



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**P-REX1 como integrador de las cascadas de
fosforilación de las cinasas mTORC2 y PKA**

TESIS QUE PRESENTA

Q.F.B. Sendi Rafael Adame García

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE
FARMACOLOGÍA**

**Director de la Tesis:
Dr. José Vázquez Prado**

México, D.F.

Diciembre 2013

Este trabajo fue apoyado por la beca 333603 otorgada por CONACyT y fue realizado en el Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Doctor José Vázquez Prado.

Este trabajo fue apoyado por el donativo “Mecanismos moleculares de migración endotelial y angiogénesis” otorgado por CONACyT

Clave: 152434 / Vigencia: Enero 27, 2012 a Febrero 26, 2016 / Responsable: Dr. José Vázquez Prado.

Quiero dedicar este esfuerzo a:

A mi mamá y a mi hermano, Felipa García Almeraya y Gerardo Sánchez García, porque todo lo bueno en mí proviene de ustedes, quiero que sepan que este y todos mis logros son también suyos.

A mi papá y mi abuelita, Noé Rafael Adame Gil y Rita Gil Rodríguez, por su amor y apoyo incondicional todo el tiempo.

A toda mi familia, en especial a mi tío, Gonzalo García Almeraya, a quien admiro mucho, y a Tamara García, porque es una gran alegría para todos.

A mi tutor, Dr. José Vázquez Prado, por permitirme formar parte de su laboratorio y grupo de trabajo, lo considero mi primer mentor académico, y aunque él no lo sepa, también me enseñó que el ejercicio científico es una manera de alcanzar plenitud en muchos aspectos de la vida.

A mis sinodales, Dra. Guadalupe Reyes Cruz y Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza, por aceptar formar parte de mi comité de evaluación y por sus valiosos comentarios.

A mi novia, Lennis Orduña Castillo, porque me das ánimos cuando más lo necesito, solo contigo me siento verdaderamente libre, te amo.

A mis amigos, Edgar Arregui, Raúl Alfaro, Francisco Aguilar, Miguel García, Iván Jhesu, George Juárez y Víctor Ayala, porque son buenos amigos en verdad.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Lydia, Daniel, Ricardo, Ismael, Magda, Estanislao, David y Paola, por su increíble apoyo y buenos momentos, dentro y fuera del laboratorio.

A Lydia, mi amiga y sensei, porque juntos aprendimos que “hasta al desorden podemos sacarle provecho”.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. José Vázquez Prado por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio y grupo de investigación, por su inmensa contribución en mi formación académica y sus valiosos comentarios que enriquecieron este proyecto.

A la Dra. Guadalupe Reyes Cruz y al Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza, por aceptar ser parte de mi comité sinodal así como por sus valiosos comentarios y aportaciones a este proyecto.

A la M en C Lydia Chávez Vargas, por su valiosa asesoría durante los experimentos así como sus comentarios objetivos que enriquecieron este proyecto.

A David Pérez Rangel, Estanislao Escobar Islas, Margarita Raquel Valadez Sánchez y Jaime Estrada Trejo, por su valiosa asistencia técnica que hizo posible el desarrollo de este proyecto

A mis compañeros del laboratorio 35 del departamento de Farmacología, Lydia Chávez, Daniel Cervantes, Magda Hernández, Ricardo Hernández, Paola Moreno, Adán Olgúin, Ismael Bracho y Alejandro Castillo, por su apoyo y asesoría en algunas fases experimentales así como por sus valiosos comentarios.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo económico recibido durante el desarrollo de mi Maestría, otorgándome el **No. de Beca: 333603**.

Este trabajo fue apoyado por CONACYT, como parte del donativo para el proyecto **“Mecanismos moleculares de migración endotelial y angiogénesis” Clave: 152434 / Vigencia: Enero 27, 2012 a Febrero 26, 2016 / Responsable: Dr. José Vázquez Prado.**

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS	4
ABSTRACT	5
RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Angiogénesis en cáncer.....	7
1.2. Aspectos moleculares de la migración de las células endoteliales durante la angiogénesis tumoral.....	8
1.3. Receptores con actividad de cinasa de tirosina.....	10
1.4. Receptores acoplados a proteínas G	13
1.5. Proteínas G heterotriméricas.....	14
1.6. Las GTPasas monoméricas de la familia de Rho controlan el movimiento celular polarizado.....	15
1.7. Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina, activadores de las RhoGTPasas.....	17
1.8. P-Rex1, un GEF para Rac.....	18
1.9. Cinasa dependiente de AMPc (PKA).....	19
1.10. Blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR)	20
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	23
Objetivo General.....	23
Objetivos Específicos	23
2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
2.1. Estrategia experimental general	24
2.2. Reactivos y anticuerpos.....	25
2.3. Cultivo Celular.	25
2.4. Plásmidos y Construcciones	26
2.5. Generación de construcciones de los dominios DEP1, DEP2, PDZ1, PDZ2 y DEP2-PDZ1 de P-Rex1 fusionadas a GST y EGFP.....	26
2.5.1. Diseño de primers.....	26
2.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa.....	27
2.5.3. Purificación y digestión de productos de PCR.....	28

2.5.4.	Ligación.....	29
2.5.5.	Transformación de ligación en bacterias <i>E. coli</i> DH5 α	30
2.5.6.	Extracción y purificación de Plásmidos (MiniPrep).....	31
2.5.7.	Diagnóstico de las construcciones obtenidas y expresión en células de mamífero.....	31
2.5.8.	Subclonación de construcciones DEP1, DEP2, PDZ1, PDZ2 y DEP2-PDZ1 de pCEFL GST a pCEFL-EFGP.....	31
2.6.	Transfección.....	32
2.7.	Lisis y GST Pull Down.....	33
2.8.	SDS-PAGE/Western Blot.....	35
2.9.	Microscopia de Fluorescencia y ensayo de colocalización en condiciones de autofagia.....	36
3.	RESULTADOS.....	38
3.1.	Generación de construcciones de los dominios DEP1, DEP2, PDZ1, PDZ2 y DEP2-PDZ1 de P-Rex1 fusionadas a GST y EGFP.....	38
3.2.	Subclonación del cDNA de los dominios DEP1, DEP2, PDZ1, PDZ2 y DEP2-PDZ de P-Rex1 del vector pCEFL GST a pCEFL EGFP.....	40
3.3.	La región PDZ-PDZ de P-Rex1 interactúa con la subunidad catalítica alfa de PKA.....	43
3.4.	PKA se asocia a distintos dominios de P-Rex1.....	44
3.5.	La asociación PDZ-PDZ P-Rex1/PKA es sensible a estimulación con Suero Fetal Bovino.....	46
3.6.	P-Rex1 es fosforilado por PKA en el primer dominio DEP.....	48
3.7.	El primer dominio DEP de P-Rex1 posee características de interacción con fosfolípidos de membrana.....	56
3.8.	La cinasa PKA podría regular la localización celular de P-Rex1 a través de su fosforilación en la serina 436.....	59
3.9.	El módulo DEP1-PDZ2 de P-Rex1 podría influenciar una segunda fosforilación por PKA en su región carboxilo terminal.....	60
3.10.	El complejo mTORC2 se asocia a múltiples dominios de P-Rex1. 61	
3.11.	La proteína Raptor (componente del complejo mTORC1) y la subunidad R1 α de la PKA colocalizan en compartimentos celulares perinucleares en condiciones que favorecen autofagia.....	63
4.	DISCUSIÓN.....	65
5.	CONCLUSIONES.....	71
6.	REFERENCIAS.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distintas alternativas terapéuticas antiangiogénicas utilizadas en la clínica cuyos blancos son el VEGF, el VEGFR y algunos componentes de sus cascadas de señalización.....	10
Figura 2. Arquitectura modular de las distintas familias de RTKs.....	11
Figura 3. Las RhoGTPasas controlan el citoesqueleto de actina y el movimiento celular.....	16
Figura 4. Los RhoGEFs son proteínas con múltiples dominios.	18
Figura 5. P-Rex1 es un RacGEF multidominio, susceptible a activación por Gβγ y PIP3.	18
Figura 6. Componentes de los 2 complejos de mTOR	21
Figura 7. Esquema general de la estrategia experimental.....	24
Figura 8. Representación gráfica del proceso de ligación entre inserto (cDNA codificante para los dominios de P-Rex1) y el vector de expresión digeridos.	30
Figura 9. Fundamento general del aislamiento de proteínas e interacciones por <i>GST Pull Down</i>	34
Figura 10. Procesamiento de muestras mediante SDS-PAGE/Western Blot.....	36
Figura 12. Obtención de construcciones pCEFL-GST-P-Rex1-DEP1, DEP2, PDZ1, PDZ2 y DEP2-PDZ1.....	39
Figura 13. Expresión en células HEK293T de las construcciones pCEFL GST de los dominios DEP1, DEP2, PDZ1, PDZ2 y DEP2-PDZ1 de P-Rex1.	40

Figura 14. Liberación y purificación de fragmentos de cDNA codificantes para los dominios DEP y PDZ de P-Rex1 a partir de las construcciones pCEFL GST..	41
Figura 15. Digestión diagnóstica de las construcciones pCEFL EGFP, que confirman la inserción de los fragmentos de cDNA codificantes para los dominios de DEP y PDZ de P-Rex1 en el vector pCEFL EGFP.	41
Figura 16. Expresión de las construcciones pCEFL EGFP de los dominios de P-Rex1.	42
Figura 17. Los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 pueden interactuar con la subunidades reguladora y catalítica alfa de PKA en células HEK293T	43
Figura 18. Las subunidades reguladora y catalítica alfa de PKA interactúan con distintas regiones de P-Rex1 células HEK293T.	44
Figura 19. Mapeo de los principales dominios de interacción de P-Rex1 con los componentes regulador y catalítico alfa de PKA.	45
Figura 20. Dinámica de interacción de los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 y los componentes regulador y catalítico de PKA frente a un curso temporal de estimulación con Suero Fetal Bovino.	48
Figura 21. La sobreexpresión en células HEK293T de los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 no altera el perfil de la fosforilación de sustratos de PKA	49
Figura 22. La construcción para Pull Down de P-Rex1, GST-DEP-DEP, genera una señal de fosforilación.	50
Figura 23. Sitios putativos de fosforilación por PKA en P-Rex1 determinados por la plataforma <i>Scansite</i> .	51
Figura 24. La señal de fosforilación por PKA de P-Rex1 proviene del módulo DEP-PDZ en la región aminoterminal.	51

Figura 25. La señal de fosforilación por PKA de P-Rex1 proviene del primer dominio DEP.....	53
Figura 26. La señal de fosforilación de los dominios DEP-DEP de P-Rex1 se incrementa al sobreexpresar PKA en distintas condiciones de estimulación celular..	55
Figura 27. Modelo estructural del dominio DEP1 de P-Rex1	57
Figura 28. Los dominios DEP-DEP de P-Rex1 poseen una localización celular perinuclear y asociada a compartimentos vesiculares..	59
Figura 29. La serina 436 de P-Rex1 alinea con la arginina 82 de Epac1.	60
Figura 30. La fosforilación de P-Rex1 por PKA en el primer dominio DEP favorece un cambio en la región carboxilo terminal	61
Figura 31. El complejo mTORC2 interactúa con distintos dominios de P-Rex1	62
Figura 32. La proteína Raptor, componente específico del complejo mTORC1 y la subunidad reguladora de la PKA, R1 α , colocan en compartimentos perinucleares en condiciones que favorecen la autofagia en células COS7.	64
Figura 33. Modelo de integración de señales de fosforilación por PKA sobre la arquitectura multidominio de P-Rex1.	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primers diseñados para amplificar el cDNA que codifica para los dominios DEP1, DEP2, PDZ1, PDZ2 y DEP2-PDZ1 de P-Rex1.	27
Tabla 2. Mezcla estándar para la reacción en cadena de la polimerasa utilizando el sistema EHF de Roche y protocolo de amplificación.	28
Tabla 3. Mezcla estándar de digestión.	29
Tabla 4. Mezcla estándar de ligación.....	29
Tabla 5. Ajustes de reactivos de transfección por Lipofectamina/Plus en dependencia del área superficial de la caja petri.	33
Tabla 6. Predicción de la posible estructura secundaria y exposición superficial de los residuos que forman parte de la región polibásica del primer dominio DEP de P-Rex1.....	58

ABSTRACT

Rho family GTPases (RhoGTPases) lead cell migration through dynamic reorganization of the actin cytoskeleton and, likewise, activation of Rho GTPases is tightly regulated by multiple guanine nucleotide exchange factors (GEFs) and other signaling hardware, including protein kinases. P-Rex1, a GEF for the RhoGTPase Rac, possess a multidomain architecture that enables it to interact with kinases such as mTOR and PKA, critical signaling elements of fundamental physiologic processes including cell migration. In this work, we contributed to assess the hypothetical possibility that P-Rex1 integrates mTOR and PKA signaling cascades, controlling their subcellular localization and access to their respective substrates. Detailed Pull Down interaction experiments revealed that P-Rex1 uses its DEP-PDZ module to recruit both kinases. Furthermore, we identified serine 436, at P-Rex1 amino-terminal region, specifically the DEP1 domain, as a PKA phosphorylation site. Interestingly, phosphorylation of S436 alters the electrophoretic mobility of P-Rex1 carboxyl-terminal region, suggesting a second phosphorylation, sequential to the one occurring at Ser436. Our *in silico* analyses showed that P-Rex1 carboxyl-terminal region contains two putative PKA phosphorylation sites, at S1001 and S1272. Additionally, fluorescently-tagged PKA and mTORC1 colocalized at perinuclear compartments during cell starvation (in which mTOR is inactive). Together, our results suggest that PKA regulates P-Rex1 via phosphorylation at Ser436 which putatively elicits a second phosphorylation, at the carboxyl-terminus. Thus, mTOR interaction with P-Rex1, which occurs at the DEP-DEP cassette, might be dynamically regulated by PKA, due to phosphorylation of P-Rex1 DEP-DEP region. Altogether, our results suggest that P-Rex1 integrates PKA and mTOR signaling cascades, restricting their cellular localization and potential access to specific substrates, including P-Rex1 itself, which is phosphorylated by PKA, putatively affecting its effector pathways, considered relevant during endothelial cell migration. Finally, our work supports further efforts to explore this pathway as a potential target of anti-angiogenic drugs.

RESUMEN

Las GTPasas de la familia de Rho (RhoGTPasas) dirigen la migración celular a través de la configuración del citoesqueleto de actina y así mismo la activación de las RhoGTPasas es estrechamente regulada por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) y diversos componentes de señalización, como cinasas de proteínas. P-Rex1 es un GEF para la RhoGTPasa Rac, que a través de su arquitectura multimodular es capaz de interactuar con diversos elementos de señalización, como las cinasas mTOR y PKA, que son elementos señalizantes críticos en diversos procesos celulares, fisiológicos y patológicos. En este trabajo, caracterizamos a detalle las interacciones entre P-Rex1 y ambas cinasas, y encontramos que el módulo DEP-PDZ de P-Rex1 es la principal región de interacción para las cinasas. Además, descubrimos que P-Rex1 es fosforilado de manera dependiente de PKA en su región N terminal, específicamente en el primer dominio DEP en la serina 436. La fosforilación en S436 tiene un efecto sobre el perfil electroforético de la región C terminal de P-Rex1, que especulamos es una fosforilación adicional por PKA. Nuestro análisis *in silico* demuestra que la región C terminal de P-Rex1 contiene dos sitios putativos de fosforilación por PKA, en S1001 y S1272. Especulamos que la fosforilación en S436 puede promover cambios en la localización celular de P-Rex1 y en la activación de Rac. Adicionalmente, realizamos experimentos que demuestran la coexistencia de componentes de PKA y mTORC1 en condiciones de inhibición de mTOR (condiciones de autofagia). Juntos, nuestros resultados contribuyen a revelar el mecanismo molecular para la regulación de P-Rex1 por PKA y provee una caracterización detallada de las interacciones entre P-Rex1 y las cinasas mTOR y PKA que pueden ser potencialmente relevantes durante la migración de células endoteliales y el diseño programado de fármacos anti-angiogénicos.

1. INTRODUCCIÓN

Los procesos celulares son controlados mediante la coordinación y organización espaciotemporal precisa de un amplio repertorio de proteínas de transducción de señales, como receptores de membrana, cinasas, fosfatasa, GTPasas pequeñas y adaptadores, entre otras.

Gracias a los hallazgos resultantes del proyecto de secuenciación del genoma humano ha sido posible acumular extensos catálogos de componentes señalizantes y, aunque nuestro conocimiento sobre la dinámica e interacción de estos componentes en distintos procesos celulares dista mucho de ser total, sí queda claro que su estudio es una poderosa herramienta para identificar potenciales blancos terapéuticos en distintas patologías, por ejemplo, el cáncer.

Este estudio tuvo como objetivo investigar la influencia de P-Rex1, un intercambiador de nucleótidos de guanina para la GTPasa pequeña Rac (RacGEF), en la transducción de señales de las cinasas mTOR y PKA, bajo la premisa de que la dinámica celular de estas tres proteínas es relevante en el proceso de migración celular que ocurre durante la angiogénesis tumoral.

1.1. Angiogénesis en cáncer

Las células de mamífero requieren oxígeno y nutrientes para su supervivencia. Esta disponibilidad de nutrientes se consigue mediante un complejo arreglo vascular, que es generado desde el desarrollo embrionario a partir de procesos que se conocen como vasculogénesis y angiogénesis, y que son regulados estrechamente por un balance entre factores anti-angiogénicos y pro-angiogénicos.

La vasculogénesis es la generación de vasos sanguíneos a partir de la diferenciación de células precursoras endoteliales a un linaje de células endoteliales comprometidas. Por otra parte, la angiogénesis es la generación de vasos sanguíneos a partir de un lecho vascular existente, es decir, no existe diferenciación celular, sino que las células endoteliales que forman parte de los vasos sanguíneos comienzan a migrar y proliferar para generar un nuevo arreglo vascular (Carmeliet and Jain 2011).

Si bien la angiogénesis ocurre durante el desarrollo embrionario, también continúa como un proceso normal a lo largo de la vida del individuo. Por ejemplo, durante el crecimiento de tejidos o la reparación de heridas. No obstante, la angiogénesis también puede presentarse en situaciones patológicas como lo es el cáncer. Cuando un tumor sólido ha alcanzado

cierto tamaño (1-2mm de diámetro de un tumor esferoide), este requiere mayor cantidad de oxígeno y nutrientes. Al no cubrir sus requerimientos fundamentales por quedar alejadas de los capilares existentes, las células malignas de un tumor en crecimiento, así como aquellas del estroma, comienzan a secretar factores pro-angiogénicos que son recibidos por las células endoteliales de los vasos sanguíneos adyacentes (a 100 o 200µm). En respuesta a estos estímulos, las células endoteliales comienzan una serie de procesos celulares como la interrupción de las uniones celulares y la degradación de su membrana basal para finalmente adquirir un fenotipo móvil que les permitirá migrar y proliferar en dirección al tumor.

La vasculatura tumoral resultante será tortuosa pero suficiente para permitir la existencia del tumor. Además, este contacto estrecho entre el tumor y los vasos sanguíneos inmaduros, altamente permeables y de alta densidad, incrementará las posibilidades de que las células malignas accedan a la circulación sanguínea y generen metástasis (Weis and Cheresh 2011).

Por lo tanto, la angiogénesis es un proceso que es deseable inhibir farmacológicamente en condiciones como el cáncer. Sólo mediante el estudio detallado de la dinámica y estructura de los participantes moleculares involucrados en este proceso será posible identificar potenciales blancos terapéuticos. Esto permitirá el diseño programado y racional de fármacos con acción anti-angiogénica.

1.2. Aspectos moleculares de la migración de las células endoteliales durante la angiogénesis tumoral.

La migración celular ocurre en procesos biológicos fundamentales como el desarrollo embrionario, la extensión de las proyecciones del sistema nervioso, la defensa del organismo ante diversos agentes infecciosos, la reparación de heridas y la generación de vasos sanguíneos durante el desarrollo y en el organismo adulto. Este proceso implica un cambio en la morfología celular, mediada por cascadas de señalización que provocan cambios en el citoesqueleto conduciendo el movimiento individual o en grupo de diversos tipos celulares, que incluyen células progenitoras y diferenciadas de distintos linajes.

Independientemente del tipo celular que esté sujeto a migración, este proceso se rige por el reconocimiento de señales extracelulares por parte de proteínas receptoras ubicadas en la membrana plasmática de la célula. Tales proteínas detectan las señales que promueven el movimiento en una dirección determinada y transfieren la información al espacio

intracelular. Las proteínas efectoras de la transducción de señales y los segundos mensajeros, conducen a modificaciones postraduccionales que promueven el ensamble de complejos macromoleculares, resultando en un cambio de la morfología celular y el desplazamiento de la célula en dirección a la señal.

Las células endoteliales poseen un amplio repertorio de proteínas de señalización que participan en la migración celular polarizada durante la angiogénesis tumoral. En este grupo se encuentran receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTKs), receptores acoplados a proteínas (GPCRs), proteínas adaptadoras y de andamiaje que ensamblan y organizan complejos señalizantes, fosfatasas, factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), GTPasas de la familia de Rho y proteínas cinasas.

Durante la angiogénesis tumoral, los factores secretados por las células tumorales y del estroma que promueven la angiogénesis predominan sobre los factores que la inhiben. A la fecha se ha caracterizado la existencia de una gran variedad de factores pro-angiogénicos, particularmente los de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) que fueron los primeros factores angiogénicos que se aislaron y purificaron, y los de la familia del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF). A partir de este conocimiento se han derivado una variedad de estrategias y alternativas terapéuticas anti-angiogénicas que tienen como blanco al VEGF y a sus receptores en células endoteliales. Por ejemplo, anticuerpos que reconocen y neutralizan al VEGF (bevacizumab) o inhibidores de la actividad de tirosina de los receptores para VEGF (VEGFR) como el sorafenib (**Figura 1**). Estudios recientes también se están enfocando sobre la actividad anti-angiogénica de receptores solubles para VEGF y otros factores de crecimiento, así como inhibidores de GPCRs que reconocen factores angiogénicos secretados por el estroma. Cabe destacar, en este punto, que la activación de receptores (tanto GPCRs, RTKs o receptores de adhesión) que promuevan la angiogénesis tumoral, desemboca en la activación de GTPasas pequeñas de la familia de Rho y en la reorganización del citoesqueleto para conducir a la migración celular y adquisición de una morfología capilar. Debido a este hecho, los estudios que se enfocan en la manipulación farmacológica de las RhoGTPasas así como distintos reguladores de las mismas han cobrado cada vez más valor en el campo del diseño programado de fármacos anti-angiogénicos (*Bruce R. Zetter (Zetter 1998)*).

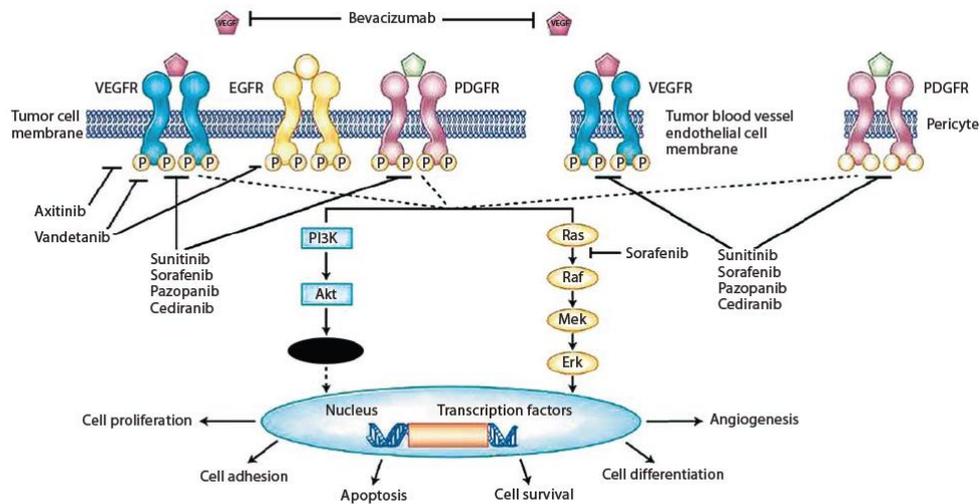


Figura 1. Distintas alternativas terapéuticas antiangiogénicas utilizadas en la clínica cuyos blancos son el VEGF, el VEGFR y algunos componentes de sus cascadas de señalización.

A continuación se describen algunas características de los componentes moleculares más relevantes durante la migración celular, haciendo énfasis en su participación en la angiogénesis tumoral.

1.3. Receptores con actividad de cinasa de tirosina.

Desde el descubrimiento, hace más de 25 años, del primer receptor con actividad de tirosina cinasa, muchos miembros de esta familia de receptores de superficie celular (conocidos también como RTKs) han emergido como reguladores clave en procesos celulares fundamentales como proliferación, diferenciación, supervivencia, metabolismo, migración celular y control del ciclo celular. En humanos existen 58 RTKs que se agrupan en 20 subfamilias. Todos los RTKs poseen una arquitectura molecular similar, con dominios de unión a ligandos en la región extracelular, una única hélice transmembranal y una región citoplasmática que contiene el dominio de cinasa de tirosina, adicional a un extremo carboxilo terminal con regiones regulatorias yuxtamembranales (**Figura 2**).

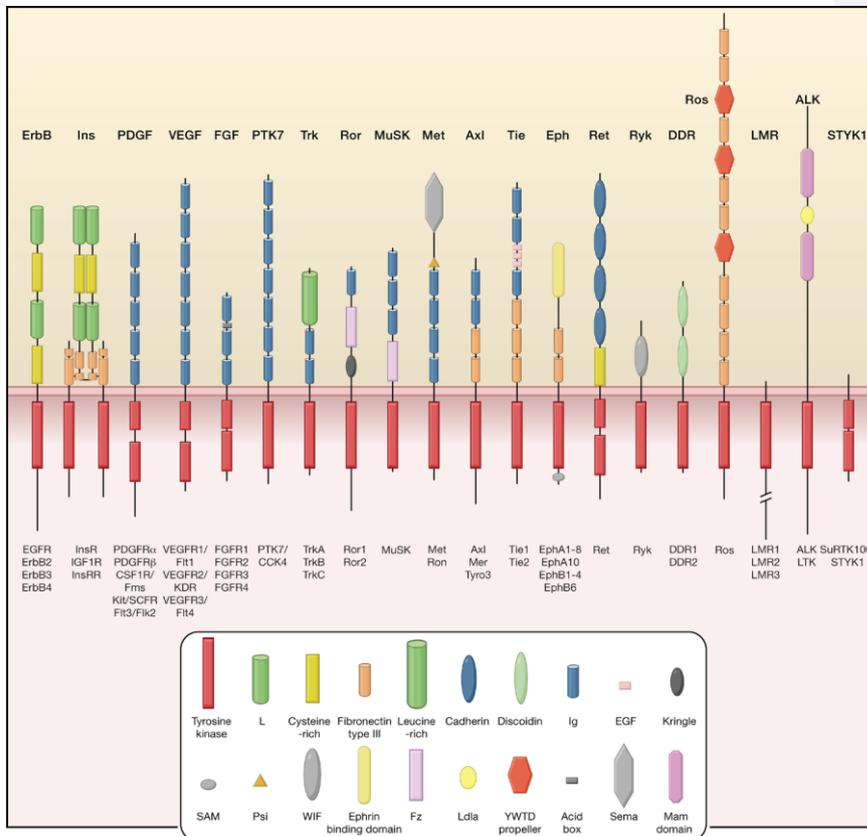


Figura 2. Arquitectura modular de las distintas familias de RTKs (Lemmon and Schlessinger 2010).

La dinámica ligando-receptor vinculada a la activación de diversos RTKs ha sido motivo de estudios detallados, incluso a nivel estructural. Nuestro entendimiento sobre estas interacciones es incluso de resolución atómica (gran cantidad de modelos obtenidos por difracción de rayos X). Tales estudios han complementado a los análisis bioquímicos pioneros, mediante los cuales se ha consolidado el modelo general que describe el mecanismo de activación de estos receptores consistente en el concepto de la dimerización del receptor y la transfosforilación de residuos de tirosina en los dominios citoplasmáticos. Salvo en el caso de los receptores para insulina que ya se encuentran dimerizados en el estado basal.

Cuando el RTK interactúa con su ligando, se promueve la homodimerización o heterodimerización con otro monómero RTK, dicha dimerización favorece

el acercamiento de las regiones citoplasmáticas de ambos receptores que contienen el dominio de tirosina cinasa, lo que ocasiona la transfosforilación de ciertos residuos de tirosina en la región intracelular del receptor (Lemmon and Schlessinger 2010).

Quizás la vía más conocida de señalización de estos receptores sea la del receptor para factor de crecimiento epidermal (EGFR), que promueve proliferación celular a través de la vía de las MAP cinasas (cinasas activadas por mitógenos). Una vez transfosforilado el dímero EGFR, la tirosinas fosforiladas son reconocidas por la proteína adaptadora Grb2 (que contiene un dominio SH2) y permite el reclutamiento de SOS, un GEF específico para la GTPasa pequeña Ras, la activación de Ras por SOS permite que la GTPasa actúe sobre su efector Raf, que es una cinasa de serina/treonina que a su vez puede fosforilar y activar a la cinasa MEK. MEK fosforila a ERK, que finalmente puede fosforilar, y de esta forma activar, a distintos factores de transcripción para promover la expresión de genes que favorecen la proliferación celular (Hynes and Lane 2005).

Por otra parte, la cinasa de lípidos PI3K (cinasa de fosfoinosítidos en posición 3) que cuenta con una subunidad reguladora p85 que posee dominios SH2, es reclutada por receptores para factores de crecimiento fosforilados en residuos de tirosina. Así pues, esta cinasa de lípidos, sensible a señalización por RTKs, genera un segundo mensajero de naturaleza lipídica localizado en la membrana, el fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato (PIP3), que es reconocido por proteínas que poseen ciertos tipos de dominios con homología de Pleckstrina (PH). Entre estas se incluyen las cinasas de serina/treonina AKT y PDK, que juegan un papel muy importante en los procesos de supervivencia y migración celular, a través de vías que favorecen la actividad de la cinasa mTOR, otra cinasa de serina/treonina involucrada en procesos celulares fundamentales como crecimiento, proliferación, metabolismo y migración celular polarizada. Por último, el PIP3 también puede ser reconocido por ciertos RhoGEFs, como P-Rex1, del cual se profundizará en otro apartado.

1.4. Receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G son la familia más grande de proteínas de membrana y median muchas respuestas celulares a

hormonas, neurotransmisores, moléculas asociadas a patógenos y distintos estímulos ambientales, siendo responsables de la visión, el olfato y el gusto. Al nivel más básico, todos los GPCRs son caracterizados por la presencia de siete segmentos α -hélice transmembranales, separadas por bucles intra y extracelulares alternantes. En vertebrados, los GPCRs son comúnmente divididos en 5 familias de acuerdo a sus similitudes en secuencia y estructura: Rhodopsina (familia A), Secretina (familia B), Glutamato (familia C), adhesión y Frizzled. La familia de la Rhodopsina es la más extensa y más diversa, sus miembros están caracterizados por secuencias motivo conservadas que implican una similitud estructural relacionada con su mecanismo de activación. A pesar de estas similitudes, los distintos GPCRs poseen características únicas en cuanto a su de transducción de señales que involucran múltiples subtipos de proteínas G, así como vías de señalización independientes a proteínas G y procesos regulatorios complejos.

Mucha de la fisiología de los vertebrados está basada en la transducción de señales por GPCRs. Entre estos se incluyen a receptores para hormonas, neurotransmisores, iones, fotones y otros estímulos. Así pues, los GPCRs son nodos esenciales de comunicación entre el ambiente extracelular y el repertorio intercelular de moléculas de señalización (Rosenbaum, Rasmussen et al. 2009) (Rasmussen, DeVree et al. 2011).

La señalización de los GPCRs depende en gran medida del subtipo de proteína G heterotriméricas que acople. Los estudios clásicos de señalización a través de GPCRs fueron realizados principalmente con el receptor β 2-adrenérgico, mismo que se acopla de forma clásica a proteínas Gs, pero puede, bajo circunstancias especiales, también acoplarse a Gi. De esta forma, los receptores β 2 adrenérgicos regularmente promueven la generación del segundo mensajero AMPc a través de la activación de la enzima adenilato ciclasa. Entre los efectores más conocidos del AMPc se encuentra la cinasa dependiente de AMPc (PKA) que tiene numerosos efectores, entre los que destacan canales iónicos, GPCRs, enzimas involucradas en el metabolismo, GEFs y RhoGTPasas. Los receptores acoplados a proteínas G también promover la activación de la cascada de las MAPK cinasas y, en el caso mencionado del receptor β 2 adrenérgico, parece ser determinante su acoplamiento a Gi una vez que ha sido fosforilado, reconocido por la arrestina, e internalizado. Además, es importante mencionar la capacidad de los GPCRs para transactivar RTKs, a través de enzimas (formalmente metaloproteasas) que hacen disponible el ligando para estos receptores.

Como ya mencionamos, pese a que gran parte de la señalización a través de GPCRs se debe a las proteínas G, muchos otros eventos como la desensibilización de las señales no se rigen por proteínas G. Además se sabe que los GPCRs son capaces de señalizar hacia la vía de MAP cinasas una vez internalizados, a través de un andamio formado por β -arrestina, una proteína que forma parte de los primeras vías de apagado de la señal de GPCRs. Adicionalmente, gracias a los esfuerzos de diversos grupos de investigación y a la obtención de las primeras estructuras cristalinas de GPCRs acopladas a ligando, se sabe que los GPCRs son capaces de sufrir un amplio espectro de cambios conformacionales que modifican su afinidad por ligandos tanto extracelulares como citoplasmáticos, haciendo de estos receptores reóstatos moleculares que matizan variedad de respuestas celulares dependientes de estímulos externos.

Análisis sistemáticos recientes de mutaciones somáticas en genomas de cáncer han puesto al descubierto que los GPCRs están mutados en el 20% de todos los tipos de cáncer, que incluyen tumores de intestino, riñón, ovario, tracto respiratorio y digestivo, próstata, pecho, tiroides, sistema nervioso central, pulmón, tejido linfóide y hematopoyético, tracto urinario e hígado. Las mutaciones en GPCRs también son evidentes en metástasis de tumores como melanomas, próstata y pulmón. La sobreexpresión atípica de algunos GPCRs, cuyos ligandos son intermediarios lipídicos como el ácido lisofosfatídico o esfingosina 1 fosfato (LPA y S1P), contribuye en procesos de angiogénesis, linfoangiogénesis y metástasis en variedad de tumores.

Finalmente, es importante destacar que las mutaciones en GPCRs que promueven el desarrollo de tumores, angiogénesis y metástasis no sólo son de tipo activante, que puede exacerbar una respuesta oncogénica, sino que otros GPCRs pueden sufrir mutaciones inactivantes que pueden resultar en la pérdida de potencial actividad supresora de tumores (O'Hayre, Vazquez-Prado et al. 2013).

1.5. Proteínas G heterotriméricas.

Las proteínas G heterotriméricas son transductores de señales atados al lado interno de la membrana plasmática y que conectan a los GPCRs con distintos efectores. Comunican señales de muchas hormonas, neurotransmisores, quimiocinas y factores autocrinos y paracrinos.

Después de que las 4 primeras proteínas G (Gs, Gt, Gi y Go) fueron aisladas por purificación bioquímica, un gran número y diversidad de proteínas G y sus subunidades han sido identificadas por clonación de cDNA. Las proteínas G consisten de tres subunidades, α , β y γ . Durante

una condición inactiva, la subunidad α tiene unido GDP, y su región efectora permanece oculta por $G\beta$, a su vez, $G\beta$ se ve envuelta por $G\gamma$, formando estos últimos dos un dímero $G\beta\gamma$ muy estable. Las proteínas G heterotriméricas se encuentran ancladas a la cara citoplasmática de membrana, a través de modificaciones postraduccionales de tipo lipídicas, para el caso concreto de α se trata de una miristoilación, mientras que $G\beta\gamma$ (a través de γ) sufre una isoprenilación. La localización membranar de las proteínas G heterotriméricas es indispensable para su función, mutaciones que impiden la miristoilación o isoprenilación de las subunidades efectoras abaten su función (Vilardaga, Bunemann et al. 2009).

Cuando un GPCR es activado, éste sufre cambios conformacionales que se transducen a su región citoplasmática, favoreciendo la activación de la proteína $G\alpha$ acoplada a través del intercambio de GDP por GTP. En este estado, $G\alpha$ se disocia del dímero $G\beta\gamma$, exponiendo su región "Switch" y actuando sobre sus efectores. Del mismo modo, $G\beta\gamma$ es ahora capaz de actuar sobre sus efectores.

El efector más conocido de las subunidades $G\alpha_s$ y $G\alpha_i$ (y de algunos dímeros $G\beta\gamma$) es la enzima adenilato ciclasa, que genera AMPc, activando diversos efectores sensibles a este nucleótido cíclico, entre los que se encuentra la cinasa PKA, misma que describiremos en detalle en un apartado más adelante.

1.6. Las GTPasas monoméricas de la familia de Rho controlan el movimiento celular polarizado.

Las GTPasas monoméricas actúan como interruptores moleculares, es decir, oscilan en estados de activación e inactivación en dependencia del nucleótido que tengan enlazado. El nucleótido GTP define un estado activo, mientras que la unión de GDP define el estado inactivo. Estos ciclos de activación e inactivación son estrechamente regulados por proteínas que favorecen el intercambio de GDP por GTP, otras que promueven la hidrólisis del GTP a GDP y un tercer grupo de proteínas que secuestran en el citoplasma a las GTPasas en un estado de unión a GDP, alejándolas de compartimentos efectores (**Figura 3A**).

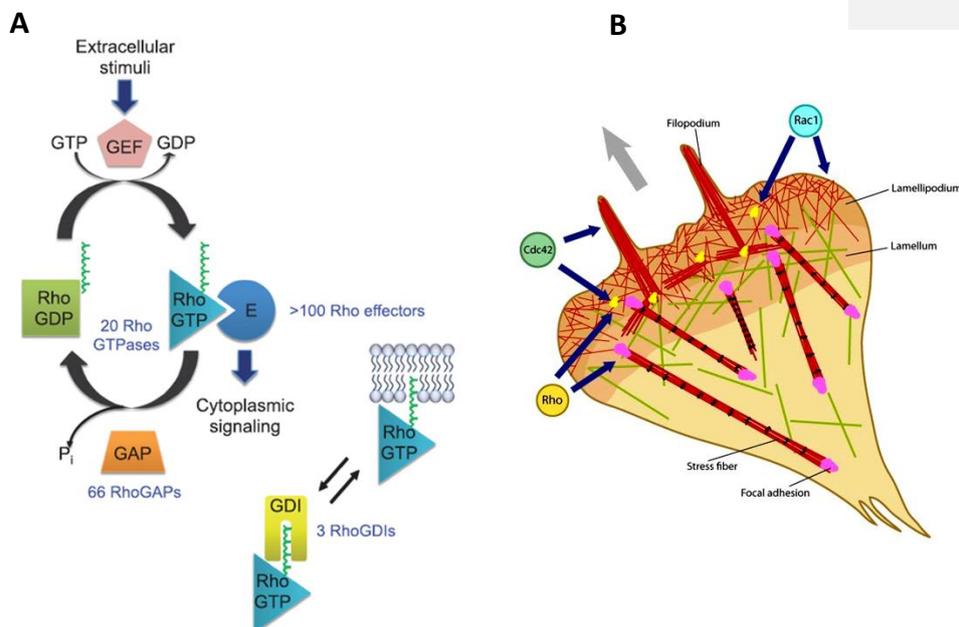


Figura 3. Las RhoGTPasas controlan el citoesqueleto de actina y el movimiento celular. A) Mecanismos de activación e inactivación de las RhoGTPasas que involucran la participación de proteínas GEFs, GAPs y GDIs (Cook, Rossman et al. 2013). B) La actividad exclusiva de las RhoGTPasas Rac, Cdc42 y Rho genera las estructuras de actina conocidas como lamelipodios, filopodios y fibras de estrés.

Existen más de 60 GTPasas pequeñas o monoméricas, que forman la superfamilia de Ras, que a su vez está compuesta por cinco grupos, que son la familia de Ras, Rho, Rab, Arf y Ran. Las GTPasas de la familia de Rho (RhoGTPasas) son conocidas por ser participantes claves en la reorganización del citoesqueleto de actina y el movimiento celular. Las RhoGTPasas más estudiadas son Rho, Rac y Cdc42 (Csepanyi-Komi, Levay et al. 2012). La sobreactivación exclusiva de alguna de estas RhoGTPasas genera estructuras de actina y fenotipos celulares particulares. Para el caso de Rac y Cdc42 se forman extensiones de membrana conocidas como filopodios y lamelipodios, respectivamente, generando una morfología celular extendida. Para el caso de la activación de la GTPasa Rho, se forman estructuras de actina contráctiles, conocidas como fibras de estrés (**Figura 3 B**).

La activación espaciotemporal precisa de las GTPasas de la familia de Rho es necesaria para que la célula pueda migrar de manera eficiente, y para ello requiere la coordinación adecuada de proteínas reguladoras de la actividad de las RhoGTPasas.

1.7. Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina, activadores de las RhoGTPasas.

Como ya mencionamos anteriormente, las RhoGTPasas son moduladas por proteínas reguladoras, algunas que las activan y otras que las inactivan.

Los intercambiadores de nucleótidos de guanina para RhoGTPasas (RhoGEFs) son proteínas que permiten la disociación del GDP de la RhoGTPasa, permitiendo el intercambio por GTP, esto debido a que el nucleótido GTP se encuentra al menos 10 veces más concentrado en citoplasma en comparación con el GDP.

Los RhoGEFs son proteínas con una arquitectura multidominio (**Figura 4**) y son casi 4 veces más diversos que las RhoGTPasas. Estas características han permitido especular que los RhoGEFs pueden cumplir funciones adicionales a las de intercambiadores de nucleótidos y que pueden ser receptivos a gran variedad de señales, como por ejemplo la asociación de cinasas y fosforilaciones por parte de las mismas (Bos, Rehmann et al. 2007).

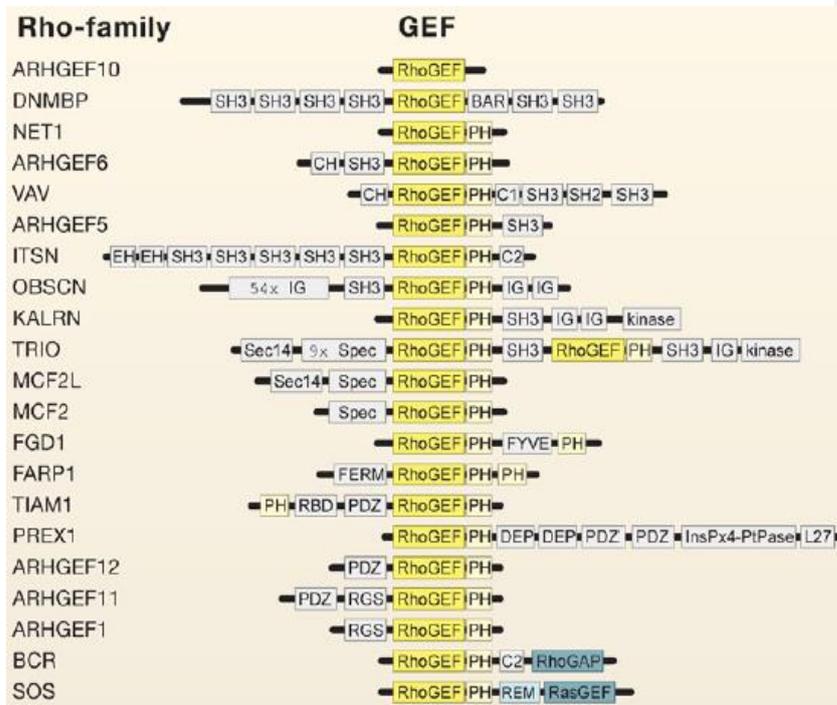


Figura 4. Los RhoGEFs son proteínas con múltiples dominios (Bos, Rehmann et al. 2007).

1.8. P-Rex1, un GEF para Rac.

P-Rex1 es un RhoGEF específico para la GTPasa Rac (RacGEF) con una arquitectura multimodular. Consta de un dominio catalítico intercambiador DH, un dominio de reconocimiento de lípidos de membrana PH, dos dominios DEP en tándem, dos dominios PDZ en tándem y una región carboxilo terminal (C term) extensa que tiene homología con fosfatasa de inosítilos en posición 4 (IP4P) y cuya actividad no ha sido confirmada (**Figura 5**) (Welch, Coadwell et al. 2002).

P-Rex1 es susceptible a activación por GPCRs a través de interacción directa con el dímero G $\beta\gamma$ y también a activación por RTKs a través de la generación por parte de PI3K de PIP3, que es reconocido por el dominio PH del RacGEF. Comúnmente se habla de una activación sinérgica de P-Rex1 por parte de G $\beta\gamma$ y PI3K (Sosa, Lopez-Haber et al. 2010; Balamatsias, Kong et al. 2011).

Previamente hemos reportado que P-Rex1 es capaz de conducir respuestas angiogénicas dependientes de SDF-1 a través de la activación la GTPasa Rac (Carretero-Ortega, Walsh et al. 2010). Así mismo, hemos reportado que P-Rex1 es capaz de interactuar con la región carboxilo terminal del GPCR S1P1 (Receptor para esfingosina 1 fosfato) a través de sus dominios PDZ en tándem, favoreciendo la migración celular (Ledezma-Sanchez, Garcia-Regalado et al. 2010).

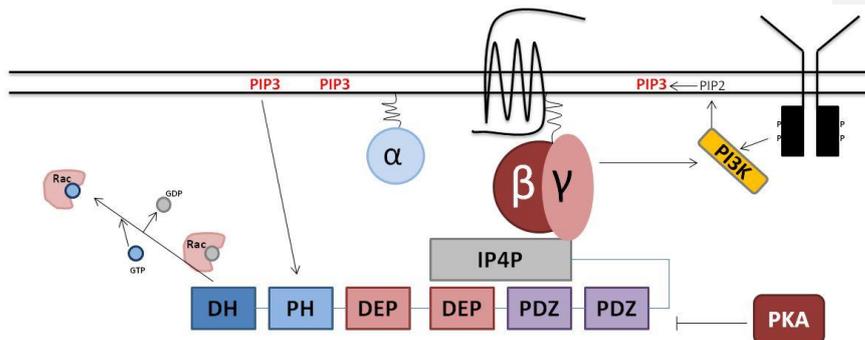


Figura 5. P-Rex1 es un RacGEF multidominio, susceptible a activación por G $\beta\gamma$ y PIP3.

Previamente, también hemos demostrado que P-Rex1 interactúa con la cinasa mTOR a través de los dominios DEP en tándem y que regula la migración celular polarizada dependiente de leucina, que es un activador clásico de mTORC1 (Hernandez-Negrete, Carretero-Ortega et al. 2007).

Existe evidencia experimental, de que P-Rex1 es fosforilado por la cinasa PKA, y que dicha fosforilación inhibe la actividad intercambiadora de P-Rex1 sobre Rac dependiente de Gβγ (Mayeenuddin and Garrison 2006) (**Figura 5**).

Recientemente, el trabajo doctoral de Lydia Chavez Vargas realizado en nuestro laboratorio ha permitido identificar a P-Rex1 como una proteína de interacción para la subunidad reguladora 1α de PKA (R1α), y especulamos que el RacGEF se asocia a la holoenzima PKA, regulando la fosforilación de algunos sustratos de esta cinasa.

1.9. Cinasa dependiente de AMPc (PKA)

Como mencionamos anteriormente, la activación de GPCRs acoplados a Gs promueve la activación de la enzima adenilato ciclasa, que genera el segundo mensajero AMPc, el cual es reconocido por gran variedad de proteínas de señalización, como GEFs, canales iónicos y cinasas, como PKA.

PKA es una cinasa filogenéticamente conservada, que consta de dos subunidades reguladoras, que reconocen al AMPc, y dos subunidades catalíticas. En su forma de holoenzima, constituida por un heterotetramero, la cinasa es inactiva, pero en presencia de AMPc, las subunidades reguladoras reconocen al nucleótido cíclico mediante su par de dominios CBD, y sufren cambios conformacionales que le hacen perder afinidad por las subunidades catalíticas por casi 3 órdenes de magnitud. Una vez liberadas de las subunidades reguladoras, las subunidades catalíticas pueden fosforilar a sus efectores (Taylor, Buechler et al. 1990; Kim, Xuong et al. 2005; Kim, Cheng et al. 2007). Cabe mencionar, que la localización celular de PKA y la especificidad para fosforilar a sus sustratos es provista por proteínas de andamiaje conocidas como AKAPs, que aunque son arquitectónicamente muy diversas, comparten un motivo consenso con el cual son capaces de asociarse a la cinasa a través de las subunidades reguladoras y localizar a PKA en compartimentos celulares donde se encuentran poblaciones de sustratos particulares (Chen and Kass 2005).

La PKA desempeña un papel fundamental en distintos procesos biológicos que incluyen crecimiento, metabolismo, expresión de genes, desensibilización de receptores y migración celular polarizada.

Es conocido que PKA puede fosforilar a la GTPasa Rho y abatir el proceso migratorio y, en contraste con su actividad inhibitoria sobre Rho, existen reportes que indican que PKA parece ser requerida para la activación de Rac y Cdc42 en células endoteliales y de carcinoma, aunque a diferencia de Rho, Rac y Cdc42 no son fosforiladas por PKA, sino que parecen requerir de intermediarios fosforilables por PKA para regular la actividad de las GTPasas, como GEFs o GAPs (Laudanna, Campbell et al. 1997; Howe 2004).

Otro interactivo de la subunidad R1 α de PKA es la cinasa mTOR. En 2006, Manos Mavrakis y colaboradores demostraron que R1 α y mTOR interactúan y colocalizan en autofagosomas (Mavrakis, Lippincott-Schwartz et al. 2006; Mavrakis, Lippincott-Schwartz et al. 2007).

El papel de PKA en el cáncer y la migración celular depende en gran medida del contexto celular, nosotros proponemos que P-Rex1 es un nodo de convergencia entre la señalización de PKA y la migración celular polarizada relevante en la angiogénesis tumoral.

1.10. Blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR)

La proteína conocida como mTOR, blanco de la rapamicina en mamíferos, es una cinasa de serina/treonina filogenéticamente conservada que controla procesos celulares tan importantes como metabolismo, crecimiento, supervivencia y migración bajo la influencia de múltiples proteínas de interacción.

La cinasa mTOR es el núcleo catalítico de dos complejos bioquímicamente diferentes y diferencialmente sensibles al antibiótico rapamicina. El complejo 1 de mTOR (mTORC1), es sensible a rapamicina, promueve la síntesis de proteínas en respuesta a gran variedad de factores de crecimiento y nutrientes. El complejo 2 de mTOR (mTORC2), es insensible al antibiótico rapamicina y promueve supervivencia y migración celular a través de la activación de las RhoGTPasas y de la fosforilación de la cinasa AKT, respectivamente. Aunque mTORC2 es insensible a rapamicina, una incubación prolongada con este antibiótico previene el ensamble de este complejo (Bracho-Valdes, Moreno-Alvarez et al. 2011).

mTORC1 está definido por el ensamble de Raptor, mientras que mTORC2 se asocia a Rictor y mSin1. mLST8 forma parte de ambos complejos (Figura 6).

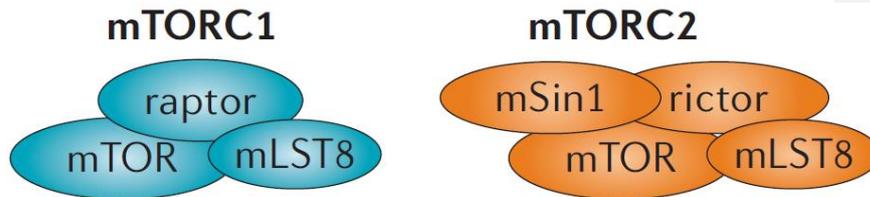


Figura 6. Componentes de los 2 complejos de mTOR (Sabatini 2006).

El mecanismo por el cual mTORC2 conduce la migración celular depende de su asociación con P-Rex1 a través de los dominios DEP-DEP del RacGEF (Hernandez-Negrete, Carretero-Ortega et al. 2007). Aparentemente la interacción de P-Rex1 con mTOR favorece, además de la activación de Rac, la activación de AKT1. Con base en esto, se especula que el P-Rex1 recluta a los distintos componentes de la vía PI3K/AKT/mTOR y que adicionalmente activa alostéricamente a mTORC2 (Kim, Yun et al. 2011).

La caracterización detallada de la interacción entre P-Rex1 y mTORC2 permitirá conocer el mecanismo concreto por el cual dicha asociación favorece el proceso de migración celular en el contexto angiogénico.

JUSTIFICACIÓN

La angiogénesis es un proceso que es deseable inhibir farmacológicamente en condiciones de cáncer. Sólo mediante el estudio detallado de la dinámica y estructura de los participantes moleculares involucrados en este proceso será posible identificar potenciales blancos terapéuticos que permitirán, posteriormente, el diseño programado y racional de fármacos con acción anti-angiogénica.

Se ha demostrado que P-Rex1 es un participante molecular importante en la migración celular dependiente de la actividad del GPCR CXCR4 (el receptor para SDF1/CXCL12), promoviendo la activación de la RhoGTPasa Rac en el contexto angiogénico. También se ha demostrado que P-Rex1 es capaz de interactuar con las cinasas mTOR y PKA, que son elementos señalizantes relevantes en diversas condiciones fisiopatológicas como lo es el cáncer. El estudio de las interacciones entre estos componentes es de gran interés, ya que dichas asociaciones podrían ser relevantes en la transducción de señales angiogénicas.

En este trabajo, postulamos que P-Rex1 puede funcionar como una plataforma de interacción para las cinasas mTORC2 y PKA, integrando señales de fosforilación de ambas cinasas, generando un nodo de convergencia relevante durante la migración celular polarizada en el contexto de la angiogénesis tumoral.

HIPÓTESIS

P-Rex1 establece interacciones con las cinasas mTOR y PKA regulando su función a través de la restricción de su localización y de proporcionar un marco para el reconocimiento de sustratos específicos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar detalladamente las interacciones entre el RacGEF P-Rex1 y las cinasas mTORC2 y PKA, así como evaluar la dinámica celular de estas interacciones y las consecuencias funcionales de estos ensamblajes.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar detalladamente las interacciones entre P-Rex1 y las cinasas mTORC2 y PKA.
2. Ubicar la dinámica y ubicación celular de las interacciones entre P-Rex1 y las cinasas mTORC2 y PKA.
3. Evaluar las consecuencias funcionales de las interacciones entre P-Rex1 y las cinasas mTORC2 y PKA desde la perspectiva de la fosforilación de sus respectivos sustratos.

2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

2.1. Estrategia experimental general

Con la finalidad de evaluar las interacciones entre distintos dominios de P-Rex1 con las cinasas mTOR y PKA, utilizaremos como modelo celular las líneas HEK293T y COS7 como sistemas transfectados, en los cuales expresaremos los componentes de interacción que nos interesa investigar. Aprovecharemos la amplia colección de construcciones de P-Rex1, mTOR y PKA con la que contamos en el laboratorio y adicionalmente generaremos construcciones de los dominios independientes de P-Rex1: DEP1, DEP2, PDZ1, PDZ2 y DEP2-PDZ1 fusionados a las proteínas GST y EGFP para realizar experimentos de Pull Down y microscopia de fluorescencia, respectivamente.

Mediante aislamiento bioquímico por Pull Down detallaremos las interacciones moleculares que sostiene P-Rex1 con las cinasas mTOR y PKA y evaluaremos el efecto de P-Rex1 en la fosforilación de sustratos de PKA mediante inmunoblot utilizando un anticuerpo que reconozca el consenso de fosforilación por PKA (**Figura 7**).

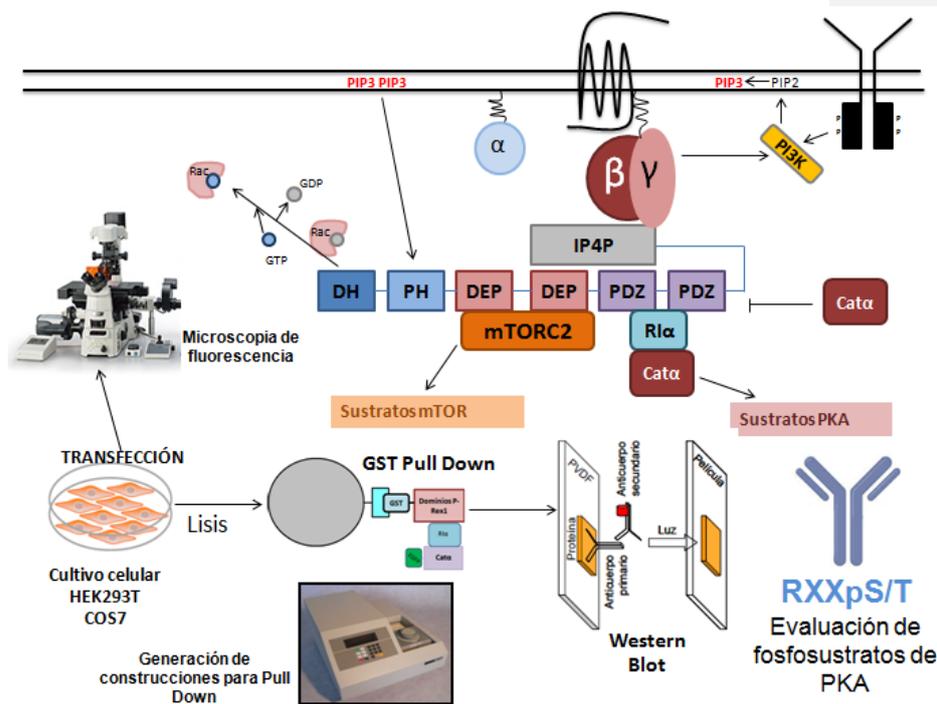


Figura 7. Esquema general de la estrategia experimental. Incluye el uso de *GST Pull Down* para definir las interacciones moleculares, generación

de construcciones de interés por PCR, microscopía de fluorescencia para evaluar la dinámica celular de las interacciones y evaluación de la fosforilación de sustratos de PKA utilizando anticuerpos que reconocen el consenso de fosforilación de esta cinasa.

2.2. Reactivos y anticuerpos

El medio de cultivo DMEM utilizado fue provisto por *Sigma Aldrich* y el suero fetal bovino (SFB) y antibiótico-antimicótico (anti-anti) proviene de *Gibco*.

El anticuerpo primario contra el epítoto HA fue provisto de *Covance*, los anticuerpos secundarios contra ratón y conejo fueron adquiridos de *KPL*, los anticuerpos contra GST y GFP se adquirieron de *Santa Cruz*, mientras que el anticuerpo contra el epítoto Myc proviene de *Sigma Aldrich*. El anticuerpo contra sustratos de la cinasa PKA (RXXpS/T #9621S) fue adquirido de *Cell Signalling*.

2.3. Cultivo Celular.

Para experimentos de interacción por *GST Pull Down* se utilizaron células HEK293T, que fueron cultivadas con DMEM suplementado al 10% con Suero Fetal Bovino y 1% de antibiótico en cajas de 10 centímetros o placas de 6 pozos según lo requería el experimento. Las condiciones de mantenimiento consistieron en temperatura de 37°C y atmosfera de CO₂ de 5%.

Para la división de células HEK293T se partía de una caja de 10 centímetros confluyente, que se lavaba con PBS 1X a temperatura de 37°C. Se agregaba 1mL de tripsina 1X y se incubaba a 37°C por un minuto. La reacción era neutralizada adicionando 9mL de DMEM 10% SFB y 1% antibiótico (medio completo). Las células eran suspendidas pipeteando varias veces sin generar burbujas o espuma. Se agregaron 2mL de las células suspendidas en cajas con 8mL de medio completo, que habían sido tratadas por 20 minutos con 3mL de poly-D-Lisina 1X y lavadas una vez con PBS 1X. Estas preparaciones se transfectaban a las 24 horas de la siembra mediante el kit de Invitrogen "Lipofectamina-PLUS". Las preparaciones alcanzaban la confluencia a las 48 o 56 horas después de la siembra.

Para los experimentos de microscopia de fluorescencia se utilizaron células COS7 que crecieron en las mismas condiciones que se describen para las células HEK293T, a excepción que las cajas de trabajo no requirieron pretratamiento con Poly-D-Lisina.

2.4. Plásmidos y Construcciones

En laboratorio contamos con una colección de plásmidos de expresión en células de mamífero que contienen el cDNA que codifica para las proteínas PRKAR1a (R1 α), PRKACAa (Cata α), Rictor y Raptor, así como para distintos dominios y regiones de P-Rex1 fusionados a distintas proteínas y epítopes. A continuación se mencionan algunas construcciones:

- pCEFL GST P-Rex1 N term (DH-PDZ2)
- pCEFL GST P-Rex1 C term
- pCEFL GST P-Rex1 DH-PH
- pCEFL GST P-Rex1 DEP-PDZ (DEP1-PDZ2)
- pCEFL GST P-Rex1 DEP-DEP
- pCEFL GST P-Rex1 PDZ-PDZ
- pCEFL EGFP P-Rex1 N term (DH-PDZ2)
- pCEFL EGFP P-Rex1 C term (EGFP es la proteína verde fluorescente)
- pCEFL EGFP P-Rex1 DH-PH
- pCEFL EGFP P-Rex1 DEP-PDZ (DEP1-PDZ2)
- pCEFL EGFP P-Rex1 DEP-DEP
- pCEFL EGFP P-Rex1 PDZ-PDZ
- pcDNA3 HA-R1 α
- pCEFL EGFP- Cata α
- pCEFL EGFP C1 R1 α (C1 significa que la proteína verde fluorescente "EGFP" se encuentra fusionada en el carboxilo terminal de R1 α)
- mCherry-Raptor (mCherry es una variante de la proteína roja fluorescente "RFP")
- pcDNA3 Myc-Rictor

2.5. Generación de construcciones de los dominios DEP1, DEP2, PDZ1, PDZ2 y DEP2-PDZ1 de P-Rex1 fusionadas a GST y EGFP.

2.5.1. Diseño de primers.

Para amplificar por PCR el cDNA que codifica para los dominios DEP1, DEP2, PDZ1, PDZ2 y el módulo DEP2-PDZ1 de P-Rex1, sometimos la

secuencia de aminoácidos de P-Rex1 (obtenida de la base de datos del NCBI) a análisis en la plataforma SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) para definir los dominios de interés. Una vez definidos, utilizando el programa *BioEdit*, identificamos y aislamos las secuencias de cDNA que codificaban para los dominios de interés. Definimos los ~ 21 primeros nucleótidos de la región 5' de cada dominio como el primer sentido y el reverso-complemento de los 21 primeros nucleótidos de la región 3' de cada dominio como el primer anti-sentido o reverso.

Al primer sentido y reverso se le agregaron secuencias de corte (en sus extremos 5' y 3') para las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, respectivamente, así como una secuencia a t a, que favorece la incorporación de la polimerasa durante la reacción de PCR y un codón de termino t c a exclusivamente a los primers reversos en su extremo 3'.

Los primers diseñados para cada construcción se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Primers diseñados para amplificar el cDNA que codifica para los dominios DEP1, DEP2, PDZ1, PDZ2 y DEP2-PDZ1 de P-Rex1.

Dominio	Primer sentido (5')	Primer reverso (3')
DEP1	ataGGATCCAAGAAGGTGAACCTCATCAAG	ataGAATTCtcaGTAGCGGAAGCGATACATCAC
DEP2	ataGGATCCCTCTACACCCCGGTGATCAAAGACC	ataGAATTCtcaAGCATGAAAGCGGAAGTACTG
PDZ1	ataGGATCCGAGGACTATGGCTTTGACATCG	ataGAATTCtcaGGCCTTCGTGGCCACCAGGAG
PDZ2	ataGGATCCGACACACTGTGCTTCCAGATTCG	ataGAATTCtcaGATCCAAGTACAGGCCAG
DEP2-PDZ1	ataGGATCCCTCTACACCCCGGTGATCAAAGACC	ataGAATTCtcaGGCCTTCGTGGCCACCAGGAG
	Secuencia de corte para BamHI	Secuencia de corte para EcoRI

Los primers diseñados fueron sintetizados por la compañía *Sigma Aldrich*.

2.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa.

Una vez recibidos los primers sintetizados y liofilizados, estos fueron disueltos en agua inyectable estéril para obtener una concentración de 100µM, posteriormente se realizaron diluciones para obtener alícuotas de 100µL a una concentración de trabajo 10µM. Las alícuotas stock se almacenaron a -70°C y las alícuotas de trabajo a -20°C.

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo utilizando como templado una construcción de P-Rex1 con la que se contaba en el laboratorio: pCEFL GST-DEP1-PDZ2.

La reacción de PCR se llevo a cabo utilizando el Kit de amplificación de Roche *Expand High Fidelity (EHF) system* y el termociclador *Perkin Elmer GeneAmp PCR system (Tabla 2)*.

Tabla 2. Mezcla estándar para la reacción en cadena de la polimerasa utilizando el sistema EHF de Roche y protocolo de amplificación.

	Para 50µL (µL)	5.5X (µL)
Agua inyect.	35.5	177.5
Buffer EHF 10X	5	27.5
dNTPs 50X	1	5.5
Primer 3'	1	
Primer 5'	1	
DMSO	2.5	12.5
Betaina	2.5	12.5
Templado	1	5.5
Enzima EHF	0.5	2.5
Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)
Desnaturalización	94	300
Desnaturalización	94	50
Alineamiento	60	50
Elongación	72	50
Elongación	72	300
Terminación	4	∞

Comentado [jvp1]: concentración del stock, o es directamente el reactivo de la botella original.

2.5.3. Purificación y digestión de productos de PCR.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (con bromuro de etidio), una vez confirmada la amplificación de fragmentos del peso esperado (210pb para los dominios DEP y PDZ, y 500pb para DEP2-PDZ1) se procedió a purificar los productos de PCR por columna mediante el Kit de *Qiagen PCR purification Kit*.

Los productos purificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa, una vez confirmado un buen rendimiento de purificación, 5µL de los productos de PCR purificados y 0.1 µg de vector pCEFL GST se sometieron a digestión con las enzimas BamHI y EcoRI (*Roche*) en un

volumen de 30 μ L a 37°C por 12 horas. La mezcla de digestión se describe en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Mezcla estándar de digestión.

	Volumen para 30 μ L (μ L)	6.5X (μ L)
Agua inyectable	22	143
Buffer A	3	19.5
BamHI	0.5	3.25
EcoRI	0.5	3.25
Fragmento purificado	5	

2.5.4. Ligación.

Las digestiones fueron analizadas por gel de agarosa y posteriormente purificadas por columna. El rendimiento de la purificación se confirmó por electroforesis de gel de agarosa.

Los fragmentos digeridos y purificados se sometieron a ligación (**Figura 8**) durante 12 horas a 16°C, las mezclas de ligación se describen en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Mezcla estándar de ligación.

	Volumen para 10 (μ L)	5.5X
Fragmento (inserto)	7.5	
Vector pCEFL GST (0.05λ)	0.5	2.75
Buffer ligasa	1	5.5
Ligasa	0.5	2.75
Agua Inyect.	0.5	2.75

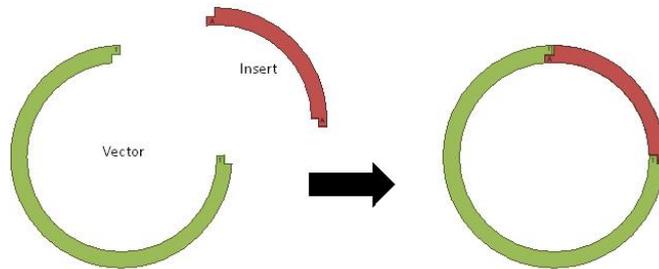


Figura 8. Representación gráfica del proceso de ligación entre inserto (cDNA codificante para los dominios de P-Rex1) y el vector de expresión digeridos.

5µL del producto de ligación fueron utilizados para transformar bacterias *E. coli* DH5α ultracompetentes.

2.5.5. Transformación de ligación en bacterias *E. coli* DH5α.

El protocolo general de transformación para ligación de bacterias *E. coli* DH5α se describe a continuación:

1. Descongelar, sumergidas en hielo, las bacterias competentes Y AGREGAR 16µl de Buffer TB por 50µL de bacterias.
2. A 50µl de bacterias agregar 5µl de ligación.
3. Incubar en hielo por un periodo de 20 a 30 minutos.
4. Realizar un choque térmico de 60 segundos a 42°C.
5. Inmediatamente después Incubar en hielo durante 10 minutos.
6. Agregar 300 µl de medio S.O.C.
7. Incubar con agitación (180-200 rpm) durante 1 hora a 37°C.
8. Centrifugar el cultivo a 2,300 rpm por 30 segundos.
9. Eliminar sobrenadante y resuspender en 50 µl de medio SB con ampicilina.
10. Plaquear todo el sobrenadante en medio LB con ampicilina e incubar las placas a 37°C de 12-16 horas.

Las colonias que crecieron en las placas fueron picadas y crecidas en 5mL de medio con ampicilina para realizar las preparaciones de extracción de plásmidos (miniprep) correspondientes.

2.5.6. Extracción y purificación de Plásmidos (MiniPrep)

Las Minipreps de las colonias crecidas fueron realizadas con el Kit *GenElute Plasmid MiniPrep* de *Sigma Aldrich* según las instrucciones del proveedor.

2.5.7. Diagnóstico de las construcciones obtenidas y expresión en células de mamífero.

Los plásmidos obtenidos se sometieron a ligación con las enzimas BamHI/EcoRI como se indica en el apartado "*Purificación y ligación de productos*" de PCR, sustituyendo el producto de PCR por 1µL de plásmido purificado. Las digestiones fueron diagnosticadas por electroforesis en gel de agarosa. Una vez confirmada la liberación de los fragmentos del peso esperado (210pb para los dominios DEP y PDZ, y 500pb para DEP2-PDZ1) se procedió a transfectar células HEK293T, sembradas en cajas de 6 pozos, con el Kit *Lipofectamina/Plus* de *Invitrogen* (Ver apartado *Transfección*). Las células fueron lisadas y procesadas por SDS-PAGE/Western Blot (Ver apartado *Lisis y GST Pull Down y SDS-PAGE/Western Blot*) 48 horas después de la transfección para determinar la expresión de las construcciones obtenidas.

2.5.8. Subclonación de construcciones DEP1, DEP2, PDZ1, PDZ2 y DEP2-PDZ1 de pCEFL GST a pCEFL-EFGP.

El cDNA codificante para los dominios DEP1, DEP2, PDZ1, PDZ2 y DEP2-PDZ1 fue liberado de las construcciones pCEFL-GST por digestión con las enzimas BamHI/EcoRI. Los fragmentos obtenidos se sometieron a purificación y digestión en paralelo con el vector pCEFL-EFGP, que contiene los mismos sitios de corte para BamHI y EcoRI que el vector pCEFL-GST. Las digestiones de los fragmentos y el vector fueron purificados, diagnosticadas y sometidas a ligación. Los productos de ligación fueron transformados en bacterias *E. coli* DH5α. Se picaron al menos 2 colonias de cada transformación y se crecieron en medio LB suplementado con ampicilina para posteriormente realizar la extracción y purificación de los plásmidos por miniprep. Los plásmidos obtenidos se

sometieron a digestión diagnóstica con las enzimas BamHI/EcoRI y se confirmó la inserción de los fragmentos en el vector pCEFL-EGFP.

Finalmente se confirmó la expresión de las construcciones pCEFL-EGFP de los dominios de P-Rex1 transfectando los plásmidos obtenidos en células HEK293T. La observación al microscopio de fluorescencia (Ver apartado *microscopía de fluorescencia*) y el Western Blot contra GFP confirmaron la expresión de los dominios de P-Rex1 fusionados a la proteína verde fluorescente.

2.6. Transfección.

El protocolo general de transfección en cajas petri de 10cm mediante el sistema "Lipofectamina-Plus" de Invitrogen se describe a continuación:

1. Preparar reactivo PLUS en un tubo de polipropileno dependiendo del número de cajas. 0.75ml DMEM sin suero por caja más 10 uL PLUS por caja. Si hay algún cDNA común para todas las cajas agregarlo en este punto. Agitar e incubar 15 minutos. Agregar el Plus sobre el medio y no al revés.
2. Preparar Lipofectamina en un tubo de polipropileno dependiendo del número de cajas. Por cada caja de 10cm de diámetro considerar 0.75mL DMEM sin suero más 12ul lipofectamina. Agitar e incubar 15 minutos.
3. Alicuotar el PLUS. 760 uL por tubo. Marcar tubos. Adicionar el cDNA a cada tubo teniendo 4ug de concentración. Agitar e incubar 15 minutos.
4. Agregar 762 ul de la solución de lipofectamina a los tubos con PLUS y cDNAs. Agitar e Incubar 15 minutos.
5. Preparar células. Marcar las cajas en la parte inferior, lavar con 3-5mL de PBS 1X, retirar y agregar 5mL de DMEM sin suero y sin antibióticos.
6. Agregar por decantación la mezcla de cDNAs, lipofectamina y PLUS, a cada caja. Incubar a 37^oC por un periodo de 3 a 5 horas.
7. Pasado ese tiempo retirar el medio de transfección y agregar 10mL de medio completo.

Para la transfección de cajas de diferente área superficial ajustar los volúmenes de los reactivos de acuerdo a la **Tabla 5**.

Tabla 5. Ajustes de reactivos de transfección por Lipofectamina/Plus en dependencia del área superficial de la caja petri.

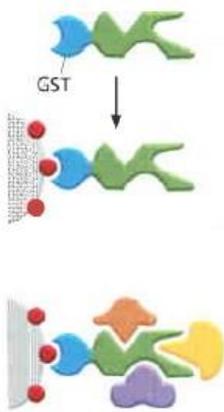
	cDNA Total (µg)	Plus (µl)	Medio para diluir plus y lipof (µl)	Lipofectamina (µl)	Medio q se agrega a células (ml)	Volumen final (ml)
96 pozos	0.1	1	10	0.5	0.05	0.07
24 pozos	0.4	1	25	1	0.2	0.250
12 pozos	0.7	5	50	2	0.4	0.5
6 pozos	1	3	100	3	0.8	1
60mm	2	6	250	6	2	2.5
100mm	4	10	750	12	5	6.5

2.7. Lisis y GST Pull Down.

El protocolo general de lisis y *GST Pull Down* (**Figura 9**) utilizado para células HEK293T cultivadas en cajas de 10 centímetros se describe a continuación:

1. Disponer células sobre hielo y lavarlas con PBS 1X frío (2-3 mL por caja).
2. Lisar con Buffer de lisis Tritón 1% o CHAPS 0.3% (CHAPs es ideal para experimentos que involucren *Pull Down* o inmunoprecipitación de los complejos de mTOR (1mL por caja) que contengan inhibidores proteasas y fosfatasas. Incubar sobre hielo 10 minutos.
3. Raspar lisados con una espátula limpia y transferir los lisados a tubos Eppendorf de 1.5mL. Los tubos se mantienen sobre hielo.
4. Centrifugar los lisados a 4°C a 13000 rpm durante 10 minutos.
5. Transferir el sobrenadante a nuevos tubos eppendorf de 1.5mL rotulados como PD (*GST Pull Down*).
6. Transferir 30µL de los tubos PD a otra serie de tubos rotulados como LT (lisado total o *input*). Mantener sobre hielo la serie LT.
7. Agregar 30µL de Glutación-Sefarosa 4B a los tubos PD. La sefarosa se debe resuspender muy bien antes de tomarla y es recomendable utilizar puntas recortadas.

8. Agitar por 30 minutos a 4°C los tubos PD con Glutación-Sefarosa, mientras tanto agregar 100µL de buffer de muestra 1X a la serie de tubos LT, posteriormente, hervir los tubos durante 5 minutos para completar la desnaturalización de la muestra. Una vez concluido este paso los tubos LT pueden procesarse para SDS PAGE/Western Blot o bien se pueden almacenar a -20°C para procesarlos posteriormente.



- Proteína de fusión GST.
- Aislamiento de la proteína de fusión a GST junto con las interacciones presentes mediante una resina rica en glutatión.

Figura 9. Fundamento general del aislamiento de proteínas e interacciones por *GST Pull Down*.

9. Concluida la incubación con Glutación-Sefarosa, centrifugar a 4°C la serie PD durante 1min a 3,000 rpm.
10. Eliminar con cuidado el sobrenadante de la serie PD, para ello usar una punta conectada a un matraz y a la línea de vacío.
11. Lavar con 1mL de buffer utilizado en la lisis (Tritón o CHAPS, agitar en vortex rápidamente dos o tres veces por tubo.
12. Centrifugar 1 min 5,000 rpm 4°C.
13. Eliminar sobrenadante.
14. Repetir lavado el lavado 2 veces más.

15. Resuspender la resina en 50 o 60 μ L de buffer de muestra 1X y hervir los tubos durante 5 minutos.
16. Centrifugar durante 1 minuto a máxima velocidad a temperatura ambiente.
17. En este punto los *Pull Down* pueden ser procesados para SDS-PAGE/Western Blotting o bien almacenados a -20°C y procesarlos posteriormente.

2.8. SDS-PAGE/Western Blot

El procedimiento general de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS y detección de proteínas por Inmunoblot (Western Blot) (**Figura 10**) se describe a continuación:

1. Correr geles de poliacrilamida preparados al porcentaje adecuado dependiendo del peso de la proteína a evaluar (15 % para proteínas de menos de 30 kDa, 10 % para la mayoría, 7.5% para proteínas cercanas a 100 kDa y 6% para proteínas mayores a 100 kDa. En algunos casos puede ser preferible preparar geles bifásicos). Correr a 35 mAmp para minigeles y 50 mAmps si son maxigeles. Utilizar buffer de corrida SDS-PAGE 1X.
2. Realizar transferencia en membrana Immobilon (previamente activada en metanol al 100%) durante 2-3 horas de 320-350 mAmp, colocando la cámara de transferencia en un baño de hielo. Para proteínas de peso mayor a 100 kDa transferir durante 5 hrs a 350 mAmps. Utilizar buffer de transferencia estándar con pH 8.3.
3. Concluida la transferencia, bloquear la membrana con 5% de leche en TBS-Tween 0.05% durante una o dos horas a temperatura ambiente en agitación "rocking" o de "sube y baja", a una velocidad de 15 rpm.
4. Realizar una serie de lavados a la membrana con agua bidestilada hasta que ya no se observen restos de leche.
4. Realizar tres lavados con TBS-Tween 0.05% en agitación orbital. Cada lavado con una duración de cinco minutos a temperatura ambiente.

5. Adicionar el anticuerpo primario a la dilución recomendada (generalmente 1:5000 a 1:10000) en TBS-Tween 0.05% durante una hora a temperatura ambiente, ajustar la velocidad de agitación “sube y baja” a 30 rpm. Es importante cerciorarse que el anticuerpo cubra completamente la membrana. Transcurrido este tiempo descartar o recuperar el anticuerpo primario y realizar lavados a la membrana como se describen en los pasos 4 y 5.

9. Adicionar el anticuerpo secundario a la dilución recomendada (generalmente 1:20000 y 1:30000) en leche al 5% en TBS-Tween 0.05% durante 1 hora en agitación “sube y baja” a 30 rpm.

10. Realizar lavados como se describen en los pasos 4 y 5. Realizar un cuarto lavado de 5 minutos con agua miliQ y mantener la membrana en agua miliQ o bidestilada. En este punto la membrana esta lista para revelarse por el método de luminiscencia de Millipore “Inmobilon Western”.

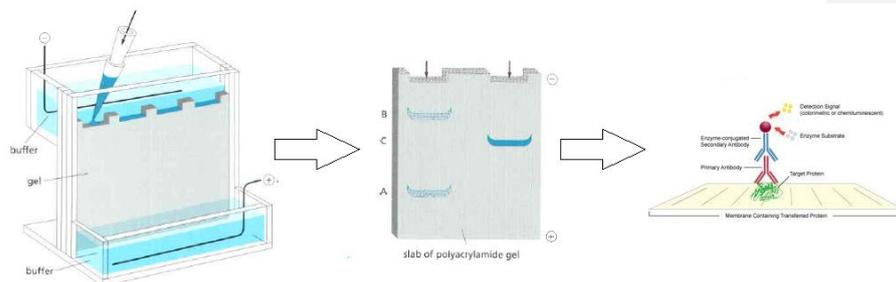


Figura 10. Procesamiento de muestras mediante SDS-PAGE/Western Blot.

2.9. Microscopia de Fluorescencia y ensayo de colocalización en condiciones de autofagia.

Para la evaluación de las construcciones de los dominios DEP1, DEP2, PDZ1, PDZ2 Y DEP2-PDZ1 de P-Rex1 fusionados a EGFP, las células HEK293T fueron sembradas en una placa de 6 pozos y transfectadas con las construcciones fluorescentes con los reactivos Lipofectamina/Plus de Invitrogen (Ver apartado Transfección). Las células fueron observadas 36 horas después de la transfección en el microscopio invertido acoplado a

fluorescencia y contraste por interferencia diferencial *Nikon ECLIPSE Ti*. Se tomó 1 fotografía de cada condición con el objetivo 10X en los canales campo claro y verde.

Células COS7 fueron sembradas en una caja petri de 10cm y transfectadas con las construcciones EGFP-C1-R1a y mCherry-Raptor de acuerdo al protocolo descrito anteriormente para los reactivos Lipofectamina/Plus (Ver apartado *Transfección*). Treinta y dos horas después de la transfección las células fueron tripsinizadas y resembradas (100µL por caja, para obtener células bien separadas) en dos cajas petri de 35mm con fondo de vidrio, previamente tratadas con gelatina estéril al 0.02% por 30 minutos a 37°C y lavadas con PBS 1X.

Las células se dejaron incubar durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente una de las cajas de células COS7 fue ayunada durante 1 hora con solución salina balanceada de Hanks para inducir autofagia, mientras que las células control se mantuvieron en medio completo. Posterior a la hora de incubación las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X y fijadas con paraformaldehido 4% durante 15 minutos. Las células fijadas fueron lavadas 3 veces con PBS 1X y mantenidas en PBS para su observación en el microscopio invertido acoplado a fluorescencia y contraste por interferencia diferencial *Nikon ECLIPSE Ti*.

Se tomaron 20 fotografías de cada condición con el objetivo 60X en los canales campo claro, verde y rojo.

3.1. Generación de construcciones de los dominios DEP1, DEP2, PDZ1, PDZ2 y DEP2-PDZ1 de P-Rex1 fusionadas a GST y EGFP.

Con el objetivo de caracterizar a detalle las interacciones que sostiene P-Rex1 con las cinasas mTOR y PKA, generamos construcciones de los dominios DEP1, DEP2, PDZ1, PDZ2 y DEP2-PDZ1 de P-Rex1, ya sea fusionados a GST para experimentos de *Pull Down* o bien a EGFP para experimentos de microscopia de fluorescencia.

En la **figura 11**, se puede observar que la amplificación del cDNA que codifica para los dominios de P-Rex1 fue exitosa (**Figura 11A**), obteniendo fragmentos de los pesos esperados (210pb para ambos dominios DEP y PDZ, y 500 para la región DEP2-PDZ1). También se puede observar que la purificación de los fragmentos amplificados y digeridos fue eficiente (**Figura 11B y C**).

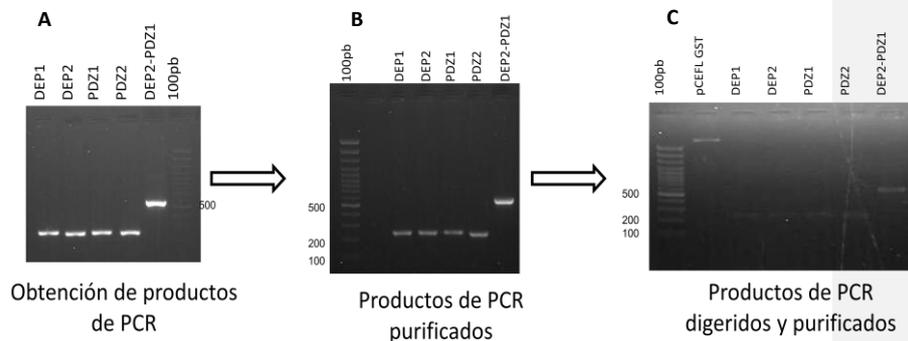


Figura 11. Obtención, purificación y digestión de los productos de PCR. A) Diagnóstico por electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos y que corresponden a fragmentos de los pesos esperados. B) Diagnóstico por electroforesis en gel de agarosa de la purificación por columna de los productos de PCR. C) Diagnóstico por electroforesis en gel de agarosa de la digestión con enzimas de restricción BamHI/EcoRI de los productos de PCR purificados DEP1, DEP2, PDZ1, PDZ2 y DEP2-PDZ1, que confirma la integridad de los fragmentos de interés.

Una vez confirmada la integridad del vector pCEFL-GST y de los productos de PCR correspondientes a la secuencia de cDNA de los diferentes dominios DEP y PDZ, una vez digeridos, estos fueron purificados exitosamente (**Figura 12A**) y sometidos a ligación. Transformamos bacterias ultracompetentes con los productos de ligación y picamos al menos dos colonias correspondientes a cada construcción. La digestión diagnóstica con las enzimas BamHI/EcoRI confirmó la liberación de fragmentos con pesos correspondientes al cDNA codificante para los dominios de P-Rex1 (**Figura 12B**).

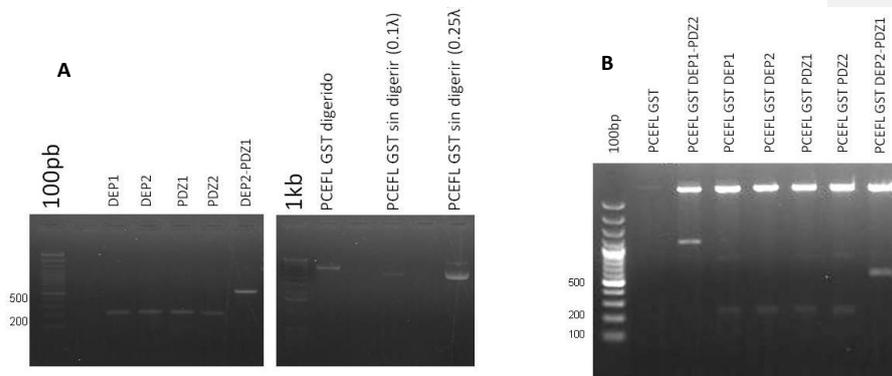


Figura 12. Obtención de construcciones pCEFL-GST-P-Rex1-DEP1, DEP2, PDZ1, PDZ2 y DEP2-PDZ1. A) Diagnóstico por electroforesis en gel de agarosa de la purificación por columna del vector pCEFL GST y los fragmentos de interés digeridos y preparados para ligación. B) Digestión diagnóstica (BamHI/EcoRI) de los plásmidos obtenidos a partir de las colonias generadas de la transformación de los productos de ligación en bacterias ultracompetentes. Los plásmidos obtenidos se sometieron a digestión diagnóstica con las enzimas BamHI/EcoRI y confirmaron las construcciones con la liberación de fragmentos con pesos correspondientes a los cDNAs codificantes para los dominios de P-Rex1.

Una vez confirmada la inserción de los fragmentos de interés al vector pCEFL GST, transfectamos células HEK293T con los plásmidos obtenidos y confirmamos por western blot, con anticuerpos ante GST, la calidad y expresión de las construcciones (**Figura 13**).

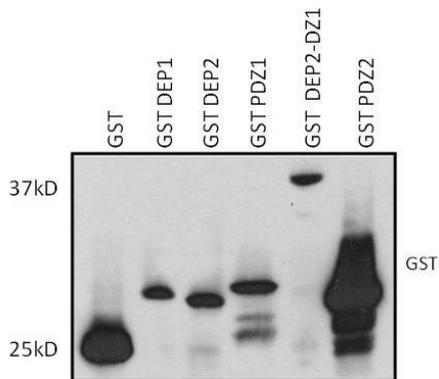


Figura 13. Expresión en células HEK293T de las construcciones pCEFL GST de los dominios DEP1, DEP2, PDZ1, PDZ2 y DEP2-PDZ1 de P-Rex1.

3.2. Subclonación del cDNA de los dominios DEP1, DEP2, PDZ1, PDZ2 y DEP2-PDZ de P-Rex1 del vector pCEFL GST a pCEFL EGFP.

A partir de las construcciones pCEFL GST que generamos, liberamos exitosamente, mediante digestión con las enzimas BamHI/EcoRI, los fragmentos de cDNA codificantes para los dominios DEP y PDZ de P-Rex1. En paralelo, realizamos la digestión del vector pCEFL EGFP con las mismas enzimas de restricción (**Figura 14A**). Posteriormente purificamos los fragmentos y vector digeridos (**Figura 14B**) y los sometimos a ligación. En una primera serie de purificación, el fragmento correspondiente a DEP1 tuvo un bajo rendimiento, por lo que se sometió a una nueva serie de liberación y purificación en la cual se obtuvo un mejor rendimiento (**Figura 14C**).

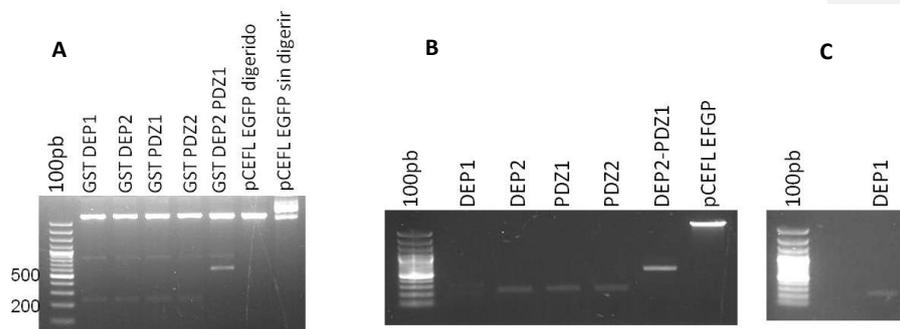


Figura 14. Liberación y purificación de fragmentos de cDNA codificantes para los dominios DEP y PDZ de P-Rex1 a partir de las construcciones pCEFL GST. A) Diagnóstico por electroforesis en gel de agarosa que confirma la liberación de los fragmentos de cDNA codificantes para los dominios de p-Rex1 del plásmido pCEFL GST. También se muestra la digestión exitosa del vector pCEFL EGFP después de la digestión con BamHI/EcoRI. B) Diagnóstico por electroforesis en gel de agarosa de la purificación del vector y los fragmentos digeridos, todas las purificaciones tuvieron un buen rendimiento a excepción de DEP1, para el cual se realizó una nueva digestión y purificación, cuyo diagnóstico se muestra en el panel C) con un mejor rendimiento.

Los fragmentos digeridos y purificados fueron sometidos a ligación con el vector pCEFL EGFP y los productos de ligación fueron transformados en bacterias ultracompetentes. Se picaron al menos dos de las colonias resultantes de cada transformación, las bacterias se crecieron en medio LB suplementado con ampicilina y se realizaron las minipreps correspondientes. Los plásmidos obtenidos se sometieron a digestión diagnóstica con las enzimas BamHI/EcoRI y se confirmó la inserción de los fragmentos al nuevo vector (**Figura 15**).

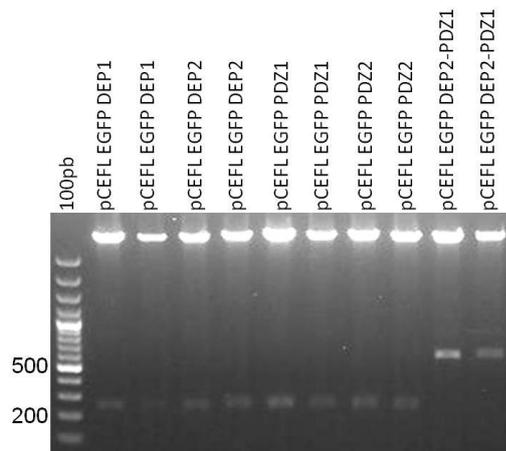


Figura 15. Digestión diagnóstica de las construcciones pCEFL EGFP, que confirman la inserción de los fragmentos de cDNA codificantes para los dominios de DEP y PDZ de P-Rex1 en el vector pCEFL EGFP.

Finalmente las construcciones obtenidas fueron transfectadas en células HEK293T. Las células fueron observadas 36 horas después de la transfección y en todas, a excepción de la construcción pCEFL EGFP-PDZ1 se confirmó fluorescencia para el canal de la proteína verde fluorescente (**Figura 16A**). A pesar de que la construcción del PDZ1 no

presentó fluorescencia cuando la observamos al microscopio, si fue sensible, al igual que todas las otras construcciones, al Western Blot contra GFP (**Figura 16B**).

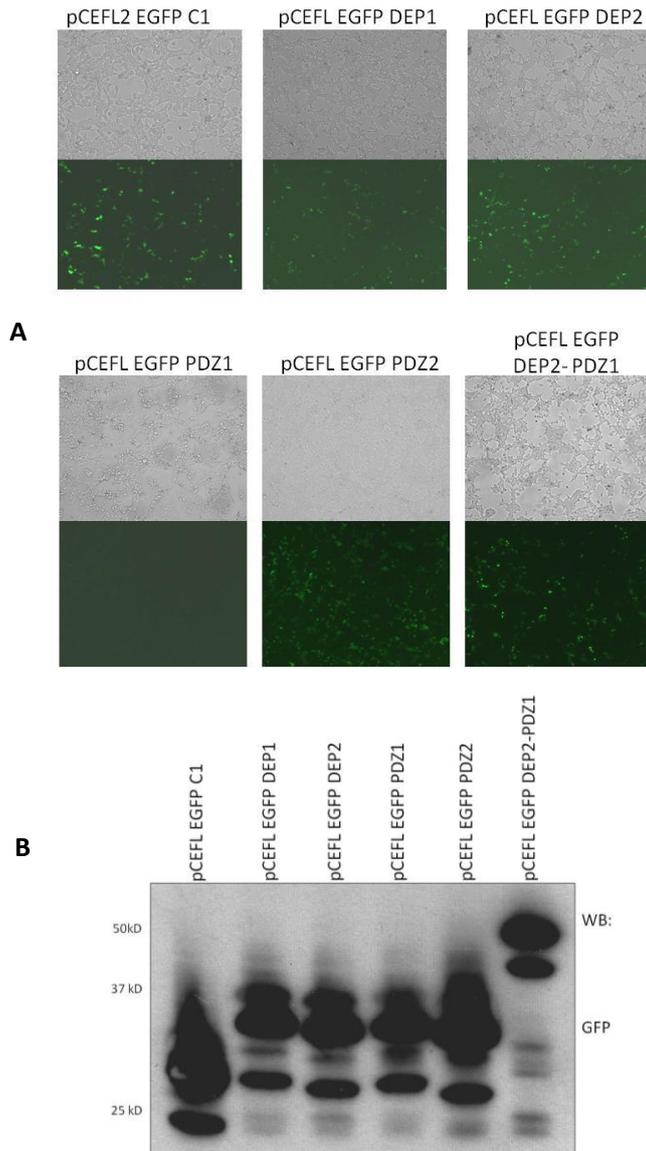


Figura 16. Expresión de las construcciones pCEFL EGFP de los dominios de P-Rex1. A) Fotografías de microscopía de fluorescencia que

demuestran la expresión de los dominios DEP y PDZ de P-Rex1 fusionados a la proteína verde fluorescente y que es confirmado en el panel B) donde se realiza un western blot contra GFP.

3.3. La región PDZ-PDZ de P-Rex1 interactúa con la subunidad catalítica alfa de PKA.

Con el propósito de conocer si la subunidad catalítica α de PKA era capaz de interactuar con los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1, expresamos en células HEK293T los dominios PDZ-PDZ fusionados a Glutación-S-Transferasa (GST-PDZ-PDZ) y la subunidad catalítica fusionada a la proteína verde fluorescente (EGFP-Cat α) para realizar ensayos de *Pull Down*. Encontramos que EGFP-Cat α fue capaz de interactuar de manera eficiente y específica con los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 (**Figura 17**), lo que indica que no sólo la subunidad reguladora de PKA puede interactuar con los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1, sino que la cinasa completa se asocia a este módulo del GEF. Estos resultados sugieren que P-Rex1 podría actuar como presentador de sustratos de PKA o bien, que la región que contempla los PDZ es el sitio de anclaje de PKA para posteriormente fosforilar y regular a P-Rex1.

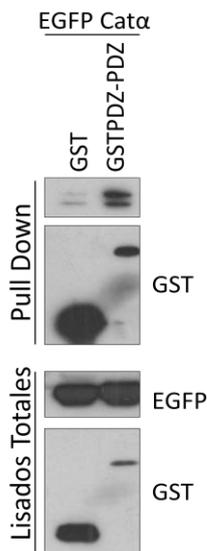


Figura 17. Los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 pueden interactuar con la subunidades reguladora y catalítica alfa de PKA en células HEK293T. *GST Pull Down* representativo donde se aíslan eficientemente los dominios PDZ-PDZ junto con los componentes de PKA. En los lisados totales se muestra la expresión equivalente de los componentes de PKA transfectados.

3.4. PKA se asocia a distintos dominios de P-Rex1.

Ensayos de Pull Down adicionales expresando en células HEK293T distintos dominios de P-Rex1 fusionados a GST y los componentes de PKA fusionados a los epítopes HA y EGFP, permitieron definir las regiones del GEF que participan en la interacción con la cinasa. La región PDZ-PDZ se asoció de manera efectiva tanto con la subunidad reguladora como con la catalítica mientras que las regiones que contemplan los dominios DH-PH y DEP-DEP también se asociaron, aunque en menor medida respecto a la región PDZ-PDZ, con las subunidades de la cinasa. La región carboxilo terminal de P-Rex1 se asoció con la subunidad catalítica pero no con la subunidad reguladora (**Figura 18**). Estos resultados sugieren que la región PDZ-PDZ de P-Rex1 es el principal módulo de interacción con PKA en su forma de holoenzima (tetrámero inactivo) y que la región carboxilo de P-Rex1 podría ser fosforilada por la subunidad catalítica de PKA.

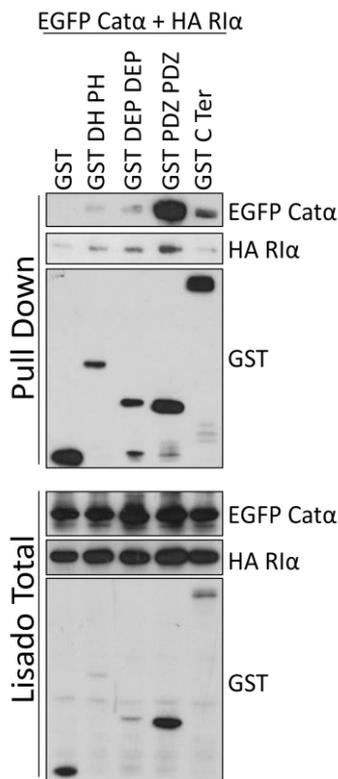


Figura 18. Las subunidades reguladora y catalítica alfa de PKA interactúan con distintas regiones de P-Rex1 células HEK293T. GST Pull Down representativo demostrando el aislamiento efectivo de las distintas construcciones de P-Rex1 junto con los componentes regulador y catalítico de PKA. En los lisados totales se muestra la expresión equivalente de los componentes de PKA transfectados.

Con la finalidad de obtener mayores detalles de la interacción de P-Rex1 con las cinasas PKA y mTORC2, generamos construcciones más pequeñas de P-Rex1 fusionadas a GST y EGFP, que contemplan de manera independiente los dominios DEP y PDZ (DEP1, DEP2, PDZ1 y PDZ2). Ensayos de *Pull Down* utilizando estas construcciones revelaron que el primer dominio DEP y ambos PDZ son las regiones más relevantes en la interacción con PKA, mientras que el segundo dominio DEP se asocia débilmente a los componentes de la cinasa (**Figura 19**).

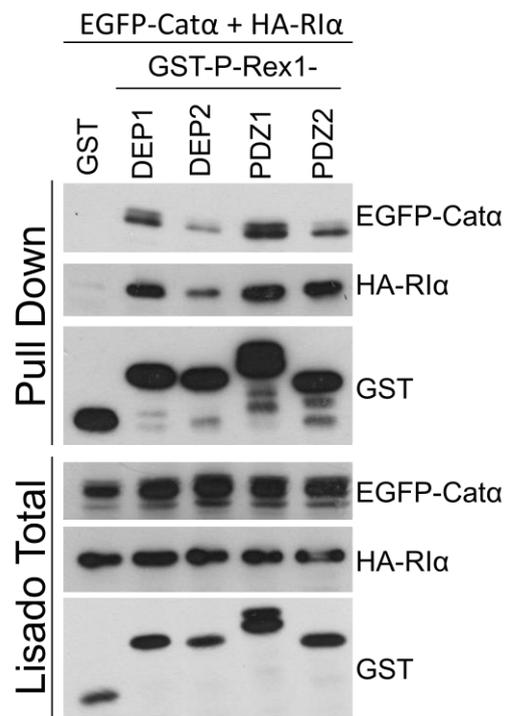


Figura 19. Mapeo de los principales dominios de interacción de P-Rex1 con los componentes regulador y catalítico alfa de PKA. Se muestra un GST Pull Down representativo donde se aísla de manera eficiente las diferentes construcciones GST de P-Rex1 junto con los componentes de PKA. Los lisados totales demuestran la expresión equivalente de las construcciones transfectadas en células HEK293T.

Experimentos adicionales (no se muestran) utilizando una construcción GST-DEP2-PDZ1 demuestran que posiblemente el dominio DEP2 reste capacidad de interacción con PKA al dominio PDZ1, ya que la interacción con PKA obtenida con la construcción GST-PDZ1 es mayor a la de la

GST-DEP2-PDZ1. Es posible especular, que quizás el segundo dominio DEP también reste capacidad de interacción al primer dominio DEP y que por esa razón no logramos detectar señal de interacción con PKA utilizando la construcción DEP-DEP. Esta evidencia permite especular que aunque el segundo dominio DEP de P-Rex1 no participa de manera directa en la interacción con los componentes de PKA, si podría ser susceptible a cambios conformacionales que impidan estéricamente la asociación de PKA con un módulo que contemplaría el primer dominio DEP y ambos PDZ.

3.5. La asociación PDZ-PDZ P-Rex1/PKA es sensible a estimulación con Suero Fetal Bovino.

Después de obtener detalles moleculares de la interacción P-Rex1/PKA, estábamos interesados en conocer si esta interacción era sensible a estímulos que regulan la migración celular. Utilizando Suero Fetal Bovino (SFB) como estímulo, decidimos evaluar la interacción de PKA con los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1, que previamente definimos como el principal módulo de interacción con los componentes reguladores y catalíticos de la cinasa. Expresando los componentes de interacción en células HEK293T ayunadas por 12 horas, se probaron 7 tiempos de estimulación con 10% de SFB para realizar ensayos de GST *Pull Down*. Los resultados obtenidos demuestran que la asociación de los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 y PKA es de tipo dinámica y que consta de una fase de refuerzo en la interacción y otra de disociación (**Figura 20A y B**). Estos hallazgos permiten especular que los dominios PDZ-PDZ podrían ser receptivos a estímulos extracelulares, quizás mediante la interacción con algunos receptores o proteínas señalizantes, que le permitieran asociarse de manera transitoria a PKA y posteriormente liberar a la cinasa en algún compartimento efector o bien en presencia de una población particular de sustratos.

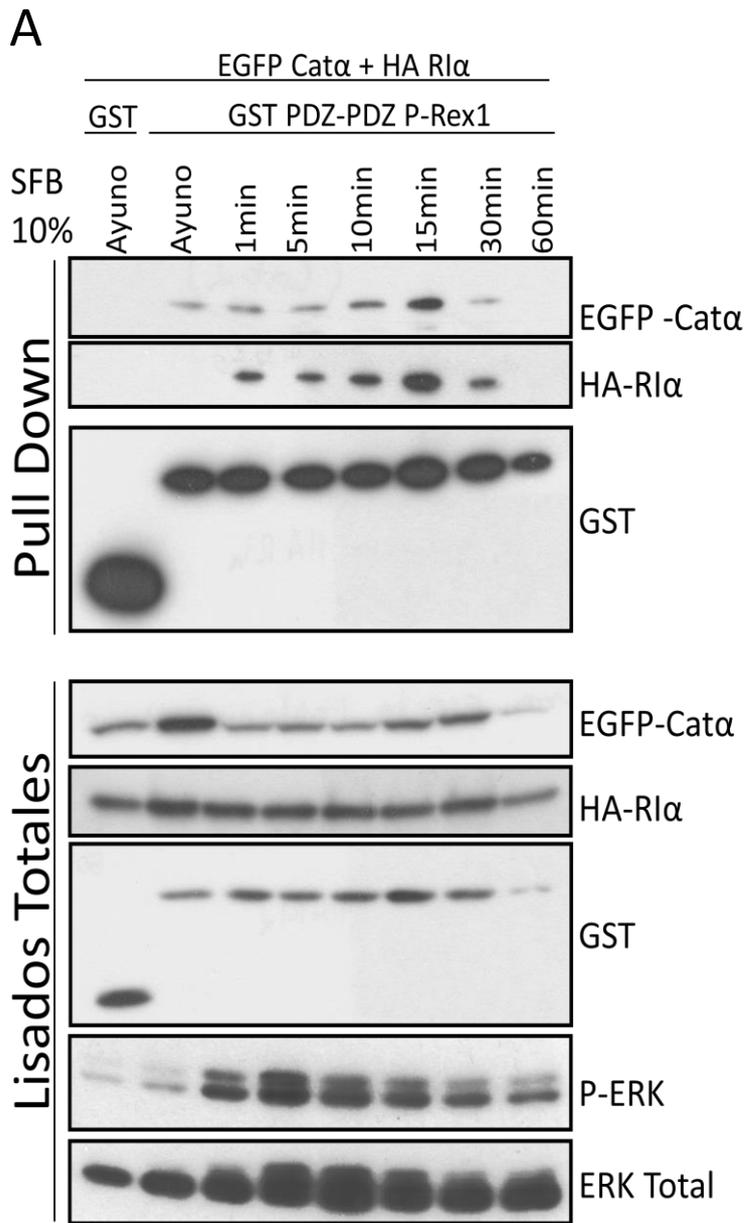


Figura y pie de figura continúan en la siguiente página.

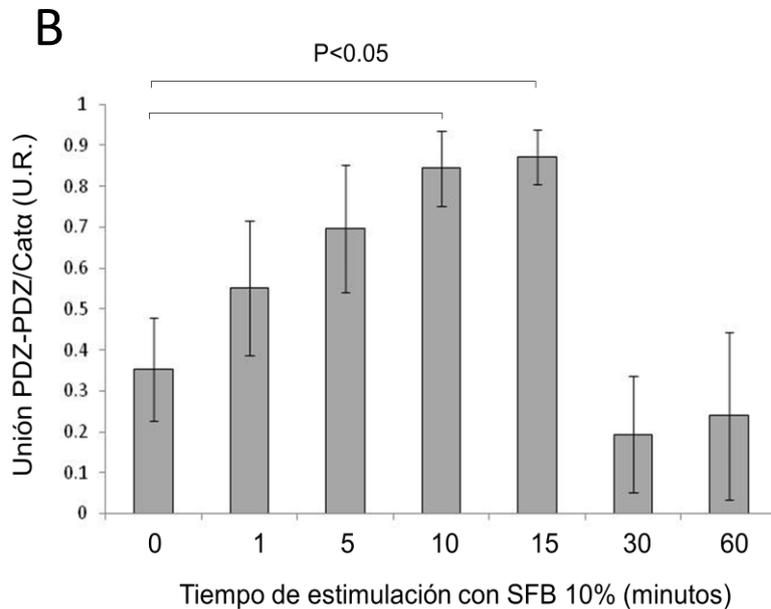


Figura 20. Dinámica de interacción de los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 y los componentes regulador y catalítico de PKA frente a un curso temporal de estimulación con Suero Fetal Bovino. A) GST Pull Down y Western Blot representativo de la dinámica de interacción. Los lisados totales demuestran la expresión equivalente de las construcciones transfectadas y el Blot contra P-ERK y ERK total se usaron como controles de la eficiencia del estímulo. B) Representación gráfica de tres experimentos independientes de la dinámica de interacción PDZ-PDZ P-Rex1/PKA. Se muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) en la prueba estadística *t* de student.

3.6. P-Rex1 es fosforilado por PKA en el primer dominio DEP.

Con el propósito de investigar si P-Rex1 podía acarrear sustratos de PKA o bien favorecer la fosforilación de una población particular de sustratos de esta cinasa, llevamos a cabo experimentos de *Pull Down* donde expresamos en células HEK293T distintos dominios de P-Rex1 (DH-PH, DEP-DEP, PDZ-PDZ y Carboxilo terminal) fusionados a GST así como los componentes regulador y catalítico de PKA con epítopes HA y EGFP, respectivamente. Los *Pull Down* y lisados totales fueron procesados para la inmunodetección con anticuerpos que reconocen serinas o treoninas fosforiladas en el marco de la secuencia consenso de PKA (RXXpS/T, anti-PKAS).

No encontramos efecto visible con respecto al control (GST) en lisados totales en la fosforilación de los sustratos de PKA al sobreexpresar la construcción GST-PDZ-PDZ (**Figura 21**), en la cual esperábamos algún cambio en el perfil de las bandas sensibles al anticuerpo en condiciones donde sobreexpresábamos la principal región de interacción de P-Rex1 con PKA, esperando disminución de bandas por efecto de competencia o bien aumento de bandas por efecto de presentación de sustratos.

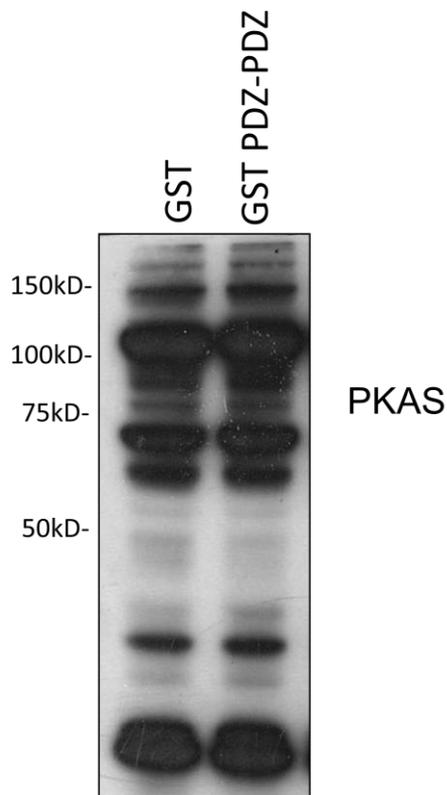


Figura 21. La sobreexpresión en células HEK293T de los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 no altera el perfil de la fosforilación de sustratos de PKA. Western Blot representativo del efecto nulo de la fosforilación de sustratos de PKA por sobreexpresión de los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1. PKAS: PKA Substrates.

Tampoco encontramos efecto visible en el bandeo contra PKAS en los lisados totales, al expresar los otros dominios de P-Rex1. No obstante, en los *Pull Down*, en el carril correspondiente a los dominios DEP-DEP, encontramos una señal del anticuerpo contra PKAS (RXXpS/T) que correspondía al peso de la construcción GST-DEP-DEP (**Figura 22**), mientras que en los otros *Pull Down* no encontramos esta señal.

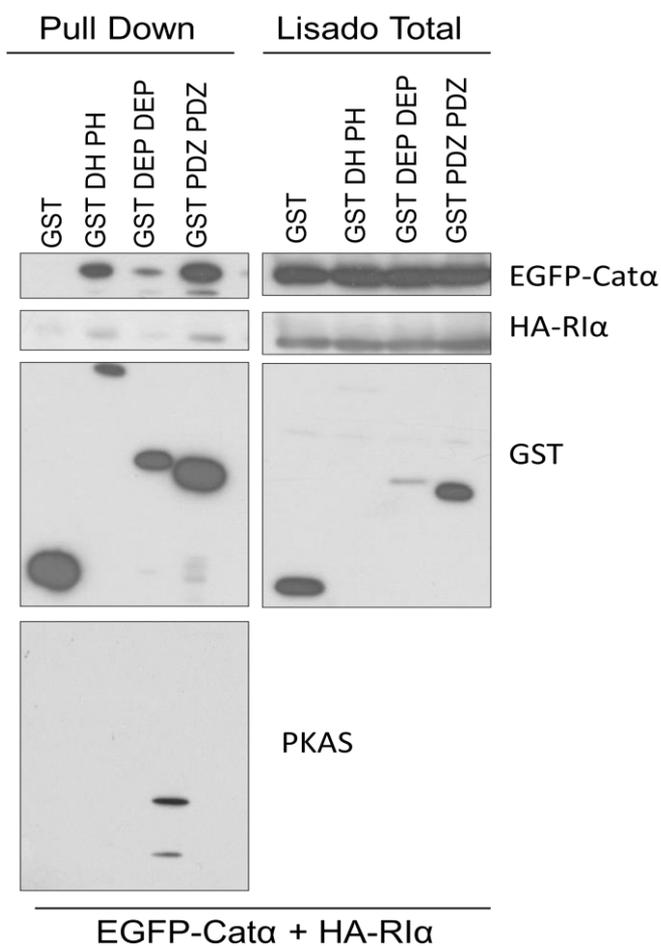


Figura 22. La construcción para Pull Down de P-Rex1, GST-DEP-DEP, genera una señal de fosforilación. *GST Pull Down* y Western Blot representativo de un mapeo de asociación de fosfostratos de PKA donde se demuestra una banda correspondiente a la construcción GST-DEP-DEP cuando el blot se realiza utilizando el anticuerpo contra PKAS.

Este resultado indicaba que probablemente la región DEP-DEP de P-Rex1 contenía un sitio de fosforilación por PKA. Para corroborar esta hipótesis, realizamos un análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de P-Rex1 con la plataforma *ScanSite* (<http://scansite.mit.edu/>) en la búsqueda de sitios consenso para PKA. Un análisis de exigencia intermedia, reveló 4 sitios potenciales de fosforilación por PKA, uno de

ellos ubicado en el primer dominio DEP del GEF, en la serina 436 (**Figura 23**).

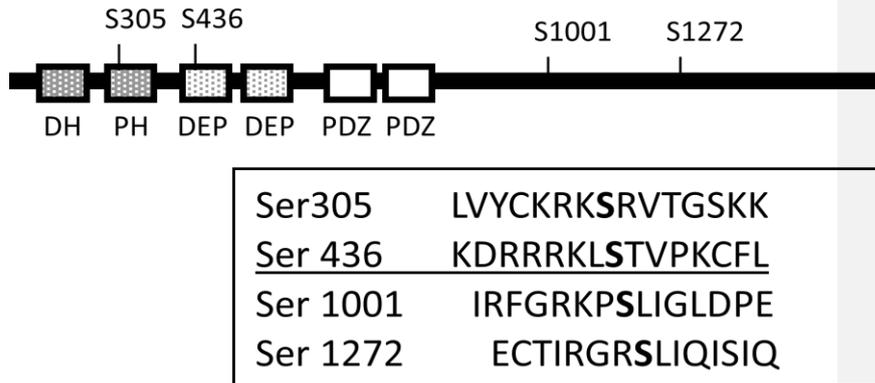
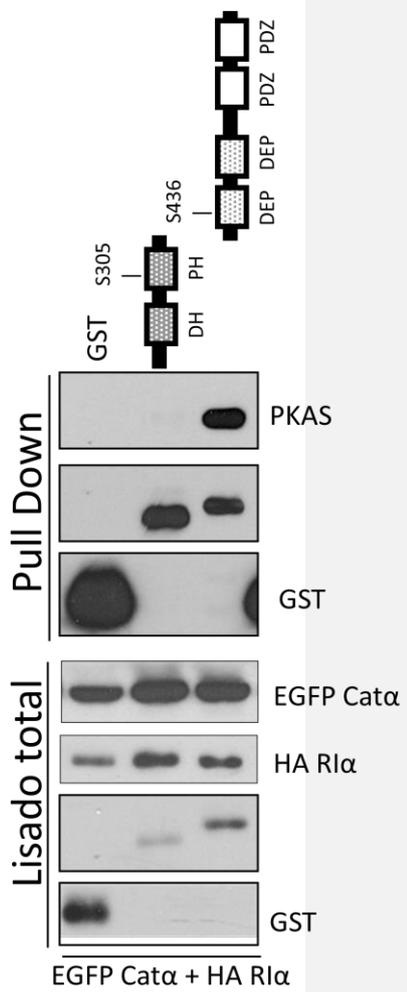
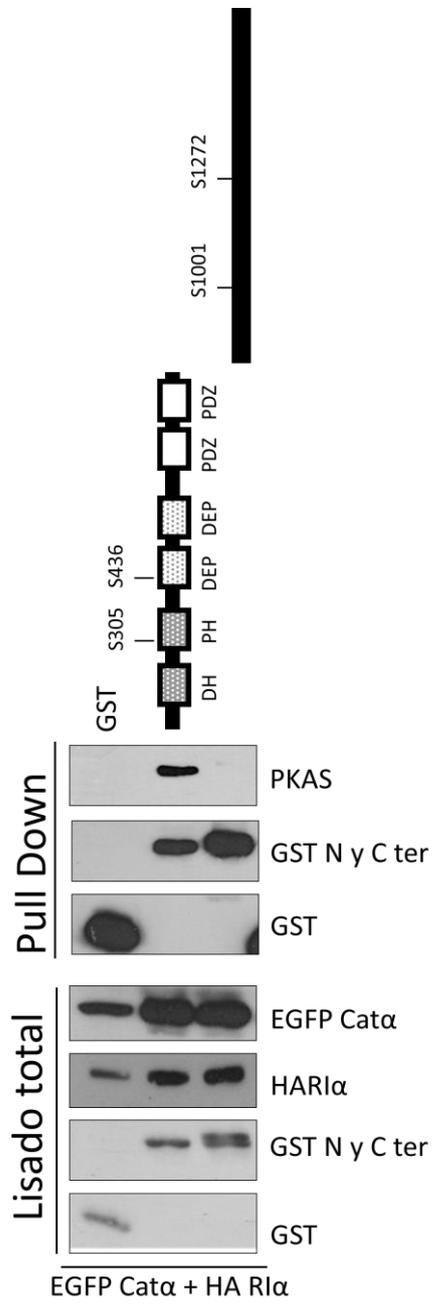


Figura 23. Sitios putativos de fosforilación por PKA en P-Rex1 determinados por la plataforma *Scansite*. Representación modular de P-Rex1 mostrando los distintos residuos potenciales a fosforilación por PKA y su ubicación dentro de la arquitectura modular de P-Rex1.

Con el interés de corroborar el sitio de fosforilación por PKA en P-Rex1, realizamos experimentos de mapeo por *GST Pull Down* de distintas regiones del RacGEF e inmunodetección del consenso RXXpS/T. Todas las construcciones que contenían el primer dominio DEP fueron susceptibles a detección con el anticuerpo contra los fosfosustratos de PKA (**Figura 24 y 25**), mientras que las construcciones que tenían ausente el primer dominio no presentaban señal de fosforilación.

Figura 24. La señal de fosforilación por PKA de P-Rex1 proviene del módulo DEP-PDZ en la región aminoterminal. A) Mapeo de fosforilación por *GST Pull Down* y detección con anticuerpos contra fosfosustratos de PKA, utilizando la región amino y carboxilo terminal de P-Rex1. La región amino terminal genera una señal de fosforilación mientras que la región carboxilo no lo hace. B) Mapeo de fosforilación por *GST Pull Down* y detección con anticuerpos contra fosfosustratos de PKA, utilizando el módulo DH-PH y DEP-PDZ de P-Rex1. El módulo DEP-PDZ genera una señal de fosforilación mientras que el módulo DH-PH no lo hace.

La figura se muestra en la siguiente página.



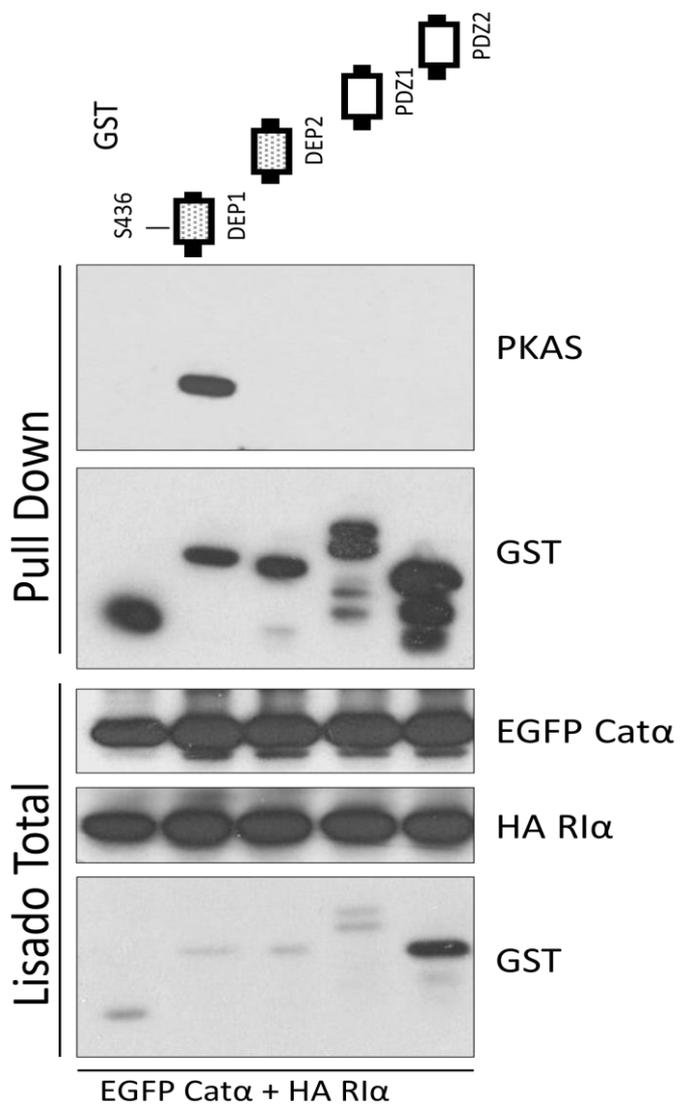


Figura 25. La señal de fosforilación por PKA de P-Rex1 proviene del primer dominio DEP. Mapeo de fosforilación por GST Pull Down y detección con anticuerpos contra fosfosustratos de PKA utilizando construcciones de los dominios que componen el módulo DEP-PDZ expresadas en células HEK293T. El primer dominio DEP genera una señal de fosforilación mientras que el segundo dominio DEP y ambos PDZ no lo hacen.

Para comprobar si la señal de fosforilación en el primer dominio DEP era sensible a la expresión de PKA, realizamos ensayos en los cuales expresamos la región DEP-DEP fusionada a GST en células HEK293T sometidas a distintas condiciones de estimulación celular (Ayuno, Medio completo, Ayuno + 30 minutos de estímulo con 10% de SFB) con y sin sobreexpresión de PKA (HA-R1 α y EGFP-Cat α). Las condiciones de ayuno y ayuno mas estimulación con SFB resultaron ser las mejores para observar la fosforilación de la región DEP-DEP cuando no se sobreexpresa a PKA, en comparación con la condición de medio completo (SFB 10% todo el tiempo) (**Figura 26**). La sobreexpresión de PKA incrementó la señal de fosforilación de la región DEP-DEP en todas las condiciones de estimulación celular, indicando que la fosforilación detectada en esa región del GEF en efecto es ocasionada por PKA.

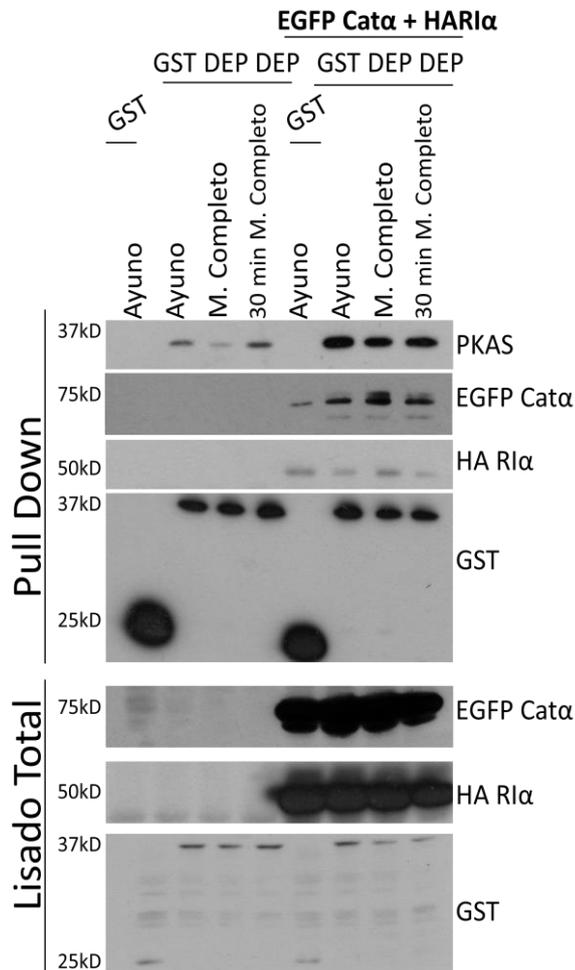


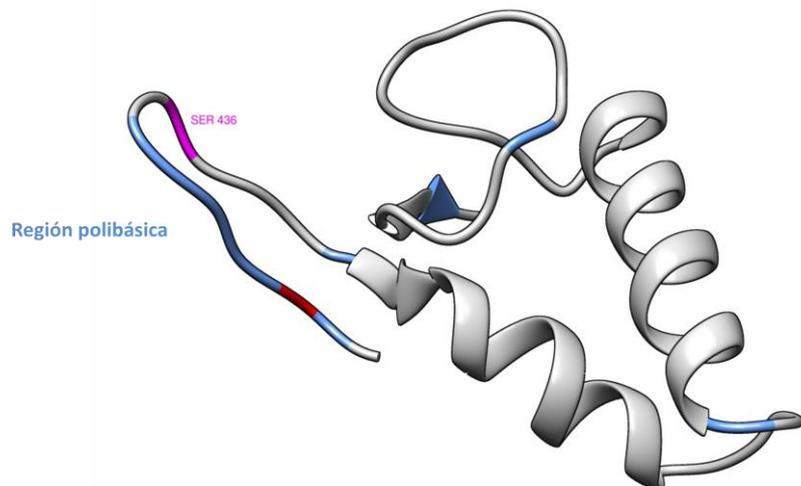
Figura 26. La señal de fosforilación de los dominios DEP-DEP de P-Rex1 se incrementa al sobreexpresar PKA en distintas condiciones de estimulación celular. GST Pull Downs de los dominios DEP-DEP en condiciones de ayuno de 12 horas, medio completo y ayuno de 12 horas seguido de 30 minutos de estimulación con medio completo, en presencia o ausencia de la sobreexpresión de los componentes regulador y catalítico alfa de PKA. La sobreexpresión de PKA incrementa la señal de fosforilación de los dominios DEP-DEP independientemente de las condiciones de estimulación celular.

3.7. El primer dominio DEP de P-Rex1 posee características de interacción con fosfolípidos de membrana.

Los dominios DEP son regiones de interacción con otras proteínas y algunos fosfolípidos de membrana. Estos dominios poseen una arquitectura conservada que consta de un núcleo de tres α hélices (H). Generalmente, las hélices H1 y H2 están separadas por una horquilla tipo β y la hélice H3 está seguida por 2 hojas β . Caracterizaciones estructurales detalladas han sugerido que la arquitectura de triple hélice forma un núcleo hidrofóbico donde algunos residuos clave estabilizan múltiples interacciones hidrofóbicas y es generalmente aceptado que la hélice H1 es el sitio de interacción del dominio DEP con otras proteínas. La resolución de estructuras, por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), de dominios DEP de distintas proteínas “Disheveled” (proteínas señalizantes de la vía de Wnt) ha sugerido la existencia de un dipolo electrostático y de un cúmulo de aminoácidos básicos expuestos en la superficie del dominio, a esta última región se le atribuye la capacidad de interacción con fosfolípidos de membrana. Cabe destacar que estas dos regiones de interacción, tanto con proteínas como con fosfolípidos, se encuentran espacialmente separadas, por lo cual se sugiere que algunos dominios DEP podrían funcionar como adaptadores o puentes entre proteínas y compartimentos membranales (Wong, Mao et al. 2000).

El primer dominio DEP de P-Rex1 posee un tramo de aminoácidos polibásicos (K429, R431, R432, R433, K434, R440), lo que sugiere que este dominio puede contribuir a la localización de este RacGEF en ciertos compartimentos membranales, mediante la interacción con fosfolípidos de membrana.

Sometiendo la secuencia de aminoácidos de P-Rex1 a predicción de estructuras secundarias por homología mediante la plataforma *ModBase* de *Uniprot*, no encontramos el tramo polibásico del primer dominio DEP formando parte de una estructura secundaria, sino acomodado en una estructura desorganizada. De forma que no podemos usar el modelo para especular sobre la posible exposición de dicha región polibásica (Figura 27). No obstante, la predicción estructural indicaba que si el dominio DEP1 era capaz de interactuar con fosfolípidos de membrana, lo tendría que hacer exclusivamente a través de ese tramo de aminoácidos básicos en tándem, puesto que los demás residuos positivos (argininas o lisinas) se encuentran espacialmente alejados entre sí, evitando la existencia de cúmulos polibásicos.



IK**D**RRRRL**S**TVP**K**CFLGNEFVAWLLEIGEIS**K**TEEGVNLGQALLENGIIHHVSDKHQ**F**KNEQVMY**R**F

Figura 27. Modelo estructural del dominio DEP1 de P-Rex1. Fue obtenido en la plataforma *ModBase* de *Uniprot*, que generó tal modelo basado en su homología con estructuras de dominios DEP conocidos. Los aminoácidos polares con carga positiva se representan como tramos azules, el sitio de fosforilación por PKA se representa en el tramo magenta y el ácido aspártico que interrumpe la región polibásica se representa como el tramo rojo. Los demás aminoácidos se representan en gris. La secuencia de aminoácidos completa del primer dominio DEP de P-Rex1 se muestra debajo de la estructura. El dominio DEP1 fue definido de acuerdo a lo obtenido en la plataforma de predicción de dominios: *SMART* y va de los aminoácidos 429 a 495 en la secuencia primaria de P-Rex1.

Adicionalmente, sometimos la secuencia de aminoácidos de P-Rex1 a cálculos predictivos sobre la exposición de sus residuos en la superficie y encontramos que la mayoría de los aminoácidos que conforman el tramo polibásico se ubicaron como expuestos, a excepción de R431, para el cual los cálculos lo ubican como un residuo oculto (**Tabla 6**). Todos los residuos de la región polibásica fueron predichos con alta probabilidad de formar estructuras tipo bobina o espiral.

Tabla 6. Predicción de la posible estructura secundaria y exposición superficial de los residuos que forman parte de la región polibásica del primer dominio DEP de P-Rex1. La tabla fue obtenida mediante una plataforma que utiliza el sistema descrito por Petersen en 2009 (Petersen, Petersen et al. 2009).

Class assignment	Amino acid	Amino acid number	Relative Surface Accessibility (RSA)	Probability of Alpha-Helix	Probability of Beta-Strand	Probability for coil
Exposed	K	429	0.5	0.052	0.084	0.864
Exposed	D	430	0.545	0.018	0.047	0.925
Buried	R	431	0.272	0.018	0.088	0.893
Exposed	R	432	0.421	0.021	0.279	0.699
Exposed	R	433	0.326	0.021	0.279	0.699
Exposed	K	434	0.415	0.004	0.128	0.858
Exposed	L	435	0.327	0.019	0.141	0.840
Exposed	S	436	0.482	0.020	0.205	0.775

Los dominios DEP-DEP en tándem de P-Rex1, fusionados a EGFP, mostraron una localización celular perinuclear y en pequeños cúmulos redondos, que podrían ser compartimentos vesiculares, tal como se observa en las imágenes de microscopía de fluorescencia mostradas en la **Figura 28**. Estos resultados permiten especular que el primer dominio DEP de P-Rex1 provee al RacGEF de localización en membranas vesiculares, aspecto que podría ser relevante en el estudio de P-Rex1 involucrado en tráfico vesicular.

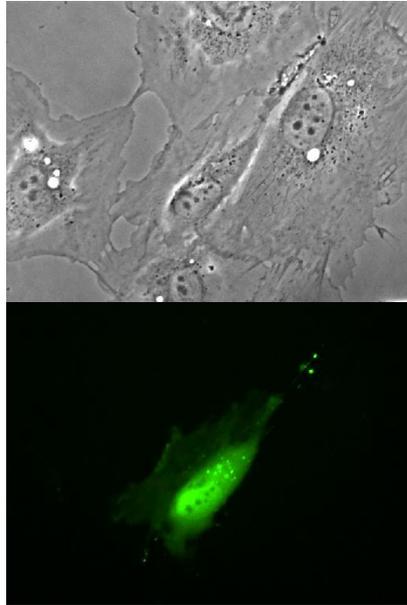


Figura 28. Los dominios DEP-DEP de P-Rex1 poseen una localización celular perinuclear y asociada a compartimentos vesiculares, además de que una fracción parece citosólica o asociada a la periferia celular. Células HUVEC transfectadas con la construcción EGFP-DEP-DEP fueron observadas por microscopía de campo claro (Fotografía de la izquierda) y microscopía de fluorescencia (Fotografía de la derecha).

3.8. La cinasa PKA podría regular la localización celular de P-Rex1 a través de su fosforilación en la serina 436.

Como se ha descrito anteriormente, la actividad de P-Rex1 es sensible a PKA, por lo tanto también es susceptible a cambios localizados en la concentración del segundo mensajero AMPc. Los GEFs específicos para las GTPasas Rap, conocidos como Epacs, son sensibles a AMPc, aunque no a través de PKA, sino por interacción directa. Es decir que al igual que la PKA, estos GEFs poseen dominios de unión a AMPc y sufren cambios conformacionales al unirse al nucleótido cíclico, permitiendo exponer sus regiones intercambiadoras de nucleótido y actuar sobre la GTPasa efectora. Recientemente se ha encontrado que la actividad del RapGEF Epac1 depende en gran medida de la integridad del tramo polibásico de su dominio DEP, el cual es expuesto cuando Epac1 sufre cambios conformacionales inducidos por la unión de AMPc. Mutaciones puntuales en el tramo polibásico de EPAC1 disminuyen su capacidad para interactuar con el ácido fosfatídico de la membrana plasmática.

Particularmente, la mutación R82A abate por completo la capacidad de Epac1 para unirse al ácido fosfatídico. Con base en la importancia del tramo polibásico del DEP en la localización celular de Epac1, decidimos realizar alineamientos entre las secuencias de aminoácidos del primer dominio DEP de P-Rex1 y el único dominio DEP de Epac1. El alineamiento demostró que ambos dominios DEP comparten una identidad del 36% y la región polibásica se conserva en ambos dominios DEP, sugiriendo que quizás también se conserve la función de interacción con fosfolípidos (**Figura 29**). Interesantemente, la arginina 82 del DEP de Epac1 (cuya sustitución por alanina abate la capacidad de Epac1 de localizar en membrana) alinea con la serina 436 del primer dominio DEP de P-Rex1. Estos hallazgos sugieren que la fosforilación del primer dominio DEP de P-Rex1, en la serina 436, podría regular la capacidad de P-Rex1 de asociarse a ciertos fosfolípidos de membrana, ya que la fosforilación que se encontraría en el marco del tramo polibásico interrumpiría las interacciones electrostáticas entre el dominio DEP de P-Rex1 y algunos fosfolípidos de membrana.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
38.1 bits(87)	2e-10	Compositional matrix adjust.	23/71(32%)	35/71(49%)	2/71(2%)
Query 4	NLIRD RKYH LRL YRQCCSGRELVDGILALGLGVHSRSQVVGICQVLLDEGALCHVKHDWA				63
Sbjct 4	NLIKDRRRK LSTV PKCFLGNEFVAWLL EIG-EISKTEEGVNLGQALLENGIIHHVSDKHQ				62
Query 64	FQDRDAQFYRF	74			
Sbjct 63	FKNEQV-MYRF	72			

Figura 29. La serina 436 de P-Rex1 alinea con la arginina 82 de Epac1. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del primer dominio DEP de P-Rex1 (Sbjct) y el único dominio DEP de Epac1 (Query).

3.9. El módulo DEP1-PDZ2 de P-Rex1 podría influenciar una segunda fosforilación por PKA en su región carboxilo terminal.

P-Rex1 establece interacciones intramoleculares entre su región amino (módulo DEP2-PDZ1) y carboxilo (Urano, Nakata et al. 2008). Esta conformación cerrada es considerada requisito para que el RacGEF sea sensible a activación por G $\beta\gamma$, se ha sugerido que dicha interacción se pierde por sobreexpresión de PKA, que aparentemente fosforila a P-Rex1 en una región que no ha sido mapeada (Urano, Nakata et al. 2008). En base a estos antecedentes, investigamos si los dominios amino (DEP1-

PDZ2) y carboxilo, expresados de forma independiente, establecen interacciones sensibles a fosforilación por PKA, bajo la hipótesis de que la fosforilación en DEP1 sería capaz de abatir esta interacción intermodular. Encontramos que la fosforilación en DEP1 no impide la asociación del módulo DEP1-PDZ2 con la región carboxilo terminal. No obstante, un doblete en la banda correspondiente al carboxilo (no observada en experimentos donde sólo se transfecta la región carboxilo y PKA), hace suponer que el carboxilo terminal de P-Rex1 también se fosforila, y que lo hace en dependencia a la asociación con los dominios de interacción con PKA (DEP1, PDZ1 y PDZ2) (**Figura 30**). Estos resultados podrían sugerir un modelo en el cual P-Rex1 integra más de una señal de fosforilación de PKA, siendo el RhoGEF el sustrato.

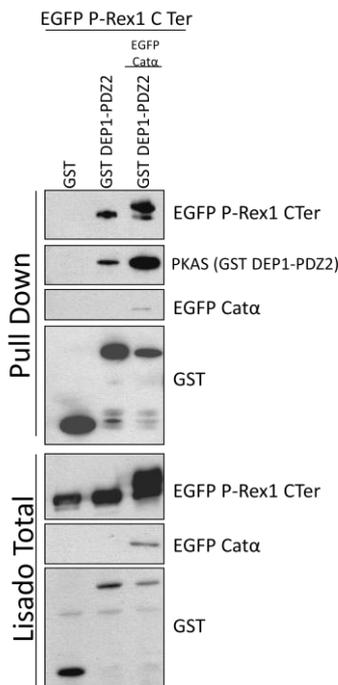


Figura 30. La fosforilación de P-Rex1 por PKA en el primer dominio DEP favorece un cambio en la región carboxilo terminal, reflejado por un corrimiento electroforético retrasado, lo que sugiere una posible fosforilación en la región carboxilo terminal, secuencial a la que ocurre en el dominio DEP1. Paralelo es requerida la asociación de la región amino con el carboxilo terminal.

3.10. El complejo mTORC2 se asocia a múltiples dominios de P-Rex1.

La cinasa mTOR regula la migración celular polarizada principalmente a través del complejo 2 (mTORC2). Hace algunos años, se descubrió en nuestro laboratorio que la región DEP-DEP de P-Rex1 es capaz de asociarse al dominio de cinasa de mTOR (Hernandez-Negrete, Carretero-Ortega et al. 2007). Con el objetivo de obtener detalles moleculares de la

interacción de P-Rex1 con mTORC2, realizamos ensayos de mapeo por *Pull Down* expresando en células HEK293T los dominios DEP-DEP, DEP1, DEP2, PDZ1 y PDZ2 de P-Rex1 fusionados a GST y el componente específico de mTORC2, Rictor, fusionado al epítotope Myc (Myc-Rictor). La proteína Myc-Rictor fue capaz de interactuar eficientemente con todos los dominios expresados de P-Rex1, a excepción del dominio DEP1, con el cual se obtuvo una interacción particularmente pobre (**Figura 31**).

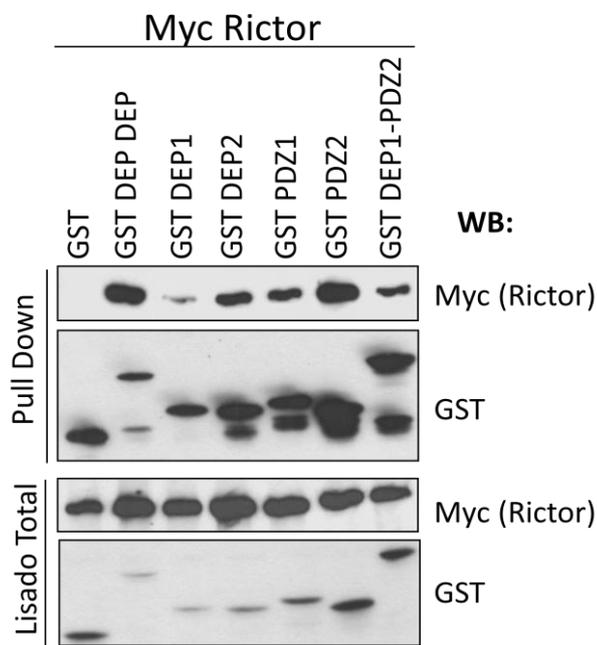


Figura 31. El complejo mTORC2 interactúa con distintos dominios de P-Rex1. GST Pull Down y Western Blot representativo de los mapeos de interacción entre los dominios que componen el módulo DEP-PDZ y el componente específico del complejo 2 de mTOR, Rictor a partir de lisados de células HEK293T. Todos los dominios a excepción del primer DEP, tienen una asociación eficiente con mTORC2.

3.11. La proteína Raptor (componente del complejo mTORC1) y la subunidad R1 α de la PKA colocalizan en compartimentos celulares perinucleares en condiciones que favorecen autofagia.

Existen reportes de que en condiciones de autofagia, donde mTOR se encuentra inhibido, la subunidad reguladora 1 α de PKA es capaz de interactuar con mTOR y colocalizar en autofagosomas (Mavrakis, Lippincott-Schwartz et al. 2006). Con la finalidad de determinar si es el complejo 1 de mTOR el que pudiera asociarse a la cinasa PKA en condiciones de autofagia, investigamos si la proteína Raptor, componente específico del complejo mTORC1, colocaliza con R1 α en células COS7 sometidas a ayuno. Para ello, realizamos experimentos de microscopia de fluorescencia, transfectando células COS7 con las construcciones fluorescentes mCherry-Raptor y EGFP-C1-R1 α . Las células fueron sometidas a ayuno, durante una hora, con solución salina balanceada de Hanks y se fijaron para su observación en el microscopio de fluorescencia. Encontramos una mayor tendencia a la colocalización de ambos componentes de las cinasas en compartimentos perinucleares en condiciones de ayuno (**Figura 32**).

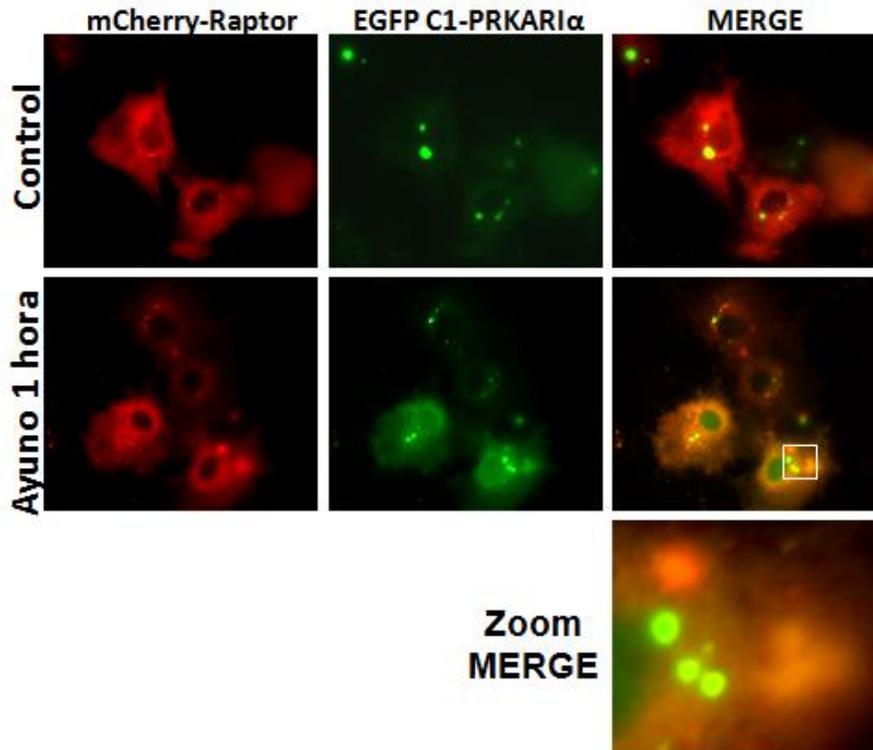


Figura 32. La proteína Raptor, componente específico del complejo mTORC1 y la subunidad reguladora de la PKA, R1 α , colocalizan en compartimentos perinucleares en condiciones que favorecen la autofagia en células COS7. Los análisis se hicieron a partir de la transfección de plásmidos que codifican para Raptor y R1 α fusionados a la proteína roja mCherry o bien a la proteína verde fluorescente, respectivamente.

El modelo de integración de las vías de PKA y mTOR, basado en nuestros resultados, sugiere que P-Rex1, a través de su región DEP-PDZ, sostiene interacciones con las cinasas mTORC2 y PKA. De forma tal que PKA, en condiciones que favorecen su actividad, puede fosforilar a P-Rex1 en su región amino, precisamente en la serina 436 ubicada en el primer dominio DEP, provocando cambios conformacionales y quizá favoreciendo otras modificaciones postraduccionales, como una segunda fosforilación sobre P-Rex1, que repercutirían en la capacidad de asociación de este GEF con la cinasa mTOR, a través de su módulo DEP-DEP y en la localización celular del RacGEF (**Figura 33**). Estos eventos de interacción y fosforilación podrían contribuir a la regulación espaciotemporal precisa de la GTPasa Rac durante la migración celular polarizada, ya que P-Rex1 sería una plataforma de andamiaje para sus propios moduladores, volviendo mucho más eficiente y matizada su regulación.

Sabemos, por estudios hechos en nuestro laboratorio, que el módulo DEP-DEP de P-Rex1 establece una interacción directa con el dominio de cinasa de mTOR (Hernandez-Negrete, Carretero-Ortega et al. 2007). Los resultados que aquí mostramos permiten una ubicación más detallada de tales interacciones, indicando que el segundo dominio DEP de P-Rex1 parece ser el mejor interactador para mTORC2 y que, adicionalmente al módulo DEP-DEP, los dominios PDZ-PDZ del GEF desempeñan un papel importante en la interacción de P-Rex1 con mTORC2. Aunque nuestros resultados no demuestran si la interacción entre mTORC2 y ambos dominios PDZ es de tipo directa, sí es posible especular que mTOR, al ser una proteína multimodular y compleja como lo es P-Rex1, pudiera poseer varios sitios de anclaje en el GEF. Esto permitiría una regulación alostérica recíproca. Recientemente se ha resuelto la estructura de la región carboxilo terminal de mTOR, y se ha especulado que el dominio de cinasa, que está sumergido entre los dominios FAT, FATC y FRBD, podría requerir regulación alostérica por parte de algunos interactores para exponer su dominio de cinasa y fosforilar a sus sustratos (Yang, Rudge et al. 2013). Nuestros resultados indican que mTORC2 dispone de al menos 3 dominios de interacción eficientes en P-Rex1 por lo que hipotetizamos que el RacGEF podría ejercer una regulación alostérica sobre la cinasa mTOR, modulando su actividad e incluso su especificidad por alguna población de sustratos.

La proteínas conocidas como AKAPs (*A kinase anchoring proteins*) controlan la localización de la proteína cinasa A, y por lo tanto la accesibilidad a determinados sustratos, a través de una interacción específica con sus subunidades reguladoras (Chen and Kass 2005). No

obstante, existen pocos antecedentes sobre interactores para PKA que no contengan el consenso de reconocimiento de las subunidades reguladoras que caracteriza a los AKAPs. Previamente identificamos, mediante el sistema de doble híbrido en levaduras, a P-Rex1 como un interactor para la subunidad reguladora 1 alfa de PKA. Esto abre la posibilidad de que P-Rex1 sea un AKAP, en cuyo caso sería verdaderamente novedoso, ya que la mayoría de AKAPs caracterizados hasta la fecha se asocian con la región amino de las subunidades reguladoras tipo II de la PKA, mientras que en este caso es el carboxilo de la subunidades reguladoras tipo I de PKA el que se asocia con P-Rex1. Para avanzar en la exploración de la hipótesis de que P-Rex1 pudiera ser un AKAP, a raíz de reconocer a la PKA a través de su subunidad reguladora tipo I, en este trabajo hemos caracterizado las regiones de unión más importantes entre este RacGEF y la PKA. A diferencia de los AKAPs, que poseen un solo consenso de reconocimiento y asociación para PKA, P-Rex1 parece tener al menos dos dominios de andamiaje relevantes para la asociación de la cinasa, siendo ambos dominios PDZ. Interesantemente, las subunidades reguladoras de la PKA poseen un motivo de reconocimiento para dominios PDZ, lo que sugiere que sea este pequeño motivo estructural, localizado en el extremo carboxilo de la subunidad reguladora tipo I, el que permita a tal subunidad reguladora reconocer a P-Rex1. Nuestros resultados sugieren que la PKA, en su forma de holoenzima, es decir, en su forma de tetrámero inactivo, puede asociarse de manera dinámica a P-Rex1 en su módulo PDZ-PDZ y que ambos dominios aportan capacidad de interacción. Con base a esto, es posible especular que quizás la estequiometría de la interacción sea de una molécula de P-Rex1 por un tetrámero de PKA, ya que éste consta de 2 subunidades reguladoras y 2 catalíticas. En este caso, cada subunidad reguladora reconocería y se asociaría a un PDZ del GEF.

Existen AKAPs que también funcionan como RhoGEFs, como es el caso de AKAP13, también conocido como el oncogen AKAP-Lbc, identificado en las vías de señalización que involucran a las MAPKs (Smith, Langeberg et al. 2010). Cabe destacar que AKAP13, al igual que P-Rex1, sufre fosforilaciones inhibitorias por parte de PKA, en este caso, la fosforilación promueve la formación de dímeros inactivos de AKAP13. Aunque no existe evidencia de que P-Rex1 forme homodímeros, es importante resaltar la capacidad que tienen algunas proteínas para formar dímeros a través de dominios PDZ, en el caso de P-Rex1, es particularmente interesante las características de su primer dominio PDZ, cuyos datos de cristalografía sugieren una homodimerización potencial de este dominio (Protein Data Bank ID: 3QIK).

El GEF P-Rex1 requiere de interacciones entre su región amino y carboxilo para ser susceptible a activación a través del dímero Gβγ y esta interacción intermodular es abatida por PKA (Urano, Nakata et al. 2008). En este trabajo hemos demostrado que PKA fosforila a P-Rex1 en la región amino, precisamente en el primer dominio DEP en la serina 436. Aunque nuestros datos no necesariamente indican que esta fosforilación sea de tipo inhibitoria, sí evidencian que la fosforilación de P-Rex1 en el primer dominio DEP no abate la interacción entre el módulo DEP-PDZ y la región carboxilo del GEF, en contraste a lo ya reportado. Si bien la fosforilación de P-Rex1 en el dominio DEP1 de la región amino no afectó la interacción entre ésta y la región carboxilo del GEF (expresadas como proteínas independientes), sí encontramos que la fosforilación en el primer dominio DEP parece tener un efecto sobre la región carboxilo de P-Rex1, que se ve reflejada como un retraso en el corrimiento electroforético del carboxilo, lo que hace pensar en la posibilidad de que pudiera tratarse de una fosforilación adicional. Lo que sugeriría una regulación secuencial del GEF por acción de la PKA. Puesto que el análisis *in silico* para ubicar posibles sitios de fosforilación en P-Rex1 indica que éste RacGEF posee al menos dos sitios de fosforilación por PKA en la región carboxilo, en conjunto con los resultados de mapeo de la fosforilación con anticuerpos anti-fosfosustrato, esto permite especular que P-Rex1 podría ser fosforilado de manera secuencial por PKA, y que la fosforilación de la región amino sea la señal para una segunda fosforilación en la región carboxilo. Algunos RhoGEFs, como es el caso de Syx, sufren fosforilaciones inhibitorias secuenciales en su región amino y carboxilo, lo que permite el reclutamiento de proteínas 14-3-3, que son proteínas especializadas en el reconocimiento de residuos de serina y treonina fosforilados y que en general tienen un efecto inhibitorio sobre su proteína blanco, impidiendo que se asocie a compartimentos o proteínas efectoras (Ngok, Geyer et al. 2013).

En este trabajo hemos demostrado la fosforilación de P-Rex1 en la región amino del GEF y hemos mapeado el sitio de fosforilación, siendo el primer dominio DEP en la serina 436, que se encuentra en un tramo polibásico, del cual, en casos similares, se sirven algunas proteínas a través de sus dominios DEP para interactuar con fosfolípidos de membrana. Tal es el caso de Epac1, un GEF para las GTPasas del grupo de Rap. Epac1 posee un dominio DEP que contiene un tramo polibásico que le permite interactuar con ácido fosfatídico producido en la membrana plásmática, por la fosfolipasa D. La mutación de la arginina 82 (que forma parte del tramo polibásico del DEP de Epac1) por una alanina, abate por completo la capacidad de interacción de Epac1 con ácido fosfatídico y por lo tanto la localización de este GEF en la membrana plasmática (Ponsioen, Gloerich et al. 2009; Consonni, Gloerich et al. 2012). Las secuencias del

primer DEP de P-Rex1 y el DEP de Epac1, al ser comparadas por un sistema de alineamiento, revelan que ambos DEP conservan el tramo polibásico y que la serina 436 de P-Rex1 alinea con la arginina 82 de Epac1. Por lo tanto, la fosforilación de P-Rex1 en la serina 436 aportaría una carga negativa que interrumpiría el tramo polibásico y quizás impediría las interacciones electrostáticas entre el dominio DEP y algunos fosfolípidos de membrana. Es relevante mencionar que los estímulos celulares que llevan a la producción de ácido fosfatídico en la membrana plasmática también conducen a la activación de mTOR, ya que esta cinasa es sensible a la presencia de este segundo mensajero lipídico (Consonni, Gloerich et al. 2012). Especulamos que P-Rex1, a través de su segundo dominio DEP y ambos PDZ, se une a los complejos de mTOR para reclutarlos a la membrana en dependencia de la actividad de la cinasa PI3K y la fosfolipasa PLD, considerando a P-Rex1 como un andamio sensible a los segundos mensajeros PIP3 (a través de su dominio PH) y ácido fosfatídico (a través del primer dominio DEP). Proponemos que este mecanismo de reclutamiento es potencialmente susceptible a inhibición a través de la fosforilación de P-Rex1 por PKA en la serina 436.

P-Rex1, como muchos otros RhoGEFs, es capaz de asociarse a la membrana plasmática a través de su dominio PH. No obstante, además P-Rex1 parece disponer de sus dominios DEP-DEP para establecer interacciones con compartimentos membranales, particularmente vesículas. Esta información, sumada a nuestros hallazgos relacionados con las características del primer DEP de P-Rex1 y la fosforilación por PKA, sugiere que el módulo DEP-PDZ del RacGEF podría ejercer, adicionalmente a su capacidad de andamio para mTOR y PKA, funciones importantes en la localización vesicular y quizás en la activación de Rac en estos compartimentos. Interesantemente, esto sería afectado por cascadas de transducción de señales acopladas a la generación de segundos mensajeros lipídicos, como el PIP3 y el ácido fosfatídico. Cabe mencionar que, de acuerdo a nuestros hallazgos, la proteína Raptor, componente esencial del complejo mTORC1, y la subunidad RI α , reguladora de la cinasa PKA, pueden localizarse de forma simultánea en compartimentos similares a aquellos en los que encontramos a los dominios DEP-DEP de P-Rex1, sugiriendo que algunos compartimentos de carácter vesicular pudieran actuar como sitio de convergencia para la señalización de P-Rex1, mTORC1 y PKA.

Para elucidar el mecanismo y papel regulador de PKA sobre P-Rex1, que resulta de la fosforilación que esta cinasa efectúa sobre el dominio DEP1, la posible regulación en cascada mediante subsecuentes fosforilaciones en la región carboxilo, así como las consecuencias en la capacidad

catalítica de P-Rex1 sobre Rac y su potencial regulador sobre la cinasa mTOR, se abre la perspectiva para realizar experimentos adicionales que involucren construcciones de P-Rex1 mutadas en la serina 436, substituyéndola por alanina (resistente a fosforilación) y ácido aspártico (fosforilación mimetizada). La especulación es que tales mutantes afectarán la integración de las señales de mTOR y PKA a nivel de P-Rex1 así como la dinámica celular de este GEF y su control del movimiento celular mediado por su capacidad para activar a Rac en respuesta a estímulos quimiotácticos.

Este trabajo ha aportado información novedosa y relevante sobre las interacciones que el RacGEF P-Rex1 sostiene con las cinasas mTOR y PKA. Nuestros resultados permiten trazar un mecanismo hipotético por el cual P-Rex1 sería inhibido como consecuencia de su fosforilación por PKA, en el primer dominio DEP del GEF, repercutiendo en su localización celular, actividad sobre Rac y movimiento quimiotáctico. De acuerdo a resultados previos de nuestro laboratorio, en los que se demostró que P-Rex1 juega un papel relevante en el proceso de angiogénesis estimulado por los receptores CXCR4, acoplados a proteínas G (Carretero-Ortega, Walsh et al. 2010), los nuevos hallazgos aquí presentados sugieren que tales efectos angiogénicos pudieran ser regulados por la activación de las cinasas PKA y mTOR, teniendo como base sus interacciones con P-Rex1 y las modificaciones postraduccionales a que este GEF es sometido como consecuencia de tales interacciones.

5. CONCLUSIONES

- El GEF P-Rex1, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina que activa a la GTPasa pequeña Rac en respuesta a señales quimiotácticas, interactúa con la cinasa PKA, en su forma de holoenzima, de manera dinámica y sensible a suero fetal bovino.
- El GEF P-Rex1 parece tener una función novedosa, tipo AKAP, de acuerdo a la interacción que establece con la cinasa PKA vía sus dominios DEP1, PDZ1 y PDZ2. En el caso de las interacciones con los dominios DEP, la subunidad catalítica de la PKA sería la responsable de reconocer a este dominio del GEF, en calidad de sustrato; en tanto que los dominios PDZ serían reconocidos por la subunidad reguladora, en calidad de sitios de anclaje, lo que sugiere
- La cinasa PKA regula al GEF P-Rex1, aparentemente, a través de un mecanismo de fosforilaciones secuenciales. Inicialmente, la PKA fosforila al GEF en el primer dominio DEP, en la serina 436 y, esta primera fosforilación estaría seguida de una segunda en la región carboxilo del GEF.
- El complejo mTORC2 posee múltiples sitios de interacción en P-Rex1, lo que indica una posible regulación alostérica de esta cinasa por el GEF.
- La subunidad reguladora de la PKA y el componente específico del complejo mTORC1, Raptor, coexisten en compartimentos celulares perinucleares en situaciones en que la célula es sometida a un estrés nutricional.

6. REFERENCIAS

- Balamatsias, D., A. M. Kong, et al. (2011). "Identification of P-Rex1 as a novel Rac1-guanine nucleotide exchange factor (GEF) that promotes actin remodeling and GLUT4 protein trafficking in adipocytes." J Biol Chem **286**(50): 43229-43240.
- Bos, J. L., H. Rehmann, et al. (2007). "GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins." Cell **129**(5): 865-877.
- Bracho-Valdes, I., P. Moreno-Alvarez, et al. (2011). "mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused." IUBMB Life **63**(10): 896-914.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2011). "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis." Nature **473**(7347): 298-307.
- Carretero-Ortega, J., C. T. Walsh, et al. (2010). "Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex-1), a guanine nucleotide exchange factor for Rac, mediates angiogenic responses to stromal cell-derived factor-1/chemokine stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL-12) linked to Rac activation, endothelial cell migration, and in vitro angiogenesis." Mol Pharmacol **77**(3): 435-442.
- Consonni, S. V., M. Gloerich, et al. (2012). "cAMP regulates DEP domain-mediated binding of the guanine nucleotide exchange factor Epac1 to phosphatidic acid at the plasma membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(10): 3814-3819.
- Cook, D. R., K. L. Rossman, et al. (2013). "Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease." Oncogene.
- Csepanyi-Komi, R., M. Levay, et al. (2012). "Small G proteins and their regulators in cellular signalling." Mol Cell Endocrinol **353**(1-2): 10-20.
- Chen, L. and R. S. Kass (2005). "A-kinase anchoring proteins: different partners, different dance." Nat Cell Biol **7**(11): 1050-1051.
- Hernandez-Negrete, I., J. Carretero-Ortega, et al. (2007). "P-Rex1 links mammalian target of rapamycin signaling to Rac activation and cell migration." J Biol Chem **282**(32): 23708-23715.
- Howe, A. K. (2004). "Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA." Biochim Biophys Acta **1692**(2-3): 159-174.
- Hynes, N. E. and H. A. Lane (2005). "ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors." Nat Rev Cancer **5**(5): 341-354.

- Kim, C., C. Y. Cheng, et al. (2007). "PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation." Cell **130**(6): 1032-1043.
- Kim, C., N. H. Xuong, et al. (2005). "Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIalpha) subunits of PKA." Science **307**(5710): 690-696.
- Kim, E. K., S. J. Yun, et al. (2011). "Selective activation of Akt1 by mammalian target of rapamycin complex 2 regulates cancer cell migration, invasion, and metastasis." Oncogene **30**(26): 2954-2963.
- Laudanna, C., J. J. Campbell, et al. (1997). "Elevation of intracellular cAMP inhibits RhoA activation and integrin-dependent leukocyte adhesion induced by chemoattractants." J Biol Chem **272**(39): 24141-24144.
- Ledezma-Sanchez, B. A., A. Garcia-Regalado, et al. (2010). "Sphingosine-1-phosphate receptor S1P1 is regulated by direct interactions with P-Rex1, a Rac guanine nucleotide exchange factor." Biochem Biophys Res Commun **391**(4): 1647-1652.
- Lemmon, M. A. and J. Schlessinger (2010). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **141**(7): 1117-1134.
- Mavrikis, M., J. Lippincott-Schwartz, et al. (2006). "Depletion of type IA regulatory subunit (RIalpha) of protein kinase A (PKA) in mammalian cells and tissues activates mTOR and causes autophagic deficiency." Hum Mol Genet **15**(19): 2962-2971.
- Mavrikis, M., J. Lippincott-Schwartz, et al. (2007). "mTOR kinase and the regulatory subunit of protein kinase A (PRKAR1A) spatially and functionally interact during autophagosome maturation." Autophagy **3**(2): 151-153.
- Mayeenuddin, L. H. and J. C. Garrison (2006). "Phosphorylation of P-Rex1 by the cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits the phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate and Gbetagamma-mediated regulation of its activity." J Biol Chem **281**(4): 1921-1928.
- Naing, A. (2013). "Overcoming resistance to mTOR inhibition for enhanced strategies in clinical trials." Expert Opin Investig Drugs **22**(6): 679-685.
- Ngok, S. P., R. Geyer, et al. (2013). "Phosphorylation-mediated 14-3-3 protein binding regulates the function of the rho-specific guanine nucleotide exchange factor (RhoGEF) Syx." J Biol Chem **288**(9): 6640-6650.
- O'Hayre, M., J. Vazquez-Prado, et al. (2013). "The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer." Nat Rev Cancer **13**(6): 412-424.

- Petersen, B., T. N. Petersen, et al. (2009). "A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions." BMC Struct Biol **9**: 51.
- Ponsioen, B., M. Gloerich, et al. (2009). "Direct spatial control of Epac1 by cyclic AMP." Mol Cell Biol **29**(10): 2521-2531.
- Rasmussen, S. G., B. T. DeVree, et al. (2011). "Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex." Nature **477**(7366): 549-555.
- Rosenbaum, D. M., S. G. Rasmussen, et al. (2009). "The structure and function of G-protein-coupled receptors." Nature **459**(7245): 356-363.
- Sabatini, D. M. (2006). "mTOR and cancer: insights into a complex relationship." Nat Rev Cancer **6**(9): 729-734.
- Smith, F. D., L. K. Langeberg, et al. (2010). "AKAP-Lbc enhances cyclic AMP control of the ERK1/2 cascade." Nat Cell Biol **12**(12): 1242-1249.
- Sosa, M. S., C. Lopez-Haber, et al. (2010). "Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an essential mediator of ErbB signaling in breast cancer." Mol Cell **40**(6): 877-892.
- Taylor, S. S., J. A. Buechler, et al. (1990). "cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes." Annu Rev Biochem **59**: 971-1005.
- Urano, D., A. Nakata, et al. (2008). "Domain-domain interaction of P-Rex1 is essential for the activation and inhibition by G protein betagamma subunits and PKA." Cell Signal **20**(8): 1545-1554.
- Villardaga, J. P., M. Bunemann, et al. (2009). "GPCR and G proteins: drug efficacy and activation in live cells." Mol Endocrinol **23**(5): 590-599.
- Weis, S. M. and D. A. Cheresh (2011). "Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets." Nat Med **17**(11): 1359-1370.
- Welch, H. C., W. J. Coadwell, et al. (2002). "P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac." Cell **108**(6): 809-821.
- Wong, H. C., J. Mao, et al. (2000). "Structural basis of the recognition of the dishevelled DEP domain in the Wnt signaling pathway." Nat Struct Biol **7**(12): 1178-1184.
- Wong, M. (2013). "A critical review of mTOR inhibitors and epilepsy: from basic science to clinical trials." Expert Rev Neurother **13**(6): 657-669.

Yang, H., D. G. Rudge, et al. (2013). "mTOR kinase structure, mechanism and regulation." Nature **497**(7448): 217-223.

Zetter, B. R. (1998). "Angiogenesis and tumor metastasis." Annu Rev Med **49**: 407-424.