con el programa de análisis de imagen ImageJ, las gráficas y la estadística se generaron a partir de los datos con el programa Prism Graphpad 5.0. Las líneas verticales representan el error estándar medio. \*\*\* Estadísticamente diferente con P<0.001.

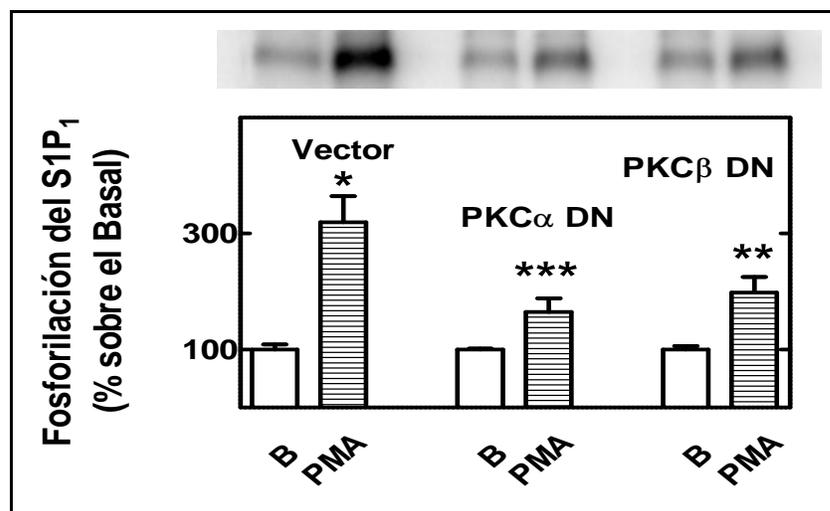
El receptor S1P<sub>1</sub> puede transactivar a diversos receptores para factores de crecimiento (Takanabe *et al.*, 2008), evento que puede ser parte una asa regulatoria en la que, una vez transactivados, los receptores de factores de crecimiento pueden regular negativamente al receptor S1P<sub>1</sub>. Para determinar si el receptor S1P<sub>1</sub> puede ser fosforilado y desensibilizado por acción de receptores con actividad de tirosina cinasa activados por sus agonistas, se llevaron a cabo ensayos de liberación de calcio intracelular en células LNCaP que expresan establemente al receptor S1P<sub>1</sub>, las cuales fueron preincubadas con 1 $\mu$ M de PDGF, IGF, EGF e insulina durante 15 min y posteriormente estimuladas con S1P.



**Figura 13. Asociación de las isoformas de PKC al receptor S1P<sub>1</sub>.** Las células LNCaP fueron estimuladas con S1P 1 $\mu$ M durante los tiempos indicados y lisadas durante 1 h, los lisados celulares fueron inmunoprecipitados contra la etiqueta GFP y las isoformas de la PKC fueron detectadas por Western blot. Como control de carga se usó el receptor S1P-GFP (n=3-4). Los datos de densitometría de los Western blot fueron obtenidos con el programa de análisis de imagen ImageJ, las gráficas y la estadística se generaron a partir de los datos con el programa Prism Graphpad 5.0. Las líneas verticales representan el error estándar medio. \* Estadísticamente diferente con P<0.001.

Como se observa en las figuras 12C, ningún factor de crecimiento fue capaz de desensibilizar al receptor. De igual forma, en ensayos de marcaje metabólico con  $[^{32}\text{P}]\text{Pi}$ , en donde las células se estimularon con los factores de crecimiento indicados durante 15 min, se observa que ninguno de los factores de crecimiento fue capaz de inducir la fosforilación del receptor (Fig. 12D).

Las isoformas de la PKC requieren interactuar directamente con sus sustratos para llevar a cabo su acción catalítica (Reeves *et al.*, 1999). En la figura 13 se muestra la inmunoprecipitación del receptor  $\text{S1P}_1$ , y su asociación con las isoformas  $\alpha$  y  $\beta\text{I}$  de la PKC. Aparentemente la asociación entre el receptor y las PKCs ocurre de forma constitutiva, pues no hay necesidad de activar a las PKCs para observar una asociación basal. Sin embargo, una vez activadas por PMA  $1\mu\text{M}$ , la asociación de las isoformas de la PKC tuvo una dinámica interesante, pues aparentemente a tiempos cortos las PKCs se disocian del receptor, para posteriormente reasociarse en mayor cantidad (Figura 13 panel superior). Se observa una asociación de la PKC  $\beta\text{II}$  desde la condición sin estimular, pero no parece aumentar la interacción por la incubación con PMA  $1\mu\text{M}$  (Figura 13 panel inferior).

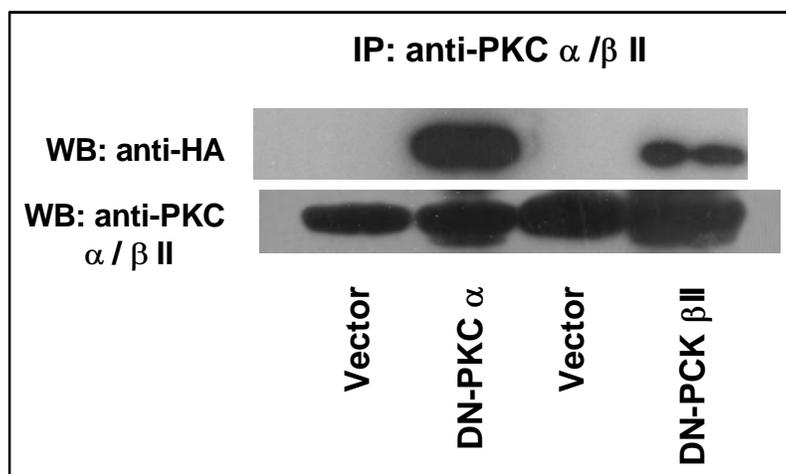


**Figura 14. Efecto de la transfección de dominantes negativas de PKC  $\alpha$  y  $\beta\text{II}$  sobre la fosforilación del receptor  $\text{S1P}_1$ .** Células LNCaP que expresan establemente al receptor  $\text{S1P}_1\text{-GFP}$  fueron transfectadas transitoriamente con el vector, un plásmido que codifica para PKC $\alpha$  o PKC $\beta$  dominantes negativas. Las células fueron marcadas metabólicamente con  $[^{32}\text{P}]\text{Pi}$  e incubadas con PMA  $1\mu\text{M}$  durante 15 min ( $n=3-5$ ). Los datos de densitometría de la autorradiografía fueron obtenidos con el programa de análisis de imagen ImageJ, las gráficas y la estadística se generaron a partir de los datos con el programa Prism Graphpad 5.0. Las líneas verticales representan el error estándar medio. \*Estadísticamente diferente con  $p<0.001$ ; \*\*Estadísticamente diferente con  $P<0.01$ ; \*\*\* Estadísticamente diferente con  $P<0.05$ .

### 9.5. Efecto de la transfección de dominantes negativas de PKC $\alpha$ y PKC $\beta$ II sobre la fosforilación del receptor S1P $_1$ .

Para comprobar la participación isoforma específica de PKC en la fosforilación del receptor S1P $_1$  mediada por PMA, se utilizó la transfección transitoria de plásmidos que codifican para PKC $\alpha$  y  $\beta$ II dominantes negativas, las cuales están mutadas en el sitio catalítico, haciéndolas incapaces de fosforilar a los sustratos, pero que compiten con las PKCs endógenas por el ATP disponible. En la figura 14 se observa que cuando se incubaron células no transfectadas con PMA 1 $\mu$ M durante 15 min, hubo un incremento en la fosforilación de aproximadamente 2.5 veces el basal, mientras que las células transfectadas con la PKC $\alpha$  DN mostraron un incremento aproximado de 0.8 veces el basal; las células transfectadas con la PKC $\beta$ II DN mostraron un incremento en la fosforilación de aproximadamente 1.2 veces el basal.

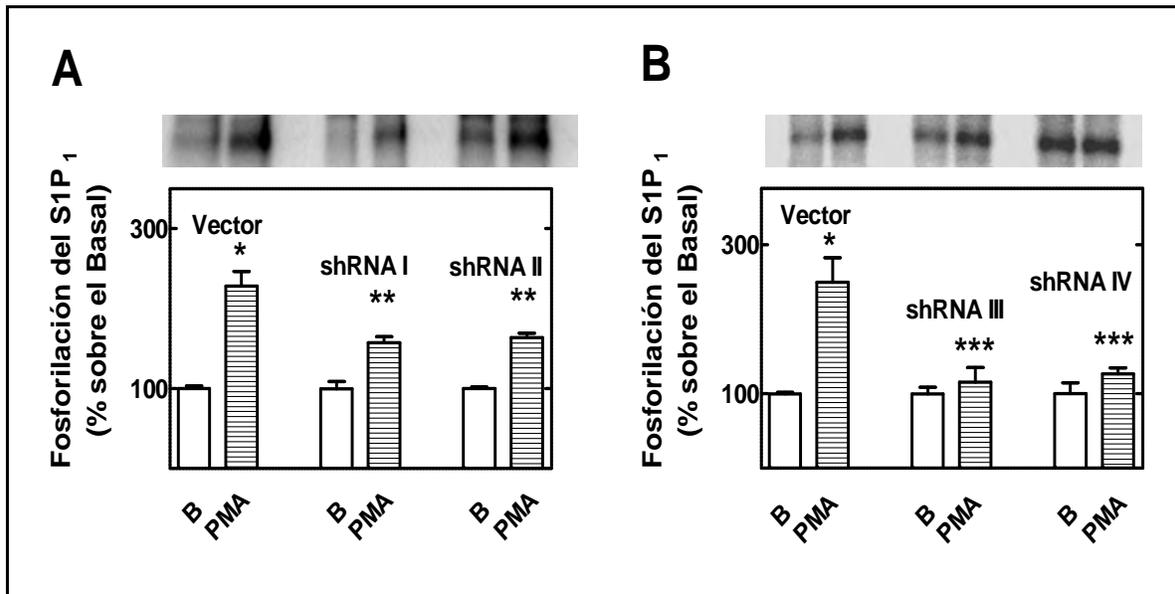
El control de expresión de las PKCs dominantes negativas fue realizado mediante Western blots contra HA, que es una etiqueta fusionada a las dominantes negativas en el extremo amino. Se observó la aparición de la banda correspondiente a las PKCs únicamente en células transfectadas. De igual forma, el Western blot usando una mezcla de anticuerpos específicos contra las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ II de la PKC mostró un aumento en la intensidad de las bandas correspondientes a las células transfectadas, confirmando la sobreexpresión de las cinasas (Figura 15).



**Figura 15. Sobreexpresión de las dominantes negativas de PKC.** El Western blot contra la etiqueta HA muestra la expresión de las PKC  $\alpha$  y  $\beta$ II DN, mientras que el Western blot contra las isoformas de PKC muestra la sobreexpresión de las cinasas. Figura demostrativa, sin repeticiones.

## 9.6. Efecto de la transfección de shRNA PKC $\alpha$ y PKC $\beta$ II sobre la fosforilación del receptor S1P $_1$ .

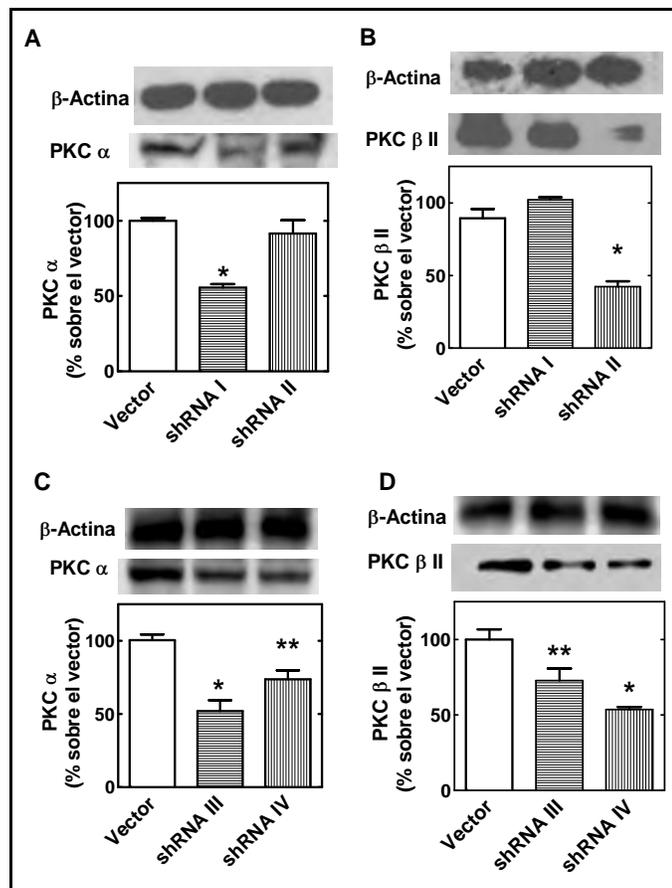
Se obtuvieron dos líneas LNCaP establemente transfectadas con shRNA PKC $\alpha$  y dos líneas celulares establemente transfectadas con shRNA PKC $\beta$ II. Dichas líneas estables fueron transfectadas transitoriamente con el receptor S1P $_1$ -GFP, mantenidas durante 48 h en medio completo y sometidas a experimentos de marcaje metabólico con [ $^{32}$ P]Pi. Como se puede observar en la figura 16, las células que expresaron de forma estable los shRNA mostraron una disminución en la fosforilación del receptor S1P $_1$  con respecto al control transfectado con el vector. No se logró observar una disminución total en la fosforilación para ninguna de las cuatro condiciones de transfección, lo que puede indicar la participación conjunta de ambas cinasas.



**Figura 16. Efecto de la transfección de shRNA  $\alpha$  y  $\beta$ II sobre la fosforilación del receptor S1P $_1$ .** A) Células LNCaP que expresan establemente a los shRNA I (silencia PKC $\alpha$ ) o shRNA II (Silencia PKC $\beta$ II), fueron transfectadas transitoriamente con el receptor S1P $_1$ -GFP, marcadas metabólicamente con [ $^{32}$ P]Pi y estimuladas con PMA 1 $\mu$ M durante 15 min (n=4). B) Células LNCaP que expresan establemente a los shRNA III (silencia PKC $\alpha$ ) o shRNA IV (Silencia PKC $\beta$ II), fueron transfectadas transitoriamente con el receptor S1P $_1$ -GFP, marcadas metabólicamente con [ $^{32}$ P]Pi y estimuladas con PMA 1 $\mu$ M durante 15 min (n=3). Los datos de densitometría de las autoradiografías fueron obtenidos con el programa de análisis de imagen ImageJ, las gráficas y la estadística se generaron a partir de los datos con el programa Prism Graphpad 5.0. Las líneas verticales representan el error estándar medio. \*Estadísticamente diferente con P<0.001; \*\*estadísticamente diferente con P<0.01 y \*\*\*estadísticamente diferente con P<0.05.

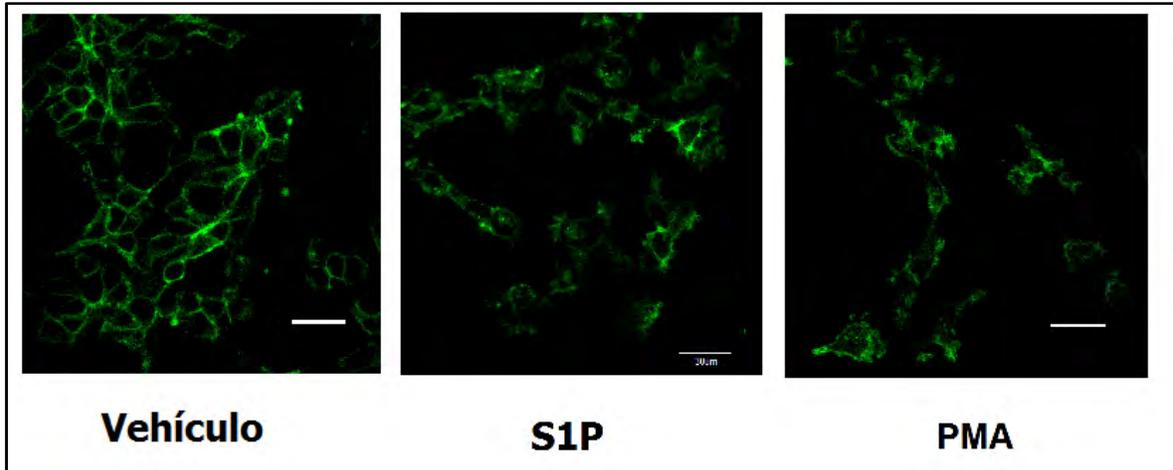
## 9.7. Especificidad de los shRNA PKC $\alpha$ y $\beta$ II.

Fue probada la especificidad de las construcciones de shRNA para PKC $\alpha$  y  $\beta$ II. Se realizaron Western blots cruzados: lisados totales de las células transfectadas con shRNA I (PKC $\alpha$ ) y shRNA II (PKC $\beta$ II) fueron sometidos electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, transferidos a membranas de PVDF y revelados contra PKC $\alpha$ ; únicamente la banda correspondiente a PKC $\alpha$  mostró una disminución en los niveles de expresión (Figura 17A).



**Figura 17. Especificidad de los shRNA PKC  $\alpha$  y  $\beta$ II.** A) Células LNCaP transfectadas con shRNA I y shRNA II fueron lisadas y sometidas a Western blot para detectar a PKC $\alpha$  (n=6-8). B) Células LNCaP transfectadas con shRNA I y shRNA II fueron lisadas y sometidas a Western blot para detectar a PKC $\beta$ II (n=4). C) Células LNCaP transfectadas con shRNA III y shRNA IV fueron lisadas y sometidas a Western blot para detectar a PKC $\alpha$  (n=6-8). D) Células LNCaP transfectadas con shRNA III y shRNA IV fueron lisadas y sometidas a Western blot para detectar a PKC $\beta$ II (n=6-7). Los datos de densitometría de los Western blots fueron obtenidos con el programa de análisis de imagen ImageJ, las gráficas y la estadística se generaron a partir de los datos con el programa Prism Graphpad 5.0. Las líneas verticales representan el error estándar medio. \* Estadísticamente diferente con P<0.001; \*\* estadísticamente diferente con P<0.01.

En el experimento recíproco, los lisados fueron sometidos a electroforesis, transferidos y revelados contra PKC $\beta$ II, se observó la disminución en la expresión únicamente de PKC $\beta$ II (Figura 17B). Las construcciones shRNA III (PKC $\alpha$ ) y IV (PKC $\beta$ ) fueron probadas de la misma forma, mostraron una especificidad menor que las construcciones I y II, sin embargo, hubo una disminución en la expresión de PKC  $\alpha$  y  $\beta$ II que fue estadísticamente significativa (Figura 17C y D).



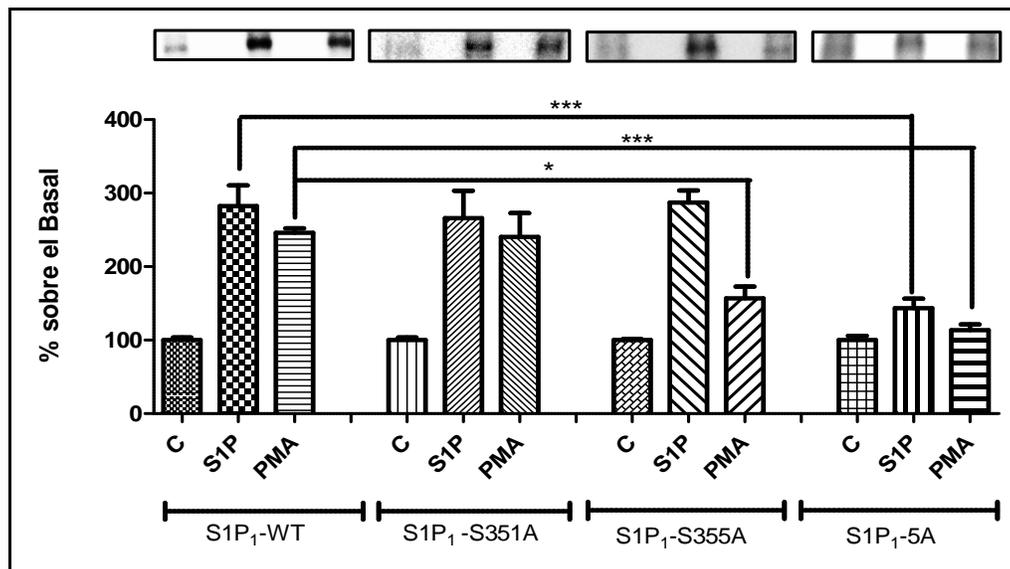
**Figura 18. Internalización del receptor S1P<sub>1</sub> inducida por S1P y PMA.** Células LNCaP fueron cultivadas en cajas con fondo de cristal, en una confluencia del 60% fueron incubadas con el vehículo, estimuladas con S1P 1 $\mu$ M durante 10 min o incubadas con PMA 1 $\mu$ M 15 min, fijadas con paraformaldehído al 4% y observadas en el microscopio confocal. Figura demostrativa, sin repeticiones.

Se ha reportado con anterioridad que el receptor S1P<sub>1</sub> es internalizado en respuesta a un estímulo con su agonista natural (González-Cabrera *et al.*, 2006) y a PMA (Watterson *et al.*, 2002). Para comprobar que el modelo celular elegido también presenta este fenómeno, se realizaron experimentos en los cuales las células LNCaP que expresan establemente al receptor S1P<sub>1</sub>-GFP fueron estimuladas con S1P 1 $\mu$ M durante 10 min o incubados con PMA 1 $\mu$ M 15 min, fijadas con paraformaldehído al 4% y observadas en el microscopio confocal. En la condición control se observó al receptor en la membrana plasmática (contorno verde fluorescente de las células), mientras que en las células estimuladas con S1P e incubadas con PMA se observó la desaparición del receptor en membrana y la aparición de vesículas verdes fluorescentes en el citoplasma (Figura 18).

## 9.8. Caracterización de las mutantes del receptor S1P<sub>1</sub>.

Se desconocen los sitios específicos en los que el receptor S1P<sub>1</sub> es fosforilado por la PKC $\alpha$  y  $\beta$ II, buscando un acercamiento a los posibles sitios fosforilables por las isoformas de PKC, se realizó un análisis *in silico* mediante el uso de los programas Netphos 2.0 del NIH, GPS de Cuckoo Workgroup (Yu *et al.*, 2008) y Scansite del MIT de la secuencia del receptor S1P<sub>1</sub>. Se encontró una región de 5 serinas (S351, S353, S355, S358 y S359) con probabilidad media de ser fosforiladas por PKC.

Con base en el análisis *in silico*, se diseñaron tres diferentes construcciones del receptor S1P<sub>1</sub>: las mutantes puntuales S1P<sub>1</sub>-S351A y S1P<sub>1</sub>-S355A, así como la mutante múltiple S1P<sub>1</sub>-5A; en la cual fueron cambiados 5 residuos de serinas por alaninas, en los residuos 351, 353, 355, 358 y 359. La mutante S1P<sub>1</sub>-S351A no mostró diferencias significativas en su estado de fosforilación con respecto a los controles silvestres (Figura 19).



**Figura 19. Fosforilación de las mutantes del S1P<sub>1</sub>.** Células LNCaP fueron transfectadas establemente con el receptor S1P<sub>1</sub> silvestre (S1P<sub>1</sub>-WT), con el receptor mutante S1P<sub>1</sub>-S351A, con el receptor mutante S1P<sub>1</sub>-S355A o con el receptor mutante S1P<sub>1</sub>-5A, marcadas metabólicamente con [<sup>32</sup>P]Pi y estimuladas con S1P 1 $\mu$ M durante 10 min, o con PMA 1 $\mu$ M durante 15 min, según se indica (n=4-8). Los datos de densitometría de las autorradiografías fueron obtenidos con el programa de análisis de imagen ImageJ, las gráficas y la estadística se generaron a partir de los datos con el programa Prism Graphpad 5.0. Las líneas verticales representan el error estándar medio. \*Estadísticamente significativo con P<0.01; \*\*\*Estadísticamente diferente con P<0.001.

Sin embargo, cuando las células fueron estimuladas con PMA, la mutante S1P<sub>1</sub>-S355A mostró una disminución de un 50% de la fosforilación con respecto al control silvestre, mientras que la fosforilación inducida por S1P se mantuvo sin cambios. La quintuple mutante no sólo perdió la capacidad de ser fosforilada por acción de PMA, sorpresivamente tampoco la S1P la fosforilación del receptor (Figura 19), lo que indica que la presencia de los sitios del motivo rico en serinas es importante para la fosforilación del receptor mediada por la S1P.

## 10. Discusión

La regulación defectuosa del S1P<sub>1</sub> en el organismo humano implica el desarrollo de patologías, algunas relacionadas con el sistema inmune o bien con la pérdida de control en la formación de nuevas vasculaturas, tal es el caso de la vascularización de tumores sólidos. La investigación básica en el campo del receptor S1P<sub>1</sub> ha tenido éxito en el desarrollo de un fármaco, el FTY720, capaz de revertir las condiciones patológicas en pacientes con esclerosis múltiple. Se sabe que dicho fármaco es un agonista sesgado del receptor S1P<sub>1</sub>, y que su principal característica es la inhibición del egreso de los linfocitos de los órganos linfoides a través del bloqueo del reciclaje membranal del receptor. También se sabe que el receptor es fosforilado en la treonina 236 por acción de su agonista y que la mutación a valina de dicho residuo produce un receptor que pierde la capacidad de inducir quimiotaxis en los linfocitos circulantes (Lee *et al.*, 2001).

En el presente estudio encontramos que el receptor S1P<sub>1</sub> es fosforilado y desensibilizado en respuesta a PMA. Para conocer las isoformas de la PKC que son activadas por acción del PMA, las células LNCaP fueron incubadas por tiempo prolongado con PMA, acción que indujo la degradación de tres isoformas clásicas de la PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I y  $\beta$ II, así como dos isoformas nuevas,  $\delta$  y  $\epsilon$ . Se incluyó la detección de la PKC  $\zeta$  como un control negativo, pues es una isoforma de PKC que no es activada por DAG/PMA, por lo tanto, una incubación prolongada con PMA no induce la degradación de esta isoforma.

También se observó que tras el uso prolongado de PMA, un nuevo estímulo con PMA es incapaz de inducir la fosforilación del receptor, sin embargo, un estímulo con S1P indujo una fosforilación incluso más intensa en comparación a las células sin tratamiento, lo que indica que las PKCs no son cinasas que fosforilen al receptor cuando es activado por su ligando natural.

Existen reportes previos en los que se observa la fosforilación del receptor mediada por PMA (Watterson KR *et al.*, 2001 y Thompson *et al.*, 2006), en los cuales observa una participación discreta de PKC $\alpha$  en la fosforilación del receptor, sin embargo los datos obtenidos en esta investigación señalan claramente que PKC $\alpha$  y en menor medida PKC $\beta$ II son las responsables de prácticamente la totalidad de la fosforilación del receptor mediada por PMA. Una preincubación con el inhibidor específico para PKC $\alpha$

(Gö6976) abatió la fosforilación del receptor casi a niveles basales, de forma muy similar al inhibidor inespecífico de cinasas de serina/treonina, BIM. El papel clave de PKC $\alpha$  en la desensibilización heteróloga del receptor S1P<sub>1</sub> se demostró mediante experimentos de medición de la liberación de calcio intracelular, en donde se observó que únicamente el inhibidor Gö6976 y BIM son capaces de revertir la desensibilización del receptor mediada por PMA.

Los inhibidores de PKC por sí solos no tuvieron ningún efecto sobre la fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub>, a excepción de la hispidina, que indujo una fosforilación discreta, tal vez debido a la existencia una asa regulatoria entre la PKC $\beta$  y alguna otra cinasa de serinas treoninas, que al romperse por acción de la hispidina, permite a la otra cinasa seguir activa y fosforilar al receptor.

Los inhibidores de isoformas de la PKC tampoco tuvieron efecto sobre la fosforilación inducida por la S1P, lo que indica que la fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub> inducida por PMA ocurre en sitios diferentes a la treonina 236, que ha sido reportado como el sitio de fosforilación por Akt cuando el receptor es activado por S1P (Lee *et al.*, 2001). Tampoco se observó efecto alguno cuando se utilizaron los inhibidores solos en experimentos de liberación de calcio intracelular. Diversos factores de crecimiento fueron probados para inducir la fosforilación y desensibilización del receptor S1P, los resultados obtenidos fueron negativos, ninguno de los factores de crecimiento fue capaz de inducir la fosforilación del receptor o de desensibilizarlo.

Se observó que las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ I de la PKC se asocian al receptor S1P<sub>1</sub> de forma constitutiva, y que la asociación aumenta cuando las PKCs son activadas por PMA. Este dato sugiere que en el sistema celular estudiado, la PKC está siempre asociada al receptor (directamente o mediante algunas proteínas adaptadoras) y que cuando es activada aumenta su afinidad por el receptor y lo fosforila en tiempos cortos. La asociación de la del receptor S1P<sub>1</sub>, el receptor de VEGF y PKC $\alpha$  en un complejo de señalización fue observado en células de carcinoma de tiroides (Bergelin *et al.*, 2010).

Para reforzar las evidencias de la participación de PKC $\alpha$  en la fosforilación heteróloga del receptor S1P<sub>1</sub>, se utilizaron las mutantes dominantes negativas de las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ II de la PKC. Se observó que ambas isoformas tuvieron participación en la

fosforilación del receptor, aunque fue predominante la participación de la isoforma  $\alpha$ . Este dato creó un conflicto con los datos obtenidos con inhibidores de cinasas, en donde se observó únicamente la participación de PKC $\alpha$ . Una posible explicación para este efecto es que en los experimentos en donde se probó a la dominante negativa de PKC $\beta$ II, la cinasa mutante esté compitiendo por el ATP disponible con la PKC $\alpha$  endógena, reduciendo así la cantidad de sitios fosforilados por la PKC $\alpha$  endógena.

La expresión de las PKC DN fue evidenciada por un Western blot contra la etiqueta HA, en donde sólo se observaron bandas cuando las células fueron transfectadas con las isoformas de PKC. La sobreexpresión de las PKCs se observó en un Western blot contra las isoformas  $\alpha$  o  $\beta$ II, aunque el aumento en la cantidad de proteína también fue evidente para ambas cinasas.

Debido al conflicto entre los datos bioquímicos, que sugieren que es predominante la fosforilación por PKC $\alpha$ , y los datos de las dominantes negativas, que sugieren que la PKC $\beta$ II también está participando en la fosforilación del receptor S1P $_1$ , se tomó la decisión de utilizar otra herramienta para intentar resolver la disyuntiva. Se utilizaron diversas construcciones de shRNAs, dos para silenciar PKC $\alpha$  y dos para silenciar PKC $\beta$ II. Todas las construcciones de shRNAs fueron capaces de disminuir la fosforilación del receptor con respecto a la fosforilación observada en el shRNA inespecífico. Al tratarse de un ensayo en donde la expresión de las PKCs se abate desde el RNA mensajero, la interpretación de los datos es más directa. Se comprobó que existe una participación de ambas isoformas de PKC, aunque la PKC $\alpha$  tiene un papel preponderante en la fosforilación del receptor S1P $_1$ .

La eficiencia y la especificidad de los shRNA se muestran en la figura 17, se puede ver que las construcciones I y II tuvieron una eficiencia de aproximadamente el 40% de silenciamiento y fueron específicas para silenciar a PKC $\alpha$  y  $\beta$ II respectivamente, mientras que las construcciones III y IV mostraron una menor especificidad, pues se observa que la expresión de ambas cinasas se ve afectada por los dos shRNA, aunque mostraron la misma eficiencia de silenciamiento.

Si se toman juntos los datos de inhibidores de PKC, de las dominantes negativas de PKC $\alpha$  y  $\beta$ II y de los shRNA para ambas isoformas, se concluye que la PKC $\alpha$  y en menor medida  $\beta$ II son las isoformas que fosforilan al receptor S1P $_1$  después de un estímulo con

PMA. Que dos isoformas de la PKC fosforilen a un mismo sustrato es un evento que se ha observado con anterioridad, (Nishikawa *et al.*, 1997) y es un ejemplo de la redundancia de los sistemas biológicos.

Se ha reportado previamente que el receptor S1P<sub>1</sub> es internalizado en respuesta a un estímulo con S1P (Watterson *et al.*, 2002); mediante el uso de microscopio confocal se observó la internalización inducida por S1P a los 10 min de estímulo y por PMA a los 15 min. Estos datos muestran que la fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub> mediada por PKC $\alpha$  y  $\beta$ II también induce un proceso de internalización, aunque se desconocen las proteínas que la median, así como la naturaleza de las vesículas.

En investigaciones previas se observó que el estímulo con FTY720P induce la fosforilación del receptor en un motivo de 5 serinas (351, 353, 355, 358 y 359) ubicado en el extremo carboxilo (Oo *et al.*, 2011), por lo que no descartamos la posibilidad de que la PKC  $\alpha$  y  $\beta$ II tengan como blanco algunas de las serinas de dicho motivo. Para conocer los posibles sitios de fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub> se diseñaron tres construcciones, una mutante en la que se cambió una serina por alanina en el sitio 351, de probabilidad baja de fosforilación por PKC (S1P<sub>1</sub>-S351A), otra mutante en la que se cambió la serina por alanina en el sitio 355, de probabilidad media de fosforilación por PKC (S1P<sub>1</sub>-S355A) y una última mutante en la que se cambiaron las serinas 351, 353, 355, 358 y 359 por alaninas (S1P<sub>1</sub>-5A).

Los resultados de la incubación con S1P o PMA de las células transfectadas transitoriamente con dichas mutantes mostraron que la construcción S1P<sub>1</sub>-S351A no manifestó cambios en la magnitud de la fosforilación, lo que excluye al sitio como blanco de la PKC. La mutante S1P<sub>1</sub>-S355A tuvo una disminución de aproximadamente un 50% de la fosforilación cuando las células son estimuladas con PMA, este dato sugiere que el residuo S355 es relevante en los efectos del PMA sobre el receptor. La mutante S1P<sub>1</sub>-5A mostró una fosforilación casi nula tanto para el estímulo con S1P como para el estímulo con PMA. Este dato que es muy interesante, pues se sabe que el ligando del receptor no induce la fosforilación del receptor en el motivo de 5 serinas sino en el sitio T236 (Oo *et al.*, 2011). Este resultado sugiere dos cosas: que del 100% de la fosforilación inducida por PMA en el receptor S1P<sub>1</sub> estaría ocurriendo 50% en el residuo 355, y el restante 50% en alguna de las siguientes serinas: 353, 358 o 359. O bien que la PKC reconoce un motivo

rico en serinas para llevar a cabo la fosforilación y que la ausencia de una o dos de las serinas en el motivo no afecta considerablemente la asociación de la cinasa.

Por otra parte, es sabido que la fosforilación del receptor inducida por su ligando ocurre mayoritariamente en el residuo T236, aunque no existen datos que confirmen o nieguen la fosforilación de la región rica en serinas tras una activación del receptor por S1P. La pérdida de la fosforilación inducida por S1P por parte de la mutante S1P<sub>1</sub>-5A sugiere que, aunque la fosforilación podría ocurrir en localizaciones diferentes, la presencia del motivo rico en serinas es determinante para el acercamiento físico de Akt, ya que el plegamiento tridimensional de la proteína podría estar acercando a la tercera asa con el extremo carboxilo, y que la pérdida de la integridad en el motivo rico en serinas afecte el mecanismo de acción de Akt, impidiendo así la fosforilación, o bien, que existen algunos residuos de la región rica en serinas que podrían ser fosforiladas tras un estímulo con S1P.

## 11. Conclusiones

La regulación del receptor S1P<sub>1</sub> en un organismo completo es de vital importancia para modular, entre otros eventos, la respuesta inmunológica del individuo. En un sistema fisiológico existen mecanismos compensatorios, que se encargan de mantener un balance adecuado entre los procesos activadores y los inactivadores de las vías de señalización. Tal es el caso de algunos factores de crecimiento y su estrecha relación con las vías de señalización del receptor S1P<sub>1</sub>. Es de gran importancia conocer no sólo los mecanismos regulatorios desencadenados por el propio ligando, sino aquellos que son mediados de forma heteróloga por la activación de receptores diferentes.

En la presente investigación encontramos que el receptor S1P<sub>1</sub> es fosforilado en respuesta a S1P y PMA, es fosforilado con mayor intensidad por la acción de la S1P que por la del PMA. Cuando se hace una incubación prolongada con PMA y después se estimula con S1P o PMA, se observa que la S1P induce la fosforilación del receptor, incluso con mayor intensidad que sin PMA toda la noche, mientras que el PMA ya no es capaz de inducirla, indicando que la S1P induce la fosforilación del receptor activando cinasas diferentes a PKC, y la participación de alguna isoforma de PKC en la fosforilación inducida por PMA.

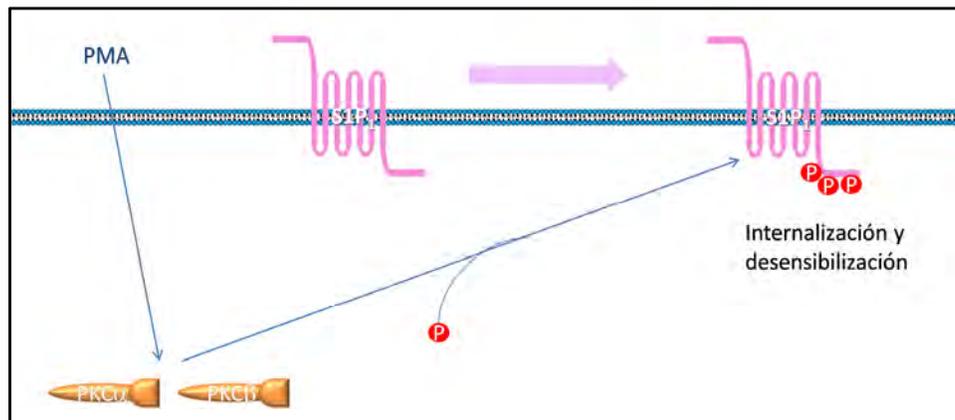
El receptor no es fosforilado por acción de PMA cuando las células son preincubadas con Gö6976, un inhibidor específico de PKC $\alpha$  o BIM, un inhibidor general de PKCs, mientras que los inhibidores de PKC $\beta$  (hispidina y LY333531) y  $\delta$  (rottlerina) no tienen efecto sobre la fosforilación, lo que indica la participación mayoritaria de PKC $\alpha$ , dato que se confirma con el uso de dominantes negativas, en donde se observó que tanto la PKC $\alpha$  DN como la PKC $\beta$ II DN disminuyen la fosforilación inducida por PMA en aproximadamente un 50%.

El uso de shRNA indica la participación de ambas isoformas de PKC en la fosforilación del receptor, la expresión de ambas isoformas es abatida en aproximadamente 50% con el uso de los shRNA.

La mutante S1P1-S355A muestra una disminución en la fosforilación del receptor inducida por PMA en aproximadamente un 50%, indicando un sitio muy importante en el proceso. La quáintuple mutante del receptor indica que el resto de los sitios importantes de

fosforilación inducida por PMA se encuentran en el motivo rico en serinas, que comprende los sitios 351, 353, 355, 358 y 359, además de que la fosforilación inducida por S1P también se ve abatida por la eliminación de dichas serinas.

En la figura 20 se puede observar el mecanismo de fosforilación propuesto, en donde las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de la PKC fosforilan al receptor S1P<sub>1</sub>, muy probablemente en residuos de serina/treonina del extremo carboxilo, induciendo así la internalización y desensibilización del receptor.



**Figura 20. Conclusión gráfica.** El PMA activa directamente a las isoformas de PKC  $\alpha$  y  $\beta$ II, las cuales fosforilan al receptor S1P<sub>1</sub>, probablemente en residuos del extremo carboxilo, induciendo la desensibilización e internalización del receptor.

## 12. Bibliografía

**Álvarez SE.** Milstien S, Spiegel S. Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends Endocrinol. Metab.* 2007. 18; 300-307.

**Argraves KM,** Argraves WS. HDL serves as a S1P signaling platform mediating a multitude of cardiovascular effects. *J. Lipid Res.* 2007. 48; 2325-2333.

**Arnon TI,** Xu Y, Lo C, Pham T, An J, Coughlin S, Dorn GW, Cyster JG. GRK2-dependent S1PR1 desensitization is required for lymphocytes to overcome their attraction to blood. *Science.* 2011. 333; 1898-1903.

**Bergelin N,** Lof C, Balthasar S, Kalhori K, Tornquist K. S1P1 and VEGFR-2 form a signaling complex with extracellularly regulated kinase 1/2 and protein kinase C-alpha regulating ML-1 thyroid carcinoma cell migration. *Endocrinology.* 2010. 151; 2994-3005.

**Billington CK,** Penn RB. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir. Research.* 2003. 4; 1-23

**Blaho VA,** Hla T. Regulation of mammalian physiology, development, and disease by the sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid receptors. *Chem. Rev.* 2011. 111; 6299-6320.

**Brinkmann V,** Cyster JG, Hla T. FTY720: Sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function. *Am. J. Transplant.* 2004. 4; 1019-1025.

**Chun J,** Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, Moolenaar W, Pyne S, Tigyi G. International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* 2002. 54; 265-269.

**Clair T,** Aoki J, Koh E, Bandle RW, Nam SW, Ptaszynska MM, Mills GB, Schiffmann E, Liotta LA, Stracke ML. Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate. *Cancer Res.* 2003. 63; 5446-5453.

**Escribá PV**, Wedegaertner PB, Goñi FM, Vögler O. Lipid–protein interactions in GPCR-associated signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. 1768; 836-852.

**Favaron M**, Manev H, Simant R, Bertolino M, Szekely AM, DeErasquin G, Guidotti A, Costa E. Down-regulation of protein kinase C protects cerebellar granule neurons in primary culture from glutamate-induced neuronal death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. 87; 1983-1987.

**Fieger CB**, Huang MC, Van Brocklyn JR, Goetzl EJ. Type 1 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor signaling of lymphocyte functions requires sulfation of its extracellular amino-terminal tyrosines. *FASEB J.* 2005. 19; 1926-1928.

**French KJ**; Upson JJ; Keller SN; Zhuang Y; Yun JK; Smith CD. Antitumor activity of sphingosine kinase inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006. 318; 596-603.

**Fyrst H**, Saba JD. Sphingosine-1-phosphate lyase in development and disease: Sphingolipid metabolism takes flight. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. 1781; 448-458.

**Gonzalez-Cabrera PJ**, Hla T, Rosen H. Mapping Pathways Downstream of Sphingosine 1-Phosphate Subtype 1 by Differential Chemical Perturbation and Proteomics. *J. Biol. Chem.* 2006. 282; 7254 -7264.

**Goronzy JJ**, Weyand CM. The innate and adaptive immune systems. En: Goldman L, Ausiello D, eds. *Cecil Medicine.* 23<sup>a</sup> ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier. 2007. Cap. 42.

**Graeler MK**, Kong Y, Karliner JS, Goetzl EJ. Protein Kinase C $\epsilon$  Dependence of the Recovery from Downregulation of S1P<sub>1</sub> G Protein-coupled Receptors of T Lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 2003. 278; 27737-27741.

**Grynkiewicz G**, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 1985. 260; 3440-3450.

**Hänel P**, Andréani P, Gräler MH. Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J.* 2007. 21; 1202-1209.

**Hanson MA**, Roth CB, Jo E, Griffith MT, Scott FL, Reinhart G, Desale H, Clemons B, Cahalan SM, Schuerer SC, Sanna MG, Han GW, Kuhn P, Rosen H, Stevens RC. Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science*. 2012. 335; 851-855.

**Hausdorff WP**, Caron MG and Lefkowitz RJ. Turning off the signal: desensitization of beta adrenergic receptor function. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 1990. 4; 2881-2889.

**Hawtin S**, Tobin AB, Patel S, Wheatley M. Palmitoylation of the vasopressin V<sub>1a</sub> receptor reveals different conformational requirements for signaling, agonist induced receptor phosphorylation, and sequestration. *J. Biol. Chem*. 2001. 276; 38139-38146.

**Hla T**, Maciag T. An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem*. 1990. 265; 9308-9313.

**Iwasaki A**, Ruslan Medzhitov R. A New Shield for a Cytokine Storm. *Cell*. 2011. 146; 861-862.

**Kennedy PC**, Zhu R, Huang T, Tomsig JL, Mathews TP, David M, Peyruchaud O, Macdonald TL, Lynch KR. Characterization of a Sphingosine 1-phosphate Receptor Antagonist Prodrug. *J Pharm. Exp. Ther*. 2011. 338; 879-889.

**Kohout TA** and Lefkowitz RJ. Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol. Pharm*. 2003. 63; 9-18.

**Krupnick JG** y Benovic JL. The role of receptor kinases and receptors in G-protein-coupled receptor regulation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 1998. 38; 289-319.

**Laemmli UK**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. 227; 680-685.

**Lee MJ**, Thangada S, Paik JH, Sapkota GP, Ancellin N, Chae SS, Wu M, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Alessi DR, Hla T. Akt-Mediated Phosphorylation of the G Protein-Coupled Receptor EDG-1 Is Required for Endothelial Cell Chemotaxis. *Mol. Cel*. 2001. 8; 693-704.

**Liu Y**, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng C X, Hobson JP, Rosenfeldt HM, Nava VE, Chae SS, Lee MJ, Liu CH, Hla T, Spiegel S, Proia RL. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J. Clin. Investig.* 2000. 106; 951-961.

**Mackay HJ**, Twelves CJ. Targeting the protein kinase C family: are we there yet?. *Nat. Rev. Cancer.* 2007. 7; 554-562.

**Malbon CC** and Hsien-yu Wang. Adrenergic Receptors. *Encyclopedia of life sciences, Nature.* 2001. 1-8.

**Marchese A**, Chen C, Kim YM, Benovic JL. The ins and outs of G-protein-coupled receptor trafficking. *Trends Biochem. Sci.* 2003. 28; 369-376.

**Mitra P**, Oskeritzian CA, Payne SG, Beaven MA, Milstien S, Spiegel S. Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006. 103; 16394-16399.

**Murata N**, Sato K, Kon J, Tomura H, Yanagita M, Kubawara A, Ui M, Okajima F. Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem. J.* 2000. 352; 809-815.

**National Institutes of Health**, National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Esclerosis múltiple, esperanza en la investigación. 2012. NIH Publication No. 75s. Obtenido de [http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/esclerosis\\_multiple.pdf](http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/esclerosis_multiple.pdf).

**Newton AC**. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol. Chem.* 1995. 270; 28495-28498.

**Nishikawa K**, Toker A, Johannes FJ, Songyang Z, Cantley LC. Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 1997. 272; 952-96.

**Nofer JR**. High-density lipoprotein, sphingosine-1-phosphate, and atherosclerosis. *J. Clin. Lipidology.* 2008. 2; 4-11.

**Ohno Y**, Ito A, Ogata R, Hiraga Y, Igarashi Y, Kihara A. Palmitoylation of the sphingosine 1-phosphate receptor S1P is involved in its signaling functions and internalization. *Genes Cells*. 2009. 14; 911-923.

**Oo ML**, Thangada S, Wu MT, Liu CH, Macdonald TL, Lynch KR, Lin CY, Hla T. Immunosuppressive and Anti-angiogenic Sphingosine 1-Phosphate Receptor-1 Agonists Induce Ubiquitinylation and Proteasomal Degradation of the Receptor. *J. Biol. Chem.* 2007. 282; 9082-9089.

**Oo MT**, Chang SH, Thangada S, Wu MT, Rezaul K, Blaho V, Hwang SI, Han DK, and Hla T. Engagement of S1P1-degradative mechanisms leads to vascular leak in mice. *J. Clin. Invest.* 2011. 121; 2290-2300.

**Paik JH**, Skoura A, Chae SS, Cowan AE, Han DK, Proia RL, and Hla T. Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization. *Genes Dev.* 2004. 18; 2392-2403.

**Pitson SM**. Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signalling. *Trends Biochem Sci.* 2011. 36; 97-107.

**Qanbar R**, Bouvier M. Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol. Ther.* 2003. 97; 1-33.

**Reeves EP**, Dekker LV, Forbes LV, Wientjes FB, Grogan A, Pappin DJC, Segal AW. Direct interaction between p47phox and protein kinase C: evidence for targeting of protein kinase C by p47phox in neutrophils. *Biochem. J.* 1999. 344; 859-866.

**Rosen H**, Gonzalez-Cabrera PJ, Sanna MG, Brown S. Sphingosine 1-Phosphate Receptor Signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 2009. 78; 743-768.

**Sánchez AM**, Díaz-Laviada I. Papel de los esfingolípidos en la señalización celular. *Dianas.* 2006. 1; 1-10.

**Schulze T**, Golfier S, Tabeling C, Räbel K, Gräler MH, Witzenrath M, Lipp M. Sphingosine-1-phosphate receptor 4 (S1P4) deficiency profoundly affects dendritic cell function and TH17 cell differentiation in a murine model. *FASEB J.* 2011. 25; 4024-4036.

**Shida D**, Takabe K, Kapitonov D, Milstien S, Spiegel S. Targeting SphK1 as a New Strategy against Cancer. *Curr. Drug Targets*. 2008. 9; 622-673.

**Sonada M**, Takano M, Mayahara J, Kato H. Computed radiography utilizing scanning laser stimulated luminescence. *Radiology*. 1983. 148; 833-838.

**Spiegel S**, Milstien S. Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J. Biol. Chem*. 2002. 277; 25851-25854.

**Takabe K**, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. "Inside-Out" Signaling of Sphingosine-1-Phosphate: Therapeutic Targets. *Pharmacol. Rev*. 2008. 60; 181-195.

**Thompson B**, Ancellin N, Fernandez SM, Hla T, Sha'afi RI. Protein kinase C $\alpha$  and sphingosine 1-phosphate-dependent signaling in endothelial cell. *Prostaglandins other Lipid Mediat*. 2006. 80; 15-27.

**Tran TM**, Friedman J, Qunaibi E. Characterization of agonist stimulation of cAMP-dependent protein kinase and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation of the beta2-adrenergic receptor using phosphoserine-specific antibodies. *Mol. Pharm*. 2004. 65; 196-206.

**Velocigene**. Alleles produced for the KOMP project by Velocigene (regeneron pharmaceuticals). MGI direct data submission. 2008. PubMed ID: J:136110.

**Wang D**, Zhao Z, Caperell-Grant A, Yang G, Mok SC, Liu J, Bigsby RM, Xu Y. S1P differentially regulates migration of human ovarian cancer and human ovarian surface epithelial cells. *Mol Cancer Ther*. 2008. 7; 1993-2002.

**Watterson KR**, Johnston E, Chalmers C, Pronin A, Cook SJ, Benovic JL, Palmer TM. Dual Regulation of EDG1/S1P1 Receptor Phosphorylation and Internalization by Protein Kinase C and G-protein-coupled Receptor Kinase 2. *J. Biol. Chem*. 2001. 277; 5767-5777.

**Wilkerson BA**, Grass GD, Wing SB, Argraves WS, Argraves KM. sphingosine 1-phosphate (S1P) carrier-dependent regulation of endothelial barrier high density lipoprotein (HDL)-S1P prolongs endothelial barrier enhancement as compared with albumin-S1P via effects on levels, trafficking, and signaling of S1P1. *J. Biol. Chem.* 2012. 287; 44645-44653.

**Yu X**, Jian R, Xinjiao G, Changjiang J, Longping W, and Xuebiao Y. GPS 2.0, a Tool to Predict Kinase-specific Phosphorylation Sites in Hierarchy Molecular Cell Proteomics. 2008. 7; 1598-1608.