



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“P-REX1 como plataforma de señalización y efector de la vía
Gβγ-PI3Kγ-mTORC1/2 relevante en migración celular”**

T E S I S

Que presenta

Q.F.B. YARELY MABELL BELTRÁN NAVARRO

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Director de la Tesis:

Dr. José Vázquez Prado

Ciudad de México

DICIEMBRE, 2018

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 35 del Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco. Con la dirección del Dr. José Vázquez Prado.

El desarrollo del trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con la beca No. 620575 y el Apoyo para Investigación Científica Básica No. 286274.

A mi familia

Agradecimientos

Al Dr. José Vázquez Prado por abrirme las puertas de su laboratorio, desde el inicio he contado con su apoyo y ha y sigue contribuyendo a mi formación profesional en lo académico y en ámbitos que van más allá de este. Gracias por su infinita disposición para solucionar cualquier duda que se me presentara y por su constante guía. Me siento muy orgullosa de formar parte del equipo del laboratorio 35.

A la Dra. Guadalupe Reyes Cruz y a la Dra. María del Carmen García García por sus invaluable sugerencias y consejos para el desarrollo de este proyecto de maestría.

A Sendi por enseñarme desde que me integré al laboratorio, por acompañarme a lo largo de este proceso, por tus sabios consejos y palabras de aliento.

A mis compañeros de laboratorio Daniel, Víctor, Irving, Alejandro, Raúl y Ricardo, encontré en ustedes seres geniales y agradezco nuestras pláticas académicas y de recreación. Admiro a cada uno, su dedicación y disposición para ayudar, sé que llegarán muy lejos en lo que se propongan.

A mis compañeros del laboratorio 19, Tania, Misael, Carlos, César, Lenis y Jorge, por su ayuda, interés y presencia en nuestros avances.

Gracias a Estanislao y David por siempre apoyarnos en nuestros proyectos, por su apoyo técnico y logístico para que el laboratorio funcione en las mejores condiciones. A Margarita y Jaime por su atención y ayuda en el laboratorio 19.

A mis compañeros de generación, Mónica, Victoria, Eduardo y José por compartir esta experiencia en paralelo y encontrar la forma de alentarnos unos a otros.

Gracias a mis padres Candelario y Maribel, a mis hermanos Carlos y Flor, ustedes son mi soporte y los amo. Siempre cuento con su apoyo y comprensión y ahora les puedo compartir un logro más en mi carrera.

Al resto de mi familia y amigos en Culiacán, Sinaloa que siempre me recuerdan y me envían las mejores vibras. Y a mi familia extendida en la Ciudad de México, Patricia y Jesús que me han acogido como una hija más, sepan que son correspondidos.

CONTENIDO

Índice de Figuras	vii
Resumen	viii
Abstract	ix
I. Introducción	10
1. Migración celular	10
2. GTPasas de la familia de Rho	13
3. RhoGEFs: factores intercambiadores de nucleótidos de guanina	16
4. P-REX1, un RacGEF	18
5. P-REX1, G $\beta\gamma$ y PI3K	19
6. G $\beta\gamma$ y PI3K	21
7. P-REX1, mTOR y G $\beta\gamma$	22
8. P-REX1 como plataforma quimiotáctica	24
II. Justificación	26
III. Hipótesis	27
IV. Objetivos	28
Objetivo General	28
Objetivos Específicos	28
V. Estrategia experimental	29
1. P-REX1 como plataforma para la interacción G $\beta\gamma$ -PI3K γ	29
2. P-REX1 como promotor de la actividad catalítica de PI3K γ y mTORC1/2	30
3. P-REX1 como efector de la vía G $\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC1/2	30

VI. Métodos	31
Líneas celulares	31
Plásmidos	31
Anticuerpos	31
Mapeo	32
Modelo endógeno en células MCF-7 y Ensayos de Activación de P-REX1.	37
<i>Knockdown</i> de P-REX1	39
Tratamiento crónico con Rapamicina	42
*Diluciones de anticuerpos	45
Construcción: GST-mLST8	46
VII. Resultados	53
Gβγ interactúa con P-REX1	53
PI3Kγ (p110γ) interactúa con P-REX1	54
La activación por SDF-1 de las vías PI3K-AKT-mTORC1/2 y ERK es dependiente del tiempo	55
Gβγ, AKT y Rictor (componente de mTORC2), interactúan con P-REX1 activo	56
P-REX1 funciona como plataforma para mTORC2	57
P-REX1 es un efector de mTORC2	59
Construcción GST-mLST8 como estrategia para aislar a los complejos mTORC1/2	60
VIII. Discusión	62
IX. Conclusiones	70
X. Perspectivas	71
XI. Referencias	72
Anexo	75

Índice de Figuras

Figura 1. Establecimiento de la polaridad intracelular en células que migran de forma individual y en grupo.	10
Figura 2. La migración celular exacerbada promueve la invasión y metástasis de células cancerosas.	11
Figura 3. Las señales extracelulares llevan al establecimiento de una polaridad intracelular.	12
Figura 4. Árbol filogenético de las GTPasas de la familia de Rho.	13
Figura 5. Regulación de las GTPasas de la familia de Rho.	14
Figura 6. La alteración de las GTPasas de la familia de Rho y la desregulación de sus controladores están asociados a cáncer.	15
Figura 7. Estructura multidominio de diferentes RhoGEFs.	17
Figura 8. P-REX1 está involucrado en la respuesta angiogénica provocada por SDF-1.	18
Figura 9. Estructura multidominio de P-REX1.	19
Figura 10. Modelo de activación de P-REX1 por $G\beta\gamma$ y PIP3.	20
Figura 11. Modelo de activación de P-REX1 por PIP3.	21
Figura 12. Modelo de reclutamiento y activación de la PI3K γ .	22
Figura 13. Activación de mTORC1, mTORC2 y sus consecuencias celulares.	23
Figura 14. P-REX1 es una plataforma quimiotáctica.	25
Figura 15. Modelo propuesto para el desempeño de P-REX1 como plataforma y efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC1/2.	27
Figura 16. Estrategia experimental para evaluar a P-REX1 como plataforma y efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC1/2.	29
Figura 17. Diagrama de flujo general para la generación de una construcción.	46
Figura 18. $G\beta_1\gamma_2$ interactúa en dos regiones de P-REX1.	53
Figura 19. La subunidad catalítica p110 γ de PI3K γ interactúa con el N terminal de P-REX1.	54
Figura 20. SDF-1 activa las vías de mTORC1, mTORC2 y ERK.	55
Figura 21. $G\beta\gamma$, Rictor y AKT pueden asociarse a la fracción activa de P-REX1.	56
Figura 22. P-REX1 es una plataforma responsable de reunir a $G\beta\gamma$, Rictor y AKT requerida para coordinar la señalización de mTORC2.	57
Figura 23. P-REX1 se localiza río abajo mTORC2.	59
Figura 24. Subclonación de mLST8 del vector pRK5-HA a pCEFL-GST.	60
Figura 25. Expresión de GST-mLST8 en células HEK-293T.	61

Resumen

P-REX1 integra señales quimiotácticas de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), como CXCR4, que a través de las proteínas heterotriméricas G_i liberan subunidades $G\beta\gamma$ que activan a PI3K, entre otros efectores. P-REX1, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) para la GTPasa Rac, puede ser activado independiente y sinérgicamente por $G\beta\gamma$ y fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), un segundo mensajero lipídico producido por las PI3K de clase I. Al modificar el citoesqueleto de actina, esta vía promueve migración celular. $G\beta\gamma$ parece estimular directamente a P-REX1 mediante interacción con el dominio catalítico DH, en tanto que el PIP3 interactúa con el dominio PH. Nuestro grupo ha demostrado que mTOR, una cinasa multifuncional organizada en dos complejos independientes, reconoce a los dominios DEP-DEP de P-REX1. Datos adicionales, no publicados, revelan interacciones potenciales de P-REX1 con PI3K y regiones adicionales de interacción con $G\beta\gamma$. Por consiguiente, postulamos que P-REX1 funciona como una plataforma de señalización y como efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K-mTORC1/2 involucrada en migración celular quimiotáctica.

Evaluamos esta hipótesis con el uso de diferentes construcciones de P-REX1 para caracterizar la base estructural por la cual este RacGEF multidominio ensambla complejos de señalización que incluyen a $G\beta\gamma$ y PI3K. En paralelo, aislamos la fracción activa de P-REX1 de células estimuladas con SDF-1, explorando la presencia de $G\beta\gamma$, Rictor y AKT como potenciales interactores de P-REX1. Por medio del *knockdown* de P-REX1 investigamos su papel en la integridad de estos complejos de señalización. Además, analizamos la fosforilación de sustratos de mTORC1 y mTORC2. Para evaluar el papel de P-Rex1 como efector de esta vía, utilizamos una estrategia de inhibición farmacológica de mTOR.

Nuestros resultados indican que las proteínas de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K-mTORC2-AKT interactúan con P-REX1 utilizando a este RacGEF multidominio como una plataforma de señalización y efector. Proponemos que este sistema regula la dinámica espacio-temporal del citoesqueleto de actina, controlando la migración celular.

Abstract

P-REX1 integrates chemotactic signals transduced by CXCR4 and other G-protein coupled receptors (GPCRs) via heterotrimeric G_i that releases $G\beta\gamma$ activating PI3K, among other effectors. P-REX1, a guanine nucleotide exchange factor (GEF) for the Rac GTPase, can be independently and synergistically activated by $G\beta\gamma$ and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3), a lipidic second messenger produced by class I PI3K. By modifying the actin cytoskeleton, this pathway promotes polarized cell migration. $G\beta\gamma$ seems to directly stimulate P-REX1-DH domain and PIP3 interacts with P-REX1-PH domain. Our group has demonstrated that mTOR, a multifunctional kinase organized in two independent complexes, interacts with P-REX1-DEP-DEP domains. Additional unpublished data revealed potential interactions of P-REX1 with PI3K and additional $G\beta\gamma$ -interaction regions. Therefore, we postulate that P-REX1 serves as a platform and signaling effector of the $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC1/2 pathway involved in chemotactic cell migration.

We assessed this hypothesis by using different P-REX1 constructs to characterize the structural basis by which this multidomain RacGEF assembles signaling complexes including $G\beta\gamma$ and PI3K. In parallel, we isolated the active fraction of P-REX1 from SDF-1 stimulated cells, exploring the presence of $G\beta\gamma$, Rictor and AKT as potential P-REX1 interactors, and addressing the phosphorylation of mTORC1 and mTORC2 substrates. In P-REX1 knockdown cells, we investigated the integrity of these signaling complexes and used pharmacological inhibition of mTOR to assess their regulation.

Our results indicate that proteins of the $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC2-AKT pathway interact with P-REX1 using this multidomain RacGEF as a plausible signaling platform and effector that regulates the spatiotemporal dynamics of the actin cytoskeleton, controlling cell migration.

Introducción

1. Migración celular

La migración celular es un proceso fisiológico necesario. Durante el desarrollo embrionario y la adultez las células migran, de manera individual o en grupo, para mantener la integridad tisular y la vigilancia inmunitaria, como en el cierre de heridas y la quimiotaxis de los neutrófilos¹. En estos procesos, el citoesqueleto de actina provee la fuerza motriz para generar protrusión al frente y contracción en la parte posterior a través de la polimerización y despolimerización de actina y la asociación con miosinas, respectivamente² (Fig. 1).

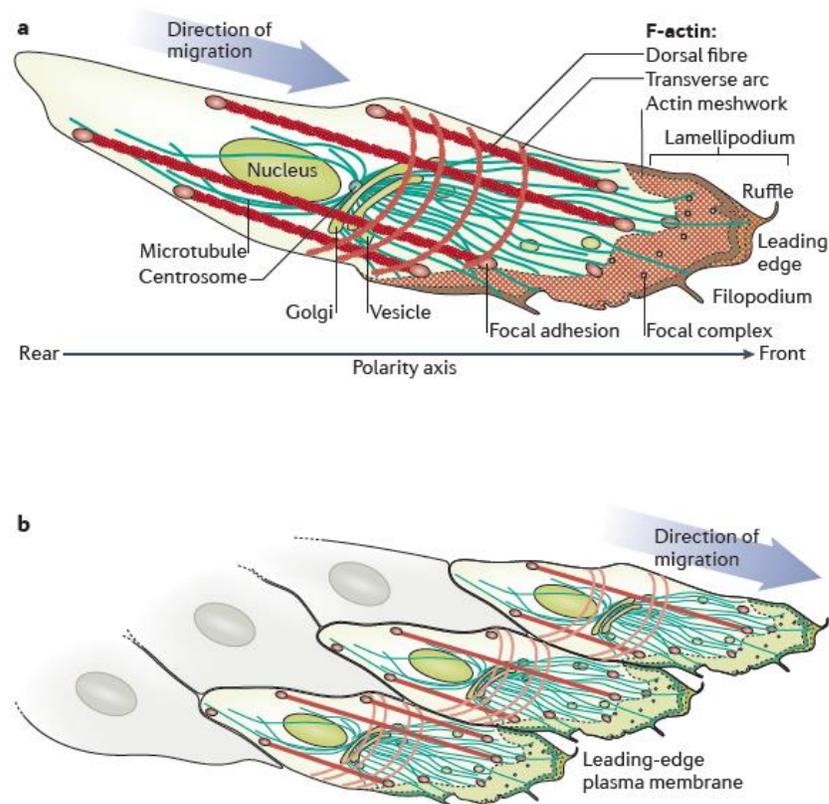


Figura 1. Establecimiento de la polaridad intracelular en células que migran de forma individual y en grupo. El arreglo del citoesqueleto de actina genera un frente de migración y contracción en la parte posterior. La polimerización de F-actina lanza a la(s) célula(s) hacia el frente en un movimiento direccionado (a y b) y al mismo tiempo la actividad acto-miosina empuja desde atrás¹.

La migración celular puede tener consecuencias patológicas. Por ejemplo, un problema radica en que células cancerosas aprovechan este proceso con fines malignos y se apoderan de los controladores del citoesqueleto. En estas células suelen encontrarse diversas proteínas alteradas. Cuando exhiben fenotipos invasivos y metastásicos hay una actividad aberrante de proteínas que vinculan señales migratorias con el citoesqueleto de actina^{3,4} (Fig. 2). En consecuencia, es de gran importancia estudiar los mecanismos moleculares detrás de este proceso para identificar los elementos desregulados y proponer estrategias que contrarresten una señalización aberrante.

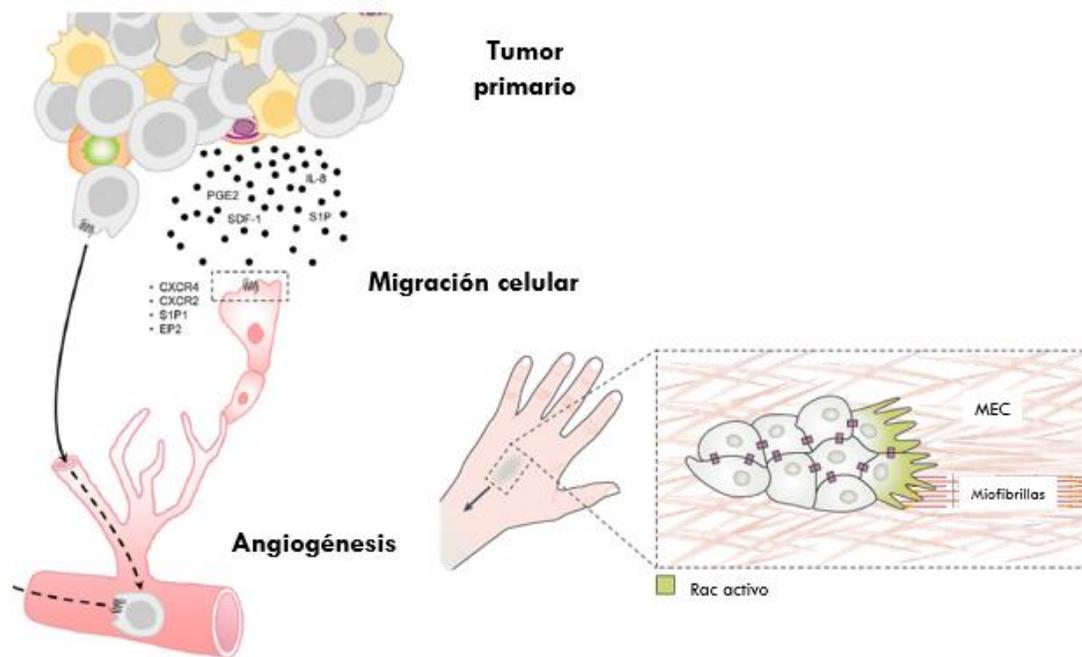


Figura 2. La migración celular exacerbada promueve la invasión y metástasis de células cancerosas. Las células tumorales secretan quimiocinas para atraer células endoteliales que crean una red vascular para nutrir al tumor. Durante la metástasis de melanoma, las células pueden migrar de manera colectiva, con células líder que lanzan lamelipodios gracias a la actividad de Rac1 y células seguidoras (*stalkers*) que se auxilian de señales físicas como las miofibrillas^{5,1}.

Las señales migratorias pueden ser agonistas quimiotácticos que activan diversos receptores membranales y vías de transducción para generar una organización celular asimétrica, como se observa en la Fig. 3. Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) quimiotácticos contribuyen a la polaridad y migración celular vía el heterodímero G $\beta\gamma$ y sus

efectores, como las PI3K de clase I y P-REX1, (*PtdIns(3,4,5)P3* (*phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate*)-dependent *Rac* exchanger), que al activar a GTPasas de la familia de Rho reorganizan el citoesqueleto de actina⁵.

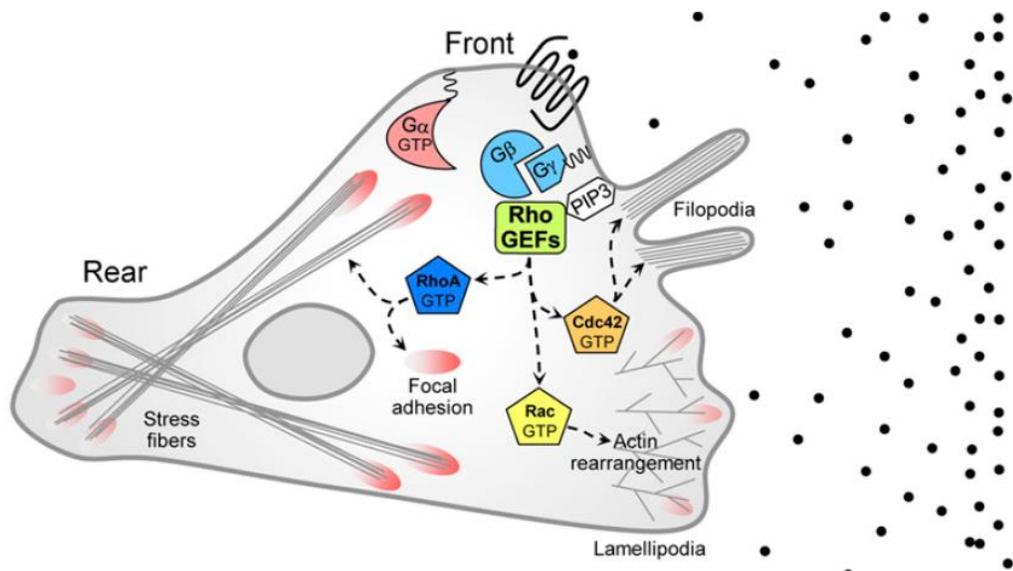


Figura 3. Las señales extracelulares llevan al establecimiento de una polaridad intracelular. Al frente de la célula se extienden filopodios y lamelipodios que representan la fuerza de propulsión hacia los agonistas quimiotácticos. Simultáneamente, se requiere una fuerza contráctil proporcionada por la asociación de miosinas a fibras de estrés⁵.

2. GTPasas de la familia de Rho

Las Rho GTPasas son reguladores clave de la dinámica del citoesqueleto de actina por lo que son cruciales para el establecimiento de la polaridad intracelular y la regulación de la forma y movimientos celulares, interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, así como procesos de endocitosis y exocitosis⁶. En consecuencia, participan en numerosos procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario, la diferenciación neuronal y formación de neuritas⁷.

En el genoma humano se encuentran codificadas 20 GTPasas de la familia de Rho⁸. Los miembros mejor estudiadas son RhoA, Rac1 y Cdc42 (Fig. 4). RhoA promueve la formación de fibras de estrés, Rac1 de lamelipodios y Cdc42 de filopodios⁹.

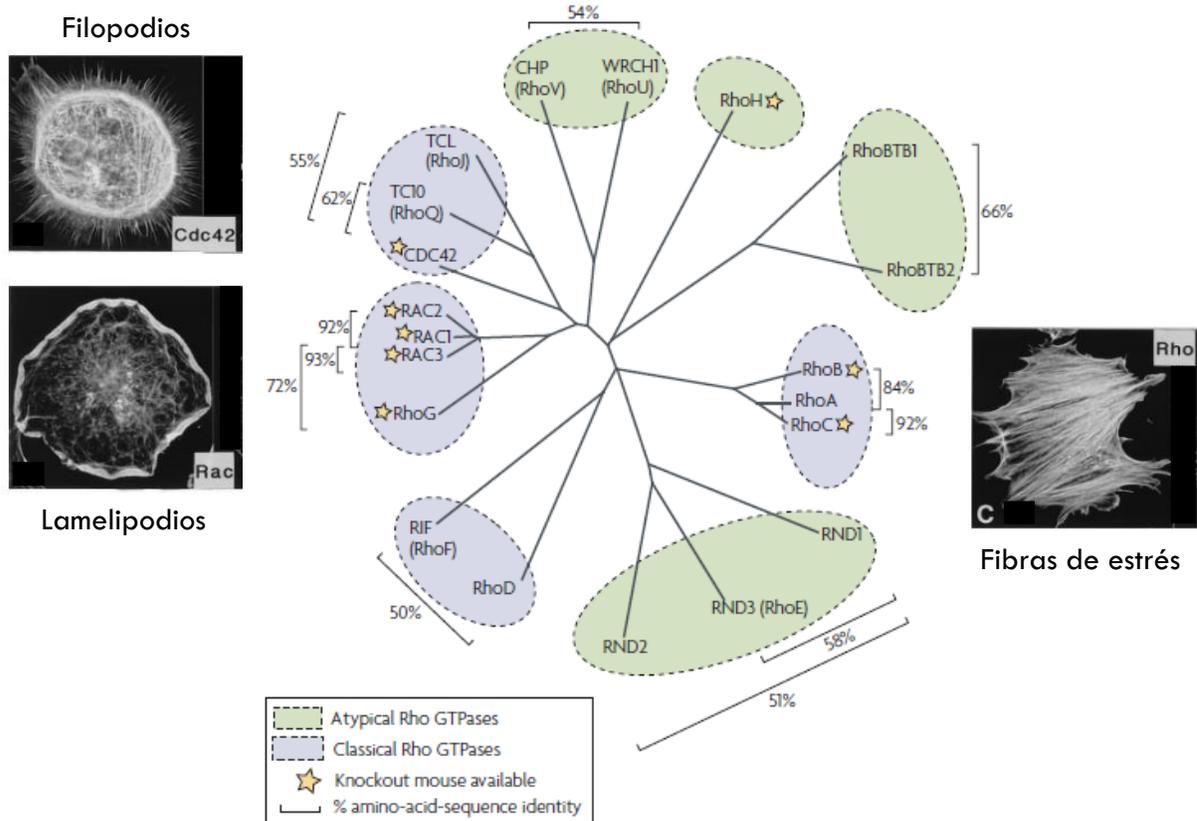


Figura 4. Árbol filogenético de las GTPasas de la familia de Rho. La familia se compone de 20 GTPasas, entre las clásicas se encuentran las más conocidas: Rho (derecha), Rac y Cdc42 (izquierda). Los recuadros muestran el fenotipo que generan las GTPasas constitutivamente activas en fibroblastos.

Dada la amplia variedad de procesos celulares que pueden controlar estas GTPasas, su regulación debe ser muy precisa. Esto implica una gran diversidad de activadores (factores intercambiadores de nucleótidos de guanina, GEFs) y desactivadores (proteínas activadoras de GTPasa, GAPs)¹⁰ (Fig. 5).

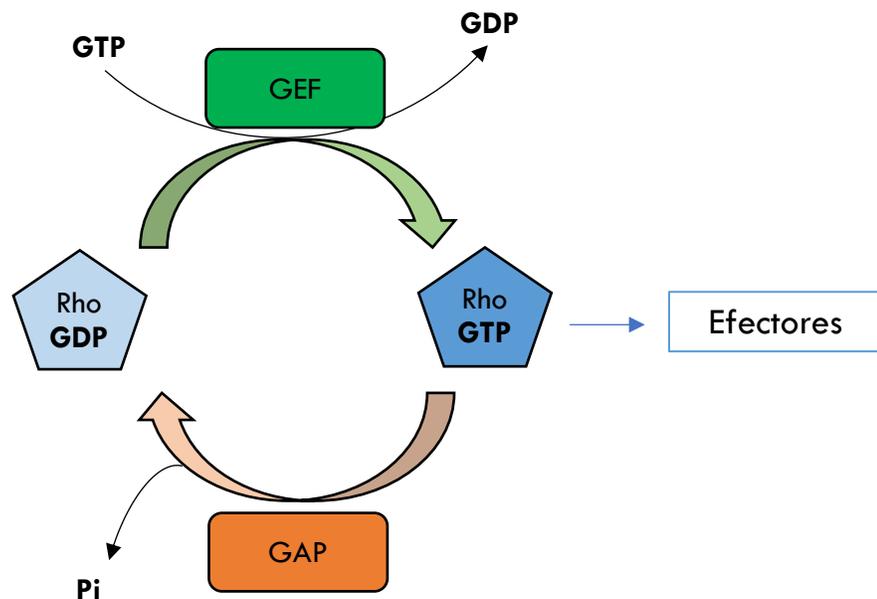


Figura 5. Regulación de las GTPasas de la familia de Rho. Las GTPasas son interruptores moleculares que sólo se encuentran en dos estados: apagadas, con *GDP* unido, y encendidas, con *GTP* unido. El simple cambio de nucleótido vuelve a la GTPasa capaz de interactuar y activar a efectores. Los GEFs son quienes promueven el encendido de la señalización al intercambiar el *GDP* por *GTP*. Los GAPs apagan la señal al ayudarle a la GTPasa a hidrolizar el *GTP* en *GDP* y P_i .

Por las consecuencias celulares que generan estas GTPasas, su desregulación se ha vinculado a los signos distintivos del cáncer, como la transformación, sobrevivencia, metabolismo y metástasis. Esta desregulación se ha atribuido a diferentes escenarios que alteran a las GTPasas propiamente, a sus reguladores y su disponibilidad.

Como se muestra en la Fig. 6, las alteraciones pueden corresponder a mutaciones directas de las GTPasas, a la sobreexpresión de GEFs, a la pérdida de los reguladores negativos

(GAPs y GDIs), a la sobreexpresión de GTPasas, a cambios en las modificaciones post-traduccionales y la generación de variantes de *splicing* alternativo.

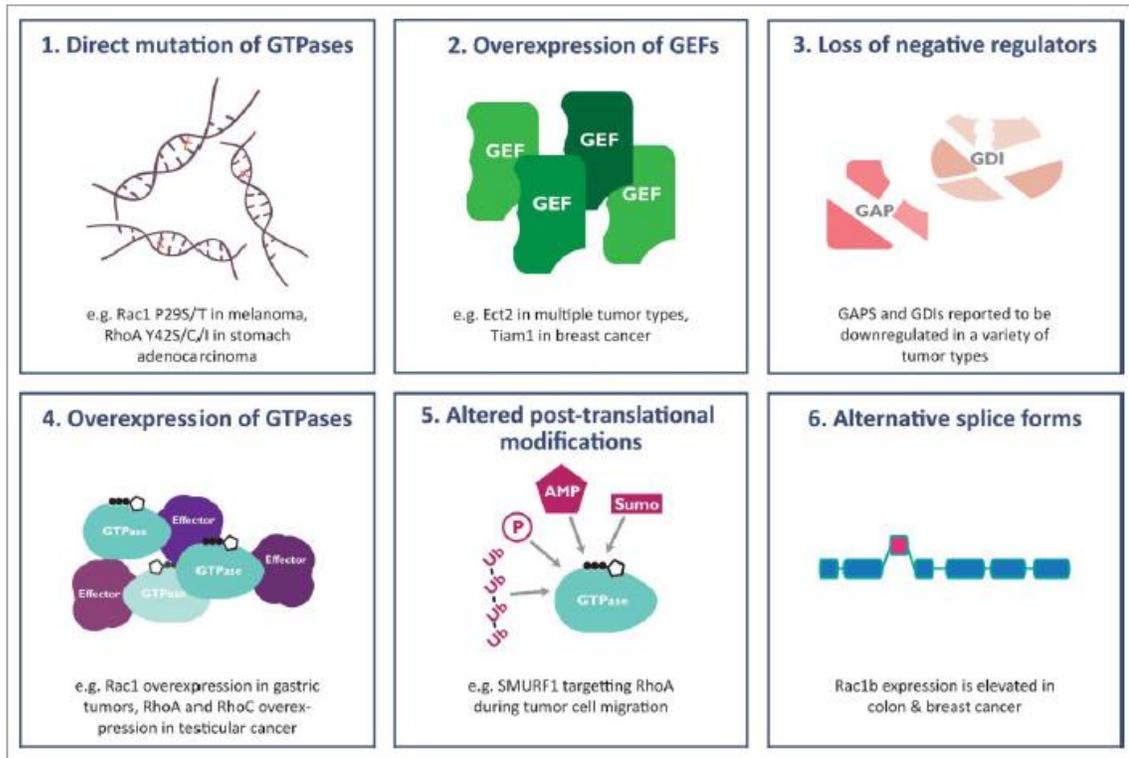


Figura 6. La alteración de las GTPasas de la familia de Rho y la desregulación de sus controladores están asociados a cáncer. Las mutaciones en las GTPasas pueden conducir a cáncer como Rac1 P29S en melanoma. La sobreexpresión de GEFs causa mayor activación de las GTPasas, así como lo hace una regulación a la baja de los GAPs. La sobreexpresión de GTPasas suele conducir a procesos oncogénicos. Los cambios en la ubiquitinación o sumoilación de las GTPasas alteran la señalización⁷.

3. RhoGEFs: factores intercambiadores de nucleótidos de guanina

Los RhoGEFs activan a las GTPasas al promover el intercambio de *GDP* por *GTP*. La familia más grande de RhoGEFs está constituida por proteínas homólogas a *Dbl* codificadas en 70 genes en humanos.

Podemos encontrar GEFs muy específicos que sólo activan a Rho, Rac o Cdc42, y GEFs un tanto promiscuos capaces de activar a más de una GTPasa¹¹. Indudablemente, que existan alrededor de 70 GEFs y 20 GTPasas refleja el papel específico que debe desempeñar cada uno para integrar diferentes mecanismos de señalización que finalmente llevan a la activación de la GTPasa en cuestión¹².

Algunos RhoGEFs que son relevantes durante el desarrollo también lo pueden ser durante el cáncer, tal como *Ect2* (*epithelial cell transforming sequence 2*), *Tiam1/2* (*T-cell lymphoma invasion and metastasis 1/2*), *Vav1/2/3* y *P-REX1/2* (*PtdIns(3,4,5)P3 (phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate)-dependent Rac exchanger*) (Fig. 7).

En la progresión del cáncer se presentan alteraciones en la expresión de genes que codifican para RhoGEFs, desde mutaciones, inusuales pero existentes, y amplificación de genes hasta mecanismos epigenéticos. *Ect2* puede encontrarse sobreexpresado y “mal” localizado. El promotor de *Tiam1* puede estar hipometilado. En líneas de cáncer de páncreas, *Vav1* no se encuentra metilado apropiadamente. *P-REX1* es abundante en cáncer de próstata y se relaciona con la disociación de desacetilasas de histona del factor transcripcional Sp1. También se encuentra sobreexpresado en melanoma, un tipo de cáncer en el que además se han detectado mutaciones activantes del gen *PREX2*. *P-REX1* ha sido particularmente caracterizado en cáncer de mama, en el que se ha demostrado que este GEF recibe señales tanto de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), como CXCR4, como de receptores con actividad de tirosín cinasa (RTKs), como EGFR y ErbB2¹¹.

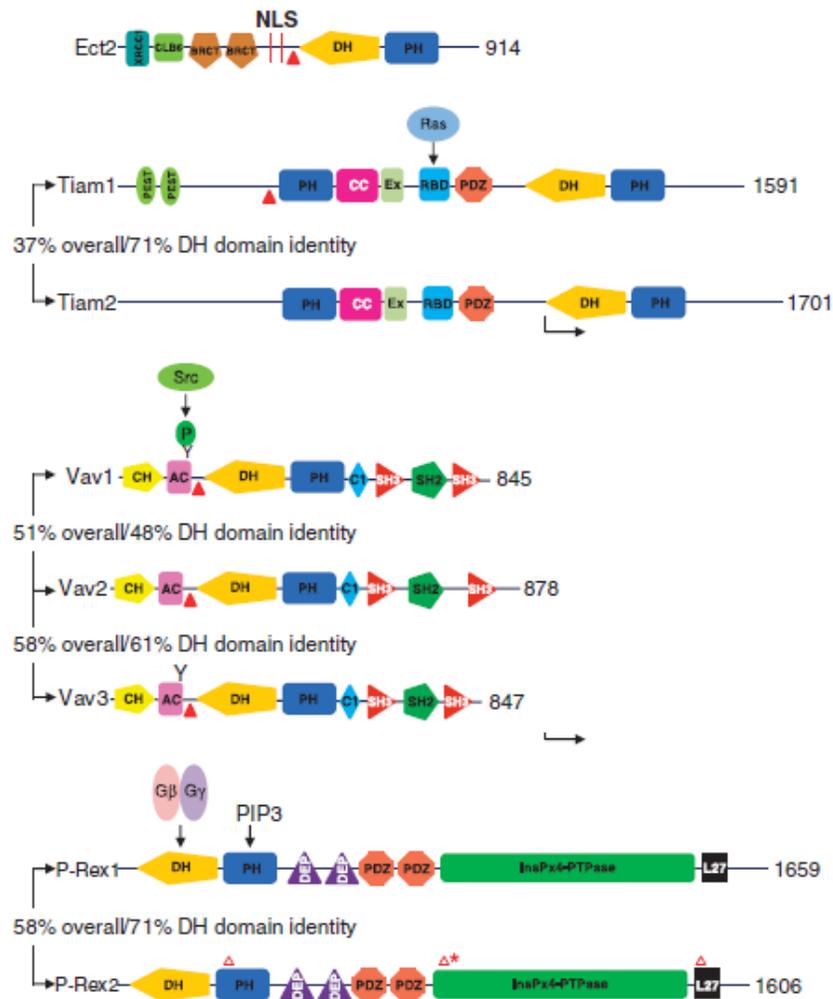


Figura 7. Estructura multidominio de diferentes RhoGEFs. El casete DH-PH característico de los RhoGEFs se muestra en todas las variantes, así como el porcentaje indicando homología entre las secuencias de aminoácidos, la cantidad total de los mismos y los mecanismos de activación. Ect2 posee una secuencia de localización nuclear (NLS), Tiam puede ser activado por Ras a través del dominio RBD (Ras Binding Domain), Vav requiere la fosforilación de residuos de tirosina por Src para desdoblarse y P-REX1 es activado por Gβγ y PIP3¹².

4. P-REX1, un RacGEF

P-REX1 es un participante específico y necesario en la vía de señalización mediante la cual CXCR4 controla la migración de células endoteliales microvasculares humanas y los cambios morfológicos relevantes en angiogénesis¹³ (Fig. 8). En respuesta al quimioatrayente SDF-1/CXCL12 (*Stromal cell-derived factor 1 α*), los receptores CXCR4 activan a la proteína heterotrimérica G_i y causan la disociación de las subunidades $G\alpha_i$ y el heterodímero $G\beta\gamma$, siendo éstas capaces de activar efectores que estimulan a GTPasas de la familia de Rho, generando protrusiones y retracciones ordenadas que orquestan un fenotipo polarizado durante la migración celular^{14,15}.

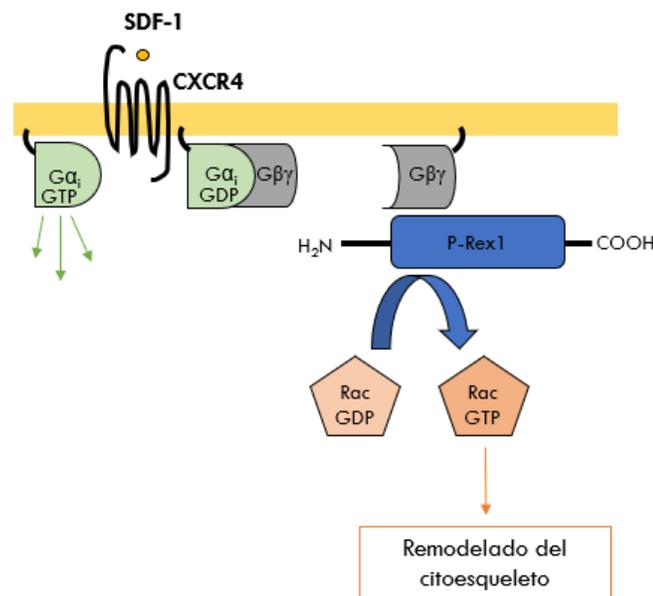


Figura 8. P-REX1 está involucrado en la respuesta angiogénica provocada por SDF-1. Vía CXCR4- G_i - $G\beta\gamma$ se activa P-REX1, un GEF para Rac, produciendo lamelipodios para permitir el avance de las células endoteliales microvasculares humanas¹³.

P-REX1 es un RhoGEF que activa a la GTPasa Rac. Se caracterizó como un factor activador de Rac sensible a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃), segundo mensajero producido por las PI3K de clase 1. Estructuralmente P-REX1 posee el tándem DH-PH, característico de los RhoGEFs, dos dominios DEP y dos dominios PDZ en tándem, y el carboxilo terminal similar a inositol polifosfato 4-fosfatasa que carece de actividad¹⁶ (Fig. 9).



Figura 9. Estructura multidominio de P-REX1. El dominio DH tiene la función de GEF, el PH es sensible a PIP₃, los dominios DEP (*Disheveled/Egl-10/Pleckstrin*) y los PDZ (*Postsynaptic-density protein of 95 kDa, Discs large and Zona occludens-1*) pueden interactuar con otras proteínas y el C terminal con homología a inositol polifosfato 4-fosfatasa¹².

Estos dominios le permiten a P-REX1 interacciones tipo proteína-proteína y proteína-lípido, que en consecuencia pueden regular la actividad del GEF, su localización subcelular, la formación de complejos con otras proteínas y pueden facilitar funciones de andamiaje que influyen en la activación de efectores¹⁷.

El hecho de que P-REX1 active a Rac, una GTPasa cuyos efectores llevan al remodelado del citoesqueleto, y que se trate de una proteína multidominio capaz de integrar distintas señales convierte a este RacGEF en un potencial blanco en el cual intervenir farmacológicamente.

5. P-REX1, Gβγ y PI3K

La actividad catalítica de P-REX1 reside en el dominio DH, por homología a Dbl. *In vitro*, este dominio es regulado por la subunidad Gβγ. El dominio PH, por homología a Pleckstrina, es sensible a PIP₃. *In vitro*, el tándem DH-PH es suficiente para responder a la presencia de Gβγ y PIP₃, promoviendo la actividad de P-REX1 de manera independiente y sinérgica. El resto de los dominios no tiene impacto en la estimulación que Gβγ y PIP₃ generan, pero sí en los niveles de actividad basal del GEF, sugiriendo la existencia de interacciones intramoleculares con el dominio DH-PH^{18,19}. La subunidad Gβγ y el segundo mensajero PIP₃, producto de la PI3K, contribuyen sinérgicamente a la localización de P-REX1 en la membrana²⁰.

Las interacciones de P-REX1 con sus activadores, el heterodímero Gβγ y PIP₃, y con su efector Rac se han descrito cada vez con más detalle estructural (Fig. 10). Por un lado,

dichas interacciones se establecen en superficies opuestas de los dominios DH-PH. En el dominio DH se encuentra una región con cargas negativas que interactúa con $G\beta\gamma$ y por el otro lado con la GTPasa Rac para intercambiarle el *GDP* por *GTP*. En el dominio PH hay una región polibásica que interactúa con las cargas negativas de los fosfatos de PIP_3 ²¹.

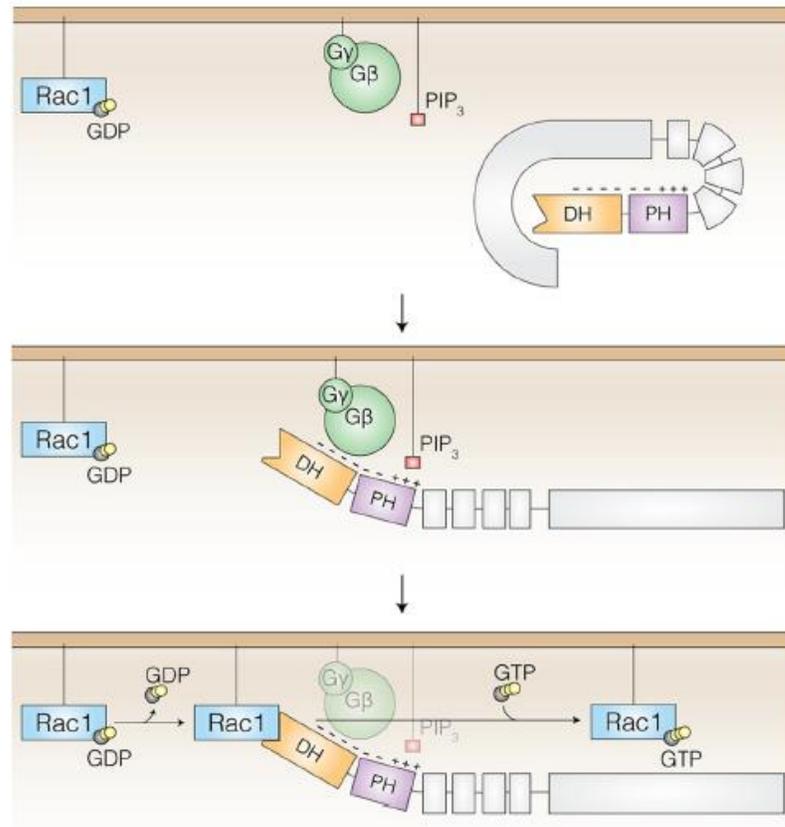


Figura 10. Modelo de activación de P-REX1 por $G\beta\gamma$ y PIP_3 . P-REX1 se encuentra autoinhibido por el C terminal y ubicado en el citosol. Con subunidades $G\beta\gamma$ libres y el PIP_3 producido el GEF se asocia a la membrana, donde se remueve el C terminal que bloqueaba al casete DH-PH, permitiendo su unión a Rac.

Por otro lado, se ha debatido la contribución del PIP_3 en la activación y/o translocación de P-REX1. Se propone un mecanismo alostérico de regulación mediado por PIP_3 al unirse al dominio PH (Fig. 11). La unión PIP_3 -PH genera cambios conformacionales que liberan el dominio DH para que este interactúe con la GTPasa. Así, de acuerdo a esta propuesta, el dominio PH se requiere para la activación del GEF, pero no para su translocación a la

membrana, es decir, la asociación a la membrana es importante, pero no suficiente para la activación de P-REX1²².

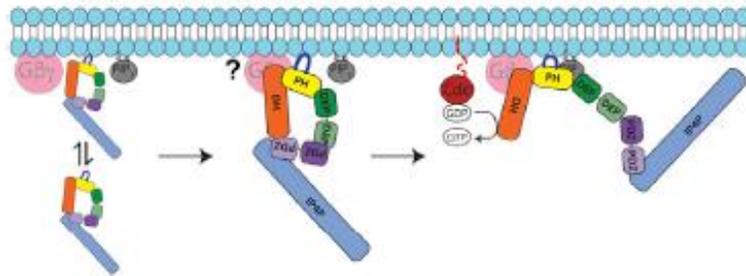


Figura 11. Modelo de activación de P-REX1 por PIP3. En estado basal hay un equilibrio entre el P-REX1 citosólico y P-REX1 unido a la membrana. Con la producción de PIP3 el dominio PH de P-REX1 cambia de conformación, lo que le permite al dominio DH llevar a cabo su actividad catalítica de GEF.

Si bien se reconoce la contribución de PI3K hacia la activación de P-REX1 a través de la producción de PIP3¹⁶, no se ha reportado ningún vínculo directo. De acuerdo con datos no publicados de nuestro grupo puede existir la interacción entre los dominios DEP-PDZ de P-REX1 y la subunidad catalítica de la cinasa, por lo que nos interesa confirmar esta asociación directa entre P-REX1 y PI3K.

Dado que P-REX1 puede asociarse a Gβγ (dominio DH), al producto de la PI3Kγ (dominio PH) y de acuerdo con datos preliminares, a la propia cinasa (a través de los dominios DEP-PDZ), postulamos que este GEF sirve como plataforma para acercar a Gβγ y PI3Kγ y facilitar su interacción y activación.

6. Gβγ y PI3K

El heterodímero Gβγ, una vez liberado de la proteína heterotrimérica Gi, puede interactuar con diferentes efectores^{5,23}, entre los que se encuentra la cinasa PI3Kγ. Esta resulta de gran interés porque genera segundos mensajeros lipídicos en cascadas de señalización provocadas por GPCRs²⁴. La PI3Kγ es un heterodímero obligado que se conforma de una subunidad catalítica p110γ y alguna de las subunidades reguladoras p87 (p84) o p101²⁵,

siendo p101 la que depende de $G\beta\gamma$. $G\beta\gamma$ recluta al heterodímero $PI3K\gamma$ a la membrana al unirse a p101 y una vez en la membrana $G\beta\gamma$ activa a $PI3K\gamma$ por interacción directa con p110 γ ²⁶ (Fig.12).

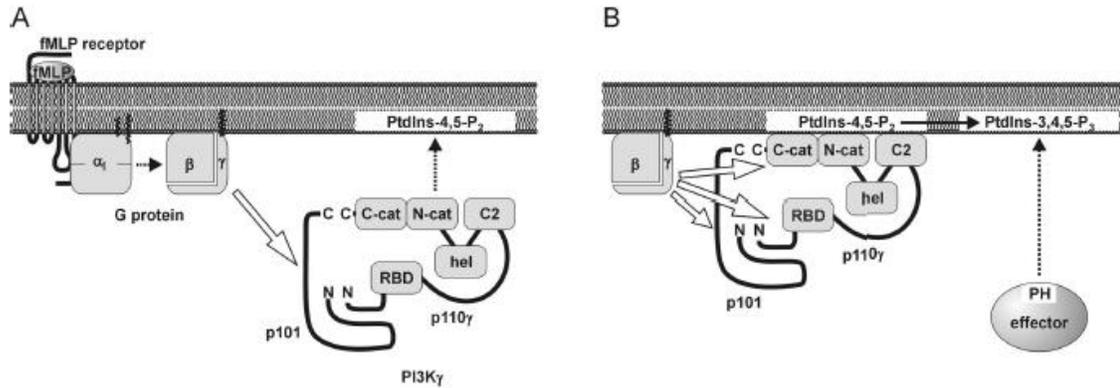


Figura 12. Modelo de reclutamiento y activación de la PI3K γ . El estímulo de los receptores fMLP conlleva a la activación de G_i y posteriormente a la de $G\beta\gamma$. Este heterodímero transloca a PI3K hacia la membrana a través de p101 (A) y una vez localizada ahí activa a p110 por interacción directa (B). La producción de PIP3 provoca el reclutamiento de efectores con dominios PH sensibles al nuevo segundo mensajero lipídico, como P-REX1 y AKT.

7. P-REX1, mTOR y $G\beta\gamma$

mTOR es una cinasa de serina/treonina que puede formar parte de dos complejos macromoleculares, mTORC1 y mTORC2. Los componentes determinantes son Raptor en mTORC1, y Rictor y mSin1 en mTORC2. Además, ambos contienen a $G\beta_L$ /mLST8. mTORC1 controla crecimiento celular y anabolismo, mientras que mTORC2 regula migración celular y sobrevivencia²⁷.

P-REX1 puede encontrarse asociado a ambos complejos de mTOR mediante sus dominios DEP-DEP con el carboxilo terminal de mTOR, pero sólo en mTORC2 se encuentra activo y participa en la regulación de la migración celular²⁸.

mTORC1 puede ser activado por dos vías: 1) nutrientes, como aminoácidos, que provocan la translocación del complejo a lisosomas a través de las GTPasas Rags, y 2) factores de

crecimiento como Insulina que al activar a AKT liberan la inhibición de la GTPasa Rheb por TSC1/TSC2 (GAP), causando la activación de mTORC1 (Fig. 13, izquierda). Así, AKT se encuentra río arriba de mTORC1²⁷.

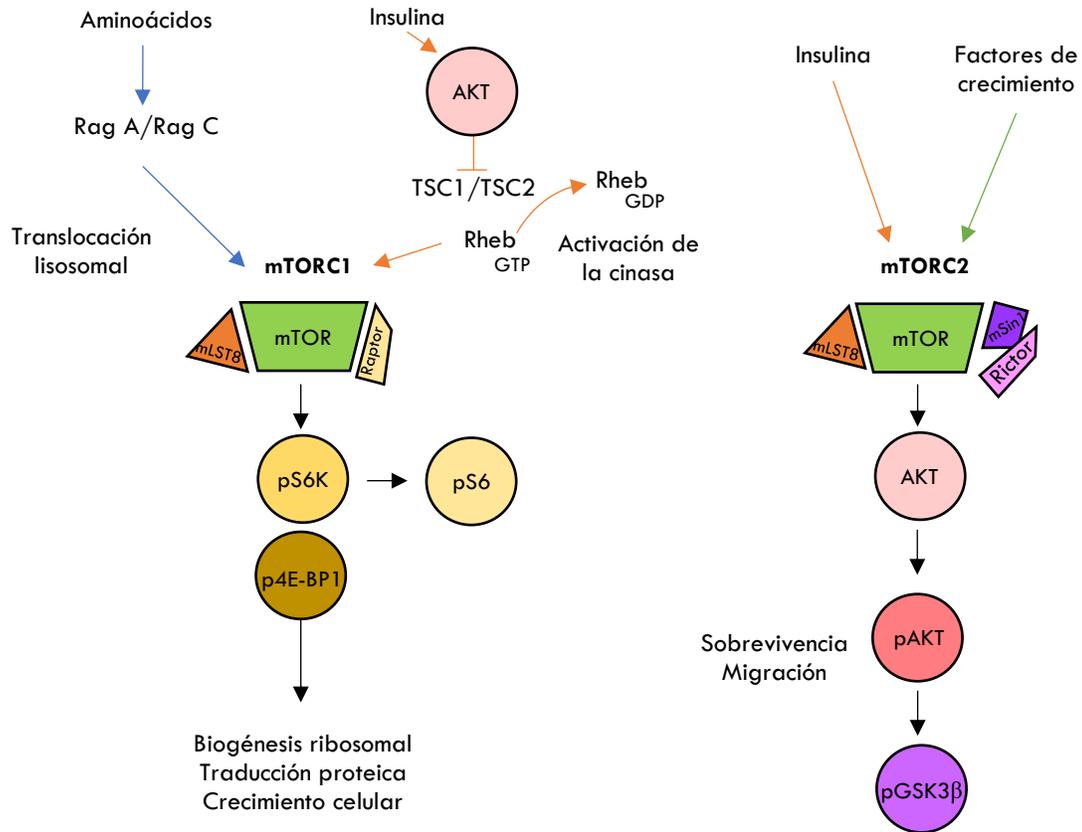


Figura 13. Activación de mTORC1, mTORC2 y sus consecuencias celulares. mTORC1 activado por nutrientes o insulina lleva a la traducción de proteínas. mTORC2 activado por insulina o factores de crecimiento regula supervivencia y migración celular.

Para la activación de mTORC2 se requieren señales extracelulares, tanto ligandos de GPCRs (quimiocinas) como factores de crecimiento que llevan a la producción de PIP3 (Fig. 13, derecha), por lo que puede tratarse de un mecanismo dependiente de PI3K o independiente. En el primer caso el PIP3 producido por PI3K recluta al complejo mTORC2 a través del componente mSin1, lo que provoca la liberación de la cinasa mTOR, la cual ahora es capaz de fosforilar al máximo a AKT²⁹. Por el contrario, el segundo mecanismo considera subpoblaciones de complejos localizados en la membrana plasmática y en organelos celulares. El PIP3 producido atrae al PH de AKT a una subpoblación de mTORC2

que es constitutivamente activo y se encuentra asociado a la membrana, donde el dominio PH de mSin1 es independiente de PIP3³⁰.

La translocación de los complejos mTORC1 y mTORC2 a la membrana plasmática también puede suceder a través del heterodímero Gβγ. Gβγ interactúa con la cinasa mTOR, específicamente con la región carboxilo terminal que incluye el dominio de cinasa. Esto coincide con un aumento en la fosforilación de los efectores de mTORC1 y mTORC2 (S6K y AKT, respectivamente). De las diferentes isoformas de Gβ, sólo Gβ₄ no interactúa con mTOR, lo que hace a esta cinasa un efector atípico de Gβγ³¹.

8. P-REX1 como plataforma quimiotáctica

Una proteína que funciona como plataforma o andamiaje es aquella que sirve de base para ensamblar complejos multiproteicos¹⁷. La gran ventaja de los GEFs es que, más allá de su función catalítica intercambiadora de nucleótidos, poseen numerosos y variados dominios con distinta afinidad por otras proteínas que pueden servir como soporte para reunirlos.

La propia estructura modular de P-REX1 lo califica como una posible plataforma de señalización capaz de regular la activación espacial y temporal de las proteínas que conjunta, pero también de su actividad de GEF. Gβγ parece unirse al dominio DH, PIP₃ interactúa con el dominio PH y mTOR interactúa con los dominios DEP-DEP en tándem (Fig. 14).

Si alguna de las proteínas antes mencionadas se ve alterada pueden desencadenarse patologías y si una de ellas es capaz de colocar juntas a las demás, se establecería un complejo que podría tener efectos malignos más graves. En cáncer y otras enfermedades humanas podemos encontrar Rho GTPasas con una actividad aberrante debido al incremento en la abundancia o actividad de RhoGEFs³². Tal es el caso de P-REX1 cuya sobreexpresión promueve el crecimiento de tumores de mama y la metástasis de melanoma y de cáncer de próstata¹⁶. Si P-REX1 puede desempeñarse como plataforma y efector, que se encuentre sobreexpresado implica que las interacciones y actividades de efectores se verían exacerbadas, por lo que intervenir en dichas interfases podría tener un beneficio terapéutico.

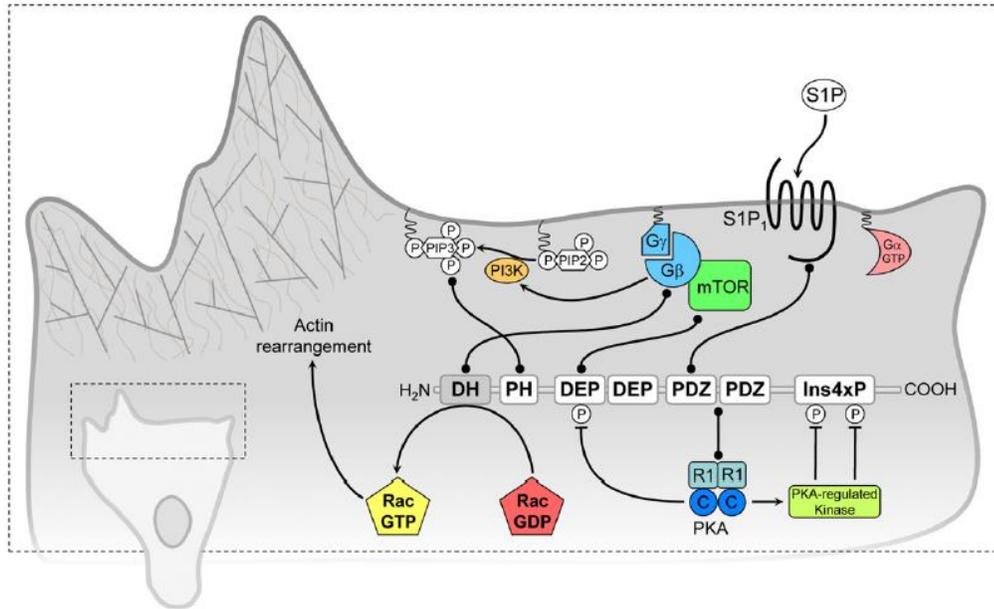


Figura 14. P-REX1 es una plataforma quimiotáctica. Los diferentes dominios de P-REX1 le permiten establecer interacciones e integrar la señalización de receptores, proteínas G, segundos mensajeros lipídicos y cinasas.

Así pues, postulamos que P-REX1 puede tener una doble función, como GEF y como plataforma organizadora. Para comprobarlo realizamos mapeos entre las proteínas, *knockdown* de P-REX1 e inhibición farmacológica de mTOR. Nuestros resultados indican que las proteínas de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC1/2 pueden interactuar directamente con P-REX1 utilizándolo como una plataforma y que este RacGEF es efector de la vía al formar parte de una cascada de transducción que él mismo facilita. Proponemos que el ensamble coordinado de estos complejos es determinante para regular la dinámica del citoesqueleto de actina durante la migración celular.

II. Justificación

En algunos tipos de cáncer caracterizados por la hiperactividad de cinasas, como PI3K y mTOR, P-REX1 se encuentra sobreexpresado. P-REX1 es un RacGEF clave en la vía de transducción dependiente de SDF-1/CXCR4. Debido a su estructura multidominio, resulta de gran interés determinar la asociación de proteínas de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC1/2 con P-REX1 y caracterizar la organización espacio-temporal que provee. Identificando las regiones de interacción requeridas puede contribuir a un cambio de estrategia, atacando a quien reúne a las proteínas en lugar de tener como blanco a cada una.

III. Hipótesis

P-REX1 es una plataforma de señalización y efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC1/2, que reúne un complejo macromolecular que facilita las actividades catalíticas de PI3K γ y mTORC1/2 dependiente de GPCRs quimiotácticos.

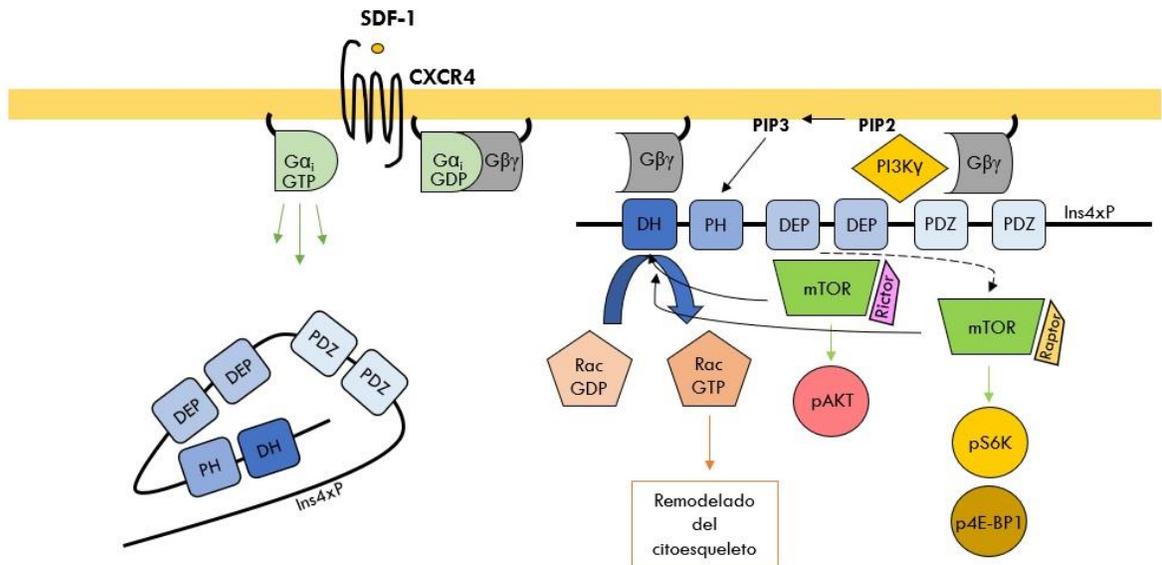


Figura 15. Modelo propuesto para el desempeño de P-REX1 como plataforma y efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC1/2. A medida que se recibe el estímulo se van estableciendo diferentes interacciones que reclutan, activan y desdoblan a P-REX1 promoviendo su extensión y la disponibilidad de sus dominios para establecer nuevos contactos. El complejo ternario SDF-1/CXCR4/ G_i lleva a la liberación de subunidades $G\alpha_i$ -GTP y $G\beta\gamma$ disponibles para interactuar con sus respectivos efectores. $G\beta\gamma$ tiene como efector a P-REX1, un RacGEF que de manera basal se encuentra autoinhibido y citosólico. Hipotéticamente, el primer desdoblamiento del GEF puede ser por algún heterodímero $G\beta\gamma$ que recluta a P-REX1 hacia la membrana a través de los dominios PDZ-PDZ. Ahí $G\beta\gamma$ puede reclutar a PI3K γ , contribuyendo a un segundo desdoblamiento por interacción directa con los dominios DEP-PDZ de P-REX1 y a un tercero de manera indirecta al producir PIP3 que atrae al PH. Por último, otra subunidad $G\beta\gamma$ puede terminar de desdoblar al GEF en la zona de activación de la membrana y fijarlo para dejarlo extendido y dispuesto para establecer otras interacciones como las de sus dominios DEP-DEP con mTOR y el DH para activar a Rac.

IV. Objetivos

Objetivo General

Estudiar a P-REX1 como plataforma de señalización y efector de $G\beta\gamma$, PI3K γ y mTORC1/2 y determinar su participación en respuesta a factores quimiotáticos como SDF-1.

Objetivos específicos

1. Estudiar a P-REX1 como la proteína que facilita la interacción directa entre $G\beta\gamma$ y PI3K γ al restringirlas en la zona de activación de la membrana.
2. Estudiar a P-REX1 como plataforma para la promoción de las actividades catalíticas de PI3K γ y mTORC1/2 reguladas por $G\beta\gamma$.
3. Estudiar a P-REX1 como efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC1/2 y determinar el tipo de regulación que ejercen sobre el GEF.

V. Estrategia experimental

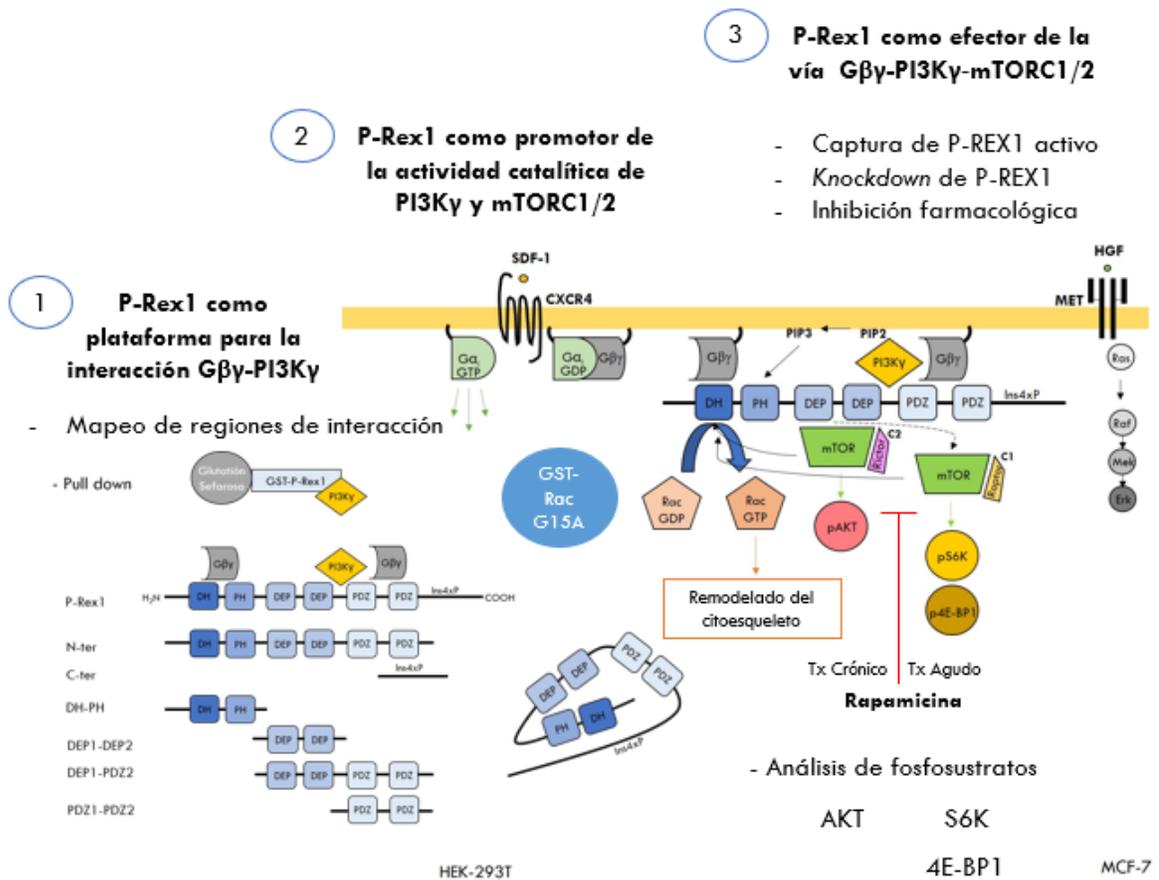


Figura 16. Estrategia experimental para evaluar a P-REX1 como plataforma y efector de la vía Gβγ-PI3Kγ-mTORC1/2. Modelo que incluye los diferentes enfoques experimentales para evaluar cada objetivo: 1) Mapeo entre P-REX1, Gβγ y PI3Kγ; 2) Análisis de fosfosustratos de PI3Kγ y mTORC1/2 tras activación de P-REX1 y 3) Evaluación de P-REX1 activo tras inhibición de mTORC2.

1. P-REX1 como plataforma para la interacción Gβγ-PI3Kγ

Con el uso de distintas construcciones de los dominios de la región amino terminal de P-REX1, que va del dominio DH al segundo PDZ, se esclarecerán aquellos que son indispensables para facilitar la interacción entre Gβγ y PI3Kγ. Se determinará el efecto que tengan estas construcciones en las interacciones y actividad de las proteínas mencionadas. Para ello se harán ensayos de pull-down y western blot para analizar la

expresión de proteínas y los complejos macromoleculares formados por P-REX1, confirmando las interacciones $G\beta\gamma$ -DH, $G\beta\gamma$ -PDZs y PI3K γ -DEP-PDZ.

Para la regulación de P-REX1 por $G\beta\gamma$ y PI3K γ se mapearán las regiones de interacción que desencadenan tanto la función del GEF como la de andamiaje, se evaluarán cuáles proteínas de la vía se asocian a la fracción activa de P-REX1 y se caracterizarán dichas interacciones con el propósito de identificar interfases inhibibles farmacológicamente.

2. P-REX1 como promotor de la actividad catalítica de PI3K γ y mTORC1/2

Para caracterizar la regulación de la actividad de PI3K γ y mTORC1/2 por P-REX1 se detectarán las proteínas fosforiladas por parte de los complejos, S6K y 4E-BP1 como sustratos de mTORC1 y AKT de mTORC2, asumiendo que esta fosforilación final (S473) es consecuencia de la actividad previa de PI3K γ con la producción de PIP3 y la actividad de PDK (T308).

3. P-REX1 como efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC1/2

Al estimular células MCF-7 con SDF-1 se determinará la activación del GEF P-REX1 al precipitarlo por afinidad a la GTPasa Rac libre de nucleótido (RacG15A) fusionada a GST. Se llevará a cabo el silenciamiento (*knockdown*) de P-REX1 y la posterior evaluación de la asociación con proteínas de la vía. Se analizará la participación de mTORC2 mediante su inhibición farmacológica: un tratamiento crónico de rapamicina y se analizarán fosfosustratos, S6K y 4E-BP1 de mTORC1 y AKT de mTORC2.

VI. Métodos

Líneas celulares

Las células MCF-7, HEK-293T y COS-7 se mantienen en cajas p100 a 37°C y 5% CO₂ en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y antibióticos al 1% (Gibco, cat. 15240-062) (Medio completo). Las células se resiembran cada tercer día cuando han alcanzado la confluencia. Lavar con 3-5 mL de PBS 1X estéril. Retirar y agregar 1 mL de Tripsina-EDTA, dejar actuar por 7-10 minutos (MCF-7, COS-7) o 1 minuto (HEK-293T) colocando la caja en la incubadora. Una vez pasado este tiempo, resuspender las células con 4 mL de medio completo para un volumen final de 5 mL. Tomar 1 mL de la suspensión celular y agregarlo en una caja p100 con 10 mL de medio completo. Dispersar inóculo mezclando la caja con cuidado.

Plásmidos

Se transfectaron células HEK-293T con los siguientes plásmidos ya descritos: pCEFL-GST, pCEFL-GST-P-REX1-N ter, pCEFL-GST-P-REX1-C ter, pCEFL-GST-P-REX1-DH-PH, pCEFL-GST-P-REX1-DEP1-DEP2, pCEFL-GST-P-REX1-PDZ1-PDZ2, pCEFL-GST-P-REX1-DEP1-PDZ2. pCEFL-Flag-P-REX1, pCEFL-3XFlag-P-REX1-DH-PH, pCEFL-3XFlag-P-REX1-DH-DEP2, pCEFL-3XFlag-P-REX1-DEP1-DEP2, pCEFL-3XFlag-P-REX1-DH-PDZ2, pCEFL-3XFlag-P-REX1-PDZ1-PDZ2. pCEFL-GST-G β ₁, pCEFL-G γ ₂. pCEFL-3XFlag-G β ₁. pcDNA-EE-PI3K γ -p101, pcDNA-EE-PI3K γ -p110 γ .

Anticuerpos

Cell Signaling: P-REX1, 13168S; p110 γ , 4252; Raptor, 2280; p-ERK1/2 (T202/Y204), 9101; p-p70S6K, 9205; p70S6K, 9202; p-GSK3 β , 9336; GSK3 β , 9315; p-S6, 2215; p4E-BP1, 2855; 4E-BP1, 9452. Sigma: AKT1, P2482. Santa Cruz Biotechnology: GST, sc-138; G β , sc-261; ERK2, sc-154; p-AKT1/2/3 (Ser473), sc-7985-R; S6, sc-74459. Millipore: mTOR, cat. 07-231. Bethyl: Rictor, cat. A300-459A. KPL: anti-mouse, 074-1802; anti-rabbit, 074-1516.

Mapeo

1) Preparar caja de 6 pozos y/o cajas p35.

Tratamiento con Poli-D-Lisina.

1. Colocar 1 mL de Poli-D-Lisina (1X) por pozo. Dejar a temperatura ambiente o incubar por 10 min.
2. Retirar Poli-D-Lisina. Lavar una vez con PBS 1X estéril. Retirar.
3. Colocar 1 mL de medio completo (DMEM+FBS 10%).

2) Preparar inóculo de células HEK-293T

1. Retirar caja p100 confluyente de la incubadora. Retirar el medio completo.
2. Lavar con 3-5 mL de PBS 1X estéril, retirar cuidadosamente.
3. Agregar 1 mL de Tripsina-EDTA (1X) y dejar actuar por 1 minuto en la incubadora.
4. Resuspender las células con 4 mL de medio completo para un volumen final de 5 mL.
5. Diluir 1 mL de la suspensión celular en 7 mL de medio completo y mezclar.
6. Colocar 1 mL de la dilución por pozo y mezclar con cuidado.
7. Dejar en la incubadora hasta el día siguiente para transfectarlas.

3) Transfección

a. PEI (*Polyethylenimine*)

1. Preparar complejos

Mezcla 1: 75 μ L de DMEM para Transfectar (sin SFB, sin antibióticos) por pozo.

Los respectivos μ L del plásmido o plásmidos comunes a transfectar, según su concentración (λ , ng/ μ L).

Vortexear y dejar reposar por 1 minuto.

2. Repartir el volumen por tubo o condición.
3. Agregar los plásmidos correspondientes a cada condición.
4. Vortexear y dejar reposar por 1 minuto.
5. Mezcla 2: 75 μ L de DMEM para Transfectar (sin SFB, sin antibióticos) por pozo.
3 μ L de PEI 1X (1 mg/ μ L) por pozo.
Calentar el PEI 1X en baño maría a 70°C por 2 minutos antes de agregarlo al medio.
6. Vortexear y dejar reposar por 1 minuto.

7. Agregar 78 μL de la segunda mezcla a los tubos que contienen la mezcla 1.
8. Dejar reposar el complejo [Medio de ayuno-DNA-PEI] por 15 minutos.
9. Preparar células para transfectar.
Retirar caja de 6 pozos y/o p35 de la incubadora. Retirarles el medio completo.
Lavar 1 vez con 1 mL de PBS 1X estéril por pozo, retirar cuidadosamente.
Agregar 1 mL de DMEM para Transfectar (sin SFB, sin antibióticos) por pozo.
10. Agregar complejos: 150 μL por pozo (1-6).
11. Incubar a 37°C durante 5 horas.
12. Recuperar por la tarde: cambiar el medio de transfección por 1 mL de medio completo.

b. Lipofectamina-PLUS (Invitrogen, cat. 10964-021; P/N 50470)

1. Preparar complejos
Mezcla 1: 100 μL de DMEM para Transfectar (sin SFB, sin antibióticos) por pozo.
Los respectivos μL del plásmido o plásmidos comunes a transfectar, según su concentración (λ , ng/ μL).
Vortexear y dejar reposar por 1 minuto.
2. Repartir el volumen por tubo o condición.
3. Agregar los plásmidos correspondientes a cada condición.
4. Vortexear y dejar reposar por 1 minuto.
5. Agregar 3 μL de PLUS por pozo y dejar reposar por 15 minutos.
6. Mezcla 2: 100 μL de DMEM para Transfectar (sin SFB, sin antibióticos) por pozo.
3 μL de Lipofectamina por pozo.
NOTA: Sacar PLUS y Lipofectamina sólo al momento de agregarlos al medio y regresarlos a 4°C inmediatamente después.
7. Vortexear y dejar reposar por 15 minutos.
8. Agregar 103 μL de la segunda mezcla a los tubos que contienen la mezcla 1.
9. Dejar reposar el complejo [Medio de ayuno-DNA-Lipofectamina-PLUS] por 15 minutos.
10. Preparar células para transfectar.
Retirar caja de 6 pozos y/o p35 de la incubadora. Retirarles el medio completo.
Lavar 1 vez con 1 mL de PBS 1X estéril por pozo, retirar cuidadosamente.
Agregar 1 mL de DMEM para Transfectar (sin SFB, sin antibióticos) por pozo.

11. Agregar complejos: 200 μ L por pozo (1-6).
12. Incubar a 37°C por un periodo de 5 horas.
13. Recuperar por la tarde: cambiar el medio de transfección por 1 mL de medio completo.

4) Ayuno de 12-16 horas

1. Lavar la placa de 6 pozos, 1 vez con 1 mL de PBS 1X estéril por pozo.
2. Agregar 1 mL de medio de ayuno (DMEM sin SFB y sin antibióticos) por pozo.

Las células HEK-293T deben ayunarse por 12-16 horas, por lo que pasado este tiempo deben procesarse.

5) Lisis

Buffer de Lisis

TBS-Triton (Tris (pH 7.5) 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X100 1%) con EDTA 5 mM, inhibidores de fosfatasa: NaF 1 mM, Ortovanadato de sodio 1 mM y β -Glicerol fosfato 10 mM; e inhibidores de proteasas: Aprotinina 10 μ g/mL, Leupeptina 10 μ g/mL y PMSF (*Phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF) 1 mM.

Preparación de 500 mL de Solución Stock de Buffer de Lisis sin inhibidores:

- 25 mL de Tris-HCl 1M
- 5 mL de EDTA 0.5M
- 30 mL de NaCl 2.5M
- 5 mL de Triton-X100
- Aforar a 500 mL con agua bidestilada
- Agitar en la parrilla de agitación magnética. Guardar a 4°C.

El volumen requerido de Buffer de Lisis se complementa con la correspondiente cantidad de inhibidores:

*Inhibidores de fosfatasa

-Fluoruro de Sodio (NaF) 1 mM y Ortovanadato de sodio (Na₃VO₄) 1 mM: 1 µL por cada mL de Buffer de Lisis.

-β-Glicerol fosfato (β-GP) 1M, concentración de trabajo 10 mM: 10 µL por cada mL de Buffer de Lisis.

*Inhibidores de proteasas

-Aprotinina 10 µg/µL, Leupeptina 10 µg/µL: 1 µL por cada mL de Buffer de Lisis.

-*Phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF) 0.1 M, concentración de trabajo 1 mM: 10 µL por cada mL de Buffer de Lisis.

1. Retirar placa de la incubadora. Colocar sobre hielo y retirarles el medio de ayuno.
2. Lavar 1 vez con 3 mL de PBS 1X frío por pozo.
3. Retirar el PBS 1X y agregar 500 µL de Buffer de Lisis suplementado con los Inhibidores de proteasas y fosfatasa por pozo.
4. Incubar sobre el hielo durante 5 minutos y después raspar las células.
5. Colectar los lisados.
6. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min a 4°C.
7. Colectar los sobrenadantes: 100 µL para lisados totales (TCL) y 400 µL para Pull-down (PD). A los 100 µL se les agregan 34 µL de Buffer Laemmli 4X-β-mercaptoetanol y se vortexean.

6) Pull-down

8. Agregar los 400 µL a tubos donde previamente se colocaron 25 µL de perlas de Glutación Sefarosa 4B (GE healthcare, cat. 17-0756-05) para atrapar por afinidad a las proteínas fusionadas a GST.

NOTA: Cortar punta para tomar las perlas y homogenizar por vórtex en cada toma.

9. Incubar por 45 minutos a 4°C.
10. Centrifugar a 5000 rpm, a 4°C por 2 minutos.
11. Lavar las perlas con 1 mL de Buffer de Lisis por tubo, vortexear por 5 segundos, centrifugar a 5000 rpm, a 4°C por 2 minutos y eliminar el sobrenadante evitando succionar las perlas. Repetir dos veces (tres lavados en total).
12. Agregar 30 µL de Buffer Laemmli 1X-β-mercaptoetanol y vortexear.

13. Hervir por 5 minutos las dos series de tubos, centrifugar a 13000 rpm, a temperatura ambiente, por 5 minutos y guardar a -20°C.

7) Western Blot (WB)

1. Correr gel(es) SDS-PAGE al porcentaje adecuado dependiendo del peso de la proteína. 6% para proteínas mayores a 100 kDa, 10 % para la mayoría y 15 % para proteínas menores a 30 kDa. Correr a 20 mA.

NOTA: Utilizar BUFFER DE CORRIDA SDS-PAGE 1X nuevo en la parte superior y el usado puede utilizarse en la parte inferior de la cámara de electroforesis.

2. Transferir en membrana de Immobilon (Millipore, cat. IPVH00010) (previamente hidratada en metanol al 100%, después en agua y finalmente equilibrada en Buffer de Transferencia). La transferencia se hace durante 2.5 horas a 320 mA.
3. Bloquear la membrana con leche al 5% en TBS-Tween (TBS-T) 0.05% durante 1 hora a temperatura ambiente en el agitador de sube y baja a una velocidad de 20 rpm.
4. Realizar 3 lavados con agua bidestilada hasta que ya no se observen restos de leche.
5. Realizar 3 lavados con TBS-T 0.05% durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Adicionar el anticuerpo primario a la dilución recomendada en TBS-T 0.05% durante toda la noche a 4°C. Asegurarse que el anticuerpo cubra completamente la membrana.
7. Al día siguiente recuperar el anticuerpo y guardarlo en un tubo Falcon (15 mL) - 20°C perfectamente rotulado.
8. Revelar con el sustrato quimioluminiscente Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, cat. WBKLS0500) a una dilución 1/1.

Modelo endógeno en células MCF-7 y Ensayos de Activación de P-REX1

1) Preparar caja de 6 pozos y/o cajas p35

1. En una placa de 6 pozos colocar 2 mL de medio completo por pozo.
2. Preparar inóculo de células MCF-7: Diluir 3 mL de la suspensión celular (p100 confluyente 1 mL de tripsina + 4 mL de medio completo) con 3 mL de medio completo y mezclar.
3. Agregar 1 mL de la dilución por pozo y mezclar con cuidado.
4. Dejar en la incubadora hasta el día siguiente para procesarlas.

NOTA: Al día siguiente verificar densidad y morfología celular, cada pozo debe tener células en un 70-80% de confluencia o más.

2) Ayuno de 24 horas

Lavar la placa de 6 pozos, 3 veces con 2 mL de PBS 1X estéril por pozo. Agregar 1 mL de medio de ayuno (DMEM sin SFB, sin antibióticos) por pozo.

Las células MCF-7 deben ayunarse 24 horas, por lo que, al día siguiente, a la misma hora, deben estimularse y procesarse.

3) Estímulo

SDF-1 α (50 μ g/mL, Stock 1000X)

La concentración de trabajo es de 50 ng/mL, por lo que se toman 10 μ L por cada mL de medio de ayuno que se colocó en los pozos.

Estímulos: 2 min, 5 min, 15 min, 30 min y 60 min.

4) Lisis

1. Retirar placa de la incubadora. Colocar sobre hielo y retirar medio con estímulo.
2. Lavar 1 vez con 3 mL de PBS 1X frío por pozo.
3. Retirar el PBS y agregar 500 μ L de Buffer de Lisis suplementado con los inhibidores de proteasas y fosfatasa (Aprotinina, Leupeptina, NaF, Na₃VO₄, β -Glicerolfosfato y PMSF) por pozo.
3. Incubar sobre el hielo durante 5 minutos y después raspar las células.
4. Colectar los lisados.

5. Centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C.
6. Colectar los sobrenadantes: 100 µL para lisados totales (TCL) y 400 µL para Pull-down (PD). A los 100 µL se les agregan 34 µL de Buffer Laemmli 4X-β-mercaptoetanol y se vortexean.

5) Pull-down

7. Los 400 µL se agregan a tubos donde previamente se colocaron 25 µL de perlas de Sefarosa-**RacG15A** para atrapar por afinidad al GEF P-REX1. Incubar por 45 minutos a 4°C.
8. Centrifugar a 5000 rpm, a 4°C por 2 minutos.
9. Lavar las perlas con 1 mL de Buffer de Lisis por tubo, vortexear por 5 segundos, centrifugar a 5000 rpm, a 4°C por 2 minutos y eliminar el sobrenadante. Repetir dos veces (3 lavados en total).
10. Agregar 30 µL de Buffer Laemmli 1X- β-mercaptoetanol y vortexear.
11. Hervir por 5 minutos las dos series de tubos (TCL y PD), centrifugar a 13000 rpm, a temperatura ambiente, por 5 minutos y guardar a -20°C.

6) Western Blot

1. Correr gel SDS-PAGE.
2. Transferir a membrana Immobilon a 320 mA por 2.5 horas.
3. Bloquear con leche al 5% en TBS-T por 1 hora.
4. Incubar con anticuerpo a 4°C toda la noche.
5. Revelar con sustrato quimioluminiscente Millipore a una dilución 1/1.

Knockdown de P-REX1

1) Preparar Medio de Transfección

Transfección Reversa con Lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen, P/N 56532)

En tubos de transfección (5 mL):

1. Mezcla 1: 250 μ L de OptiMEM por pozo (6)
3 μ L de Lipofectamina RNAiMAX por pozo
Mezclar por pipeteo y dejar reposar por 1 minuto.
2. Mezcla 2: 250 μ L OptiMEM por pozo (3)
12 μ L de esiRNA Control: GFP por pozo (Sigma-Aldrich, cat. EHUEGFP)
Mezclar por pipeteo y dejar reposar por 1 minuto.
3. Mezcla 3: 250 μ L OptiMEM por pozo (3)
12 μ L de esiRNA Blanco: P-REX1 por pozo
Mezclar por pipeteo y dejar reposar por 1 minuto.
4. De la Mezcla 1 repartir el contenido en partes iguales a la Mezcla 2 y 3.
5. Incubar complejos en una caja de 6 pozos por 20 minutos, a temperatura ambiente.
La Mezcla 2 se coloca en los primeros 3 pozos y la Mezcla 3 en los 3 pozos restantes.

2) Preparar células: MCF-7

1. Retirar caja p100 de la incubadora. Retirarles el medio completo.
2. Lavar 1 vez con 3-5 mL de PBS 1X estéril, retirar cuidadosamente.
3. Agregar 1 mL de Tripsina-EDTA y dejar actuar por 7-10 minutos en la incubadora (37°C, 5% CO₂).
4. Resuspender las células con 4 mL de medio de ayuno para un volumen final de 5 mL.
5. De los 5 mL tomar 250 μ L de la suspensión celular por pozo.
6. Dispersar inóculo mezclando la caja con cuidado.
7. Incubar toda la noche.
8. Recuperar al día siguiente: cambiar el medio de transfección por 2 mL de medio completo.
9. Procesar de 48-72 horas después.

3) Ayuno de 24 horas

Lavar la placa de 6 pozos, 3 veces con 2 mL de PBS 1X estéril por pozo. Agregar 1 mL de medio de ayuno (DMEM sin SFB, sin antibióticos) por pozo.

Las células MCF-7 deben ayunarse 24 horas, por lo que, al día siguiente, a la misma hora, deben estimularse y procesarse.

4) Estímulo 100X

SDF-1 α (5 μ g/mL Stock 1000X, PeproTech, cat. 300-28A)

La concentración de trabajo es de 50 ng/mL, por lo que se toman 10 μ L por cada mL de medio de ayuno que se colocó en los pozos: *Knockdown control* y *Knockdown blanco*.

HGF (1 μ g/mL Stock 1000X, R&D Systems, cat.294-HGN)

La concentración de trabajo es de 10 ng/mL, por lo que se toman 10 μ L por cada mL de medio de ayuno que se colocó en los pozos.

Los estímulos se dejan actuar por 15 minutos, una vez agregados, se regresa la caja a la incubadora.

5) Lisis

1. Retirar placa de la incubadora. Colocar sobre hielo y retirar el medio con estímulo.
2. Lavar 1 vez con 3 mL de PBS frío por pozo.
3. Retirar el PBS y agregar 500 μ L de Buffer de Lisis suplementado con los inhibidores y MgCl₂.
4. Incubar sobre el hielo 5 minutos y después raspar las células.
5. Colectar los lisados.
6. Centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C.
7. Colectar los sobrenadantes: 100 μ L para lisados totales (TCL) y 400 μ L para Pull-down (PD). A los 100 μ L se les agregan 34 μ L de Buffer de muestra 4X y se vortexean.

6) Pull-down

7. Los 400 μL se agregan a tubos donde previamente se colocaron 25 μL de perlas de Sefarosa-**RacG15A** para atrapar por afinidad al GEF P-REX1. Incubar por 45 minutos a 4°C.
8. Centrifugar a 5000 rpm, a 4°C por 2 minutos.
9. Lavar las perlas con 1 mL de Buffer de Lisis por tubo, vortexear por 5 segundos, centrifugar a 5000 rpm, a 4°C por 2 minutos y eliminar el sobrenadante. Repetir dos veces (3 lavados en total).
10. Agregar 30 μL de Buffer Laemmli 1X- β -mercaptoetanol y vortexear.
11. Hervir por 5 minutos las dos series de tubos (TCL y PD), centrifugar a 13000 rpm, a temperatura ambiente, por 5 minutos y guardar a -20°C.

7) Western Blot

1. Correr gel SDS-PAGE.
2. Transferir a membrana Immobilon a 320 mA por 2.5 horas.
3. Bloquear con leche al 5% en TBS-T por 1 hora.
4. Incubar con anticuerpo a 4°C toda la noche.
5. Revelar con sustrato quimioluminiscente Millipore a una dilución 1/1.

Tratamiento crónico con Rapamicina

1) Preparar caja de 6 pozos y/o cajas p35

1. En una placa de 6 pozos colocar 2 mL de medio completo por pozo.
2. Preparar inóculo de células MCF-7: Diluir 3 mL de la suspensión celular (p100 confluyente 1 mL de tripsina + 4 mL de medio completo) con 3 mL de medio completo y mezclar.
3. Agregar 1 mL de la dilución por pozo y mezclar con cuidado.
4. Dejar en la incubadora hasta el día siguiente para el tratamiento con rapamicina.

NOTA: Al día siguiente verificar densidad y morfología celular, cada pozo debe tener células en un 70-80% de confluencia o más.

2) Ayuno de 24 horas con Tratamiento crónico de DMSO o Rapamicina

1. Preparar vehículo e inhibidor previamente:

DMSO: (DIMETHYL SULPHOXIDE (DMSO) HYBRI-MAX, SIGMA, RNBC9043)

Diluir 20 µL de DMSO en 180 µL de PBS 1X estéril.

Utilizar 10 µL por cada mL de medio de ayuno que se coloque en los pozos.

Rapamicina (200 000 ng/mL Stock 10 000X)

Stock de Rapamicina reconstituida en DMSO a 200 µg/mL (Stock a 10 000X), guardar a -20°C.

Hacer dilución 1/100 en el vehículo: En 900 µL de PBS 1X estéril diluir 90 µL de DMSO y posteriormente 10 µL del Stock de Rapa 10 000 X para obtener una solución 1000X a 2 000 ng/mL.

La concentración de trabajo de rapamicina es de 20 ng/mL, por lo que se toman 10 µL por cada mL de medio de ayuno que se coloque en los pozos.

2. Preparar medio de ayuno con DMSO o Rapamicina:

En 1 mL de medio de ayuno por pozo, 10 µL de DMSO.

En 1 mL de medio de ayuno por pozo, 10 µL de Rapamicina (2 000 ng/mL).

Vortexear y permitir que estas preparaciones se ambienten en la incubadora por aproximadamente 15 minutos.

3. Preparar células:

Lavar la placa de 6 pozos, 3 veces con 2 mL de PBS 1X estéril por pozo.

Agregar 2 mL de medio de ayuno preparado con DMSO o Rapamicina por pozo.

En este protocolo 8 horas después de ayunar, se refresca el medio de ayuno con DMSO o Rapamicina (16 horas restantes de tratamiento), pasado este tiempo estimular y procesar.

3) Estímulo 100X

SDF-1 α (5 μ g/mL Stock 1000X)

La concentración de trabajo es de 50 ng/mL, por lo que se toman 10 μ L por cada mL de medio de ayuno que se colocó en los pozos: *Knockdown control* y *Knockdown blanco*.

HGF (1 μ g/mL Stock 1000X)

La concentración de trabajo es de 10 ng/mL, por lo que se toman 10 μ L por cada mL de medio de ayuno que se colocó en los pozos.

Los estímulos se dejan actuar por 15 minutos, una vez agregados, se regresa la caja a la incubadora.

4) Lisis

1. Lavar 1 vez con 3 mL de PBS frío por pozo.
2. Retirar el PBS y agregar 500 μ L de Buffer de Lisis suplementado con los inhibidores y MgCl₂.
3. Incubar sobre el hielo 5 minutos y después raspar las células.
4. Colectar los lisados.
5. Centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C.
6. Colectar los sobrenadantes: 100 μ L para lisados totales (TCL) y 400 μ L para Pull-down (PD). A los 100 μ L se les agregan 34 μ L de Buffer de muestra 4X y se vortexean.

5) Pull-down

7. Los 400 μL se agregan a tubos donde previamente se colocaron 25 μL de perlas de Sefarosa-**RacG15A** para atrapar por afinidad al GEF P-REX1. Incubar por 45 minutos a 4°C.
8. Centrifugar a 5000 rpm, a 4°C por 2 minutos.
9. Lavar las perlas con 1 mL de Buffer de Lisis por tubo, vortexear por 5 segundos, centrifugar a 5000 rpm, a 4°C por 2 minutos y eliminar el sobrenadante. Repetir dos veces (3 lavados en total).
10. Agregar 30 μL de Buffer de muestra 1X-5% mercaptoetanol y vortexear.
11. Hervir por 5 minutos las dos series de tubos (TCL y PD), centrifugar a 13000 rpm, a temperatura ambiente, por 5 minutos y guardar a -20°C.

6) Western Blot

1. Correr gel SDS-PAGE.
2. Transferir a membrana Immobilon a 320 mA por 2.5 horas.
3. Bloquear con leche al 5% en TBS-T por 1 hora.
4. Incubar con anticuerpo a 4°C toda la noche.
5. Revelar con sustrato quimioluminiscente Millipore a una dilución 1/1.

*Diluciones de anticuerpos

A continuación, presentamos las diluciones en que se emplearon los distintos anticuerpos primarios y secundarios según el ensayo y las proteínas por detectar:

Anticuerpo primario	Dilución
P-REX1	1: 1000
p110 γ	1: 5000
G β ₁	1: 5000
Raptor	1: 5000
Rictor	1: 4000
mTOR	1: 10 000
p-AKT1/2/3 (Ser473)	1: 5000
AKT1	1: 10 000
p-ERK1/2 (T202/Y204)	1: 10 000
ERK2	1: 10 000
p-p70S6K	1: 4000
p70S6K	1: 4000
p-GSK3 β	1: 7000
GSK3 β	1: 7000
p-S6	1: 5000
S6	1: 20 000
p4E-BP1	1: 7000
4E-BP1	1: 10 000
GST	1: 1200
Anticuerpo secundario	Dilución
anti-mouse	1:10 000 – 1: 40 000
anti-rabbit	1:10 000 – 1: 40 000

Construcción: GST-mLST8

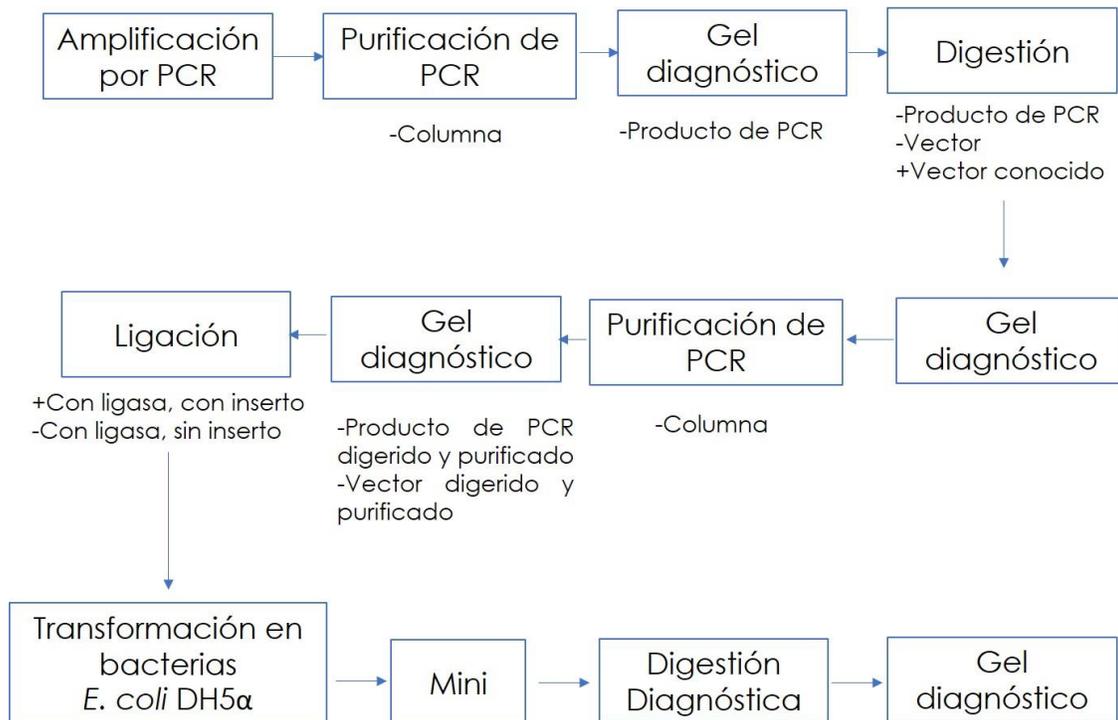


Figura 17. Diagrama de flujo general para la generación de una construcción. En este proceso se inicia con la amplificación por PCR del inserto desde un templado para introducirlo en el nuevo vector. Se verifica cada purificación, digestión y ligación con un gel diagnóstico. Posteriormente se transforman bacterias para que expresen la proteína de fusión.

1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se utilizó el kit Expand High Fidelity (Roche, cat. 1759175).

Esterilizar los tubos para PCR requeridos (exponer en la campana durante 10 minutos a radiación UV), en este caso fueron 3 tubos.

- PCR con templado blanco: HA-mLST8
- PCR sin templado (Control negativo)
- PCR con templado y oligos conocidos (Control positivo)

Mezcla de PCR

	Volumen	*HA-mLST8	*Agua PISA	*pCEFL-GST-N ter
Agua PISA	cbp 50 μL	35.5 μL	36.5 μL	35.5 μL
Buffer 10X + MgCl₂	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
dNTP's 50X	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
Primer 5'	1 μL (10 μM)	1 μL	1 μL	1 μL
Primer 3'	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
DMSO	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL
Betaína	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL
Templado: *	1 μL (25 ng/ μL)	1 μL	-	1 μL
Enzima	0.5 μL	0.5 μL	0.5 μL	0.5 μL

Los primers se diseñaron *in silico* y se ordenaron a SIGMA-ALDRICH:

Primer 5' (#WD07364184):

mLST8_5'_BamHI fw: ATAGGATCCATGAACACCTCCCCAGGCACG

Primer 3' (#WD07364185):

mLST8 3'_EcoRI rv: ATAGAATTCCTAGCCCAGCACACTGTCATTG

Programa de Termociclador (Mastercycler, nexus GSX1, Eppendorf):

Desnaturalización inicial: 94°C por 4 minutos

Desnaturalización	94°C por 60 segundos	} 35 ciclos
Hibridación	68°C por 60 segundos	
Extensión o Elongación	72°C por 2 minutos	

Elongación final 72°C por 5 minutos

Mantener a 4°C.

2. Purificación de productos de PCR por Columna

Se empleó el QIAquick PCR Purification Kit (250) (Quiagen, cat. 28106):

1. Agregar 150 μL de PBI a 30 μL de producto de PCR y mezclar (el PBI debe estar amarillo indicando pH 7.5).
2. Depositar la mezcla en una columna, en un tubo de 2 mL y centrifugar 60 segundos a 13 000 rpm.
3. Descartar el eluido.
4. Lavar la columna con 750 μL de PE que contenga etanol. Centrifugar 60 segundos a 13 000 rpm.
5. Secar la columna centrifugando una vez más.
6. Colocar la columna en un tubo de colección (1.5 mL) bien rotulado y agregar 30 μL de agua inyectable. Equilibrar 1 minuto la columna.
7. Centrifugar 60 segundos a 13 000 rpm y coleccionar el eluido.

3. Gel diagnóstico

1. Montar la cámara y enfriar a -20°C mientras se prepara el gel.
2. Preparar solución de agarosa para un gel de 1.5%. Pesar 600 mg de agarosa y disolver en 40 mL de TAE 1X (40mM Tris, 20mM Acetato y 2mM EDTA).
3. Calentar en microondas hasta observar la solución transparente.
4. Dejar enfriar un poco hasta que la temperatura sea soportable al tacto y agregar 4 μL de Bromuro de etidio, mezclar y vaciar en la cámara de electroforesis.
5. Colocar el peine y dejar gelificar por 10 minutos aproximadamente.
6. Después de que el gel solidificó, colocar en la cámara de electroforesis y agregar TAE 1X hasta cubrir completamente el gel.
7. Preparar las muestras. Mezclar 1 μL de Buffer Orange con 1 μL de muestra (DNA).
8. Cargar 1 μL de marcador de peso molecular (100 bp) y 2 μL de las muestras.
9. Correr el gel de agarosa a 70 mA por 20-30 minutos o hasta la separación adecuada de las muestras.

10. Para registro, encender BioDoc-It Imaging System. Ajustar el tiempo de captura a 1.2 segundos. Colocar el gel y ajustar contraste y resolución.
11. Encender luz UV y tomar foto. Guardar archivo desde plataforma.

4. Digestión

El producto de PCR purificado se deja digerir toda la noche:

	Volumen	mLST8	pCEFL-GST	pCEFL-GST-DEP1-PDZ2
Agua PISA	25 µL	13 µL	18 µL	25 µL
Buffer 10X: A	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL
cDNA	1 µL (300-1 000 ng)	13 µL	8 µL (800 ng)	2 µL (500 ng)
Enzima 1: BamHI	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
Enzima 2: EcoRI	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
Vol. total	30 µL	30 µL	30 µL	30 µL

Al día siguiente se corre un (5.) **Gel diagnóstico** del producto de PCR digerido (tal como en el punto 3), se realiza la (6.) **Purificación por Columna** del producto de PCR digerido (como en el punto 2) y un (7.) **Gel diagnóstico** del producto de PCR digerido purificado (como en el punto 3).

8. Ligación

Se empleó el Kit para ligación (Roche, cat. 11243292001):

	Volumen	mLST8	Agua PISA
Inserto	7.5 µL	7.5 µL	7.5 µL
Vector: pCEFL-GST	0.5 µL (puede ser diluido)	0.5 µL	0.5 µL
Buffer 10X	1 µL	1 µL	1 µL
Ligasa T4	1 µL	1 µL	1 µL
Vol. total	10 µL	10 µL	10 µL

Incubar a 16°C durante 16 horas.

9. Transformación en bacterias *E. coli* DH5α

1. Descongelar las bacterias ultracompetentes en hielo (tardan aproximadamente 10 minutos). A 50 µL de bacterias agregar 3 µL de ligación (1 µL de ligación control).
2. Incubar en hielo de 20 a 30 minutos.
3. Realizar choque térmico a 42°C durante 60 segundos.
4. Inmediatamente después incubar en hielo durante 10 minutos.
5. Agregar 300 µL de medio S.O.C (Invitrogen, cat. 14844-034) en campana.
6. Incubar con agitación en Orbital Shaker Incubator (mrc) a 180-200 rpm durante 1 hora a 37°C.
7. Centrifugar el cultivo a 6 000 rpm por 30 segundos.
8. Eliminar el sobrenadante y resuspender en 100 µL de medio con antibiótico (Ampicilina).
9. Plaquear todo el sobrenadante en placa con el antibiótico correspondiente (Ampicilina).
10. Incubar las placas por 12-14 horas en horno, a 37°C.
11. Al día siguiente revisar crecimiento de colonias en las placas y mantener en refrigeración hasta el momento de seleccionar colonias a expandir.
12. Picar colonias e inocular en 5 mL de medio con el antibiótico pertinente.
13. Incubar con agitación en Orbital Shaker Incubator (mrc) a 180-200 rpm durante 12-14 horas a 37°C.
14. Al día siguiente retirar del shaker y guardar en refrigeración, o bien, comenzar la Mini.

10. Mini

Antes de realizar la Mini, preparar glicerol(es). Se diluyen 250 µL de DNA en 250 µL de Glicerol al 30%.

Se empleó el Kit GenElute Plasmid Miniprep Kit (SIGMA-ALDRICH, Pcode 1001579043):

1. Centrifugar tubos con tapón en SORVALL RT7 a 2300 rpm, por 5 minutos, a temperatura ambiente.

2. Retirar sobrenadante.
3. Agregar 200 μL de *Solución de Resuspensión con RNAasa*.
4. Vortexear lentamente hasta resuspender el pellet.
5. Transferir a tubo eppendorf (1.5 mL). Agregar 200 μL de *Buffer de Lisis*. Invertir 7 veces lentamente (No vortexear).
6. Agregar 350 μL de *Solución de Neutralización*. Invertir 7 veces de manera leve. No exceder este tratamiento por más de 5 minutos.
7. Centrifugar a 13 000 rpm por 10 minutos, a temperatura ambiente para obtener lisados celulares.
8. Preparar la columna. En un tubo de colección (2 mL) colocar la columna y agregarle 500 μL de *Solución de Preparación de columna*.
 - a. Centrifugar a 13 000 rpm por 1 minuto, a temperatura ambiente.
 - b. Desechar el eluato.
9. Transferir lisados a la columna
10. Dejar reposar por 1 minuto.
11. Centrifugar a 13 000 rpm por 1 minuto, a temperatura ambiente.
12. Desechar el eluato.
13. Volver a centrifugar y desechar el eluato.
14. Transferir columna a un nuevo tubo eppendorf (1.5 mL).
15. Eluir con 50 μL de Agua PISA.
16. Dejar reposar por 2 minutos.
17. Centrifugar a 13 000 rpm por 1 minuto, a temperatura ambiente.
18. Colectar el eluato.
19. Cuantificar el DNA.
 - a. Preparar una dilución 1:50 y cuantificar DNA en Espectrofotómetro (Biomate 3S UV-Visible Spectrophotometer, Thermo Scientific).
 - b. Rotular perfectamente el tubo con datos de concentración (λ) y pureza.

11. Digestión Diagnóstica

	Volumen	pCEFL-GST- mLST8 1 (0.25λ)	pCEFL-GST- mLST8 2 (0.25λ)	pCEFL-GST- N ter (0.25λ)
Agua Pisa	4.8 μL	4.8 μL	4.8 μL	4.8 μL
Buffer 10X: A	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
cDNA	4 μL (1 000 ng)	4 μL (1 000 ng)	4 μL (1 000 ng)	4 μL (1 000 ng)
Enzima 1: BamHI	0.1 μL	0.1 μL	0.1 μL	0.1 μL
Enzima 2: EcoRI	0.1 μL	0.1 μL	0.1 μL	0.1 μL
Vol. total	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL

Por último, se realiza un (12.) **Gel Diagnóstico** para evaluar la liberación del inserto del vector en el que se introdujo.

VII. Resultados

Gβγ interactúa con P-REX1

Con la finalidad de evaluar a P-REX1 como plataforma para Gβγ y PI3Kγ se analizó de manera independiente la asociación entre distintos dominios del GEF, el heterodímero Gβγ y la cinasa, al transfectarlos en células HEK-293T.

Al mapear la interacción entre Gβγ y P-REX1 se encontró que sucede en dos regiones independientes del GEF, con los dominios DH-PH y los PDZ-PDZ (Fig. 18, panel izquierdo, segundo y cuarto carriles). De los tándems evaluados, Gβ₁γ₂ (detectado por western blot anti Gβ₁) exhibió una asociación mayor a los PDZ-PDZ que al casete catalítico DH-PH.

Esto demuestra que los heterodímeros Gβγ son capaces de interactuar con P-REX1 y que lo hacen a través de dos sitios distintos, ampliando las posibilidades de este GEF de integrar señales de subunidades Gβγ liberadas por activación de GPCRs.

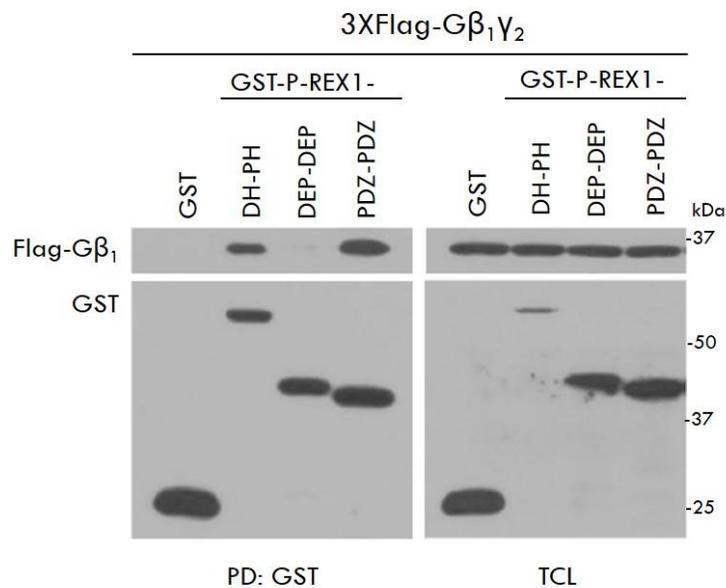


Figura 18. Gβ₁γ₂ interactúa en dos regiones de P-REX1. Se transfectaron células HEK-293T con los plásmidos de GST-P-REX1, 3XFlag-Gβ₁ y Gγ₂. A través de ensayos de pull-down se determinó la asociación de Gβ₁γ₂ con los dominios DH-PH y PDZ-PDZ de P-REX1.

PI3K γ (p110 γ) interactúa con P-REX1

Para evaluar a P-REX1 como facilitador de la interacción entre G $\beta\gamma$ y PI3K γ se analizó, en células HEK-293T, la asociación entre distintos dominios del GEF y la cinasa.

El mapeo de la interacción entre PI3K γ y P-REX1 evidenció que la subunidad catalítica p110 γ fue capaz de asociarse a la región amino terminal del GEF y dicha asociación fue incluso mayor a la de los diferentes dominios analizados por separado (Fig. 19, panel izquierdo, segundo carril). De las diferentes secciones del GEF, los dominios DEP1-PDZ2 mostraron una mayor interacción con p110 γ (Fig. 19, panel izquierdo, quinto carril) que el módulo DH-PH y los dominios PDZ1-PDZ2.

Estos resultados indican que hay una interacción de la PI3K con P-REX1, por lo que este GEF puede desempeñarse como plataforma.

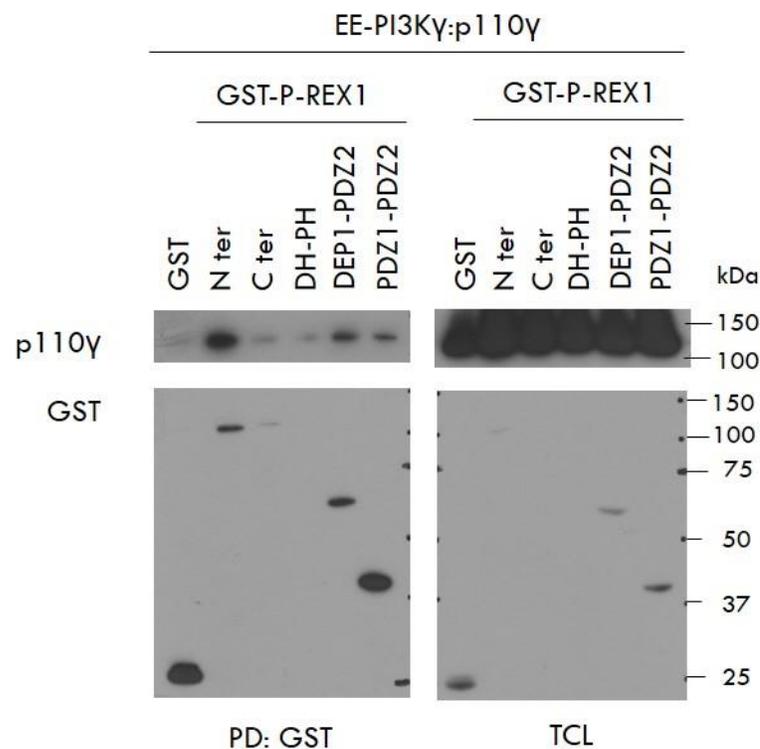


Figura 19. La subunidad catalítica p110 γ de PI3K γ interactúa con el N terminal de P-REX1. Las células HEK-293T se contranfectaron con GST o las construcciones de GST-P-Rex1 y p110 γ , la subunidad catalítica de PI3K γ para identificar la asociación de la cinasa con P-REX1 al precipitarlo por afinidad a la resina de glutatión sefarosa.

La activación por SDF-1 de las vías PI3K-AKT-mTORC1/2 y ERK es dependiente del tiempo

Con el fin de asegurar la activación de los componentes de la vía PI3K-AKT-mTORC1/2, vías alternas y la eficiencia del estímulo se llevaron a cabo curvas de activación con SDF-1 en células MCF-7.

Se activaron las vías de mTORC2, mTORC1 y ERK (Fig. 20). Uno de los efectores de mTORC2 es AKT, al ser fosforilada en la S473 alcanzó su máxima activación y fosforiló a uno de sus sustratos como GSK3 β . AKT y GSK3 β tuvieron su pico de activación a los 5'. mTORC1 tiene como efectores a S6K, cinasa que fosforila a la proteína ribosomal S6, y a 4E-BP1. S6 se activó a los 15' y 4E-BP1 a los 5'. Con SDF-1 también se activó la vía de las MAPK, caracterizada por la fosforilación de ERK que tuvo su máxima activación a los 5'.

En conjunto estos resultados validan la utilización de las células MCF-7 para evaluar las vías de señalización relevantes al proyecto e incluso otras que sirven como control.

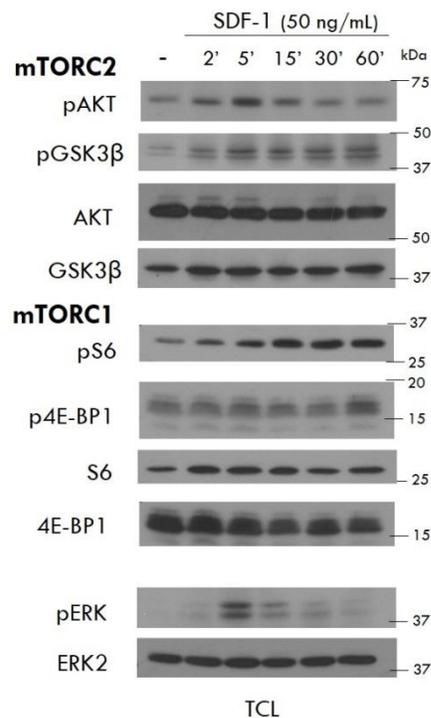


Figura 20. SDF-1 activa las vías de mTORC1, mTORC2 y ERK. Células MCF-7 ayunadas se estimularon con la quimiocina SDF-1 (50 ng/mL) a los 2 min, 5 min, 15 min, 30 min y 60 min, posteriormente se evaluó la activación de diferentes vías con anticuerpos específicos.

Gβγ, AKT y Rictor (componente de mTORC2), interactúan con P-REX1 activo

Para constatar que P-REX1 forma parte de la vía de señalización de SDF-1/CXCR4 y que sirve de plataforma para Gβγ, PI3Kγ y mTORC1/2 se realizaron ensayos de pull-down de lisados de células MCF-7 estimuladas por SDF-1. Se analizaron las proteínas asociadas y la fosforilación de proteínas de la vía y de efectores para comprobar que el GEF promueve la actividad catalítica de las mismas debido al acercamiento que les proporciona.

En la cascada de señalización provocada por SDF-1 se activó el RacGEF P-REX1 a los 15'. En la fracción del GEF activo se encontraron asociadas a las proteínas que forman parte de la vía propuesta, como Gβ, Rictor y AKT, las cuales coincidieron con el pico de activación de P-REX1 (Fig. 21, panel izquierdo, parte superior). En lisados totales se demostró la fosforilación de sustratos tanto de mTORC1 como de mTORC2 y la activación de ERK (Fig. 21, panel derecho).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que el GEF P-REX1 tiene un papel como plataforma para la señalización entre Gβγ y mTORC2 y que el aislamiento de esta fracción no afecta la activación de otras vías.

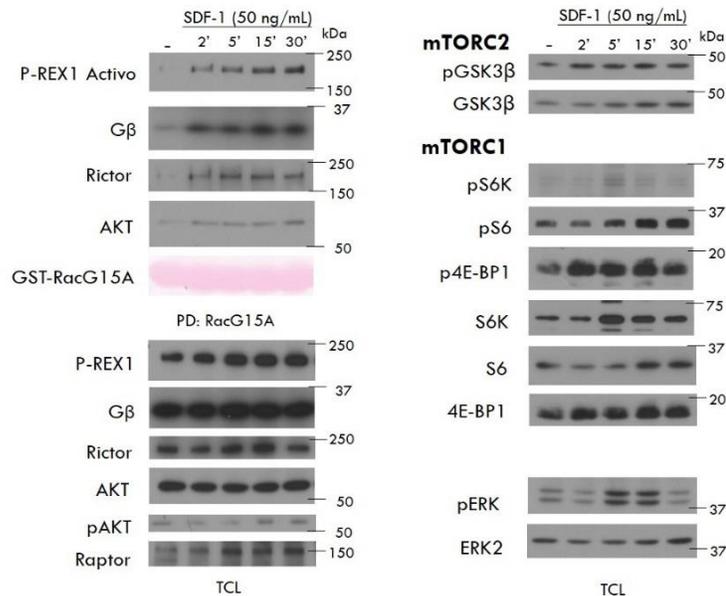


Figura 21. Gβγ, Rictor y AKT pueden asociarse a la fracción activa de P-REX1. Se estimularon células MCF-7, previamente ayunadas, con SDF-1 (50 ng/mL) y se aisló la fracción activa de P-REX1 al precipitarlo por afinidad a la GTPasa RacG15A (libre de nucleótido). Se detectó la asociación y activación de proteínas con anticuerpos específicos.

P-REX1 funciona como plataforma para mTORC2

Para evaluar a P-REX1 como efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC1/2 una de las estrategias consiste en llevar a cabo su silenciamiento (*knockdown*) y analizar el nivel de inhibición del GEF y si se afecta la asociación con proteínas de la vía.

El *knockdown* de P-REX1 reveló una menor actividad del GEF ante los estímulos (SDF-1, HGF) y puso a prueba la asociación de las proteínas de la vía propuesta, como consecuencia de una menor expresión y activación de P-REX1 se vio disminuida la asociación de $G\beta\gamma$, de Rictor y de AKT (Fig. 22, panel izquierdo, parte superior). En la activación de AKT hubo un efecto que sugiere que la expresión de P-REX1 es necesaria para coordinar la señalización de mTORC2 hacia su sustrato (Fig. 22, panel derecho, quinto carril respecto al segundo).

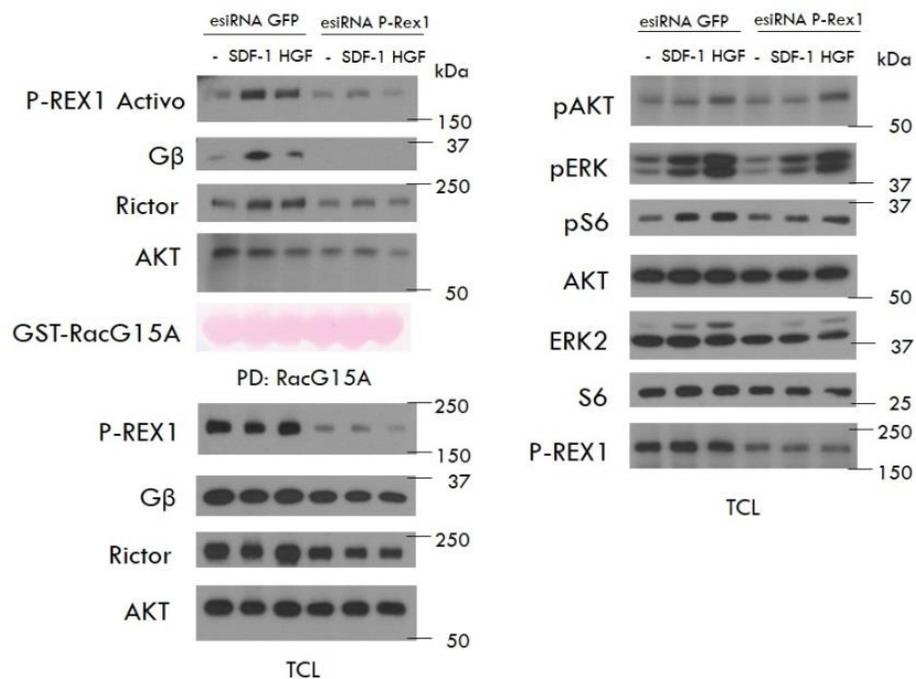


Figura 22. P-REX1 es una plataforma responsable de reunir a $G\beta\gamma$, Rictor y AKT requerida para coordinar la señalización de mTORC2. Células MCF-7 se transfectaron con esiRNA GFP y esiRNA P-REX1. Tras el ayuno de 24 horas, se estimularon las células con SDF-1 (50 ng/mL) o HGF (10 ng/mL) por 15 minutos para después llevar a cabo ensayos de activación de P-REX1 y revelar con anticuerpos específicos a proteínas de la vía y evaluar su activación por fosforilación de sustratos.

Estos resultados son compatibles con nuestra propuesta de que P-REX1 actúa como plataforma de esta vía, el *knockdown* disminuyó significativamente la expresión del GEF y

provocó que ante menor cantidad de plataforma y menor activación hubiera menos asociación de $G\beta\gamma$, de Rictor y de AKT a P-REX1.

P-REX1 es un efector de mTORC2

Además del aspecto de plataforma, para evaluar si P-REX1 es efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC1/2 otra estrategia consiste en la inhibición de alguno de estos componentes, lo que debería afectar la activación de P-REX1. Elegimos un tratamiento crónico con rapamicina que inhibe los dos complejos formados por mTOR para después evaluar cómo se afecta la actividad del GEF, la asociación con proteínas del complejo propuesto y la activación de sus efectores.

El tratamiento crónico con rapamicina, a diferencia del de DMSO, evidenció que P-REX1 es un efector de mTORC2. La interferencia de la señalización de mTORC2 disminuyó la activación de P-REX1, lo que lo colocó abajo del complejo, y se afectó la asociación con Rictor y, en menor proporción, con AKT (Fig. 23, panel izquierdo, parte superior). La fosforilación de sustratos de mTORC2 se vio inhibida (Fig. 23, panel de en medio), así como la de sustratos de mTORC1 (Fig. 23, panel derecho) y no se afectó la vía de ERK.

Por lo tanto, P-REX1 es un efector de mTORC2 cuya inhibición afecta la actividad del GEF e impacta también en su función de plataforma.

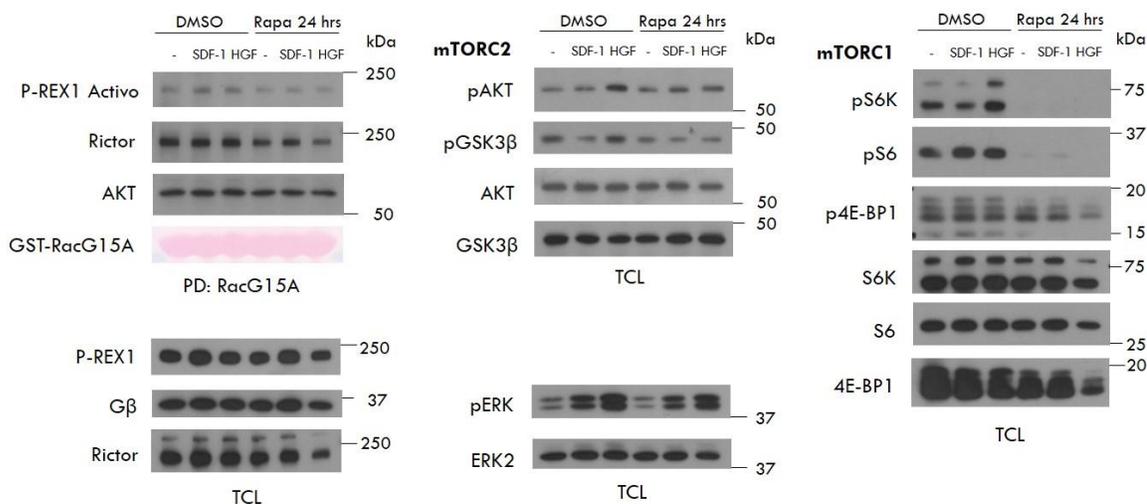


Figura 23. P-REX1 se localiza río abajo mTORC2. Se ayunaron y pretrataron células MCF-7 con rapamicina (20 ng/mL) por 24 horas, se estimularon con SDF-1 (50 ng/mL) o HGF (10 ng/mL) por 15 minutos y se realizaron ensayos de activación del GEF P-REX1. Se determinó la asociación de proteínas de la vía y la activación de sustratos (fosforilación) de mTORC1/2 con anticuerpos específicos.

Construcción GST-mLST8 como estrategia para aislar a los complejos mTORC1/2

Como parte de este proyecto de maestría se buscó generar una construcción que a futuro nos permitiera contar con una estrategia alternativa para el aislamiento de los complejos macromoleculares que hemos venido caracterizando. Decidimos enfocarnos en mLST8 después de realizar un análisis del complejo mTORC2 desde una perspectiva estructural. La construcción consistió en la proteína de fusión GST-mLST8 con la finalidad de emplearla, en estudios a realizar durante el doctorado, como una estrategia complementaria al tratamiento con rapamicina para aislar solamente a uno de los complejos y buscar a P-REX1 asociado.

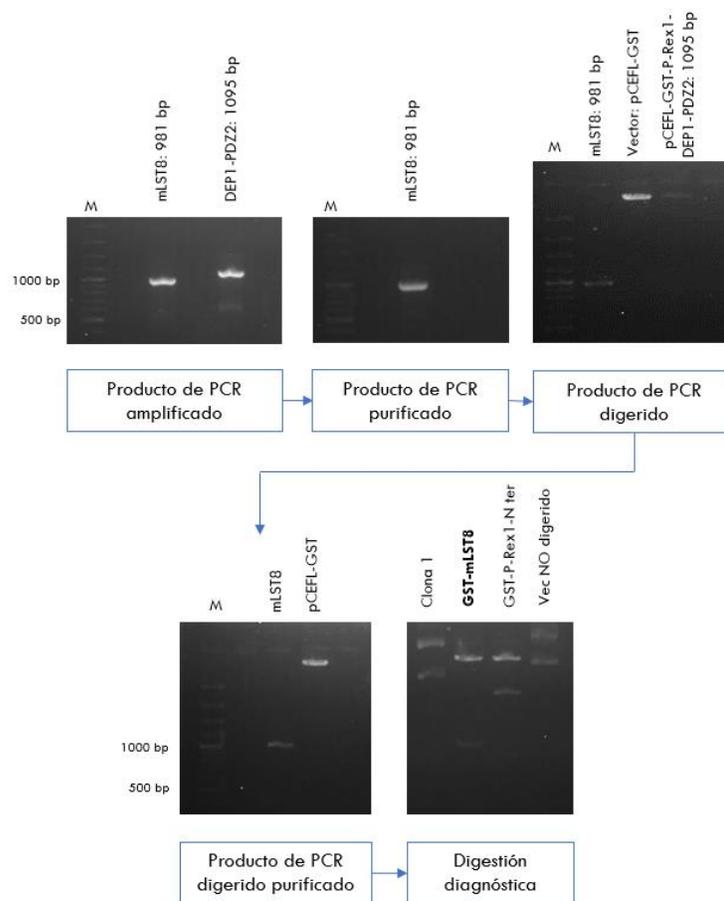


Figura 24. Subclonación de mLST8 del vector pRK5-HA a pCEFL-GST. mLST8 se amplificó por PCR y se purificó. mLST8 y el vector pCEFL-GST se digirieron con la combinación BamHI, EcoRI para llevar a cabo la ligación. Posteriormente se transformaron bacterias y se realizaron minis de dos colonias. Se realizó una digestión diagnóstica para asegurar la liberación del inserto (mLST8) del vector donde se introdujo (pCEFL-GST).

Se subclonó mLST8, componente de mTORC1/2, a partir de HA-mLST8 por amplificación por PCR y en cada paso del proceso se aseguró el mantenimiento de los productos purificados, digeridos y ligados como se muestra en la Fig. 24.

Una vez que se confirmó la obtención de GST-mLST8 de una de las clonas (la segunda) se transfectó el plásmido en células HEK-293T para determinar su expresión. En la Fig. 25 se muestra la expresión de GST-mLST8 en lisados totales (panel a la derecha) y la efectividad del pull-down con glutatión-sefarosa (panel de en medio).

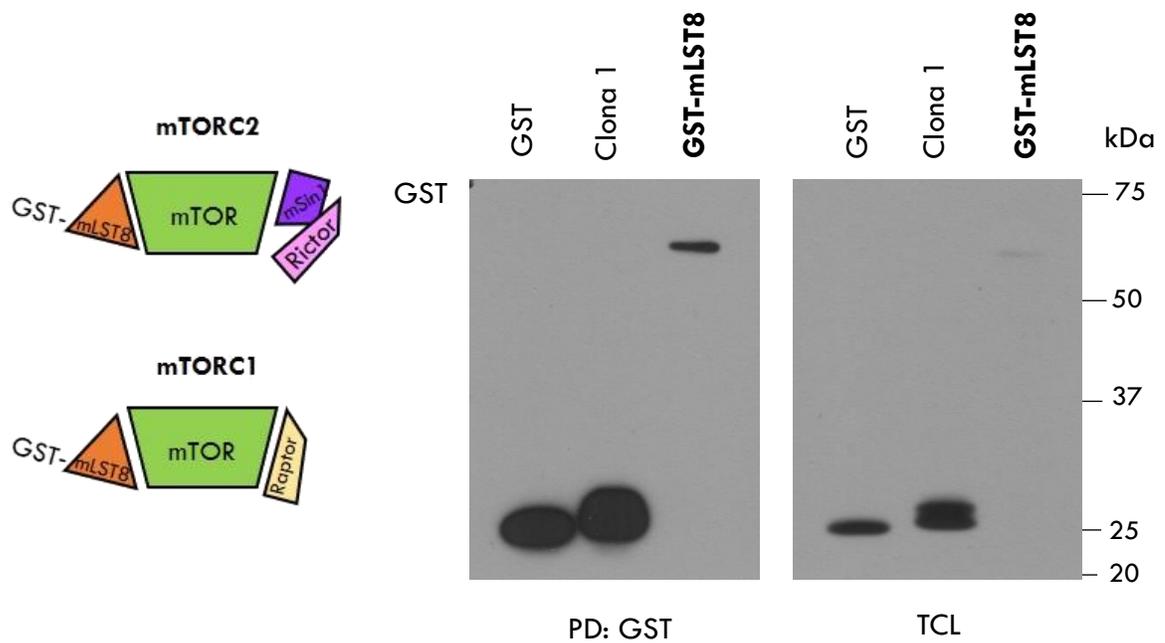


Figura 25. Expresión de GST-mLST8 en células HEK-293T. Se logró detectar a GST-mLST8 en lisados totales y precipitarla por afinidad. La clona 1 corresponde a una de las colonias y se tomó como control negativo.

Una vez que se optimicen las condiciones de transfección se procederá a validar a GST-mLST8 por medio de ensayos de pull-down y buscando a los componentes de mTORC1/2 como se muestran en el modelo (Fig. 25, panel izquierdo).

VIII. Discusión

En este trabajo demostramos que en respuesta a la activación de receptores CXCR4, P-REX1 puede desempeñarse como plataforma y efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC1/2. Encontramos que estas proteínas pueden interactuar directamente con P-REX1, utilizándolo como plataforma y que este RacGEF es efector de la vía, es decir, P-REX1 forma parte de una cascada de transducción que él mismo facilita al integrar a las proteínas de la vía. Postulamos que como consecuencia de la activación de receptores CXCR4 se establece una señalización más efectiva al utilizar a P-Rex1 como plataforma y efector para regular la dinámica del citoesqueleto de actina durante la migración celular.

$G\beta\gamma$ interactúa con P-REX1

A partir del reconocimiento del heterodímero $G\beta\gamma$ como una subunidad capaz de activar efectores³³ se ha estudiado si la superficie que se establece con uno de ellos es idéntica al resto. A menudo hay áreas que se superponen en parte, más no en su totalidad²³. A diferencia de lo reportado desde la primera vez que se caracterizó a P-REX1 siendo activado por $G\beta\gamma$ y PIP3, nuestros resultados indican que además del DH-PH, la subunidad $G\beta\gamma$ puede interactuar con los dominios PDZ-PDZ de P-REX1 (Fig. 18).

Esto implica que el mismo o diferentes heterodímeros $G\beta\gamma$ pueden establecer múltiples contactos con el GEF que contribuyen al reclutamiento y/o activación de P-REX1. Por su disposición basal (P-REX1 citosólico y autoinhibido) consideramos más probable que el primer contacto lo establezca $G\beta\gamma$ con los PDZ-PDZ y posteriormente con el DH-PH. Al analizar ambos contactos podemos suponer que los heterodímeros $G\beta\gamma$ activos y asociados a la membrana pueden fijar a P-REX1 en esta misma zona.

Debido a los dos sitios independientes de interacción entre P-REX1 y $G\beta\gamma$ resulta prometedora la utilización de péptidos bloqueantes como los inhibidores diferenciales derivados de la proteína tipo fosducina (PhLP)³⁴, el C terminal de GRK2^{35,36}, y los propios dominios de P-REX1 que por competencia pudieran desplazar al GEF endógeno, para interrumpir la señalización desde los primeros contactos de P-REX1 con $G\beta\gamma$, pero no la de este heterodímero con el resto de sus efectores.

PI3K γ (p110 γ) interactúa con P-REX1

Desde la caracterización de P-REX1 se conoce su sensibilidad a PIP3 para ser activado³⁷. La producción de este segundo mensajero lipídico depende de las PI3K de clase I, por lo que estas cinasas se han visto involucradas de manera indirecta. Más allá de ese primer hallazgo, nuestros resultados revelaron una aportación directa, pues la subunidad catalítica p110 γ es capaz de interactuar con la región N terminal de P-REX1, en la que se ubican varios de los dominios que caracterizan a este GEF (Fig. 19). Esto resulta coherente si se compara con la región C terminal, pues la complejidad de la región amino, con sus múltiples dominios, parece determinar la habilidad de P-REX1 para interactuar con otras proteínas.

La relevancia de esta nueva interacción recae en un tipo de circuito positivo donde la interacción P-REX1-PI3K γ puede promover la activación del GEF a través de la producción de PIP3, es decir, la función de plataforma estimula la de efector.

Respecto a los análisis estructurales de P-Rex1, que incluyen al módulo catalítico en complejo con la GTPasa Rac, descritos por Lucato²¹ y Cash²², nuestros resultados apoyan el mecanismo descrito por la primera, en el sentido en que P-REX1 es activado por G $\beta\gamma$ y PIP3, pero de acuerdo a nuestros hallazgos estas interacciones se van estableciendo a medida que se reciben los estímulos y cada interacción contribuye al desplazamiento del C terminal, permitiendo la extensión del GEF.

Adicionalmente, resultará útil el empleo de distintas construcciones de los dominios del amino terminal de P-REX1 fusionadas a GFP para identificar los que promuevan la actividad catalítica de PI3K γ , esta puede detectarse por microscopía de fluorescencia con un biosensor como PH-AKT-mRFP que reconoce el PIP3 producido. Además, puede analizarse la activación de AKT (pAKT) como un efecto indirecto de la actividad de la cinasa de lípidos.

La activación por SDF-1 de las vías PI3K-AKT-mTORC1/2 y ERK es dependiente del tiempo

Las células MCF-7 pertenecen a una línea celular de cáncer de mama no metastásico que ha sido ampliamente estudiada por su perfil molecular³⁸ y para el desarrollo de este proyecto encontramos que constituyen un buen modelo ya que las proteínas de nuestro interés se expresan de forma endógena. Estas células resultan ideales para estimular con SDF-1 y detectar la activación de las vías de interés y vías alternas que sirven como control. Encontramos las vías de PI3K-AKT-mTORC1, PI3K-mTORC2-AKT y la de las MAPK activadas a través del reconocimiento de proteínas fosforiladas con anticuerpos específicos (Fig. 20).

La validación del uso de esta línea celular también es con motivo del buen nivel de expresión que contiene de P-REX1³⁹.

Gβγ, AKT y Rictor (componente de mTORC2), interactúan con P-REX1 activo

P-REX1 forma parte de la señalización de SDF-1/CXCR4 en angiogénesis¹³. De forma similar, en células MCF-7, los receptores CXCR4 conducen a la activación de P-REX1. Lo más interesante en nuestros resultados fue que en la fracción activa de P-REX1 se encontraron asociadas proteínas de la vía como Gβγ, Rictor y AKT, estos dos últimos componente y blanco de mTORC2, respectivamente (Fig. 21). Esto implica que cuanto más activo se detectó a P-REX1, mayor asociación se observó de tales proteínas. Podemos asumir que la activación del GEF se relaciona con una mayor disposición y/o exposición de sus dominios, lo que le permite la asociación con las proteínas encontradas. Otra alternativa es que se trate de diferentes poblaciones de P-REX1 activo con distintos estados de desdoblamiento y disposición para que las proteínas se asocien a él.

De forma sorprendente, la cinasa AKT presente en el complejo con P-REX1 no se encontró fosforilada (pAKT). Esto podría reflejar la dinámica de su activación. P-REX1 activo, con Gβγ y mTORC2 asociados, podría tener a AKT interactuando como parte de la presentación del sustrato a mTORC2, pero una vez que esta cinasa es activada (fosforilada en la Ser473⁴⁰) es desplazada por más cinasa inactiva, lo que sería compatible con la función propuesta para P-REX1 como una plataforma que favorece la actividad de la vía que conduce a la posible fosforilación de AKT asociada a P-REX1 activo.

Nuestros esfuerzos por detectar a p110 γ endógena en la fracción activa de P-REX1 y en lisados totales de células MCF-7 fueron infructuosos, lo que contrasta con el análisis de P-REX1 como efector de la señalización de receptores ErbB2³⁹, donde por inhibición farmacológica de PI3K γ y *knockdown* de la subunidad catalítica p110 γ determinan la participación de la cinasa en células MCF-7. En contraparte, nuestros resultados coinciden con la identificación de PI3K γ como blanco para suprimir migración e invasión de células de cáncer de mama. Aparentemente existe una correlación entre los niveles de expresión de PI3K γ y la migración metastásica de células de cáncer de mama. En las líneas celulares metastásicas MDA-MB-231 y MDA-MB-436 se detecta una mayor expresión de esta cinasa, en contraste con MCF-7 que carece de capacidad metastásica⁴¹. Podemos descartar la eficiencia del anticuerpo, pues es el mismo que utilizamos para detectar a p110 γ transfectada en células HEK-293T, pero desconocemos si el anticuerpo reconoce específicamente a esta clase de PI3K y no a otras y que eso sea lo que muestra.

P-REX1 funciona como plataforma para mTORC2

P-REX1 puede encontrarse asociado tanto a mTORC1 como a mTORC2, pero solamente en complejo con el segundo puede detectarse activo²⁸, por lo que tiene sentido encontrar a Rictor y a AKT cuando aislamos la fracción de P-REX1 activo.

P-REX1 es la plataforma responsable de reunir a G $\beta\gamma$, Rictor y AKT dado que el *knockdown* de este GEF disminuyó significativamente la asociación de estas proteínas (Fig. 22, panel izquierdo, parte superior). Esta disminución se detectó para las tres proteínas, pero parece haber una jerarquía entre ellas. En primera instancia se ve afectada la asociación de G $\beta\gamma$, después la de Rictor y en menor proporción la de AKT. Cabe la posibilidad de la existencia de poblaciones de P-REX1 activo con G $\beta\gamma$ asociada que son más sensibles a la disminución del GEF y su activación, y otras poblaciones de P-REX1 activo con mTORC2 asociado y su sustrato AKT cuya asociación persiste o resiste más al *knockdown*, aunque haya menos GEF activo.

En cuanto a la expresión total de G β , Rictor y AKT (Fig. 22, panel izquierdo, parte inferior) donde el *knockdown* de P-REX1, pero no el de GFP, parece tener un efecto negativo, puede interpretarse como consecuencia de la disminución de P-REX1 que desestabiliza a las

proteínas antes asociadas y causa una mayor degradación de estas. Si bien no todas las proteínas detectadas se vieron disminuidas en los lisados totales, en este punto no podemos descartar que la baja expresión de algunas proteínas en las células *knockdown* de P-REX1 pudiera deberse a un efecto más general que afecte la cantidad de células en la preparación, o bien la expresión general de varias proteínas. El primer escenario apoyaría la participación de P-REX1 como plataforma, pues al disminuir su expresión se ve afectada la de G β , Rictor y AKT incluso en lisados totales.

Respecto a la vía de las MAPK como control positivo, el *knockdown* de P-REX1 no afectó la activación de ERK (pERK) (Fig. 22, panel derecho, parte inferior). Si bien la amplificación de señal por SDF-1/CXCR4 activa a ERK, que dependa de P-REX1 es debatible. De acuerdo con nuestros hallazgos se trata de una vía independiente y que sirve de control de estímulo, aunque se interfiera con P-REX1 (*knockdown*) se observa activación de ERK.

P-REX1 puede integrar señales de receptores CXCR4 y ErbB2/3³⁹. Existe comunicación cruzada entre efectores activados por ambos tipos de receptores, como P-REX1-Rac-PAK y MEK/ERK, respectivamente. En el primer caso el GEF se situaría río arriba de ERK e implica su participación en proliferación celular y transformación. Desde esta perspectiva resultaría útil la intervención terapéutica a nivel de MAPK en tumores de cáncer de mama que sobreexpresan a P-REX1⁴².

Otro mecanismo propuesto consiste en un asa de retroalimentación positiva de Rac hacia PI3K⁴³. Tanto GPCRs como receptores con actividad de tirosín cinasa (RTKs) contribuyen a la producción de PIP3 a través de PI3K β y PI3K α , respectivamente. Con la activación de GPCRs se liberan subunidades G $\beta\gamma$ y se activa P-REX1, llevando a la activación de la GTPasa Rac. Esta tiene cuatro destinos: 1) activar a PI3K β (RBD en p110 β) causando mayor producción de PIP3; 2) activar a PAK y vincularse a la vía de las MAPK a través de Raf; 3) interactuar con pERK y 4) promover el remodelado del citoesqueleto de actina. Si nos enfocamos en la primera acción, el asa de Rac hacia PI3K β crea una continua y mayor activación de P-REX1, Rac, PI3K y, en caso de comunicación cruzada, mayor activación de pERK. En estas condiciones, el nivel de P-REX1 se correlaciona inversamente con la actividad de PI3K y positivamente con la expresión de ER (receptores de estrógenos) en tumores humanos de cáncer de mama, por lo que la intervención P-REX1-Rac puede afectar tanto la señalización de PI3K como la de ERK⁴⁴.

En contraste con estos reportes y en concordancia con la determinación del no requerimiento de P-REX1 para la activación de la vía de las MAPK en células de cáncer de mama luminal, donde P-REX1 es necesario para la activación de Rac y la motilidad celular, pero no para mitogénesis ni para sobrevivencia⁴⁵, nuestros hallazgos apoyan la independencia de P-REX1 en la señalización hacia ERK.

Así que P-REX1 actúa como plataforma de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC2, ya que el *knockdown* disminuyó significativamente la asociación de $G\beta$, de Rictor y de AKT, sin afectar a ERK.

El concepto de plataforma para los GEFs no es nuevo, pero ha tomado relevancia por las diferentes posibilidades de interacción gracias a la estructura multidominio que poseen. Más allá de su actividad catalítica de GEF, de intercambiar *GDP* por *GTP* para activar a GTPasas, los GEFs pueden establecer múltiples contactos y servir como integradores de la actividad de las proteínas que reúnen. Este concepto también puede aplicarse para otras proteínas, como JIP1 y WDR26. JIP1 se considera una plataforma para los componentes de la vía JNK (*c-Jun NH2-terminal kinase*) estimulada por ácidos grasos saturados como palmitato. JIP1 es una proteína que puede tener varias fosforilaciones en residuos de tirosinas y estas sirven de anclaje para los dominios SH2 de Src y VAV. Al acercarse a estas proteínas facilita la fosforilación y activación de VAV por Src, lo que activa a Rac y esta a la vía de JNK a través de MLK que contiene un dominio CRIB (PAKN)⁴⁶. Otro ejemplo es WDR26, esta es una proteína WD40 que puede funcionar como plataforma para $G\beta\gamma$ -PI3K β -AKT2 al interactuar con cada una de estas proteínas, volviendo más eficiente su activación. Al encontrarse sobreexpresada en líneas de cáncer de mama promueve el crecimiento tumoral, la migración y la invasión dependiente de GPCRs⁴⁷.

P-REX1 es un efector de mTORC2

La inhibición del complejo mTORC2 con rapamicina por 24 horas afecta el ensamblado de sus componentes, lo que interrumpe la señalización hacia sus efectores⁴⁸. P-REX1 es uno de ellos según observamos en los experimentos en los que el tratamiento crónico con rapamicina afectó su activación, la asociación con proteínas de la vía y la activación de

efectores de ambos complejos (Fig. 23). El tratamiento tuvo mayor impacto para disminuir la asociación de Rictor que la de AKT (Fig. 23, panel izquierdo, parte superior). Desafortunadamente no se pudo detectar la asociación de $G\beta\gamma$ ni siquiera en la condición control (DMSO).

Si consideramos que el tratamiento crónico con rapamicina afecta el ensamblado de mTORC2, pero no disminuye la cantidad existente de cada componente, cabe la posibilidad de que Rictor se esté asociando a P-REX1 de manera directa, esto puede ponerse a prueba con ensayos complementarios, como inmunoprecipitaciones de Rictor o Raptor marcados con algún epítipo, con y sin el tratamiento correspondiente de rapamicina (crónico y agudo) para no aislar al resto de los componentes y posteriormente buscar si P-REX1 se une a Rictor o Raptor. También podría realizarse el *knockdown* de Rictor o Raptor y ensayos de pull-down empleando la construcción GST-mLST8 obtenida durante el desarrollo de este proyecto (Fig. 25).

Una limitación del enfoque empleado es la inhibición adicional de mTORC1 por la cronicidad del tratamiento, para determinar la contribución de este complejo pueden realizarse ensayos con un tratamiento agudo de rapamicina (de aproximadamente 1 hora)⁴⁹.

Otras estrategias que pueden emplearse para analizar a P-REX1 como efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC2 es la inhibición de PI3K γ con LY294002 y/o Wortmanina y los correspondientes ensayos de pull-down y western blot para determinar si los efectos ya encontrados respecto a P-REX1 impactan en la activación de Rac al ser su efector. Y de manera funcional, al promover la activación de P-REX1 por SDF-1 y teñir con faloidina podemos determinar su participación como plataforma y GEF en la reorganización del citoesqueleto de actina y las consecuencias en la morfología celular.

Con base en los resultados obtenidos demostramos que P-REX1 funciona como plataforma para $G\beta\gamma$, Rictor y AKT y es un efector de mTORC2, lo que implica que este GEF es capaz de organizar a estas proteínas haciendo que la comunicación entre ellas fluya mejor y que en el proceso se lleve a su propia activación.

El mecanismo que proponemos consiste en lo siguiente: tras el estímulo de SDF-1 se activan los receptores CXCR4 y posteriormente proteínas G_i , provocando la disociación de $G_{\alpha i}$, ahora con GTP , y el heterodímero $G\beta\gamma$. Por amplificación de la señal se pueden considerar suficientes $G\beta\gamma$ subunidades liberadas y disponibles para interactuar con efectores. Uno de ellos es P-REX1, quien usualmente se encuentra autoinhibido y de manera citosólica. En teoría, el primer desdoblamiento del GEF puede ser por algún heterodímero $G\beta\gamma$ que recluta a P-REX1 hacia la membrana a través de los dominios PDZ-PDZ. Ahí $G\beta\gamma$ podría reclutar a PI3K γ , misma que contribuiría con un segundo desdoblamiento por interacción directa con los dominios DEP-PDZ de P-REX1 y a un tercero de manera indirecta al producir PIP3 que atrae al PH. Por último, otra subunidad $G\beta\gamma$ acabaría de desdoblar al GEF en la zona de activación de la membrana y fijarlo de tal manera que se encuentre totalmente extendido y dispuesto para establecer otras interacciones como sus dominios DEP-DEP con mTOR y el DH para activar a Rac.

Demostramos que P-REX1 puede desempeñarse como plataforma y efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC2, volviendo prometedora la estrategia de intervenir en la señalización aberrante de células cancerosas con sobreexpresión de P-REX1 desde la proteína que reúne a los integrantes de la vía, en lugar de emplear tres inhibidores distintos, para $G\beta\gamma$, para PI3K γ y para mTORC2, se podría atacar a la que exacerba la comunicación entre ellas. Esto tendría beneficios terapéuticos en cáncer de mama.

IX. Conclusiones

1. $G\beta\gamma$ y la subunidad catalítica p110 γ de PI3K γ interactúan con diferentes dominios de P-REX1, apoyando la función de este RacGEF como plataforma organizadora de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC2.
2. P-REX1 como plataforma de señalización promueve la actividad catalítica PI3K γ y de ambos complejos de mTOR.
3. P-REX1 es una plataforma y efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTOR como lo revela la inhibición río arriba que interfiere con su actividad de GEF y la transducción de señal.

X. Perspectivas

Con el objetivo de ampliar y detallar el estudio de P-REX1 como plataforma de señalización y efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC1/2 se pretende profundizar los objetivos ya presentados:

1. *Estudiar a P-REX1 como la proteína que facilita la interacción directa entre $G\beta\gamma$ y PI3K γ al restringirlas en la zona de activación de la membrana.*

Detallar el mapeo de P-REX1 con $G\beta\gamma$ y con PI3K γ para determinar si la presencia del GEF promueve la activación de la cinasa al encontrarse más cerca de su activador, así como emplear péptidos bloqueantes (dominios de P-REX1 con los que se encontró asociación con estas dos proteínas) que por competencia logren disminuir la interacción y/o activación.

2. *Estudiar a P-REX1 como plataforma para la promoción de las actividades catalíticas de PI3K γ y mTORC1/2 reguladas por $G\beta\gamma$.*

Emplear la construcción GST-mLST8 para aislar ambos complejos de mTOR, al combinarlo con el tratamiento de rapamicina podemos seleccionar el complejo a precipitar (Tx. agudo: mTORC1, Tx. crónico: mTORC2) y buscar si se encuentra asociado P-REX1.

3. *Estudiar a P-REX1 como efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC1/2 y determinar el tipo de regulación que ejercen sobre el GEF.*

Llevar a cabo ensayos de migración celular para evaluar funcionalmente la estrategia inhibitoria de P-REX1 como plataforma.

XI. Referencias

1. Mayor R, Etienne-Manneville S. The front and rear of collective cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(2):97-109. doi:10.1038/nrm.2015.14.
2. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002;420(6916):629-635. doi:10.1038/nature01148.
3. Yamaguchi H, Condeelis J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2007;1773(5):642-652. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.07.001.
4. Duff D, Long A. Roles for RACK1 in cancer cell migration and invasion. *Cell Signal.* 2017;35:250-255. doi:10.1016/j.cellsig.2017.03.005.
5. Vazquez-Prado J, Bracho-Valdes I, Cervantes-Villagrana RD, Reyes-Cruz G. Gβγ Pathways in Cell Polarity and Migration Linked to Oncogenic GPCR Signaling: Potential Relevance in Tumor Microenvironment. *Mol Pharmacol.* 2016;90(5):573-586. doi:10.1124/mol.116.105338.
6. Ridley AJ. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 15):2713-2722. doi:10.1083/jcb.150.4.807.
7. Porter AP, Papaioannou A, Malliri A. Deregulation of Rho GTPases in cancer. *Small GTPases.* 2016;7(3):123-138. doi:10.1080/21541248.2016.1173767.
8. Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: New insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(9):690-701. doi:10.1038/nrm2476.
9. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 1998;279(5350):509-514. doi:10.1126/science.279.5350.509.
10. Wennerberg, K, Rossman, K L, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci.* 2005;118:843-846.
11. Barrio-Real L, Kazanietz MG. Rho GEFs and cancer: Linking gene expression and metastatic dissemination. *Sci Signal.* 2012;5(244):pe43. doi:10.1126/scisignal.2003543.
12. Cook DR, Rossman KL, Der CJ. Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene.* 2013;33(31):4021-4035. doi:10.1038/onc.2013.362.
13. Carretero-Ortega J, Walsh CT, Hernández-García R, Reyes-Cruz G, Brown JH, Vázquez-Prado J. 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. *Mol Pharmacol.* 2010;77(3):435-442. doi:10.1124/mol.109.060400.
14. O'Hayre M, Salanga CL, Handel TM, Allen SJ. Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem J.* 2008;409(3):635-649. doi:10.1042/BJ20071493.
15. Vega FM, Ridley AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett.* 2008;582(14):2093-2101. doi:10.1016/j.febslet.2008.04.039.
16. Welch HCE. Regulation and function of P-Rex family Rac-GEFs. *Small GTPases.* 2015;6(2):49-70. doi:10.4161/21541248.2014.973770.
17. Rossman KL, Der CJ, Sondek J. GEF means go: Turning on Rho GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(2):167-180. doi:10.1038/nrm1587.
18. Hill K, Krugmann S, Andrews SR, et al. Regulation of P-Rex1 by phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate and Gbetagamma subunits. *J Biol Chem.* 2005;280(6):4166-4173. doi:10.1074/jbc.M411262200.
19. Chávez-Vargas L, Adame-García SR, Cervantes-Villagrana RD, et al. Protein Kinase A (PKA) Type I interacts with P-Rex1, a Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor: EFFECT ON PKA LOCALIZATION AND P-Rex1 SIGNALING. *J Biol Chem.* 2016;291(12):6182-6199. doi:10.1074/jbc.M115.712216.
20. Barber MA, Donald S, Thelen S, Anderson KE, Thelen M, Welch HCE. Membrane translocation

- of P-Rex1 is mediated by G protein $\beta\gamma$ subunits and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.* 2007;282(41):29967-29976. doi:10.1074/jbc.M701877200.
21. Lucato CM, Halls ML, Ooms LM, et al. The phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1-Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (P-Rex1-Rac1) complex reveals the basis of Rac1 activation in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2015;290(34):20827-20840. doi:10.1074/jbc.M115.660456.
 22. Cash JN, Davis EM, Tesmer JJG. Structural and Biochemical Characterization of the Catalytic Core of the Metastatic Factor P-Rex1 and Its Regulation by PtdIns(3,4,5)P3. *Structure.* 2016;24(5):730-740. doi:10.1016/j.str.2016.02.022.
 23. Gulati S, Jin H, Masuho I, et al. Targeting G protein-coupled receptor signaling at the G protein level with a selective nanobody inhibitor. *Nat Commun.* 2018;9(1):1996. doi:10.1038/s41467-018-04432-0.
 24. Shymanets A, Prajwal, Vadas O, et al. Different inhibition of G $\beta\gamma$ -stimulated class IB phosphoinositide 3-kinase (PI3K) variants by a monoclonal antibody. Specific function of p101 as a G $\beta\gamma$ -dependent regulator of PI3K γ enzymatic activity. *Biochem J.* 2015;469(1):59-69. doi:10.1042/BJ20150099.
 25. Shymanets A, Prajwal, Bucher K, Beer-Hammer S, Harteneck C, Nürnberg B. p87 and p101 subunits are distinct regulators determining class I B phosphoinositide 3-kinase (PI3K) specificity. *J Biol Chem.* 2013;288(43):31059-31068. doi:10.1074/jbc.M113.508234.
 26. Brock C, Schaefer M, Reusch HP, et al. Roles of G beta gamma in membrane recruitment and activation of p110 gamma/p101 phosphoinositide 3-kinase gamma. *J Cell Biol.* 2003;160(1):89-99. doi:10.1083/jcb.200210115.
 27. Bracho-Valdés I, Moreno-Alvarez P, Valencia-Martínez I, Robles-Molina E, Chávez-Vargas L, Vázquez-Prado J. mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused. *IUBMB Life.* 2011;63(10):896-914. doi:10.1002/iub.558.
 28. Hernández-Negrete I, Carretero-Ortega J, Rosenfeldt H, et al. P-Rex1 links mammalian target of rapamycin signaling to Rac activation and cell migration. *J Biol Chem.* 2007;282(32):23708-23715. doi:10.1074/jbc.M703771200.
 29. Liu P, Gan W, Chin YR, et al. Ptdins(3,4,5) P3-dependent activation of the mTORC2 kinase complex. *Cancer Discov.* 2015;5(11):1194-1209. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0460.
 30. Ebner M, Sinkovics B, Szczygieł M, Ribeiro DW, Yudushkin I. Localization of mTORC2 activity inside cells. *J Cell Biol.* 2017;216(2):343-353. doi:10.1083/jcb.201610060.
 31. Robles-Molina E, Dionisio-Vicuña M, Guzmán-Hernández ML, Reyes-Cruz G, Vázquez-Prado J. G $\beta\gamma$ interacts with mTOR and promotes its activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;444(2):218-223. doi:10.1016/j.bbrc.2014.01.044.
 32. Barrio-Real L, Kazanietz MG. Rho GEFs and Cancer: Linking Gene Expression and Metastatic Dissemination. *Sci Signal.* 2012;5(244):pe43. doi:10.1126/scisignal.2003543.
 33. Ford CE, Skiba NP, Bae H, et al. Molecular basis for interactions of G protein $\beta\gamma$ subunits with effectors. *Science.* 1998;280(5367):1271-1274. doi:10.1126/science.280.5367.1271.
 34. Guzmán-Hernández ML, Vázquez-Macías A, Carretero-Ortega J, et al. Differential inhibitor of G $\beta\gamma$ signaling to AKT and ERK derived from phosphatidylinositol-like protein: Effect on sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration and in vitro angiogenesis. *J Biol Chem.* 2009;284(27):18334-18346. doi:10.1074/jbc.M109.008839.
 35. Bookout AL, Finney AE, Guo R, Peppel K, Koch WJ, Daaka Y. Targeting Gbetagamma signaling to inhibit prostate tumor formation and growth. *J Biol Chem.* 2003;278(39):37569-37573. doi:10.1074/jbc.M306276200.
 36. Cant SH. G Protein-coupled Receptor Kinase 2-mediated Phosphorylation of Ezrin Is Required for G Protein-coupled Receptor-dependent Reorganization of the Actin Cytoskeleton. *Mol Biol Cell.* 2005;16(7):3088-3099. doi:10.1091/mbc.E04-10-0877.
 37. Welch HCE, Coadwell WJ, Ellson CD, et al. P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell.* 2002;108(6):809-821. doi:10.1016/S0092-8674(02)00663-3.
 38. Comşa Ş, Cîmpean AM RM. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of

- Experience in Research. *Anticancer Res.* 2015;35:3147-3154.
39. Sosa MS, Lopez-Haber C, Yang C, et al. Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an Essential Mediator of ErbB Signaling in Breast Cancer. *Mol Cell.* 2010;40:877-892. doi:10.1016/j.molcel.2010.11.029.
 40. Yoon SO, Shin S, Karreth FA, et al. Focal Adhesion- and IGF1R-Dependent Survival and Migratory Pathways Mediate Tumor Resistance to mTORC1/2 Inhibition. *Mol Cell.* 2017;67(3):512-527. doi:10.1016/j.molcel.2017.06.033.
 41. Xie Y, Abel PW, Kirui JK, et al. Identification of upregulated phosphoinositide 3-kinase γ as a target to suppress breast cancer cell migration and invasion. *Biochem Pharmacol.* 2013;85(10):1454-1462. doi:10.1016/j.bcp.2013.03.001.
 42. Liu HJ, Ooms LM, Srijakotre N, et al. PtdIns(3,4,5)P3-dependent rac exchanger 1 (PREX1) Rac-guanine nucleotide exchange factor (GEF) activity promotes breast cancer cell proliferation and tumor growth via activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling. *J Biol Chem.* 2016;291(33):17258-17270. doi:10.1074/jbc.M116.743401.
 43. Yang HW, Shin MG, Lee S, et al. Cooperative Activation of PI3K by Ras and Rho Family Small GTPases. *Mol Cell.* 2012;47(2):281-290. doi:10.1016/j.molcel.2012.05.007.
 44. Dillon LM, Bean JR, Yang W, et al. P-REX1 creates a positive feedback loop to activate growth factor receptor, PI3K/AKT and MEK/ERK signaling in breast cancer. *Oncogene.* 2015;34(40):3968-3976. doi:10.1038/onc.2014.328.
 45. Barrio-Real L, Lopez-Haber C, Casado-Medrano V, et al. P-Rex1 is dispensable for Erk activation and mitogenesis in breast cancer. *Oncotarget.* 2018;9(47):28612-28624. doi:10.18632/oncotarget.25584.
 46. Kant S, Standen CL, Morel C, et al. A Protein Scaffold Coordinates SRC-Mediated JNK Activation in Response to Metabolic Stress. *Cell Rep.* 2017;20(12):2775-2783. doi:10.1016/j.celrep.2017.08.025.
 47. Ye Y, Tang X, Sun Z, Chen S. Upregulated WDR26 serves as a scaffold to coordinate PI3K/AKT pathway-driven breast cancer cell growth, migration, and invasion. *Oncotarget.* 2016;7(14):17854-17869. doi:10.18632/oncotarget.7439.
 48. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, et al. Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Mol Cell.* 2006;22(2):159-168. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.029.
 49. Ramirez-Rangel I, Bracho-Valdes I, Vazquez-Macias A, Carretero-Ortega J, Reyes-Cruz G, Vazquez-Prado J. Regulation of mTORC1 Complex Assembly and Signaling by GRp58/ERp57. *Mol Cell Biol.* 2011;31(8):1657-1671. doi:10.1128/MCB.00824-10.
 50. Cervantes-Villagrana RD, Adame-García SR, García-Jimenez I, Color-Aparicio VM, **Beltran-Navarro YM**, König G, Kostenis E, Reyes-Cruz G, Gutkind JS, Vázquez-Prado J. $G\beta\gamma$ signaling to the chemotactic effector P-REX1 and mammalian cell migration is directly regulated by $G\alpha_q$ and $G\alpha_{13}$ proteins. *J Biol Chem.* November 2018. doi:10.1074/jbc.RA118.006254.

Anexo

Los resultados de la **Figura 21** de esta tesis fueron incluidos en un artículo⁵⁰ de nuestro grupo publicado en el *Journal of Biological Chemistry*:

Gβγ signaling to the chemotactic effector P-REX1 and mammalian cell migration is directly regulated by Gα_q and Gα₁₃ proteins

Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana¹, Sendi Rafael Adame-García²,
Irving García-Jiménez³, Víctor Manuel Color-Aparicio⁴,
Yarely Mabel Beltrán-Navarro¹, Gabriele M. König⁵, Evi Kostenis⁶,
Guadalupe Reyes-Cruz³, J. Silvio Gutkind⁷ and José Vázquez-Prado^{8*}

+ Author Affiliations

* Corresponding author; email: jvazquez@cinvestav.mx

Author contributions: R.D.C.-V., S.R.A.-G., and J.V.-P. conceptualization; R.D.C.-V. data curation; R.D.C.-V., S.R.A.-G., E.K., G.R.-C., J.S.G., and J.V.-P. formal analysis; R.D.C.-V., S.R.A.-G., I.G.-J., V.M.C.-A., and Y.M.B.-N. investigation; R.D.C.-V., S.R.A.-G., I.G.-J., V.M.C.-A., Y.M.B.-N., G.R.-C., and J.S.G. methodology; R.D.C.-V. and J.V.-P. writing-original draft; G.M.K., E.K., G.R.-C., J.S.G., and J.V.-P. resources; E.K., G.R.-C., J.S.G., and J.V.-P. writing-review and editing; J.V.-P. supervision; J.V.-P. funding acquisition; J.V.-P. project administration.

Abstract

G protein-coupled receptors stimulate Rho guanine nucleotide exchange factors that promote mammalian cell migration. Rac and Rho GTPases exert opposing effects on cell morphology, and are stimulated downstream of Gβγ and Gα_{12/13} or Gα_q, respectively. These Gα subunits might in turn favor Rho pathways by preventing Gβγ signaling to Rac. Here, we investigated whether Gβγ signaling to phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 1 (P-REX1), a key Gβγ chemotactic effector, is directly controlled by Rho-activating Gα subunits. We show that pharmacological inhibition of Gα_q makes P-REX1 activation by Gq/Gi-coupled lysophosphatidic acid receptors more effective. Moreover, chemogenetic control of Gi and Gq by designer receptors exclusively activated by designer drugs (DREADDs) confirmed that Gi differentially activates P-REX1. GTPase-deficient Gα_qQL and Gα₁₃QL variants formed stable complexes with Gβγ, impairing its interaction with P-REX1. The N-terminal regions of these variants were essential for stable interaction with Gβγ. Pull-down assays revealed that chimeric Gα₁₃₋₁₂QL interacts with Gβγ unlike to Gα₂₋₁₃QL, the reciprocal chimera, which similarly to Gα₂QL could not interact with Gβγ. Moreover, Gβγ was part of tetrameric Gβγ/Gα_qQL/RGS2 and Gβγ/Gα₁₃₋₁₂QL/RGS4 complexes, whereas Gα₁₃QL dissociated from Gβγ to interact with the PDZ-RhoGEF-RGS domain. Consistent with an integrated response, Gβγ and AKT kinase were associated with active SDF-1/CXCL12-stimulated P-REX1. This pathway was inhibited by Gα_qQL and Gα₁₃QL, which also prevented CXCR4-dependent cell migration. We conclude that a coordinated mechanism prioritizes Gα_q- and Gα₁₃-mediated signaling to Rho over a Gβγ-dependent Rac pathway, attributed to heterotrimeric Gi proteins.