



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN DEL RECEPTOR LPA₁ POR ISOFORMAS
CONVENCIONALES DE LA PROTEÍNA CINASA C.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Aurelio Hernández Méndez

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, Instituto de Fisiología Celular (UNAM).

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Marina Gavilánez Ruíz, Facultad de Química (UNAM).

Dr. Jorge Vázquez Ramos, Facultad de Química (UNAM).

MÉXICO, D. F. SEPTIEMBRE, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se realizó bajo la tutoría del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, en el Departamento de Biología Celular y Desarrollo, del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, con financiamiento de la dirección general de asuntos del personal académico, UNAM (IN200812) y del Consejo nacional de ciencia y tecnología (177556).

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo integrado por:

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz

Dra. Marina Gavilanes Ruiz

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos

El jurado de examen doctoral estuvo integrado por:

Presidente Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Vocal Dra. Clorinda Arias Álvarez

Vocal Dr. Enrique Ortega Soto

Vocal Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir

Secretario Dra. María Elena Ibarra Rubio

Aurelio Hernández Méndez fue alumno del programa de posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y fue apoyado con una beca de posgrado del CONACYT (208187) y también por una beca para la obtención de grado por parte del PAPIIT, UNAM.

A mi maestra Rocío Alcántara Hernández.

Agradecimientos

Al Dr. Jesús Adolfo García Sáinz por su confianza y enseñanzas a lo largo de mi estancia en su laboratorio.

A los integrantes de mi comité tutorial, la Dra. Marina Gavilanes Ruiz y el Dr. Jorge Vázquez Ramos, por todos sus comentarios y sugerencias para que el proyecto saliera adelante.

A los miembros de mi jurado de tesis: al Dr. Ignacio Camacho Arroyo, a la Dra. Clorinda Arias Álvarez, al Dr. Enrique Ortega Soto, a la Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir, y a la Dra. María Elena Ibarra Rubio, por la lectura crítica y correcciones hechas a esta tesis.

A la Dra. Rocío Alcántara Hernández por su apoyo incondicional y la ayuda brindada en la realización de la parte experimental de este trabajo.

A la Dra. Selma Eréndira Avendaño Vázquez y al M. en C. Javier Martínez, por su apoyo para la realización de este proyecto

A la Dra. Teresa Romero por su ayuda técnica

A la Dra. Martha Robles, a la Dra. María Cristina Castañeda, a la Dra. Marina Macías y al Lic. en IBB. Genaro Vázquez, por su ayuda técnica y la donación de material para la realización de este proyecto.

A los auxiliares de laboratorio Guadalupe Jiménez y Fermín Domínguez

A mis compañeros de laboratorio: Alejandro Cabrera, Christian Colín, Jean A. Castillo, Omar B. Sánchez, Marco A. Alfolzo, Marco A. Morquecho, Carla Sosa y Germán Acosta por su ayuda y su amistad durante mi estancia en el laboratorio.

Agradezco al programa de apoyo a los alumnos de posgrado (PAEP), por el apoyo otorgado para la asistencia al congreso Cell signaling networks 2011 y al XXIX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica.

Agradezco a las unidades de apoyo del Instituto de Fisiología Celular:

Unidad de Biología Molecular:

Dra. Laura Ongay Larios

Biol. María Guadalupe Codiz Huerta

Biol. Dolores minerva Mora Cabrera

Unidad de cómputo:

Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo

Ing. Ivette Rosas Arciniega

Bioterio:

Dra. Claudia Rivera

Dr. Héctor Malagón

Taller de mantenimiento:

Ing. Aurey Galván Lobato

Ing. Manuel Ortíz Benavides

ÍNDICE

RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
ABREVIATURAS.....	9
I. INTRODUCCIÓN.....	10
I.1. Ácido lisofosfatídico (LPA).....	12
I.2. Receptores acoplados a proteínas G.....	13
I.3. Receptores para LPA.....	14
I.4. Desensibilización.....	17
I.5. Proteína cinasa C (PKC).....	21
I.6. Regulación del receptor LPA ₁	23
II. HIPÓTESIS.....	26
III. OBJETIVOS.....	26
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
IV. 1. Reactivos.....	27
IV. 2. Línea celular.....	27
IV. 3. Vectores de clonación.....	28
IV. 4. Transfección de las células C9.....	28
IV. 5. Medición de Ca ²⁺ intracelular.....	29

IV. 6. Ensayo de fosforilación de receptores.....	30
IV. 7. Análisis estadístico.....	31
V. RESULTADOS.....	32
V. 1. Desensibilización del receptor LPA ₁ inducido por PMA.....	32
V. 2. Ensayos de regulación negativa de la PKC inducida por PMA.....	34
V. 3. Inhibidores farmacológicos selectivos para distintas isoformas de PKC.....	36
V. 4. Uso de dominantes negativas de PKC para determinar el papel de PKC α y PKC β	38
V. 5. Uso de shRNA contra PKC α y PKC β II	40
V. 6. Participación de PKC en la desensibilización homóloga del recepto LPA1...42	
V. 7. Asociación de PKC α y PKC β II al receptor LPA ₁ -eGFP.....	43
V. 8. Asociación de GRK al receptor LPA1-eGFP.....	44
VI. DISCUSIÓN.....	45
VII. CONCLUSIONES.....	50
VIII. REFERENCIAS.....	51
IX. ANEXO.....	56

RESUMEN.

El ácido lisofosfatídico (LPA) es un lípido bioactivo que promueve una gran variedad de efectos a nivel celular gracias a la activación de un grupo de receptores pertenecientes a la súper familia de receptores acoplados a proteínas G. Las respuestas celulares inducidas por el LPA pueden ser reguladas por eventos de fosforilación de sus receptores, fenómeno conocido como desensibilización (homóloga cuando es inducida por su ligando y heteróloga cuando es independiente de ligando). En el presente trabajo se estudió el papel que juegan las isoformas clásicas de la proteína cinasa C (PKC) en la desensibilización del receptor LPA₁ inducida por un éster de forbol, el forbol miristato acetato (PMA). Para esto utilizamos una construcción del receptor LPA₁ fusionado a la proteína verde fluorescente, misma que se transfectó para expresión estable en la línea celular C9 de epitelio de hígado de rata (C9 LPA₁-eGFP). La incubación de las células C9 LPA₁-eGFP toda la noche con PMA, produjo la disminución en la cantidad de las distintas isoformas de las PKCs clásicas (α , β I, β II y γ), de una isoforma nueva (δ), mientras que para la isoforma atípica ζ no observamos este efecto. El tratamiento con PMA toda la noche bloqueó la fosforilación y la desensibilización del receptor LPA₁ producida por el PMA. El uso de los inhibidores farmacológicos Gö6976, selectivo para PKC α y β , e hispidina, selectivo para PKC β , también bloqueó parcialmente la fosforilación y la desensibilización del receptor. La cotransfección con mutantes dominantes negativas para las isoformas PKC α y PKC β II, y el uso de shRNAs dirigidos contra estas isoformas de PKC, produjo una reducción de la fosforilación del receptor LPA₁ inducida por PMA y LPA, pero evitó la desensibilización. La estimulación de las células C9 LPA₁-eGFP con LPA y PMA indujo la asociación de PKC α y PKC β II al receptor LPA₁; además, también indujo la asociación de las cinasas GRK2 y GRK3 (cinasas que participan en la desensibilización homóloga) a este receptor para ambos estímulos. Se trata de una forma de regulación más compleja a los modelos de desensibilización de receptores acoplados a proteínas G actualmente conocidos. En éste trabajo demostramos que la fosforilación del receptor LPA₁ inducida por PMA es mediada por PKC α y PKC β .

ABSTRACT.

Lysophosphatidic acid (LPA) is a bioactive lipid that promotes different effects at the cellular level by activating a group of receptors belonging to the G-protein coupled receptors super family. LPA-induced cellular responses could be regulated by phosphorylation of its receptors, a phenomenon known as desensitization (homologous when induced by its ligand, and heterologous when it is ligand-independent). In this work, we assessed the role of the classical isoforms of protein kinase C on LPA₁ receptor desensitization induced by a phorbol ester, phorbol myristate acetate (PMA). For this purpose, we constructed an LPA₁ receptor fused to the green fluorescent protein which was transfected for stable expression in C9 cells, an epithelial cell line derived from rat liver (C9 LPA₁-eGFP). By incubating cells with PMA overnight we were able to observe down-regulation of the classical PKC isoforms (α , β I, β II and γ), as well as for the new isoform δ , while no effect was observed for the atypical ζ isoform. PMA overnight treatment blocked phosphorylation and desensitization of LPA₁ receptor induced by PMA. The use of the pharmacological inhibitors Gö6976, for PKC α and β , and hispidin for PKC β , partially blocked LPA₁ receptor phosphorylation and desensitization. Cotransfection with dominant negative mutants of PKC α and PKC β II, and the use of shRNA directed against these isoforms of PKC, resulted in a reduction of LPA₁ receptor phosphorylation induced by LPA and PMA, but such treatments did not reverse desensitization. Stimulation of C9 LPA₁-eGFP cells with LPA and PMA induced association of PKC α and PKC β II to LPA₁ receptors and also association of GRK2 and GRK3 (kinases involved in homologous desensitization). These data showed a form of regulation more complex than the models of G protein-coupled receptor desensitization currently established. Moreover, we demonstrated that PMA-induced LPA₁ receptor phosphorylation is mediated by PKC α and PKC β II.

ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
ATX	Autotaxina
BIM	Bisindolilmaleimida I
Ca ²⁺	Calcio
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
DAG	Diacilglicerol
DN	Mutante dominante negativa
GRK	Cinasa de los receptores acoplados a proteínas G
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPA ₁	Receptor para ácido lisofosfatídico subtipo 1
³² P	Fosforo 32
PKC	Proteína cinasa C
PMA	Éster de forbol, forbol-miristato-acetato
RTK	Receptor con actividad de cinasa de residuos de tirosina
S1P	Esfingosina-1-fosfato
shRNA	RNA pequeño interferente de horquilla

I. INTRODUCCIÓN

El ácido lisofosfatídico (LPA) es un lípido bioactivo compuesto por una molécula de glicerol, una cadena de ácido graso y un grupo fosfato (monoacil-sn-glicerol-3-fosfato, fig. 1A). Este lípido promueve una gran variedad de efectos en los animales, como la implantación y distribución de los embriones en roedores y es importante en el desarrollo vascular y del cerebro en los vertebrados, además de que se ha relacionado con padecimientos como la hidrocefalia (Yung et al., 2011) y con el desarrollo de algunos tipos de cáncer, como el de ovario y el de colon; a nivel celular induce proliferación, sobrevivencia y migración, figura 1B (Mills y Moolenaar, 2003).

Inicialmente el LPA fue descubierto como uno de los componentes que eran liberados por las plaquetas activadas (Yukiura et al., 2011); pero ahora se sabe que este lípido es muy abundante en los fluidos corporales, y se encuentra en niveles altos en el suero (1-5 μ M) donde puede ser transportado de forma activa unido a albúmina. También está presente en la saliva, el líquido de ascitis, el líquido seminal y el fluido folicular (Moolenaar, 1994).

Los efectos fisiológicos promovidos por el LPA son mediados por la activación de un grupo de receptores pertenecientes a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). El descubrimiento del primer receptor para LPA a mediados de los años 90 del siglo pasado, abrió un gran panorama para el estudio de la función, mecanismos de señalización y regulación de las acciones del LPA (Contos et al., 2000; Fukushima y Chun, 2001).

Hasta la fecha se han identificado 7 receptores para LPA, dentro de los cuales los subtipos 1, 2 y 3 tienen una identidad del 50 %, y se encuentran más relacionados filogenéticamente a los receptores para otro fosfolípido importante, la esfingosina-1-fosfato (S1P). Los otros cuatro receptores se encuentran más relacionados con una familia de receptores de nucleótidos de adenina conocida como P2Y. Cada uno de los receptores para LPA puede acoplarse a diferentes proteínas G, dependiendo del tipo celular que se trate, y seguir distintas vías de señalización

como se puede observar en la figura 1C (Chun et al., 2002; Anliker y Chun, 2004, Gardell et al., 2006; Avendaño-Vázquez et al., 2007).

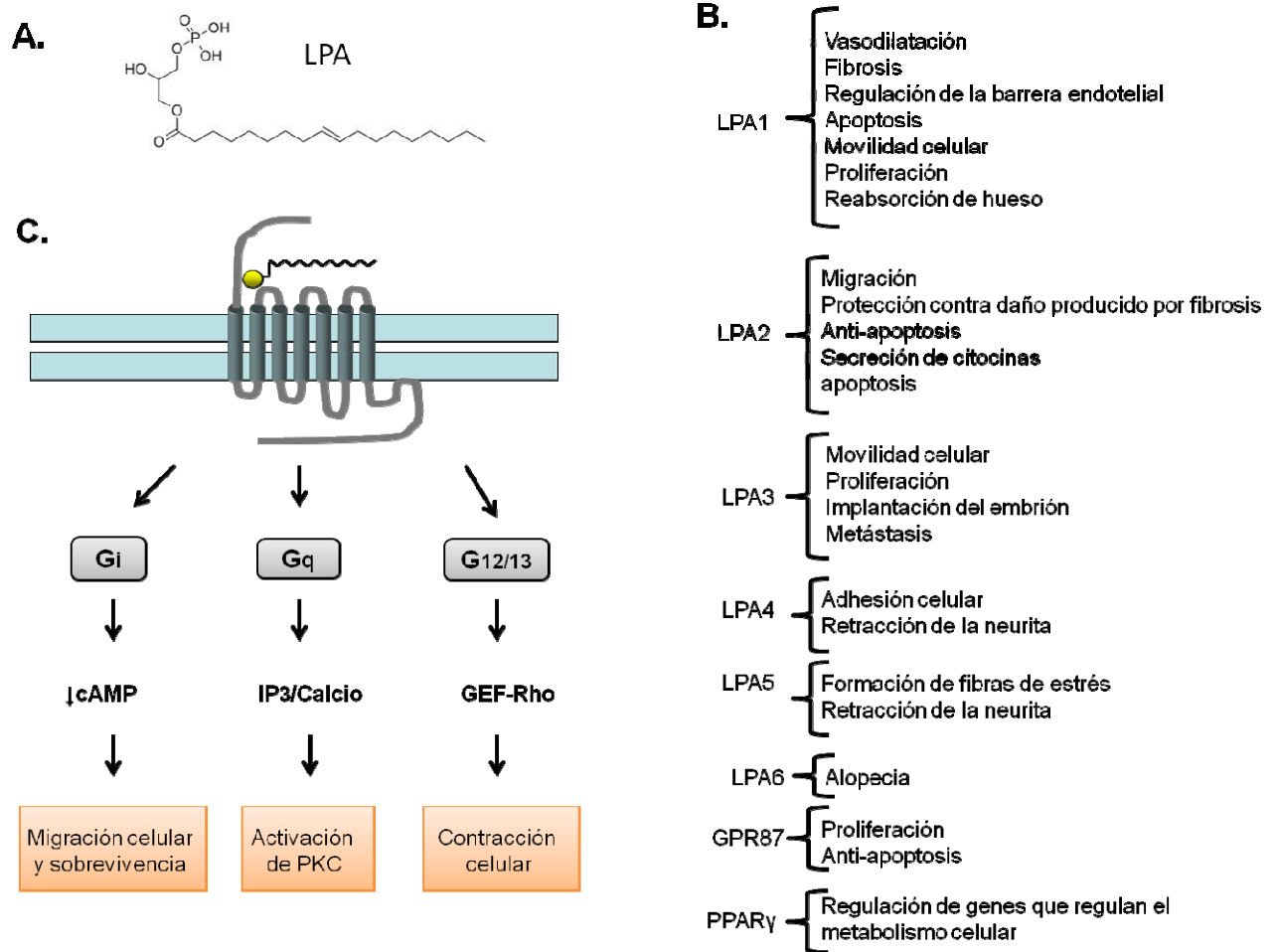


Figura 1. Principales funciones del LPA. A) estructura química del ácido lisofosfatídico. B) Hasta la fecha se reconocen 6 receptores para LPA (LPA₁₋₆), pero también se ha visto que el receptor GPR87 puede ser activado por LPA, además el LPA puede activar al receptor nuclear PPAR γ . Aquí se muestran las principales funciones de cada receptor. C) El receptor LPA₁ se puede acoplar principalmente a la vía de Gi, que inhibe la actividad de la adenilato ciclasa y reduce los niveles de cAMP, teniendo como consecuencia la migración y supervivencia celular; también puede acoplarse a la vía de Gq que activa a la fosfolipasa C, que produce DAG e IP₃; este último permite la liberación de Ca²⁺ del retículo endoplasmático, que junto con el DAG llevan a la activación de la proteína cinasa C. Otra de las vías que puede activar el LPA₁ es la vía de G12/13, que promueve la activación de la proteína G monomérica Rho, que produce cambios en el citoesqueleto y la contracción de la célula. Basado en Contos et al., 2000.

La regulación de la señalización intracelular inducida por la activación de los GPCRs se asocia generalmente a ciclos de fosforilación y desfosforilación de los receptores, en un evento conocido como desensibilización (Vázquez-Prado et al., 2003). En la desensibilización pueden estar involucradas una gran cantidad de cinasas, algunas de las cuales pueden ser activadas por mensajeros intracelulares (segundos mensajeros) como es el caso de la proteína cinasa C (PKC), que se activa por diacilglicerol (DAG) y calcio (Ca^{2+}). En el presente trabajo se trata de elucidar el papel que tienen las distintas isoformas convencionales de PKC en la fosforilación y regulación del receptor LPA_1 .

I.1. Ácido lisofosfatídico (LPA).

Como ya se mencionó, la denominación LPA incluye a un grupo de compuestos que poseen la estructura general de monoacil-sn-glicerol-3 fosfato, es decir el esqueleto es una molécula de glicerol, que puede tener unida en el carbono 1 o 2 una cadena de ácido graso, que puede variar en su longitud y puede ser tanto saturada como insaturada, y presentan en el carbono 3 un grupo fosfato. El LPA se encuentra *in vivo* como una mezcla de diversos ácidos grasos, tanto saturados (16:0, 18:0) como insaturados (16:1, 18:1, 18:2, 20:4) (Aoki, 2004).

Se han propuesto dos vías para la síntesis de LPA. Una se da de manera intracelular a partir de fosfolípidos de membrana, como lo son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, sobre los cuales actúan las fosfolipasas A1 o A2, hidrolizando los enlaces éster en las posiciones C1 y C2 del glicerol, respectivamente, y liberando una de las cadenas de ácido graso de los fosfolípidos. Posteriormente la lisofosfolipasa D rompe el enlace fosfodiéster en la cabeza polar, dejando expuesto al grupo fosfato. En la otra vía, el LPA se genera de forma similar pero en el medio extracelular, por la acción de las fosfolipasas A1 y A2 secretadas y de la autotaxina (ATX), que es una fosfodiesterasa que tiene la función de lisofosfolipasa D aunque estructuralmente no estén relacionadas

(Moolenaar, 1994; Hama et al., 2002; Tigyi y Parrill, 2003; Aoki, 2004; Aoki et al., 2008)

Recientemente se ha propuesto que la ATX puede interactuar con moléculas de la superficie celular como las integrinas, lo que facilitaría la producción y disponibilidad de LPA para activar a sus receptores locales (Fulkenson et al., 2011).

El papel bioactivo del LPA y de otros fosfolípidos como la S1P puede ser regulado por un grupo de proteínas integrales de membrana conocidas como fosfatasa de los lípidos fosfato (LPPs), este grupo de fosfatasa conformado por 3 miembros en mamíferos (LPP1-3), presentan el sitio activo en la parte extracelular o hacia el lumen del retículo endoplasmático, por lo que pueden modificar al LPA tanto extracelular como intracelular, removiendo el grupo fosfato para degradarlo a monoacilglicerol (Tigyi y Parrill, 2003; Pyne et al., 2004). La remoción del grupo acilo del glicerolfosfato por lisofosfolipasas es una de las formas de degradación del LPA que regula la cantidad de LPA disponible. Además de esto, las aciltransferasas pueden generar ácido fosfatídico (PA) a partir de LPA integrándole una cadena más de ácido graso (Tigyi y Parrill, 2003).

I.2. Receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) son un grupo muy importante de proteínas integrales de membrana, que funcionan como receptores para una gran cantidad de moléculas de señalización o agonistas, que pueden variar en su naturaleza química como: proteínas, péptidos, lípidos, catecolaminas, hasta iones como Ca^{2+} o factores físicos, como la luz (fotones). Los GPCRs poseen en su estructura siete hélices alfa hidrofóbicas insertadas en la membrana plasmática unidas por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares. Estas presentan el extremo amino terminal en el lado extracelular y el carboxilo terminal del lado citosólico. Se calcula que son aproximadamente 900 genes los que codifican para

GPCRs en el genoma humano, y son el blanco del 30-40% de los fármacos que actualmente se encuentran en el mercado (Stevens et al., 2012).

Los GPCRs se pueden acoplar a cuatro familias distintas de proteínas G heterotriméricas que se activan cuando el receptor es ocupado por su agonista específico. Este proceso produce un cambio conformacional en el receptor, lo que permite que haya un intercambio de GDP (guanosina difosfato) por GTP (guanosina trifosfato) en la proteína G, y se disocien las subunidades $G\alpha$ unido a GTP y el dímero $G\beta\gamma$, las cuales pueden activar a sus moléculas efectoras río abajo en la cascada de señalización (Stevens et al., 2012).

Las proteínas G se clasifican en las siguientes familias dependiendo de sus funciones principales: $G_{\alpha s}$ (que estimula la producción de AMP cíclico, cAMP), $G_{\alpha i}$ (que inhibe la producción de AMP cíclico), $G_{\alpha q}$ (que activa a la fosfolipasa C) y $G_{\alpha 12/13}$ (que activa a la proteína G monomérica Rho). La unión del ligando a los GPCRs desencadena una cascada de señalización intracelular que produce una respuesta celular, pero al mismo tiempo se activa la maquinaria molecular encargada de regular negativamente la actividad del receptor en un proceso conocido como desensibilización (Vázquez-Prado et al., 2003). Además de regular la actividad de las enzimas ya mencionadas, muchas de las proteínas G pueden modular la actividad de diferentes familias de canales iónicos (Zamponi y Currie, 2013).

I.3. Receptores para LPA

Los receptores para LPA pertenecen a la super-familia de los GPCRs. Hasta el momento se han identificado 6 receptores para ácido lisofosfatídico. Originalmente los primeros tres receptores que se descubrieron fueron nombrados EDG2/LPA₁, EDG4/LPA₂ y EDG7/LPA₃ (EDG, genes de diferenciación del endotelio), por la similitud que tienen con otro grupo de receptores para la S1P, en donde el receptor EDG1/S1P1, fue identificado como uno de los genes que se expresaban en las células que dan origen al endotelio. Posteriormente, los EDGs

fueron renombrados usando el nombre de sus respectivos ligandos (Chun et al., 2002). Los otros tres receptores de LPA (LPA₄₋₆), son más parecidos a la familia de receptores de purinas conocidos como P2Y. Así mismo existe un séptimo receptor, el GPR87, que puede mediar la respuesta tanto a LPA como a S1P (Tabata et al., 2007).

Por otro lado, el LPA también puede activar a un receptor nuclear conocido como PPAR γ que regula la expresión de genes que controlan el metabolismo celular (Bensinger y Tontonoz, 2008).

El receptor LPA₁ fue el primer receptor para LPA descrito, y se detectó como uno de los genes que se expresaban en la zona ventricular durante el desarrollo de la corteza cerebral en ratones, por lo que recibió el nombre de Vz γ -1 (Hecht et al., 1996). Posteriormente se caracterizó en humanos donde recibió el nombre de EDG2. El receptor está compuesto por 364 aminoácidos, con una masa molecular estimada de 41,109 Da (An et al., 1998; An, Bleu et al. 1998). Los ratones “knockout” para lpa1 (-/-) presentan 50% de letalidad neonatal, debido a malformaciones craneofaciales a que presentan dificultades para alimentarse; los organismos que si sobreviven presentan un tamaño reducido en comparación con los ratones silvestres (Contos et al., 2000).

El receptor LPA₂ fue el segundo receptor caracterizado en humanos encontrado por la similitud del gen del LPA₂ con el cDNA del ya descubierto EDG2, por lo que recibió el nombre de EDG4. El receptor consta de 351 aminoácidos con una masa molecular estimada de 39,084 Da (An, Bleu et al. 1998). Los ratones “knockout” para lpa2 (-/-) no parecen mostrar alteraciones fenotípicas, pero el doble knockout lpa1 (-/-) lpa2 (-/-), presenta un fenotipo parecido al lpa1 (-/-) con un incremento considerable en la malformación de la parte frontal del cráneo (Contos et al., 2002; Lin y Lai 2008).

El LPA₃ fue descubierto utilizando oligonucleótidos correspondientes con secuencias que codifican para dos bloques de aminoácidos muy conservados en el segundo y sexto dominio transmembrana de los receptores EDG2 y EDG4, por

lo que originalmente fue nombrado EDG7; consta de 353 aminoácidos, con una masa molecular de 40,128 Da (Bandoh et al., 1999). Los ratones “knockout” para *lpa3* (-/-) son viables, aunque las hembras presentan talla reducida; además, presentan una alteración en la distribución de los embriones en el útero, produciéndose una implantación múltiple e hipertrofia en la placenta (Ye et al., 2005; Hama et al., 2007).

Existe un número muy grande de GPCRs de los cuales se desconoce su ligando, a estos se les denomina receptores huérfanos y se les nombra como GPRs, con un número que los identifica. El LPA₄ fue descubierto durante un proyecto de “adopción” de GPCRs huérfanos. El GPR23 como se conocía inicialmente al LPA₄ resultó ser un receptor filogenéticamente muy cercano a otra subfamilia de GPCRs llamados P2Y, los cuales son receptores purinérgicos por lo que también se le conoce al LPA₄ como P2Y9. Sorpresivamente este receptor de 370 aminoácidos con un peso de 41,895 Da, resultó ser un receptor al que se une el LPA e incrementa la concentración de Ca²⁺ intracelular en células derivadas de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con el DNA que codifica para esta proteína. Los ratones “knockout” para *lpa4* (-/-) son perfectamente viables y no parecen presentar diferencias fenotípicas con respecto a los ratones WT (Lee et al., 2008). El LPA₄ se expresa en timo, próstata, páncreas, corazón, intestino delgado y predominantemente en ovario y se acopla a las proteínas Gq y Gs (Noguchi et al., 2003).

El receptor GPR92, otro receptor huérfano, fue identificado como el receptor LPA₅ por unir LPA y aumentar la concentración de cAMP en células HeLa transfectadas para su expresión. Presenta una homología del 31% con el LPA₄ y 22% con la familia clásica de receptores de LPA, está constituido de 372 aminoácidos con un peso de 41,347 Da y se acopla a Gi y Gq; los ratones “knockout” para *lpa5* (-/-) son completamente viables y no presentan diferencias fenotípicas con los ratones silvestres (Lin et al., 2012). Este receptor se expresa en hígado, colon, intestino delgado cerebro, corazón y bazo (Kotarsky et al., 2006).

El último receptor identificado para LPA es el receptor LPA₆/p2y5 y consta de 344 aminoácidos y un peso molecular de 39,392 Da. Fue descrito como un gen involucrado en un tipo de alopecia humana, donde una mutación en la secuencia del gen resulta en un codón de término que hace que el receptor se traduzca de forma incompleta con lo cual pierde su función. El LPA₆ se puede acoplar a G12/13 y Gs (Pasternack et al., 2008; Yanagida et al., 2009).

Otro receptor rescatado de la orfandad es el GPR87, una proteína de 358 aminoácidos y 41,436 Da, muy parecido a la familia de los receptores P2Y, y que es capaz de unir LPA e incrementar la concentración de Ca²⁺ intracelular en células CHO transfectadas para su expresión (Tabata et al., 2007). Además de unirse a estos receptores de membrana, se sabe que el LPA también puede interactuar con un receptor nuclear conocido como PPAR-γ que regula la expresión diversos genes que tienen que ver con el control de la energía y el metabolismo celular, sin embargo, los efectos que tiene el LPA al unirse a este receptor nuclear aun no son claros (Bensinger y Tontonoz, 2008).

I.4. Desensibilización.

El término desensibilización se aplica a la pérdida de la respuesta del receptor subsecuente a una administración prolongada o repetida de un agente. Para mantener la homeostasis celular un receptor no debe activar de forma continua a la cascada de señalización intracelular, por lo que es necesario que la señal se apague. En los GPCRs, esto generalmente se asocia a ciclos de fosforilación y defosforilación en los receptores (Vázquez-Prado et al., 2003, Kelly et al., 2008).

Para fines prácticos, se ha clasificado a la desensibilización de los GPCRs en dos tipos: homóloga y heteróloga. La primera se refiere a la pérdida de la respuesta ocasionada por la unión del agonista que actúa sobre un receptor en particular y generalmente se asocia a cinasas de los receptores acoplados a proteínas G conocidas como GRKs. En cambio, la desensibilización heteróloga se refiere a una pérdida de la respuesta más general, mediada principalmente por cinasas

dependientes de segundos mensajeros como la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA), o la cinasa dependiente de Ca^{2+} y DAG (PKC). En este caso los segundos mensajeros se generan por la activación de receptores, como los de factores de crecimiento que tienen actividad de tirosina cinasa (RTKs) u otros GPCRs, es decir un receptor es regulado por la activación de otro diferente (figura 2) (Benovic, et al., 1985; Luttrell y Lefkowitz, 2002).

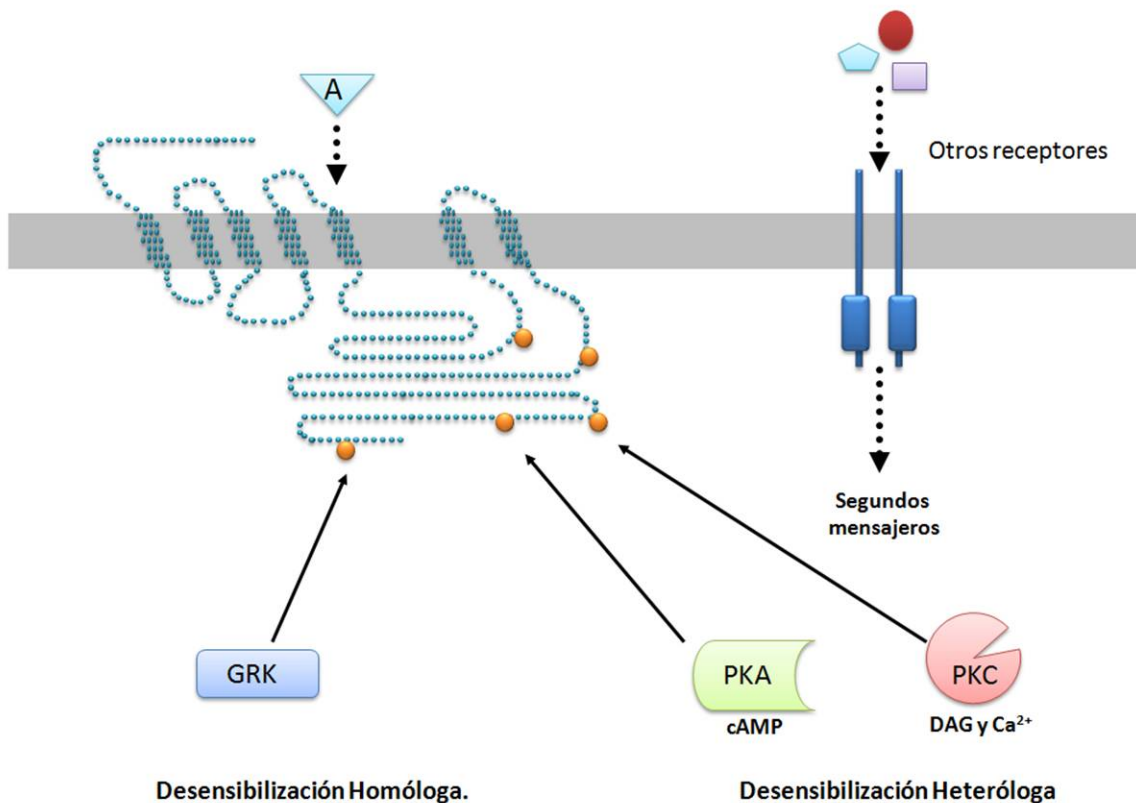


Figura 2. Cinasas que participan en la desensibilización homóloga (GRKs) y heteróloga (PKA y PKC). A (agonista), cAMP (adenosina monofosfato cíclico), DAG (diacilglicerol), Ca^{2+} (calcio).

En la desensibilización homóloga, una vez que el agonista se une al receptor y éste transduce la señal, el receptor es fosforilado por la cinasa GRK en residuos de serina y/o treonina presentes principalmente en la tercera asa intracelular y en el extremo carboxilo; inmediatamente después los sitios fosforilados sirven como puntos de anclaje para la unión de la proteína β -arrestina. La unión de la β -arrestina al receptor impide el acoplamiento de la proteína G, por lo que la señal se termina. Además la β -arrestina también actúa como adaptadora para el reclutamiento de otras proteínas como la β 2-adaptina del complejo AP-2 y la formación de una invaginación de la membrana recubierta de clatrina que por acción de la dinamina conduce a la endocitosis de los receptores en vesículas. Una vez internalizado, el receptor puede ser seleccionado para ser degradado en los lisosomas o puede ser conducido a endosomas donde el ligando se disocia del receptor al igual que la β -arrestina, permitiendo que el receptor sea defosforilado por las fosfatasas, entre ellas PP2A, para después ser reciclado a la membrana plasmática (Luttrell y Lefkowitz 2002) (Fig. 3).

La fosforilación de los GPCRs, se convierte en una marca molecular a la que se le ha asociado con varios procesos celulares específicos, dependiendo de los sitios modificados con el fosfato y por tanto, de las cinasas que participan. Así, en algunos GPCRs la fosforilación tanto de las asas intracelulares como del extremo carboxilo, le permiten al receptor interactuar con proteínas adaptadoras y/o proteínas andamio que reclutan a su vez otras proteínas, incluyendo cinasas y fosfatasas que participan en la regulación de la función del receptor (sobreactivación y desensibilización). Recientemente, el concepto de “código de barras” de los GPCRs, surge para identificar los sitios probables de fosforilación de cada uno de los GPCRs por acción de las distintas cinasas, y que en conjunto, constituyen un código particular que caracteriza estados específicos de cada receptor (Butcher et al., 2011).

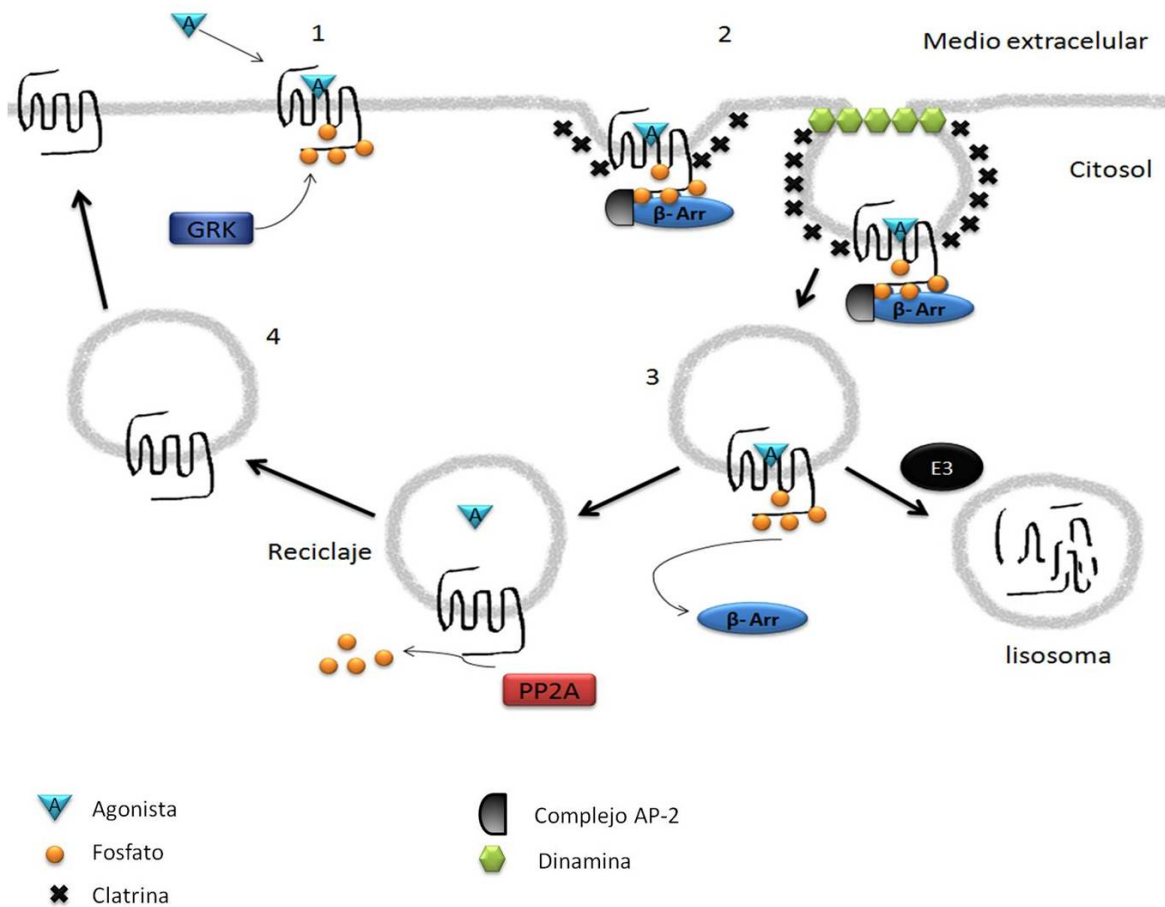


Figura 3. Desensibilización de GPCRs inducida por ligando (homóloga). 1) La unión del agonista al receptor hace que la GRK fosforile residuos de serina y treonina en la tercera asa intracelular y en el extremo carboxilo terminal del receptor. 2) Los sitios fosforilados en el receptor sirven de anclaje para la proteína β -arrestina y el acoplamiento de complejo AP-2, lo que induce la formación de una vesícula endocítica recubierta de clatrina, y que depende de dinamina para la endocitosis del receptor. 3) β -arrestina se disocia del receptor el cual puede ser redirigido a los lisosomas para su degradación en una vía dependiente de la ligasa de ubiquitina E3, o puede ser dirigido a vesículas de medio ácido donde el agonista se disocia del receptor y éste es defosforilado por acción de la fosfatasa PP2A. 4) El receptor es reciclado a la membrana citoplasmática (resensibilización). Basado en Luttrell y Lefkowitz, 2002.

I.5. Proteína cinasa C (PKC)

La familia de la PKC comprende un grupo de cinasas que fosforilan a otras proteínas en residuos de serina y treonina, y que participan como efectores en una gran cantidad de vías de transducción de señales de GPCRs y de receptores de factores de crecimiento (RTKs), entre otros.

Tradicionalmente la familia de la PKC ha sido vista como un grupo de enzimas sensibles a lípidos, activadas por la acción de la fosfolipasa C, la cual hidroliza al fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) para generar DAG (que permanece en la membrana), e inositol trifosfato (IP₃) que activa canales en el retículo endoplasmático, permitiendo la liberación de Ca²⁺ del retículo. Una de las características de las PKCs es que pueden ser activadas farmacológicamente por ésteres de forbol como el 12-miristato 13-acetato (PMA), que ancla a la PKC en su conformación activa a la membrana plasmática, junto con un grupo de proteínas llamadas "RACKS" (del inglés receptors for activated C kinase) (Mochly-Rosen et al., 1991).

Las isoformas de PKC pertenecen a la familia de proteínas cinasas AGC (PKA, PKG; PKC) que comparten características estructurales básicas en el sitio de catálisis, en el sitio de unión a sustrato y a ATP, y en el dominio de regulación que mantiene a estas enzimas en su conformación inactiva.

La estructura general de las PKCs es la siguiente: tienen en el extremo amino, un dominio autoregulatorio conocido como pseudosustrato (PS, fig. 4), el dominio regulador de PKC tiene dos subdominios en tándem llamados C1A y C1B, que funcionan como motivos de unión a DAG/PMA y un dominio C2 que une Ca²⁺. El dominio catalítico hacia el carboxilo terminal, posee un subdominio C3 de unión para ATP, y un dominio catalítico conocido como C4.

La familia de la PKC está conformada por 11 isoformas que se han agrupado en 3 subfamilias por sus características estructurales y de activación. Las primeras son las llamadas isoformas clásicas o convencionales (cPKC), compuesta por las isoformas α , β I, β II y γ las cuales son activadas por Ca²⁺ y DAG. El segundo

subgrupo es el de las isoformas nuevas (nPKC): δ , ϵ , η , θ y μ , las cuales son activadas sólo por DAG. Por último, la subfamilia de las PKCs atípicas (aPKC), formado por ζ y λ / ι , que poseen un dominio C1 truncado, por lo que son insensibles tanto a Ca^{2+} como a DAG (Sossin, 2007; Steinberg, 2008) (figura 4).

Todas las isoformas requieren de fosforilación en el dominio C4 por la proteína cinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK) para su actividad y maduración. Para las cPKCs y nPKCs la fosforilación ocurre inmediatamente después de la traducción y es la que permite el buen plegamiento de la enzima. Adicionalmente las isoformas cPKCs y nPKCs poseen otros dos sitios de autofosforilación en el dominio C4 que estabilizan e incrementan la actividad específica de las enzimas (figura 4).

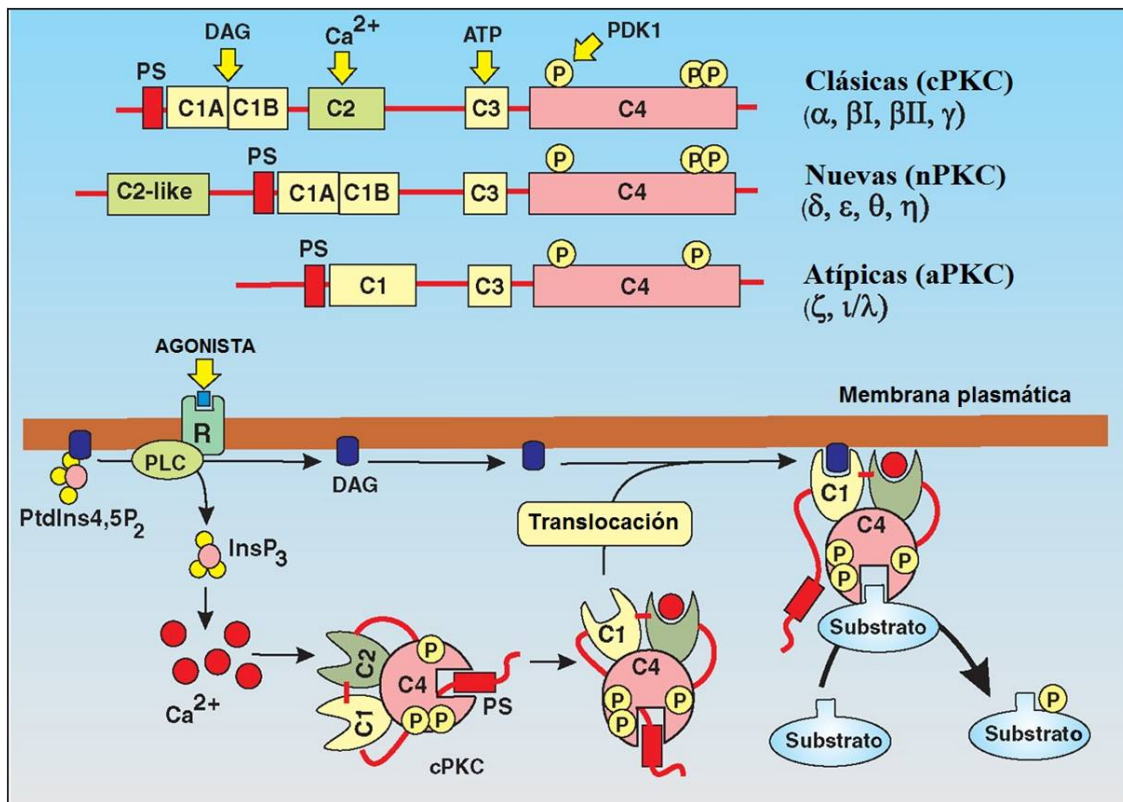


Figura 4. Esquema de la estructura de la familia de las PKCs y su forma de activación. La clasificación de las PKCs se basa en su estructura y forma de activación (ver texto). Pseudosubstrato (PS), diacilglicerol (DAG), calcio (Ca^{2+}), adenosina trifosfato (ATP), cinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK), grupo fosfato (P), receptor (R), fosfolipasa C (PLC). Modificado de Berridge, 2012.

Gran parte de la dificultad del estudio de la especificidad de las isoformas de PKCs es la diversidad de estas presentes en la célula, por ejemplo la línea celular C9 de hígado de rata presenta las isoformas; α , β I, β II, γ , δ , θ , ε , y ζ (Robles-Flores et al., 2002).

I.6. Regulación del receptor LPA₁

En nuestro laboratorio se logró demostrar que el receptor LPA₁ es fosforilado e internalizado bajo la acción del agonista (LPA) y por la activación directa de la PKC con un éster de forbol (PMA, 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato). Lo anterior se demostró utilizando una construcción del receptor LPA₁ con la proteína verde fluorescente fusionada a su extremo carboxilo, la cual permitió detectar cambios de localización celular de este receptor (Avendaño-Vazquez et al., 2005).

Estudios posteriores demostraron la existencia de sitios específicos en el extremo carboxilo del receptor LPA₁ que son claves para la unión de las cinasas que fosforilan y desensibilizan al receptor, así como un grupo de serinas (³⁴¹SDRSASS³⁴⁷) que se requiere para la asociación de β -arrestinas, y un motivo dileucina (³⁵²IL³⁵³) que es requerido para la internalización inducida por éster de forbol (Urs et al., 2008). También se ha visto que la delección de los últimos 3 aminoácidos (³⁶¹SVV³⁶³) del extremo carboxilo, considerado como un dominio de unión a proteínas con dominios PDZ, hace que el receptor no se desensibilice y permanezca constitutivamente activo, incrementando significativamente la capacidad proliferativa de células B103 (línea celular de neuroblastoma) transfectadas con estos receptores mutados (Shano et al., 2008).

Haciendo un análisis *in silico* utilizando el programa de cómputo llamado GPS 2.1 que predice sitios de fosforilación de distintas cinasas en proteínas (Xue et al., 2008). El programa se basa en la similitud de la secuencia de aminoácido de la proteína que se trate de analizar, con los sitios consenso reconocidos por diferentes familias de cinasas.

En el análisis encontramos diversos sitios probables de ser fosforilados por la familia de las PKCs; un sitio en la segunda asa intracelular del receptor LPA₁ murino (S160), seis en la tercera asa intracelular (T236, S240, S243, S244, T252 y S255), mientras que en el extremo carboxilo terminal se presentan 4 sitios para la familia de GRK (T338, S347, S358 y S362), así como sitios probables para ambas familias de cinasas en el extremo carboxilo (T321, S341 y S346). Esta información nos sugiere la importancia que pueden tener distintas isoformas de PKC en la regulación del receptor LPA₁ (figura 5).

Datos preliminares de nuestro laboratorio utilizando inhibidores farmacológicos, mostraron que las isoformas PKC α Y PKC β pueden estar implicadas en la desensibilización heteróloga del receptor LPA₁ (Martínez-Ortiz, 2007). Por lo tanto este proyecto de investigación se enfocó en comprobar la participación estas isoformas de PKC en la desensibilización del LPA₁ inducida por PMA, mediante el uso de distintas herramientas moleculares.

II. HIPÓTESIS

Las isoformas convencionales de la PKC, particularmente PKC α y PKC β , son las encargadas de la fosforilación y desensibilización heteróloga del receptor LPA₁ inducida por PMA.

III. OBJETIVOS

Estudiar si la desensibilización del receptor LPA₁ inducida por PMA es mediada por PKC α y PKC β , dos de las isoformas clásicas de la familia de la PKC, en la línea celular C9 de epitelio de hígado de rata.

Para esto se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Determinar si la inhibición de la liberación de Ca²⁺ intracelular inducida por PMA, es revertida por inhibidores farmacológicos selectivos para algunas isoformas de PKC.
- Analizar la fosforilación del receptor LPA₁-eGFP en células tratadas con inhibidores farmacológicos selectivos para distintas isoformas clásicas de PKC.
- Tranfectar células C9 de forma transitoria con mutantes dominantes negativas de las isoformas clásicas PKC α y PKC β II, y observar la fosforilación del receptor LPA₁ y movilización de Ca²⁺ intracelular ante estímulos con PMA.
- Inhibir la síntesis de las isoformas PKC α y PKC β II mediante el uso de shRNA y analizar el efecto que este silenciamiento tiene sobre la fosforilación del receptor LPA₁-eGFP inducida tanto por PMA como por LPA.

- Determinar si existe asociación entre las cPKC y el receptor LPA₁ cuando se estimula a la células con PMA y con LPA.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV. 1. Reactivos

El LPA (oleoil-sn-glicero-3-fosfato), el PMA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato), el medio de cultivo F12 Ham's (Kaighn's modification: F12-K), hispidina, los inhibidores de proteasas, las columnas (maxiprep) para purificar DNA se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El Gö6976 y la rottlerina se obtuvieron de Calbiochem. El suero fetal bovino, la tripsina, el medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) libre de fosfatos, el anticuerpo acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP- de conejo anti-ratón IgG+A+M (H+L)), el Fura-2 AM, la LipofectaminaTM 2000, se obtuvieron de Invitrogen; la geneticina (G418) y el Opti-MEM^R se obtuvieron de Gibco BRL Life Technologies, Inc. La proteína A acoplada a agarosa se obtuvo de Milipore. Los anticuerpos primarios anti- PKC α , β I, β II, γ , δ , y ζ se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology, al igual que los anticuerpos anti GRK2 y GRK3. El anti-suero anti-GFP para inmunoprecipitar el receptor LPA₁-eGFP fue generado en nuestro laboratorio (Avendaño-Vazquez et al., 2005).

IV. 2. Línea celular

Se utilizó la línea celular C9 de epitelio de hígado de rata de la American Type Culture Collection (ATCC). Las células C9 se crecieron en medio F12-K (Kaighn's modification) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 μ g/ml de estreptomycin, 100 U/ml de penicilina y 0.25 μ g/ml de anfotericina, en una incubadora a una temperatura de 37°C y con una atmósfera de 5% de CO₂.

Se utilizó la línea C9 con el receptor LPA₁-eGFP estable previamente generada en el laboratorio (Avendaño-Vazquez et al., 2005).

IV. 3. Vectores de clonación

Las secuencia de nucleótidos que codifica para el receptor LPA₁ se encuentra inserto en el vector pEGFP-N1, que permite fusionar al receptor con la GFP en el extremo carboxilo terminal. Los plásmidos con las secuencias que codifican para las dominantes negativas de PKC α y PKC β II fueron obtenidos de Addgene. La secuencia del shRNA (RNA pequeño interferente de horquilla) para la isoforma PKC α y PKC β II están insertas en el vector pSIREN (secuencia 1: 5'-ACCCAAGAATGAGAGCAA-3' y la secuencia 2: 5'-CCAGGAAGTCATCAGGAAT-3') y fueron donadas por las Dras. Marta Robles-Flores y María Cristina Castañeda Patlán de la Facultad de Medicina de la UNAM.

IV. 4. Transfección de las células C9

Las células C9 se transfectaron con lipofectamina 2000, para lo cual se prepararon diferentes soluciones: Una solución A que contenía: 5 μ l de lipofectamina 2000 + 20 μ l de medio de transfección Opti-MEM, que se dejó incubar por 5 minutos. Una solución B con: 3 μ g del plásmido de interés + Opti-MEM necesario para tener un volumen final de 25 μ l; y finalmente una solución C, que es la mezcla de las soluciones A y B en tubo de 1.5 ml incubada por 30 minutos. Después de ese tiempo se adicionaron 550 μ l de Opti-MEM al tubo con la solución C, para obtener un volumen de 600 μ l.

A células C9 sembradas en cajas de 6 pozos con una confluencia entre el 90-95% se les retiró el medio de cultivo y se lavaron 2 veces con 2 ml de DMEM, para después dejarlas incubando por 4 h con la solución C previamente preparada; después se les retiró la solución C o de transfección y se dejaron un día con medio F12-K complementado con SFB al 10% para su recuperación. Al siguiente día se

cambió el medio por uno que contiene el antibiótico G418 (geneticina, 300 µg/ml) para seleccionarlas por resistencia a este antibiótico, para las células transfectadas con los shRNA se usó un medio con G418 más puromicina para su selección.

Para la transfección transitoria de las dominantes negativas de PKC α y PKC β II, se utilizaron células en cajas petri de 10 cm de diámetro con una confluencia del 90-95 % y se transfectaron con \approx 50 µg de DNA utilizando lipofectamina 2000. Después de 48 horas de la transfección las células se utilizaron para experimentos de medición de Ca^{2+} intracelular y ensayos de fosforilación.

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

Las células de una caja petri con una confluencia de 90-100% se dejaron toda la noche con medio F12-K sin suero para evitar que estuvieran preestimuladas. Al siguiente día se les retiró el medio y se lavaron 2 veces con PBS; después se incubaron 1 h con el fluoróforo Fura 2-AM (2.5 µM) en solución amortiguadora Krebs-Ringer-Hepes con 0.05% (p/v) de albúmina de suero bovino a 37°C. Pasado este tiempo se les retiró la solución amortiguadora y se trataron con tripsina (10 mg/ml) por 1 min para despegarlas de la caja; la acción de la tripsina se detuvo con solución amortiguadora Krebs-Ringer-Hepes con 0.05% (p/v) de albúmina de suero bovino. Las células se pasaron a un tubo cónico de 15 ml y se centrifugaron a 1000 g durante 2 min; luego se retiró el amortiguador y se resuspendió la pastilla de células de nuevo en Krebs-Ringer-Hepes. Esto se repitió dos veces y al final las células se resuspendieron en 3.5 ml de Krebs-Ringer-Hepes con 0.05% (p/v) de BSA.

La movilización de Ca^{2+} intracelular se observó mediante cambios en la fluorescencia de las células (0.5 ml de células resuspendidas + 1.5 ml de Krebs-Ringer-Hepes en una celda), en agitación constante utilizando un espectrofluorómetro AMINCO-Bowman serie 2, usando dos longitudes de onda de

excitación (340 nm y 380 nm), y una longitud de onda de emisión de 510 nm del fluoróforo Fura 2-AM.

La $[Ca^{2+}]_i$ en unidades nM se cuantificó utilizando un programa de cómputo incluido en el espectrofluorómetro, a partir de la relación entre la fluorescencia máxima y mínima de acuerdo a la ecuación $[Ca^{2+}]_i = K_d [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)] [Sf2/Sb2]$, donde la K_d representa la constante de afinidad del fluoróforo por el Ca^{2+} ; R es la lectura de la fluorescencia en unidades arbitrarias, R_{min} representa la fluorescencia mínima obtenida al adicionar el quelante de Ca^{2+} EGTA (5 mM) y R_{max} es la fluorescencia máxima obtenida al lisar las células con Tritón-X-100 al 10% (v/v). $Sf2$ y $Sb2$ son los coeficientes de proporcionalidad del fluoróforo libre ($Sf2$) y el unido al Ca^{2+} ($Sb2$) en la longitud de onda 2.

IV. 6. Ensayo de fosforilación de receptores

Las células C9 que expresaban de manera estable el receptor LPA_1 fusionado a la proteína verde fluorescente (C9 PLA_1 -EGFP), sembradas en cajas petri con una confluencia del 90-95 %, se incubaron con 3 ml de medio DMEM libre de fosfatos adicionado con $[^{32}P]Pi$ (100 $\mu Ci/ml$) (Perkin-Elmer), durante 3 h a 37 °C (marcaje metabólico).

Las células marcadas metabólicamente se estimularon con LPA 1 μM por 15 min o con TPA 1 μM por 15 min; posteriormente se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos-salino (PBS) frío, y se resuspendieron en 1 ml de solución amortiguadora de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM; NaCl 150 mM; Nonidet 1% (v/v); NaF 20 mM; Na_3VO_4 100 μM ; β -glicerofosfato 10 mM; $Na_4P_2O_7$ 10 mM; los fosfoaminoácidos: P-serina 1 mM, P-tirosina 1 mM y P-treonina 1 mM; EDTA 5 mM; leupeptina 20 $\mu g/ml$; aprotinina 20 $\mu g/ml$, fluoruro de fenil-metilsulfonilo (PMSF) 10 $\mu g/ml$ y de inhibidor de tripsina de soya 50 $\mu g/ml$ a pH 7.5 final) durante 1 h sobre hielo. Los extractos se colectaron y centrifugaron a 12,000 g por 15 min a 4°C.

Los sobrenadantes de las muestras se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 ml, que contenían 20 μl del suero contra la GFP y 40 μl de proteína A-sefarosa y se

dejaron en agitación a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente los tubos se centrifugaron a 12,000 g por 15 min y se eliminó el sobrenadante. Las esferas de proteína A-sefarosa se lavaron 3 veces por resuspensión-centrifugación con solución RIPA, a las esferas lavadas se les agregó solución de Laemmli 2X (30 µl) más 30 µl de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% (p/v) y urea 7 M y se sometieron a ebullición durante 5 min. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 12,000 g y los sobrenadantes de las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5 % en condiciones reductoras.

Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF a 120 mA por gel durante 1 h y se expusieron sobre una placa del sistema PhosphorImager de Molecular Dynamics con el software Image J para la cuantificación de la fosforilación.

IV. 7. Análisis estadístico

Para comparar entre varios grupos se hizo un análisis de varianza con una prueba de Bonferroni, utilizando las herramientas estadísticas incluidas en el programa de cómputo GraphPad Prism. Los estudios de coinmunoprecipitación fueron comparados de forma individual (LPA y PMA vs control), empleando la prueba t de Student. En todos los casos se consideró una $P < 0.05$ como valor significativo.

V. RESULTADOS

V. 1. Desensibilización del receptor LPA₁ inducida por PMA

Resultados previos obtenidos en el laboratorio utilizando la línea celular C9 de epitelio de hígado de rata, transfectadas con la construcción del receptor LPA₁ fusionado con la GFP en el extremo carboxilo terminal (C9 LPA₁-eGFP), demostraron que la sobreexpresión del receptor incrementaba a más del doble la movilización de Ca²⁺ intracelular inducida por LPA 1 μM comparado con las células sin transfectar (C9 WT), y que esta movilización de Ca²⁺ por LPA era abatida por la incubación previa de las células durante 5 minutos con 1 μM de éster de forbol (Avendaño-Vazquez et al., 2005). En el presente trabajo decidimos repetir esos experimentos, lo que nos sirvió para corroborar los resultados previos y además para estandarizar las técnicas de medición de Ca²⁺ intracelular y fosforilación. En la figura 6A se muestran los trazos representativos de la movilización de Ca²⁺ en las dos líneas celulares y el efecto que tiene el PMA sobre éstas; mientras que en la figura 6B se muestran en una gráfica de barras los mismos efectos, sobresaliendo que la sobreexpresión del receptor LPA₁ aumenta significativamente la movilización de Ca²⁺ intracelular inducida por LPA, y que ésta se abate casi en su totalidad por acción del PMA, lo que indica que el receptor se desensibiliza por acción de la PKC.

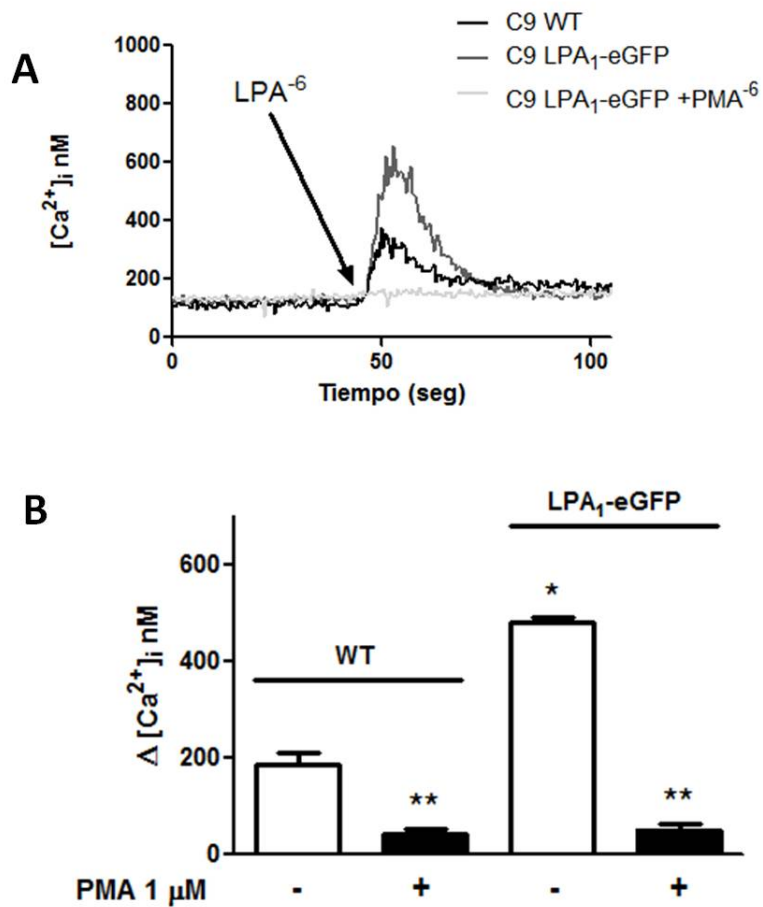


Figura 6. Desensibilización del receptor LPA₁-eGFP inducida por PMA. A) Trazos representativos de la movilización de Ca²⁺ intracelular en células C9 WT y células C9 LPA₁-eGFP. Las células C9 LPA₁-eGFP se incubaron por 5 minutos con PMA 1 μM y después se estimularon con LPA 1 μM mostrando que el LPA induce la desensibilización del LPA₁. B) Gráfica de barras que muestra claramente el incremento en la liberación de [Ca²⁺]_i en las células C9 LPA₁-eGFP con respecto a las C9 WT y la disminución en la liberación de Ca²⁺ por acción de PMA 1 μM en ambas líneas. Determinación de 4 experimentos individuales. * P<0.001 vs WT sin PMA. ** P<0.001 vs ausencia de PMA.

V. 2. Ensayos de regulación negativa de la PKC inducida por PMA

Para estudiar el papel de la PKC en la fosforilación y desensibilización de receptor LPA₁, se realizó un experimento de regulación negativa de la PKC. El experimento consistió en incubar durante toda la noche (o-n, aproximadamente 17 h) con PMA 1 μM a las células C9 transfectadas con el LPA₁-eGFP, lo que produce una disminución en la cantidad de proteína de las distintas isoformas de la PKC disponibles en la célula. Las isoformas afectadas por el tratamiento o-n de PMA son principalmente las clásicas: PKC α, PKC βI, PKC βII y PKC γ; sin embargo también se observó la disminución en la cantidad de PKC δ, una isoforma nueva (las otras nPKC no se estudiaron). La isoforma atípica PKC ζ, no es afectada en su expresión por PMA o-n. Lo mismo pasa con otras cinasas como las GRKs, lo que indica que el tratamiento con PMA o-n es específico para las PKCs que pueden ser activadas por éster de forbol (cPKCs y nPKCs) como se observa en la figura 7A.

Las células C9 transfectadas con el LPA₁-eGFP y tratadas toda la noche con PMA 1 μM se utilizaron para medir la movilización de Ca²⁺ intracelular inducida por LPA 1 μM, encontrándose que el receptor no se desensibiliza por la incubación previa con PMA como pasa en las células control (WT, fig. 7B). Es decir, la incubación con PMA o-n impidió la fosforilación del receptor LPA₁-eGFP por la estimulación con PMA al día siguiente; con la estimulación de LPA se observa una clara fosforilación del receptor. Este resultado indica que la fosforilación del LPA₁-eGFP es mediada por las isoformas de PKC que son sensibles al tratamiento con PMA o-n (isoformas cPKC y nPKC). Por otra parte la fosforilación inducida por LPA parece ser independiente de la PKC, pues la regulación negativa de las distintas isoformas de PKC sensibles a PMA no afectó la fosforilación en este caso. Esto sugiere de acuerdo con la literatura que la fosforilación lleva a la desensibilización inducida por ligando u homóloga probablemente está mediada por las GRKs (fig. 7C).

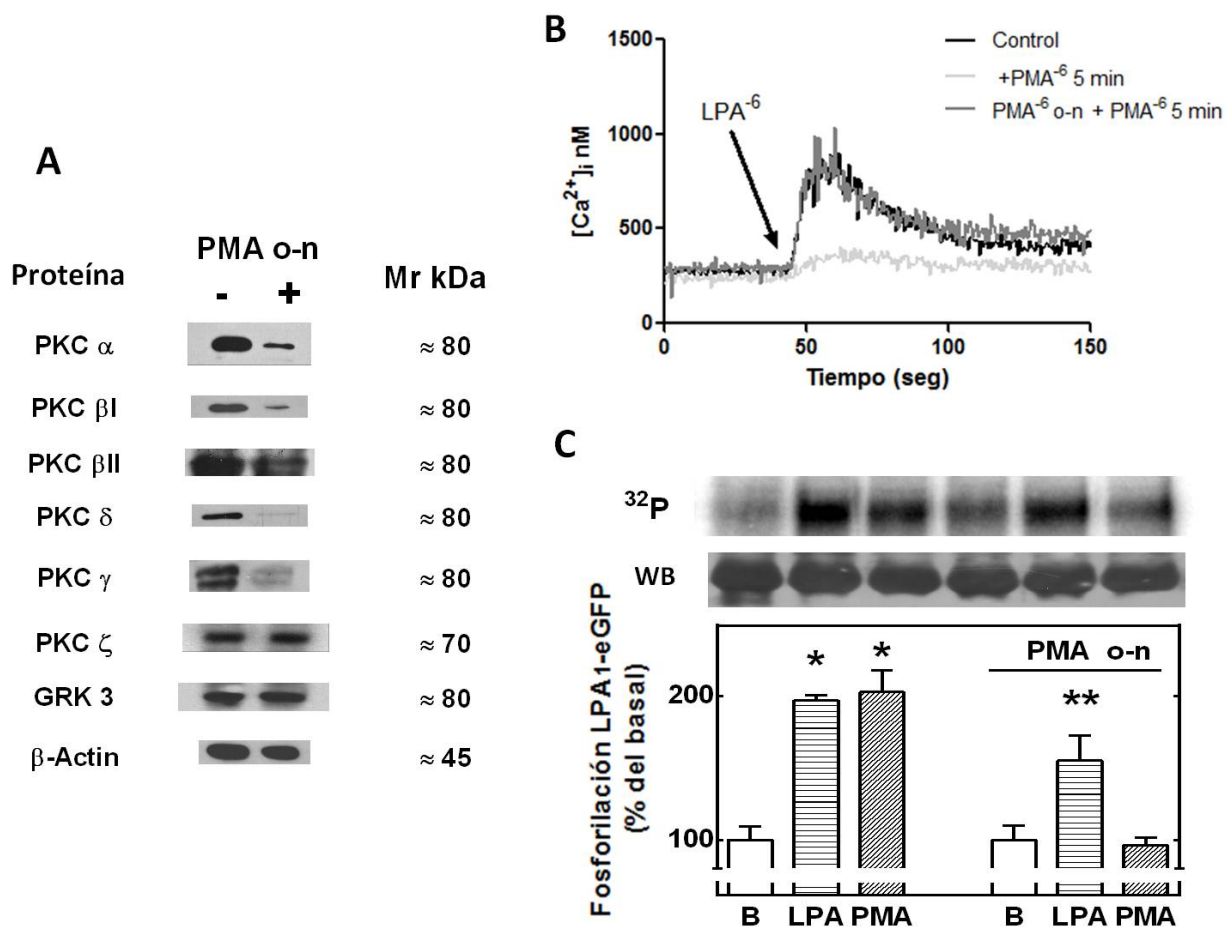


Figura 7. Efecto de la incubación con PMA durante toda la noche (PMA o-n) sobre la desensibilización y fosforilación del receptor LPA₁. A) Disminución de la expresión de las distintas isoformas de PKC por efecto de la incubación de las células C9 LPA₁-eGFP con PMA toda la noche, control (-) y tratadas con PMA 1 μ M (+), n=3. B) Movilización de Ca²⁺ intracelular en respuesta a LPA en células C9 LPA₁-eGFP tratadas o-n con PMA 1 μ M e incubadas con PMA 1 μ M 5 min antes de recibir el estímulo de LPA (línea gris oscuro), células C9 LPA₁-eGFP control (línea negra), células C9 LPA₁-eGFP control preincubadas 5 minutos con PMA 1 μ M (línea gris claro). C) Fosforilación del receptor LPA₁-eGFP por la estimulación con LPA 1 μ M y PMA 1 μ M por 15 min en células incubadas toda la noche en ausencia o presencia de PMA (PMA o-n, derecha), comparadas con el control (izquierda); las barras muestran la cuantificación densitométrica de las fosforilaciones de 4 experimentos independientes, WB control para GFP; *p<0.001 vs basal; **p<0.05 vs basal PMA o-n.

V. 3. Inhibidores farmacológicos selectivos para distintas isoformas de PKC.

Para investigar el papel que juegan las isoformas clásicas de PKC en la desensibilización heteróloga inducida por PMA del receptor LPA₁, se utilizaron inhibidores farmacológicos selectivos: Gö6976 para PKC α y β , hispidina para PKC β y rottlerina para PKC δ (para comprobar el efecto sobre una isoforma nueva) en ensayos de liberación de Ca²⁺ intracelular en células C9 transfectadas de forma estable con el receptor LPA₁-eGFP. El efecto inhibitorio en la movilización de Ca²⁺ intracelular inducido por la incubación durante 5 min con PMA 1 μ M es revertido de forma importante por Gö6976 (con alrededor de un 70 %), mientras que hispidina sólo la revirtió un 40 % y rottlerina no revirtió el efecto del PMA. Bisidolilmaleimida I, un inhibidor general de PKC, revirtió de forma total el efecto del PMA sobre la respuesta de Ca²⁺ inducida por LPA (fig. 8A). Estos resultados sugieren que las isoformas clásicas α y β de PKC estarían mediando la desensibilización del receptor LPA₁ y descarta la participación de PKC δ , una nPKC.

Después se probaron los inhibidores farmacológicos en experimentos de fosforilación del LPA₁-eGFP (fig. 8B), y se observó una inhibición de la fosforilación inducida por PMA en presencia de Bisidolilmaleimida I y Gö6976 (inhibidor de PKC α y β); mientras que el inhibidor de PKC β hispidina y el de PKC δ , rottlerina, no disminuyeron significativamente la fosforilación del LPA₁ inducida por PMA, estos resultados sugieren que la isoforma PKC α es la principal encargada de fosforilar al receptor LPA₁ (que luego de ser fosforilado se desensibiliza).

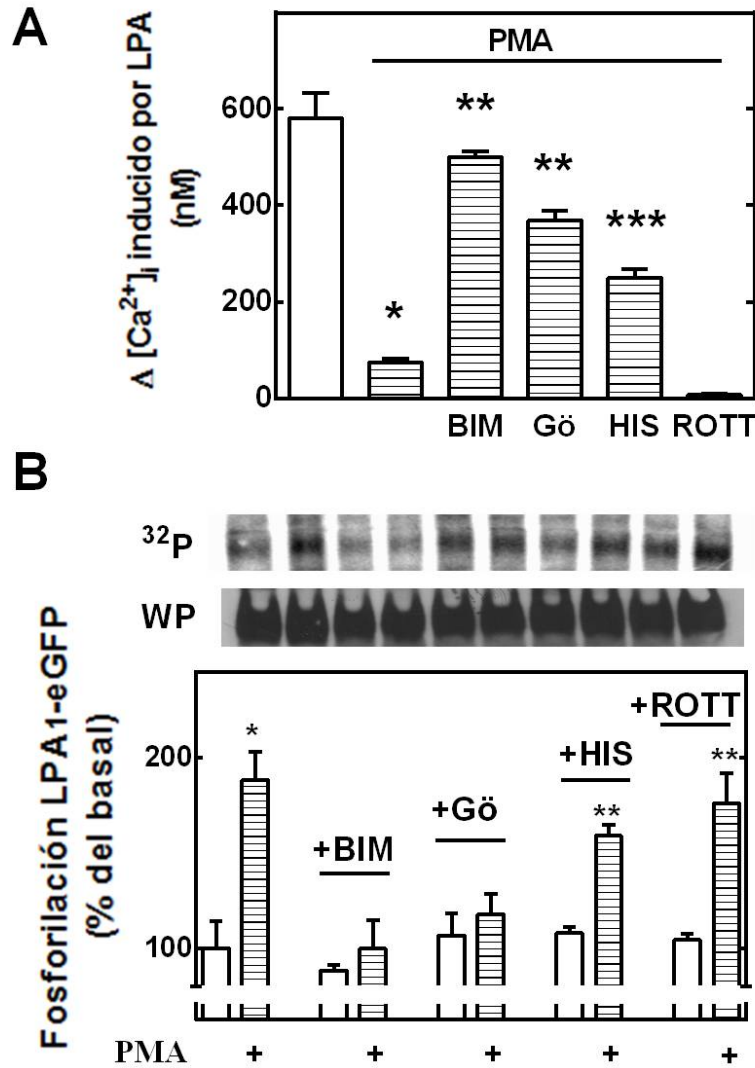


Figura 8. Efecto de los inhibidores farmacológicos de PKC sobre la desensibilización y fosforilación del receptor LPA₁. A) Células C9 LPA₁-eGFP fueron incubadas por 15 min con inhibidores farmacológicos selectivos para distintas isoformas de PKC: Bisindolilmaleimida I 1 μM (BIM, inhibidor general de PKC), Gö6976 1 μM (Gö, selectivo para PKC α), Hispidina (HIS, selectivo para PKC β) y Rottlerina 1 μM (ROTT, selectivo para PKC δ), para después ser incubadas con PMA 1 μM por 5 min y pasado este tiempo ser estimuladas con LPA 1 μM en experimentos de medición de liberación de Ca²⁺ intracelular, n=4, *P<0.005 vs sin PMA; ** P<0.05 vs PMA sin inhibidores; P<0.05 vs sin PMA. B) Se usaron los mismos inhibidores en experimentos de fosforilación incubando por 15 min seguidos del estímulo de PMA 1 μM por 15 min (B); *p<0.001 vs ausencia de PMA; **p<0.05 vs inhibidor solo. WB contra GFP como control, n=4.

V. 4. Uso de dominantes negativas de PKC para determinar el papel de PKC α y PKC β

Nuestra siguiente herramienta para esclarecer qué isoforma de PKC participa en la fosforilación del receptor LPA₁ fue la transfección de manera transitoria con las dominantes negativas (DN) para las isoformas α y β II de la PKC. Lo que hacen estas dominantes negativas es competir con la PKC endógena por su sustrato, en este caso el receptor LPA₁, pero poseen una mutación en el sitio catalítico que les impide fosforilar al receptor.

Como se esperaba, se observó una disminución significativa de la fosforilación en las células transfectadas con la PKC α DN y activadas con PMA 1 μ M. Por otra parte, la disminución en la fosforilación que se observa en las células transfectadas con la PKC β II DN también fue significativa, lo que nos habla de que son las dos isoformas, PKC α y PKC β II las que participan en la fosforilación del receptor LPA₁ (fig. 9A). Las DNs también inhiben la fosforilación inducida por LPA lo que podría interpretarse como una participación de ambas isoformas en la desensibilización homóloga, diferente a lo encontrado con los inhibidores farmacológicos.

A pesar de la disminución en la fosforilación del receptor LPA₁ por las DNs, el receptor se sigue desensibilizando completamente por la incubación durante 5 min con PMA, como lo muestra la figura 9B. La preincubación con bisindolylmaleimida I o Gö 6976 revirtió el efecto sobre la desensibilización inducida por la activación de las PKCs por PMA en la liberación de Ca²⁺, lo que sugiere que las DNs no son suficientemente efectivas para contrarrestar el papel que tienen las PKCs endógenas que siguen actuando y desensibilizando al receptor a pesar de que hay una reducción en la fosforilación.

Para verificar la expresión de las dominantes negativas en las células transfectadas, se inmunoprecipitaron PKC α y PKC β II con anticuerpos selectivos para cada isoforma y se corrieron geles desnaturalizantes por réplica en "Wester

blot”, para detectar las DN con un anticuerpo contra el epítipo de hemaglutinina (HA), ya que las DN poseen esta etiqueta (fig. 9C).

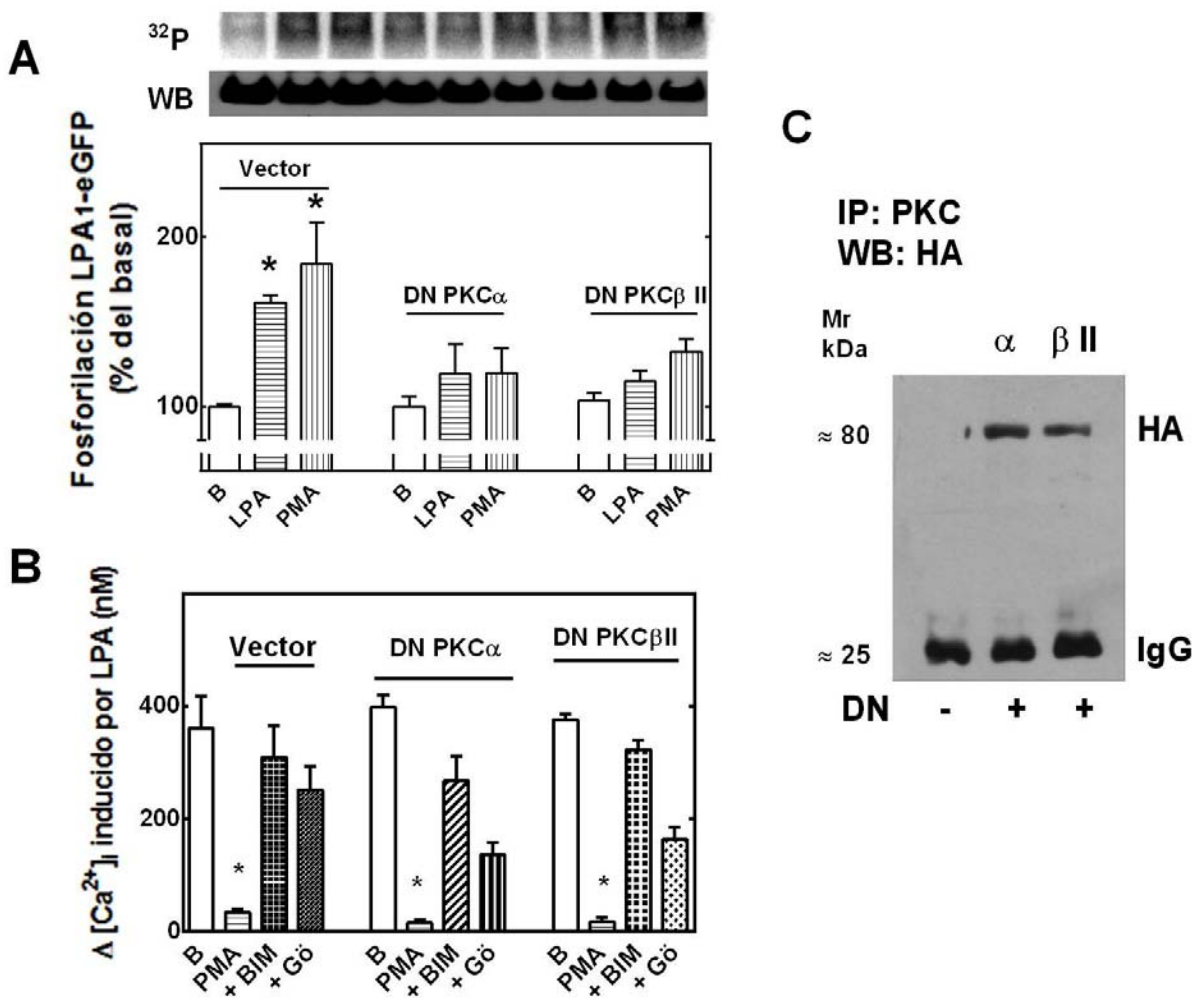


Figura 9. Efecto de la expresión de Dominantes negativos de PKC sobre la fosforilación y desensibilización del receptor LPA₁. A) Células C9 LPA₁-eGFP fueron transfectadas de forma transitoria con las dominantes negativas (DN) de PKC α y PKC β II, y sometidas a ensayos de fosforilación 48 h después de la transfección, estimulando con 1 μ M de LPA y PMA por 15 min, WB control contra GFP, n=5 *p<0.001 vs basal (B). B) También se transfectaron células de la misma forma para ensayos de movilización de Ca²⁺ intracelular incubando por 5 minutos con PMA 1 μ M antes de ser estimuladas con LPA 1 μ M, el tratamiento con 1 μ M los inhibidores bisindolilmaleimada I y Gö6976 15 min antes de poner PMA revirtieron el efecto de PMA; *P<0.001 vs todos los tratamientos del mismo grupo. En C se muestra la inmunoprecipitación de PKC α y PKC β II en las células transfectadas con las dominantes negativas y en el control (células no transfectadas con DNs IP: PKC α) v detectadas por WB contra el epítipo de hemaglutinina (HA).

V. 5. Uso de shRNA contra PKC α y PKC β II.

En los planes del proyecto se contempló la utilización de iRNA dirigido contra las isoformas PKC α y PKC β , y ver de forma más directa la importancia de PKC en la desensibilización del LPA₁. La utilización de siRNAs (RNA pequeños de interferencia) contra las isoformas mencionadas no dieron los resultados esperados (datos no mostrados) pues no mostraban que fueran efectivos para silenciar la expresión de las PKCs, por lo que se pensó en otra estrategia para disminuir la expresión de estas cinasas. Se utilizaron dos secuencias de nucleótidos para generar shRNAs (RNA pequeños interferentes de horquilla) contra PKC α y PKC β II, las células C9 LPA₁-eGFP se transfectaron con cada vector que contenía cada una de secuencia de shRNA; para generar líneas que expresaran de forma estable el receptor LPA₁-eGFP y los shRNA contra PKC α y PKC β II, se hizo una doble selección con G418 y puromicina.

Con estas líneas se hicieron experimentos de fosforilación y medición de la liberación de Ca²⁺ intracelular. El resultado fue similar a lo que se observó con las células transfectadas con las dominantes negativas, pues en las células con los shRNA contra PKC α y PKC β II (shRNA1 y shRNA2), disminuyó la fosforilación del receptor LPA₁ inducida por PMA de manera significativa en comparación con el control (fig. 10A), lo que apoya la idea de que son ambas isoformas las que están mediando la fosforilación del receptor inducida por PMA, y que PKC α y PKC β II estarían de alguna forma participando también en la fosforilación inducida por ligando (desensibilización homóloga).

Por otra parte, los experimentos de medición de la movilización de Ca²⁺ intracelular utilizando los shRNA contra PKC, mostraron que la desensibilización inducida por PMA se mantiene, a pesar de que la fosforilación del receptor disminuye, lo que hace suponer que no es necesario que el receptor se encuentre totalmente fosforilado para que se desensibilice (fig. 10B). El uso de los inhibidores farmacológicos bisindolilmaleimida I y Gö6976 revirtió el efecto del PMA. Ambas secuencias de shRNA lograron disminuir la expresión de PKC α y PKC β II aunque la secuencia 1 produjo una disminución más notable, a pesar de

esta diferencia, ambas secuencias permitieron obtener resultados similares (fig. 10C). Los shRNAs no afectaron la expresión de β -actina utilizada como control (fig. 10D).

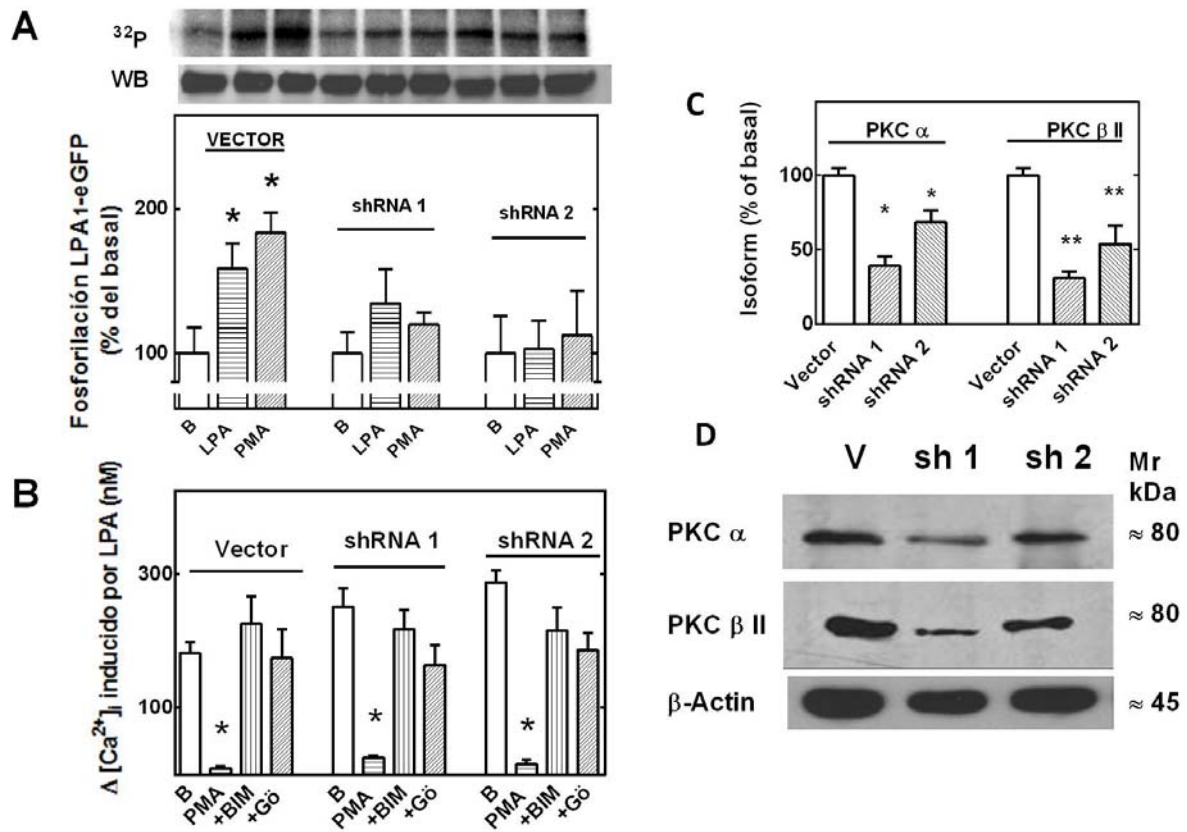


Figura 10. Efecto del silenciamiento de PKC α y PKC β II por shRNA sobre la fosforilación y desensibilización del receptor LPA₁. A) Células C9 LPA₁-eGFP se transfectaron de forma estable con vectores que contienen las secuencias de nucleótidos para shRNA contra las isoformas clásicas de PKC α y β II (shRNA 1 y shRNA 2), n=4. Se probaron las líneas estables en ensayos de fosforilación estimulando por 15 minutos con LPA y PMA 1 μ M, WB vs GFP, n=5, P<0.001 vs. basal (B). B) se muestran ensayos de movilización de Ca²⁺ intracelular usando las líneas estables con los shRNAs incubando con PMA 1 μ M por 5 min antes de recibir el estímulo de LPA 1 μ M; bisindolilmaleimida I (BIM) y Gö6976 (Gö) revierten el efecto inhibitor de PMA, n=3, P<0.001 vs. todos los tratamientos del mismo grupo. C) las barras muestra la disminución de la expresión de las isoformas de PKC α y β II por acción de los shRNA1 y shRNA2 cuantificado respecto al vector vacío, n=3, *P<0.001 vs vector shRNA1, *P<0.001 vs. vector shRNA2. D) se muestra una imagen representativa del WB contra PKC α y PKC β II en lisados totales, β -actina se uso como control de carga.

V. 6. Participación de PKC en la desensibilización homóloga del receptor LPA₁

Los resultados anteriores con el uso de DNs y shRNAs para PKC y mostraron que estas dos isoformas de cPKC participan en la fosforilación inducida por ligando, lo que convencionalmente se le atribuye a las GRKs. Para saber si PKC en general también es necesaria en la desensibilización homóloga se hicieron experimentos de medición de la liberación de Ca²⁺ intracelular en las líneas estables que coexpresan el receptor LPA₁-eGFP y los shRNA. Los resultados muestran que las células responden de forma normal a LPA 1 μM, pero ante un segundo estímulo de LPA 1 μM no hay respuesta o esta es apenas detectable (fig. 11), lo que indica que el receptor se desensibilizó a pesar de que no se fosforila por LPA (fig. 10A).

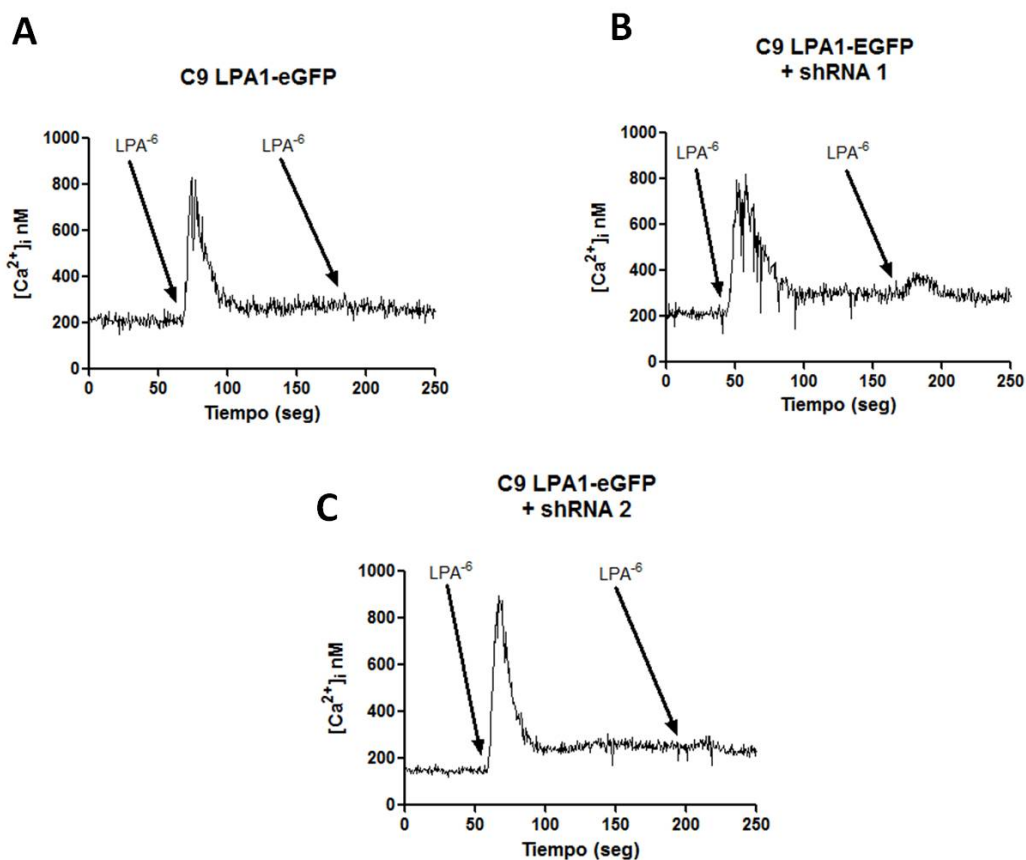


Figura 11. Participación de PKC en la desensibilización homóloga del receptor LPA₁. Trazos representativos de la movilización de calcio intracelular en células C9 LPA₁-eGFP (A), C9 LPA₁-eGFP + shRNA 1 y C9 LPA₁-eGFP + shRNA 2. Todas las líneas celulares se estimularon dos veces con 1 μM de LPA, mostrando una respuesta muy pequeña o nula ante el segundo estímulo.

V. 7. Asociación de PKC α y PKC β II al receptor LPA₁-eGFP

También se observó la asociación de PKC α y β II al receptor LPA₁, esto se hizo con ensayos de co-inmunoprecipitación donde las células C9 LPA₁-eGFP se estimularon durante 15 min con LPA (1 μ M) o PMA (1 μ M), y después se lisaron y se inmunoprecipitó al receptor LPA₁-eGFP. Posteriormente, se detectaron por replica en “Western blot” usando anticuerpos específicos para reconocer a las isoformas de PKC antes mencionadas, encontrándose un incremento significativo en la asociación de PKC α y β II ante ambos estímulos (fig. 12).

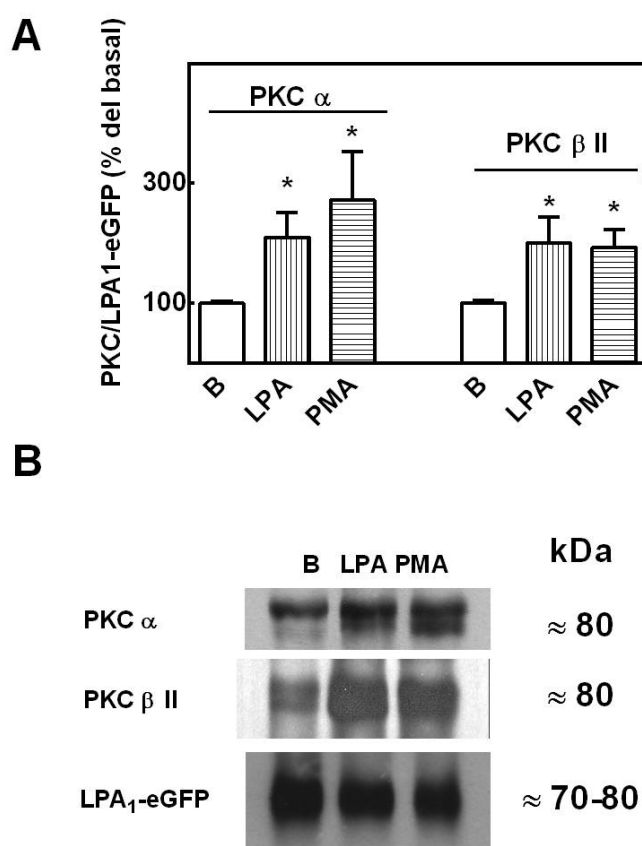


Figura 12. Asociación de las isoformas de cPKC y el receptor LPA₁. A) Cuantificación de la asociación de PKC α y PKC β II cuando las células C9 LPA₁-eGFP son estimuladas con LPA y PMA 1 μ M por 15 min, B: asociación basal de PKC al receptor LPA₁. B) imagen representativa de la asociación de PKC α y β II tras los estímulos de LPA y PMA, IP: LPA₁-eGFP, WB: PKC α , PKC β II y GFP (control de carga); se realizaron 3 experimentos independientes, * P<0.05 vs asociación basal de cada isoforma.

V. 8. Asociación de GRK al receptor LPA₁-eGFP

Tras analizar los resultados obtenidos en la desensibilización mediada por ligando (desensibilización homóloga) del LPA₁ usando las dominantes negativas y los shRNA para PKC α y β II, nos preguntamos si la desensibilización homóloga era independiente de GRKs y dependía directamente de cPKC. Para contestar esta pregunta, se hicieron ensayos de coimmunoprecipitación similares a los que se realizaron para evidenciar la asociación de PKC con el receptor, estimulando con LPA (1 μ M) o PMA (1 μ M) por 15 minutos. Encontramos que GRK2 como GRK3 se asocian al receptor con ambos estímulos, lo que nos habla de una posible cooperación entre estas dos familias de cinasas (PKCs y GRKs) en la regulación homóloga como heteróloga del receptor LPA₁ (fig.13).

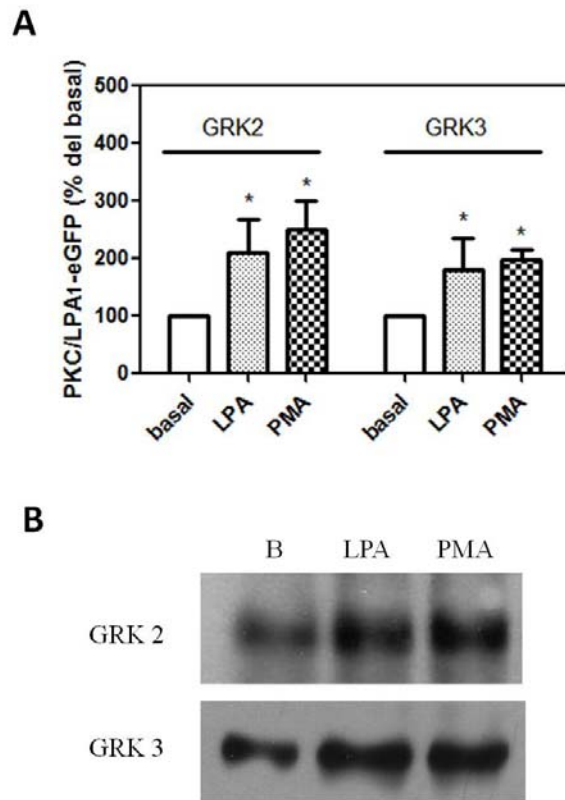


Figura 13. Asociación de GRK al receptor LPA₁. A) cuantificación de la asociación de GRK2 y GRK3 al receptor LPA₁ cuando las células C9 LPA₁-eGFP son estimuladas con LPA y PMA 1 μ M por 15 min. B) imagen representativa de la asociación de GRK2 y GRK3 al receptor LPA₁ tras los estímulos de LPA y PMA, IP: LPA₁-eGFP, WB: GRK2 y GRK3; se realizaron 3 experimentos independientes, * P<0.05 vs asociación basal de cada isoforma.

VI. DISCUSIÓN

A primera vista, la regulación del receptor LPA₁ parece ser dependiente de la fosforilación. Trabajos previos demostraron que puede ser regulado de forma homóloga y heteróloga y que, en ambos casos, la fosforilación en este receptor jugaba un papel importante para su desensibilización (Avendaño-Vazquez et al., 2005). La familia de PKC es una familia de cinasas efectora muy importante en una gran cantidad de vías de señalización, y su activación puede llevar a la regulación heteróloga de algunos receptores, entre ellos el receptor LPA₁, para mantener un funcionamiento celular adecuado.

La importancia del conocimiento de los mecanismos de regulación para cada receptor se hace necesaria debido a la gran cantidad de isoformas de PKC que se presentan en la célula y por lo cual se ha sugerido, por sus semejanzas, que podrían tener papeles redundantes en su actividad dentro de la célula.

En este trabajo demostramos que el tratamiento por tiempos prolongados con PMA regula negativamente la cantidad de proteína de las distintas isoformas de PKC sensibles a este compuesto, y por consiguiente, su actividad se ve reducida. El tratamiento con PMA o-n no alteró el estado de activación del receptor LPA₁ por su ligando, cuando las células son tratadas al día siguiente nuevamente con PMA, como se demuestra en la figura 7. Lo que posiblemente se debió a la poca cantidad de las PKCs disponibles en la célula después del tratamiento con PMA o-n. Lo que indica que la cantidad de PKCs es insuficiente para fosforilar y desensibilizar al receptor. Por otro lado, el tratamiento con PMA o-n no alteró la fosforilación del LPA₁ inducida por su ligando, dado que esa fosforilación se le atribuye a la acción de las GRKs.

El uso de inhibidores farmacológicos selectivos para las distintas isoformas de PKC fue un paso inicial para tratar de dilucidar qué isoformas están implicadas en la regulación del receptor LPA₁. Los resultados sugieren que las isoformas clásicas PKC α y PKC β son las encargadas de desensibilizar de forma heteróloga al receptor puesto que Gö6976 (selectivo para PKC α y β) e Hispidina (selectivo

para PKC β) impidieron que el receptor se fosforilara por el tratamiento con PMA 1 μ M, y además revirtieron de forma significativa el efecto del éster de forbol sobre la liberación de Ca^{2+} intracelular producida por LPA (fig. 8). El uso de este tipo de herramientas farmacológicas puede ser limitado debido a que muchas veces los inhibidores pueden afectar a más de una isoforma de la misma subfamilia de PKC, por lo que los resultados podrían ser poco específicos para cinasas de la misma subfamilia, pero es una herramienta válida para discriminar entre subfamilias. Por tal motivo, se decidió usar otro tipo de estrategias para tratar de discernir más puntualmente que isoformas actúan sobre el receptor LPA₁.

Por eso se usaron dominantes negativas de las isoformas PKC α y PKC β II. Los datos con estas mutantes mostraron que ambas isoformas están implicadas en la fosforilación de receptor LPA₁, apoyando los resultados obtenidos con los inhibidores farmacológicos, pero la disminución en la fosforilación de las células transfectadas con las DNs no revirtió la desensibilización inducida por PMA en la movilización de Ca^{2+} intracelular. Es decir, aunque el receptor ya no se fosforila se sigue desensibilizando, lo que pone en duda nuestra hipótesis inicial de que PKC desensibilizaría al receptor LPA₁ por la fosforilación. Hay que tomar en cuenta que con las DNs la enzima está inactiva pero presente; podría ser que el hecho de que la PKC se active y cambie de conformación permita que se una a su sustrato, en este caso el LPA₁, y que la simple unión de PKC al LPA₁ impida que el receptor encienda su vía de señalización.

Otra estrategia que se siguió fue el abatimiento de la expresión de las isoformas de PKC α y PKC β II mediante el uso de shRNA selectivos. Los datos obtenidos con la disminución de las cPKC antes mencionadas concordaron con nuestros resultados anteriores obtenidos con los inhibidores farmacológicos y las dominantes negativas. Así, se reforzó la idea de que las isoformas α y β II, son las que están implicadas en la fosforilación del receptor, pero nuevamente como se demostró con el uso de las DNs, parece que el receptor no necesita estar fosforilado para ser desensibilizado por la vía dependiente de PMA, como lo muestran los experimentos de movilización de Ca^{2+} intracelular. Esto no

concuenda con el modelo clásico de desensibilización heteróloga. Algo que hay que hacer notar es que la reducción en la expresión de las PKCs α y β II mediante el uso de shRNAs, no es total, pero si es suficiente para ver una disminución en el efecto que tienen sobre la fosforilación del receptor LPA₁.

Algo muy interesante es el hecho de que la fosforilación inducida por LPA (desensibilización homóloga) al parece también involucra a las PKC α y β , y no solo a las GRKs, como lo propone el modelo clásico de regulación de GPCRs por sus agonistas.

La coimmunoprecipitación de las dos isoformas de PKC con el receptor LPA₁ indica que PKC se asocia al receptor cuando se estimula a las células con PMA y también cuando se estimula con su agonista. Del mismo modo, GRK2 y GRK3 también se asocian al receptor ante los dos estímulos.

La desensibilización heteróloga del receptor se presenta de todos modos aun y cuando éste ya no se fosforile, como se observa en los trazos con los shRNA en los experimentos de movilización de Ca²⁺ ante dos estímulos de LPA (fig. 11).

Se ha sugerido que para algunos receptores acoplados a proteínas G, la regulación o desensibilización puede darse de manera independiente de fosforilación, y estar mediada por una maquinaria molecular que impediría el acoplamiento del heterotrímero que forman a la proteína G (subunidades α , β y γ), por lo cual el receptor sería incapaz de transducir su señal (Pao y Benovic 2002). Los datos mostrados en este trabajo hacen difícil establecer una relación directa entre la fosforilación y la desensibilización del receptor LPA₁, pues las herramientas usadas no descartan la participación aunque mínima de las PKCs clásicas en la desensibilización.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos han permitido conocer que las isoformas clásicas PKC α y PKC β II se encargan de fosforilar al receptor LPA₁ cuando las células son tratadas con PMA, pero también participan en la fosforilación del receptor inducida por su ligando, aunque como lo vimos con los ensayos de coimmunoprecipitación, en ambos procesos parecería estar

participando también GRK. La PKC probablemente forma parte de esta maquinaria (con o sin actividad), figura 14.

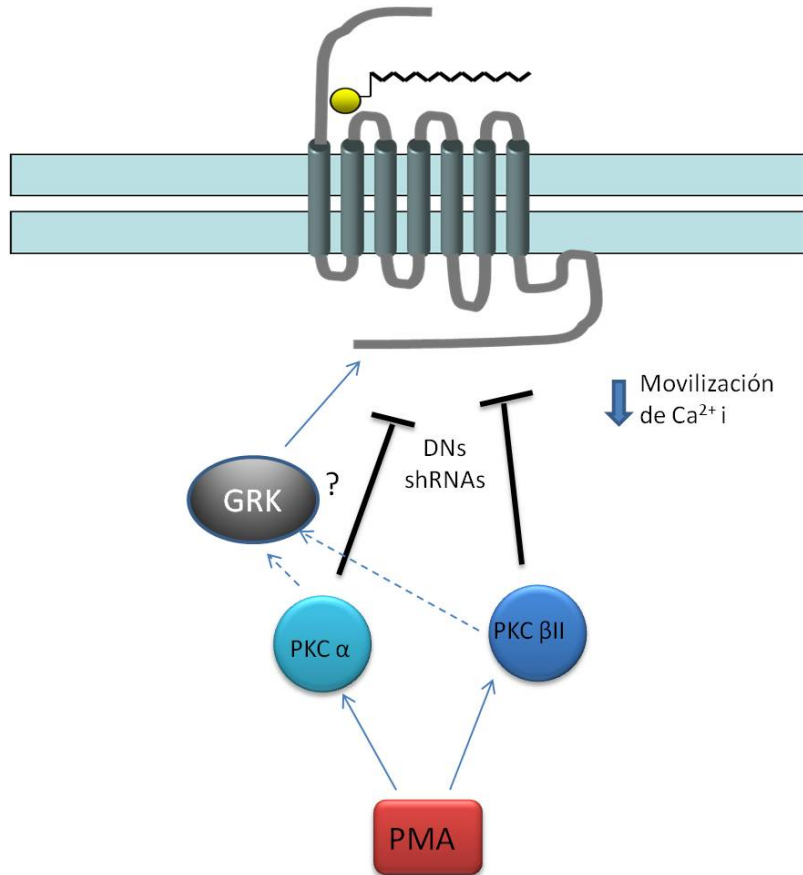


Figura 14. Modelo propuesto para la fosforilación del receptor LPA₁. Las isoformas PKC α y PKC β II participan en la fosforilación del receptor LPA₁, pero la desensibilización del receptor parece ser independiente de la fosforilación del receptor. GRK también podría estar participando en la regulación inducida por LPA y PMA, aunque se desconoce el mecanismo.

El uso de programas para predecir posibles sitios de fosforilación como GPS 2.1, podría ayudar un poco a interpretar esta relación de activación entre familias de cinasas. En el esquema de la figura 5 se muestra claramente la distribución diferencial entre sitios que pueden ser fosforilados por PKC, que se encuentran en la segunda y tercera asas intracelulares y los sitios para GKR que se encuentran en la cola carboxilo terminal. Podemos pensar entonces en una fosforilación del receptor LPA₁ por ambas familias de cinasas, unas que fosforilarían a las asas y otras al carboxilo.

Cabe mencionar que recientemente han aparecido trabajos que proponen la fosforilación diferencial de un mismo receptor dependiendo del estímulo (distintos agonistas), y de las cinasas que se activen ante ese estímulo; al patrón de fosforilación que se presenta en el receptor en respuesta a un agonista determinado, se le ha llamado “código de barras” de fosforilación de los GPCR (Nobles et al., 2011). Imaginemos que tanto LPA y PMA activen de forma diferente a las cPKCs y a las GRKs, pero que al final de cuentas estas dos familias de cinasas de alguna forma se coordinan y llegan al receptor para fosforilarlo, posiblemente de una manera por PMA y de otra por LPA. Esta fosforilación inducida por PMA y LPA y llevada a cabo por las isoformas cPKC, parece no tener relación directa con la desensibilización del receptor LPA₁ en ambos casos (homóloga y heteróloga), y por lo tanto desconocemos qué función pueda tener la fosforilación del receptor LPA₁.

Desde hace algunos años se ha visto que las GRKs pueden también regular la función de los GPCRs de una forma independiente de su actividad de cinasa, es decir una desensibilización independiente de fosforilación (Pao y Benovic, 2002; Dhami et al., 2005); esto gracias a su habilidad para interaccionar con un gran número de proteínas involucradas en la señalización y el tráfico vesicular.

Actualmente el papel que juega la fosforilación en los GPCRs no sólo se acota a una señal para la formación de un complejo endocítico que lleva al secuestro del receptor para que no siga señalizando, sino que se ha visto que los GPCRs pueden continuar señalizando aún dentro de la célula en las vesículas (Irannejad

et al., 2013). Quizá la fosforilación o patrones de fosforilación en los receptores lleven a la formación de complejos de señalización intracelulares, que podrían ser regulados de forma diferente a los modelos convencionales.

VII. CONCLUSIONES

El receptor LPA₁ es fosforilado por las cinasas de la subfamilia de PKC clásicas PKC α y PKC β II, tanto cuando las células son desensibilizadas de forma homóloga por ligando como de forma heteróloga por PMA.

La fosforilación del receptor no es indispensable para su desensibilización, lo que deja la posibilidad de que el receptor LPA₁ sea regulado de una forma independiente de fosforilación, pues a pesar de que el receptor no se fosforila se sigue desensibilizando.

Nuestros resultados también abren la posibilidad de que la regulación del receptor LPA₁ ocurra mediante una dinámica compleja de cinasas de distintas familias.

El presente trabajo representa un avance importante en el conocimiento de la regulación de este receptor para LPA y claramente ilustra que los modelos actuales de desensibilización de GPCRs están incompletos y que su regulación es más compleja.

VIII. REFERENCIAS.

An, S., T. Bleu, O. G. Hallmark and E. J. Goetzl (1998). "Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid." *Journal of Biological Chemistry* **273**(14): 7906-7910.

An, S., T. Bleu, Y. Zheng and E. J. Goetzl (1998). "Recombinant human G protein-coupled lysophosphatidic acid receptors mediate intracellular calcium mobilization." *Molecular pharmacology* **54**(5): 881-888.

Anliker, B. and J. Chun (2004). "Lysophospholipid G protein-coupled receptors." *Journal of Biological Chemistry* **279**(20): 20555-20558.

Aoki, J. (2004). Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Seminars in cell & developmental biology*, Elsevier.

Aoki, J., A. Inoue and S. Okudaira (2008). "Two pathways for lysophosphatidic acid production." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1781**(9): 513-518.

AVENDANO-VAZQUEZ, S., A. García-Caballero and J. GARCIA-SAINZ (2005). "Phosphorylation and desensitization of the lysophosphatidic acid receptor LPA1." *Biochem. J* **385**: 677-684.

Avendaño-Vázquez, S. E., A. Cabrera-Wrooman, C. C. Colín-Santana and J. A. García-Sáinz (2007). "Lysophosphatidic acid LPA1 receptor close-up." *Signal Transduction* **7**(5-6): 351-363.

Bandoh, K., J. Aoki, H. Hosono, S. Kobayashi, T. Kobayashi, K. Murakami-Murofushi, M. Tsujimoto, H. Arai and K. Inoue (1999). Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid, *ASBMB*. **274**: 27776-27785.

Benovic, J., L. Pike, R. Cerione, C. Staniszewski, T. Yoshimasa, J. Codina, M. Caron and R. Lefkowitz (1985). "Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein." *Journal of Biological Chemistry* **260**(11): 7094-7101.

Bensinger, S. J. and P. Tontonoz (2008). "Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors." *Nature* **454**(7203): 470-477.

Berridge, M. J. (2012). "Cell Signalling Biology". Biochemical Journal. pag. 2.56.
Butcher, A. J., R. Prihandoko, K. C. Kong, P. McWilliams, J. M. Edwards, A. Bottrill, S. Mistry and A. B. Tobin (2011). "Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code." Journal of Biological Chemistry **286**(13): 11506-11518.

Contos, J. J., N. Fukushima, J. A. Weiner, D. Kaushal and J. Chun (2000). "Requirement for the lpa1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(24): 13384-13389.

Contos, J. J., I. Ishii and J. Chun (2000). "Lysophosphatidic acid receptors." Molecular pharmacology **58**(6): 1188-1196.

Contos, J. J., I. Ishii, N. Fukushima, M. A. Kingsbury, X. Ye, S. Kawamura, J. H. Brown and J. Chun (2002). "Characterization of lpa2 (Edg4) and lpa1/lpa2 (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to lpa2." Molecular and cellular biology **22**(19): 6921-6929.

Chun, J., E. J. Goetzl, T. Hla, Y. Igarashi, K. R. Lynch, W. Moolenaar, S. Pyne and G. Tigyi (2002). "International union of pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature." Pharmacological reviews **54**(2): 265-269.

Dhami, G. K., A. V. Babwah, R. Sterne-Marr and S. S. Ferguson (2005). "Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor 1 signaling requires g protein-coupled receptor kinase 2 binding to the second intracellular loop." Journal of Biological Chemistry **280**(26): 24420-24427.

Fulkerson, Z., Wu, T., Sunkara, M., Vander Kooi, C., Morris, A. J., & Smyth, S. S. (2011). "Binding of autotaxin to integrins localizes lysophosphatidic acid production to platelets and mammalian cells". Journal of Biological Chemistry, **286**(40), 34654-34663.

Fukushima, N. and J. Chun (2001). "The LPA receptors." Prostaglandins & other lipid mediators **64**(1): 21-32.

Gardell, S. E., A. E. Dubin and J. Chun (2006). "Emerging medicinal roles for lysophospholipid signaling." Trends in molecular medicine **12**(2): 65-75.

Hama, K., J. Aoki, A. Inoue, T. Endo, T. Amano, R. Motoki, M. Kanai, X. Ye, J. Chun and N. Matsuki (2007). "Embryo spacing and implantation timing are differentially regulated by LPA3-mediated lysophosphatidic acid signaling in mice." Biology of reproduction **77**(6): 954-959.

Hama, K., K. Bandoh, Y. Kakehi, J. Aoki and H. Arai (2002). "Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids: possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors." FEBS letters **523**(1): 187-192.

Hecht, J. H., J. A. Weiner, S. R. Post and J. Chun (1996). "Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex." *The Journal of cell biology* **135**(4): 1071-1083.

Irannejad, R., J. C. Tomshine, J. R. Tomshine, M. Chevalier, J. P. Mahoney, J. Steyaert, S. G. Rasmussen, R. K. Sunahara, H. El-Samad and B. Huang (2013). "Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes." *Nature* **495**(7442): 534-538.

Kelly, E., C. P. Bailey and G. Henderson (2008). "Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization." *British journal of pharmacology* **153**(S1): S379-S388.

Kotarsky, K., Å. Boketoft, J. Bristulf, N. E. Nilsson, Å. Norberg, S. Hansson, C. Owman, R. Sillard, L. F. Leeb-Lundberg and B. Olde (2006). "Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **318**(2): 619-628.

Lee, Z., C.-T. Cheng, H. Zhang, M. A. Subler, J. Wu, A. Mukherjee, J. J. Windle, C.-K. Chen and X. Fang (2008). Role of LPA4/p2y9/GPR23 in negative regulation of cell motility, *Am Soc Cell Biol.* **19**: 5435-5445.

Lin, F.-T. and Y.-J. Lai (2008). "Regulation of the LPA2 receptor signaling through the carboxyl-terminal tail-mediated protein-protein interactions." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1781**(9): 558-562.

Lin, M.-E., R. R. Rivera and J. Chun (2012). "Targeted deletion of LPA5 identifies novel roles for lysophosphatidic acid signaling in development of neuropathic pain." *Journal of Biological Chemistry* **287**(21): 17608-17617.

Luttrell, L. M. and R. J. Lefkowitz (2002). "The role of β -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals." *Journal of cell science* **115**(3): 455-465.

Martinez-Ortiz J. (2007). "Participación de PKC α y PKC β I en la desensibilización funcional del receptor LPA $_1$ en células C9". Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México.

Mochly-Rosen, D., H. Khaner and J. Lopez (1991). "Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**(9): 3997-4000.

Mills G. and Moolenaar, W. H. (2003). "The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer". *Nature Reviews Cancer*. **3**, 582-591

Moolenaar, W. H. (1994). "LPA: a novel lipid mediator with diverse biological actions." *Trends in cell biology* **4**(6): 213-219.

Nobles, K. N., K. Xiao, S. Ahn, A. K. Shukla, C. M. Lam, S. Rajagopal, R. T. Strachan, T.-Y. Huang, E. A. Bressler and M. R. Hara (2011). "Distinct phosphorylation sites on the β 2-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin." *Science signaling* **4**(185): ra51.

Noguchi, K., S. Ishii and T. Shimizu (2003). "Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family." *Journal of Biological Chemistry* **278**(28): 25600-25606.

Pao, C. S. and J. L. Benovic (2002). "Phosphorylation-independent desensitization of G protein-coupled receptors?" *Science Signaling* **2002**(153): pe42.

Pasternack, S. M., I. von Kügelgen, K. Al Aboud, Y.-A. Lee, F. Rüschemdorf, K. Voss, A. M. Hillmer, G. J. Molderings, T. Franz and A. Ramirez (2008). "G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth." *Nature genetics* **40**(3): 329-334.

Pyne, S., K.-C. Kong and P. I. Darroch (2004). *Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate biology: the role of lipid phosphate phosphatases. Seminars in cell & developmental biology*, Elsevier.

Robles-Flores, M., E. Rendón-Huerta, H. González-Aguilar, G. Mendoza-Hernández, S. Islas, V. n. Mendoza, M. V. Ponce-Castañeda, L. González-Mariscal and F. López-Casillas (2002). "p32 (gC1qBP) Is a General Protein Kinase C (PKC)-binding Protein INTERACTION AND CELLULAR LOCALIZATION OF P32-PKC COMPLEXES IN RAT HEPATOCYTES." *Journal of Biological Chemistry* **277**(7): 5247-5255.

Shano, S., K. Hatanaka, S. Ninose, R. Moriyama, T. Tsujiuchi and N. Fukushima (2008). "A lysophosphatidic acid receptor lacking the PDZ-binding domain is constitutively active and stimulates cell proliferation." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **1783**(5): 748-759.

Sossin, W. S. (2007). "Isoform specificity of protein kinase Cs in synaptic plasticity." *Learning & memory* **14**(4): 236-246.

Steinberg, S. F. (2008). "Structural basis of protein kinase C isoform function." *Physiological reviews* **88**(4): 1341-1378.

Stevens, R. C., V. Cherezov, V. Katritch, R. Abagyan, P. Kuhn, H. Rosen and K. Wüthrich (2012). "The GPCR Network: a large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function." *Nature Reviews Drug Discovery* **12**(1): 25-34.

Tabata, K.-i., K. Baba, A. Shiraishi, M. Ito and N. Fujita (2007). "The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor." *Biochemical and biophysical research communications* **363**(3): 861-866.

Tigyi, G. and A. L. Parrill (2003). "Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action." *Progress in lipid research* **42**(6): 498-526.

Urs, N. M., A. P. Kowalczyk and H. Radhakrishna (2008). "Different mechanisms regulate lysophosphatidic acid (LPA)-dependent versus phorbol ester-dependent internalization of the LPA1 receptor." *Journal of Biological Chemistry* **283**(9): 5249-5257.

Vázquez-Prado, J., P. Casas-González and J. A. García-Sáinz (2003). "G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions." *Cellular signalling* **15**(6): 549-557.

Xue, Y., J. Ren, X. Gao, C. Jin, L. Wen and X. Yao (2008). "GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy." *Molecular & Cellular Proteomics* **7**(9): 1598-1608.

Yanagida, K., K. Masago, H. Nakanishi, Y. Kihara, F. Hamano, Y. Tajima, R. Taguchi, T. Shimizu and S. Ishii (2009). "Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6." *Journal of Biological Chemistry* **284**(26): 17731-17741.

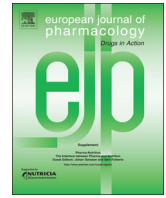
Ye, X., K. Hama, J. J. Contos, B. Anliker, A. Inoue, M. K. Skinner, H. Suzuki, T. Amano, G. Kennedy and H. Arai (2005). "LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing." *Nature* **435**(7038): 104-108.

Yukiura, H., K. Hama, K. Nakanaga, M. Tanaka, Y. Asaoka, S. Okudaira, N. Arima, A. Inoue, T. Hashimoto and H. Arai (2011). "Autotaxin regulates vascular development via multiple lysophosphatidic acid (LPA) receptors in zebrafish." *Journal of Biological Chemistry* **286**(51): 43972-43983.

Yung, Y. C., T. Mutoh, M.-E. Lin, K. Noguchi, R. R. Rivera, J. W. Choi, M. A. Kingsbury and J. Chun (2011). "Lysophosphatidic acid signaling may initiate fetal hydrocephalus." *Science translational medicine* **3**(99): 99ra87-99ra87.

Zamponi G. W. y Currie K. P. M. (2013). "Regulation of CaV2 calcium channels by G protein coupled receptors". *Biochimica et Biophysica Acta* **1828**: 1629–1643

IX. ANEXO



Molecular and cellular pharmacology

Conventional protein kinase C isoforms mediate phorbol ester-induced lysophosphatidic acid LPA₁ receptor phosphorylation

Aurelio Hernández-Méndez, Rocío Alcántara-Hernández, Germán C. Acosta-Cervantes, Javier Martínez-Ortiz, S. Eréndira Avendaño-Vázquez, J. Adolfo García-Sáinz*

Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-248, México D. F-04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 May 2013

Received in revised form

26 November 2013

Accepted 28 November 2013

Available online 16 December 2013

Keywords:

Lysophosphatidic acid

LPA₁

Receptor phosphorylation

Protein kinase C

ABSTRACT

Using C9 cells stably expressing LPA₁ receptors fused to the enhanced green fluorescent protein, it was observed that activation of protein kinase C induced a rapid and strong increase in the phosphorylation state of these receptors. Overnight incubation with phorbol esters markedly decreased the amount of conventional (α , β I, β II and γ) and novel (δ) but not atypical (ζ) immunodetected PKC isoforms, this treatment blocks the action of protein kinase on receptor function and phosphorylation. Bis-indolylmaleimide I a general, non-subtype selective protein kinase C inhibitor, and Gö 6976, selective for the isoforms α and β , were also able to block LPA₁ receptor desensitization and phosphorylation; hispidin, isoform β -selective blocker partially avoided receptor desensitization.

Expression of dominant-negative protein kinase C α or β II mutants and knocking down the expression of these kinase isozymes markedly decreased phorbol ester-induced LPA₁ receptor phosphorylation without avoiding receptor desensitization. This effect was blocked by bis-indolyl-maleimide and Gö 6976, suggesting that these genetic interventions were not completely effective. It was also observed that protein kinase C α and β II isozymes co-immunoprecipitate with LPA₁ receptors and that such an association was further increased by cell treatments with phorbol esters or lysophosphatidic acid. Our data suggest that conventional protein kinase C α and β isozymes modulate LPA₁ receptor phosphorylation state. Receptor desensitization appears to be a more complex process that might involve additional elements.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Lysophosphatidic acid (LPA) is a lipid mediator involved in many cellular processes including proliferation, migration, secretion and contraction and has also been implicated in inflammation, fibrosis, malignant transformation and metastasis (Choi et al., 2010). Its actions are mainly mediated through six distinct G protein-coupled receptors, denominated LPA_{1–6} (Choi et al., 2010). LPA_{1–3} are phylogenetically related, whereas LPA_{4–6} are more distant evolutionarily (Choi et al., 2010). LPA₁ was the first LPA receptor identified (Hecht et al., 1996), it has been studied in greater detail and mediates many of the known actions of LPA.

The LPA₁ receptor has the characteristic 7-transmembrane domain topology of G protein-coupled receptors with two putative

N-glycosylation sites present at the extracellular amino terminus tail, a purported palmitoylation site, at the intracellular carboxyl terminus domain, and at least eight putative phosphorylation sites located at the third intracellular loop and the carboxyl terminus tail (Avendaño-Vázquez et al., 2007; Choi et al., 2010; Murph et al., 2008).

Regulation of receptor function is a complex phenomenon involving many processes with different time frames. It includes changes in receptors responsiveness, density at the plasma membranes, and even modifications in their rates of synthesis and degradation. Like other G protein-coupled receptors, LPA₁ signaling desensitizes through homologous (i.e., induced by its own agonists) and heterologous (i.e. through activation of unrelated agents) mechanisms. Phosphorylation appears to be a very early event associated with receptor desensitization and internalization. G protein-coupled receptor kinases and second messenger-activated protein kinases play cardinal roles in these processes (García-Sáinz et al., 2000; Tobin, 2008; Vázquez-Prado et al., 2003). There is also evidence that desensitization and internalization of some G protein-coupled receptors can occur in the absence of receptor phosphorylation (Ferguson, 2007). In this regard, it has

Abbreviations: LPA, lysophosphatidic acid; PKC, protein kinase C; PMA, phorbol myristate acetate; eGFP, enhanced green fluorescent protein; DN, dominant-negative; shRNA, short hairpin RNA; SDS-PAGE, sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5622 5613.

E-mail address: agarcia@ifc.unam.mx (J.A. García-Sáinz).

been shown that LPA₁ receptors are phosphorylated and desensitized in response to LPA (Avendaño-Vázquez et al., 2005), direct activation of protein kinase C (PKC) with phorbol esters (Avendaño-Vázquez et al., 2005) or stimulation of unrelated receptors such as AT₁ angiotensin II receptors (Avendaño-Vázquez et al., 2005; Colín-Santana et al., 2011), epidermal growth factor receptors (Colín-Santana et al., 2011) and estrogen receptor α (González-Arenas et al., 2008). Interestingly, LPA₁ desensitization and phosphorylation induced by angiotensin II, epidermal growth factor and estradiol involves PKC (Avendaño-Vázquez et al., 2005; Colín-Santana et al., 2011), whereas homologous desensitization appears to require G protein-coupled receptor kinase 2 (Aziziyeh et al., 2009).

PKC is a heterogeneous subfamily of protein kinases comprising 10 isozymes that have been classified into three groups based on their structure and cofactor regulation: (a) conventional PKCs including α , β I and β II (splice variants) and γ ; (b) novel PKCs including δ , ϵ , η , θ and μ ; and (c) atypical PKCs including ζ and λ (Newton, 2010). In the present work using a hepatocyte-derived cell line (C9 cells), we employed different approaches to define the PKC isoforms that participate in phorbol ester-induced LPA₁ phosphorylation and desensitization; our results indicate that PKC α and, to a lesser extent, PKC β isoforms mediate receptor phosphorylation and suggest that desensitization might involve additional actions.

2. Materials and methods

2.1. Materials

L- α -LPA (oleoyl-sn-glycero-3-phosphate), PMA (phorbol myristate acetate), hispidin, angiotensin II, DNA purification kits, and protease inhibitors were purchased from Sigma Chemical Co. Ham's F12 medium (Kaighn's modification, F12K), phosphate-free Dulbecco's modified Eagle's medium, trypsin, antibiotics, and other reagents used for cell culture were from Life Technologies. Fetal bovine serum was obtained from Multicell. Bis-indolylmaleimide I, Gö 6976 and rottlerin were obtained from Calbiochem. [³²P]Pi (8500–9120 Ci/mmol) was obtained from Perkin Elmer Life Sciences, agarose-coupled protein A was from Millipore, and Fura 2AM was obtained from Invitrogen. Plasmids for expression of PKC α and β II dominant-negative (DN) mutants (Soh and Weinstein, 2003) were purchased from Addgene. Plasmids for expression of short hairpin RNA (shRNA) against both PKC α and β II (construct 1, target sequence: 5'-ACCCAAGATGAGAGCAA-3' and construct 2 sequence: 5'-CCAGGAAGTCATCAGGAT-3') using RNAi-Ready pSiren-RetroQ vector (Clontech) were generous gifts from Drs. Martha Robles-Flores and María Cristina Castañeda-Patlán (Facultad de Medicina, UNAM). Primary antibodies were obtained as follows: anti-PKC α , - β I, - β II, - γ and - δ , and β -actin from Santa Cruz Biotechnology, anti-GFP monoclonal antibody from Clontech and secondary antibodies were from Zymed and Millipore; polyvinylidene difluoride membranes were obtained from BioRad and chemiluminescence kits were purchased from Pierce. The anti-GFP (rabbit polyclonal) antisera used for immunoprecipitation were generated in our laboratory (Avendaño-Vázquez et al., 2005; Colín-Santana et al., 2011; González-Arenas et al., 2008). The rat hepatic epithelial cell line, C9, was purchased from the American Type Culture Collection. Other reagents used were obtained from the sources described (Avendaño-Vázquez et al., 2005; Colín-Santana et al., 2011; González-Arenas et al., 2008).

2.2. Cell lines and transfections

A C9-derived cell line stably expressing LPA₁ receptors fused to the eGFP (enhanced green fluorescent protein) was previously

generated in our laboratory; these receptors are functional and the eGFP-tag has been successfully used for immunoprecipitation (Avendaño-Vázquez et al., 2005; Colín-Santana et al., 2011; González-Arenas et al., 2008). C9 cells were cultured in F12K medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 μ g/ml streptomycin, 100 units/ml penicillin and 0.25 μ g/ml amphotericin B, at 37 °C in a 95% air and 5% CO₂ atmosphere. Because LPA is present in sera, the growth medium was removed and replaced with F12K containing a reduced concentration (1%) of fetal bovine serum, 12–16 h prior to the experiments.

Transfections, for transient expression, with plasmids for expression of PKC α and β II dominant-negative (DN) mutants (\approx 50 μ g of plasmid for each 10 cm-diameter dish) were performed utilizing Lipofectamine 2000 following the manufacturer's instructions and cells were cultured for 48 h prior to being used. For experiments utilizing shRNAs, cells were transfected using the same protocol and after 24 h culture medium was supplemented with 2 μ g/ml puromycin, and resistant cells were selected.

2.3. Intracellular calcium determinations

Intracellular calcium was determined essentially as previously described (Avendaño-Vázquez et al., 2005; Colín-Santana et al., 2011; González-Arenas et al., 2008). In brief, cells were loaded with 2.5 μ M of the fluorescent Ca²⁺ indicator, Fura-2/AM, in Krebs-Ringer-HEPES containing 0.05% bovine serum albumin, pH 7.4 for 1 h at 37 °C and then washed three times to eliminate unincorporated dye. Fluorescence measurements were carried out at 340 and 380 nm excitation wavelengths and at 510 nm emission wavelength, with a chopper interval set at 0.5 s, utilizing an Aminco-Bowman Series 2 luminescence spectrometer (Rochester, NY, USA). Intracellular calcium ([Ca²⁺]_i) was calculated according to Grynkiewicz et al. (1985).

2.4. Phosphorylation of LPA₁-eGFP receptors

The procedure was performed essentially as previously described (Avendaño-Vázquez et al., 2005; Colín-Santana et al., 2011; González-Arenas et al., 2008). Briefly, cells were maintained overnight in phosphate-free Dulbecco's modified Eagle's medium without serum and then incubated in 3 ml of the same medium containing [³²P]Pi (100 μ Ci/ml) for 3 h at 37 °C. Labeled cells were stimulated as indicated, washed with ice-cold phosphate-buffered saline solution, and solubilized with 0.5 ml of ice-cold buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% deoxycholate, 1% Nonident P40, 20 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM β -glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM p-serine, 1 mM p-threonine, 1 mM p-tyrosine, and protease inhibitors. Cell lysates were centrifuged at 12,000g for 15 min at 4 °C and supernatants were incubated overnight at 4 °C with protein A-agarose and the anti-GFP antiserum generated in our laboratory. After three washes with 50 mM HEPES, 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.2, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate, and 100 mM NaF, pellets containing the immune complexes were boiled for 5 min in sodium dodecyl sulfate-sample buffer containing 5% β -mercaptoethanol, and subsequently subjected to sodium-dodecyl-sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (the acrylamide concentration was changed from 10% to 7.5% to improve resolution). Samples were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes and the level of receptor phosphorylation was assessed with a Molecular Dynamics PhosphorImager and ImageJ software (National Institutes of Health-USA). Data fell within the linear range of detection of the apparatus and were plotted using Prism 5 from GraphPad software. All data, including the baseline, were normalized to the

value obtained in the absence of stimulus (100%) and which resulted from the average of at least two different samples.

2.5. Western blot assays

Cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed using 0.5 ml of Laemmli sample buffer (Laemmli, 1970) for each culture dish (10 cm of diameter). Lysates were centrifuged at 12,700g for 5 min and proteins in supernatants were separated by electrophoresis on 7.5% SDS-PAGE. Proteins were electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membranes and immunoblottings were performed. Incubation with primary selective antibodies was conducted for 12 h at 4 °C and with the secondary antibody for 1 h at room temperature. Super signal-enhanced chemiluminescence's kits were employed exposing the membranes to X-Omat X-ray films. Signals were quantified by densitometric analysis utilizing the ImageJ software. In the co-immunoprecipitation studies LPA₁-eGFP was immunoprecipitated as described for the receptor phosphorylation studies, and Western blotting was performed as indicated previously.

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis between comparable groups was performed using analysis of variance with Bonferroni's post-test and was performed with the software included in the GraphPad Prism software program. In the co-immunoprecipitation studies, treatments with LPA or PMA were individually compared with the controls employing the Student's *t* test. In all statistical comparisons *P* < 0.05 was considered significant.

3. Results

In agreement with a previous publication (Avendaño-Vázquez et al., 2005) we observed that LPA increases intracellular calcium in wild type C9 cells and that such an effect is magnified in cells stably expressing the LPA₁-eGFP construct (Fig. 1, panel A); these effects were essentially abolished in cells preincubated for 5 min with 1 μM PMA (Fig. 1, panel A). Representative tracings are presented in Supplementary Fig. S1 (panels A and B). As a control, the effect of angiotensin II was also tested under the same conditions, and it was observed that the PMA treatment diminished the action of the peptide hormone, but to a much lesser extent (Supplementary Fig. S1, panels C and D), in agreement with a previous publication (García-Caballero et al., 2001).

LPA₁ receptor phosphorylation was studied. In the present work 7.5% SDS-PAGE was used for protein separation which allowed us to define the LPA₁-eGFP construct Mr within the range of 70–80 kDa. The receptor construct was identified by Western blots against the GFP tag using our own antisera and confirmed utilizing a commercial anti-GFP antibody (not shown). In agreement with previous data (Avendaño-Vázquez et al., 2005), PMA induced a rapid and strong increase in the phosphorylation state of the receptor, which was sustained for at least 60 min (longest time studied, Fig. 1, panel B).

It is well-known that prolonged incubation with active phorbol esters leads to PKC down regulation (Krug and Tashjian, 1987). In our model, overnight incubation with 1 μM PMA markedly decreased (70–90%) the amount of immunodetectable conventional and novel PKC isoforms α, β I, βII, γ and δ, but not that of the atypical isozyme, PKC ζ (Supplementary Fig. S2). Immunodetected G protein-coupled receptor kinase 3 and β-actin, which served as controls, were not affected by the phorbol ester treatment (Supplementary Fig. S2). Overnight treatment with PMA did not alter the baseline intracellular calcium concentration nor the effect of LPA on this parameter (Fig. 2, panel A). Under these conditions, 5 min preincubation with PMA was no longer able to

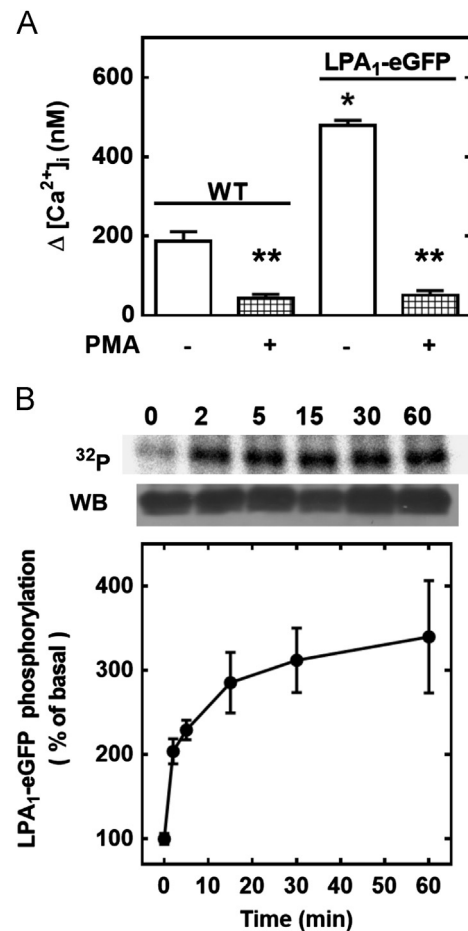


Fig. 1. Effects of PMA on LPA-induced increase in intracellular calcium concentration and LPA₁-eGFP phosphorylation. Panel A: non-transfected C9 cells (WT, wild-type), and cells stably expressing LPA₁-eGFP receptors were incubated for 5 min in the absence or presence of 1 μM PMA, then challenged with 1 μM LPA and the increases in intracellular calcium concentration (Δ[Ca²⁺]_i) were recorded. Means are plotted with vertical lines representing the S.E.M. of 4 determinations using different cells preparations. **P* < 0.001 vs. WT without PMA; ***P* < 0.001 vs. absence of PMA. Panel B: cells stably expressing LPA₁-eGFP receptors were incubated for the times indicated in the presence of 1 μM PMA and receptor phosphorylation was studied. Means are plotted with vertical lines representing the S.E.M. of 6 determinations using different cells preparations. All groups **P* < 0.001 vs. time 0. A representative autoradiogram and a representative Western blots are shown; the receptor construct has a Mr within the range ≈ 70–80 kDa.

decrease LPA-triggered intracellular calcium increase (Fig. 2, panel A), and phorbol ester-induced LPA₁-eGFP phosphorylation was also essentially abolished (Fig. 2, panel B). Incubation with LPA was clearly able to increase LPA₁-eGFP phosphorylation in cells incubated overnight with the phorbol ester, although the effect was smaller than that observed in cells preincubated overnight without PMA (Fig. 2, panel B).

In order to acquire some insight on the PKC isozymes involved in the actions of PMA we employed some of the pharmacological inhibitors available, including the non isoform-selective inhibitor, bis-indolylmaleimide I and the following isoforms-selective PKC inhibitors: PKC α- and β-selective, Gö 6976 (Martiny-Baron et al., 1993), isoform β-selective, hispidin (Gonindard et al., 1997), and for isoform δ, rottlerin (Gschwendt et al., 1994). These agents were preincubated for 15 min before the addition of PMA and a 1 μM concentration was selected, on the basis of preliminary experiments. It can be observed in Fig. 3 (panel A) that preincubation with bis-indolylmaleimide I completely blocked the inhibitory action of PMA on the LPA-triggered intracellular calcium increase, whereas Gö 6976, and particularly hispidin, were less effective;

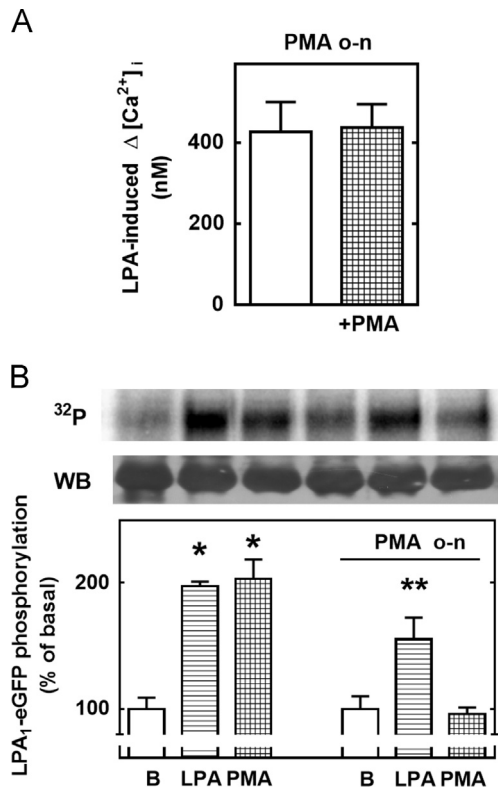


Fig. 2. Effects of overnight (o-n) incubation with PMA on LPA₁-eGFP receptor function and phosphorylation. Panel A: cells were incubated overnight (≈ 16 h) in the absence or presence of $1 \mu\text{M}$ PMA, washed, loaded with Fura-2 AM and the effect of $1 \mu\text{M}$ LPA on intracellular calcium concentration was determined. Means are plotted with vertical lines representing the S.E.M. of 3 determinations using different cells preparations. Panel B: cells were incubated overnight in the absence or presence of $1 \mu\text{M}$ PMA and receptor phosphorylation was studied. Cells were incubated in the absence of any agent (B, baseline), $1 \mu\text{M}$ LPA or $1 \mu\text{M}$ PMA for 15 min. Means are plotted with vertical lines representing the S.E.M. of 4 determinations using different cells preparations. $*P < 0.001$ vs. their respective baseline (B); $**P < 0.05$ vs. its respective baseline (B). A representative autoradiogram and a representative Western blot are shown; the receptor construct has a Mr within the range ≈ 70 – 80 kDa.

none of these inhibitors altered baseline intracellular calcium concentration or LPA action on this parameter (data not shown). Rottlerin alone decreased ($\approx 30\%$) the LPA-induced increase in intracellular calcium (data now shown) and was completely unable to block the effect of PMA (Fig. 3, panel A). As shown in Fig. 3 (panel B), none of these inhibitors altered baseline LPA₁-eGFP phosphorylation and only Gö 6976 (alone or in combination with hispidin) was able to block the effect of PMA on receptor phosphorylation.

We next used two additional approaches to study the actions of PKC α and β isoforms. Expression of dominant-negative mutants of PKC α and β II was tested first. Transient expression of these mutants markedly reduced the ability of PMA, and also of LPA, to induce LPA₁-eGFP phosphorylation (Fig. 4, panel A). However, expression of these mutants was completely ineffective for blocking PMA inhibition of LPA-triggered intracellular calcium increase (Fig. 4, panel B). However, cell preincubation with bis-indolylmaleimide or Gö 6976, markedly reduced the effect of PMA on LPA-triggered calcium signaling. This data suggested that the action of these mutants was not completely effective. However, changes in the amount of plasmid used in the transfections or in the time elapsed between transfection and the actual experiments (48–72 h) did not modify these results. Similarly, transient expression of both mutants gave the same results (data not shown). Expression of the mutants was evidenced by the presence of the

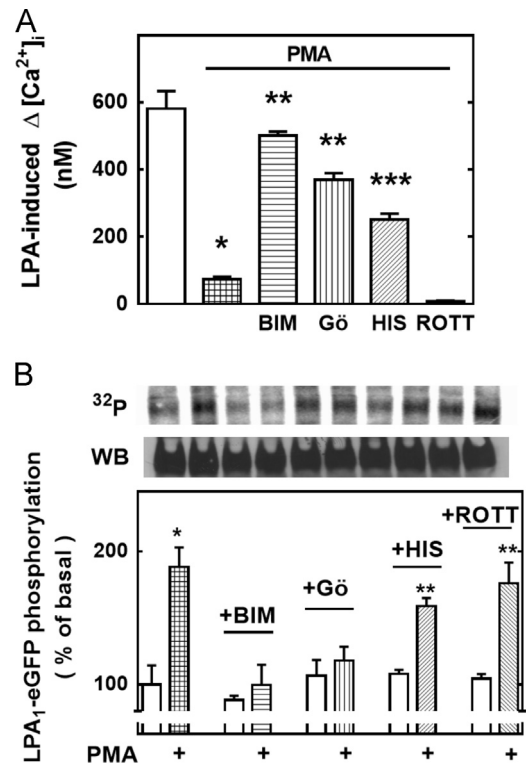


Fig. 3. Effects protein kinase C inhibitors on PMA-induced LPA₁-eGFP receptor desensitization and phosphorylation. Panel A: cells stably expressing LPA₁-eGFP receptors were incubated for 15 min in the absence (B, baseline) or presence of $1 \mu\text{M}$ of the inhibitors: BIM, bis-indolylmaleimide I; Gö, Gö 6976, HIS, hispidin, ROTT, rottlerin, followed by 15 min in the absence or presence of $1 \mu\text{M}$ PMA and receptor phosphorylation was studied. Means are plotted with vertical lines representing the S.E.M. of 4 determinations using different cells preparations. $*P < 0.005$ vs. baseline (B); $**P < 0.05$ vs. inhibitor alone. A representative autoradiogram and a representative Western blot are shown; the receptor construct has a Mr within the range ≈ 70 – 80 kDa. Panel B: cells were incubated for 15 min in the absence or presence of $1 \mu\text{M}$ of the following indicated inhibitors: BIM, bis-indolylmaleimide I; Gö, Gö 6976, HIS, hispidin, or ROTT, rottlerin, followed by 5 min in the absence or presence of $1 \mu\text{M}$ PMA and $1 \mu\text{M}$ LPA-triggered calcium increase was determined. Means are plotted with vertical lines representing the S.E.M. of 4–5 determinations using different cells preparations. $*P < 0.001$ vs. absence of PMA; $**P < 0.001$ vs. PMA without any inhibitor; $***P < 0.01$ vs. PMA without any inhibitor.

hemagglutinin tag (HA) present in the mutant constructions; cross-reactivity of the secondary antibody with the light chain of the IgG (used for immunoprecipitation) served as control (Supplementary Fig. S3).

We also employed shRNA to knockdown protein expression of PKC α and β II. The two constructions used, decreased the amount of both isoforms and did not alter the amount of immunodetected β -actin (Supplementary Fig. S4). Stable expression of any of these constructions blocked LPA₁-eGFP phosphorylation (Fig. 5, panel A) but, in contrast, they did not modify the ability of PMA to inhibit LPA-triggered intracellular calcium increase (Fig. 5, panel B). Again, cell preincubation with the PKC inhibitors, bis-indolylmaleimide or Gö 6976, markedly reduced the effect of PMA on LPA calcium signaling (Fig. 6, panel B). Transient transfection with both shRNAs resulted in similar results (data not shown).

Finally, we explored the possibility that PKC α and β II could interact with the LPA₁-eGFP receptor construct through co-immunoprecipitation studies. As shown in Fig. 6, both PKC isoforms co-immunoprecipitate with the LPA₁-eGFP receptor construct and such co-immunoprecipitation increased when cells were treated with LPA or PMA. These data, certainly, do not prove any direct receptor-enzyme association, but do suggest the possibility of a dynamic interaction within signaling complexes.

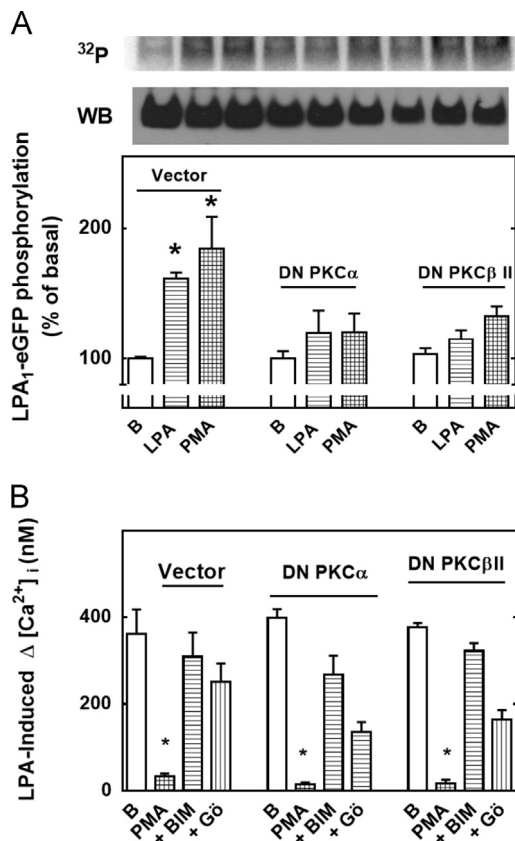


Fig. 4. Effect of expression of dominant-negative (DN) mutants of PKC on PMA-induced LPA₁-eGFP receptor desensitization and phosphorylation. Panel A: cells were transfected with an empty vector or plasmids for the expression of DN-PKC α or β II isozymes and LPA₁-eGFP receptor phosphorylation was studied 48 h later; cells were challenged with vehicle or 1 μ M PMA for 15 min. Means are plotted with vertical lines representing the S.E.M. of 5–6 determinations using different cells preparations. * $P < 0.001$ vs. absence of PMA. A representative autoradiogram and a representative Western blot are shown; the receptor construct has a Mr within the range ≈ 70 –80 kDa. Panel B: cells were transfected and cultured as indicated above; to study intracellular calcium these were incubated for 15 min in the absence or presence of 1 μ M of the inhibitors: BIM, bis-indolylmaleimide I or G \ddot{o} , G \ddot{o} 6976, then for a further 5 min in the absence (B, baseline) or presence (all of the other columns of the group) of 1 μ M PMA and finally, all of them were challenged with 1 μ M LPA. Means are plotted with vertical lines representing the S.E.M. of 5–7 determinations using different cells preparations. * $P < 0.001$ vs. all of other treatments in the same group.

4. Discussion

Our present results confirm and extend our previous findings indicating that the LPA₁ receptor is a phosphoprotein whose phosphorylation state is modulated through agonist stimulation and the activation of PKC by PMA (Avendaño-Vázquez et al., 2005). Such a phosphorylation is associated with receptor desensitization. The pharmacological and molecular biological approaches used in this work strongly suggest that PKC α , and to a lesser extent, PKC β are major participants in receptor phosphorylation and that desensitization is a more complex process. In the majority of our work the β II isoform was studied, but these two isoforms are splice variants, whose enormous similarity makes it very difficult to establish a clear distinction between them, with the approaches used; it appears likely that their function could overlap to some extent.

The present data indicated that activation of PKC with PMA induces LPA₁ receptor phosphorylation and desensitization and that the PKC down regulation, caused by prolonged cell incubation with the phorbol ester, was able to block both its effect on receptor function and phosphorylation state. These data indicate that the presence of PKC is required for these effects, but it does not

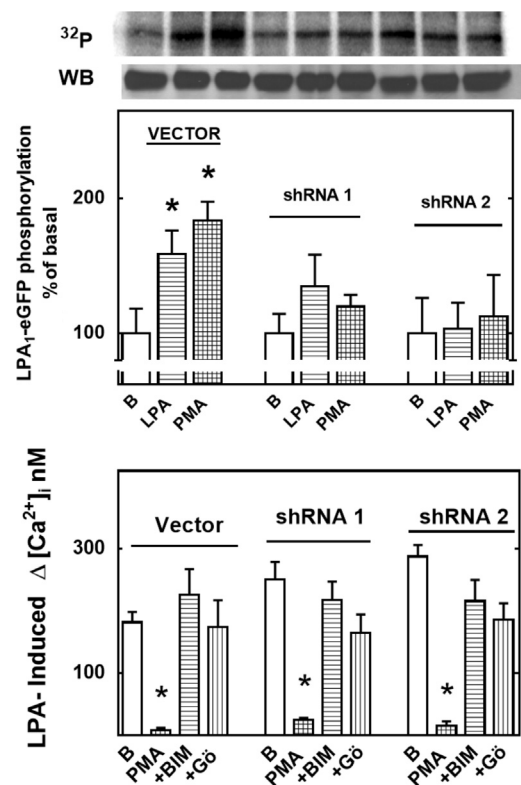


Fig. 5. Effect of knocking down the expression of PKC isoforms on PMA-induced LPA₁-eGFP receptor desensitization and phosphorylation. In these experiments cells were transfected with an empty vector or plasmids for the expression of shRNA 1 and 2 (sh 1 and 2). Panel A: cells were challenged with vehicle or 1 μ M PMA for 15 min to study LPA₁-eGFP receptor phosphorylation. Means are plotted with vertical lines representing the S.E.M. of 4–5 determinations using different cells preparations. * $P < 0.001$ vs. absence of PMA. A representative autoradiogram and a representative Western blot are shown; the receptor construct has a Mr within the range ≈ 70 –80 kDa. Panel B: to study intracellular calcium these were incubated for 15 min in the absence or presence of 1 μ M of the inhibitors: BIM, bis-indolylmaleimide I or G \ddot{o} , G \ddot{o} 6976, then for a further 5 min in the absence (B, baseline) or presence (all of the other columns of the group) of 1 μ M PMA and finally, all of them were challenged with 1 μ M LPA. Means are plotted with vertical lines representing the S.E.M. of 3 determinations using different cells preparations. * $P < 0.001$ vs. all of other treatments in the same group.

experimentally prove its being a requirement for its activity. In addition, this type of approach decreases, as shown experimentally, the amount of several conventional (α , β I, β II and γ) and a novel (δ isoform) PKC isozymes.

A pharmacological approach was utilized to achieve further insights. Protein kinases are considered one of the major drug-targets of this century and, in fact, some inhibitors are already clinical successes, changing the life expectancy of many patients, and many others are in clinical trials (Cohen, 2002). However, the majority of protein kinase inhibitors act on the ATP binding site of these kinases that, as expected, is highly conserved among them, raising serious concerns regarding their selectivity (Bain et al., 2007; Davies et al., 2000).

Despite this limitation, we tested a non isoform-selective PKC inhibitor (bis-indolylmaleimide I) and the isoforms-selective PKC inhibitors (a): G \ddot{o} 6976, an indocarbazol derivative that acts in a competitive fashion with respect to ATP and shows considerable selectivity for PKC α and β (Martiny-Baron et al., 1993) and (b) hispidin, a fungal metabolite, (6-(3,4-dihydroxystyryl)-4-hydroxy-2-pyrone), which has been reported as a potent and selective inhibitor of PKC β I and β II (Gonindard et al., 1997). Rottlerin, a reported inhibitor of PKC δ (Gschwendt et al., 1994) was also employed, although its selectivity, and even its use as a PKC inhibitor, have been put into question (Bain et al., 2007; Davies et al., 2000; Soltoff, 2007).

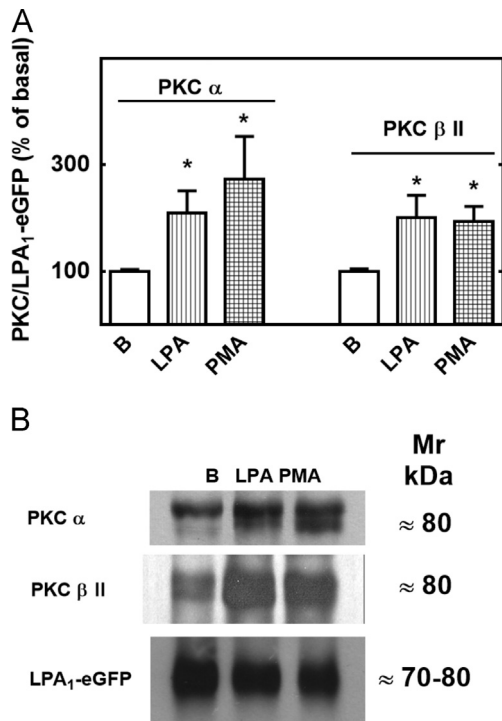


Fig. 6. Co-immunoprecipitation of PKC isoforms and LPA₁-eGFP receptors. Panel A: cells were incubated for 15 min in the absence of any agent (B, baseline) or presence of 1 μ M LPA or 1 μ M PMA and the LPA₁-eGFP receptors were immunoprecipitated as described in Material and Methods and the receptors and the PKC isoforms were detected by Western blotting. Baseline values were taken as 100% and the variation results from duplicate determinations for each experiment. Means are plotted with vertical lines representing the S.E.M. of 3 determinations using different cells preparations. * $P < 0.05$ vs. baseline by Student's *t* test. Panel B: representative immunoblots are presented; Mr values are indicated at the right.

Bis-indolylmaleimide I and Gö 6976 were clearly able to block the effects of PMA on LPA₁ phosphorylation and on receptor function. These effects were observed after a short preincubation (15 min) with the inhibitors, which very unlikely might induce any significant change in PKC amounts, suggesting that inhibition of kinase activity was sufficient to block these effects. Hispidin, which only partially decreases PMA-induced LPA₁ phosphorylation, was able to restore (also partially), the ability of LPA to increase intracellular calcium in the presence of the phorbol ester. Rottlerin was unable to block any of the PMA actions studied and it also altered by itself, the LPA-triggered calcium response. The data support the idea that the catalytic activities of conventional PKC isoforms, particularly α and, to a lesser extent, the β isozymes, are key participants in LPA₁ phosphorylation and modulation of its function. However, expression of DN mutants of the PKC isozymes, clearly attenuated PMA-induced LPA₁-eGFP phosphorylation, but this treatment was unable to block the PMA effect on receptor function. Similarly, knocking down PKC α and β II isozymes markedly decreased PMA-induced receptor phosphorylation, but did not modify the ability of the phorbol ester to blunt receptor action on intracellular calcium. It is interesting that PKC inhibitors were still able to block PMA action on LPA₁-triggered calcium signaling when used in cells expressing the DN PKC mutants or in which PKC was knocked down with shRNAs. The data suggest that the molecular biological approaches were only partially effective. We, certainly, cannot exclude the possibility that desensitization could be the result not only of receptor phosphorylation, but also downstream molecular entities and/or include the formation of complexes with different proteins (kinases, phosphatases, adapters and scaffolds, among others) (Vázquez-Prado et al., 2003). Many enzymes change their cellular localization in response to activation, and this is frequently blocked by inhibitors.

We were surprised by the fact that overnight treatment with PMA and particularly, the use of DN PKC mutants and PKC knockdown, markedly decreased agonist-induced LPA₁ receptor phosphorylation. It is known that there is an intense crosstalk among different protein kinases, including PKC and G protein-coupled receptor kinases (Elorza et al., 2000; Penela et al., 2003; Sarnago et al., 1999). It is possible, that long-term treatments might result in compensatory changes that could be responsible for the markedly decreased agonist-induced receptor phosphorylation. However, at this point the mechanism(s) involved remain unknown.

In addition to the possibility that factors, besides receptor phosphorylation (such as the formation of the previously mentioned complexes) could be part of the desensitization process, there is now evidence indicating that the specific sites phosphorylated in a given receptor might vary with the stimulus and even with the cell type, and that the distinct phosphorylation patterns (or "barcodes") result in diverse functional consequences (Nobles et al., 2011; Shukla et al., 2013; Tobin, 2008; Tobin et al., 2008). It has also been observed that LPA₁ internalize in response to the agonist, and to activation of PKC by phorbol esters (Murph et al., 2003; Urs et al., 2008), but that the amino acids required at the receptor's carboxyl tail and in the role(s) of β -arrestin appear to differ, i. e., a serine cluster in the carboxyl tail is required for β -arrestin binding and endocytosis after LPA stimulation, whereas a more distal dileucine motif is required for phorbol ester-induced internalization (Urs et al., 2008). We currently lack information regarding the relationship between LPA₁ receptor phosphorylation and internalization. Future research goals certainly include defining the protein kinase- modified residues, the so-called receptor "phosphorylation barcodes", and to relate these with conformational changes and receptor associations with other signaling devices. Identification of the molecular participants in these events is only an initial step, and our contribution is to evidence that conventional PKC isozymes play a role.

Acknowledgments

This research was partially supported by Grants from CONACyT [177556] and DGAPA-UNAM [200812]. Aurelio Hernández-Méndez is a student of the Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas-UNAM and a recipient of a PhD fellowship from CONACyT; this work constitutes a major part of his thesis. We express our gratitude to Drs. Marina Macías-Silva, Martha Robles-Flores and María Cristina Castañeda-Patlán for the generous gift of the shRNA constructs and other materials, and for their help and advice. We thank Dr. María Teresa Romero-Ávila, Dr. Claudia Rivera, Dr. Héctor Malagón, Aurey Galván and Manuel Ortíz for technical help. We also express our gratitude to Margaret Brunner, M.A., for style corrections.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.043>.

References

- Avenidaño-Vázquez, S.E., Cabrera-Wrooman, A., Colín-Santana, C.C., García-Sáinz, J.A., 2007. Lysophosphatidic acid LPA₁ receptor close-up. *Signal Transduct.* 7, 351–363.
- Avenidaño-Vázquez, S.E., García-Caballero, A., García-Sáinz, J.A., 2005. Phosphorylation and desensitization of the lysophosphatidic acid receptor LPA₁. *Biochem. J.* 385, 677–684.

- Aziziyeh, A.I., Li, T.T., Pape, C., Pampillo, M., Chidiac, P., Possmayer, F., Babwah, A.V., Bhattacharya, M., 2009. Dual regulation of lysophosphatidic acid (LPA1) receptor signalling by Ral and GRK. *Cell Signal.* 21, 1207–1217.
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S., Alessi, D.R., Cohen, P., 2007. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.* 408, 297–315.
- Cohen, P., 2002. Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 309–315.
- Colín-Santana, C.C., Avendaño-Vázquez, S.E., Alcántara-Hernández, R., García-Sáinz, J.A., 2011. EGF and angiotensin II modulate lysophosphatidic acid LPA(1) receptor function and phosphorylation state. *Biochim. Biophys. Acta* 1810, 1170–1177.
- Choi, J.W., Herr, D.R., Noguchi, K., Yung, Y.C., Lee, C.W., Mutoh, T., Lin, M.E., Teo, S.T., Park, K.E., Mosley, A.N., Chun, J., 2010. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 157–186.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M., Cohen, P., 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* 351, 95–105.
- Elorza, A., Sarnago, S., Mayor Jr., F., 2000. Agonist-dependent modulation of G protein-coupled receptor kinase 2 by mitogen-activated protein kinases. *Mol. Pharmacol.* 57, 778–783.
- Ferguson, S.S., 2007. Phosphorylation-independent attenuation of GPCR signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 173–179.
- García-Caballero, A., Olivares-Reyes, J.A., Catt, K.J., García-Sáinz, J.A., 2001. Angiotensin AT(1) receptor phosphorylation and desensitization in a hepatic cell line. Roles of protein kinase c and phosphoinositide 3-kinase. *Mol. Pharmacol.* 59, 576–585.
- García-Sáinz, J.A., Vázquez-Prado, J., Medina, L.C., 2000. Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.* 389, 1–12.
- Gonindard, C., Bergonzi, C., Denier, C., Sergheraert, C., Kläbe, A., Chavant, L., Hollande, E., 1997. Synthetic hispidin, a PKC inhibitor, is more cytotoxic toward cancer cells than normal cells in vitro. *Cell Biol. Toxicol.* 13, 141–153.
- González-Arenas, A., Avendaño-Vázquez, S.E., Cabrera-Wrooman, A., Tapia-Carrillo, D., Larrea, F., García-Becerra, R., García-Sáinz, J.A., 2008. Regulation of LPA receptor function by estrogens. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 253–262.
- Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440–3450.
- Gschwendt, M., Müller, H.J., Kielbassa, K., Zang, R., Kittstein, W., Rincke, G., Marks, F., 1994. Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 93–98.
- Hecht, J.H., Weiner, J.A., Post, S.R., Chun, J., 1996. Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J. Cell Biol.* 135, 1071–1083.
- Krug, E., Tashjian Jr., A.H., 1987. Time-dependent changes in protein kinase C distribution and disappearance in phorbol ester-treated human osteosarcoma cells. *Cancer Res.* 47, 2243–2246.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Martiny-Baron, G., Kazanietz, M.G., Mischak, H., Blumberg, P.M., Kochs, G., Hug, H., Marme, D., Schachtele, C., 1993. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J. Biol. Chem.* 268, 9194–9197.
- Murph, M.M., Nguyen, G.H., Radhakrishna, H., Mills, G.B., 2008. Sharpening the edges of understanding the structure/function of the LPA1 receptor: expression in cancer and mechanisms of regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1781, 547–557.
- Murph, M.M., Scaccia, L.A., Volpicelli, L.A., Radhakrishna, H., 2003. Agonist-induced endocytosis of lysophosphatidic acid-coupled LPA1/EDG-2 receptors via a dynamin2- and Rab5-dependent pathway. *J. Cell Sci.* 116, 1969–1980.
- Newton, A.C., 2010. Protein kinase C: poised to signal. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E395–E402.
- Nobles, K.N., Xiao, K., Ahn, S., Shukla, A.K., Lam, C.M., Rajagopal, S., Strachan, R.T., Huang, T.Y., Bressler, E.A., Hara, M.R., Shenoy, S.K., Gygi, S.P., Lefkowitz, R.J., 2011. Distinct phosphorylation sites on the beta(2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of beta-arrestin. *Sci. Signal.* 4, ra51.
- Penela, P., Ribas, C., Mayor Jr., F., 2003. Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal.* 15, 973–981.
- Sarnago, S., Elorza, A., Mayor Jr., F., 1999. Agonist-dependent phosphorylation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) by Src tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 34411–34416.
- Shukla, A.K., Manglik, A., Kruse, A.C., Xiao, K., Reis, R.I., Tseng, W.C., Staus, D.P., Hilger, D., Uysal, S., Huang, L.Y., Paduch, M., Tripathi-Shukla, P., Koide, A., Koide, S., Weis, W.I., Kossiakoff, A.A., Kobilka, B.K., Lefkowitz, R.J., 2013. Structure of active beta-arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature* 497, 137–141.
- Soh, J.W., Weinstein, I.B., 2003. Roles of specific isoforms of protein kinase C in the transcriptional control of cyclin D1 and related genes. *J. Biol. Chem.* 278, 34709–34716.
- Soltoff, S.P., 2007. Rottlerin: an inappropriate and ineffective inhibitor of PKCdelta. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 453–458.
- Tobin, A.B., 2008. G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom. *Br. J. Pharmacol.* 153 (Suppl 1), S167–S176.
- Tobin, A.B., Butcher, A.J., Kong, K.C., 2008. Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 413–420.
- Urs, N.M., Kowalczyk, A.P., Radhakrishna, H., 2008. Different mechanisms regulate lysophosphatidic acid-dependent versus phorbol ester-dependent internalization of the LPA1 receptor. *J. Biol. Chem.* 283, 5249–5257.
- Vázquez-Prado, J., Casas-González, P., García-Sáinz, J.A., 2003. G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cell Signal.* 15, 549–557.

REVIEW

Lysophosphatidic acid LPA₁₋₃ receptors: signaling, regulation and *in silico* analysis of their putative phosphorylation sites

Aurelio Hernández-Méndez, Rocío Alcántara-Hernández, J. Adolfo García-Sánchez

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-248; México D. F. 04510

Correspondence: J. Adolfo García-Sánchez

E-mail: agarcia@ifc.unam.mx

Received: February 05, 2014

Published online: July 12, 2014

Lysophosphatidic acid (LPA) is a glycerophospholipid with a plethora of actions in the normal function of our organism as well as in the pathogenesis of many diseases. These actions are mainly exerted through a family of G protein-coupled receptors, which currently comprise six members; other receptors might participate in LPA actions including a nuclear receptor. In this work, we mainly focus on three of these receptors, i. e., LPA₁₋₃; those that were initially discovered which, have been more extensively studied and that are phylogenetically related among themselves, as well as with receptors for other bioactive phospholipids, such as those for spingosine 1-phosphate. The characteristics of these receptors, their patterns of tissue expression, and some of the actions in which they are involved are presented. Regulation of receptor function, including desensitization, internalization and phosphorylation has only been studied for the LPA₁ subtype. However, *in silico* analysis of potential phosphorylation sites indicate that all of these three receptors are putatively regulated by agonist activation and heterologous stimuli. We think LPA₁₋₃ receptor regulation constitutes a niche of investigation that is potentially of great importance considering the physiological and pathophysiological actions in which they are involved.

Keywords: Lysophosphatidic acid; LPA; Lysophosphatidic acid receptors; receptor phosphorylation

Receptors & Clinical Investigation 2014; 1:236-252. doi: 10.14800/rci.193; © 2014 by Smart Science & Technology, LLC.

Introduction

Lysophosphatidic acid (LPA) is a not very abundant metabolite, which participates in the biosynthesis, catabolism and transport of phospholipids in the organism, and in the continuous turnover of membranous organelles, such as the plasma membrane, endoplasmic reticula or Golgi apparatus. Interestingly, LPA also plays another very important role as a mediator in cell communication in autocrine, paracrine and endocrine ways. Thus, LPA and other lipids are denominated “bioactive”, meaning that they are extracellular messengers or local hormones.

The ability of LPA to increase smooth muscle

contraction, blood pressure and platelet aggregation was discovered in the early 1980's^[1]. It took almost ten years to frame the concept that LPA is an extracellular signal, contribution made in the early 1990's, by Wouter H. Moolenaar and his group^[2,3]. A few years later, the first receptor for this lipid was identified as the product of the ventricular zone gene-1 (vgz-1) by Chun and coworkers^[4]. LPA is now recognized as a potent local mediator that exerts a plethora of actions regulating the normal function of our organism and also participating in the pathogenesis of different diseases. The physiological actions of LPA are enormously diverse and include: regulation of cardiac and smooth muscle cell contractility^[5,6], intestinal epithelial homeostasis^[7], bone

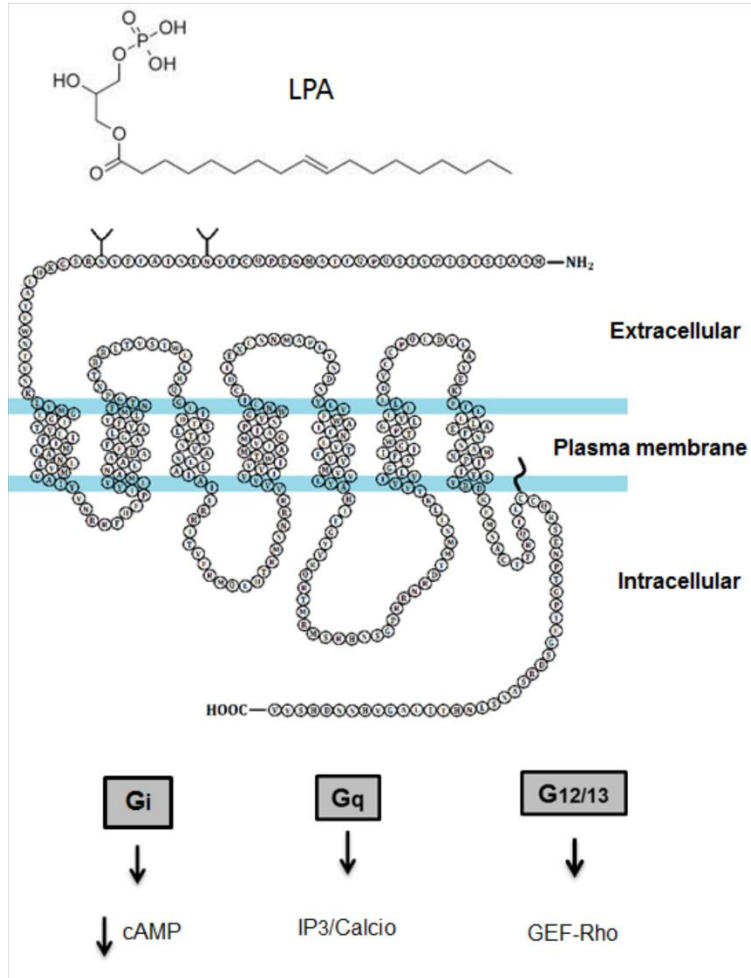


Fig 1. Model for the cellular action of lysophosphatidic acid through LPA₁₋₃ receptors. In the upper panel the molecular structure of a lysophosphatidic acid is presented. Middle and lower panels show the general structure of a LPA receptor (exemplified by LPA₁) and its interaction with different G proteins.

reabsorption^[8, 9]. LPA also appears to be involved in fibrosis^[10-12], lymphocyte homing and inflammation^[13], cardiac hypertrophy^[14], and in different types of cancer^[15-21], and other morbid entities. At the cellular level, LPA modulates cytoskeletal organization^[22], cell shape^[23-26], proliferation^[27], chemotaxis^[28], cell migration and invasion^[16], protection against or promotion of apoptosis (depending on cell type)^[29-31], among other key processes. The amount of information on the actions of LPA is very abundant and continues growing at a very fast rate. However, there are important areas in which our knowledge is clearly insufficient. This paper is mainly focused on what is known and unknown about three LPA receptors, their signaling and regulation; *in silico* analysis of potential phosphorylation sites in these receptors is also presented. Many review papers are cited and readers are also directed to two special issues of *Biochimica et Biophysica Acta*^[32, 33] and to the database and publications of the International Union of Basic and Clinical Pharmacology^[34-38], which cover many aspects of LPA actions and receptors.

LPA represents an heterogeneous group of substances containing a free fatty acid joined through an ester bond to positions 1 or 2 of glycerol 3-phosphosphate; the length

of the fatty acid chain and its degree of saturation vary (Fig. 1). LPA can be generated both inside cells and extracellularly, via the sequential action of phospholipases A₁/A₂ and D^[39-41] and is degraded by several types of lipid phosphatases^[41, 42]. LPA is present in tissues, in normal fluids such as blood, urine, saliva or cerebrospinal fluid, and also in pathological liquids, such as ascites^[41, 43].

LPA can modulate transcription through nuclear receptors, such as the ligand-activated peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)^[44], an aspect that will not be addressed here. However, many of the major LPA actions are mediated through seven-transmembrane domains/ G protein-coupled receptors (GPCRs). Currently six GPCRs constitute the LPA receptor family^[37], and are denominated LPA₁₋₆^[34-36]. The orphan receptor GPR87, was recently shown to be activated by this lipid and was suggested as a new LPA receptor, i.e., LPA₇^[45]. All of these receptors interact during signaling with one or more G proteins (G_q, G_{12/13}, G_i or G_s). Three of these, LPA₁₋₃, were the first to be identified, are related phylogenetically among themselves, sharing $\approx 50\%$ amino acid sequence identity^[34-36, 40, 41], and also with other phospholipid

receptors; they are the subject of this work (Figs. 1-4). The remaining LPA receptors, LPA₄₋₇, are relatively distant phylogenetically from the others but are related with the purinergic receptor family [34-36, 40, 41, 45]. In the Figures we have indicated with colors the sites that are possible targets of different protein kinases. Preference was given to sites affected by PKC, GRK or both, due to the fact that they are known regulators of LPA₁ [46-53]; when multiple kinases target a site, readers are referred to Tables I-III.

more of these receptors has been blocked [60]. A very elegant proteomic analysis of LPA-induced protein phosphorylation has been reported, showing that this lysophospholipid induces marked changes in the phosphoproteome, with a change in $\approx 30\%$ of the 6,292 phosphosites studied, and the time-course of the events suggested a protein kinase orchestration of signaling [61]. Interestingly, the authors concluded that the function of most LPA-regulated phosphorylation sites has not been investigated, which opens a new research avenues in the

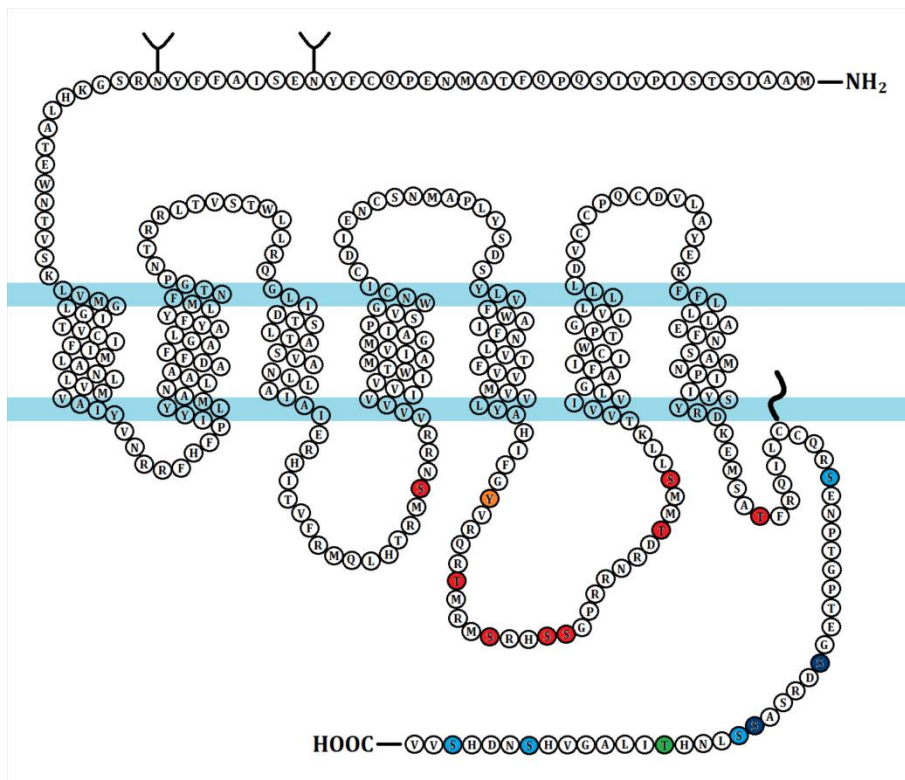


Fig 2. Schematic representation of the human LPA₁ receptor.

Potential phosphorylation sites are indicated in colors with the kinase involved as follows: PKC, red; GRK, light blue; PKC and GRK, dark blue; PKA, yellow; Akt/PKB, green, and Tyrosine kinases, orange. For isozymes putatively involved and sites potentially targeted by several kinases, please see Table I. "Y" indicates potential glycosylation sites; "Z", potential palmitoylation sites; blue lines indicate plasma membrane region.

Despite the advances achieved in the field during the last 10 years, considerable gaps continue to persist in our knowledge. One of these is the lack of precise association of particular receptors with specific actions. Several reasons might explain this. An obvious one is that there is a great overlapping among the functions of these receptors [40]. This appears to be a general situation for many receptors and is likely the result of pressure selection during evolution, helping to assure species persistence. Lack of pharmacological tools has also contributed to the paucity of progress. Despite efforts made by many groups working in medicinal chemistry, the availability of potent and selective agonists and antagonists for these receptors is scarce, essentially limited to a few ligands with marginal selectivity [1, 40, 54-59]. Fortunately, information on the functions of these receptors has been gained through determination of messenger RNA expression in different tissues and the use of animals and cells in which the expression of one or

field [61].

Succinct information on the structural characteristics of these receptors, their signaling, tissue distribution and major actions is presented in the following paragraphs.

LPA₁ receptor

The human *LPAR1* gene is present in chromosome 9 site 9q31.3 and encodes a protein of 364 amino acids (molecular mass ≈ 41 kDa) [4, 37, 40, 62, 63] (Fig. 2). As indicated previously, this was the first receptor identified of this family [4], it has been considered prototypical for this receptor family and has been detected, in many human and mouse organs, such as brain, heart, intestine, ovaries, testis, prostate, thymus and pancreas, among others [40]. Signaling through this receptor appears to involve three G protein partners, $G\alpha_{i/o}$, which inhibit adenylyl cyclase, thus decreasing cyclic AMP levels;

Table I

Kinases	Number	S/T/Y	Sequence	Localization
PKA, PKC α , δ , η , CaMK 1	160	S	MQLHTRM S NRRRVVVV	Intracellular loop 2
PDGFR, TYK 2, JAK, Abl	231	Y	LYAHIFG Y VRQRTMR	Intracellular loop 3
PKA, PKC α , β , δ , CaMK 1	236	T	FGYVRQR T MRMSRHS	Intracellular loop 3
PKA, PKC α	240	S	RQRTMRM S RHSSGPR	Intracellular loop 3
PKA, PKC α , CaMK 2	243	S	TMRMSRH S SGPRRNR	Intracellular loop 3
PKA, PKC α , δ , η , CAMK 4, AMPK	244	S	MRMSRH S SGPRRNRD	Intracellular loop 3
PKA, PKC α , CaMK 2	252	T	GPRRNRD T MMSLLKT	Intracellular loop 3
PKC ζ	255	S	RNRDTMM S LLKTVVI	Intracellular loop 3
PKB, PKC β , δ , θ , η , CaMK 1	321	T	RDKEMSA T FRQILCC	C-terminal
GRK 2	331	S	QILCCQR S ENPTGPT	C-terminal
PKC β , δ , θ , GRK 2, MAPK 13	341	S	PTGPTEG S DRSASSL	C-terminal
PKA, PKC δ , η , GRK3, CaMK 4, AMPK	346	S	EGSDRSAS S LNHTIL	C-terminal
GRK 3	347	S	GSDRSAS S LNHTILA	C-terminal
Akt/PKB	351	T	SASSLNH T ILAGVHS	C-terminal
GRK 2	358	S	TILAGVH S NDHSVV*	C-terminal
GRK 2	362	S	GVHSNDH S VV*****	C-terminal

Predicted human LPA₁ receptor phosphorylation sites. The kinases that might target the site, amino acid number, amino acid, sequence and localization are indicated. Abbreviations used are: protein kinase C (PKC), G protein receptor kinase (GRK), protein kinase A (PKA), protein kinase B (Akt/PKB), mitogen-activated protein kinase (MAPK), calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK), AMP-dependent protein kinase (AMPK), PDGF receptor (PDGFR), tyrosine-protein kinase (TYK), Janus kinase (JAK), Abelson murine leukemia viral oncogene homolog (Ab).

$G\alpha_q/11$, which activate phospholipase C, increasing IP₃ and diacylglycerol formation and the concentration of intracellular calcium; or $G\alpha_{12/13}$, which modulate the Rho pathway [40, 46, 51]. Through these pathways a variety of cellular responses are triggered; these include: cell proliferation, survival, cell shape changes and cytoskeletal rearrangements, migration, rearrangements in cell-cell contacts, among many others [40, 46, 51]. The LPA₁ third intracellular loop is critical for signaling [51] and a PDZ binding domain is present in the carboxyl terminus of LPA₁ receptors, which appears to participate in signaling [64, 65]. Not surprisingly, many of the known LPA effects are mediated through this subtype. These include actions that affect the central nervous system development and function, such as modulating embryonic Schwann cell migration, myelination and cell-to-axon segregation [66], astrocyte proliferation [67], formation of dendritic spine synapses [68] and also in neurite retraction [69], which can be involved in neuritogenesis. Consistent with these findings, LPA₁ receptor knockout mice exhibit synaptic dysfunction in the hippocampus [70], reduced neurogenesis in the dentate gyrus [71] and defective cortical development [72]; these modifications are associated with altered suckling [73] and other behavioral abnormalities such as reduced wheel running and voluntary exercise [74], anxiety and spatial-memory impairments [75]. It has been suggested that the neurochemical changes observed in LPA₁-deficient mice could make them a possible model for psychiatric diseases, such as schizophrenia [76]. On the dark side, this receptor subtype participates in cerebral ischemia-induced neuropathic pain [77], hypoxia-induced stereotyped fetal brain disorganization [78],

oxygen-induced retinal degeneration [79] and in the initiation of fetal hydrocephalus [80].

LPA₁ receptors play a role in osteoclast differentiation and bone reabsorption [8] and LPA₁ knockout mice show craniofacial dysmorphism [60] and abnormal bone development with decreased osseous tissue mass [9]. In zebrafish, this receptor subtypes appears to be essential for lymphatic vessel development [81], and in mice for angiogenesis [82]. LPA₁ appears to be involved in renal [10] and lung [11, 12] fibrosis, and in ovarian [18, 51], pancreatic [19, 20] and breast [15, 18] cancer, also increasing hepatocellular carcinoma cell-invasion [21]. LPA₁ receptor expression is increased while LPA₂ and LPA₃ are decreased, in ovarian cancer [51].

LPA₂ receptor

The LPA₂ receptor was discovered, taking advantage of its homology to LPA₁, through sequence search [83]. The human LPA₂ receptor gene, *LPAR2*, is located in chromosome 19 site 19p12 and encodes a protein of 351 amino acids (calculated molecular mass of \approx 39 kDa) [37, 40] (Fig. 3). Its expression is restricted, as compared with LPA₁, but it has been detected in testis, leukocytes, prostate, spleen, intestine and pancreas [40]. This receptor also couples with $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{i/o}$ and $G\alpha_{12/13}$ employing similar effector pathways to those of LPA₁. Additionally, it interacts with TRIP6, a focal adhesion molecule, and with other proteins, through a PDZ-binding domain present in its carboxyl terminus tail [40]. Interestingly, this receptor has been associated with cell survival and migration, and is considered a potential factor in cancer metastasis [16, 17]. In this regard it has been observed that

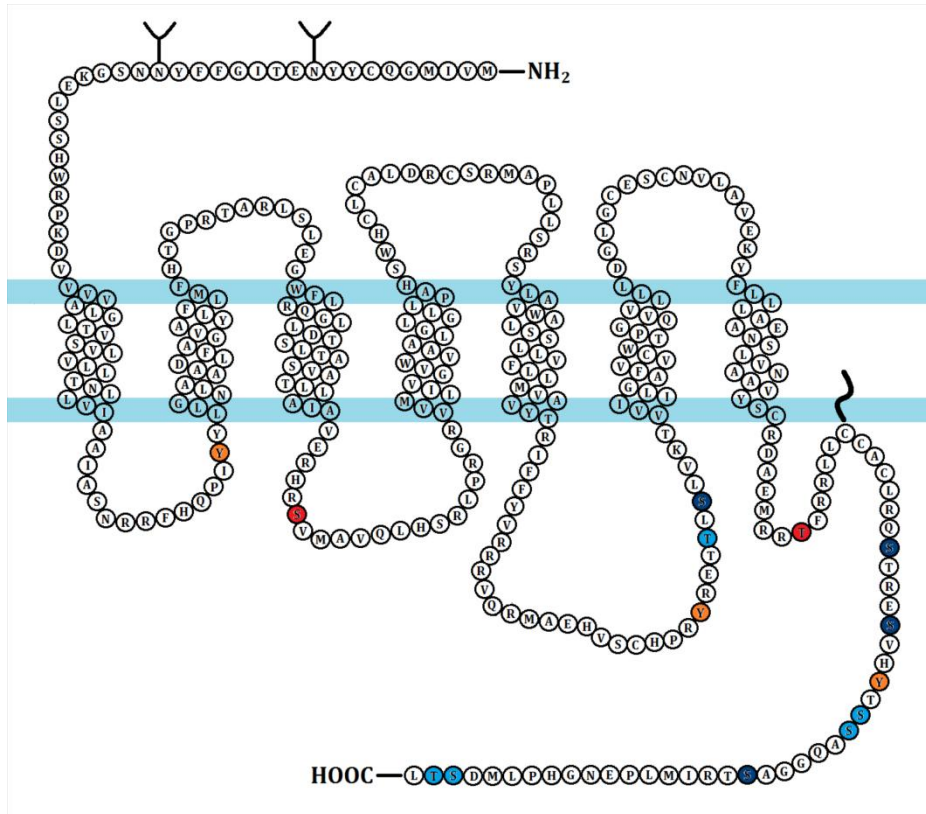


Fig 3. Schematic representation of the human LPA₂ receptor. Potential phosphorylation sites are indicated in colors with the kinase involved as follows: PKC, red; GRK, light blue; PKC and GRK, dark blue; PKA, yellow; and Tyrosine kinases, orange. For isozymes putatively involved and sites potentially targeted by several kinases, please see Table II. “Y” indicates potential glycosylation sites; “Z”, potential palmitoylation sites; blue lines indicate plasma membrane region.

LPA₂ receptor activation promotes migration in gastric and ovarian cancer cells^[16, 84] and in human colon cancer cells induces mitogenic signals^[17], its presence is associated with ovarian cancer tumorigenicity and aggressiveness^[51, 85] and mediates endometrial cancer

invasion^[186]. In a model of colitis-associated cancer, absence of LPA₂ receptors attenuated tumor formation^[187].

LPA₃ receptor

Table II

Kinases	Number	S/T/Y	Sequence	Localization
JAK 1, Btk	68	Y	RRFQPI Y YLLGNLA	Intracellular loop 1
PKA, PKC δ , PKC ζ	132	S	IAVERHR S VMAVQLH	Intracellular loop 2
VEGFR	232	Y	HVSCHPR Y RETTLSL	Intracellular loop 3
PKA, GRK 4	236	T	HPRYRET T LSLVKTV	Intracellular loop 3
PKC ζ , GRK 5	238	S	RYRETT S LVKTVVI	Intracellular loop 3
PKA, PKB, PKC α , β , δ , θ	305	T	RDAEMRR T FRRLCC	C-terminal
PKC α , β , θ , GRK 2	318	S	CCACL RQ STRESVHY	C-terminal
PKA, PKC η , ζ , GRK 2	322	S	LQRSTRE S VHYTSSA	C-terminal
PDGFR, VEGFR, Yes	325	Y	STRESVHY T SSAQQG	C-terminal
GRK 2, 3	327	S	RESVHY T SSAQQGAS	C-terminal
GRK 3	328	S	ESVHY T SSAQQGAST	C-terminal
PKC β , η , GRK 3	334	S	SSAQQG A STRIMPLE	C-terminal
GRK 2	349	S	NGHPLMD STL *****	C-terminal
GRK 2,	350	T	GHPLMD STL *****	C-terminal

Predicted phosphorylation sites in the human LPA₂ receptor. Indications as in Table I. Additional abbreviations: B lymphocyte kinase (Btk), VEGF receptor (VEGFR), c-yes protooncogene (Yes), Insulin receptor (InsR).

The LPA₃ receptor was an orphan GPCR^[88, 89]. Human *LPAR3* gene is located in chromosome locus 1p22.3-p31-1, it encodes a protein of 353 amino acids (estimated molecular mass of \approx 40 kDa)^[37, 40] (Fig. 4). Expression of this receptor subtype has been detected in brain, heart, pancreas, lung and in sex organs such as, testis, prostate, uterus (endometrium) and ovary^[40, 51, 90].

LPA₃ receptors exert their actions through modulation of $G\alpha_{i/o}$ and $G\alpha_{q/11}$ function and consequently their activation inhibits adenylyl cyclase, decreasing cyclic AMP levels, it increases phospholipase C (phosphoinositidase) activity generating diacylglycerol, which increases protein kinase C (PKC) activity, and IP₃, which increases intracellular free calcium. Interestingly,

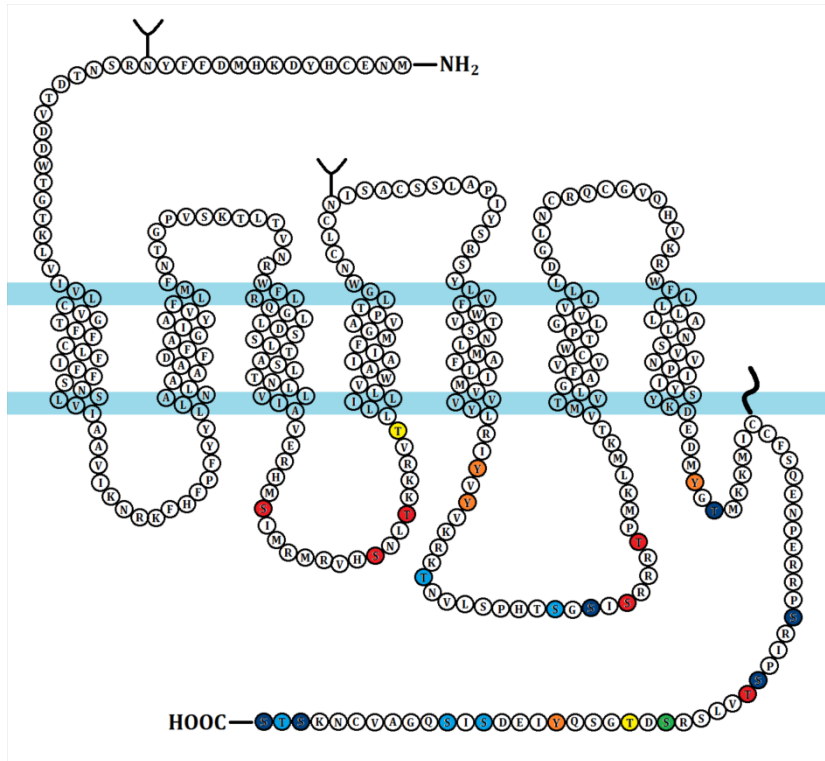


Fig 4. Schematic representation of the human LPA₃ receptor. Potential phosphorylation sites are indicated in colors with the kinase involved as follows: PKC, red; GRK, light blue; PKC and GRK, dark blue; PKA, yellow; Akt/PKB, green, and Tyrosine kinases, orange. For isozymes putatively involved and sites potentially targeted by several kinases, please see Table III. "Y" indicates potential glycosylation sites; "Z", potential palmitoylation sites; blue lines indicate plasma membrane region.

this receptor subtype does not appear to couple with $G\alpha_{12/13}$, which modulates the Rho pathway [40]. LPA₃ knockout female mice show alterations in embryo implantation and small litter size [40, 91], this seems to be mediated by phospholipase A₂ and cyclooxygenase activation, resulting in prostaglandin production and action in the endometrium [40, 90, 92]. There is little evidence for roles of LPA₃ receptors in nervous system functioning; however, recent evidence indicates that activation of this receptor subtype induces neurite branch formation, in neuronal cell lines [93]. Breast cancer aggressiveness has been associated with increased expression of LPA₃ and autotaxin [94].

Regulation of receptor function

GPCR function can be modulated by a very large number of processes with different mechanisms and time-frames. Changes in their steady state levels frequently involve modifications in their rates of synthesis and/ or degradation and represent long-term processes. However, changes in cell responsiveness to particular stimuli can be achieved rapidly within the range of minutes. Desensitization, defined operationally as diminished response to agonists, is a frequent adaptive response, that is induced by prolonged or repeated stimulation, but that can also be the result of brief receptor activation (homologous desensitization). Desensitization can also be induced rapidly by stimulation with agents unrelated with the receptor

affected (heterologous desensitization). These desensitizations are frequently associated with covalent modification of receptors and/ or of other molecular entities involved in their signaling, and can also involve changes in the receptor's cellular localization (plasma membrane vs. intracellular vesicles) [95, 96]. It is currently accepted that receptor phosphorylation is an initial event in desensitization that subsequently leads to GPCR internalization [95, 97]. In addition, it is currently accepted that homologous desensitization-associated receptor phosphorylation is mainly catalyzed by G protein-coupled receptor kinases (GRKs) [98] whereas receptor phosphorylation caused by heterologous stimuli is catalyzed by second messenger-activated kinases, such as protein kinase A (PKA) [99, 100] and PKC [101-108], and also by other kinases of several different families, such as protein kinase B (Akt/ PKB) [109], calcium/ calmodulin kinase 2 (CaMK2) [110], MAP kinases [111], as well as by non-receptor and receptor tyrosine kinases [112-116]. However, it is noteworthy to mention that desensitization can also take place in the absence of receptor phosphorylation because receptor interaction with different proteins might constitute a steric hindrance for efficient G protein coupling [117]. It is important to consider that, during desensitization a particular response is diminished but the process frequently represents a switch in signaling, initiating other cellular events [116, 118-122]. Not all GPCR phosphorylations are associated to desensitization; for example, it has been observed that

Table III

PKA, PKC α , δ , ζ	130	S	IAVERHMS S IMRMRVH	Intracellular loop 2
PKA, PKC α , ζ	138	S	IMRMRVH S NLTKKR	Intracellular loop 2
PKC α	141	T	MRVH S NLTKKRVTLL	Intracellular loop 2
PKA	146	T	NLTKKR V TLILLVW	Intracellular loop 2
Pyk 2	210	Y	VVVYLR I YVYVVKRKT	Intracellular loop 3
Pyk 2, JAK	212	Y	VYLR I YVYVVKRKTNV	Intracellular loop 3
PKA, GRK 5	217	T	YYYV K RKTNVLS P HT	Intracellular loop 3
GRK 4	225	S	NVLS P HT S GSISRRR	Intracellular loop 3
PKB, PKC α , ζ , GRK 4	227	S	LS P HT S GSISRRRTP	Intracellular loop 3
PKC α , β , γ , δ , η	229	S	PHT S GSISRRRTPMK	Intracellular loop 3
PKA, PKC α	233	T	GSISRR T PMKLMKT	Intracellular loop 3
Fgr, Fyn, Yes, Lyn, Lck, JAK 2, VEGFR	301	Y	SYKDEDM Y GTMKKMI	C-terminal
PKC θ , GRK 4, 5	303	T	KDEDM Y GT M KKMICC	C-terminal
PKA, PKC α , ζ , GRK 3	321	S	ENPERR P SRIPSTVL	C-terminal
PKA, PKC α , ϵ , GRK 3, 5	325	S	RR P SRIPSTVLSRSD	C-terminal
PKC γ	326	T	R P SRIP T VLSRSDT	C-terminal
Akt/PKB	331	S	PSTVLSR S DTGSQYI	C-terminal
PKA	333	T	TVLSRSD T GSQYIED	C-terminal
Fyn, Yes, VEGFR, PDGFR, InsR	337	Y	RS D TGSQY I EDSISQ	C-terminal
GRK 2	341	S	GSQY I EDSISQ G AVC	C-terminal
GRK 2	343	S	QY I EDSISQ G AVCNK	C-terminal
PKC γ , GRK 2, 3	351	S	QGAVCNK S T S *****	C-terminal
GRK 2	352	T	GAVCNK S T S *****	C-terminal
PKC γ , δ , ζ , GRK 1, 2, 4, 5	353	S	AVCNK S T S *****	C-terminal

Predicted phosphorylation sites in the human LPA₃ receptor. Indications as in Tables I and II. Additional abbreviations: VEGF receptor (VEGFR), proline-rich tyrosine kinase (Pyk), feline sarcoma viral oncogene homolog (Fgr), tyrosine protein kinases Fyn (Fyn), Lyn, (Lyn) and Lck (Lck).

Akt/PKB-catalyzed phosphorylation of sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P₁), at threonine 236, is required for its effect on endothelial migration, but not for other actions ^[123].

Current classic models for GPCR desensitization/internalization suggest that receptor activation (homologous), induces a conformational change that is transmitted to G proteins ^[124], leading to GDP-GTP exchange and G protein subunit dissociation. This promotes GRK binding which facilitates receptor phosphorylation. These ATP-dependent phospho-transfer reactions take place mainly on serine and threonine (but can also include tyrosine) residues present in the third intracellular loop and carboxyl terminus. β -Arrestins bind to the phosphorylated receptor, initiating the internalization process and setting G protein-independent signaling into motion ^[99, 101-105]. In the case of heterologous desensitization, second messenger-activated and other kinases phosphorylate consensus sites in different unstimulated GPCRs. To date, it is far from clear to what extent such phosphorylations lead to β -arrestin binding and even less is known regarding G protein-independent signaling. What it is known, is that many GPCRs can be phosphorylated, desensitized, and internalized by both, agonist-stimulation and in a heterologous manner. The concepts of homologous and heterologous desensitizations are operationally correct and useful, but at the molecular level the events are more complex (see later).

In many cases where there is evidence of GPCR phosphorylation, the phosphorylation sites remain unknown. Site-directed mutagenesis and mass spectrometry of purified receptors are the major techniques employed. Very interesting data from Tobin and coworkers have shown that the M₃ muscarinic acetylcholine receptor phosphopeptide maps differ in cell context-dependent fashion ^[110, 125-127]. Using different experimental tools the authors were also able to define that the muscarinic receptor phosphorylation varied in the same cell depending on the stimulus ^[125]. The possibility that different phosphorylation “bar codes” might explain varied functional responses, has been advanced ^[110, 125-127].

Regulation of LPA₁₋₃ receptor function

To the best of our knowledge, the only LPA receptor known to be subjected to phosphorylation is LPA₁ ^[46-49]. Agonist stimulation and activation of PKC induce LPA₁ receptor phosphorylation ^[46-50]. Conventional PKC isozymes α and β , seem to play major roles in LPA₁ phosphorylation and desensitization induced by phorbol esters ^[47, 50]. This family of protein kinases also participates in 17 β -estradiol-induced LPA₁ desensitization and phosphorylation, in a signaling cascade that involves the estrogen receptor α and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) activity ^[49]. Similarly, it has been observed that angiotensin II and EGF are also capable of inducing LPA₁ receptor phosphorylation and

desensitization^[47, 48]. Interestingly, LPA and angiotensin II induce plasma membrane HB-EGF shedding, which activates EGF receptors in autocrine/ paracrine fashion, and this contributes to LPA₁ phosphorylation and desensitization. Needless to say these findings indicate that homologous desensitization is not exclusively mediated through GRK. Similar observations have been made for the α_{1B} -adrenergic receptor^[128-131]. Heterologous desensitization is also complex at the molecular level because there is an intense crosstalk between PKC and other signaling kinases (such as Src or the MAP kinases) and also GRKs^[132-136]; therefore, it is possible that GRKs could participate in some “heterologous” desensitizations. The intense liaison between the EGF receptors and LPA₁ also involves Akt/PKB; i. e., LPA induces Akt/PKB phosphorylation / activation (as reflected by threonine 308 phosphorylation) but this effect is mediated through the EGF receptor via HB-EGF membrane shedding^[48]. This indicates that, on the one hand, some LPA-induced effects might involve EGF receptor stimulation but that, on the other hand, EGF activation leads to LPA₁ receptor desensitization.

Cell treatments with LPA or phorbol esters induce LPA₁ receptor internalization^[51-53]. LPA-induced receptor internalization takes place via a β -arrestin, dynamin2- and Rab5-dependent pathway^[51-53] whereas the phorbol ester-induced effect requires clathrin and the AP-2 complex, but not β -arrestin^[53]. Using a series of truncation mutants it was observed that a serine-rich domain (amino acids 341-347, SDRSASS) was required for agonist-induced internalization, while a dileucine motif (amino acids 352-353, IL) was required for the phorbol ester-induced effect^[53]. These data indicate that the structural requirements for LPA- and phorbol ester-induced LPA₁ receptor internalization are different^[53]. The causal relationship among receptor phosphorylation, desensitization and internalization has not yet been firmly established. The small GTPase, Ral, and GRK2 regulate LPA₁ signaling^[137]. Interestingly, the effect of GRK2 does not appear to require catalytic activity, because a dominant-negative mutant of this kinase also induces LPA₁ desensitization^[137]. As previously mentioned LPA₁ contains a PDZ-binding domain in its carboxyl tail and it is through this domain that it interacts with PDZ-containing GIPC (GTPase activating protein [RGS19]-interacting protein)^[64]. This binding promotes LPA₁ vesicular trafficking into early endosomes and attenuates signaling^[64]. PDZ-binding domain-lacking LPA₁ receptors are constitutively active, stimulate cell proliferation and lead to colony formation under serum-free conditions^[65].

Much less is known about LPA₂ receptor regulation.

This receptor subtype also harbors a PDZ-binding domain in its carboxyl tail. Expression of these receptors increases GIPC basal activity, but the agonist, LPA, was unable to intensify such activity^[137]. Interestingly LPA₂ (but not LPA₁) associates with a PDZ domain-containing scaffolding protein, i. e. the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 2; this association appears to increase receptor signaling through phospholipase C^[138] and channel function^[139]. Another PDZ-containing protein, MAGI-3, also interacts with LPA₂ and, in this case, exerts a negative modulation of signaling^[140]. In other words, LPA₂ signalling is modulated, in an opposing manner, by two PDZ-containing proteins. Other proteins also interact with the LPA₂ carboxyl tail^[141].

Information on LPA₃ regulation is limited to the modulation of its genetic expression, during the menstrual cycle through the action of progesterone and estrogen^[92, 142, 143].

Analysis of putative LPA₁₋₃ phosphorylation sites

Receptor sequences obtained from the UniProt database^[144, 145] [LPA₁ (Q92633, LPAR1_HUMAN), LPA₂ (Q9HBW0, LPAR2_HUMAN), and LPA₃ (Q9UBY5, LPAR3_HUMAN)], were subjected to alignments and analysis of putative phosphorylation sites using the Group Based Prediction System (GPS algorithm 2.1 v)^[146, 147] and the Swiss Institute of Bioinformatics, ExPASy-ClustalW^[148, 149], proteomic programs. The GPS algorithm is based on the hierarchical structure of protein kinases and the partition of the phosphorylation sites known into several groups. A phosphorylation site is predicted if it possesses significant sequence similarity to known phosphorylation sites in at least one group. The GPS program indicates the predicted phosphorylated peptide, the kinases most likely able to catalyze the phosphorylation, and a numerical score for each protein kinase^[146]. It is noteworthy that there is redundancy, i. e., many possible phosphorylation sites are putative targets of more than one protein kinase; this is indicated in Tables I-III, in which predicted phosphorylation sites for LPA₁₋₃ receptors are presented. Sites were analyzed for the following protein kinases: PKC isoforms, PKA, GRKs, Akt/PKB, CaMK, AMP-dependent protein kinase (AMPK), mitogen-activated protein kinases (ERK/MAPK), and tyrosine kinases. The majority of the predicted phosphorylation sites of LPA₁₋₃ receptors are located in their third intracellular loops and carboxyl termini, although some sites were also predicted in the first and second intracellular loops (Tables I-III). *In silico* analysis evidenced marked differences in predicted phosphorylation sites among the three receptors (Tables I-III, see also Fig. 5).

for the second intracellular loops was $\approx 23\%$, for third intracellular loops $\approx 28\%$, and for the carboxyl termini, only 9% (Fig. 5).

Despite this low amino acid sequence identity, alignment showed that three potentially phosphorylatable residues are conserved in the carboxyl termini of the three receptor subtypes. These include the following: a) T321 (LPA₁), T305 (LPA₂) and T303 (LPA₃), targeted in common by PKC and individually other protein kinases; b) S341 (LPA₁), S328 (LPA₂) and S331 (LPA₃), targeted by different protein kinases; and c) S362 (LPA₁), S349 (LPA₂) and S351 (LPA₃), targeted in common by GRK 2 and the site in LPA₃ also by PKC. There are also some conserved sites in which the GPS programs predict phosphorylation of only two of these (indicated in the same order, non-predicted to be phosphorylation targets in brackets): a) Y231 (LPA₁), [Y214] (LPA₂) and Y212 (LPA₃); b) S244 (LPA₁), [S227] (LPA₂) and S225 (LPA₃); and c) T252 (LPA₁), [T235] (LPA₂) and T233 (LPA₃). A putative phosphorylation site was detected in which the targeted amino acid changed in one receptor: S347 (LPA₁), S334 (LPA₂) and Y337 (LPA₃). The putative phosphorylation sites present in only two of these receptors include: a) S132 (LPA₂) and S130 (LPA₃); b) S255 (LPA₁) and S238 (LPA₂); and T350 (LPA₂) and T352 (LPA₃).

It was surprising to observe the presence of many putative PKA phosphorylation sites in the three LPA receptors studied; many of these were targets of different PKC isozymes.

It is clear that the *in silico* analysis presents a complex panorama, with many possible phosphorylatable sites and redundant action of different kinases. It offers, as well, the possibility of studying the role(s) of specific sites in receptor regulation by means of different conditions and stimuli. Obviously, this requires factual experimental demonstration. The use of mutants (truncated or site-directed) and mass spectrometry appears to be required to address this. It should be borne in mind that these processes take place in four dimensions, where location (3D) and time play key roles. The redundancy observed might also suggest the possibility that a given kinase or isoform might act on the receptor's susceptible sites during an initial time-frame, and then other kinase(s) might participate. It is also important to consider that receptor phosphorylation and the resulting phosphorylation bar-codes are likely very dynamic, resulting from the coordinate action of kinases and phosphatases, possibly reaching different short-lived signaling states. One can envision the study of these processes *in cellulo* through the use of microscopy, fluorescent probes and FRET and BRET techniques

^[150-152]. We are convinced that although the amount of information on LPA receptors is already very abundant, there are areas, such as receptor regulation, that offer niches of opportunity to many researchers and that are, in our opinion, relevant for understanding cell physiology and pathophysiology and promising for the development of better treatments of human and animal diseases.

Acknowledgements

Research in our laboratory is supported by Grants from CONACyT [177556 and 153278] and DGAPA-UNAM [200812]. AHM is a student of the Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas-UNAM and the recipient of a fellowship from CONACyT. The authors thank Mrs. Margaret Brunner, MA, for style corrections.

References

1. Im DS. Pharmacological tools for lysophospholipid GPCRs: development of agonists and antagonists for LPA and S1P receptors. *Acta Pharmacol Sin* 2010; 31: 1213-1222. <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2010.135> PMID:20729877
2. Jalink K, van Corven EJ, Moolenaar WH. Lysophosphatidic acid, but not phosphatidic acid, is a potent Ca²⁺(+)-mobilizing stimulus for fibroblasts. Evidence for an extracellular site of action. *J Biol Chem* 1990; 265: 12232-12239. PMID:2373690
3. Mills GB, Moolenaar WH. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 582-591. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1143> PMID:12894246
4. Hecht JH, Weiner JA, Post SR, Chun J. Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J Cell Biol* 1996; 135: 1071-1083. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.135.4.1071> PMID:8922387
5. Cremers B, Flesch M, Kostenis E, Maack C, Niedernberg A, Stoff A, et al. Modulation of myocardial contractility by lysophosphatidic acid (LPA). *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 71-80. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2828\(02\)00279-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2828(02)00279-1)
6. Toews ML, Ustinova EE, Schultz HD. Lysophosphatidic acid enhances contractility of isolated airway smooth muscle. *J Appl Physiol* 1997; 83: 1216-1222. PMID:9338431
7. Lee SJ, Leoni G, Neumann PA, Chun J, Nusrat A, Yun CC. Distinct phospholipase C-beta isozymes mediate lysophosphatidic acid receptor 1 effects on intestinal epithelial homeostasis and wound closure. *Mol Cell Biol* 2013; 33: 2016-2028. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00038-13> PMID:23478264 PMID:PMC3647975
8. David M, Machuca-Gayet I, Kikuta J, Ottewill P, Mima F, Leblanc R, et al. Lysophosphatidic acid receptor type 1

- (LPA1) plays a functional role in osteoclast differentiation and bone resorption activity. *J Biol Chem* 2014; 289: 6551-6564.
PMid:24429286
9. Gennero I, Laurencin-Dalcieux S, Conte-Auriol F, Briand-Mesange F, Laurencin D, Rue J, et al. Absence of the lysophosphatidic acid receptor LPA1 results in abnormal bone development and decreased bone mass. *Bone* 2011; 49: 395-403.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2011.04.018>
PMid:21569876 PMCid:PMC3697734
 10. Pradere JP, Gonzalez J, Klein J, Valet P, Gres S, Salant D, et al. Lysophosphatidic acid and renal fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1781: 582-587.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2008.04.001>
PMid:18455518 PMCid:PMC2577601
 11. Tager AM, LaCamera P, Shea BS, Campanella GS, Selman M, Zhao Z, et al. The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nature medicine* 2008; 14: 45-54.
<http://dx.doi.org/10.1038/nm1685>
PMid:18066075
 12. Toews ML, Ediger TL, Romberger DJ, Rennard SI. Lysophosphatidic acid in airway function and disease. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1582: 240-250.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1388-1981\(02\)00177-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1388-1981(02)00177-4)
 13. Knowlden S, Georas SN. The autotaxin-LPA axis emerges as a novel regulator of lymphocyte homing and inflammation. *J Immunol* 2014; 192: 851-857.
<http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1302831>
PMid:24443508
 14. Yang J, Nie Y, Wang F, Hou J, Cong X, Hu S, et al. Reciprocal regulation of miR-23a and lysophosphatidic acid receptor signaling in cardiomyocyte hypertrophy. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1831: 1386-1394.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2013.05.005>
PMid:23711961
 15. Marshall JC, Collins JW, Nakayama J, Horak CE, Liewehr DJ, Steinberg SM, et al. Effect of inhibition of the lysophosphatidic acid receptor 1 on metastasis and metastatic dormancy in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104: 1306-1319.
PMid:22911670 PMCid:PMC3611817
 16. Yang D, Yang W, Zhang Q, Hu Y, Bao L, Damirin A. Migration of gastric cancer cells in response to lysophosphatidic acid is mediated by LPA receptor 2. *Oncol Lett* 2013; 5: 1048-1052.
PMid:23426604 PMCid:PMC3576385
 17. Yun CC, Sun H, Wang D, Rusovici R, Castleberry A, Hall RA, et al. LPA2 receptor mediates mitogenic signals in human colon cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 289: C2-11.
<http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00610.2004>
PMid:15728708
 18. Xu Y, Fang XJ, Casey G, Mills GB. Lysophospholipids activate ovarian and breast cancer cells. *Biochem J* 1995; 309 (Pt 3): 933-940.
PMid:7639713 PMCid:PMC1135721
 19. Liao Y, Mu G, Zhang L, Zhou W, Zhang J, Yu H. Lysophosphatidic acid stimulates activation of focal adhesion kinase and paxillin and promotes cell motility, via LPA1-3, in human pancreatic cancer. *Dig Dis Sci* 2013; 58: 3524-3533.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10620-013-2878-4>
PMid:24061591
 20. Kato K, Yoshikawa K, Tanabe E, Kitayoshi M, Fukui R, Fukushima N, et al. Opposite roles of LPA1 and LPA3 on cell motile and invasive activities of pancreatic cancer cells. *Tumour Biol* 2012; 33: 1739-1744.
<http://dx.doi.org/10.1007/s13277-012-0433-0>
PMid:22678979
 21. Park SY, Jeong KJ, Panupinthu N, Yu S, Lee J, Han JW, et al. Lysophosphatidic acid augments human hepatocellular carcinoma cell invasion through LPA1 receptor and MMP-9 expression. *Oncogene* 2011; 30: 1351-1359.
<http://dx.doi.org/10.1038/onc.2010.517>
PMid:21102517
 22. Sakai N, Chun J, Duffield JS, Wada T, Luster AD, Tager AM. LPA1-induced cytoskeleton reorganization drives fibrosis through CTGF-dependent fibroblast proliferation. *FASEB J* 2013; 27: 1830-1846.
<http://dx.doi.org/10.1096/fj.12-219378>
PMid:23322166 PMCid:PMC3633809
 23. Jalink K, Eichholtz T, Postma FR, van Corven EJ, Moolenaar WH. Lysophosphatidic acid induces neuronal shape changes via a novel, receptor-mediated signaling pathway: similarity to thrombin action. *Cell Growth Differ* 1993; 4: 247-255.
PMid:7684247
 24. Mori M, Tsushima H. Activation of Rho signaling contributes to lysophosphatidic acid-induced contraction of intact ileal smooth muscle of guinea-pig. *Can J Physiol Pharmacol* 2000; 78: 729-736.
<http://dx.doi.org/10.1139/y00-050>
 25. Tigyi G, Fischer DJ, Sebok A, Yang C, Dyer DL, Milei R. Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: control by phosphoinositide-Ca²⁺ signaling and Rho. *J Neurochem* 1996; 66: 537-548.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66020537.x>
PMid:8592123
 26. Manning TJ, Jr., Rosenfeld SS, Sontheimer H. Lysophosphatidic acid stimulates actomyosin contraction in astrocytes. *J Neurosci Res* 1998; 53: 343-352.
[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19980801\)53:3<343::AID-JNR8>3.0.CO;2-A](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19980801)53:3<343::AID-JNR8>3.0.CO;2-A)
 27. Moolenaar WH. Mitogenic action of lysophosphatidic acid. *Adv Cancer Res* 1991; 57: 87-102.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)60996-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-230X(08)60996-3)
 28. Gerrard JM, Clawson CC, White JG. Lysophosphatidic acids: III. Enhancement of neutrophil chemotaxis. *Am J Pathol* 1980; 100: 609-618.
PMid:7416233 PMCid:PMC1903568
 29. Ye X, Ishii I, Kingsbury MA, Chun J. Lysophosphatidic acid as a novel cell survival/apoptotic factor. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1585: 108-113.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1388-1981\(02\)00330-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1388-1981(02)00330-X)
 30. Li Y, Gonzalez MI, Meinkoth JL, Field J, Kazanietz MG, Tennekoon GI. Lysophosphatidic acid promotes survival and differentiation of rat Schwann cells. *J Biol Chem* 2003; 278:

- 9585-9591.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M213244200>
 PMid:12524451
31. Holtsberg FW, Steiner MR, Keller JN, Mark RJ, Mattson MP, Steiner SM. Lysophosphatidic acid induces necrosis and apoptosis in hippocampal neurons. *J Neurochem* 1998; 70: 66-76.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70010066.x>
 PMid:9422348
32. Tigyi G. Special issue: Advances in Lysophospholipid Research. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1831: 1-250.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2012.09.011>
 PMid:23010474
33. Tigyi G. Special issue: Lysophospholipids. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1781: 423-600.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2008.08.003>
 PMid:18760233
34. Chun J, Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, Moolenaar W, et al. International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 265-269.
<http://dx.doi.org/10.1124/pr.54.2.265>
 PMid:12037142
35. Chun J, Hla T, Lynch KR, Spiegel S, Moolenaar WH. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 2010; 62: 579-587.
<http://dx.doi.org/10.1124/pr.110.003111>
 PMid:21079037 PMCid:PMC2993255
36. Davenport AP, Alexander SP, Sharman JL, Pawson AJ, Benson HE, Monaghan AE, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXVIII. G protein-coupled receptor list: recommendations for new pairings with cognate ligands. *Pharmacol Rev* 2013; 65: 967-986.
<http://dx.doi.org/10.1124/pr.112.007179>
 PMid:23686350 PMCid:PMC3698937
37. Chun J, Hla T, Moolenaar WH, Spiegel S, Yung YC, Mpmahanga CP. IUPHAR Database, in, vol. 2014, IUPHAR, <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=36>, 2014.
38. Kihara Y, Maceyka M, Spiegel S, Chun J. Lysophospholipid receptor nomenclature review: IUPHAR Review 8. *Br J Pharmacol* 2014; n/a-n/a.
39. Aoki J, Inoue A, Okudaira S. Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1781: 513-518.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2008.06.005>
 PMid:18621144
40. Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee CW, Mutoh T, et al. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50: 157-186.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105753>
 PMid:20055701
41. Yung YC, Stoddard NC, Chun J. LPA Receptor Signaling: Pharmacology, Physiology, and Pathophysiology. *J Lipid Res* 2014.
<http://dx.doi.org/10.1194/jlr.R046458>
 PMid:24643338
42. Brindley DN, Pilquill C. Lipid phosphate phosphatases and signaling. *J Lipid Res* 2009; 50 Suppl: S225-S230.
<http://dx.doi.org/10.1194/jlr.R800055-JLR200>
 PMid:19066402 PMCid:PMC2674702
43. Sandmann G, Siess W, Essler M. Lysophosphatidic acid is the unique platelet-activating substance in human malignant ascites. *Eur J Med Res* 2003; 8: 397-404.
 PMid:14555295
44. McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, St Hilaire A, Xu Y, Hinshaw JC, et al. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 131-136.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0135855100>
 PMid:12502787 PMCid:PMC140905
45. Tabata K, Baba K, Shiraiishi A, Ito M, Fujita N. The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363: 861-866.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.09.063>
 PMid:17905198
46. Avenda-o-Vázquez SE, Cabrera-Wrooman A, Colín-Santana CC, Garcá-Sánchez JA. Lysophosphatidic acid LPA1 receptor close-up. *Signal Transduc* 2007; 7: 351-363.
<http://dx.doi.org/10.1002/sita.200700138>
47. Avenda-o-Vázquez SE, Garcá-Caballero A, Garcá-Sánchez JA. Phosphorylation and desensitization of the lysophosphatidic acid receptor LPA1. *Biochem J* 2005; 385: 677-684.
<http://dx.doi.org/10.1042/BJ20040891>
 PMid:15369458 PMCid:PMC1134742
48. Colín-Santana CC, Avenda-o-Vázquez SE, Alcántara-Hernández R, Garcá-Sánchez JA. EGF and angiotensin II modulate lysophosphatidic acid LPA(1) receptor function and phosphorylation state. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1810: 1170-1177.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.08.016>
 PMid:21914461
49. González-Arenas A, Avenda-o-Vázquez SE, Cabrera-Wrooman A, Tapia-Carrillo D, Larrea F, Garcá-Becerra R, et al. Regulation of LPA receptor function by estrogens. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 253-262.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.11.014>
 PMid:18166159
50. Hernández-Méndez A, Alcántara-Hernández R, Acosta-Cervantes GC, Martínez-Ortiz J, Avendano-Vázquez SE, Garcá-Sánchez JA. Conventional protein kinase C isoforms mediate phorbol ester-induced lysophosphatidic acid LPA1 receptor phosphorylation. *Eur J Pharmacol* 2014; 723: 124-130.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.043>
 PMid:24355769
51. Murph MM, Nguyen GH, Radhakrishna H, Mills GB. Sharpening the edges of understanding the structure/function of the LPA1 receptor: expression in cancer and mechanisms of regulation. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1781: 547-557.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2008.04.007>
 PMid:18501205 PMCid:PMC2565514
52. Murph MM, Scaccia LA, Volpicelli LA, Radhakrishna H. Agonist-induced endocytosis of lysophosphatidic

- acid-coupled LPA1/EDG-2 receptors via a dynamin2- and Rab5-dependent pathway. *J Cell Sci* 2003; 116: 1969-1980.
<http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00397>
 PMid:12668728
53. Urs NM, Kowalczyk AP, Radhakrishna H. Different mechanisms regulate lysophosphatidic acid (LPA)-dependent versus phorbol ester-dependent internalization of the LPA1 receptor. *J Biol Chem* 2008; 283: 5249-5257.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M710003200>
 PMid:18089565
54. Mutoh T, Rivera R, Chun J. Insights into the pharmacological relevance of lysophospholipid receptors. *Br J Pharmacol* 2012; 165: 829-844.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01622.x>
 PMid:21838759 PMCid:PMC3312481
55. Swaney JS, Chapman C, Correa LD, Stebbins KJ, Broadhead AR, Bain G, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of an oral lysophosphatidic acid type 1 receptor-selective antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 336: 693-700.
<http://dx.doi.org/10.1124/jpet.110.175901>
 PMid:21159750
56. East JE, Carter KM, Kennedy PC, Schulte NA, Toews ML, Lynch KR, et al. Development of a phosphatase-resistant, L-tyrosine derived LPA1/LPA3 dual antagonist. *Med Chem Comm* 2011; 2: 325-330.
<http://dx.doi.org/10.1039/c0md00273a>
 PMid:22180836 PMCid:PMC3237054
57. Lynch KR, Macdonald TL. Structure-activity relationships of lysophosphatidic acid analogs. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1582: 289-294.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1388-1981\(02\)00183-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1388-1981(02)00183-X)
58. Tigyi G. Aiming drug discovery at lysophosphatidic acid targets. *Br J Pharmacol* 2010; 161: 241-270.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00815.x>
 PMid:20735414 PMCid:PMC2989581
59. Beck HP, Kohn T, Rubenstein S, Hedberg C, Schwandner R, Hasslinger K, et al. Discovery of potent LPA2 (EDG4) antagonists as potential anticancer agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; 18: 1037-1041.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.12.024>
 PMid:18178086
60. Choi JW, Lee CW, Chun J. Biological roles of lysophospholipid receptors revealed by genetic null mice: an update. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1781: 531-539.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2008.03.004>
 PMid:18407842 PMCid:PMC2657083
61. Mausbacher N, Schreiber TB, Machatti M, Schaab C, Daub H. Proteome-wide analysis of temporal phosphorylation dynamics in lysophosphatidic acid-induced signaling. *Proteomics* 2012; 12: 3485-3498.
<http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201200172>
 PMid:23090842
62. An S, Bleu T, Hallmark OG, Goetzl EJ. Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 1998; 273: 7906-7910.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.14.7906>
 PMid:9525886
63. An S, Dickens MA, Bleu T, Hallmark OG, Goetzl EJ. Molecular cloning of the human Edg2 protein and its identification as a functional cellular receptor for lysophosphatidic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231: 619-622.
<http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1997.6150>
 PMid:9070858
64. Varsano T, Taupin V, Guo L, Bateria OY, Jr., Farquhar MG. The PDZ protein GIPC regulates trafficking of the LPA1 receptor from APPL signaling endosomes and attenuates the cell's response to LPA. *PLoS One* 2012; 7: e49227.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0049227>
 PMid:23145131 PMCid:PMC3493537
65. Shano S, Hatanaka K, Ninose S, Moriyama R, Tsujiuchi T, Fukushima N. A lysophosphatidic acid receptor lacking the PDZ-binding domain is constitutively active and stimulates cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 748-759.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.11.013>
 PMid:18157949
66. Anliker B, Choi JW, Lin ME, Gardell SE, Rivera RR, Kennedy G, et al. Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptor, LPA1, influence embryonic schwann cell migration, myelination, and cell-to-axon segregation. *Glia* 2013; 61: 2009-2022.
<http://dx.doi.org/10.1002/glia.22572>
 PMid:24115248
67. Shano S, Moriyama R, Chun J, Fukushima N. Lysophosphatidic acid stimulates astrocyte proliferation through LPA1. *Neurochem Int* 2008; 52: 216-220.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2007.07.004>
 PMid:17692995 PMCid:PMC3265988
68. Pilpel Y, Segal M. The role of LPA1 in formation of synapses among cultured hippocampal neurons. *J Neurochem* 2006; 97: 1379-1392.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03825.x>
 PMid:16638019
69. Sayas CL, Ariaens A, Ponsioen B, Moolenaar WH. GSK-3 is activated by the tyrosine kinase Pyk2 during LPA1-mediated neurite retraction. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 1834-1844.
<http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E05-07-0688>
 PMid:16452634 PMCid:PMC1415316
70. Musazzi L, Di Daniel E, Maycox P, Racagni G, Popoli M. Abnormalities in alpha/beta-CaMKII and related mechanisms suggest synaptic dysfunction in hippocampus of LPA1 receptor knockout mice. *Int J Neuropsychopharmacol* 2011; 14: 941-953.
<http://dx.doi.org/10.1017/S1461145710001240>
 PMid:20942999
71. Matas-Rico E, Garcia-Diaz B, Llebreg-Zayas P, Lopez-Barroso D, Santin L, Pedraza C, et al. Deletion of lysophosphatidic acid receptor LPA1 reduces neurogenesis in the mouse dentate gyrus. *Mol Cell Neurosci* 2008; 39: 342-355.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2008.07.014>
 PMid:18708146 PMCid:PMC3667670
72. Estivill-Torrus G, Llebreg-Zayas P, Matas-Rico E, Santin L, Pedraza C, De Diego I, et al. Absence of LPA1 signaling results in defective cortical development. *Cereb Cortex* 2008; 18: 938-950.

- <http://dx.doi.org/10.1093/cercor/bhm132>
PMid:17656621
73. Contos JJ, Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Chun J. Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 13384-13389.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.24.13384>
PMid:11087877 PMCid:PMC27233
74. Castilla-Ortega E, Rosell-Valle C, Blanco E, Pedraza C, Chun J, Rodriguez de Fonseca F, et al. Reduced wheel running and blunted effects of voluntary exercise in LPA1-null mice: the importance of assessing the amount of running in transgenic mice studies. *Neurosci Res* 2013; 77: 170-179.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2013.09.004>
PMid:24055600
75. Castilla-Ortega E, Sanchez-Lopez J, Hoyo-Becerra C, Matas-Rico E, Zambrana-Infantes E, Chun J, et al. Exploratory, anxiety and spatial memory impairments are dissociated in mice lacking the LPA1 receptor. *Neurobiol Learn Mem* 2010; 94: 73-82.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2010.04.003>
PMid:20388543 PMCid:PMC3684252
76. Roberts C, Winter P, Shilliam CS, Hughes ZA, Langmead C, Maycox PR, et al. Neurochemical changes in LPA1 receptor deficient mice--a putative model of schizophrenia. *Neurochem Res* 2005; 30: 371-377.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11064-005-2611-6>
PMid:16018581
77. Halder SK, Yano R, Chun J, Ueda H. Involvement of LPA1 receptor signaling in cerebral ischemia-induced neuropathic pain. *Neuroscience* 2013; 235: 10-15.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.005>
PMid:23318243
78. Herr KJ, Herr DR, Lee CW, Noguchi K, Chun J. Stereotyped fetal brain disorganization is induced by hypoxia and requires lysophosphatidic acid receptor 1 (LPA1) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 15444-15449.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1106129108>
PMid:21878565 PMCid:PMC3174597
79. Yang C, Lafleur J, Mwaikambo BR, Zhu T, Gagnon C, Chemtob S, et al. The role of lysophosphatidic acid receptor (LPA1) in the oxygen-induced retinal ganglion cell degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 1290-1298.
<http://dx.doi.org/10.1167/iovs.08-1920>
PMid:18978343
80. Yung YC, Mutoh T, Lin ME, Noguchi K, Rivera RR, Choi JW, et al. Lysophosphatidic acid signaling may initiate fetal hydrocephalus. *Sci Transl Med* 2011; 3: 99ra87.
<http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3002095>
PMid:21900594 PMCid:PMC3653407
81. Lee SJ, Chan TH, Chen TC, Liao BK, Hwang PP, Lee H. LPA1 is essential for lymphatic vessel development in zebrafish. *FASEB J* 2008; 22: 3706-3715.
<http://dx.doi.org/10.1096/fj.08-106088>
PMid:18606866
82. Jeon ES, Lee IH, Heo SC, Shin SH, Choi YJ, Park JH, et al. Mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis in a murine xenograft model of A549 human adenocarcinoma through an LPA1 receptor-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1801: 1205-1213.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaliip.2010.08.003>
PMid:20708100
83. Contos JJ, Chun J. Genomic characterization of the lysophosphatidic acid receptor gene, lp(A2)/Edg4, and identification of a frameshift mutation in a previously characterized cDNA. *Genomics* 2000; 64: 155-169.
<http://dx.doi.org/10.1006/geno.2000.6122>
PMid:10729222
84. Jeong KJ, Park SY, Seo JH, Lee KB, Choi WS, Han JW, et al. Lysophosphatidic acid receptor 2 and Gi/Src pathway mediate cell motility through cyclooxygenase 2 expression in CAO-V-3 ovarian cancer cells. *Exp Mol Med* 2008; 40: 607-616.
<http://dx.doi.org/10.3858/em.2008.40.6.607>
PMid:19116446 PMCid:PMC2679339
85. Yu S, Murph MM, Lu Y, Liu S, Hall HS, Liu J, et al. Lysophosphatidic acid receptors determine tumorigenicity and aggressiveness of ovarian cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 1630-1642.
<http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djn378>
PMid:19001604 PMCid:PMC2720766
86. Hope JM, Wang FQ, Whyte JS, Ariztia EV, Abdalla W, Long K, et al. LPA receptor 2 mediates LPA-induced endometrial cancer invasion. *Gynecol Oncol* 2009; 112: 215-223.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.09.019>
PMid:19019417
87. Lin S, Wang D, Iyer S, Ghaleb AM, Shim H, Yang VW, et al. The absence of LPA2 attenuates tumor formation in an experimental model of colitis-associated cancer. *Gastroenterology* 2009; 136: 1711-1720.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085\(09\)60515-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085(09)60515-1)
<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.002>
PMid:19328876 PMCid:PMC2691721
88. Im DS, Heise CE, Harding MA, George SR, O'Dowd BF, Theodorescu D, et al. Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate. *Mol Pharmacol* 2000; 57: 753-759.
PMid:10727522
89. Bandoh K, Aoki J, Hosono H, Kobayashi S, Kobayashi T, Murakami-Murofushi K, et al. Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 1999; 274: 27776-27785.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.39.27776>
PMid:10488122
90. Ye X, Herr DR, Diao H, Rivera R, Chun J. Unique uterine localization and regulation may differentiate LPA3 from other lysophospholipid receptors for its role in embryo implantation. *Fertil Steril* 2011; 95: 2107-2113, 2113 e2101-2104.
91. Ye X, Hama K, Contos JJ, Anliker B, Inoue A, Skinner MK, et al. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature* 2005; 435: 104-108.
<http://dx.doi.org/10.1038/nature03505>
PMid:15875025 PMCid:PMC1369590
92. Hama K, Aoki J, Inoue A, Endo T, Amano T, Motoki R, et al. Embryo spacing and implantation timing are differentially regulated by LPA3-mediated lysophosphatidic acid signaling

- in mice. *Biol Reprod* 2007; 77: 954-959.
<http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.107.060293>
 PMid:17823089
93. Furuta D, Yamane M, Tsujiuchi T, Moriyama R, Fukushima N. Lysophosphatidic acid induces neurite branch formation through LPA₃. *Mol Cell Neurosci* 2012; 50: 21-34.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2012.03.006>
 PMid:22465231
94. Popnikolov NK, Dalwadi BH, Thomas JD, Johannes GJ, Imagawa WT. Association of autotaxin and lysophosphatidic acid receptor 3 with aggressiveness of human breast carcinoma. *Tumour Biol* 2012; 33: 2237-2243.
<http://dx.doi.org/10.1007/s13277-012-0485-1>
 PMid:22922883
95. Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 1-24.
 PMid:11171937
96. Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* 1998; 273: 18677-18680.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.30.18677>
 PMid:9668034
97. Rapacciuolo A, Suvarna S, Barki-Harrington L, Luttrell LM, Cong M, Lefkowitz RJ, et al. Protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation mediates beta-1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways. *J Biol Chem* 2003; 278: 35403-35411.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M305675200>
 PMid:12821660
98. Penn RB, Pronin AN, Benovic JL. Regulation of G protein-coupled receptor kinases. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 81-89.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1050-1738\(00\)00053-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1050-1738(00)00053-0)
99. AbdAlla S, Lother H, el Massiery A, Quittner U. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med* 2001; 7: 1003-1009.
<http://dx.doi.org/10.1038/nm0901-1003>
 PMid:11533702
100. Tran TM, Friedman J, Qunaibi E, Baameur F, Moore RH, Clark RB. 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 Pharmacol* 2004; 65: 196-206.
<http://dx.doi.org/10.1124/mol.65.1.196>
 PMid:14722251
101. Diviani D, Lattion AL, Cotecchia S. Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the alpha_{1B}-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1997; 272: 28712-28719.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.45.28712>
 PMid:9353340
102. Lattion AL, Diviani D, Cotecchia S. Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the alpha_{1B}-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 22887-22893.
 PMid:8077240
103. Garcá-Sánchez JA, Vázquez-Prado J, Medina LC. Alpha₁-adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur J Pharmacol* 2000; 389: 1-12.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00896-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00896-1)
104. Vázquez-Prado J, Casas-González P, Garcá-Sánchez JA. G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cell Signal* 2003; 15: 549-557.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0898-6568\(02\)00151-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0898-6568(02)00151-1)
105. Garcá-Sánchez JA, Vázquez-Cuevas FG, Romero-Ávila MT. Phosphorylation and desensitization of alpha_{1D}-adrenergic receptors. *Biochem J* 2001; 353: 603-610.
<http://dx.doi.org/10.1042/0264-6021:3530603>
 PMid:11171057 PMCID:PMC1221606
106. Vázquez-Prado J, Garcá-Sánchez JA. Effect of phorbol myristate acetate on alpha₁-adrenergic action in cells expressing recombinant alpha₁-adrenoceptor subtypes. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 17-22.
 PMid:8700110
107. Vázquez-Prado J, Medina LC, Garcá-Sánchez JA. Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of alpha_{1B}-adrenoreceptors in Rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem* 1997; 272: 27330-27337.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.43.27330>
 PMid:9341183
108. Vázquez-Prado J, Medina LC, Romero-Ávila MT, González-Espinosa C, Garcá-Sánchez JA. Norepinephrine- and phorbol ester-induced phosphorylation of alpha_{1A}-adrenergic receptors. Functional aspects. *J Biol Chem* 2000; 275: 6553-6559.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.9.6553>
 PMid:10692461
109. Doronin S, Shumay E, Wang HY, Malbon CC. Akt mediates sequestration of the beta₂-adrenergic receptor in response to insulin. *J Biol Chem* 2002; 277: 15124-15131.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M108771200>
 PMid:11809767
110. Torrecilla I, Spragg EJ, Poulin B, McWilliams PJ, Mistry SC, Blaukat A, et al. Phosphorylation and regulation of a G protein-coupled receptor by protein kinase CK2. *J Cell Biol* 2007; 177: 127-137.
<http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200610018>
 PMid:17403928 PMCID:PMC2064117
111. Schmidt H, Schulz S, Klutzny M, Koch T, Handel M, Hollt V. Involvement of mitogen-activated protein kinase in agonist-induced phosphorylation of the mu-opioid receptor in HEK 293 cells. *J Neurochem* 2000; 74: 414-422.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0740414.x>
 PMid:10617147
112. Baltensperger K, Karoor V, Paul H, Ruoho A, Czech MP, Malbon CC. The beta-adrenergic receptor is a substrate for the insulin receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1996; 271: 1061-1064.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.2.1061>
 PMid:8557631
113. Doronin S, Wang Hy HY, Malbon CC. Insulin stimulates phosphorylation of the beta₂-adrenergic receptor by the

- insulin receptor, creating a potent feedback inhibitor of its tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2002; 277: 10698-10703.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109432200>
 PMid:11782469
114. Gavi S, Shumay E, Wang HY, Malbon CC. G-protein-coupled receptors and tyrosine kinases: crossroads in cell signaling and regulation. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17: 48-54.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2006.01.006>
 PMid:16460957
115. Fessart D, Simaan M, Laporte SA. c-Src regulates clathrin adapter protein 2 interaction with beta-arrestin and the angiotensin II type 1 receptor during clathrin-mediated internalization. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 491-503.
<http://dx.doi.org/10.1210/me.2004-0246>
 PMid:15498833
116. Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, et al. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 1999; 283: 655-661.
<http://dx.doi.org/10.1126/science.283.5402.655>
 PMid:9924018
117. Ferguson SS. Phosphorylation-independent attenuation of GPCR signalling. *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28: 173-179.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2007.02.008>
 PMid:17350109
118. Lefkowitz RJ, Pierce KL, Luttrell LM. Dancing with different partners: protein kinase a phosphorylation of seven membrane-spanning receptors regulates their G protein-coupling specificity. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 971-974.
<http://dx.doi.org/10.1124/mol.62.5.971>
 PMid:12391258
119. Luttrell LM. Activation and targeting of mitogen-activated protein kinases by G-protein-coupled receptors. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80: 375-382.
<http://dx.doi.org/10.1139/y02-045>
 PMid:12056542
120. Lefkowitz RJ. A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 2013; 52: 6366-6378.
<http://dx.doi.org/10.1002/anie.201301924>
 PMid:23650015
121. Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 373-386.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrd3024>
 PMid:20431569 PMCID:PMC2902265
122. Shenoy SK, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2005; 2005: cm10.
123. Lee MJ, Thangada S, Paik JH, Sapkota GP, Ancellin N, Chae SS, et al. Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Mol Cell* 2001; 8: 693-704.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00324-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00324-0)
124. Kobilka B. The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 2013; 52: 6380-6388.
<http://dx.doi.org/10.1002/anie.201302116>
 PMid:23650120 PMCID:PMC4031317
125. Butcher AJ, Prihandoko R, Kong KC, McWilliams P, Edwards JM, Bottrill A, et al. Differential G-protein-coupled Receptor Phosphorylation Provides Evidence for a Signaling Bar Code. *J Biol Chem* 2011; 286: 11506-11518.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.154526>
 PMid:21177246 PMCID:PMC3064205
126. Tobin AB. G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom. *Br J Pharmacol* 2008; 153 Suppl 1: S167-S176.
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0707662>
 PMid:18193069 PMCID:PMC2268057
127. Tobin AB, Butcher AJ, Kong KC. Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling. *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29: 413-420.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2008.05.006>
 PMid:18606460 PMCID:PMC2880250
128. Casas-González P, Garcá-Sáñz JA. Role of epidermal growth factor receptor transactivation in alpha1B-adrenoceptor phosphorylation. *Eur J Pharmacol* 2006; 542: 31-36.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.05.031>
 PMid:16828079
129. Casas-González P, Ruiz-Martínez A, Garcá-Sáñz JA. Lysophosphatidic acid induces alpha-1b-adrenergic receptor phosphorylation through G-beta-gamma, phosphoinositide 3-kinase, protein kinase C and epidermal growth factor receptor transactivation. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1633: 75-83.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1388-1981\(03\)00089-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1388-1981(03)00089-1)
130. Castillo-Badillo JA, Molina-Munoz T, Romero-Avila MT, Vazquez-Macias A, Rivera R, Chun J, et al. Sphingosine 1-phosphate-mediated alpha1B-adrenoceptor desensitization and phosphorylation. Direct and paracrine/autocrine actions. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1823: 245-254.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.10.002>
 PMid:22019450 PMCID:PMC3273635
131. Garcá-Sáñz JA, Romero-Ávila MT, Alcántara-Hernández R. Mechanisms involved in alpha(1B) -adrenoceptor desensitization. *IUBMB Life* 2011; 63: 811-815.
<http://dx.doi.org/10.1002/iub.519>
 PMid:21815242
132. Krasel C, Dammeier S, Winstel R, Brockmann J, Mischak H, Lohse MJ. Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin. *J Biol Chem* 2001; 276: 1911-1915.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M008773200>
 PMid:11042191
133. Pronin AN, Benovic JL. Regulation of the G protein-coupled receptor kinase GRK5 by protein kinase C. *J Biol Chem* 1997; 272: 3806-3812.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.6.3806>
134. Elorza A, Sarnago S, Mayor F, Jr. Agonist-dependent modulation of G protein-coupled receptor kinase 2 by mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol* 2000; 57: 778-783.
 PMid:10727525

135. Penela P, Ribas C, Mayor F, Jr. Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal* 2003; 15: 973-981.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0898-6568\(03\)00099-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0898-6568(03)00099-8)
136. Sarnago S, Elorza A, Mayor F, Jr. Agonist-dependent phosphorylation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) by Src tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1999; 274: 34411-34416.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.48.34411>
PMid:10567420
137. Aziziyeh AI, Li TT, Pape C, Pampillo M, Chidiac P, Possmayer F, et al. Dual regulation of lysophosphatidic acid (LPA1) receptor signalling by Ral and GRK. *Cell Signal* 2009; 21: 1207-1217.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.03.011>
PMid:19306925
138. Oh YS, Jo NW, Choi JW, Kim HS, Seo SW, Kang KO, et al. NHERF2 specifically interacts with LPA2 receptor and defines the specificity and efficiency of receptor-mediated phospholipase C-beta3 activation. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 5069-5079.
<http://dx.doi.org/10.1128/MCB.24.11.5069-5079.2004>
PMid:15143197 PMCid:PMC416407
139. Holcomb J, Jiang Y, Lu G, Trescott L, Brunzelle J, Sirinupong N, et al. Structural insights into PDZ-mediated interaction of NHERF2 and LPA2, a cellular event implicated in CFTR channel regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 446: 399-403.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.128>
PMid:24613836
140. Lee SJ, Ritter SL, Zhang H, Shim H, Hall RA, Yun CC. MAGI-3 competes with NHERF-2 to negatively regulate LPA2 receptor signaling in colon cancer cells. *Gastroenterology* 2011; 140: 924-934.
<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.11.054>
PMid:21134377 PMCid:PMC3057353
141. Lin FT, Lai YJ. Regulation of the LPA2 receptor signaling through the carboxyl-terminal tail-mediated protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1781: 558-562.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2008.04.013>
PMid:18501721 PMCid:PMC2574565
142. Guo H, Gong F, Luo KL, Lu GX. Cyclic regulation of LPA3 in human endometrium. *Arch Gynecol Obstet* 2013; 287: 131-138.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00404-012-2479-z>
PMid:22872026
143. Hama K, Aoki J, Bando K, Inoue A, Endo T, Amano T, et al. Lysophosphatidic receptor, LPA3, is positively and negatively regulated by progesterone and estrogen in the mouse uterus. *Life Sci* 2006; 79: 1736-1740.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2006.06.002>
PMid:16815476
144. UniProt C. The UniProt Consortium, in, <http://www.uniprot.org/>, 2014.
145. UniProt C. Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* 2014; 42: D191-198.
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1140>
PMid:24253303 PMCid:PMC3965022
146. Xue Y, Ren J, Gao X, Jin C, Wen L, Yao X. GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 1598-1608.
<http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M700574-MCP200>
PMid:18463090 PMCid:PMC2528073
147. GPS. Group-based Prediction System, in, <http://gps.biocuckoo.org/index.php>, 2014
148. SIB. ExPASy, in, Swiss Institute of Bioinformatics, <http://www.expasy.org/>;
<http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>, 2014
149. Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: W597-603.
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks400>
PMid:22661580 PMCid:PMC3394269
150. Castillo-Badillo JA, Cabrera-Wrooman A, García-Sánchez JA. Visualizing G Protein-coupled Receptors in Action through Confocal Microscopy Techniques. *Arch Med Res* 2014.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.03.009>
PMid:24751328
151. Boute N, Jockers R, Issad T. The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 351-354.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)02062-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-6147(02)02062-X)
152. Salahpour A, Espinoza S, Masri B, Lam V, Barak LS, Gainetdinov RR. BRET biosensors to study GPCR biology, pharmacology, and signal transduction. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3: 105.

To cite this article: Aurelio Hernández-Méndez, et al. Lysophosphatidic acid LPA₁₋₃ receptors: signaling, regulation and *in silico* analysis of their putative phosphorylation sites. *Receptor Clin Invest* 2014; 1: 236-252. doi: 10.14800/rci.193.