



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**Facultad de Medicina**

**Licenciatura en Investigación Biomédica Básica**

Regulación por Fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub>

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
Licenciada en Investigación Biomédica Básica

PRESENTA:  
Silvana Bazúa Valenti

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Jesús Adolfo García Sáinz  
Departamento de Biología Celular y del Desarrollo  
Instituto de Fisiología Celular  
UNAM

MÉXICO, D. F. mayo, 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo se realizó bajo la tutoría del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, en el laboratorio 303 Sur del Departamento de Biología Celular y del Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Este trabajo constituye parte del proyecto de investigación apoyado por el donativo No. 177556 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como por el donativo No. 200812 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM).

Silvana Bazúa Valenti fue alumna de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica y fue apoyada por DGAPA y SNI-CONACyT (ayudante de investigador).



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA  
COORDINACIÓN

**DR. ENRIQUE LUIS GRAUE WIECHERS**  
DIRECTOR  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
PRESENTE.

Por este conducto, le informamos que la tesis titulada: “**Regulación por fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub>**”, que presenta la alumna **SILVANA BAZÚA VALENTI** con número de cuenta **30653467-6**, cumple los requisitos establecidos en el Plan de Estudios de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos Miembros del Jurado, otorgamos nuestro voto aprobatorio para que sea presentada en examen oral.

Dr. Alfonso León del Río

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz

Dra. Erika Patricia Rendón Huerta

Dr. Enrique Ortega Soto

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

## ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>4</b>  |
| <b>RESUMEN</b> .....  | <b>5</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....   | <b>6</b>  |
| GENERALIDADES DE LA COMUNICACIÓN CELULAR .....  | 6         |
| <i>Transducción de Señales</i> .....  | 6         |
| <i>Receptores Acoplados a Proteínas G</i> .....   | 9         |
| <i>Regulación de Receptores Acoplados a Proteínas G</i> .....   | 16        |
| LA FAMILIA DE PROTEÍNAS CINASAS C .....   | 20        |
| EL RECEPTOR S1P <sub>1</sub> Y SU LIGANDO LA ESFINGOSINA-1-FOSFATO .....  | 23        |
| <i>La Esfingosina-1-Fosfato</i> .....   | 23        |
| <i>El receptor S1P<sub>1</sub></i> .....  | 27        |
| REGULACIÓN DEL RECEPTOR S1P <sub>1</sub> : PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....   | 34        |
| <b>HIPÓTESIS</b> .....  | <b>38</b> |
| <b>OBJETIVOS</b> .....  | <b>38</b> |
| OBJETIVO PRINCIPAL .....  | 38        |
| OBJETIVOS PARTICULARES .....  | 38        |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....   | <b>39</b> |
| REACTIVOS .....   | 39        |
| CULTIVO CELULAR .....   | 39        |
| EXPRESIÓN DE PLÁSMIDOS EN LÍNEAS CELULARES .....  | 40        |
| ENSAYOS DE FOSFORILACIÓN.....   | 41        |
| LISIS DE CÉLULAS .....  | 42        |
| COINMUNOPRECIPITACIONES.....  | 42        |
| WESTERN BLOT.....   | 43        |
| CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO LIBRE INTRACELULAR [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> .....                    | 44        |
| PRESENTACIÓN DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....  | 45        |
| <b>RESULTADOS</b> .....   | <b>46</b> |
| ANÁLISIS DE LA UNIÓN FUNCIONAL ENTRE EL RECEPTOR S1P <sub>1</sub> Y S1P.....  | 46        |
| EL PMA INDUCE LA FOSFORILACIÓN Y DESENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR S1P <sub>1</sub> .....                                    | 48        |
| EFECTO DE LAS DISTINTAS ISOFORMAS DE PKC SOBRE LA DESENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR S1P <sub>1</sub> .....                   | 50        |
| ASOCIACIÓN RECEPTOR S1P <sub>1</sub> -PKC.....  | 54        |
| EFECTO DE LA REPRESIÓN GÉNICA DE LAS PKC'S ALPHA Y BETA II SOBRE LA DESENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR S1P <sub>1</sub> ..... | 56        |
| <b>DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS</b> .....   | <b>58</b> |
| <b>CONCLUSIÓN</b> .....   | <b>63</b> |
| <b>ANEXO 1: RESULTADOS</b> .....  | <b>64</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ANEXO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b> | <b>68</b> |
| <b>REFERENCIAS.....</b>                   | <b>71</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>INTRODUCCIÓN.....</b>   |    |
| FIGURA 1. ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA GENERAL DE UN GPCR.....   | 10 |
| FIGURA 2. ESQUEMA DEL CICLO DE ACTIVACIÓN DE UN GPCR .....   | 12 |
| FIGURA 3. PATRONES DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADOS POR LOS DIFERENTES TIPOS DE PROTEÍNAS G .....   | 15 |
| FIGURA 4. MODELOS DE DESENSIBILIZACIÓN DE GPCR'S INDUCIDA POR GRK'S Y POR CINASAS<br>DEPENDIENTES DE SEGUNDOS MENSAJEROS .....   | 19 |
| FIGURA 5. ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA DE LAS ISOFORMAS DE LAS PKC'S .....   | 22 |
| FIGURA 6. ESTRUCTURA DE LA S1P .....   | 23 |
| FIGURA 7. SÍNTESIS DE S1P .....  | 25 |
| FIGURA 8. ESQUEMA DEL RECEPTOR S1P <sub>1</sub> .....  | 28 |
| FIGURA 9. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DEL RECEPTOR S1P <sub>1</sub> FORMANDO UN COMPLEJO CON S1P ..  | 31 |
| FIGURA 10. VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DEL RECEPTOR S1P <sub>1</sub> .....  | 32 |
| FIGURA 11. ESQUEMA DEL MODELO DE REGULACIÓN DEL RECEPTOR S1P <sub>1</sub> .....  | 36 |
| <b>RESULTADOS.....</b>   |    |
| FIGURA R1. VISUALIZACIÓN Y ANÁLISIS FUNCIONAL DEL RECEPTOR S1P <sub>1</sub> - GFP .....  | 47 |
| FIGURA R2. EFECTO DOSIS-DEPENDIENTE DE LA S1P SOBRE EL RECEPTOR S1P <sub>1</sub> .....   | 48 |
| FIGURA R3. EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE LA PKC SOBRE LA DESENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR S1P <sub>1</sub> ..   | 49 |
| FIGURA R4. EFECTO DE INHIBIDORES ESPECÍFICOS PARA LAS DISTINTAS ISOFORMAS DE PKC SOBRE LA<br>MOVILIZACIÓN DE Ca <sup>2+</sup> INTRACELULAR Y FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR S1P <sub>1</sub> ..... | 51 |
| FIGURA R5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PMA ON SOBRE LA FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR S1P <sub>1</sub><br>..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.   |    |
| FIGURA R6. EFECTO DE PMA SOBRE LA ASOCIACIÓN DEL RECEPTOR S1P <sub>1</sub> Y LAS ISOFORMAS DE PKC.....   | 55 |
| FIGURA R7. EFECTO DE LA REPRESIÓN GÉNICA DE PKC ALFA Y BETA II SOBRE LA DESENSIBILIZACIÓN DEL<br>RECEPTOR S1P <sub>1</sub> .....   | 57 |
| <b>CONCLUSIÓN .....</b>  |    |
| FIGURA R8. MODELO REPRESENTATIVO DE LA REGULACIÓN POR FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR S1P <sub>1</sub><br>INDUCIDA POR PMA.....   | 63 |
| <b>ANEXO 1: RESULTADOS.....</b>  |    |
| FIGURA A1. FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR S1P <sub>1</sub> INDUCIDA POR S1P.....   | 65 |
| FIGURA A2. FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR S1P <sub>1</sub> EN PRESENCIA DE PMA.....  | 66 |
| FIGURA A3. EFECTO DE LA REPRESIÓN GÉNICA DE PKC ALFA Y BETA II EN LA FOSFORILACIÓN DEL<br>RECEPTOR S1P <sub>1</sub> .....  | 67 |
| <b>ANEXO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  |    |

|   |    |
|---|----|
| FIGURA A4. MAPA DE RESTRICCIÓN Y SITIOS DE CLONACIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pSIREN-RETROQ..... | 69 |
|---|----|

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....   |    |
| TABLA 1. LOS RECEPTORES DE S1P: DISTRIBUCIÓN Y FUNCIÓN.....               | 33 |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....   |    |
| TABLA 2. SECUENCIAS CLONADAS EN PLÁSMIDOS SHRNA ALFA Y SHRNA BETA II..... | 40 |
| <b>ANEXO 2: MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....                                |    |
| TABLA 3. ANTICUERPOS UTILIZADOS EN EL TRABAJO EXPERIMENTAL.....           | 70 |

## ABSTRACT

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

Our results indicate that the classical isoforms, mainly PKC  $\alpha$  and to a lesser extent PKC  $\beta$ , mediate phosphorylation and desensitization of S1P<sub>1</sub>.

**Key words:** sphingosine-1-phosphate, S1P, sphingosine-1-phosphate receptor 1; S1P<sub>1</sub>, receptor phosphorylation, protein kinase C, PKC.

**Abbreviations used:** S1P<sub>1</sub>, sphingosine-1-phosphate receptor 1; S1P, sphingosine-1-phosphate; PKC, protein kinase C; GFP, green fluorescent protein, GRK, G protein-coupled receptor kinase; short hairpin RNA, shRNA.



## RESUMEN

La esfingosina-1-fosfato (S1P) es una molécula bioactiva que ha despertado gran interés en la investigación básica y clínica por su participación en la diferenciación, proliferación, motilidad y sobrevivencia celular. La S1P es secretada por plaquetas activadas y mastocitos, entre otras células, y se asocia a lipoproteínas y albúmina para circular por el torrente sanguíneo. Ejerce sus funciones principalmente como ligando de una familia de cinco receptores de lípidos, acoplados a proteínas G conocidos como Edg's (por Endothelial differentiation gene). El Edg1 o S1P<sub>1</sub> se acopla preferentemente a la familia de proteínas heterotriméricas G<sub>i/o</sub>, por lo que algunas moléculas cascada abajo en su señalización son la PLCβ, PKC, las MAP cinasas, AKT y Rac1. Hoy se sabe que el receptor tiene un papel en la angiogénesis, en la regulación de la tonicidad y permeabilidad vascular, neurogénesis y en el control del egreso de linfocitos activados de los nódulos linfáticos. La importancia de la S1P como molécula señalizadora, y de su receptor S1P<sub>1</sub>, en tantos procesos fisiológicos, hace que su regulación sea un blanco terapéutico interesante. Se ha demostrado que la activación por S1P, el agonista natural, lleva a la fosforilación e internalización del receptor. Sin embargo, se sabe poco acerca de su regulación y la identidad de las cinasas involucradas en este proceso. En el año 2002, se publicó la primera evidencia de una correlación entre la activación de la PKC por forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y la fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub>.

En el presente trabajo se busca caracterizar los procesos moleculares que provocan la regulación por fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub>, así como identificar las posibles isoformas de la PKC implicadas en este proceso. Como modelo de estudio se estableció una línea celular humana de cáncer de próstata transfectada con el receptor S1P<sub>1</sub>, fusionado a la GFP. Posteriormente se hizo un ensayo funcional en el que se midió la movilización de calcio intracelular promovida por la activación del receptor, observando una EC<sub>50</sub> de aproximadamente 100 nM. El tratamiento de las células con PMA provocó la desensibilización del receptor al disminuir la liberación de calcio intracelular en respuesta a la S1P. El efecto se cuantificó con una IC<sub>50</sub> de 10 nM. El siguiente paso fue utilizar inhibidores farmacológicos específicos de las distintas isoformas de PKC. Los resultados mostraron que el receptor no se desensibiliza en presencia de los inhibidores para PKC α y, en menor grado, para βI y βII. Para investigar más a fondo el papel de estas isoformas, se transfectaron células con shRNA's contra α y βII. El efecto no fue tan claro como con los inhibidores pero la desensibilización se revierte discretamente con el shRNA de PKC α. Por último, se realizaron coinmunoprecipitaciones y Western blots para analizar la cinética de asociación receptor-PKC a distintos tiempos de estimulación con PMA. La isoforma α se encuentra asociada independientemente de la estimulación con PMA, pero empieza a reclutarse a tiempos cortos. Mientras que la isoforma βI también se encuentra asociada pero se recluta a tiempos más largos. La isoforma βII se encuentra asociada muy discretamente. Los datos presentados demuestran que la activación de la familia de las PKC's fosforilan y desensibilizan al receptor, además los datos sugieren que son las isoformas clásicas α y β las que podrían estar implicadas en la regulación del receptor S1P<sub>1</sub>.

## INTRODUCCIÓN

En este proyecto se estudió al receptor S1P<sub>1</sub> de esfingosina-1-fosfato (S1P) con el propósito de investigar los mecanismos que lo regulan, por lo que en la introducción se presentarán, de manera sintética, los componentes y características ligados del sistema de transducción de señales, así como la regulación del mismo. En la primera parte se exponen las principales definiciones en las que se ubica el sistema del receptor S1P<sub>1</sub> y en la segunda se exponen las características del receptor y de la S1P.

## GENERALIDADES DE LA COMUNICACIÓN CELULAR

### TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Las células que pertenecen a un organismo multicelular generan un microambiente que les facilita la comunicación con el exterior y les permite secretar señales de crecimiento, señales que activan ciertos procesos celulares, e incluso señales de muerte cuando es necesario. Si trasladamos este mecanismo al cuerpo humano, las redes de comunicación entre células se convierten de un sistema pequeño a otro más complejo compuesto por distintos conjuntos de células. Es decir, no sólo una célula se comunica con su vecina del mismo tipo celular, si no que una célula especializada se comunica, a través de secreciones paracrinas y endocrinas, con otros tipos de células especializadas. Lo anterior sirve para informar a otros tejidos sobre el estado en el que se encuentran y las señales que han detectado.

Durante el proceso evolutivo de los sistemas de transducción se originaron dos elementos básicos: el **receptor**, que reconoce el estímulo extracelular y el **efector**, que es controlado por el receptor y es el encargado de provocar la respuesta celular (Wettschureck & Offermanns, 2005). Otra manera de llamar al estímulo extracelular es ligando o primer mensajero. El proceso mediante el cual la célula transforma una señal del medio exterior a una señal química celular se llama **transducción de señales** (Nelson & Cox, 2008).

En general, los primeros mensajeros de estos sistemas (con excepción de los que son muy hidrofóbicos) no pueden entrar a la célula, por lo que el sistema se vuelve un poco más elaborado para poder transformar la señal. Algunos receptores se acoplan a una enzima efectora que produce un segundo mensajero intracelular y éste, al unirse a otras enzimas, provoca la activación o inactivación de proteínas blanco. Ahora bien, es importante notar que el ligando puede ser de diferente tipo según el efecto que provoca sobre el receptor. A continuación se mencionan los dos principales:

- **Agonista:** es un ligando que se une al receptor y provoca una respuesta, éstos pueden ser agonistas completos, es decir, que ocasionan el máximo nivel de respuesta, o parciales, que incluso en concentraciones de saturación, causan una respuesta parcial (Kenakin, 2009).
- **Antagonista:** es un compuesto que se une al receptor sin producir una respuesta celular, pero bloquea parcial o totalmente la acción de los agonistas (Kenakin, 2009).

Entre las características de los sistemas de transducción que se describen en libros clásicos de Bioquímica como el Lehninger, tres son de gran relevancia para el desarrollo de esta tesis. Estas son: la especificidad, la afinidad y la sensibilidad. **La especificidad** del sistema se da porque la estructura del ligando es complementaria al sitio de unión de un receptor particular, o de un tipo de receptores. Además, los receptores se encuentran expresados cualitativamente y cuantitativamente en ciertos tipos de célula, dependiendo del programa de diferenciación de éstas (Nelson & Cox, 2008).

**La afinidad** define la fuerza de la interacción entre el ligando y el receptor. Las fuerzas que controlan la afinidad son principalmente fuerzas electroestáticas entre los grupos polares, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y otras más (Kenakin, 2009). Por lo que la afinidad se puede pensar también como una fuerza de atracción y se

cuantifica como una **CONSTANTE DE DISOCIACIÓN ( $K_d$ )**. La deducción matemática que explica la  $K_d$  es la siguiente (Nelson & Cox, 2008):

- La formación del complejo ligando [A] – receptor [R] ([AR]) se puede describir con la siguiente ecuación:



- Por lo que la constante de disociación se puede expresar como:

$$\frac{[A][R]}{[AR]} = K_d$$

Donde cada elemento equivale a concentraciones molares de la proteína y/o del ligando, dando como resultado una constante de disociación que se expresa en unidades molares (M) y corresponde a la concentración del ligando [A] en la que el 50% de la población de receptor [R] se encuentra ocupado (Nelson & Cox, 2008). Entre más grande sea la  $K_d$ , el receptor tiene menos afinidad por el ligando, ya que se necesita una mayor concentración del ligando para saturar la mitad de la población de los receptores. Generalmente los receptores tienen valores de  $K_d$  alrededor de  $10^{-6}$  –  $10^{-11}$  M (de pico a nano molar) lo que demuestra grandes afinidades de los receptores por sus ligandos (Nelson & Cox, 2008).

La tercera característica, y quizá la más relevante para el tema de esta tesis, es **la sensibilidad** del sistema de transducción. En general, los sistemas de comunicación funcionan como pulsos rápidos. Las hormonas y neurotransmisores son secretados y en poco tiempo (segundos o minutos) su concentración baja, por degradación o recaptura. Pero este ajuste no ocurre solamente a nivel del ligando, sino que el sistema debe tener una manera de apagarse mediante procesos de retroalimentación negativa que modifican la sensibilidad del receptor, para prevenir una estimulación excesiva de la célula. Conforme pasa el tiempo de estimulación y como consecuencia de la activación, el receptor se modifica (frecuentemente es fosforilado) y esto provoca un decaimiento de la sensibilidad al ligando. La pérdida de sensibilidad es llamada **DESENSIBILIZACIÓN** y también se usa el término **TAQUIFILAXIA** para fármacos.

La desensibilización puede verse de varias maneras, una desviación hacia la derecha en la curva dosis-respuesta al agonista (disminuyendo la potencia), o una disminución en

la respuesta máxima que incluso puede anular por completo la respuesta del receptor (Kenakin, 2009). En todos estos casos, el tiempo de recuperación (re sensibilización) depende del estímulo y del tipo de desensibilización. Un ejemplo clásico que demuestra este sistema de desensibilización de los receptores es cuando una persona entra a un cuarto oscuro (Nelson & Cox, 2008). La luz actúa como el estímulo para receptores en la retina, si uno se encuentra en plena la luz del día el sistema de transducción de estos receptores está activado, por lo que cuando se entra a un cuarto oscuro inicialmente no se ve absolutamente nada, aún cuando existe una pequeña cantidad de luz en el cuarto. La retina se encuentra desensibilizada. Si uno permanece en la oscuridad durante unos minutos empieza a distinguir ciertas figuras que antes no podía ver. La capacidad de respuesta se re sensibiliza.

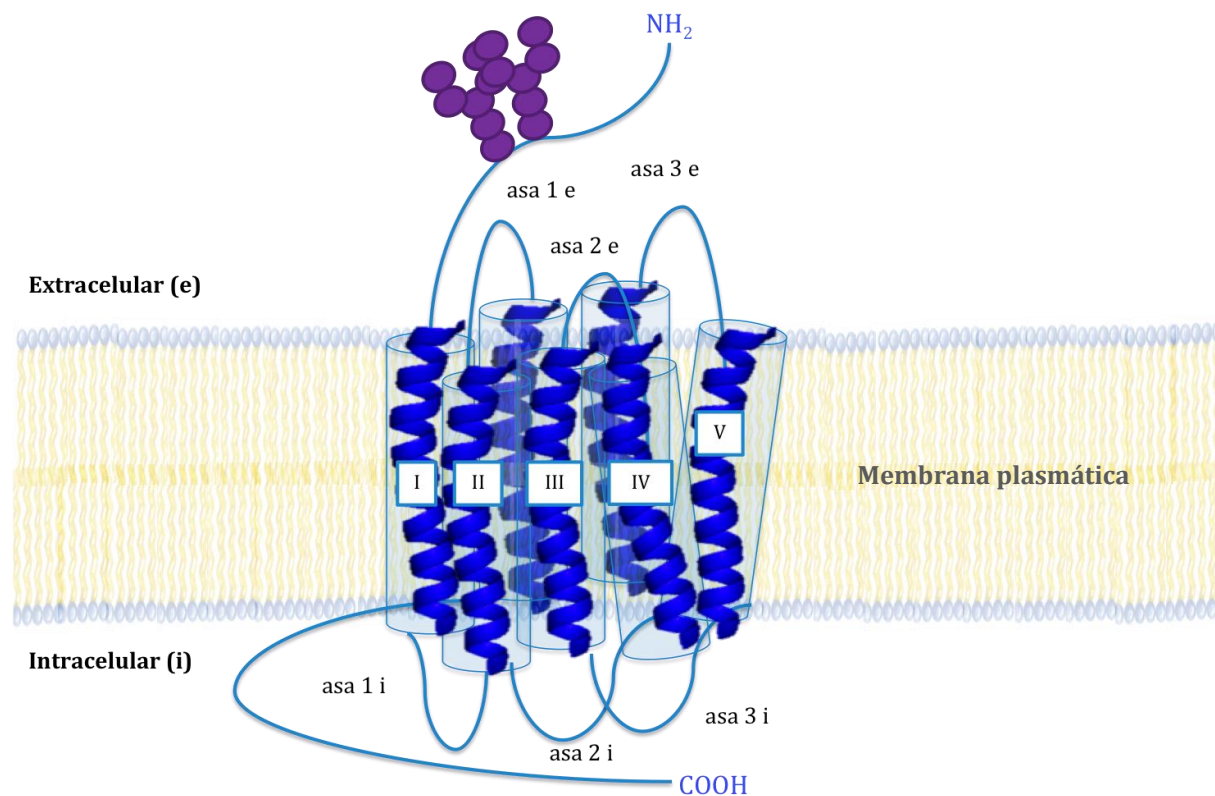
La relevancia de la desensibilización de los sistemas de transducción se puede ver en el crecimiento tumoral, ya que la señales de crecimiento celular dependen de factores secretados por el entorno celular en el que se encuentran. Si existe un error en los sistemas que permiten a las células responder a estos estímulos y sobre todo en la parte del sistema encargada de la desensibilización, la señal es continua y la célula puede dividirse una y otra vez hasta formar, eventualmente, un tumor.

## RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G

Hasta ahora hemos descrito los principios generales de la transducción de señales: el ligando (información extracelular) interacciona con el receptor, el receptor activado enciende una cascada de señalización que produce un cambio funcional en la célula y eventualmente la señal se apaga. Aunque los principios generales se conservan, existen diversos tipos de sistemas de transducción que difieren entre ellos por el tipo de receptor y la localización del mismo.

En esta tesis se estudia un tipo de receptor membranal que se acopla a proteínas G (GPCR por sus siglas en inglés). Los GPCR's constituyen una superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales que responden a estímulos de distintos orígenes,

desde la luz, olores y sabores, hasta hormonas generales o locales y neurotransmisores (Ferguson, 2001). La estructura básica de un GPCR está constituida por siete dominios hidrofóbicos en forma de hélices  $\alpha$  que cruzan la membrana y que se conectan unos con otros a través de asas intra y extracelulares que varían en tamaño. El extremo amino terminal ( $\text{NH}_2$ ) se encuentra en el lado extracelular y generalmente está glucosilado, mientras que el extremo carboxilo terminal ( $\text{COOH}$ ) se halla en el lado intracelular de la célula. Los dominios que están en el lado citoplásmico funcionan para la propagación de la señal, ya sean como sitios de anclaje para proteínas efectoras o como sustratos para diversas enzimas, entre ellas las proteínas cinasas (Fig. 1).



**Fig. 1. Esquema de la estructura general de un GPCR.** En azul oscuro se muestran los dominios en forma de hélice  $\alpha$  que cruzan el ancho de la membrana plasmática. Se muestran siete dominios transmembranales identificados con números romanos: I más próximo al amino terminal ( $\text{NH}_2$ ) y VII más próximo al extremo carboxilo terminal ( $\text{COOH}$ ), los dominios VI y VII se encuentran atrás. El  $\text{NH}_2$  se encuentra en el lado extracelular y generalmente está glucosilado (estructuras moradas) y el carboxilo terminal se encuentra intracelular y anclado a la membrana. \* Imagen creada a partir de Morris & Malbon, 1999.

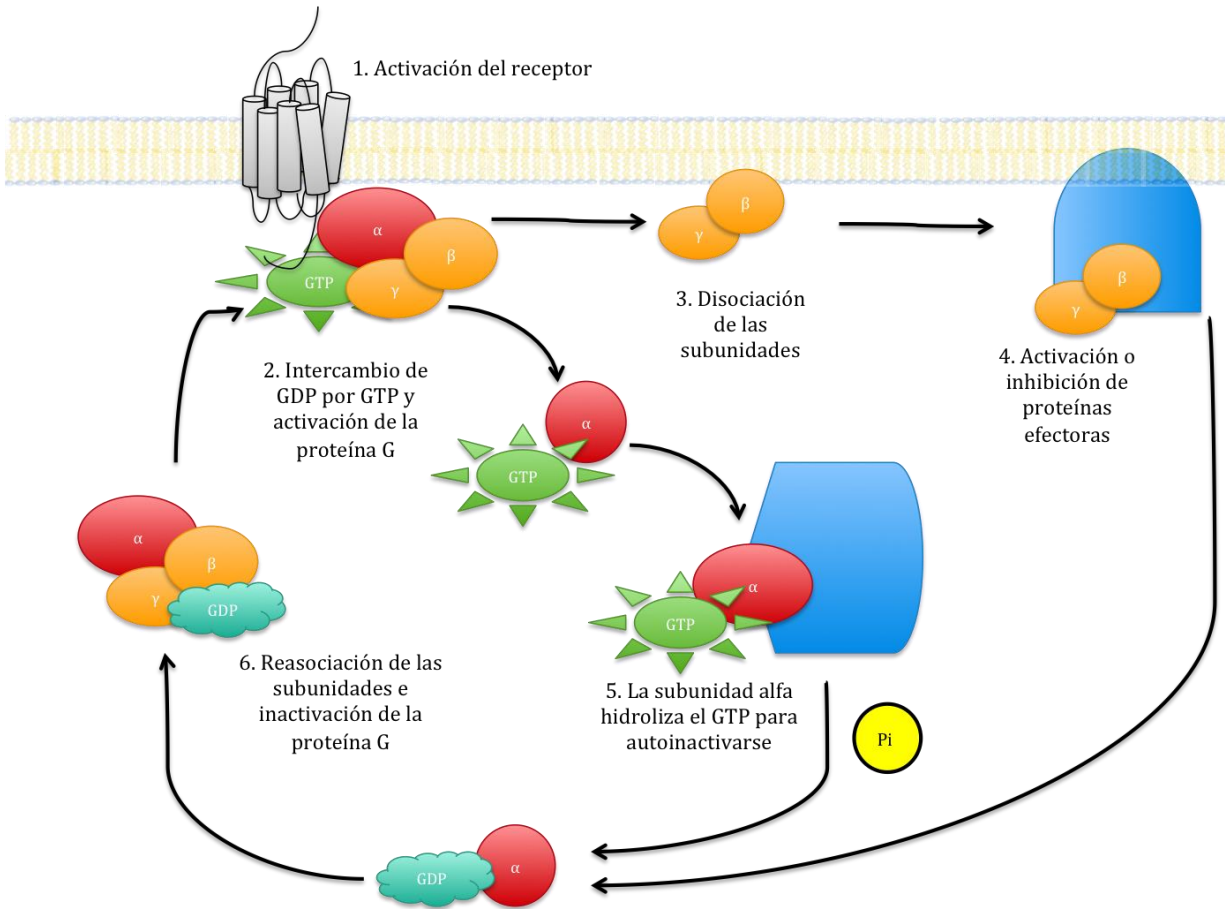
La imagen tridimensional del receptor puede pensarse como un cilindro hecho de hélices  $\alpha$  insertado en la membrana plasmática. El ligando se une a un dominio conocido como “*binding pocket*” que se encuentra en la región extracelular del centro del cilindro. Visto desde arriba puede pensarse como una canasta en la que se mete el ligando. La unión del ligando al receptor provoca un cambio conformacional que comprime la región cercana al mismo y expande la región citoplásmica, exponiendo dominios que permitirán iniciar la cascada de señalización<sup>1</sup>.

La conformación activa del receptor permite la unión de una proteína G heterotrimérica intercambiadora de nucleótidos de guanina<sup>2</sup>. Estas proteínas están compuestas por tres subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (aunque  $\beta$  y  $\gamma$  están fuertemente asociadas y funcionan como un dímero, por lo que en el resto del texto se describirán como complejo  $\beta\gamma$ ). Ahora bien, la unión de la proteína G al receptor provoca dos eventos fundamentales: primero estabiliza la conformación activa del receptor<sup>1</sup>, y segundo, provoca un cambio conformacional en la proteína G que hace que se libere el GDP de la subunidad  $\alpha$ , se una un GTP y se disocie el complejo  $\beta\gamma$ . Las subunidades libres activan o reprimen a proteínas efectoras. Por su parte, estas proteínas efectoras tienen la función de modular enzimas y canales generando segundos mensajeros (moléculas que activan a otras proteínas o componentes celulares) que a su vez provocan los cambios funcionales en el metabolismo o en el estado de activación de la célula. La subunidad  $\alpha$  tiene un dominio de GTPasa, por lo que es capaz de hidrolizar el GTP al que se ha unido para producir su propia inactivación y la consecuente re asociación con las subunidades  $\beta\gamma$  (Kleuss et al., 1994). La re asociación de las subunidades provoca el final de la señalización encendida por el ligando, y del ciclo de activación del receptor (Fig. 2).

---

<sup>1</sup> Kobilka, Brian. “Structural Insights into the Dynamic Process of G-Protein-Coupled Receptor Activation.” ASBMB, Earl and Thresa Stadtman Distinguished Scientist Award Lecture, Experimental Biology Meeting 2013. Boston, MA. 23 apr. 2013 y “Brian K. Kobilka - Nobel Lecture: The Structural Basis of G-Protein Coupled Receptor Signaling”. Nobelprize.org. 7 May 2013

<sup>2</sup> Las proteínas G pertenecen a una súper familia de proteínas con actividad de GTPasa, dentro de la cual se pueden distinguir dos grandes grupos. Uno que contiene a las proteínas G de bajo peso molecular como Ras, que participa en vías de transducción de señales que llevan a la proliferación celular; Rho, que participa en procesos que modifican el citoesqueleto de actina; y Rab, que participa en el tráfico vesicular (Wennerberg, Rossman, & Der, 2005). El otro grupo contiene a la familia de proteínas G heterotriméricas que coordinan la transducción de señales a partir de su acoplamiento a receptores de siete dominios transmembranales.



**Fig. 2. Esquema del ciclo de activación de un GPCR.** La unión de un agonista provoca un cambio en la estructura del receptor hacia una conformación activa, que le permite interactuar con la proteína G heterotrimérica. Un cambio conformacional en la proteína G provoca el intercambio de un GDP por un GTP, activando a la proteína y permitiendo la disociación de las subunidades que van y activan y/o reprimen a otras proteínas efectoras. La subunidad  $\alpha$  tiene actividad de GTPasa, por lo que eventualmente hidroliza el GTP a GDP (liberando un fosfato (Pi)) y en consecuencia las subunidades se inactivan y se re asocian. \* Imagen creada a partir de Terry P. Kenakin. (2009). *A Pharmacology Primer: Theory, Applications and Methods* (3rd ed.). Oxford, UK: Elsevier Academic Press.

Existen diversas isoformas de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , y cada una tiene diferencias estructurales y funcionales, por lo que en cada célula la composición heterotrimérica de las proteínas G es heterogénea. Es decir, se pueden dar múltiples combinaciones que resultan en diferentes complejos heterotriméricos. Su distribución a nivel de tejidos e incluso dentro de la misma célula es variable, logrando hacer aún más selectiva la regulación de la señal. En general, las proteínas G se clasifican de acuerdo a la subunidad  $\alpha$ , pero los avances tecnológicos han permitido conocer que también las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  tienen propiedades reguladoras (Gilman, 1984; Gilman, 1995; Ueda et



al., 1994). Aunque las subunidades  $\alpha$  contienen  $\approx 50\%$  de homología entre ellas (Strathmann, 1991), existen diferencias en la secuencia y función de cada una. Se pueden clasificar en cuatro familias denominadas  $s$ ,  $q$ ,  $12/13$ ,  $i$  (Fig. 3).

- **$G\alpha_s$** : incluye a  $G\alpha_s$  y  $G\alpha_{olf}$ . Ambas proteínas activan el SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN DE LA ADENILIL CICLASA (AC). La AC genera, a partir de adenosín trifosfato (ATP), adenosín monofosfato cíclico (AMPC). Este actúa como segundo mensajero. Una de sus acciones más importantes es la unión a las subunidades reguladoras de la cinasa dependiente de AMPC (PKA), para liberar las subunidades catalíticas y activar a esta cinasa que fosforila y así regular un gran número de enzimas. Otra función del AMPC es la apertura de canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos (Yau, 1994) (Fig. 3 a).

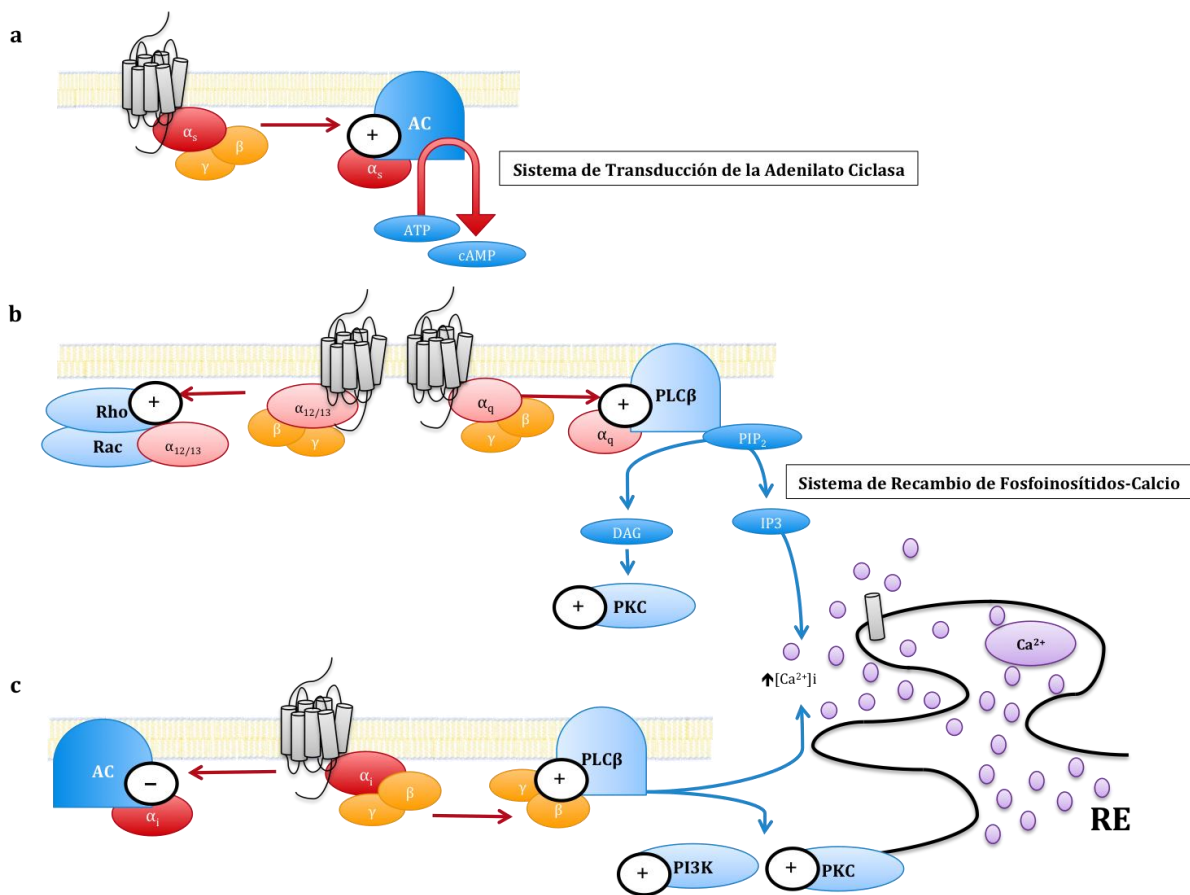
Un dato importante es que estas proteínas son sustratos de una ADP ribosilación por la toxina de *Vibrio cholerae* que inhibe la actividad de GTPasa de estas proteínas G en su forma activa (Gilman, 1995; Mangmool & Kurose, 2011; Morris & Malbon, 1999).

- **$G\alpha_q$** : contiene a cinco miembros,  $G\alpha_{11}$ ,  $G\alpha_{14}$ ,  $G\alpha_{15}$ ,  $G\alpha_{16}$  y  $G\alpha_q$ . Estas proteínas encienden el SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN DE RECAMBIO DE FOSFOINÓSÍTIDOS-CALCIO al activar la fosfolipasa C-  $\beta$  (PLC  $\beta$ ) que cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) a inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 provoca la apertura de canales de calcio ( $Ca^{2+}$ ) dependientes de IP3 presentes en el retículo endoplásmico, resultando en la movilización de  $Ca^{2+}$  de depósitos internos hacia el citosol. El calcio se une a distintas proteínas sensoras de calcio como la calmodulina o la troponina C, que a su vez regulan la actividad de otras proteínas cinasas, fosfatasas y sintasas, entre otras. El otro mensajero, el DAG, permanece en la membrana, donde puede activar isoformas de la proteína cinasa C (PKC) (Fig. 3 b). Esta proteína cinasa de residuos de serina y treonina activa o reprime a otras proteínas cinasas, factores de transcripción, canales iónicos o incluso a otros receptores (Kenakin, 2009).

- **G $\alpha_{12/13}$**  : contiene sólo dos miembros, G $\alpha_{12}$  y G $\alpha_{13}$  . En general son activadas por receptores que también activan a la familia de G $_q$  (Wettschureck & Offermanns, 2005). Las proteínas G $\alpha_{12}$  y G $\alpha_{13}$  están involucradas en la remodelación del citoesqueleto y proliferación celular. Esto lo hacen a través de la activación de las GTPasas Rho, Rac1 y proteínas de la vía de las MAP cinasas, entre otras (Fig. 3 b). También se han implicado en la regulación del anti portador Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> (Morris & Malbon, 1999).
- **G $\alpha_i$**  : contiene a G $\alpha_{i-1}$ , G $\alpha_{i-2}$ , G $\alpha_{i-3}$ , G $\alpha_t$  y G $\alpha_o$  . Estas proteínas se conocen principalmente por inhibir a la AC y por reducir la concentración de AMPc, y por lo tanto, producen el efecto opuesto a las proteínas G $\alpha_s$ . Sin embargo, se ha demostrado que la subunidad  $\beta$  y de estas proteínas también tienen la capacidad de activar el sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio, a través de la PLC  $\beta$ , entre otras proteínas efectoras (Wettschureck & Offermanns, 2005) (Fig. 3 c). Un dato importante es que todos los miembros de esta familia tienen en su extremo carboxilo terminal, una cisteína sensible a ADP-ribosilación catalizada por la toxina pertussis de *Bordetella pertussis* (García-Sáinz, 1981; Malbon et al., 1984). Esta es una modificación irreversible que desacopla a la proteína G del receptor impidiendo la transducción de la señal.

El sistema de transducción de los receptores acoplados a proteínas G difiere de la mayoría de los sistemas transmembranales en que el elemento activo del receptor no es el receptor en sí, sino una proteína G heterotrimérica que se acopla al receptor. Esta conformación, única entre los sistemas de transducción, brinda a este tipo de receptores una ventaja de diversidad de la señal sobre los demás, pues le permite al receptor acoplarse a más de un tipo de vía de señalización y, por lo tanto, ser parte de distintos sistemas de transducción. Los receptores de esta familia representan entre el 3 y 5 por ciento de las proteínas codificadas en el genoma humano, siendo uno de los grupos más grandes (Bjarnadóttir et al., 2006; Lagerström & Schiöth, 2008; Marchese et al., 1999). Hoy se conocen los ligandos para más de 200 receptores, el resto continúan

en investigación y mientras tanto se les denomina “receptores huérfanos” (Lagerström & Schiöth, 2008) (<http://www.iuphar-db.org/index.jsp>).



**Fig. 3. Patrones de señalización activados por los diferentes tipos de proteínas G.** a. El principal efector de la señalización de  $G_{\alpha_s}$  es la Adenilato Ciclasa (AC). b. El principal efector de la señalización de  $G_{\alpha_q}$  es la activación de la fosfolipasa C  $\beta$  (PLC $\beta$ ) que genera DAG, que activa a la PKC, e IP $_3$  que promueve la apertura de canales dependientes de IP liberando calcio del retículo endoplásmico (RE). Mientras que las proteínas  $G_{\alpha_{12/13}}$  activan a Rho y Rac 1. Generalmente, los receptores que se acoplan a  $G_{\alpha_q}$  también tienen afinidad por  $G_{\alpha_{12/13}}$ . c. La proteína  $G_{\alpha_i}$  inhibe a la AC a través de la subunidad  $\alpha$  y activa PLC $\beta$  y PI3K a través de la subunidad  $\beta\gamma$ . \* Imagen creada a partir de Wettschureck & Offermanns, 2005.

Dadas las características de estos receptores, se ha demostrado que son una parte importante del funcionamiento de muchos sistemas que regulan la homeostasis del cuerpo humano. La alteración de su señalización se ha implicado en la patogénesis de

múltiples enfermedades (Tao, 2006). La relevancia fisiológica de estos receptores y sus ligandos hace que estos sean blancos terapéuticos. De hecho, en el año 2000 se registró que la mitad de los fármacos recetados en Estados Unidos de América estaban dirigidos a GPCR's (Kenakin, 2009). Esto último, es una evidencia de la importancia que tiene la investigación de los mecanismos capaces de regular a estos receptores.

## REGULACIÓN DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G

Se mencionó anteriormente la importancia de la regulación de los sistemas de transducción. La ubicuidad de los GPCR's y su papel en distintos procesos fisiológicos ha determinado que la actividad requiera de un balance coordinado entre los mecanismos que encienden la señalización celular y los mecanismos reguladores que la apagan. El proceso de desensibilización de un GPCR es producto de la combinación de varios mecanismos, entre los que se encuentran: 1) la fosforilación del receptor por la acción de proteínas cinasas, 2) el desacoplamiento del receptor y la proteína G heterotrimérica, 3) la internalización y 4) la re sensibilización y el reciclaje a la membrana. Ahora bien, la desensibilización puede ser provocada por la misma señalización del receptor, que se conoce como **DESENSIBILIZACIÓN HOMÓLOGA**, o bien, puede ser provocada por la integración y diversificación de señales generadas por distintas unidades de señalización de uno o más receptores, lo que se conoce como **DESENSIBILIZACIÓN HETERÓLOGA**.

Para ambos tipos de desensibilización, la fosforilación parece ser el primer paso (Ferguson, 2001). En un principio, se creía que la fosforilación era producto de cinasas dependientes de segundos mensajeros, por ejemplo, PKC y la PKA, que son activadas por la cascada de señalización que inicia el receptor (Fig. 3). Sin embargo, en 1986 dos descubrimientos de un grupo de investigadores, dirigidos por Robert J. Lefkowitz, cambiaron este modelo de regulación. Primero encontraron que el receptor  $\beta_2$  adrenérgico se fosforilaba de manera independiente de cAMP y la consecuente activación de PKA, abriendo la posibilidad de que existieran otras cinasas reguladoras del receptor (Strasser et al., 1986). Poco tiempo después, lograron identificar y

purificar la cinasa involucrada en la regulación independiente de segundos mensajeros del receptor, a la que llamaron *β-adrenergic receptor kinase* ( $\beta$ -ARK) (Benovic et al., 1986).

En los años siguientes, se identificaron proteínas con secuencias parecidas a esta cinasa que también eran responsables de la fosforilación y desensibilización de otros GPCRs. Por lo que se pensó que más bien la  $\beta$ -ARK pertenecía a una familia de cinasas que llamaron G-protein Receptor Kinases (GRK's). Estos descubrimientos llevaron al establecimiento de una vía "canónica" de desensibilización homóloga de un GPCR (Fig. 4 a). En este modelo, el receptor es fosforilado por GRK's en residuos de serina y treonina de la 3ra asa intracelular, o del extremo carboxilo terminal, cuando se encuentra en una conformación activa (Luttrell & Lefkowitz, 2002; Neve, 2006). Una vez que el receptor se encuentra fosforilado, el siguiente paso consiste en desacoplar al receptor de la proteína G para impedir que se siga propagando una señal. Para esto se reclutan proteínas conocidas como arrestinas (Kelly et al., 2008; Shenoy & Lefkowitz, 2005a) que se acoplan al receptor al reconocer el patrón de fosforilación de las GRK's (Luttrell & Lefkowitz, 2002). Además, la arrestina funciona como anclaje para la maquinaria de proteínas endocíticas que facilitan la internalización del receptor, entre las que se pueden mencionar la clatrina y la  $\beta$ 2-adaptina (Reiter & Lefkowitz, 2006; Shenoy & Lefkowitz, 2005a). Una vez en el endosoma, el receptor puede tomar dos caminos. El primero, que es común entre receptores como el  $\beta$ <sub>2</sub> adrenérgico y el S1P<sub>1</sub>, es que el receptor se desacople tanto del ligando como de la arrestina, para ser desfosforilado por una fosfatasa específica de GPCR's (la fosfatasa PP2A) y ser reciclado a la membrana. El segundo mecanismo, común entre los receptores de la familia secretina, es formar un complejo estable con la arrestina y acumularse en los endosomas para ser degradados por vía de la ubiquitina-proteosoma (Shenoy & Lefkowitz, 2005b) o reciclarse de una forma mucho más lenta.

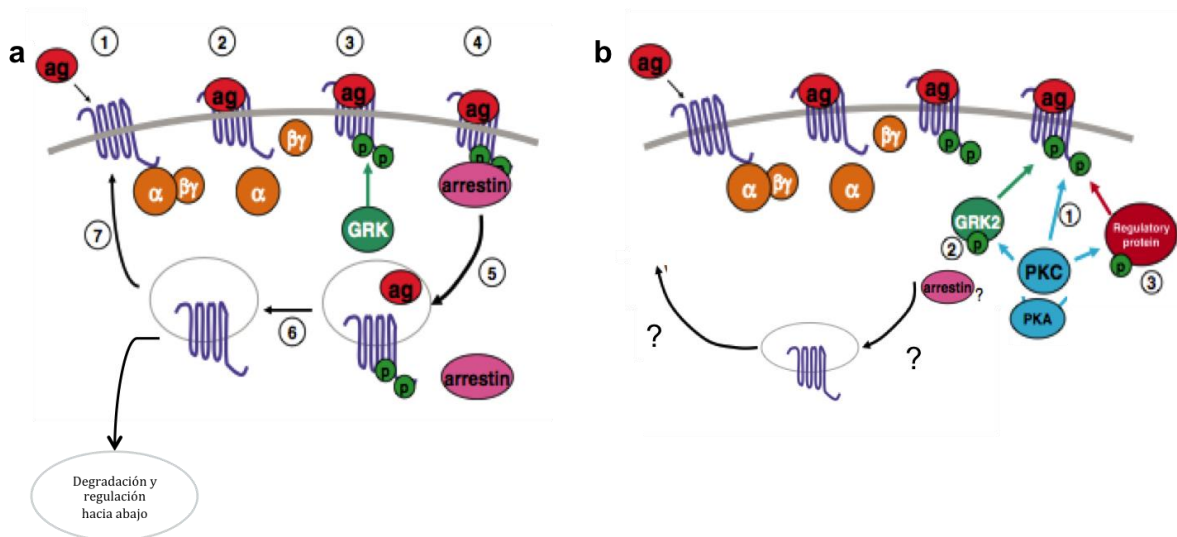
La magnitud de la desensibilización depende de varios factores, como la estructura del receptor, que determina la rapidez con la cual se desacopla del agonista y de la arrestina, así como el entorno celular en el que se encuentra (Kelly et al., 2008). En los últimos años se ha encontrado que el tipo de GRK también juega un papel importante

(Ferguson, 2001; Luttrell & Lefkowitz, 2002; Tobin, 2008). Ahora bien, las ventanas de tiempo en las que ocurren estos mecanismos van desde la fosforilación, que ocurre en segundos después de la unión del agonista; la internalización, que lleva minutos; hasta la re sensibilización, que puede llevar hasta varias horas, dependiendo del tipo de receptor.

Los mecanismos que intervienen en la regulación de un receptor son muchos y complejos. Después del descubrimiento de las GRK's, las cinasas dependientes de segundos mensajeros pasaron a segundo plano en la búsqueda del entendimiento de estos mecanismos reguladores. Sin embargo, con el avance de las herramientas experimentales y el descubrimiento de nuevos GPCR's, se han encontrado evidencias de que son un elemento importante en cualquier modelo de regulación. Incluso se ha encontrado el caso del receptor metabotrópico de glutamato 4, en el que la desensibilización ocurre sólo mediante la activación de PKC (Mathiesen & Ramirez, 2006).

Un problema interesante es que los mecanismos mediante los cuales ambos tipos de cinasas inducen la desensibilización de los receptores parecen ser distintos, ya que el receptor fosforilado por las cinasas PKC y PKA no funciona como sustrato para las arrestinas (Kelly et al., 2008; Pitcher et al., 1992). Entonces, ¿cómo inducen la desensibilización? (Fig. 4 b). Una teoría es que reclutan a un complejo GRK-arrestina y que, por lo tanto, las actividades de ambos tipos de cinasas no son independientes. Por ejemplo, en el sistema de regulación de receptores involucrados en el olfato, la inhibición de cualquiera de las cinasas resulta en la desaparición de la desensibilización de estos receptores (Ferguson, 2001; Schleicher et al., 1993). También se han encontrado evidencias de que la PKC induce la fosforilación de la proteína G provocando una alteración en su activación y función (García-Sáinz et al., 1999; Gutiérrez-Venegas & García-Sáinz, 1991; Hernandez-Sotomayor et al., 1991), o bien, que los residuos fosforilados en el receptor funcionan como un obstáculo para la unión de la proteína G (Benovic et al., 1985; en Kelly et al., 2008). Una explicación adicional es que las cinasas PKA y PKC reclutan otras proteínas reguladoras (Kelly et al., 2008).

Ahora bien, la principal diferencia entre las GRK's y las cinasas dependientes de segundos mensajeros es que las primeras pueden únicamente fosforilar a receptores activados por su ligando (desensibilización homóloga), mientras que las cinasas dependientes de segundos mensajeros fosforilan indistintamente a los receptores. Esto ha llevado a pensar que la fosforilación independiente del ligando, fosforilación del receptor en estado basal y los mecanismos de desensibilización heteróloga son una propiedad atribuida a las cinasas dependientes de segundos mensajeros. No obstante, varias vías de señalización encendidas por GPCR's tienen la capacidad de activar estas cinasas, por lo que no se puede descartar en su totalidad el papel de éstas en la desensibilización homóloga (Kelly et al., 2008).



**Fig. 4. Modelos de desensibilización de GPCRs inducida por GRK's y por cinasas dependientes de segundos mensajeros.** **a.** En la vía canónica el receptor es activado por el agonista (ag) (1) provocando el acoplamiento a proteína G (2) y la fosforilación por la GRK (3). La arrestina se une a los sitios fosforilados provocando la desensibilización del receptor (4), internalización (5), re-sensibilización por el desacoplamiento de la arrestina, el ligando y desfosforilación (6) y finalmente es reciclado a la membrana (7). Cuando el receptor no se desacopla del ligando y la arrestina, o el tratamiento con el agonista, es más prolongado, el receptor se degrada por vía de la ubiquitina-proteosoma provocando su regulación hacia abajo. **b.** Desensibilización inducida por cinasas dependientes de segundos mensajeros. Para los dos ejemplos (PKC y PKA) la vía de señalización encendida promueve la producción de segundos mensajeros y, por lo tanto, la activación de estas cinasas. Su activación permite que fosforilen al receptor (1), que eventualmente causa la desensibilización al impedir que se una la proteína G. Si esta fosforilación permite la unión de arrestinas depende del contexto celular y del receptor. No obstante existen otros mecanismos indirectos de regulación, por ejemplo, la activación de PKC o PKA, lo que promueve a su vez la activación de la GRK (2) u otras proteínas reguladoras del receptor (3)\* Imagen tomada y modificada de Kelly et al., 2008.

El conjunto de observaciones citadas arriba resalta el hecho de que todavía hay muchos aspectos por estudiar y descubrir en los mecanismos de desensibilización y, por lo tanto, de regulación de GPCR's. Pero sobre todo, persisten incógnitas sobre el papel de las cinasas dependientes de segundos mensajeros.

## LA FAMILIA DE PROTEÍNAS CINASAS C

Anteriormente se mencionaron los mecanismos mediante los cuales se desensibiliza un GPCR y se indicó que algunas de las cinasas dependientes de segundos mensajeros que participan en este proceso son las PKC's. Las PKC's forman una familia de cinasas de serina y treonina integrada por diez isoformas que se clasifican en tres grupos según su estructura y cofactor de activación (Newton, 2010a). La mayoría de las isoformas son activadas por lípidos, como el DAG, provocando su translocación a la membrana plasmática donde se localizan cercanas a su sustrato. Por esta razón, se sabe que se estimulan cuando un GPCR o un RTK enciende la PLC, y por lo tanto, el sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio. También se sabe que se pueden activar farmacológicamente con ésteres de forbol, como el promotor de crecimiento tumoral, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA).

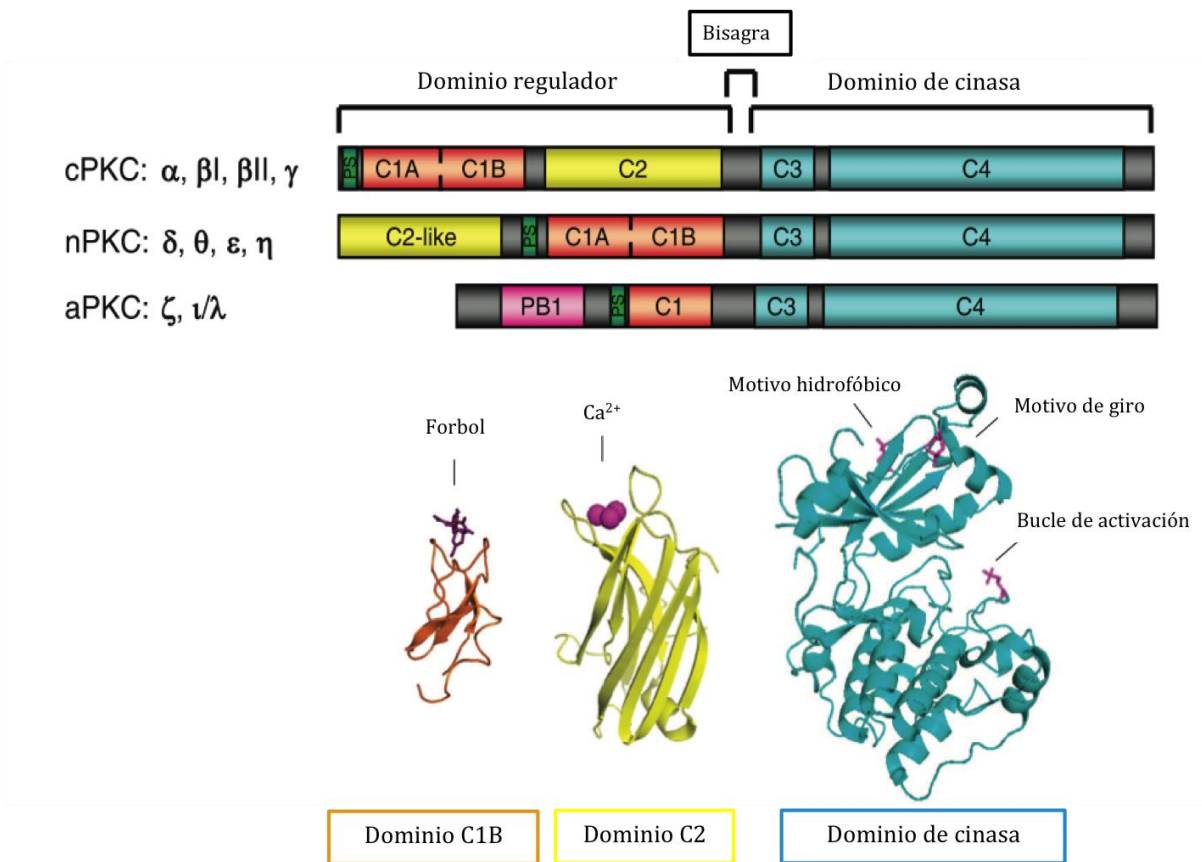
Todas las PKC's tienen un dominio regulador en su extremo amino terminal y un dominio de cinasa altamente conservado en la región carboxilo terminal, donde también está el dominio de unión al sustrato y al ATP (Newton, 2010a) (Fig. 5). Cercano al dominio de cinasa, se encuentra un motivo de giro y otro hidrofóbico, que son dominios de autofosforilación. El dominio regulador realiza dos funciones principales, una es la unión a segundos mensajeros como DAG (dominio C1) y  $Ca^{2+}$  (dominio C2), y otra es inhibir el centro activo a través de una región auto inhibidora formada por una secuencia de amino ácidos que contiene una alanina, que funciona como pseudosustrato. Ahora bien, otra característica importante de las PKC's es un bucle de activación que contiene una treonina que es fosforilada por la cinasa dependiente de fosfoinosítidos 1 (PDK-1). Cuando esta última es activada, fosforila este residuo preparando a la PKC para su activación. Posteriormente, la acumulación de DAG o  $Ca^{2+}$



promueve la unión de estos a los dominios C1 y C2, provocando la translocación de la PKC a la membrana (Newton, 2010b; Steinberg, 2008). La ocupación de C1 y C2, junto con la interacción de la PKC con la membrana, genera un cambio conformacional que libera el sitio catalítico.

Aunque el mecanismo de activación se conserva, las isoformas se clasifican con base en la estructura y funcionamiento de la región reguladora.

- **PKC's convencionales (cPKC's):** son las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  I,  $\beta$  II (una variante por "splicing" alternativo que contiene un mayor número de amino ácidos en el NH<sub>2</sub> terminal) y  $\gamma$ . Las cPKC's contienen un dominio C1 funcional formado por dos secuencias en tándem (C1A y C1B). También contienen un dominio C2 funcional por lo que su mecanismo de activación es el que se explicó arriba.
- **PKC's nuevas (nPKC's):** se dividen a su vez en dos grupos que comparten mayor homología. Uno está formado por las isoformas  $\delta$  y  $\theta$ , y otro por las isoformas  $\epsilon$  y  $\eta$ . La secuencia de las nPKC's contiene primero el dominio C2 y luego el dominio C1. El dominio C2 no une calcio por lo que se le conoce como dominio "tipo C2". Aunque el dominio C1 funciona igual que el de las cPKC's, el dominio C2 es distinto por lo que el mecanismo de activación difiere del de las cPKC's.
- **PKC's atípicas (aPKC's):** son las isoformas  $\zeta$  y  $\iota/\lambda$ . No contienen C2 y el dominio C1 reconoce solamente a PIP<sub>3</sub> o ceramida. Adicionalmente, las aPKC's contienen un dominio PB1 (Phox and Bem1) que media la dimerización de proteínas con el mismo dominio, por ejemplo p62, MEK5, Par6, entre otras (Noda et al., 2003). Esto explica por qué las aPKC's están reguladas principalmente por interacciones con otras proteínas y no por lípidos como las demás isoformas.



**Fig. 5. Esquema de la estructura de las isoformas de las PKC's.** Todas las PKC's tienen un dominio regulador variable y un dominio de cinasa (azul) conservado. El dominio regulador tiene un motivo de pseudosustrato (verde PS) que mantiene a la enzima en una conformación inactiva. Los dominios C1 (naranja) (compuestos por C1A y C1B) son sensores moleculares de DAG para las cPKC's y nPKC's, mientras que el dominio C1 en las aPKC's no reconoce DAG. Los dominios C2 (amarillo) son sensores de calcio en las cPKC's únicamente. El dominio tipo C2 ("C2-like") de las nPKC's no reconoce calcio. En gris oscuro se muestran las regiones que varían según la isoforma. En la parte baja de la figura se muestran diagramas de los dominios C1B, C2 y el dominio de cinasa. \* Imagen tomada y modificada a partir de Steinberg, 2008.

Las PKC's se han implicado en muchos procesos de regulación metabólica, proliferación y migración por lo que generalmente se expresan de manera ubicua y muchas células contienen diferentes isoformas simultáneamente. Sin embargo, algunas PKC's se expresan preferentemente en ciertos tejidos. Por ejemplo, la isoforma  $\theta$  se expresa fundamentalmente en músculo esquelético, órganos linfoides y tejido hematopoyético; la PKC  $\gamma$  se encuentra expresada en neuronas. El resto de las isoformas se expresan de manera más ubicua.

## EL RECEPTOR S1P<sub>1</sub> Y SU LIGANDO LA ESFINGOSINA-1-FOSFATO

### LA ESFINGOSINA-1-FOSFATO

Los esfingolípidos son moléculas esenciales para las células eucariotas. Fueron descritos por primera vez en 1884 por el neuroquímico alemán J.L Thudichum en un trabajo que tituló "A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain". En un principio se pensaba que su función era solamente ser un soporte para la membrana. Sin embargo, el estudio de su metabolismo y función reveló que además de su función estructural, los esfingolípidos funcionan como moléculas de señalización. Las primeras evidencias de sus funciones como lípidos señalizadores fueron publicadas en 1991, por el grupo de investigadores dirigido por Sarah Spiegel. Ellos demostraron que uno de estos metabolitos, la esfingosina-1-fosfato (S1P), es una molécula bioactiva que funciona como un potente mitógeno (Zhang et al., 1991). Hoy en día, la S1P ha despertado gran interés en la investigación básica y clínica por sus implicaciones en procesos celulares y fisiológicos como la angiogénesis y el tráfico de leucocitos, entre otros procesos fisiológicos.

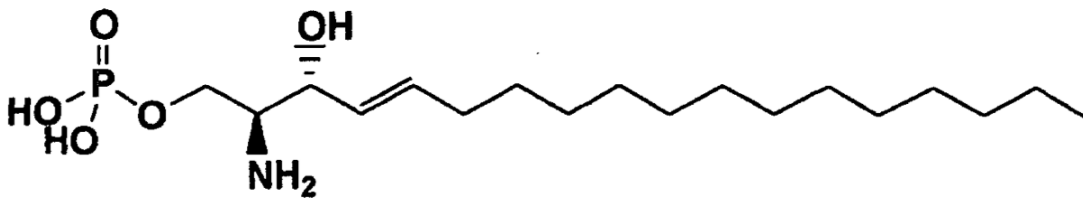


Fig. 6. Estructura de S1P.

La S1P tiene una estructura simple formada por una cadena de 18 carbonos (un grupo acilo), un grupo NH<sub>2</sub>, dos alcoholes y un grupo fosfato (Fig. 6). Está presente en altas concentraciones en la sangre y linfa, alrededor de 0.5 μM, unida principalmente a lipoproteínas de alta densidad y en menor grado a la albúmina (Spiegel, 2000). También se encuentra en el espacio intersticial de los tejidos pero en concentraciones

mucho menores que en la sangre, alrededor de 5-20 nM (Rosen & Goetzl, 2005; Young & Van Brocklyn, 2006). El gradiente que se establece entre la sangre, o la linfa, y el espacio intersticial es aprovechado por muchos tipos celulares como una señal migratoria; especialmente por células hematopoyéticas y del sistema inmunológico (Rivera et al., 2008). Aunque casi todos los tipos celulares pueden sintetizar S1P, una porción significativa de la que se encuentra en sangre y linfa se atribuye a la secreción por eritrocitos, plaquetas activadas (Yatomi et al., 2001; Yutaka Yatomi, 2008), y células del endotelio vascular (Timothy Hla et al., 2008; Igarashi & Michel, 2008; Venkataraman et al., 2008).

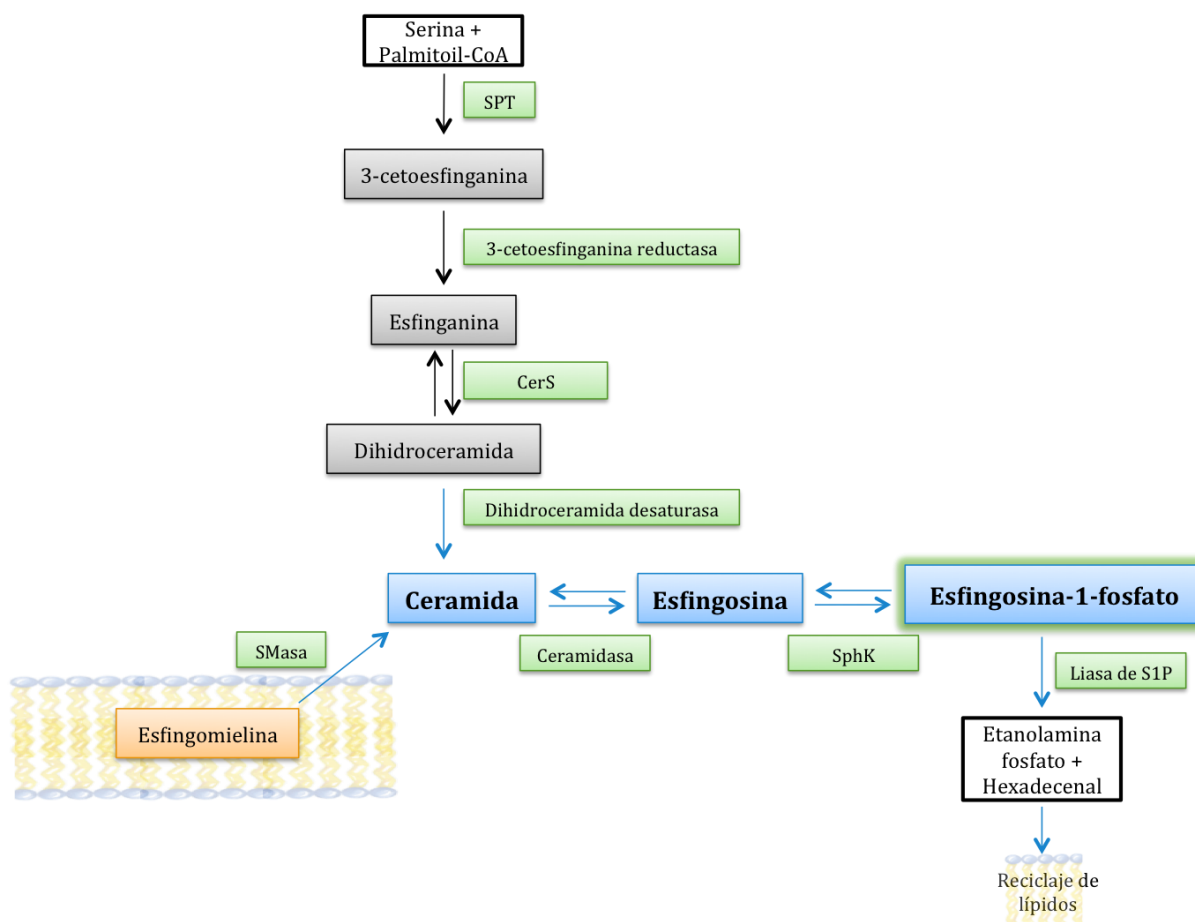
#### SÍNTESIS DE LA ESFINGOSINA-1-FOSFATO

---

Los esfingolípidos son moléculas anfipáticas que contienen una región hidrofóbica que consiste en un esqueleto formado por una base esfingoides a la que se le puede añadir un ácido graso. Una de estas bases esfingoides es la S1P y su síntesis es producto del metabolismo de la ceramida, que es la base estructural de los esfingolípidos y el centro de la biosíntesis. La ceramida se puede generar por dos caminos, uno catabólico y otro por el cual se genera *de novo* (Fig. 7). El camino catabólico es un camino corto y relativamente más simple. Es catalizado por la enzima esfingomielinasa (SMasa) y consiste en la hidrólisis de la esfingomielina para generar ceramida y fosfolina.

La síntesis *de novo* empieza en el retículo endoplásmico liso cuando se condensa una serina con un palmitoil coenzima A gracias a la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT). La condensación de estas dos moléculas forma una molécula de esfinganina. Posteriormente la sintasa de ceramida promueve la N-acilación de esta para producir dihidroceramida. El último paso de la síntesis *de novo* de la ceramida es catalizada por la enzima dihidroceramida desaturasa y consiste en "desaturar" la molécula produciendo un enlace doble entre los carbonos 4 y 5 del esqueleto de esfingosina. Una vez que se obtiene la ceramida por cualquiera de los caminos, puede ser sometida a una desacilación catalizada por la ceramidasa para obtener esfingosina. La esfingosina

puede ser fosforilada para formar S1P por una enzima llamada esfingosina cinasa (SphK) y posteriormente degradada irreversiblemente por la S1P liasa para dar etanolamina fosfato y hexadecenal, que puede ser reducido a palmitato y reciclado a la síntesis *de novo*. Alternativamente, la S1P puede ser desfosforilada a esfingosina por fosfatasas específicas de S1P o fosfatasas de lisofosfolípidos (Timothy Hla et al., 2008).



**Fig. 7. Síntesis de S1P.** La ceramida es el centro del metabolismo de la S1P. Se puede sintetizar *de novo* a partir de la unión entre una serina y un palmitoil CoA por la acción de la serinpalmitoiltransferasa (SPT) para formar 3-cetoesfinganina, que es reducida por la reductasa a esfinganina. Posteriormente la esfinganina es acilada por la ceramida sintasa (CerS) y desaturada por una desaturasa. La ceramida puede ser desacilada para dar lugar a la esfingosina. Esta última es fosforilada por la enzima esfingosina cinasa (SphK) para producir la S1P.

En mamíferos se han identificado dos isoformas de SphK's, la SphK1 y la Sphk2, que se expresan de manera ubicua, pero más abundante en eritrocitos y células endoteliales

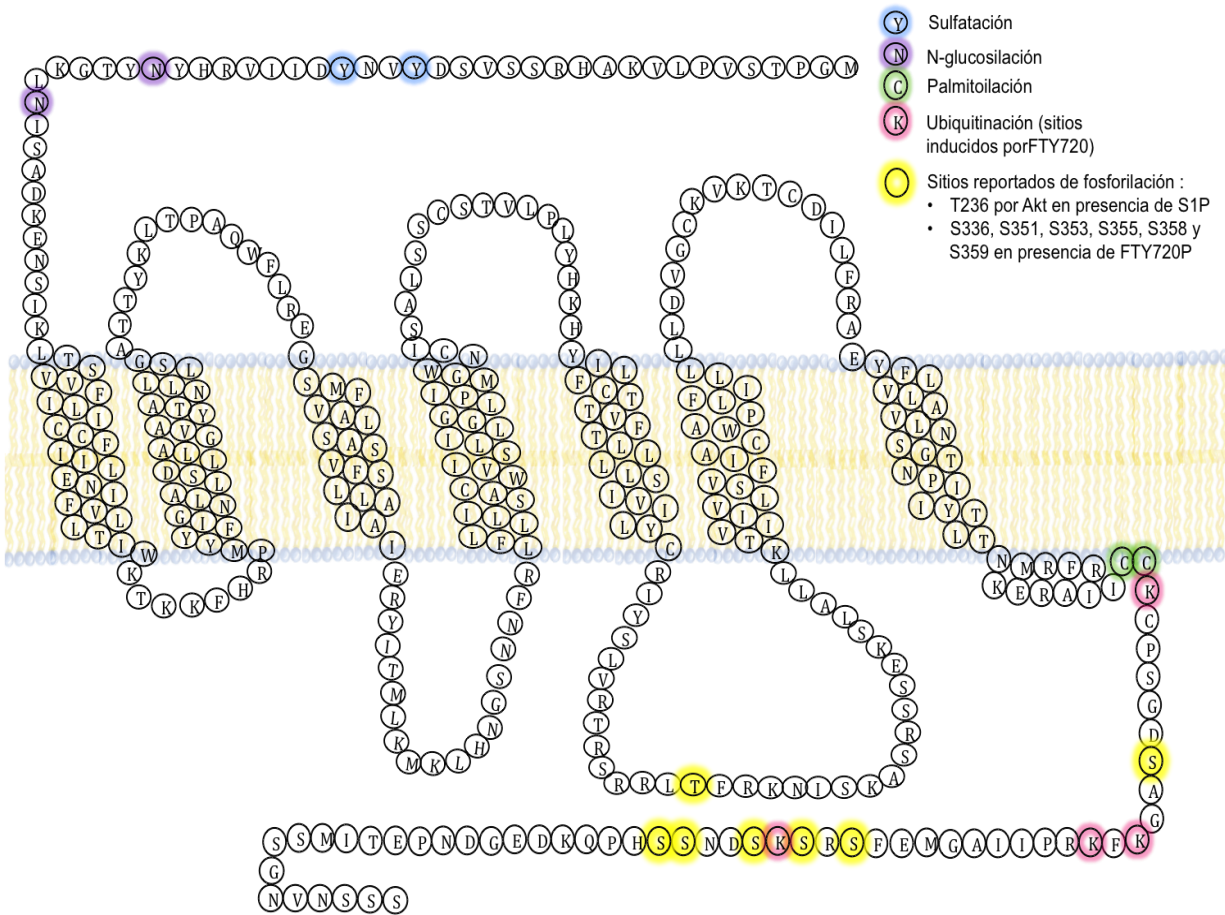
(Aarthi et al., 2011). Se cree que la SphK1 es la cinasa principal en la producción de S1P. Se ha demostrado que su actividad puede ser estimulada por citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento (Melendez, 2008), y que esta activación puede ser dependiente de PKC (Johnson et al., 2002; Susan Pyne et al., 2009). Por otro lado, la Sphk2 se localiza principalmente en el núcleo y se sabe menos acerca de su actividad y regulación (Rosen et al., 2009). La delección génica en ratones de sólo una isoforma no tiene ningún efecto, pero la delección de ambas es una mutación embrionaria letal (Blaho & Hla, 2011).

Hoy se sabe que la S1P produce una variedad de respuestas celulares de gran relevancia como la proliferación, diferenciación, motilidad, y sobrevivencia al regular la apoptosis (Alvarez et al., 2007). Contrario a la función de la S1P, sus precursores la ceramida y la esfingosina, se han asociado a la regulación de procesos apoptóticos en respuesta a situaciones de estrés celular (Alvarez et al., 2007; Ogretmen & Hannun, 2004). La facilidad con la que estas moléculas se intercambian entre ellas y los efectos opuestos que producen, ha llevado a investigadores en el campo a proponer que la conversión entre S1P y sus precursores actúa como una balanza que determina el destino de la célula. Por esta razón, la concentración intracelular de S1P es regulada cuidadosamente mediante el equilibrio de su síntesis y degradación.

Las evidencias que existían sobre la síntesis intracelular y la activación de las SphK's por factores de crecimiento sugerían la posibilidad de que la S1P actuaba como segundo mensajero, pero pronto se descubrió que las principales acciones de la S1P ocurren cuando este actúa como ligando de una familia de cinco GPCR's. La respuesta que activa la S1P es heterogénea ya que cada receptor se acopla a diferentes proteínas G (Tabla 1). Pero, si se sintetiza intracelularmente ¿cómo sale al espacio extracelular para actuar de manera autocrina y paracrina? Estudios *in vitro* de células cebadas de humano y de rata demostraron que el transportador ABCC1 (ATP-binding cassette) está involucrado en el transporte de la S1P. Aunque existe evidencia muy concreta acerca de la síntesis intracelular y la posterior secreción de S1P, la hipótesis de que esta actúa como segundo mensajero sigue en vías de investigación (Pyne & Pyne, 2000).

## EL RECEPTOR S1P<sub>1</sub>

El primer miembro de la familia de GPCR's que utiliza a la S1P como ligando fue descubierto en 1990 por Timothy Hla y sus colaboradores al identificar un receptor huérfano que se expresaba cuando se inducía la diferenciación endotelial con PMA (Hla & Maciag, 1990). Por esta razón se le designó "*Endothelial Differentiation Gene 1*" (EDG-1), después se le llamó S1P<sub>1</sub>. Ahora se sabe que este receptor está compuesto de 380 amino ácidos que forman la estructura de un GPCR de clase A, es decir con similitud a la bacteriorodopsina (Fig. 8). La secuencia empieza con la región amino terminal compuesta por 46 amino ácidos, entre los que se encuentran dos residuos (Asn<sub>30</sub> y Asn<sub>36</sub>) con alta probabilidad de ser sustratos de N-glucosilación y dos tirosinas (Tyr<sub>19</sub> y Tyr<sub>22</sub>) que sufren sulfatación y están implicadas en la afinidad por el ligando (Fieger et al., 2005; Moore, 2003). La secuencia continúa con siete dominios hidrofóbicos que se alternan con ocho dominios hidrofílicos (incluyendo el segmento amino-terminal que ya se mencionó arriba). Cada dominio hidrofóbico está compuesto de 20 a 26 amino ácidos, mientras que los dominios hidrofílicos son más pequeños y se componen de 7 a 19 amino ácidos, excepto el dominio citoplasmático entre la quinta y la sexta hélice (residuos 223 a 255) que está compuesto por 33 amino ácidos básicos reportados como sitios clave de modificaciones proteolíticas (Devi, 1991) y que tienen homología con otros receptores de la subfamilia de los receptores de serotonina (Julius et al., 1988 en Hla & Maciag, 1990). Por último, la secuencia peptídica del receptor termina con un segmento carboxilo terminal compuesto por 68 amino ácidos abundantes en residuos de serina y treonina que se describirán más adelante en la sección de regulación.



**Fig. 8. Esquema del receptor S1P<sub>1</sub>.** En diferentes colores se resaltan los principales sitios de modificaciones postraduccionales citadas en el texto.

En el artículo en el que se presenta el hallazgo del receptor, Timothy Hla menciona tres sitios importantes, además de los ya mencionados arriba, que lo describen como un GPCR. El primero es Glu<sub>141</sub>-Arg<sub>142</sub>-Tyr<sub>143</sub>, al principio de la segunda asa intracelular, conocido como motivo “DRY” (aunque en algunos casos el primer residuo puede ser un ácido glutámico, como en el caso del S1P<sub>1</sub>), que también se ha reportado en el receptor β<sub>2</sub> adrenérgico y que es necesario para el anclaje de la proteína G (Hla & Maciag, 1990; Lee et al., 1996). El segundo sitio de homología es la mitad más cercana al extremo carboxilo terminal o, más específicamente, el séptimo dominio hidrofóbico de la secuencia del S1P<sub>1</sub> se encuentra conservado en los GPCR’s que reconocen hormonas peptídicas como ligandos endógenos (Hla & Maciag, 1990). El tercer sitio consiste en dos residuos de cisteína (Cys<sub>329</sub>-Cys<sub>330</sub>) en el segmento carboxilo terminal susceptibles



a S-palmitoilación<sup>3</sup> (Fig. 8). Esta modificación postraduccional es de vital importancia para el anclaje estable de proteínas a la membrana plasmática (Salaun et al., 2010) y parece también ser el caso para el receptor S1P<sub>1</sub>. Ohno y sus colaboradores mutaron estas cisteínas por alaninas para evitar la palmitoilación. Encontraron que sin estos residuos el receptor es más difícil de internalizar y la señalización se reduce en general (Ohno et al., 2009).

Después de su descubrimiento, el S1P<sub>1</sub> se mantuvo como receptor huérfano hasta que en 1998 otro grupo de investigadores, en el que también estaba Timothy Hla, observaron que en el suero se encontraba una sustancia que inducía cambios morfológicos en células de riñón de humano (la línea celular HEK293) transfectadas con el receptor. Utilizando métodos de purificación determinaron que la S1P era el inductor más potente de los cambios morfológicos (M. Lee, 1998). El análisis de la curva de unión reveló que la S1P se une al receptor con una afinidad alta (con una K<sub>d</sub>= 8 nM) y con gran especificidad, pues sólo la esfinganina-1-fosfato que no tiene el enlace doble en el carbono 4, compite con la S1P en los ensayos de unión con [<sup>32</sup>P]S1P (M. Lee, 1998; Spiegel, 2000).

Una vez que encontraron el ligando fue más fácil identificar otros receptores que también reconocen a la S1P y que tienen una secuencia muy parecida al Edg1, por lo que se les denominó receptores Edg. Estos receptores se encuentran clasificados dentro de la superfamilia de receptores de clase A, junto a la familia de receptores de cannabinoides. La subfamilia de receptores Edg está compuesta por 8 miembros Edg<sub>1-8</sub>, que son activados por lisofosfolípidos. Cinco miembros de esta familia Edg1, Edg5, Edg3, Edg6 y Edg8 (S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> y S1P<sub>5</sub> respectivamente) reconocen a la S1P como su ligando endógeno con una afinidad alta (K<sub>d</sub>= 8-63 nM) (Rosen et al., 2009; Young & Van Brocklyn, 2006) (Tabla 1). El resto de los receptores de esta familia, Edg2,

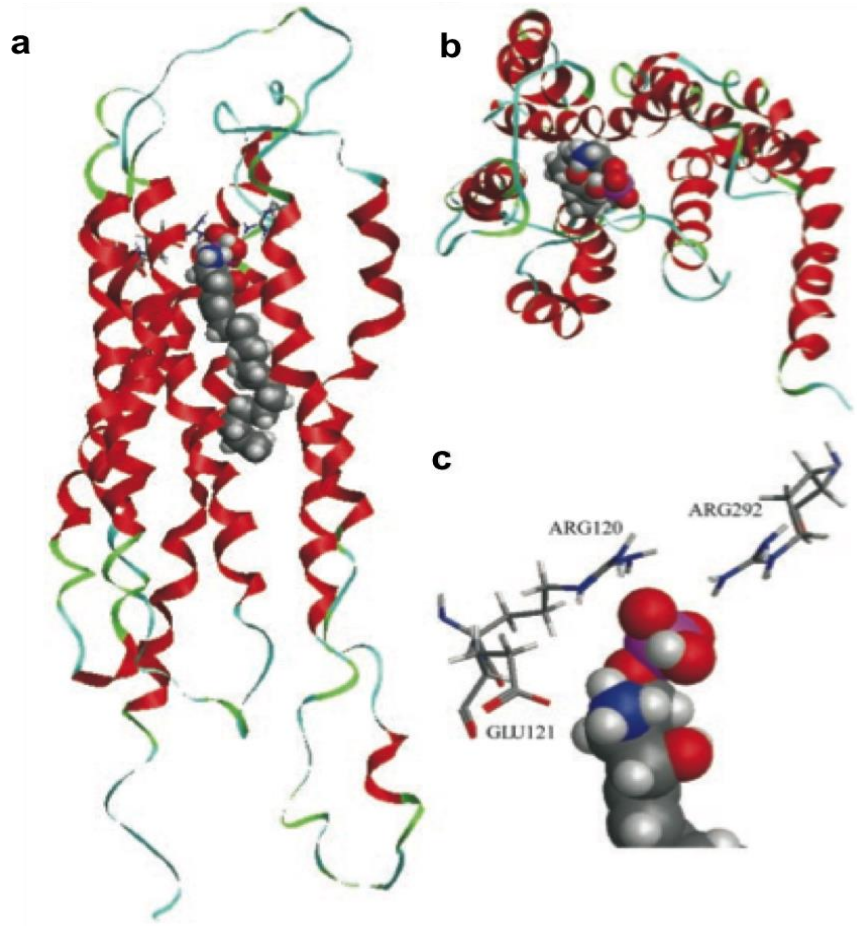
---

<sup>3</sup> La palmitoilación es la adición reversible de un ácido palmítico a través de un enlace tioéster. Se ha establecido una correlación entre la fosforilación del receptor y la despalmitoilación. En algunos receptores, como el β<sub>2</sub> adrenérgico, una mutación en la cisteína del carboxilo terminal que impide la palmitoilación de esta, provocó un aumento en la fosforilación basal del receptor. Esto último podría implicar que la palmitoilación limita el acceso de cinasas a la cola carboxilo terminal del receptor, pero cuando el receptor se encuentra en una conformación activa, la fosforilación promueve la despalmitoilación del receptor para facilitar su internalización.

Edg4 y Edg7 son activados por otro lípido bioactivo, el ácido lisofosfatídico (LPA) (Parrill et al., 2000; Spiegel, 2000).

Estudios relativamente recientes realizados por el grupo de Gabor Tigyi identificaron los residuos clave en la interacción de la S1P con el receptor S1P<sub>1</sub>. Encontraron que, como otros GPCRs, la S1P se une a un “*binding pocket*” (Parrill et al., 2000). La S1P se acomoda metiendo primero el esqueleto de carbonos y dejando la cabeza con el grupo fosfato cercana al lado extracelular. El modelo creado por Parrill y Tigyi predice 3 interacciones iónicas importantes entre la S1P y el receptor: los amino ácidos catiónicos Arg<sub>120</sub> y Arg<sub>292</sub> interaccionan con grupo fosfato de la S1P, mientras que el amino ácido aniónico Glu<sub>121</sub> interacciona con el grupo amino (Parrill et al., 2000) (Fig. 9). Los fosfolípidos que no tienen el grupo amino cerca del fosfato, como el LPA, no pueden hacer un enlace iónico con Glu<sub>121</sub> por lo que el grupo carboxilo del ácido glutámico repele al grupo fosfato del lípido, dificultando la unión al receptor. Dentro de la familia de los receptores Edg, sólo los que reconocen a la S1P conservan este amino ácido en esta posición.

De estos receptores, sólo la delección génica del receptor S1P<sub>1</sub> es letal en el embrión (Lynch & Macdonald, 2008). Ocurre por una falla en el desarrollo del sistema vascular, ocasionando rupturas en los vasos que llevan a hemorragias fatales. El fenotipo de la delección génica de este receptor coincide con el fenotipo de las SphK's y refleja una función clave de la S1P en el desarrollo vascular embrionario. Al contrario de la delección del receptor S1P<sub>1</sub>, la delección de S1P<sub>2</sub> y S1P<sub>3</sub> resulta en embriones viables, aunque a veces son letales en la etapa perinatal generalmente son fenotipos que sobreviven, lo que sugiere que hay mecanismos compensatorios entre receptores y la posibilidad de coexpresión de uno o más de estos receptores en algunos tipos celulares.

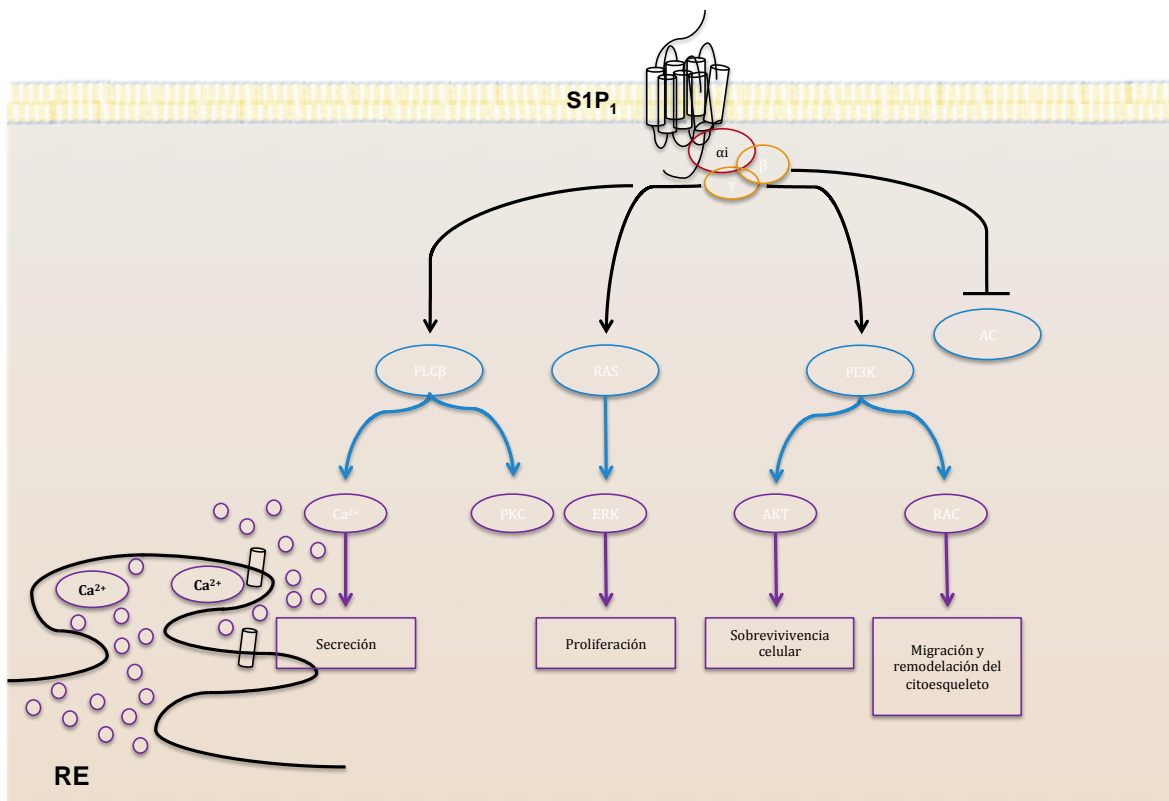


**Fig. 9. Características estructurales del receptor S1P<sub>1</sub> formando un complejo con S1P.** **a.** Modelo del receptor S1P<sub>1</sub> con la S1P (el esqueleto de carbonos (gris oscuro) hacia el lado citoplásmico y la cabeza de fosfato (rosa) viendo hacia el lado extracelular) visto desde el plano de la membrana. El lado extracelular está orientado hacia arriba. **b.** El mismo modelo visto desde arriba, es decir, desde el lado extracelular. Se puede ver con claridad cómo la S1P se encuentra en el bolsillo de unión entre las hélices transmembranales. **c.** Una imagen más cercana de las interacciones iónicas entre los aminoácidos y la cabeza de la S1P. En rosa se ve el átomo de fósforo que junto con los oxígenos (rojo) forma el grupo fosfato y en azul el átomo de nitrógeno que junto con los hidrógenos (gris claro) forma el grupo amino. \* Imagen tomada de Parrill et al., 2000.

Aunque entre los receptores de S1P hay una homología de aproximadamente 50% (S Pyne & Pyne, 2000), estos receptores se expresan de manera diferente, dependiendo del tejido en el que se encuentran y se acoplan a varios tipos de proteínas G, también dependiendo del tejido (Ancellin & Hla, 1999). Esto último permite que a la S1P genere una gama amplia de efectos celulares que influyen en diversos procesos fisiológicos que van desde el desarrollo vascular y el ritmo cardiaco, hasta la regulación del sistema

inmunológico. Más aún, esto hace que la señalización de estos receptores sea altamente especializada y tal vez única para cada subtipo de receptor.

El S1P<sub>1</sub> es el único receptor monógamo en el sentido de que se acopla únicamente a la familia de proteínas heterotriméricas G<sub>i/o</sub>, por lo que algunas moléculas río abajo en su señalización son la PLCβ, las MAP cinasas (MAPK), AKT y Rac1 que son activadas por el dímero βγ (Volker Brinkmann, 2007; M. J. Lee et al., 1996) (Fig. 10). Su expresión es ubicua pero se encuentra en mayores cantidades en tejido nervioso, sistema cardiovascular, células del sistema inmunológico, pulmones y riñón (Tabla 1).



**Fig. 10. Vía de transducción de señales del receptor S1P<sub>1</sub>.**\* Imagen creada a partir de Rosen & Goetzl, 2005.

| Receptor                                       | Proteína G   | Fenotipo del <i>Knock-out</i>  | Agonistas   | Antagonistas                              | Distribución en tejidos   | Función celular   |
|--|--|--|---|---|---|---|
| S1P <sub>1</sub><br>(edg1)<br>381 <sup>a</sup> | G <sub>i/o</sub>   | Letal por falta de maduración del sistema vascular (hemorragias masivas).<br>Timocitos son incapaces de salir a circulación. | FTY720-P<br>KRP-203<br>AUY95<br>SEW2871<br>CYM5442<br>Ácidos aril-propiónicos | VPC-23019<br>W123<br>(R)-W146<br>VPC44116 | Cerebro, corazón, bazo, hígado, pulmón, timo, riñón, músculo esquelético y liso, y células hematopoyéticas/linfoides. | Astrocitos y Célula Troncal Neuronal: migración.<br>Células T: bloqueo de egreso, quimiotaxis, disminuye la maduración tardía.<br>Células B: bloqueo de egreso, quimiotaxis.<br>Cardiomiocitos: aumento positivo en la inotropía.<br>Células Endoteliales: desarrollo del sistema vascular, fortalecimiento de uniones adherentes y de la barrera endotelial.                                     |
| S1P <sub>2</sub><br>(edg5)<br>353 <sup>a</sup> | G <sub>i/o</sub><br>G <sub>q</sub><br>G <sub>12/13</sub> | Menos viabilidad en etapa perinatal.<br>En algunos casos hay convulsiones.<br>Sordera  | N/A   | JTE-013                                   | Cerebro, corazón, bazo, hígado, pulmón, timo, riñón y músculo esquelético y liso.                                     | Cardiomiocitos: sobrevivencia en eventos de isquemia-reperfusión.<br>Hepatocito: proliferación y remodelación de la ME.<br>Células cebadas: degranulación.<br>Células del músculo liso vascular: menor migración inducida por PDGF.<br>Células epiteliales (stria vascularis y cochlea): desarrollo<br>Células epiteliales (retina): angiogénesis patológica y rompimiento de uniones adherentes. |
| S1P <sub>3</sub><br>(edg3)<br>378 <sup>a</sup> | G <sub>i/o</sub><br>G <sub>q</sub><br>G <sub>12/13</sub> | Menos viabilidad en etapa perinatal.<br>Empeora eventos de sepsis.   | FTY720-P<br>KRP-203   | VPC-23019                                 | Cerebro, corazón, bazo, hígado, pulmón, timo, riñón, testículo y músculo esquelético.                                 | Cardiomiocitos: sobrevivencia a eventos de isquemia-reperfusión.<br>Células dendríticas: empeora la sepsis experimental (letalidad, inflamación y coagulación).   |
| S1P <sub>4</sub><br>(edg6)<br>384 <sup>a</sup> | G <sub>i/o</sub><br>G <sub>12/13</sub>                   | N/A  | FTY720-P<br>KRP-203   | N/A                                       | Células linfoides y pulmón.   | Células T: migración y secreción de citocinas.  |
| S1P <sub>5</sub><br>(edg8)<br>398 <sup>a</sup> | G <sub>i/o</sub><br>G <sub>12/13</sub>                   | No se distingue un fenotipo especial.  | FTY720-P<br>KRP-203   | N/A                                       | Cerebro, piel y bazo.   | Células NK: migración y tráfico.<br>Oligodendrocitos: sobrevivencia.<br>Células precursoras de Oligodendrocitos: inhibe migración.  |

**Tabla 1. Los receptores de S1P: Distribución y función.** <sup>a</sup> Número de amino ácidos. \* Tabla creada a partir de Rosen et al., 2009.

Contrariamente, los demás receptores son más promiscuos pues tienen la capacidad de acoplarse a más de una familia de proteínas G. Por ejemplo, el receptor S1P<sub>2</sub> se puede acoplar a G<sub>s</sub>, G<sub>q</sub> o G<sub>12/13</sub>, mientras que S1P<sub>3-5</sub> se pueden acoplar a G<sub>i/o</sub> o G<sub>12/13</sub> (Tabla 1). En general la expresión de estos receptores también es ubicua pero cada receptor se expresa preferentemente en ciertos tejidos.

## REGULACIÓN DEL RECEPTOR S1P<sub>1</sub>: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La activación del receptor S1P<sub>1</sub> tiene ciertas características que provocan la regulación negativa del receptor. En un principio, la S1P genera una respuesta dosis dependiente clásica, es decir, la respuesta alcanza un punto máximo de activación al incrementarse la concentración del ligando. Eventualmente, el receptor se desensibiliza de manera homóloga en respuesta a un incremento en la concentración del ligando, al tiempo de estimulación o a estimulaciones repetidas. Como parte de la desensibilización, el receptor es internalizado desde la membrana plasmática a endosomas y cuerpos vesiculares. El camino que toma el receptor dentro del endosoma depende de las propiedades del ligando (Fig. 11). Por ejemplo, el agonista y el prototipo de regulador negativo del receptor S1P<sub>1</sub>, el FTY720-P, induce la poliubiquitinación del receptor en residuos de lisina (Lys<sub>330</sub>, Lys<sub>339</sub>, Lys<sub>341</sub> y Lys<sub>354</sub>) del extremo carboxilo promoviendo su degradación (Oo et al., 2011)<sup>4</sup>. Este agonista empieza a utilizarse en la clínica para controlar el progreso de enfermedades autoinmunes y desmielinizantes, como la esclerosis múltiple, ya que al funcionar como antagonista funcional del receptor, interrumpe la capacidad de los linfocitos de responder al gradiente de S1P y los atrapa en los nódulos linfáticos, ocasionando linfopenia a nivel sistémico (Brinkmann et al., 2001; Brinkmann et al., 2010).

---

<sup>4</sup> Contrario al efecto drástico del FTY720P, la S1P produce internalización pero no la degradación del receptor en condiciones fisiológicas (la posibilidad de que esto ocurre a concentraciones supra fisiológicas no se ha estudiado aún). En las discusiones de estos estudios se han propuesto dos explicaciones. Una es que la capacidad del FTY720P de inducir la poliubiquitinación del receptor en endosomas para dirigirlo a degradación puede ser producto de que este compuesto es resistente a la acción de las fosfatasa y de la S1P liasa. La otra propuesta es que el compuesto mantiene al receptor en una conformación que inhabilita a las fosfatasa, impidiendo la disociación entre el compuesto y el receptor.

Ahora bien, como ya se ha mencionado, los mecanismos de regulación y desensibilización empiezan con la fosforilación del extremo carboxilo terminal del receptor. La primera evidencia de que el receptor S1P<sub>1</sub> se fosforilaba como consecuencia de la unión del agonista fue publicada en 1998 por el grupo de Timothy Hla (M. J. Lee et al., 1998). Un año más tarde, el mismo grupo de investigadores identificó, mediante mutagénesis del extremo carboxilo, un dominio rico en serinas (<sup>351</sup>SRSKSDNSS<sup>359</sup>) que al mutarse inhibía la desensibilización e internalización del receptor (Liu et al., 1999). Una vez establecida la importancia de extremo carboxilo en la desensibilización del receptor, el siguiente paso fue encontrar a las cinasas responsables de este efecto. Se demostró que, al igual que otros GPCR's, las GRK's y el subsecuente reclutamiento de arrestinas, juegan un papel clave (Arnon et al., 2011; Oo et al., 2007; Watterson et al., 2002). Recientemente, con el desarrollo del agonista FTY720-P, se han encontrado sitios de fosforilación más específicos en las serinas S<sup>351</sup>, S<sup>352</sup> y S<sup>355</sup> (Oo et al., 2011) (Fig. 8).

Se ha demostrado que, además de la fosforilación por GRK, y la activación de la vía canónica, la activación de PKC's por PMA induce la fosforilación del receptor y bloquea la señalización del receptor S1P<sub>1</sub> (Watterson et al., 2002) (Fig.11). Aunque la fosforilación inducida por PMA tiene similitudes con la que es inducida por el ligando, las evidencias demuestran que ocurren por mecanismos diferentes (Watterson et al., 2002). No obstante, dada la relevancia fisiológica de la PKC en procesos de regulación (Fig. 4), la fosforilación del receptor inducida por esta cinasa representa un mecanismo importante de regulación que amerita indagaciones más profundas, pues podría estar implicada en procesos de desensibilización heteróloga.

La caracterización del papel de estas cinasas en la regulación del receptor S1P<sub>1</sub> se complica por la existencia de más de una isoforma (Newton, 2010a; Steinberg, 2008). Aunque ya esté demostrado que las PKC's tienen la capacidad de fosforilar al receptor, el papel que tienen las distintas isoformas en los mecanismos de regulación no se ha estudiado aún y esta tesis tiene como orientación general la identificación de las isoformas de PKC involucradas en este proceso.

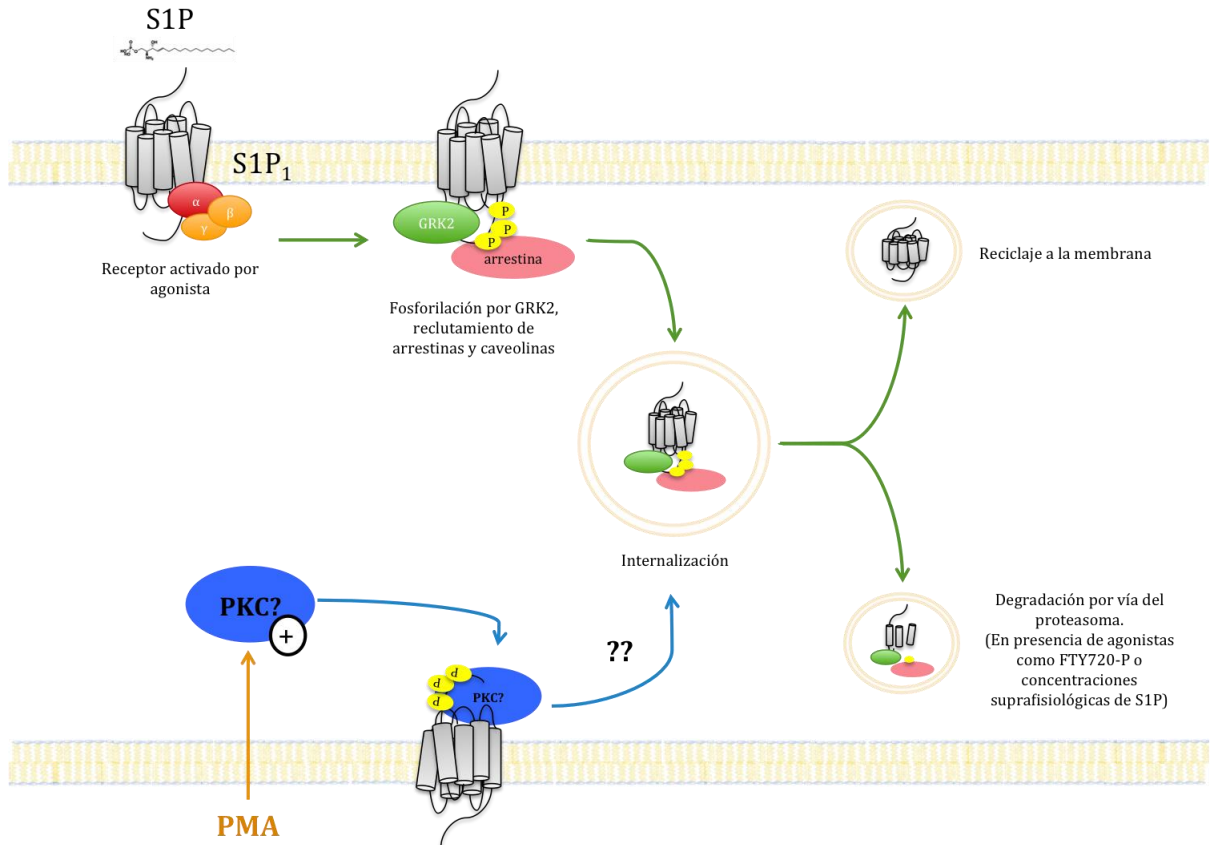


Fig. 11. Esquema del modelo de regulación del receptor S1P<sub>1</sub>.

#### JUSTIFICACIÓN

La activación del receptor S1P<sub>1</sub> y los cambios en su expresión se han asociado a numerosos procesos fisiológicos, por lo que fallas en los mecanismos que lo regulan se han asociado a la patogénesis de algunas enfermedades cardiovasculares, cáncer y procesos inflamatorios, entre otros (Pyne et al., 2009). La búsqueda de la caracterización de estos mecanismos, así como la identificación de las proteínas reguladoras abre muchas posibilidades hacia la creación de estrategias terapéuticas para enfermedades en las que se encuentre involucrado el receptor S1P<sub>1</sub>.

La regulación del receptor S1P<sub>1</sub> no se conoce en su totalidad y la identidad de las cinasas involucradas empieza a conocerse. Por esta razón, este trabajo busca contribuir a la caracterización de los mecanismos mediante los cuales se regula la



función del receptor y a la identificación de las proteínas responsables de este proceso.

## HIPÓTESIS

La activación por PMA de la PKC inducirá la fosforilación y la consecuente desensibilización del receptor S1P<sub>1</sub> en células humanas derivadas de cáncer de próstata. Existen isoformas específicas que están involucradas en este proceso de regulación.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo general del proyecto es estudiar el papel de las distintas isoformas de PKC en la regulación por fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub>. Así como establecer cuál es la principal isoforma de PKC en este mecanismo regulador.

### OBJETIVOS PARTICULARES

Para cumplir con el objetivo principal se pretenden alcanzar los siguientes objetivos particulares:

1. Caracterizar farmacológica y análisis funcional del receptor S1P<sub>1</sub>-GFP.
2. Caracterizar la desensibilización del receptor inducida por PMA.
3. Conocer el efecto de inhibidores farmacológicos de las distintas isoformas de PKC sobre la inducción de la desensibilización del receptor por PMA con el fin de encontrar la o las isoformas responsables.
4. Estudiar la asociación receptor-proteína cinasa en presencia de PMA.
5. Analizar el efecto de la represión génica de las isoformas de PKC sobre la inducción de la desensibilización del receptor por PMA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### REACTIVOS

El medio de cultivo del Roswell Park Memorial Institute (RPMI), el antibiótico G-418 y otros reactivos para cultivo celular se obtuvieron de Gibco by Life Technologies. El suero fetal bovino (SFB) de Multicell. La esfingosina-1-fosfato (S1P) y el forbol 12-miristoil 13-acetato (PMA), la hispidina (Hispl), la puromicina, los kits de purificación de DNA e inhibidores de proteasas fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Chemical Co. Los inhibidores Gö 6976 y rottlerina (Rott) de Calbiochem y la bisindolmaleimida I (BIM I) de Cell Signaling. La proteína A acoplada a agarosa se obtuvo de Millipore. El [<sup>32</sup>P]Pi (8500-9120 Ci/mmol) se obtuvo de Perkin Elmer Life Sciences. El Fura-2/AM fue obtenido de Molecular Probes, Invitrogen. Los anticuerpos primarios anti-GFP (monoclonal) se compraron de Clontech, mientras que los anticuerpos contra las isoformas de PKC se compraron de Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo contra la β actina fue donado generosamente por la Dra. Marina Macías (Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, UNAM). Los anticuerpos secundarios fueron obtenidos de Zymed y Millipore (ver Tabla 4 en Anexo 2). Las membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) se obtuvieron de BioRad. Los reactivos de quimioluminiscencia se obtuvieron de Thermo Scientific, Pierce. El anticuerpo contra la GFP, utilizado para las inmunoprecipitaciones, fue obtenido en el laboratorio, generando una proteína de fusión GST-GFP. La proteína purificada se utilizó como antígeno para inmunizar conejos, posteriormente se recolectó el suero de los conejos inmunizados (Colín-Santana, Tesis de Licenciatura, 2005; Avendaño-Vázquez et al., 2005).

### CULTIVO CELULAR

Se utilizó la línea celular LNCaP, derivada de cáncer de próstata humano obtenida del American Type Culture Collection (Manassas, VA, EUA). Las células LNCaP que expresan establemente el receptor S1P<sub>1</sub> acoplado en el carboxilo terminal a la GFP

fueron generadas en el laboratorio por la Dra. María Teresa Romero Ávila. Las células transfectadas con los shRNA de la PKC  $\alpha$  y  $\beta$  II fueron generadas en el laboratorio como se indica más adelante.

Todas las células fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con 10% de SFB. Se adicionaron los siguientes antibióticos: estreptomycin 100  $\mu$ g/ml, penicilina 100 U/ml, anfotericina B 0.25  $\mu$ g/ml y G-418 300  $\mu$ g/ml como antibiótico de selección. El cultivo se mantuvo en incubación a 37 °C en 95% de aire y 5% CO<sub>2</sub>.

## EXPRESIÓN DE PLÁSMIDOS EN LÍNEAS CELULARES

Los plásmidos utilizados para silenciar las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  II de PKC fueron donados por el laboratorio de la Dra. Martha Robles Flores y las construcciones fueron realizadas por la Dra. María Cristina Castañeda Patlán (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM). El vector utilizado fue RNAi-Ready pSIREN-RetroQ (Clontech, #631526). Se hicieron dos construcciones, una dirigida al RNAm de PKC  $\alpha$  y la otra dirigida al RNAm de PKC  $\beta$  II (Tabla 2).

| Plásmido         | Secuencia  |
|------------------|--|
| shRNA $\alpha$   | 5'-gatcc <b>gtcacagtacgagatgcaattcaagagattgcatctcgactgtgactttttacgcgtg</b> -3' |
| shRNA $\beta$ II | 5'-gatccg <b>ccaggaagtcaggaatttcaagagaattcctgatgacttctgg</b> ttttttacgcgtg-3'  |

**Tabla 2. Secuencias clonadas en plásmidos shRNA  $\alpha$  y shRNA  $\beta$ II.** Las secuencias se insertaron entre los sitios de restricción BAMI y EcoRI del vector de expresión (ver Fig. A3 del Anexo 2). \* En negritas se señala la secuencia que reconoce el RNAm de cada PKC. La primera secuencia en negritas representa la secuencia de 5'-3' y la segunda representa la secuencia de 3'-5'.

El plásmido Vector consiste en el vector vacío, es decir no tiene ninguna secuencia insertada y se usó como control en los experimentos en los que se utilizaron los shRNA's.

Para la obtención del plásmido, se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$  competentes y se extrajo el DNA de acuerdo a las instrucciones del kit de extracción (Sigma). La concentración de las muestras se obtuvo utilizando un espectrofotómetro *Nanodrop* (Thermo Scientific).

Para la transfección, las células se sembraron un día antes en placas de 6 pozos (3.5 cm cada pozo) con medio RPMI suplementado y se dejaron incubando toda la noche. Posteriormente, la transfección fue realizada con 6  $\mu$ l de lipofectamina 2000 (Sigma) por pozo siguiendo las instrucciones del fabricante y con 150 ng de plásmido para las células transfectadas con el shRNA PKC $\alpha$ , 320 ng para las que fueron transfectadas con el shRNA PKC  $\beta$  II y 112 ng para las del vector vacío. Las células transfectadas se aislaron con medio RPMI suplementado como se menciona arriba y adicionado con puromicina 1  $\mu$ g/ml como antibiótico de selección. Los experimentos se realizaron alrededor de 2 semanas después de la transfección y de la selección.

## ENSAYOS DE FOSFORILACIÓN

**NOTA: TODOS LOS ENSAYOS DE FOSFORILACIÓN DE ESTE PROYECTO FUERON REALIZADOS POR MARCO ANTONIO MORQUECHO LEÓN, ESTUDIANTE DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS.**

Las células fueron cultivadas en placas de 6 pozos y crecidas a confluencia. Se dejaron en medio de ayuno sin fosfatos 24 horas antes del experimento. Al día siguiente, se incubaron 1 h a 37 °C con 2 ml de medio suplementado con [ $^{32}$ P]Pi 50  $\mu$ Ci/ml. Una vez marcadas, las células fueron estimuladas con S1P 1  $\mu$ M durante 10 min o con PMA 1  $\mu$ M por 15 min. Posteriormente se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos-salino (PBS) fría y se incubaron una hora en hielo con 500  $\mu$ l de solución de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, Tritón 1%, NaF 50 mM, Na $_3$ VO $_4$  100  $\mu$ M,  $\beta$ -glicerofosfato 10 mM, Na $_4$ P $_2$ O $_7$  10 mM, p-Serina 1 mM, p-Tirosina 1 mM, p-Treonina 1mM, EDTA 5 mM, leupeptina 20  $\mu$ g/ml, fluoruro de fenil-sulfonilo (PMSF) 100  $\mu$ g/ml, inhibidor de tripsina 50  $\mu$ g/ml, pH 7.5). Se recolectó lo que quedaba en los pozos, se guardó en un Eppendorf y se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos que contenían 5  $\mu$ l del anticuerpo generado en el laboratorio contra la GFP y 20  $\mu$ l de proteína A-agarosa y se incubó en

agitación toda la noche (6 h para las coimmunoprecipitaciones) a 4 °C. Después de la inmunoprecipitación, las esferas de agarosa se lavaron en tres ciclos de re suspensión-centrifugación (5,000 rpm durante 7 min) con una solución de lavado (Hepes 50 nM, NaCl 100 nM, NaHPO<sub>4</sub> 50 nM, NaF 10 nM, Tritón 1%, SDS 0.05%, pH 7.4). Una vez lavadas, las esferas fueron resuspendidas en SDS 10% y Buffer Laemli 2X (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% v/w SDS, 10% v/v glicerol, 0.1% azul de bromofenol, 2% v/v 2beta-mercaptoetanol). Las muestras se hirvieron durante 5 min, se centrifugaron y se corrieron en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. Los geles fueron secados y posteriormente expuestos sobre una placa del sistema PhosphorImager de Molecular Dynamics y analizados con el software Image J para la cuantificación de la fosforilación.

## LISIS DE CÉLULAS

Las células fueron cultivadas en placas de 6 pozos y crecidas a confluencia. Se dejaron en medio de ayuno (2 ml) con PMA 1 μM y sin PMA 24 horas antes del experimento. Al día siguiente, se retiró el medio de ayuno y se lavaron dos veces con solución amortiguadora de fosfatos-salina (PBS). Posteriormente, se dejaron reposar 5 min con 100 μl de Buffer Laemli 1X sobre hielo. Los lisados se homogenizaron repetidamente con una jeringa de insulina y se transfirieron a Eppendorfs. Las muestras se hirvieron durante 5 min, se centrifugaron y se separaron en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10 %. Los geles fueron transferidos a membranas de PVDF y sometidos a western blot como se explica a continuación.

Para los lisados totales se siguió el mismo protocolo excepto por el ayuno del día anterior y se cultivaron en cajas Petri de 6 cm de diámetro.

## COINMUNOPRECIPITACIONES

Las células fueron cultivadas en placas de 6 pozos y crecidas a confluencia. Se dejaron en medio de ayuno (2 ml cada pozo) 24 horas antes del experimento. Al día siguiente, se agregó PMA 1 μM en los siguientes tiempos: control (0 min), 1, 5, 10, 15 y 30 min. Se retiró el medio y se lavaron dos veces con una solución amortiguadora de fosfatos-

salino (PBS) fría y se incubaron con 500 µl de solución de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, Tritón 1%, NaF 50 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 100 µM, β-glicerofosfato 10 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10 mM, EDTA 5 mM, leupeptina 20 µg/ml, fluoruro de fenil-sulfonilo (PMSF) 100 µg/ml, inhibidor de tripsina 50 µg/ml, pH 7.5). Se repitieron los pasos realizados para los ensayos de fosforilación, incluyendo la solución de lavado. Posteriormente, las muestras se hirvieron durante 5 min, se centrifugaron y se corrieron en geles desnaturalizantes SDS-PAGE al 7.5 %. Los geles fueron transferidos a membranas de PVDF y fueron sometidos a western blot como se explica a continuación.

## WESTERN BLOT

Los geles se transfirieron a membranas de PVDF en una cámara semihúmeda a 240 A durante 1 h. Posteriormente las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente en una solución de leche al 5% en TBS-T (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.1% Tween, pH 7.5). Posteriormente, se puso el anticuerpo primario en una dilución 1:1000 para los anticuerpos para las PKC's, 1:5000 para el anticuerpo para GFP y se dejó incubando a 4 °C toda la noche (ver Tabla 3 en Anexo 2). Al día siguiente las membranas se lavaron tres veces en agitación durante 5 min y dos veces durante 10 min con TBS-T.

Después, las membranas se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario, ligado a la enzima peroxidasa, en una dilución 1:10,000 (anti ratón) y 1:15,000 (anti-conejo). Pasado el tiempo de incubación las membranas se lavaron como se describió arriba.

La señal fue detectada en placas de autoradiografía usando un sistema quimioluminiscencia (SuperSignal ® Thermo Scientific). Como control se detectó simultáneamente actina usando un anticuerpo monoclonal anti-actina humana en una dilución 1:1000 y el mismo anticuerpo anti-ratón previamente descrito. Los datos fueron cuantificados por densitometría (se cuantificó la densidad óptica y el área de las bandas) con el software Image J.

## CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO LIBRE INTRACELULAR [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>

Las células fueron cultivadas en cajas Petri de 10 cm de diámetro y crecidas a una confluencia del 80% y se ayunaron 24 h antes del experimento. Al día siguiente, las células se cargaron con el fluoróforo Fura 2AM 2.5 μM en una solución Krebs-Ringer-Hepes-Glucosa (NaCl 120 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, KCl 4.75 mM, glucosa 10 mM, Hepes 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.27 mM, albúmina sérica bovina 0.05%, pH 7.4) durante 1 h en la incubadora. Posteriormente, se lavaron superficialmente con solución salina para eliminar el exceso de albúmina y Fura 2AM externo, se adicionó 1 ml de verseno (0.2 g EDTA/l de PBS) durante 3 min a 37 °C cuando las células se encontraban bien adheridas a la caja, o bien se desprendieron rascando la caja cuando el verseno no fue necesario. Una vez despegadas de la caja, las células fueron resuspendidas en solución Krebs-Ringer-Hepes-Glucosa y trasladadas a un tubo Falcon de 15 ml para realizar dos ciclos de lavado: se centrifugó 5 min a 3 000 rpm, se resuspendió el botón de células suavemente en 8 ml de la solución Krebs-Ringer-Hepes-Glucosa. Finalmente se resuspendieron en el volumen deseado de acuerdo a la cantidad de trazos del experimento. Para evaluar el efecto del PMA, las células fueron pre incubadas 5 min a temperatura ambiente en presencia de PMA 1 μM en agitación suave. Para evaluar el efecto de los inhibidores farmacológicos de las isoformas de PKC se preincubaron 15 min en presencia de los inhibidores farmacológicos y posteriormente 5 min en presencia de PMA 1 μM. La movilización del calcio intracelular se midió mediante los cambios de fluorescencia generados por la estimulación del receptor con S1P 1 μM. Se utilizó un espectrofluorómetro AMINCO-Bowman serie 2, que registra la fluorescencia con excitación de 340 nm y a una emisión de 510 nm del fluoróforo. Las diferencias en la fluorescencia se cuantificaron utilizando un programa de cómputo que mide la relación entre la fluorescencia máxima y mínima de acuerdo a la ecuación (Grynkiewicz, Poenie, & Tsien, 1985):

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \left[ \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \right] \left[ \frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right]$$



Donde la  $K_d$  representa la constante de afinidad del fluoróforo por el  $\text{Ca}^{2+}$  (224 mM); R es la lectura de la fluorescencia en unidades arbitrarias, R max es la fluorescencia obtenida al lisar las células con Triton-X-100 al 10% y R min representa la fluorescencia mínima obtenida utilizando el quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  EGTA 50 mM; Sf2 y Sb2 son los coeficientes de proporcionalidad del fluoróforo libre (Sf2) y unido al calcio (Sb2) en la longitud de onda 2.

## PRESENTACIÓN DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se presentan como el promedio  $\pm$  el error estándar para un mínimo de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados con pruebas de ANOVA con corrección de Bonferroni, que compara las medias entre los diferentes pares de columnas pero utiliza la ANOVA para calcular el error estándar y recalculan el error  $\alpha$ . Para todas las pruebas estadísticas, un p valor  $< 0.05$  se consideró estadísticamente significativo. \*\*\*  $p < 0.001$  \*\*  $0.001 > p < 0.01$  \*  $0.01 > p < 0.05$ . Todas las estadísticas fueron calculadas con el software GraphPad Prism versión 5.0 para Mac OS X.

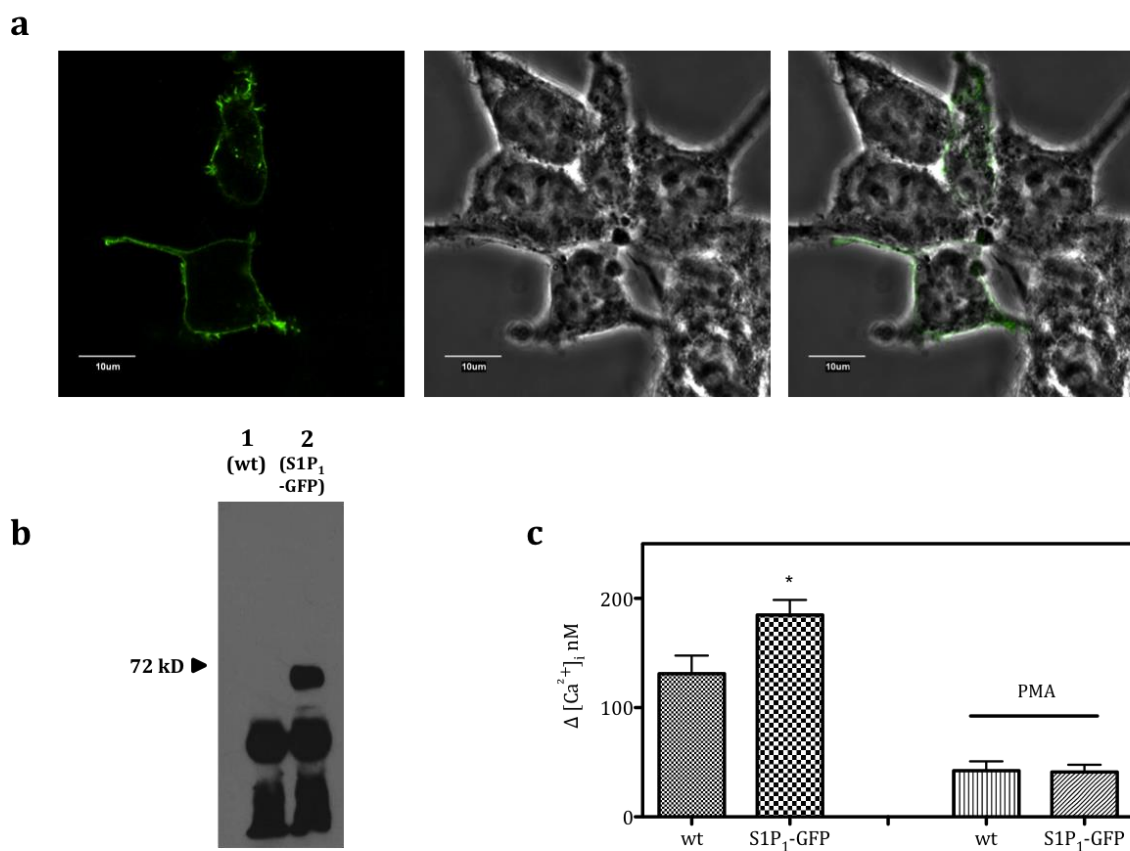
## RESULTADOS

### ANÁLISIS DE LA UNIÓN FUNCIONAL ENTRE EL RECEPTOR S1P<sub>1</sub> Y S1P

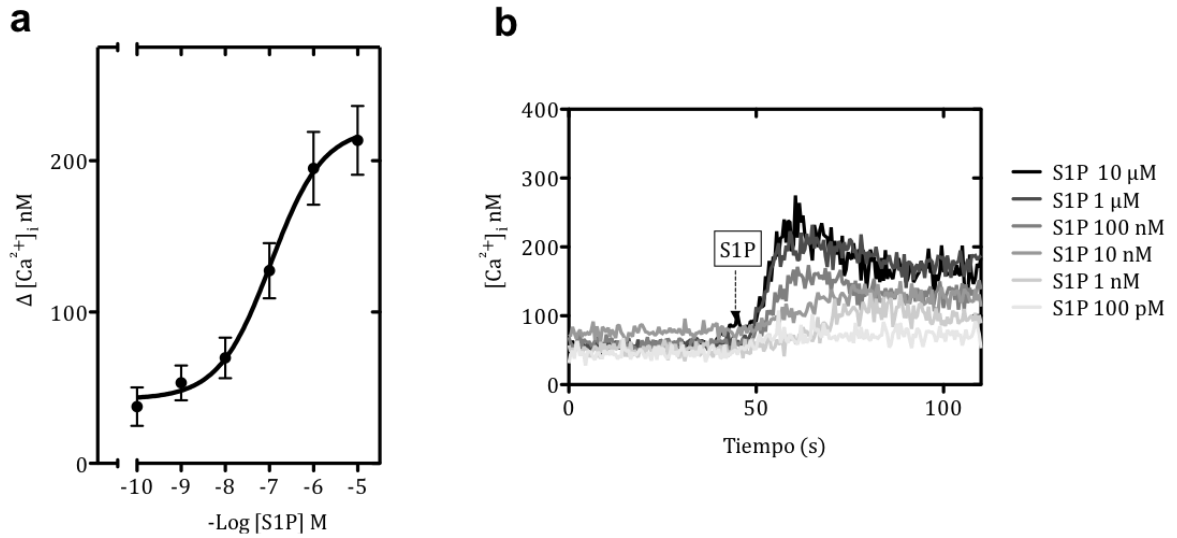
El modelo de estudio que se utilizó para realizar el proyecto fueron células humanas de cáncer de próstata que expresan establemente el receptor S1P<sub>1</sub> fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP). La construcción del receptor con la GFP nos permitió localizar la expresión del receptor en la membrana (Fig. R1 a) y facilitar su inmunoprecipitación mediante anticuerpos contra la GFP obtenidos en el laboratorio (ver materiales y métodos). La inmunoprecipitación de células sin transfectar (células wild-type (wt)) junto a la inmunoprecipitación de las células transfectadas con el receptor demostró la especificidad del anticuerpo por la GFP, así como la localización específica de la banda del receptor fusionado a la GFP en un peso aproximado de 70 kD (43 kD del receptor sólo y 27 kD de la GFP) (Fig. R1 b). El modelo de estudio se escogió por su sencillez experimental, y en las indagaciones bibliográficas posteriores se confirmó la relevancia clínica del receptor en la progresión tumoral del cáncer de próstata, entre otros (H. Lee et al., 2010).

Para conocer el efecto funcional de la unión de la S1P con el receptor S1P<sub>1</sub> sobre la vía de señalización se realizó un ensayo que mide la movilización de calcio intracelular *in vivo*. El ensayo mostró que las células wt generan un incremento de  $\approx 130$  nM de calcio intracelular. Mientras que las células transfectadas con el receptor generan un incremento  $\approx 200$  nM. Es decir que las células transfectadas incrementan su concentración de calcio 50-70 nM más que las células wt (Fig. R1 d). Esto último se puede atribuir a la aparición de un número discreto de receptores S1P<sub>1</sub>-GFP en la membrana. Ambas respuestas fueron bloqueadas al incubar las células con PMA 1  $\mu$ M (Fig. R1 d). Posteriormente se realizó una curva dosis-respuesta para evaluar la actividad intrínseca de la S1P en distintas concentraciones. Se encontró que la S1P produce una respuesta gradual dependiente de la concentración. El efecto mínimo de movilización de calcio intracelular se obtiene con concentraciones bajas entre 1 nM y 10 nM; conforme aumenta la concentración de S1P, la pendiente aumenta

positivamente hasta llegar al efecto máximo que se obtiene con una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y donde la curva empieza a formar una meseta que está alrededor de 200 nM por encima del basal (Fig. R2 a). De acuerdo a un ajuste no lineal de cuatro parámetros, se observa una  $\text{EC}_{50}$  alrededor de 100 nM con una  $\text{R}^2$  de 0.73. La diferencia en la magnitud de la respuesta según la concentración de S1P se puede ver con mayor claridad en los trazos representativos (Fig. R2 b). Dado que la S1P tiene una concentración plasmática de 0.5  $\mu\text{M}$  (M. Lee, 1998; Spiegel, 2000), se escogió la concentración de 1  $\mu\text{M}$  para el resto de los experimentos.



**Fig R1. Visualización y análisis funcional del receptor S1P<sub>1</sub>-GFP.** **a.** De izquierda a derecha: micrografías tomadas con microscopio confocal FV10i Olympus: GFP, luz visible, merge. La barra equivale a 10  $\mu\text{m}$ . **b.** Western blot de la inmunoprecipitación de GFP en células wt (carril 1) y en células transfectadas con el receptor S1P<sub>1</sub>-GFP (carril 2). **c.** Cuantificación de la movilización de calcio intracelular generada en respuesta a S1P 1  $\mu\text{M}$  en ausencia (izq) y presencia (der) de PMA 1  $\mu\text{M}$ , en células no transfectadas (wt) y células transfectadas con el receptor (S1P<sub>1</sub>-GFP). Las columnas representan el promedio de 7 a 12 determinaciones y las líneas el error estándar. \* 0.05 > p vs. wt

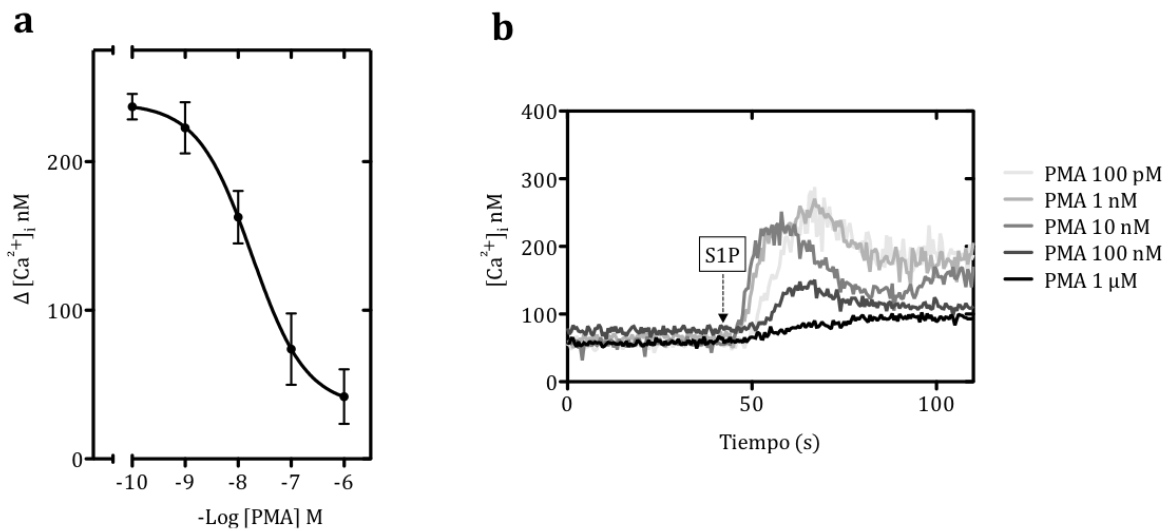


**Fig. R2. Efecto dosis-dependiente de la S1P sobre el receptor S1P<sub>1</sub>.** Las células se incubaron con Fura-2AM 5 μM durante 1 h a 37 °C, posteriormente se lavaron y se estimularon con concentraciones de S1P desde 100 pM hasta 10 μM (líneas claras a oscuras) para hacer las mediciones de los cambios en la concentración de calcio intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>). **a.** Curva dosis-respuesta a S1P. Los puntos representan el promedio de 5-8 determinaciones usando distintas preparaciones de células y las líneas el error estándar. **b.** Trazos representativos de la curva que se muestra en **a.** Las líneas claras a oscuras representan las concentraciones 100 pM hasta 10 μM respectivamente.

## EL PMA INDUCE LA FOSFORILACIÓN Y DESENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR S1P<sub>1</sub>

Watterson y sus colaboradores (2002) reportaron que en presencia de PMA el receptor es fosforilado. Por lo que quisimos analizar si la activación de la PKC y la consecuente fosforilación del receptor también tenía un efecto sobre la desensibilización del receptor en este modelo. Para esto, las células fueron preincubadas con distintas concentraciones de PMA durante 5 min para después medir la respuesta a S1P. Las concentraciones de PMA se utilizaron desde 100 pM, (concentración en la que no se observó ningún efecto de desensibilización sobre la respuesta endógena del receptor a la S1P), hasta 1 μM (concentración en la que desaparece casi totalmente la respuesta) (Fig. R3 a y b). De acuerdo a un ajuste no lineal de cuatro parámetros, la IC<sub>50</sub> de PMA, es decir la concentración a la cual se observa 50% de inhibición de la respuesta endógena, se encuentra alrededor de 10 nM con una R<sup>2</sup> de 0.86. Dado que a una concentración de 1 μM se observó una

desensibilización total por PMA, se utilizó esta concentración para los experimentos siguientes. Por otro lado, el análisis de la fosforilación del receptor inducida por PMA mostró que la fosforilación ocurre rápidamente, dos minutos después de añadir PMA y continuó aumentando hasta los 30 min. Se encontró que la fosforilación también es dosis-dependiente, observando un punto máximo a una concentración también de 1  $\mu\text{M}$  y con una  $\text{EC}_{50}$  también alrededor de 10 nM (Fig. A2 del Anexo 1).



**Fig. R3. Efecto de la activación de la PKC sobre la desensibilización del receptor S1P<sub>1</sub>.** Las células se incubaron con Fura-2AM 5  $\mu\text{M}$  durante 1 h a 37 °C, posteriormente se lavaron y se incubaron 5 min con las concentraciones indicadas de PMA. Se agregó S1P 1  $\mu\text{M}$  donde se indica (flecha) para hacer las mediciones de los cambios en la concentración de calcio intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). **a.** Curva dosis-respuesta a S1P en presencia de PMA. Los puntos representan el promedio de 5-8 determinaciones usando distintas preparaciones de células y las líneas el error estándar. **b.** Trazos representativos de la curva que se muestra en **a.** Las líneas claras a oscuras representan las concentraciones 100 pM hasta 1  $\mu\text{M}$  respectivamente.

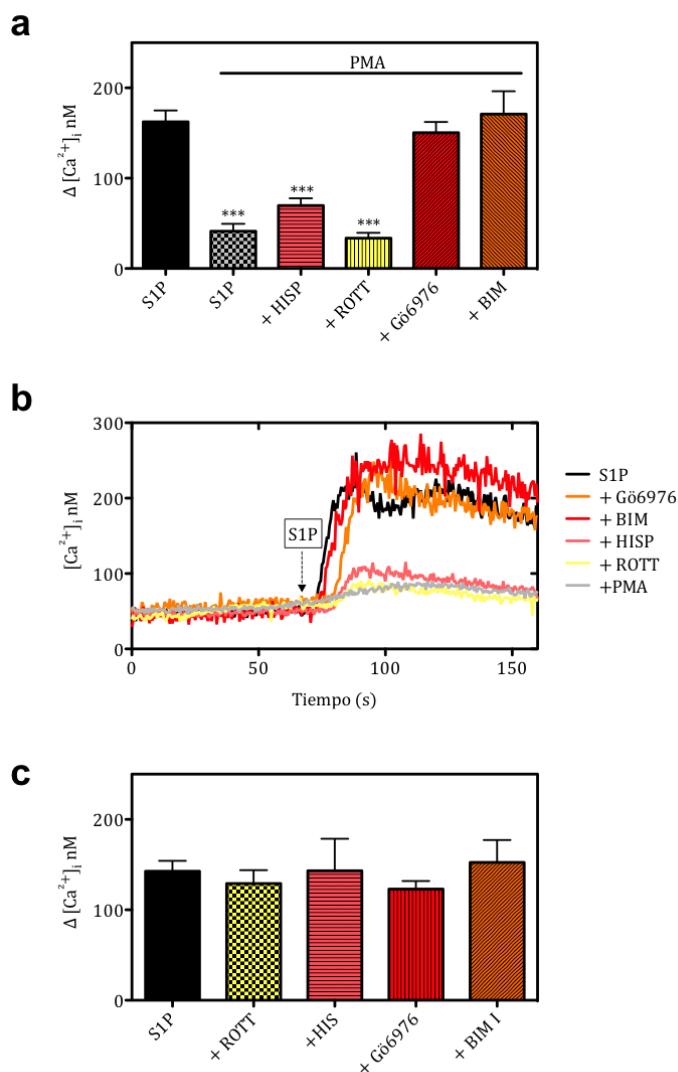
## EFFECTO DE LAS DISTINTAS ISOFORMAS DE PKC SOBRE LA DESENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR S1P<sub>1</sub>

Hasta ahora los resultados demuestran que la activación de la PKC induce la fosforilación y la desensibilización del receptor. Sin embargo, el PMA activa las isoformas clásicas y convencionales. Para buscar la, o las, principales isoformas involucradas en la regulación por fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub> se utilizaron inhibidores farmacológicos específicos para las distintas isoformas: bisindoilmaleimida I (BIM I) para PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  (Toullecs et al., 1991); Gö6976 para la isoforma  $\alpha$  fundamentalmente ( $\beta$ I a concentraciones altas) (Martiny-Baron et al., 1993); Hispidina para las isoformas  $\beta$ I y  $\beta$ II (Gonindard et al., n.d.); rottlerina para la isoforma  $\delta$  principalmente y con menor potencia  $\gamma$  y  $\epsilon$  (Corbit, Foster, & Rosner, 1999).

Las células fueron preincubadas durante 15 min en presencia de los inhibidores a una concentración de 1  $\mu$ M, después se preincubaron con PMA 1  $\mu$ M durante 5 min para posteriormente medir el efecto de la S1P sobre la movilización de calcio. Los resultados mostraron que únicamente BIM I y Gö6976 revierten la desensibilización del receptor inducida por PMA. Contrariamente, la Hispidina y la Rottlerina no tuvieron un efecto significativo, aunque la Hispidina revierte el efecto del PMA parcialmente (Fig. R4 a y b). Es decir, que incluso cuando estas isoformas se encuentran inactivas, el PMA sigue siendo capaz de inducir la fosforilación y la consecuente desensibilización del receptor S1P<sub>1</sub>. El hecho de que BIM I revierta el efecto no es sorprendente dado que es un inhibidor poco selectivo e inhibe varias isoformas, pero el hecho de que Gö6976 revierta el efecto de la misma manera que BIM I es un resultado importante ya que de él se puede concluir que al inhibir la isoforma  $\alpha$  principalmente y  $\beta$ I en menor grado, el PMA pierde la capacidad de desensibilizar al receptor.

Ninguno de los inhibidores alteró la respuesta normal del receptor a S1P (Fig. R4 c) por lo que los resultados anteriores se pueden atribuir únicamente a la inhibición de

las isoformas y no a un efecto adverso del inhibidor sobre la vía de señalización que libera el calcio intracelular.



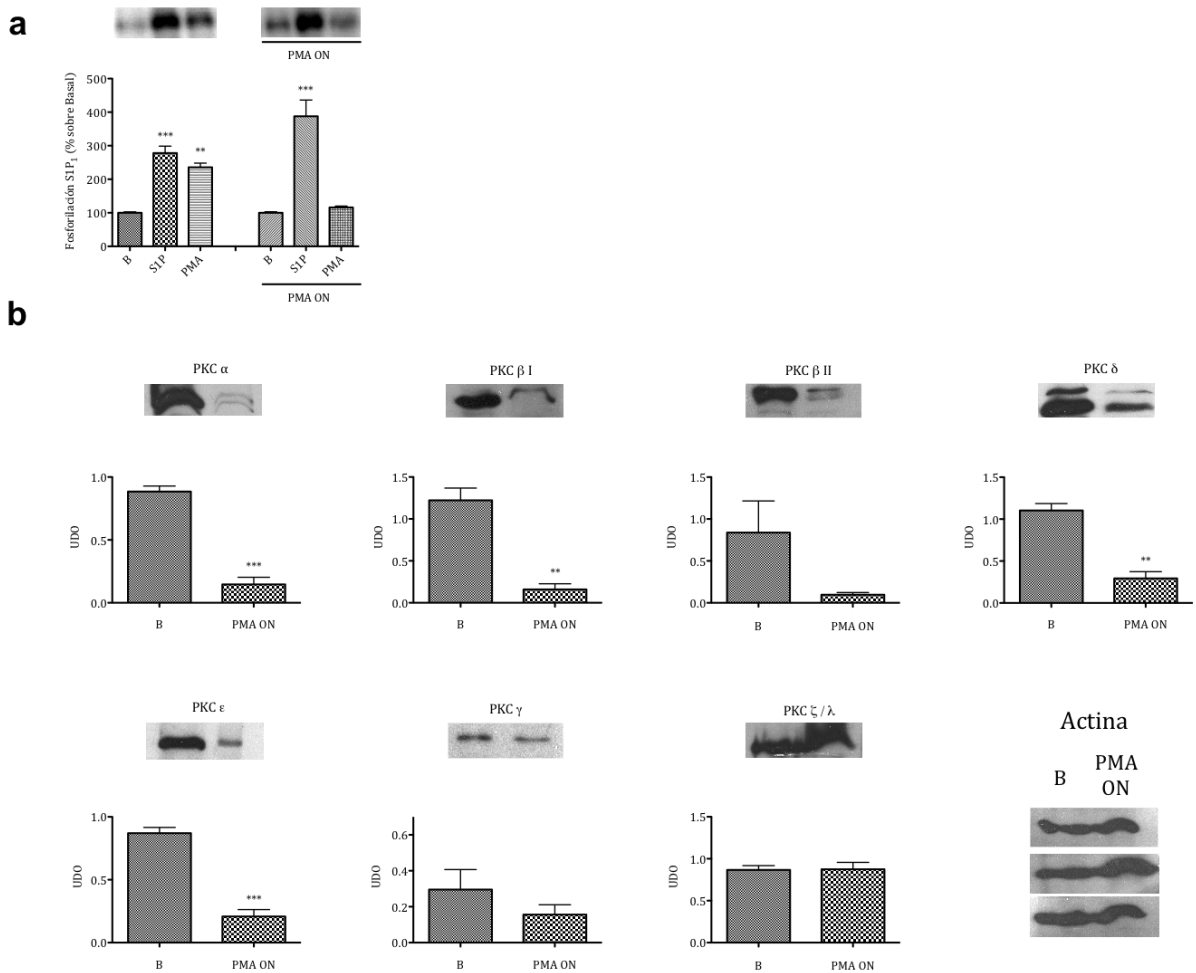
**Fig. R4. Efecto de inhibidores específicos para las distintas isoformas de PKC sobre la movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular y fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub>.** **a.** Las células se incubaron con Fura-2AM 5 μM durante 1 h a 37 °C, posteriormente se lavaron y se incubaron en ausencia (S1P) o en presencia de los siguientes inhibidores durante 15 min: hispidina 1 μM (+HISP), rottlerina 1 μM (+ROTT), Gö6976 1 μM (+Gö6976), bisindolmaleimida 1 μM (+BIM). Posteriormente las células fueron incubadas con PMA 1 μM durante 5 min para inducir la desensibilización y estimuladas con S1P 1 μM. **b.** Trazos representativos del aumento en la concentración de calcio intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) inducido por S1P 1 μM (flecha) con las condiciones descritas en **a.** **c.** Se muestra el control del efecto de los inhibidores solos sobre la respuesta a S1P. Las barras representan el promedio de 7-14 determinaciones de distintas preparaciones y las líneas el error estándar. \*\*\* p<0.001 vs. S1P

Sabíamos que el tratamiento durante toda la noche (overnight, ON),  $\approx$  14 horas, con PMA de la células provocaba la degradación de las PKC's (Vázquez-Prado & García-Sáinz, 1996), por lo que para evaluar más a fondo el papel de estas en la fosforilación y desensibilización del receptor inducida por PMA, se realizó el tratamiento ON con 1  $\mu$ M PMA, previo al análisis funcional del receptor. Desafortunadamente el tratamiento ON tuvo efectos negativos en la vía de señalización que lleva a la movilización de calcio, pues inhibió todas las respuestas a distintos ligandos que se utilizaban como control, por lo que tuvimos que analizar únicamente la fosforilación. Los experimentos mostraron que en las células tratadas ON con PMA la fosforilación inducida por PMA disminuye significativamente, mientras que la fosforilación por S1P fue incluso mayor que sin el tratamiento (Fig. R5 a).

Para tener un control de la cantidad relativa de las PKC's en nuestro modelo de estudio se hicieron western blots con anticuerpos selectivos para las distintas isoformas. Los resultados mostraron que las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  I,  $\beta$  II,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , se expresan en las células LNCaP S1P<sub>1</sub>-GFP y que se degradan o sufren una regulación hacia abajo por el tratamiento ON (Fig. R5 b) (el anticuerpo contra la isoforma  $\theta$  no mostró ninguna señal, por lo que se asumió que su expresión en esta línea celular es muy baja o inexistente; los datos no se muestran). El promedio de tres experimentos, por cada isoforma, demostró que la PKC  $\alpha$  reduce un 83.98% su expresión, la PKC  $\beta$  I un 87.47%, PKC  $\beta$  II un 90.92%, PKC  $\delta$  72.09%, PKC  $\epsilon$  77.09% y por último PKC  $\gamma$  que sólo se reduce un 46.67%. Aunque en porcentaje todas las isoformas excepto  $\gamma$  reducen su expresión más del 70% con el tratamiento ON, estadísticamente todas las isoformas excepto la PKC  $\beta$  II mostraron una diferencia relevante de acuerdo a la prueba de t de student. El hecho de que la PKC  $\beta$  II no mostrara una relevancia estadística se puede atribuir a la dispersión de los datos ya que la  $R^2$  es de 0.48. Para resolver esto se podría aumentar el número de eventos. No obstante, no se puede descartar el hecho de que la PKC  $\beta$  II se degrada igual que el resto de las isoformas. Como control del efecto del tratamiento se utilizó la isoforma  $\zeta$  porque su activación no depende de DAG, por lo que el PMA no tiene ningún efecto sobre su función. Esto último se ve



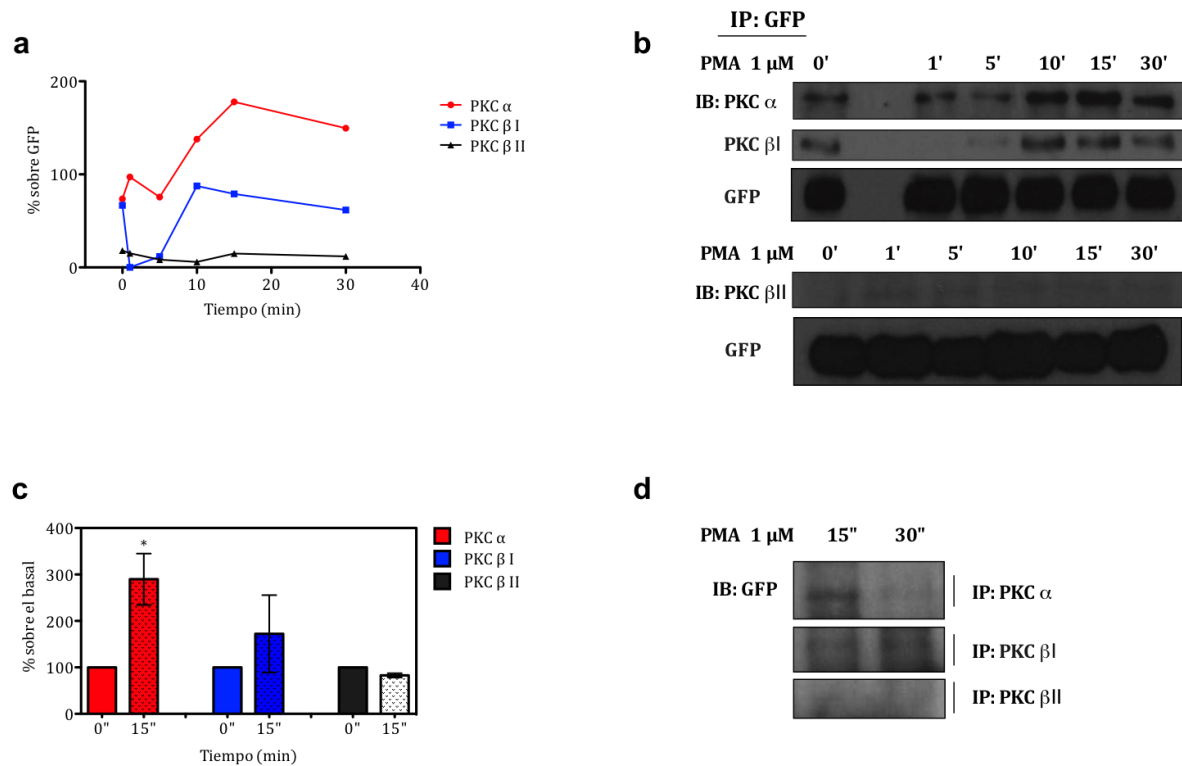
claramente ya que aún con el tratamiento ON, la PKC  $\zeta$  mantiene al 100% su expresión (Fig. R5 b). Como control de carga se utilizó un anticuerpo contra la proteína  $\beta$  actina.



**Fig R5. Efecto del tratamiento ON con PMA sobre fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub> por PKC.** a. Las células fueron preincubadas con PMA 1  $\mu$ M ON. Al día siguiente fueron sometidas al marcaje metabólico con 50  $\mu$ Ci/ml [<sup>32</sup>P]P<sub>i</sub> durante 3 h a 37°C. Posteriormente se incubaron 15 min con PMA 1  $\mu$ M y S1P 1  $\mu$ M. Las barras representan el promedio de 5-8 determinaciones y las líneas el error estándar. b. Western blots que muestran la degradación de las isoformas de PKC's después de el tratamiento con 1  $\mu$ M de PMA ON y sin tratamiento (basal **B**). Las barras representan el promedio de 2-3 determinaciones y las líneas el error estándar. Como control de carga se utilizó la expresión de la  $\beta$  actina. \*\*0.01>p \*\*\*0.001>p vs. basal

## ASOCIACIÓN RECEPTOR S1P<sub>1</sub>-PKC

El siguiente paso fue comprobar si existía una asociación entre las PKC's  $\alpha$ ,  $\beta$ I y  $\beta$ II y el receptor S1P<sub>1</sub>. Para esto, las células LNCaP S1P<sub>1</sub>-GFP se solubilizaron para inmunoprecipitar el receptor con anticuerpos que reconocen la GFP. Se corrieron los inmunoprecipitados en geles desnaturizantes SDS-PAGE para después someterlos a inmunoblots con anticuerpos específicos para estas isoformas. Para determinar la cinética de asociación, el experimento se realizó en distintos tiempos dentro de los 30 min que ya se habían establecido para el curso temporal de la fosforilación del receptor por PMA (Fig. A2 Anexo 1). La coimmunoprecipitación mostró que PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ I y, en menor medida,  $\beta$ II se asocian al receptor S1P<sub>1</sub>-GFP en el estado basal (0 min). Sin embargo, el curso temporal reveló que las isoformas tienen cinéticas de asociación muy diferentes (Fig. R6 a y b). La isoforma  $\alpha$  mostró un aumento gradual desde los 0 min hasta los 15 min que fue el punto de asociación máxima y, a partir de ahí, empieza a disociarse. La isoforma  $\beta$ I mostró un aumento gradual pero más lento que la PKC  $\alpha$ , los valores de asociación no aumentaron respecto al basal hasta los 10 min cuando empezó a aumentar y se sostuvo hasta los 30 min. La isoforma  $\beta$ II no mostró un aumento significativo respecto a su asociación basal. Las diferencias en la asociación de las isoformas de PKC con el receptor se analizaron más detenidamente al graficar el aumento a los 15 min respecto al basal, con una n de cuatro experimentos para la PKC  $\alpha$  y de tres experimentos para  $\beta$ I y  $\beta$ II. Los resultados muestran que la PKC  $\alpha$  aumenta significativamente  $\approx$ 200% sobre el basal, mientras que la PKC  $\beta$ I sólo  $\approx$ 100% arriba del basal. La PKC  $\beta$ II no mostró ningún cambio significativo a los 15 min (Fig. R6 c). Se confirmó la asociación del receptor con estas isoformas realizando la inmunoprecipitación al revés, es decir inmunoprecipitando las PKC's y detectando por western blot el receptor fusionado a la GFP.



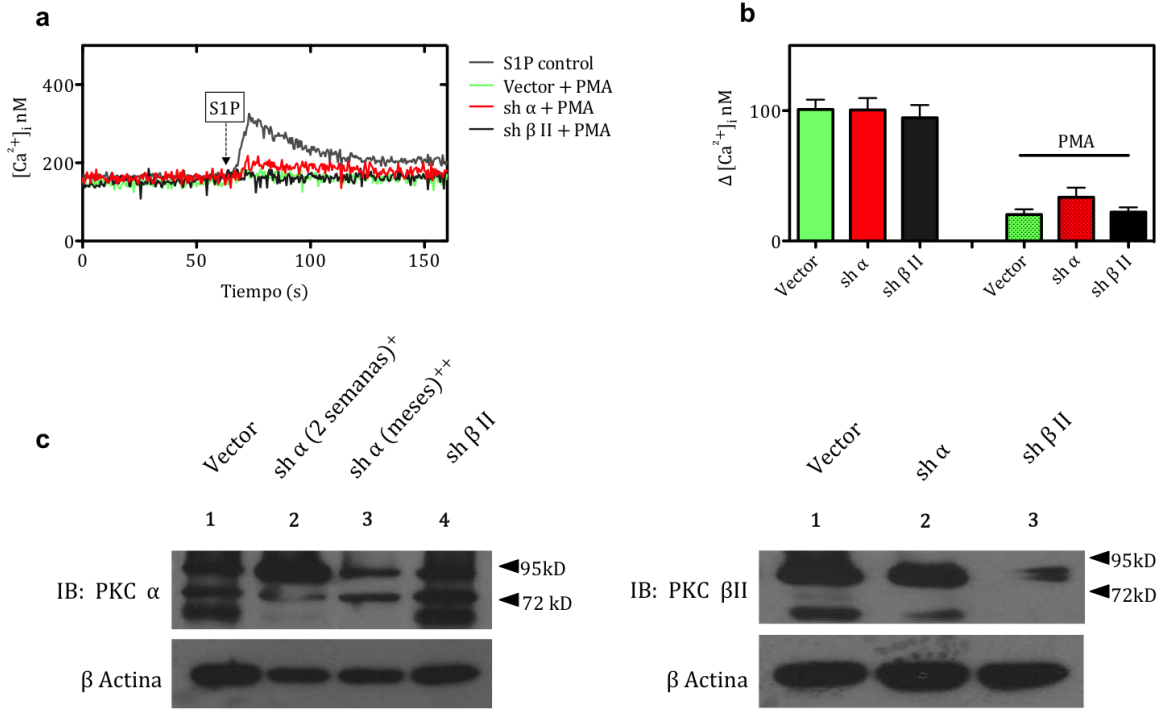
**Fig. R6. Efecto de PMA sobre la asociación del receptor S1P<sub>1</sub> y las isoformas de PKC.** **a.** Se realizó la inmunoprecipitación del receptor S1P<sub>1</sub>-GFP y se detectaron por western blot las tres isoformas de PKC en células que fueron tratadas con PMA 1  $\mu$ M durante los tiempos indicados. Los datos se normalizaron de acuerdo a la cantidad total de receptor inmunoprecipitado en cada tiempo (% sobre GFP). **b.** Imágenes representativas de los datos cuantificados en **a.** **c.** Datos normalizados de acuerdo a la coimmunoprecipitación al tiempo 0" (% sobre el basal). Las barras representan el promedio de 3-4 determinaciones y las líneas verticales el error estándar. **d.** Inmunoprecipitación de PKC's tratadas con PMA 1  $\mu$ M durante los tiempos indicados y detección por western blot GFP. \* 0.05 > p vs basal

Resulta interesante que las asociaciones concuerdan. Es decir, a los 15 min el receptor está más asociado a la PKC  $\alpha$  que a las demás isoformas. A los 30 min se ve que disminuye la asociación con PKC  $\alpha$  pero se sostiene con PKC  $\beta$ I. El receptor no se ve asociado a la PKC  $\beta$ II en ningún tiempo (Fig. R6 d). Es importante mencionar que se encontró variación en los resultados de las coimmunoprecipitaciones, lo cual dificultó por un lado la interpretación de los resultados y por el otro la acumulación de datos para reducir el error estándar del análisis. Esto último se puede atribuir a que el método experimental no conservaba en las mejores condiciones el complejo PKC-receptor, es decir, que dicho complejo es poco estable.

## EFFECTO DE LA REPRESIÓN GÉNICA DE LAS PKC'S ALPHA Y BETA II SOBRE LA DESENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR S1P<sub>1</sub>

Para investigar más a fondo y de manera más específica la relevancia fisiológica de las cPKC's  $\alpha$ ,  $\beta$ I y  $\beta$ II en la desensibilización del receptor mediada por PMA, se determinó la movilización de calcio intracelular en células en las que la expresión de PKC  $\alpha$  o PKC  $\beta$ II fue establemente reprimida con shRNA's. Como control se utilizaron células que expresan establemente el vector vacío. Desafortunadamente, la transfección de los shRNA's en las células LNCaP S1P<sub>1</sub>-GFP redujo la viabilidad celular por lo que nos vimos obligados a tomar un camino alternativo y evaluar el efecto de estos en las células LNCaP wt. Esto tiene una desventaja importante, las células LNCaP expresan principalmente S1P<sub>2</sub> y S1P<sub>3</sub> (Akao et al., 2006) que se acoplan a G<sub>q</sub>, G<sub>12/13</sub> y G<sub>i/o</sub> (Tabla 1) (Volker Brinkmann, 2007) dificultando la interpretación de los resultados ya que no se pueden atribuir directamente al receptor S1P<sub>1</sub>. No deja de ser interesante que incluso en las células wt, la represión de la expresión de PKC  $\alpha$  fue el único tratamiento que logró revertir parcialmente la desensibilización del receptor inducida por PMA, pero no mostró ser estadísticamente significativo (Fig. R7 a y b). Además, en los trazos representativos se alcanza a distinguir que el tratamiento con el shRNA de PKC  $\alpha$  es el único que regresa discretamente la forma de la respuesta a S1P aunque no la magnitud (Fig. R7 b). El análisis estadístico mostró que la diferencia entre los distintos tratamientos no alcanza a ser significativa. Paralelamente, la fosforilación del receptor inducida por PMA se redujo significativamente en células transfectadas con ambos shRNA's (tanto con el shRNA de PKC  $\alpha$ , como con el shRNA de  $\beta$ II) (Fig A3 del Anexo 1).

El efecto de la represión génica estable de las PKC's  $\alpha$  y  $\beta$ II mediante la transfección de shRNA's fue estudiada a partir de western blots de lisados celulares (Fig. R7 c).



**Fig. R7. Efecto de la represión génica de PKC  $\alpha$  y  $\beta$ II sobre la desensibilización del receptor S1P<sub>1</sub> mediada por PMA.** **a.** Trazos representativos del aumento en la concentración de calcio intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>). Las células transfectadas con los shRNA's se incubaron con Fura-2AM 5  $\mu$ M durante 1 h a 37 °C, posteriormente se lavaron y se incubaron en ausencia o en presencia de PMA 1  $\mu$ M durante 5 min. Fueron estimuladas con S1P 1  $\mu$ M en donde se indica (flecha). **b.** Cuantificación de los trazos mostrados en **a.** Las barras representan el promedio de 5-8 determinaciones de distintas preparaciones y las líneas el error estándar. **c.** Western blot de la lisis de células transfectadas con los shRNA's y con el vector. Los carriles 2 y 3 de la extrema izquierda muestran el cambio de expresión de la PKC  $\alpha$  en presencia del shRNA transfectado en células seleccionadas con puromicina 1 mg/ml durante un periodo de 2 semanas (+) y varios meses (++).

## DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Los mecanismos implicados en la vía de señalización del receptor S1P<sub>1</sub> son relevantes para un gran número de procesos fisiológicos importantes, entre los que se encuentran la angiogénesis y la regulación del sistema vascular; la migración de linfocitos y, descubierto más recientemente, en mecanismos que promueven la progresión tumoral (H. Lee et al., 2010). Un mal funcionamiento de los sistemas de regulación de estos procesos puede estar implicado en la causa de numerosas enfermedades. Por esta razón, conocer los mecanismos mediante los cuales se regula la función del receptor S1P<sub>1</sub> abre muchas puertas para crear estrategias farmacológicas que tengan aplicaciones clínicas.

Los primeros resultados de esta tesis caracterizan la señalización del receptor S1P<sub>1</sub>-GFP transfectado en células humanas de próstata. Como se esperaba, la respuesta a S1P generó una movilización de calcio intracelular consistente con la vía de señalización que generaría el receptor acoplado a G<sub>i/o</sub> (Fig. R1 y R2). Posteriormente se estableció una curva dosis-respuesta en la que se observó una EC<sub>50</sub> alrededor de 100 nM (que se encuentra cercana a la concentración de S1P en sangre) (Fig. R2). Por lo que podemos deducir que el modelo de estudio es consistente con lo que ocurre en cualquier sistema celular en el que coexisten el receptor S1P<sub>1</sub> y los efectores de la vía de señalización.

El trabajo experimental que se presentó en esta tesis confirma las observaciones publicadas anteriormente (Watterson et al., 2002) que establecen que la activación de la PKC por PMA induce la fosforilación y la desensibilización del receptor S1P<sub>1</sub>. El efecto de desensibilización se observó claramente cuando las células se preincubaron durante 5 min con PMA antes de ser estimuladas con S1P y se redujo significativamente la liberación de calcio intracelular respecto al control sin PMA, es decir respecto al efecto endógeno de la S1P (Fig. R1 c y Fig. R3). Más aun, en experimentos paralelos realizados en el laboratorio, se hicieron ensayos de marcaje metabólico con <sup>32</sup>P y se observó que el PMA induce la fosforilación del receptor de manera temprana y dosis-dependiente con una EC<sub>50</sub> alrededor de 10 nM (Fig. A2

Anexo 1). Mientras que la S1P lo hace con una  $EC_{50}$  alrededor de 450 nM, que también es congruente con los niveles de S1P en sangre (Fig. A1 Anexo 1). Es destacable que, los resultados de la curva dosis-respuesta de PMA en calcio coinciden con los datos de fosforilación. La  $IC_{50}$ , obtenida en la desensibilización medida por calcio, también se encuentra alrededor de 10 nM y el máximo efecto también fue de 1  $\mu$ M. Esto podría implicar que la fosforilación inducida por la PKC provoca un cambio en la capacidad funcional del receptor que le impide iniciar una cascada de señalización en respuesta a su ligando. Se ha demostrado que el PMA tiene un efecto menor en la inducción de la internalización que la S1P, y que incluso al inhibir la PKC, la S1P sigue provocando la internalización del receptor (Watterson et al., 2002). El mecanismo mediante el cual las PKC's inducen la desensibilización y la internalización del receptor S1P<sub>1</sub> no se ha estudiado aún, por lo que buscar estos mecanismos y establecer la internalización del receptor en nuestro modelo celular es una perspectiva interesante de este trabajo.

Mediante el uso de inhibidores farmacológicos de las diferentes isoformas de PKC comprobamos que únicamente Gö 6976 (que es un inhibidor de la isoforma  $\alpha$  principalmente y  $\beta$ I en menor grado) y BIM I (que es un inhibidor de varias isoformas, entre las que se encuentran  $\alpha$  y las  $\beta$ ) bloquean por completo la desensibilización del receptor S1P<sub>1</sub>-GFP inducida por PMA (Fig. R4). Aunque el objetivo principal del proyecto era caracterizar la isoforma PKC responsable del proceso de regulación, los inhibidores farmacológicos no son lo suficientemente selectivos como para señalar con certeza la isoforma responsable. Por ejemplo, la Rottlerina se utilizó en una concentración menor de la recomendada 1  $\mu$ M porque ha sido ampliamente criticada cuando se utiliza con el fin de inhibir a la isoforma  $\delta$ , ya que se ha demostrado que tiene muy poca selectividad por esta y que más bien puede inhibir otras cinasas. No obstante, los resultados nos permitieron, por un lado, orientar nuestra búsqueda hacia un grupo de isoformas convencionales (PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ I y, en menor grado  $\beta$ II) y, por otro, diseñar estrategias alternas más específicas para comprobar que estas isoformas son las responsables del proceso de regulación.

El receptor S1P<sub>1</sub> se acopla a  $G_{i/o}$  por lo que activa la PLC y promueve la formación de DAG, que es capaz de activar PKC's convencionales y nuevas. Esto último podría

sugerir la posibilidad de que las PKC's estén implicadas en la fosforilación inducida por el ligando junto con la GRK que se ha demostrado en linfocitos (Arnon et al., 2011) y en otras células (Alderton et al., 2001; Watterson et al., 2002). Sin embargo, los resultados exponen lo contrario. El tratamiento ON con PMA mostró que aun cuando las PKC's se encuentran degradadas, la S1P sigue induciendo la fosforilación del receptor (Fig. R5 a). En cambio, cuando hay una regulación hacia abajo de las cPKC's  $\alpha$ ,  $\beta$ I y  $\beta$ II principalmente (70 a 90%), y  $\delta$  y  $\epsilon$  en menor grado, la fosforilación por PMA desaparece por completo. Por otro lado, la cinética de fosforilación es distinta para cada elemento, la S1P llega a inducir la fosforilación máxima a los 10 min y a partir de ahí comienza a bajar gradualmente (Fig. A1 Anexo1), mientras que el PMA induce un incremento gradual que sostiene por más tiempo (Fig. A2 Anexo 1). Aunque estos resultados sugieren que la acción del PMA y de la PKC no tienen relevancia fisiológica en la desensibilización homóloga del receptor, se deben realizar experimentos que descarten con mayor certeza este argumento, ya que debemos tomar en cuenta que el tratamiento ON con PMA podría inducir un estado de estrés que active otras cinasas capaces de fosforilar el receptor en estas condiciones. Esto último podría explicar el aumento significativo en la fosforilación (alrededor de 100%) del receptor por S1P en las células tratadas con PMA ON respecto a las células sin el tratamiento (Fig. 5 a). Una aproximación experimental que podría caracterizar con mayor exactitud el papel de la PKC en la desensibilización del receptor es el análisis por espectrometría de masas de los sitios de fosforilación. Hasta donde sabemos, los sitios de fosforilación del receptor se han definido solamente para el agonista sintético FTY720-P (Oo et al., 2011). No existe evidencia de los sitios de fosforilación inducidos por S1P y por PMA, por lo que sería un enfoque valioso de este trabajo.

Los resultados mostrados en esta tesis coinciden con evidencias publicadas anteriormente en que los mecanismos mediante los cuales las PKC's desensibilizan al receptor son diferentes a los que lo desensibilizan de manera homóloga. Sin embargo, la posibilidad de que estén implicadas en la desensibilización heteróloga no se pueden descartar y esto aún no se ha dilucidado. En el laboratorio del Dr. García Sáinz se han estudiado casos en los que los GPCR's, por ejemplo el receptor  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico, es



desensibilizado al activar receptores para endotelina, ácido lisofosfatídico o EGF, y que en este proceso la PKC juega un papel clave (Alcántara-Hernández, Leyva-Illades, & García-Sáinz, 2001). Más aún, se han descrito modelos de comunicación cruzada entre el receptor S1P<sub>1</sub> y receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK's) como el PDGFR (Alderton et al., 2001; Conway, Rakhit, Pyne, & Pyne, 1999; Hobson et al., 2001), IGF-1, EGF y el  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico (Castillo-Badillo et al., 2012). El efecto de la activación de otros receptores en la desensibilización heteróloga del receptor S1P<sub>1</sub> se estudió al inicio de este trabajo pero no se obtuvieron datos alentadores por lo que no se profundizó en ellos y no se incluyeron en el proyecto. No obstante, repetir los experimentos o buscar estrategias experimentales alternativas a la medición del sistema de recambio fosfoinosítidos-calcio, sería otra perspectiva importante.

Una alternativa interesante al modelo de desensibilización heteróloga propuesto arriba es que la PKC esté involucrada en la desensibilización homóloga del receptor en presencia de bajas concentraciones de S1P, por ejemplo en el espacio intersticial de algunos órganos (concentraciones micromolares en sangre contra nanomolares en el espacio intersticial) (Rosen & Goetzl, 2005; Young & Van Brocklyn, 2006). La presencia de diferentes cinasas reguladoras según la concentración del ligando se ha encontrado para otros GPCRs como el  $\beta_2$  adrenérgico, en donde cantidades nanomolares del ligando son suficientes para amplificar la señal y activar cinasas dependientes de segundos mensajeros. Por otro lado, para la activación de la GRK se necesitan concentraciones más grandes (Kelly et al., 2008; Tran et al., 2004). El modelo de regulación del receptor S1P<sub>1</sub> inducido por GRK2 se demostró en linfocitos expuestos a una concentración alta de S1P, como la que se encuentra en la sangre (Arnon et al., 2011). La posibilidad de que otras cinasas como la PKC estén implicadas en la regulación inducida por el ligando (desensibilización homóloga) en concentraciones más bajas no se ha estudiado aún.

Los estudios de coinmunoprecipitación revelaron que el receptor S1P<sub>1</sub> se asocia principalmente a las isoformas PKC  $\alpha$  y  $\beta$ I y que esta asociación aumenta conforme las células se estimulan con PMA hasta por 30 min. Sin embargo, de estas dos cinasas, la PKC  $\alpha$  se asocia en mayor grado y el curso temporal es más reproducible. La PKC  $\beta$ II se

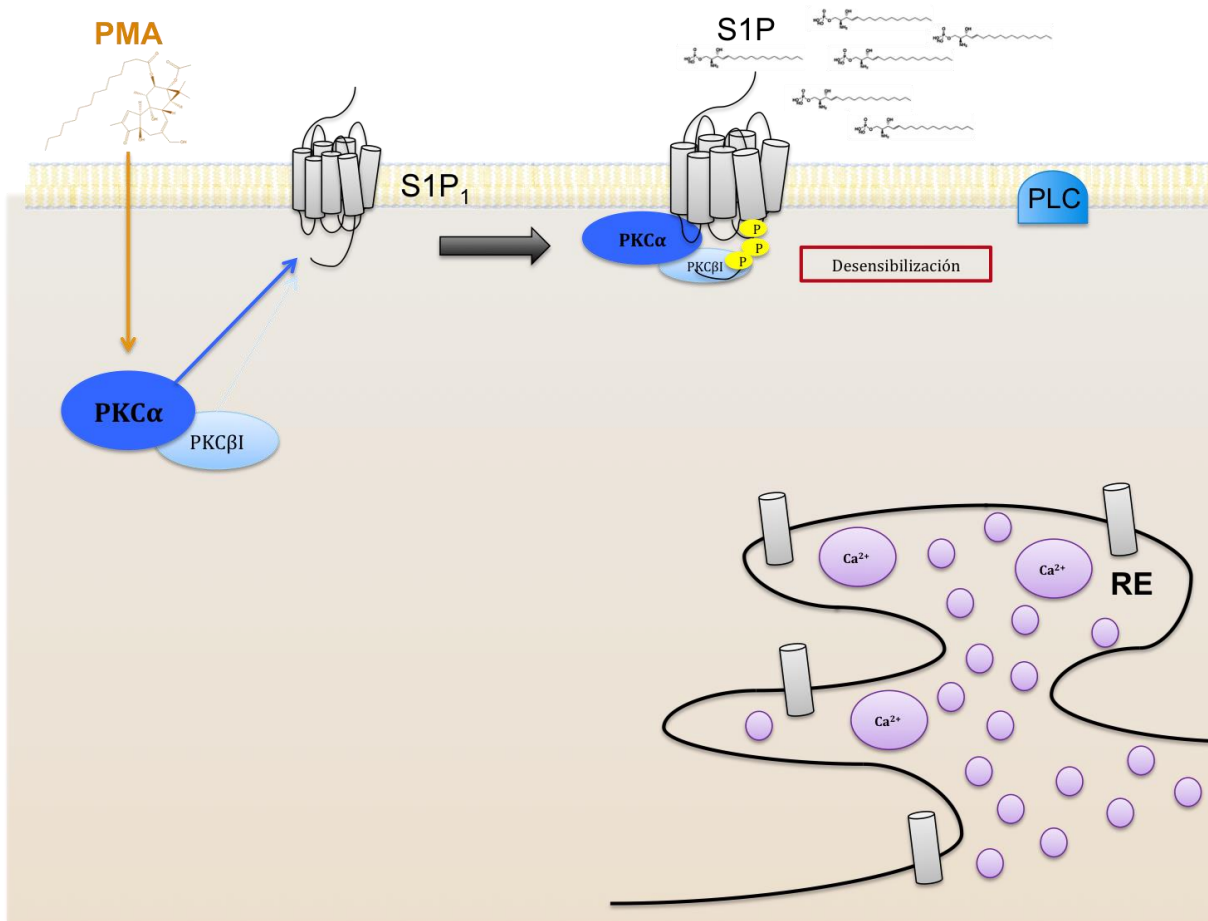
asocia muy discretamente pero no aumentó con la estimulación de PMA. En las indagaciones posteriores a la realización del experimento, se encontró evidencia de que la asociación del receptor a la PKC  $\alpha$  y la PKC  $\beta$ I ya se había reportado en un contexto de transactivación entre el VEGFR-2 y S1P<sub>1</sub> en células de un carcinoma tiroideo (Bergelin et al., 2010). Con estas observaciones podemos sugerir que únicamente las isoformas cPKC's  $\alpha$  principalmente y  $\beta$ I en menor grado, se asocian al receptor y, por ende, pueden ser las responsables de la inducción de la fosforilación del receptor por PMA.

Las células LNCaP expresan preferentemente los receptores S1P<sub>2</sub> y S1P<sub>3</sub> (Akao et al., 2006) que se asocian a G<sub>i/o</sub>, G<sub>q</sub> y G<sub>12/13</sub> (Volker Brinkmann, 2007) por lo que el incremento discreto en la movilización de calcio se puede atribuir a la expresión de S1P<sub>1</sub>. Aunque este incremento es moderado y no alcanza a ser significativo, el hecho de que la capacidad de movilización de calcio aumente una pequeña cantidad llama la atención. Se necesitarían otras técnicas para comprobar que, al menos en el ensayo funcional de movilización de calcio, el receptor S1P<sub>1</sub> es el principal actor. Algo que se podría hacer para fortalecer el diseño experimental es analizar la expresión del receptor en nuestro cultivo celular por RT-PCR, tanto de las células transfectadas como en las wt. Ahora bien, sin la prueba de RT-PCR de las células wt no podemos asegurar que la respuesta a S1P que enciende el sistema de recambio fosfoinosítidos calcio sea producto del receptor S1P<sub>1</sub>. Sin embargo, en los resultados observamos que aún en las células wt, la presencia de PMA desensibiliza la respuesta a S1P (Fig. R1c y 7a). Más aún, en las células transfectadas con los shRNA contra las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ II, el shRNA de PKC  $\alpha$  es la única condición que alcanza a revertir, aunque sólo parcialmente, el efecto del PMA (Fig. R7a y b), lo que podría implicar que esta isoforma regula a otros miembros de la familia de receptores de S1P además de al receptor S1P<sub>1</sub>. Estudiar el papel de la PKC  $\alpha$  en la regulación de los receptores de S1P<sub>2</sub> y S1P<sub>3</sub> podría ser de gran utilidad ya que estos receptores se han involucrado en procesos de señalización en el sistema cardiovascular (Means & Brown, 2009).

## CONCLUSIÓN

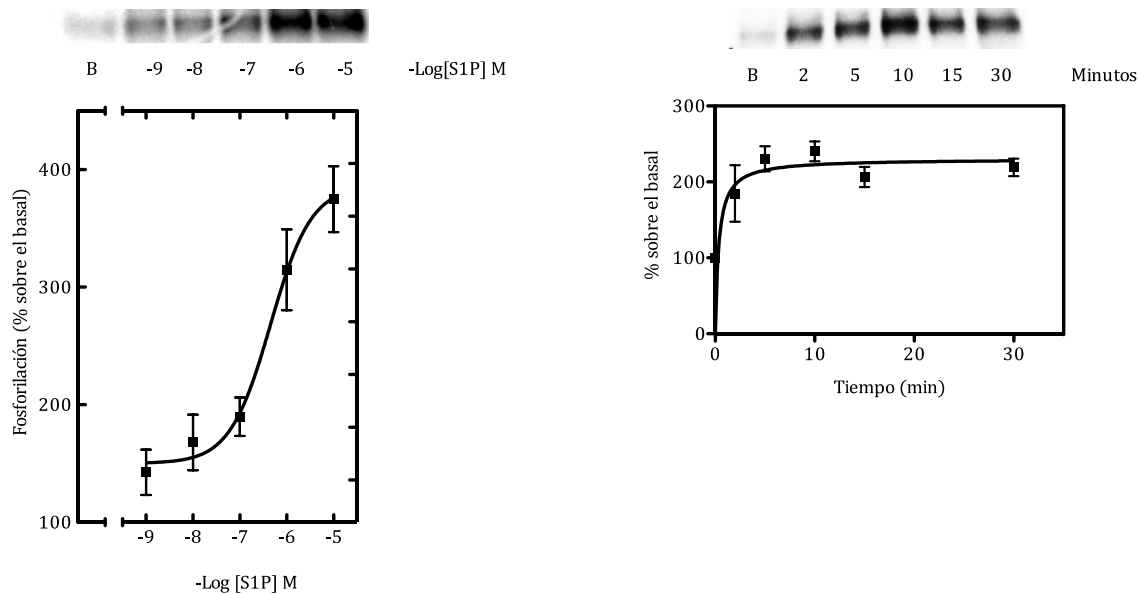
Tomados en conjunto, los datos presentados en esta tesis demuestran que el PMA induce la fosforilación y la desensibilización del receptor  $S1P_1$  en células humanas de cáncer de próstata y que este efecto está mediado por las isoformas convencionales  $PKC\ \alpha$ , principalmente, y en menor grado  $PKC\ \beta$ .

Proponemos el siguiente modelo:

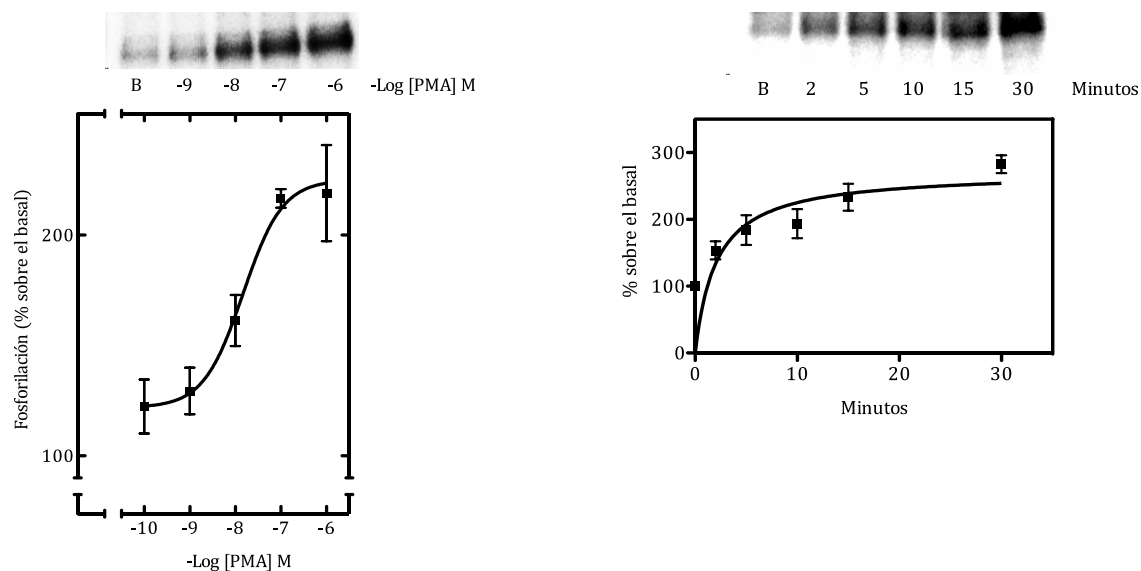


**Fig. R8. Modelo representativo de la regulación por fosforilación del receptor  $S1P_1$  inducida por PMA.** La activación por PMA de la  $PKC\ \alpha$  principalmente, y en menor grado  $PKC\ \beta$ , induce la fosforilación del receptor impidiendo la activación por  $S1P$  de la vía de señalización.

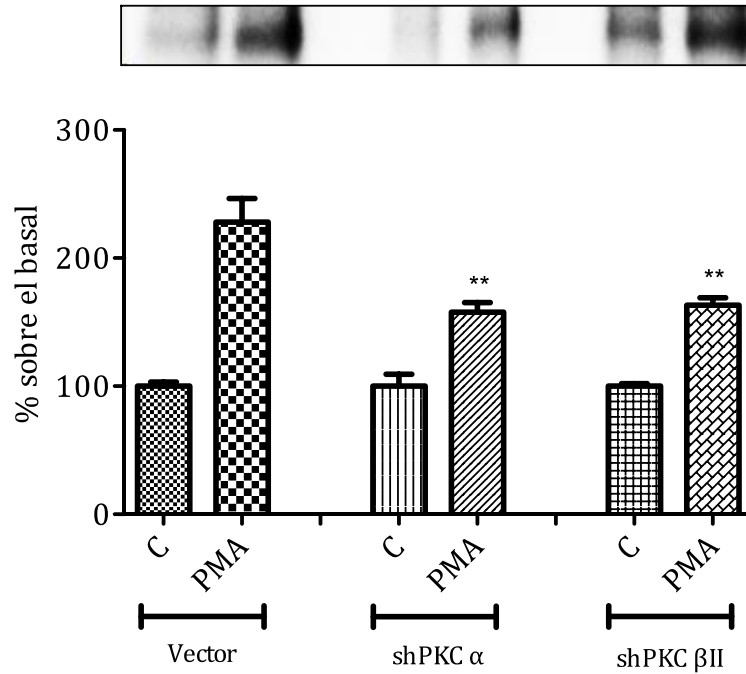
## ANEXO 1: RESULTADOS



**Fig. A1. Fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub> inducida por S1P.** **a.** Las células se marcaron metabólicamente con 50  $\mu\text{Ci/ml}$  [ $^{32}\text{P}$ ]P<sub>i</sub> durante 3 h a 37 °C y posteriormente se incubaron con PMA durante 15 min en las concentraciones indicadas. Los puntos representan el promedio y las líneas el error estándar de 3-6 determinaciones usando distintas preparaciones de células y las líneas, el error estándar. **b.** Las células se incubaron con PMA 1  $\mu\text{M}$  durante los tiempos indicados. Los puntos representan el promedio de 5-8 determinaciones y las líneas, el error estándar.



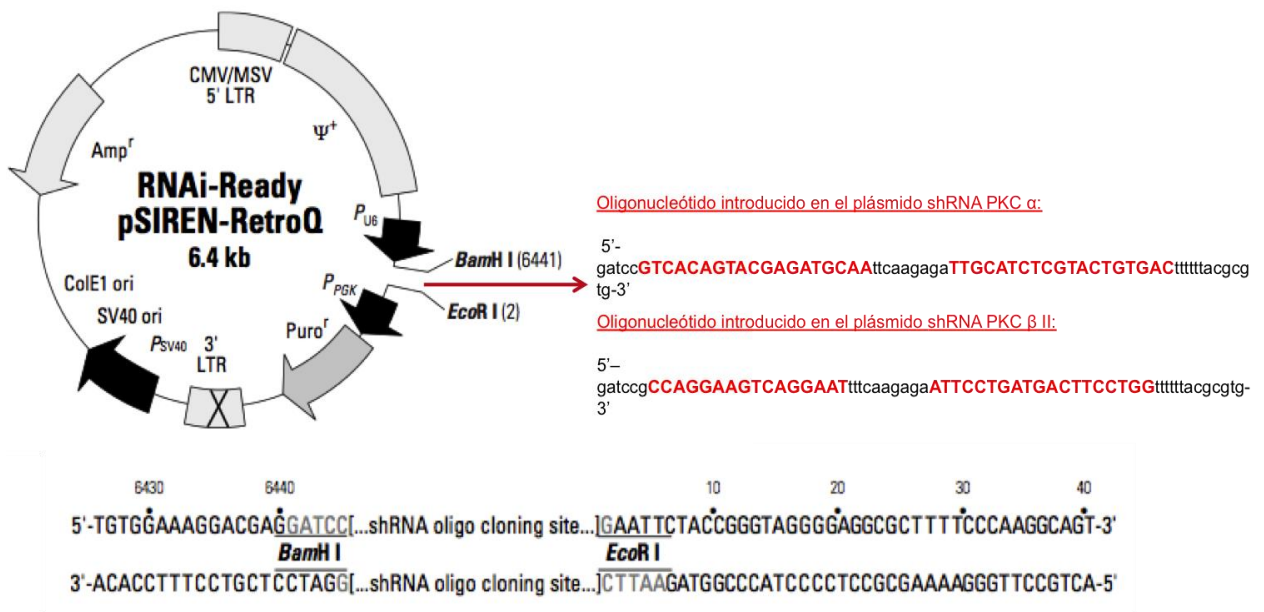
**Fig. A2. Fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub> en presencia de PMA.** **a.** Las células se marcaron metabólicamente con 50  $\mu$ Ci/ml [<sup>32</sup>P]P<sub>i</sub> durante 3 h a 37 °C y posteriormente se incubaron con PMA durante 15 min en las concentraciones indicadas. Los puntos representan el promedio y las líneas el error estándar de 3-6 determinaciones usando distintas preparaciones de células y las líneas, el error estándar. **b.** Las células se incubaron con PMA 1  $\mu$ M durante los tiempos indicados. Los puntos representan el promedio de 3 determinaciones y las líneas el error estándar.



**Fig. A3. Efecto de la represión génica de PKC  $\alpha$  y  $\beta$ II en la fosforilación del receptor S1P<sub>1</sub> inducida por PMA.** Las células se transfectaron con el receptor S1P<sub>1</sub>-GFP y las construcciones de shRNA's para PKC  $\alpha$  y PKC  $\beta$ II para posteriormente ser sometidas al protocolo de fosforilación en ausencia (C) o en presencia de PMA 1  $\mu$ M (PMA). Las barras representan el promedio y las líneas el error estándar de 4 a 5 determinaciones de distintas preparaciones. Arriba: Se muestra una autoradiografía representativa de la fosforilación. \*\*0.05 > p vs. PMA Vector.

## ANEXO 2: MATERIALES Y MÉTODOS





**Fig. A4. Mapa de restricción y sitios de clonación del vector de expresión pSIREN-RetroQ.** En negro se muestran los sitios únicos de restricción. En letras rojas se resalta la secuencia dirigida al RNAm de cada PKC en dirección 5'->3' primero y 3'->5 segundo.

\* Figura adquirida de [www.clontech.com](http://www.clontech.com) RNAi-Ready pSIREN-RetroQ Vector Information Protocol No. PT3737-5.

| Anticuerpo     |    |            |   | Dilución | Tratamiento                    | Anticuerpo 2º   |
|----------------|----|------------|---|----------|--------------------------------|---|
| GFP            | 1º | Monoclonal | Zymed   | 1:5000   | Solución de bloqueo T.L.N 4 °C | HRP Rabbit anti-mouse Zymed<br>1:10,000 en solución de bloqueo.<br>1 h a temperatura ambiente.  |
| GFP            | 1º | Policlonal | Obtenido en el laboratorio (Colín-Santana, Tesis de Licenciatura, 2005) | 1:5000   | Solución de bloqueo TLN 4 °C   | Ms x Rb light Chain Specific HRP conjugated Millipore<br>1:10,000 en solución de bloqueo.<br>1 h a temperatura ambiente   |
| PKC $\alpha$   | 1º | Policlonal | Santa Cruz Biotechnology  | 1:1000   | Solución de bloqueo T.L.N 4 °C | <p><b>Para Inmunoprecipitaciones:</b><br/>Ms x Rb light Chain Specific HRP conjugated Millipore<br/>1:10,000 en solución de bloqueo.<br/>1 h a temperatura ambiente</p> <p><b>Para lisados totales:</b><br/>HRP Goat anti-rabbit DS Grade Zymed<br/>1:10,000 en solución de bloqueo.<br/>1 h a temperatura ambiente</p> |
| PKC $\beta$ I  | 1º | Policlonal | Santa Cruz Biotechnology  | 1:1000   | Solución de bloqueo T.L.N 4 °C |   |
| PKC $\beta$ II | 1º | Policlonal | Santa Cruz Biotechnology  | 1:1000   | Solución de bloqueo T.L.N 4 °C |   |
| PKC $\delta$   | 1º | Policlonal | Santa Cruz Biotechnology  | 1:1000   | Solución de bloqueo T.L.N 4 °C |   |
| PKC $\epsilon$ | 1º | Policlonal | Santa Cruz Biotechnology  | 1:1000   | Solución de bloqueo T.L.N 4 °C |   |
| PKC $\gamma$   | 1º | Policlonal | Santa Cruz Biotechnology  | 1:1000   | Solución de bloqueo T.L.N 4 °C |   |
| PKC $\zeta$    | 1º | Policlonal | Santa Cruz Biotechnology  | 1:1000   | Solución de bloqueo T.L.N 4 °C |   |
| $\beta$ Actina | 1º | Monoclonal | Santa Cruz Biotechnology  | 1:1000   | BSA 1% en TBS-Tween (0.1%)     |   |

**Tabla 3. Anticuerpos utilizados en el trabajo experimental.**

## REFERENCIAS

- Aarhi, J. J., Darendeliler, M. a, & Pushparaj, P. N. (2011). Dissecting the role of the S1P/S1PR axis in health and disease. *Journal of dental research*, 90(7), 841–54.
- Akao, Y., Banno, Y., Nakagawa, Y., Hasegawa, N., Kim, T.-J., Murate, T., Igarashi, Y., et al. (2006). High expression of sphingosine kinase 1 and S1P receptors in chemotherapy-resistant prostate cancer PC3 cells and their camptothecin-induced up-regulation. *Biochemical and biophysical research communications*, 342(4), 1284–90.
- Alcántara-Hernández, R., Leyva-Illades, D., & García-Sáinz, J. a. (2001). Protein kinase C-alpha(1b)-adrenoceptor coimmunoprecipitation: effect of hormones and phorbol myristate acetate. *European journal of pharmacology*, 419(1), 9–13.
- Alderton, F., Rakhit, S., Kong, K. C., Palmer, T., Sambhi, B., Pyne, S., & Pyne, N. J. (2001). Tethering of the platelet-derived growth factor beta receptor to G-protein-coupled receptors. A novel platform for integrative signaling by these receptor classes in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, 276(30), 28578–85.
- Alvarez, S. E., Milstien, S., & Spiegel, S. (2007). Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 18(8), 300–7.
- Ancellin, N., & Hla, T. (1999). Differential pharmacological properties and signal transduction of the sphingosine 1-phosphate receptors EDG-1, EDG-3, and EDG-5. *The Journal of biological chemistry*, 274(27), 18997–9002.
- Arnon, T. I., Xu, Y., Lo, C., Pham, T., An, J., Coughlin, S., Dorn, G. W., et al. (2011). GRK2-dependent S1PR1 desensitization is required for lymphocytes to overcome their attraction to blood. *Science*, 333(6051), 1898–903.
- Avenidaño-Vázquez, S. E., García-Caballero, A., & García-Sáinz, J. A. (2005). Phosphorylation and desensitization of the lysophosphatidic acid receptor LPA1. *The Biochemical journal*, 385(Pt 3), 677–84.
- Benovic, J L, Strasser, R. H., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1986). Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(9), 2797–801.
- Benovic, Jeffrey L, Pike, L. J., Cerione, R. A., Staniszewskis, C., Yoshimasa, T., Codina, J., Caron, M. G., et al. (1985). Phosphorylation of the Mammalian beta-Adrenergic Receptor by Cyclic AMP-dependent Protein Kinase. *The Journal of biological chemistry*, 260, No. 1, 7094–7101.
- Bergelin, N., Blom, T., Heikkilä, J., Löf, C., Alam, C., Balthasar, S., Slotte, J. P., et al. (2010). Sphingosine kinase as an oncogene: autocrine sphingosine 1-phosphate modulates ML-1 thyroid carcinoma cell migration by a mechanism dependent on protein kinase C-alpha and ERK1/2. *Endocrinology*, 151(7), 2994–3005.
- Bjarnadóttir, T. K., Gloriam, D. E., Hellstrand, S. H., Kristiansson, H., Fredriksson, R., & Schiöth, H. B. (2006). Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics*, 88(3), 263–73.

- Blaho, V. a, & Hla, T. (2011). Regulation of mammalian physiology, development, and disease by the sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid receptors. *Chemical reviews*, 111(10), 6299–320.
- Brinkmann, V, Chen, S., Feng, L., Pinschewer, D., Nikolova, Z., & Hof, R. (2001). FTY720 alters lymphocyte homing and protects allografts without inducing general immunosuppression. *Transplantation proceedings*, 33(1-2), 530–1.
- Brinkmann, Volker. (2007). Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacology & therapeutics*, 115(1), 84–105.
- Brinkmann, Volker, Billich, A., Baumruker, T., Heining, P., Schmouder, R., Francis, G., Aradhye, S., et al. (2010). Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(11), 883–97.
- Castillo-Badillo, J. a, Molina-Muñoz, T., Romero-Ávila, M. T., Vázquez-Macías, A., Rivera, R., Chun, J., & García-Sáinz, J. A. (2012). Sphingosine 1-phosphate-mediated  $\alpha$ 1B-adrenoceptor desensitization and phosphorylation. Direct and paracrine/autocrine actions. *Biochimica et biophysica acta*, 1823(2), 245–54.
- Conway, a M., Rakhit, S., Pyne, S., & Pyne, N. J. (1999). Platelet-derived-growth-factor stimulation of the p42/p44 mitogen-activated protein kinase pathway in airway smooth muscle: role of pertussis-toxin-sensitive G-proteins, c-Src tyrosine kinases and phosphoinositide 3-kinase. *The Biochemical journal*, 337 (2), 171–7.
- Corbit, K. C., Foster, D. a, & Rosner, M. R. (1999). Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Molecular and cellular biology*, 19(6), 4209–18.
- Devi, L. (1991). Consensus sequence for processing of peptide precursors at monobasic sites. *FEBS letters*, 280(2), 189–94.
- Ferguson, S. S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological reviews*, 53(1), 1–24.
- Fieger, C. B., Huang, M.-C., Van Brocklyn, J. R., & Goetzl, E. J. (2005). Type 1 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor signaling of lymphocyte functions requires sulfation of its extracellular amino-terminal tyrosines. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(13), 1926–8.
- García-Sáinz, J. a, Gottfried-Blackmore, a, Vázquez-Prado, J., & Romero-Avila, M. T. (1999). Protein kinase C-mediated phosphorylation and desensitization of human  $\alpha$ 1b-adrenoceptors. *European journal of pharmacology*, 385(2-3), 263–71.
- García-Sáinz, J. A. (1981). Decreased Sensitivity to  $\alpha$ 2 Adrenergic Amines, Adenosine and Prostaglandins in White Fat Cells from Hamsters Treated with Pertussis Vaccine. *FEBS letters*, 126(2), 306–308.
- Gilman, A. G. (1984). G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell*, 36(3), 577–9.
- Gilman, A. G. (1995). G Proteins and Regulation of Adenylyl Cyclase I. *Bioscience Reports*, 15(2).

- Goninard, C., Bergonzi, C., Denier, C., Sergheraert, C., Klabe, A., Chavant, L., & Hollande, E. (1997). Synthetic hispidin, a PKC inhibitor, is more cytotoxic toward cancer cells than normal cells in vitro. *Cell biology and toxicology*, 13(3), 141–153.
- Gryniewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry*, 260(6), 3440–50.
- Gutiérrez-Venegas, G., & García-Sáinz, J. a. (1991). Activation of protein kinase C inhibits hormonal stimulation of the GTPase activity of Gi in human platelets. *FEBS letters*, 279(2), 316–8.
- Hernandez-Sotomayor, S. M., Macías-Silva, M., Malbon, C. ., & García-Sáinz, J. A. (1991). Modulation of Gs activity by phorbol myristate acetate in rat hepatocytes. *American journal of physiology. Cell physiology*, 260, C259–C265.
- Hla, T, & Maciag, T. (1990). An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *The Journal of biological chemistry*, 265(16), 9308–13.
- Hla, Timothy, Venkataraman, K., & Michaud, J. (2008). The vascular S1P gradient-cellular sources and biological significance. *Biochimica et biophysica acta*, 1781(9), 477–82.
- Hobson, J. P., Rosenfeldt, H. M., Barak, L. S., Olivera, a, Poulton, S., Caron, M. G., Milstien, S., et al. (2001). Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science*, 291(5509), 1800–3.
- Igarashi, J., & Michel, T. (2008). The enigma of sphingosine 1-phosphate synthesis: a novel role for endothelial sphingosine kinases. *Circulation research*, 102(6), 630–2.
- Johnson, K. R., Becker, K. P., Facchinetti, M. M., Hannun, Y. a, & Obeid, L. M. (2002). PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. Extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). *The Journal of biological chemistry*, 277(38), 35257–62.
- Kelly, E., Bailey, C. P., & Henderson, G. (2008). Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *British journal of pharmacology*, 153, S379–S388.
- Kenakin, T. P. (2009). *A Pharmacology Primer: Theory, Applications and Methods* (3rd ed., p. 389). Oxford, UK: Elsevier Academic Press.
- Kleuss, C., Raw, a S., Lee, E., Sprang, S. R., & Gilman, a G. (1994). Mechanism of GTP hydrolysis by G-protein alpha subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(21), 9828–31.
- Lagerström, M. C., & Schiöth, H. B. (2008). Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, 7(4), 339–57.
- Lee, H., Deng, J., Kujawski, M., Yang, C., Liu, Y., Herrmann, A., Kortylewski, M., et al. (2010). STAT3-induced S1PR1 expression is crucial for persistent STAT3 activation in tumors. *Nature medicine*, 16(12), 1421–8.
- Lee, M. (1998). Sphingosine-1-Phosphate as a Ligand for the G Protein-Coupled Receptor EDG-1. *Science*, 279(5356), 1552–1555.

- Lee, M. J., Evans, M., & Hla, T. (1996). The inducible G protein-coupled receptor edg-1 signals via the G(i)/mitogen-activated protein kinase pathway. *The Journal of biological chemistry*, 271(19), 11272–9.
- Lee, M. J., Thangada, S., Liu, C. H., Thompson, B. D., & Hla, T. (1998). Lysophosphatidic acid stimulates the G-protein-coupled receptor EDG-1 as a low affinity agonist. *The Journal of biological chemistry*, 273(34), 22105–12.
- Liu, C. H., Thangada, S., Lee, M. J., Van Brocklyn, J. R., Spiegel, S., & Hla, T. (1999). Ligand-induced trafficking of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1. *Molecular biology of the cell*, 10(4), 1179–90.
- Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of cell science*, 115(Pt 3), 455–65.
- Lynch, K. R., & Macdonald, T. L. (2008). Sphingosine 1-phosphate chemical biology. *Biochimica et biophysica acta*, 1781(9), 508–12.
- Malbon, C. C., Rapiejko, P. J., & Garcíá-Sáinz, J. a. (1984). Pertussis toxin catalyzes the ADP-ribosylation of two distinct peptides, 40 and 41 kDa, in rat fat cell membranes. *FEBS letters*, 176(2), 301–6.
- Mangmool, S., & Kurose, H. (2011). G(i/o) Protein-Dependent and -Independent Actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins*, 3(7), 884–99.
- Marchese, A., George, S. R., Kolakowski, L. F., Lynch, K. R., & O’Dowd, B. F. (1999). Novel GPCRs and their endogenous ligands: expanding the boundaries of physiology and pharmacology. *Trends in pharmacological sciences*, 20(9), 370–5.
- Martiny-Baron, G., Kazanietz, M. G., Mischak, H., Blumberg, P. M., Kochs, G., Hug, H., Marmé, D., et al. (1993). Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976. *The Journal of biological chemistry*, 268(13), 9194–7.
- Mathiesen, J. M., & Ramirez, M. T. (2006). The metabotropic glutamate receptor 4 is internalized and desensitized upon protein kinase C activation. *British journal of pharmacology*, 148(3), 279–90.
- Means, C. K., & Brown, J. H. (2009). Sphingosine-1-phosphate receptor signalling in the heart. *Cardiovascular research*, 82(2), 193–200.
- Melendez, A. J. (2008). Sphingosine kinase signalling in immune cells: potential as novel therapeutic targets. *Biochimica et biophysica acta*, 1784(1), 66–75.
- Moore, K. L. (2003). The biology and enzymology of protein tyrosine O-sulfation. *The Journal of biological chemistry*, 278(27), 24243–6.
- Morris, a J., & Malbon, C. C. (1999). Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiological reviews*, 79(4), 1373–430.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2008). Biosignaling. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. New York, NY: W.H. Freeman and Company.
- Neve, K. A. (2006). Novel Features of G Protein-Coupled Receptor Kinase 4. *Molecular pharmacology*, 69(3), 673–676.

- Newton, A. C. (2010a). Protein kinase C : poised to signal. *American journal of physiology Endocrinology and Metabolism*, 298, E395–E402.
- Newton, A. C. (2010b). Regulation of Conventional and Novel Protein Kinase C Isozymes by Phosphorylation and Lipids. In M. G. Kazanietz (Ed.), *Protein Kinase C in Cancer Signaling and Therapy* (pp. 9–24). Totowa, NJ: Humana Press.
- Noda, Y., Kohjima, M., Izaki, T., Ota, K., Yoshinaga, S., Inagaki, F., Ito, T., et al. (2003). Molecular recognition in dimerization between PB1 domains. *The Journal of biological chemistry*, 278(44), 43516–24.
- Ogretmen, B., & Hannun, Y. a. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nature reviews. Cancer*, 4(8), 604–16.
- Ohno, Y., Ito, A., Ogata, R., Hiraga, Y., Igarashi, Y., & Kihara, A. (2009). Palmitoylation of the sphingosine 1-phosphate receptor S1P is involved in its signaling functions and internalization. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 14(8), 911–23.
- Oo, M. L., Chang, S., Thangada, S., Wu, M., Rezaul, K., Blaho, V., Hwang, S., et al. (2011). Engagement of S1P 1 -degradative mechanisms leads to vascular leak in mice. *The Journal of clinical investigation*, 121(6), 2290–2300.
- Oo, M. L., Thangada, S., Wu, M.-T., Liu, C. H., Macdonald, T. L., Lynch, K. R., Lin, C.-Y., et al. (2007). Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. *The Journal of biological chemistry*, 282(12), 9082–9.
- Parrill, a L., Wang, D., Bautista, D. L., Van Brocklyn, J. R., Lorincz, Z., Fischer, D. J., Baker, D. L., et al. (2000). Identification of Edg1 receptor residues that recognize sphingosine 1-phosphate. *The Journal of biological chemistry*, 275(50), 39379–84.
- Pitcher, J., Lohse, M. J., Codina, J., Caron, I. M. G., & Lefkowitz, R. J. (1992). Desensitization of the Isolated beta2-adrenergic Receptor by beta-Adrenergic Receptor Kinase, cAMP-Dependent Protein Kinase, and Protein Kinase C Occurs via Distinct Molecular Mechanisms. *Biochemistry*, 31, 3193–3197.
- Pyne, S, & Pyne, N. J. (2000). Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *The Biochemical journal*, 349(Pt 2), 385–402.
- Pyne, Susan, Lee, S. C., Long, J., & Pyne, N. J. (2009). Role of sphingosine kinases and lipid phosphate phosphatases in regulating spatial sphingosine 1-phosphate signalling in health and disease. *Cellular signalling*, 21(1), 14–21.
- Reiter, E., & Lefkowitz, R. J. (2006). GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 17(4), 159–65.
- Rivera, J., Proia, R. L., & Olivera, A. (2008). The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nature reviews. Immunology*, 8(10), 753–63.
- Rosen, H., & Goetzl, E. J. (2005). Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nature reviews. Immunology*, 5(7), 560–70.

- Rosen, H., Gonzalez-Cabrera, P. J., Sanna, M. G., & Brown, S. (2009). Sphingosine 1-phosphate receptor signaling. *Annual review of biochemistry*, 78, 743–68.
- Salaun, C., Greaves, J., & Chamberlain, L. H. (2010). The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *The Journal of cell biology*, 191(7), 1229–38.
- Schleicher, S., Boekhoff, I., Arriza, J., Lefkowitz, R. J., & Breer, H. (1993). A beta-adrenergic receptor kinase-like enzyme is involved in olfactory signal termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(4), 1420–4.
- Shenoy, S. K., & Lefkowitz, R. J. (2005a). Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2005(308), cm10. doi:10.1126/stke.2005/308/cm10
- Shenoy, S. K., & Lefkowitz, R. J. (2005b). Receptor-Specific Ubiquitination of beta-arrestin Directs Assembly and Targeting of 7TM Receptor-Signalosomes. *Journal of biological chemistry*, (14), 1–21.
- Spiegel, S. (2000). Sphingosine 1-phosphate: a ligand for the EDG-1 family of G-protein-coupled receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 905, 54–60.
- Steinberg, S. F. (2008). Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function. *Physiological reviews*, 88, 1341–1378.
- Strasser, R. H., Sibley, D. R., & Lefkowitz, R. J. (1986). A novel catecholamine-activated adenosine cyclic 3',5'-phosphate independent pathway for beta-adrenergic receptor phosphorylation in wild-type and mutant S49 lymphoma cells: mechanism of homologous desensitization of adenylate cyclase. *Biochemistry*, 25(6), 1371–7.
- Strathmann, M. P. (1991). G 12 and G 13 Subunits Define a Fourth Class of G Protein Subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(13), 5582–5586.
- Tao, Y.-X. (2006). Inactivating mutations of G protein-coupled receptors and diseases: structure-function insights and therapeutic implications. *Pharmacology & therapeutics*, 111(3), 949–73.
- Tobin, a B. (2008). G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom. *British journal of pharmacology*, 153 Suppl (December 2007), S167–76.
- Toullec, D., Pianetti, P., Bellevergue, P., Grand-perret, T., Ajakane, M., Baudets, V., Boissinb, P., et al. (1991). The Bisindolylmaleimide GF 109203X Is a Potent and Selective Inhibitor of Protein Kinase C. *The Journal of biological chemistry*, 266(24), 15771–15781.
- Tran, T. M., Friedman, J., Qunaibi, E., Baameur, F., Moore, R. H., & Clark, R. B. (2004). 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. *Molecular pharmacology*, 65(1), 196–206.
- Ueda, N., Iñiguez-Lluhi, J. A., Lee, E., Smrcka, A. V., Robishaw, J. D., & Gilman, A. G. (1994). G Protein beta gamma Subunits. *The Journal of biological chemistry*, 269(6), 4388–4395.
- Vázquez-Prado, J., & García-sáinz, J. A. (1996). Effect of Phorbol Cells Expressing Myristate Acetate on a1-Adrenergic Action Recombinant. *Molecular pharmacology*, 50, 17–22.



- Venkataraman, K., Lee, Y.-M., Michaud, J., Thangada, S., Ai, Y., Bonkovsky, H. L., Parikh, N. S., et al. (2008). Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circulation research*, 102(6), 669–76.
- Watterson, K. R., Johnston, E., Chalmers, C., Pronin, A., Cook, S. J., Benovic, J. L., & Palmer, T. M. (2002). Dual regulation of EDG1/S1P(1) receptor phosphorylation and internalization by protein kinase C and G-protein-coupled receptor kinase 2. *The Journal of biological chemistry*, 277(8), 5767–77.
- Wennerberg, K., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science*, 118(Pt 5), 843–6.
- Wettschureck, N., & Offermanns, S. (2005). Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiological reviews*, 85, 1159–1204.
- Yatomi, Y., Ozaki, Y., Ohmori, T., & Igarashi, Y. (2001). Sphingosine 1-phosphate: synthesis and release. *Prostaglandins*, 64(1-4), 107–122.
- Yatomi, Yutaka. (2008). Plasma sphingosine 1-phosphate metabolism and analysis. *Biochimica et biophysica acta*, 1780(3), 606–11.
- Yau, K. (1994). Cyclic nucleotide-gated channels : An expanding ion channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(April), 3481–3483.
- Young, N., & Van Brocklyn, J. R. (2006). Signal transduction of sphingosine-1-phosphate G protein-coupled receptors. *TheScientificWorldJournal*, 6, 946–66.
- Zhang, H., Desai, N. N., Olivera, a, Seki, T., Brooker, G., & Spiegel, S. (1991). Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *The Journal of cell biology*, 114(1), 155–67.