



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

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**“Señalización quimiotáctica por GPCRs: interactores de  $G\alpha_q$   
como posibles reguladores de la señalización de  $G\beta\gamma$ ”**

**TESIS**

Que presenta

**Biól. Raúl Vega Fonseca**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

EN LA ESPECIALIDAD DE  
FARMACOLOGÍA

**Director de Tesis:**

Dr. José Vázquez Prado

Ciudad de México

Diciembre, 2019

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio 35 del Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. José Vázquez Prado.

El sustentante agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) el apoyo recibido a lo largo del proyecto (CVU: 833017).

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Dr. José Vázquez Prado**, por la oportunidad y la confianza para trabajar en su laboratorio, por sus consejos para mejorar mi trabajo, así como también por la paciencia durante mi aprendizaje en el laboratorio y por el compromiso genuino de motivarnos a apuntar siempre a lo más alto en todos los aspectos, por enseñarnos la cultura del esfuerzo y del respeto y a creer en nosotros mismos, a ser dinámicos como una célula.

A la **Dra. Guadalupe Reyes Cruz**, por el tiempo, la atención, la confianza, el apoyo incondicional y los conocimientos recibidos durante mi estancia como parte de su equipo de trabajo.

A mis padres y abuelos, **Dolores Quiroz Ayala, Elvia Fonseca Quiroz, Antonio Fonseca Quiroz y Antonio Fonseca Rizo**, mi hermana **Diana Vega Fonseca** y mi tía **Eloísa Fonseca Quiroz**, quienes constituyen mi motor principal y me fomentan la cultura de buscar siempre la superación personal, por todos los inigualables e inestimables esfuerzos que han hecho para permitirme llegar aquí.

A **Lucero Navarrete Martínez**, por ser mi pilar, mi inspiración, mi compañera de camino, por siempre estar ahí para mí, para escucharme y ayudarme a afrontar los retos.

A mis amigos/compañeros de laboratorio **Irving, Sendi y Daniel**, por asesorarme en la aplicación de las técnicas de laboratorio, las enseñanzas, la disponibilidad, la paciencia, el compañerismo y el apoyo brindados.

A mis amigos/compañeros de laboratorio **Yarely, Víctor y Alejandro**, por la empatía, el compañerismo y el apoyo brindados.

A **todos y cada uno** de mis **amigos/compañeros de laboratorio**, por las enseñanzas, el apoyo incondicional, la solidaridad y por hacer más ameno el trabajo.

A mis **amigos de vida, carrera y familiares**, que me han regalado muchos de los mejores momentos de mi vida y me han impulsado para seguir adelante, evitando caer en la autocomplacencia y, cuando lo he necesitado, ofrecerme su apoyo incondicional.

A **Estanislao Escobar Islas, Margarita Valadez Sánchez, Omar Hernández García, David Pérez Rangel y Jaime Estrada Trejo** por el inestimable apoyo técnico brindado.

“No hay nada en la biología que tenga sentido si no es a la luz de la evolución.” Theodosius Dobzhansky.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
RESUMEN .....	v
SUMMARY.....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	19
3. HIPÓTESIS .....	20
4. OBJETIVOS.....	21
5. ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES.....	22
6. RESULTADOS.....	53
7. DISCUSIÓN .....	72
8. CONCLUSIONES .....	76
9. REFERENCIAS.....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El microambiente tumoral y la migración celular en la progresión del cáncer. Quimiotaxis.....	2
Figura 2. Modelo clásico de activación de GPCRs.....	4
Figura 3. Efectores quimiotácticos de $G\beta\gamma$ . ....	5
Figura 4. La señalización de $G\beta\gamma$ lleva al rearrreglo del citoesqueleto. ....	6
Figura 5. Mecanismos moleculares dependientes de $G\beta\gamma$ que generan movimiento celular.....	7
Figura 6. Sitios de interacción entre $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ en $G_i$ . ....	9
Figura 7. La activación de GPCRs con acoplamiento múltiple puede dar lugar a una diversidad de eventos celulares. ....	11
Figura 8. La $\alpha N$ de la subunidad $G\alpha$ como sitio esencial para mantener la interacción con $G\beta\gamma$ . ....	13
Figura 9. Modelo de “clam-shell”.....	13
Figura 10. Modelo alternativo de activación de proteínas G heterotriméricas. ....	15
Figura 11. $G\alpha_{qQL}$ y su efector TRIO como proteínas clave en el melanoma uveal. ....	18
Figura 12. Regulación de la señalización quimiotáctica de $G\beta\gamma$ por interactores de $G\alpha_q$ . ....	20
Figura 13. Configuración del programa Cn3D empleada para visualizar las estructuras de las proteínas G heterotriméricas.....	22
Figura 14. PCR de traslape para generar el cDNA que codifica para la quimera $G\alpha_{i2(1-29)}-\alpha_{q(38-359)}$ .....	26
Figura 15. Proceso de ligación de inserto $G\alpha_{i2}-G\alpha_q$ en el vector de expresión pCEFL2.....	32
Figura 16. Etapas posteriores a la ligación para obtener la construcción pCEFL2- $G\alpha_{i2(1-29)}-G\alpha_{q(38-359)}$ . ....	35
Figura 17. Diseño de experimento funcional: regulación de la señalización de $G\beta\gamma$ por interactores de $G\alpha_q$ en células COS-7. ....	47

Figura 18. Diseño de experimento de interacción: regulación de la señalización de $G\beta\gamma$ por interactores de $G\alpha_q$ en células HEK 293T.....	50
Figura 19. Análisis de las interacciones en el sitio 1 y sitio 2 de los heterotrimeros $G_i$ y $G_q$ .....	54
Figura 20. Alineamiento de secuencias de $\alpha N$ de $G\alpha_i$ y $G\alpha_q$ .....	55
Figura 21. Composición de aminoácidos de la $\alpha N$ de $G\alpha_i$ y $G\alpha_q$ .....	56
Figura 22. Amplificación de $\alpha N$ y dominio de GTPasa para quimeras $G\alpha_i-\alpha_q$ y $G\alpha_q-\alpha_i$ .....	57
Figura 23. Amplificación de la secuencia de la quimera $G\alpha_i-\alpha_q$ .....	58
Figura 24. Clonación de construcción pCEFL2- $G\alpha_i-G\alpha_q$ . ....	59
Figura 25. Detección y función esperada de la proteína quimérica $G\alpha_i-\alpha_q$ .....	60
Figura 26. Amplificación de la quimera $G\alpha_q-\alpha_i$ . ....	61
Figura 27. Función esperada de la proteína quimérica $G\alpha_q-\alpha_i$ . ....	62
Figura 28. Amplificación de la $\alpha N$ de $G\alpha_q$ y de $G\alpha_i$ y función esperada de ambas como proteínas.....	63
Figura 29. Obtención de construcción pCEFL2-3'-GST. ....	64
Figura 30. Análisis de las interacciones de $G\alpha_q$ con interactores.....	66
Figura 31. Regulación de la señalización de $G\beta\gamma$ por interactores de $G\alpha_q$ .....	68
Figura 32. Efecto de interactores de $G\alpha_q$ sobre la señalización de $G\beta\gamma$ . ....	69
Figura 33. Desplazamiento de $G\beta\gamma$ de $G\alpha_qQL$ por interactores de $G\alpha_q$ .....	71

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mezcla para reacción 1 de PCR de traslape para quimera $G\alpha_{i2}-G\alpha_q$ .....	27
Tabla 2. Mezcla para reacción 2 de PCR de traslape para quimera $G\alpha_{i2}-G\alpha_q$ .....	27
Tabla 3. Programa de amplificación para reacción 1 y 2 de PCR de traslape para quimera $G\alpha_{i2}-G\alpha_q$ . ....	28
Tabla 4. Mezcla para reacción 3 de PCR de traslape para quimera $G\alpha_{i2}-G\alpha_q$ .....	29

Tabla 5. Programa de amplificación para reacción 3 de PCR de traslape para quimera $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$ .	30
Tabla 6. Mezcla de reacción para la digestión enzimática del vector y del inserto $G\alpha_i$ - $\alpha_q$ .	31
Tabla 7. Mezcla para la reacción de ligación del vector con inserto $G\alpha_i$ - $\alpha_q$ .	32
Tabla 8. Mezcla de reacción para la digestión diagnóstica de construcción pCEFL2- $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$ .	34
Tabla 9. Composición del stock del buffer de lisis.	37
Tabla 10. Composición del buffer empleado para la lisis celular.	38
Tabla 11. Anticuerpos empleados para el experimento funcional.	48
Tabla 12. Composición del buffer empleado para la lisis celular y el ensayo de Pull-Down del experimento de interacción.	51
Tabla 13. Anticuerpos empleados para el experimento de interacción.	52

## RESUMEN

Los GPCRs quimiotácticos son clave en procesos fisiológicos y patológicos, como el movimiento celular, imprescindible para la metástasis. Estos receptores activan a una diversidad de proteínas G heterotriméricas, de las cuales se conocen 4 familias:  $G_i$ ,  $G_s$ ,  $G_{q/11}$  y  $G_{12/13}$ , que poseen una diversidad de efectores, produciendo diferentes respuestas celulares. El modelo clásico de activación postula que, en un estado inactivo, las subunidades  $G\alpha$ -GDP y  $G\beta\gamma$  permanecen asociadas mediante dos regiones, sitio 1 y sitio 2, hasta que la estimulación de un GPCR provoca la completa disociación y activación de  $G\alpha$ -GTP y  $G\beta\gamma$ . Sin embargo, la señalización quimiotáctica dependiente de  $G\beta\gamma$ , clave en el movimiento celular, es más eficiente cuando proviene de  $G_i$ . Para explicar esto, se han propuesto diferentes razones: abundancia diferencial, localización celular diferencial, y dinámica de disociación diferencial, entre otras. Con respecto a la última, evidencia de nuestro laboratorio indica que las mutantes deficientes de GTPasa (en estado activo)  $G\alpha_q$ QL y  $G\alpha_{13}$ QL se mantienen unidas a  $G\beta\gamma$  mediante el sitio 2, impidiendo su señalización, lo cual contrasta con el modelo clásico. En este trabajo se evaluó si efectores de  $G\alpha_q$  producen la disociación de  $G\beta\gamma$  del sitio 2, posterior a la separación del sitio 1 dada por el receptor, implicando un efecto secuencial. Se hizo el análisis bioinformático de estructuras  $G\alpha_q$ -interactores y se evaluó mediante Western Blot la activación de vías dependientes de  $G\beta\gamma$ , como pAKT, en un sistema de receptor acoplado exclusivamente a  $G_q$  endógena ( $G_q$ -DREADD) al transfectar al efector de  $G\alpha_q$ , p63. Además, se evaluó mediante Pull-Down la disociación del complejo  $G\alpha_q$ QL- $G\beta\gamma$  por p63. Se generó la construcción de la proteína quimérica  $G\alpha_i$ - $\alpha_q$  (con el sitio 1 de  $G\alpha_q$  y el sitio 2 de  $G\alpha_i$ ), la cual se espera que libere efectivamente a  $G\beta\gamma$  al activar al  $G_q$ -DREADD, haciendo que se comporte como si se acoplara a  $G_i$ . Interesantemente, la sobreexpresión de p63 en el sistema de  $G_q$ -DREADD produjo un aumento en pAKT en la condición basal y al estimular al receptor, implicando que p63 aprovecha la actividad basal del receptor y libera a  $G\beta\gamma$ . Asimismo, p63 parece desplazar a  $G\beta\gamma$  de  $G\alpha_q$ QL y, sorpresivamente, también afecta su detección en el PD, posiblemente debido a la activación de vías de degradación. El aumento en pAKT al transfectar a p63 sugiere que  $G\beta\gamma$  se disocia e incrementa su disponibilidad señalizante.



## SUMMARY

Chemotactic GPCRs are essential in both physiological and pathological contexts, such as cell migration, that is necessary for metastasis. These receptors are capable to activate a diversity of heterotrimeric G proteins, for which 4 families are known:  $G_i$ ,  $G_s$ ,  $G_{q/11}$ , and  $G_{12/13}$ . G proteins, in turn, activate diverse effectors, leading to different cell responses. According to the classical model of activation, in an inactive state  $G\alpha$ -GDP and  $G\beta\gamma$  subunits stay associated in a complex by two different regions, site 1 and site 2. Upon GPCR stimulation, this complex is completely dissociated into  $G\alpha$ -GTP and  $G\beta\gamma$ , rendering both active. Nonetheless,  $G\beta\gamma$ -dependent chemotactic signalling, key for cell movement, is more efficient when it comes from  $G_i$ . Different explanations have been proposed in order to explain the latter: differential abundance of G proteins, differential subcellular localization, and differential dissociation dynamics, among others. Regarding to the latter, evidence from our laboratory points out that GTPase-deficient mutants (in an active state)  $G\alpha_q$ QL and  $G\alpha_{13}$ QL remain associated to  $G\beta\gamma$  through site 2, preventing its signalling capability, which contradicts the classical model. In this research, we determined if  $G\alpha_q$  effectors are capable to dissociate  $G\beta\gamma$  from site 2, after site 1 dissociation by a GPCR, entailing a sequential effect. We also analysed  $G\alpha_q$ -interactors structures through bioinformatics tools and assessed the activation of  $G\beta\gamma$ -dependent pathways (pAKT) by Western Blot using an endogenous  $G_q$ -specifically coupled receptor ( $G_q$ -DREADD) upon transfection of the  $G\alpha_q$  effector, p63. Furthermore, we evaluated the dissociation of  $G\alpha_q$ QL- $G\beta\gamma$  complex by p63. A construct that encodes a chimeric  $G\alpha_i$ - $\alpha_q$  ( $G\alpha_q$ 's site 1 and  $G\alpha_i$ 's site 2) protein was obtained. This protein is expected to effectively release  $G\beta\gamma$  after  $G_q$ -DREADD activation, thus behaving as a  $G_i$ -coupled receptor. Interestingly, p63 overexpression in the  $G_q$ -DREADD system led to an increase in pAKT levels, in both basal and stimulus conditions, implying that p63 takes advantage of the basal activity of the receptor so as to release  $G\beta\gamma$ . Likewise, p63 not only seems to displace  $G\beta\gamma$  from  $G\alpha_q$ QL but, unexpectedly, it also disturbs its detection in the PD assay, possibly due to the activation of degradation pathways. The increase in pAKT levels upon p63 transfection suggests that  $G\beta\gamma$  is dissociated from  $G\alpha_q$ , thereby enhancing its signalling availability.

## ABREVIATURAS

$\alpha$ N	$\alpha$ -hélice N-terminal de la subunidad G $\alpha$
Å	Ángstrom (unidad de medida)
aa	aminoácidos
Ab	Anticuerpo
bp	Pares de bases
°C	Grados centígrados
cDNA	DNA complementario
CNO	Clozapine-N-oxide
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DREADD	Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs – Receptor de diseñador activado exclusivamente por drogas de diseñador
GDP	Guanosín difosfato
GEF	Guanine nucleotide Exchange factor – Factor intercambiador de nucleótido de guanina
GPCRs	G-Protein-Coupled Receptors - Receptores acoplados a proteínas G
GRP	Péptido liberador de gastrina
GTP	Guanosín trifosfato
IL-8	Interleucina-8
kDa	Kilodalton
LPA	Ácido lisofosfatídico
$\mu$ g	Microgramos

$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{L}$	Microlitro
M	Molar
mA	Miliamperios
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NCBI	National Center for Biotechnology Information - Centro Nacional para la Información Biotecnológica
ng	nanogramos
P-Rex1	Factor intercambiador de nucleótido de guanina de Rac dependiente de $\text{PIP}_3$
PCR	Polymerase Chain Reaction - Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Ensayo de Pull-Down
$\text{PGE}_2$	Prostaglandina $\text{E}_2$
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
$\text{PIP}_3$	Fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato
$\text{PLC}\beta$	Fosfolipasa $\text{C}\beta$
PTx	Toxina pertussis
RGS	Regulator of G-protein Signaling – Regulador de la señalización de las proteínas G
rpm	Revoluciones por minuto
S1P	Esfingosina-1-fosfato
SDF	Factor derivado de células estromales

SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Eletrophoresis - Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
TAE	Tris-acetatos-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
WT	Wild-type (silvestre)
WB	Western Blot

# 1. INTRODUCCIÓN

## **Migración celular**

La migración celular juega un papel central en varios procesos y está filogenéticamente conservada. En organismos unicelulares, como la ameba *Dictyostelium*, permite la búsqueda de nutrientes, agregación celular y la morfogénesis de estructuras multicelulares. Mientras que en metazoarios, la migración es fundamental durante el desarrollo embrionario, así como también en la fase adulta, para procesos como la respuesta inmune, cierre de heridas, anidamiento (homing) de células madre, entre otros (Devreotes y Horwitz, 2015).

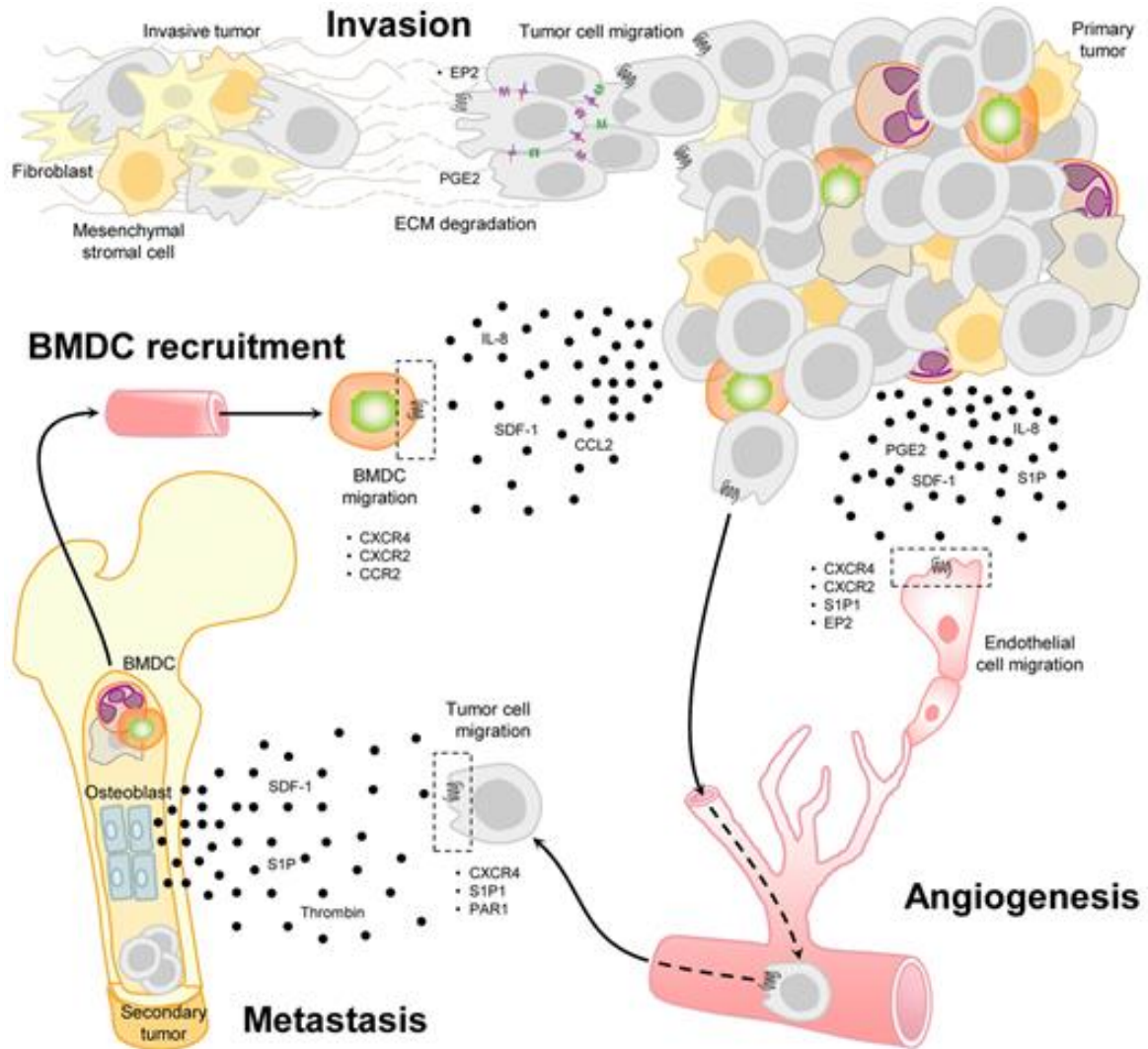
Sin embargo, la migración celular no solo sucede bajo condiciones fisiológicas, sino también en un contexto patológico, en enfermedades como el cáncer, particularmente durante el proceso conocido como metástasis, en el cual, a partir de un tumor primario se invaden otros tejidos. En el microambiente tumoral, las células llevan a cabo un ajuste de su morfología y se mueven al ser estimuladas por diversos factores quimiotácticos que pueden ser secretados tanto por las células cancerosas como por las estromales (Vázquez-Prado *et al.*, 2016).

A nivel intracelular, ocurre una remodelación espacio-temporal del citoesqueleto de actina que empuja a las células hacia gradientes de factores quimiotácticos. Estas respuestas mecánicas se encuentran altamente reguladas mediante mecanismos de señalización dependientes de receptores (Vázquez-Prado *et al.*, 2016).

## **Migración celular por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)**

En padecimientos como el cáncer, se establece un tumor primario, el cual está conformado por distintos tipos celulares además de las células cancerosas, por ejemplo; fibroblastos, células endoteliales, células derivadas de la médula ósea, células del sistema inmune, entre otros. Eventualmente, del tumor primario se puede disociar una célula cancerosa que, al viajar a través de los vasos sanguíneos, llega a invadir otros órganos (como la médula ósea). Una vez establecida en el órgano invadido, la célula cancerosa puede promover el reclutamiento de otros tipos

celulares. Este proceso, previamente mencionado, se conoce como metástasis (figura 1) (Vázquez-Prado *et al.*, 2016).



**Figura 1. El microambiente tumoral y la migración celular en la progresión del cáncer. Quimiotaxis.** Durante la progresión del cáncer se establece un tumor primario, el cual está conformado por distintos tipos celulares además de las células cancerosas, como fibroblastos, células endoteliales, células derivadas de la médula ósea, entre otros. Para que estas diferentes poblaciones celulares se recluten al tumor, las células cancerosas liberan factores quimiotácticos, como PGE2, SDF-1, S1P e IL-8. De tal manera que existen diferentes factores quimiotácticos para los distintos tipos celulares. Algunos de estos factores quimiotácticos pueden actuar sobre GPCRs, promoviendo la migración de células hacia el tumor para favorecer el crecimiento del mismo, como se observa durante el proceso de angiogénesis, en el cual se reclutan células endoteliales hacia el tumor para generar vasos sanguíneos (Vázquez-Prado *et al.*, 2016).

Por otra parte, es posible que una célula cancerosa se desprenda del tumor y viaje a través de los vasos sanguíneos para invadir órganos, por ejemplo, la médula ósea, este evento es conocido como metástasis. (Tomado de Vázquez-Prado *et al.*, 2016).

Por lo tanto, para que sea posible la metástasis, debe ocurrir movimiento celular. Para que lo anterior suceda, las células cancerosas liberan factores quimiotácticos que pueden ser reconocidos por receptores en distintos tipos celulares, promoviendo la migración de las mismas hacia el órgano donde se encuentra la célula invasora (figura 1) (Friedl y Alexander, 2009).

Con respecto a los receptores, se ha descrito que los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) pueden promover la migración celular para reclutar células del sistema inmune, promoviendo a su vez, la tumorigénesis. Para esto, los GPCRs detectan un gradiente de factores quimiotácticos, como quimiocinas, provocando que la célula se mueva a favor del gradiente (Wu *et al.*, 2019).

Los GPCRs pueden reconocer diferentes estímulos quimiotácticos, como trombina, ácido lisofosfatídico (LPA), péptido liberador de gastrina (GRP), endotelina y prostaglandinas. De manera particular, se sabe que el oncogen MAS, el cual codifica para un GPCR, está relacionado con la transformación celular a pesar de que no presenta mutaciones que lleven a su activación constitutiva. Además, se ha demostrado que GPCRs WT (silvestres) pueden volverse tumorigénicos debido a la exposición a agonistas producidos a niveles mayores de los normales. Por otra parte, también se conocen algunas mutaciones en residuos clave que pueden conferir una capacidad transformante a los GPCRs sin requerir la estimulación de un ligando (Dorsam y Gutkind, 2007).

No solo las mutaciones confieren a los GPCRs una capacidad transformante, sino que también la sobreexpresión de los mismos, lo cual se ha observado en diferentes tipos de cáncer, contribuyendo así al crecimiento tumoral al ser activados por sus ligandos en el microambiente tumoral (Dorsam y Gutkind, 2007).

Un ejemplo de GPCR quimiotáctico es el receptor CXCR3 en células T CD8 y NK (natural killer), éste puede ser activado por los ligandos CXCL9 y CXCL10, provocando la migración de células del sistema inmune hacia tumores para atacar a éstos. En contraste, las células cancerosas pueden reclutar a células del sistema inmune, como células Treg (T reguladoras) y MDSCs (células supresoras derivadas de mieloides) para que el tumor adquiera características inmunosupresoras (Wu *et*

*al.*, 2019). Las Treg expresan al GPCR CCR4, que es activado por el ligando CCL22, producido por células tumorales; mientras que las MDSCs expresan al GPCR CCR2, el cual puede ser activado por la quimiocina CCL2 (Kitamura *et al.*, 2015).

### Modelo clásico de activación de proteínas G heterotriméricas

Los GPCRs activan a una diversidad de proteínas G heterotriméricas, de las cuales se conocen cuatro familias,  $G_i$ ,  $G_s$ ,  $G_{q/11}$ , y  $G_{12/13}$ . A su vez, cada familia puede activar a una diversidad de efectores, produciendo distintas respuestas celulares (Milligan y Kostenis, 2006). Con respecto a la composición de las proteínas G heterotriméricas, están formadas por las subunidades  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  (Pierce *et al.*; 2002).

En cuanto al modelo clásico de activación, se sabe que mientras las proteínas G se encuentran en un estado inactivo, la subunidad  $G\alpha$  está unida a GDP y formando un complejo con el heterodímero  $G\beta\gamma$  (figura 2) (Pierce *et al.*; 2002).

Sin embargo, cuando un ligando se une a su nicho en el GPCR, éste sufre un cambio conformacional, de tal manera que hay un rearrreglo en sus 7 hélices transmembranales y se activa (Rasmussen *et al.*, 2011). Así, en un estado activo, el receptor expone sitios intracelulares y es capaz de actuar sobre la subunidad  $G\alpha$ , provocando un cambio conformacional sobre la misma, entonces,  $G\alpha$  libera GDP y éste es intercambiado por GTP, y ahora,  $G\alpha$  se encuentra en un estado activo. Además, el cambio conformacional lleva a que  $G\alpha$  pierda afinidad por  $G\beta\gamma$  y se libera. Por lo tanto, ambos se encuentran disponibles para señalizar y activar a sus efectores (figura 2). (Dorsam y Gutkind, 2007).

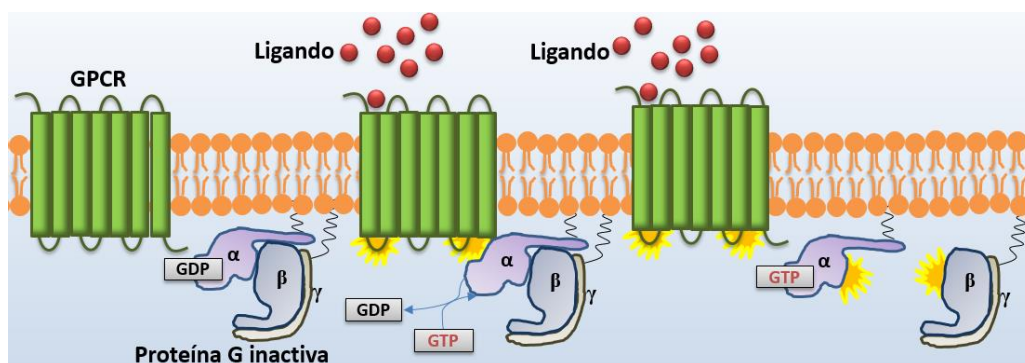
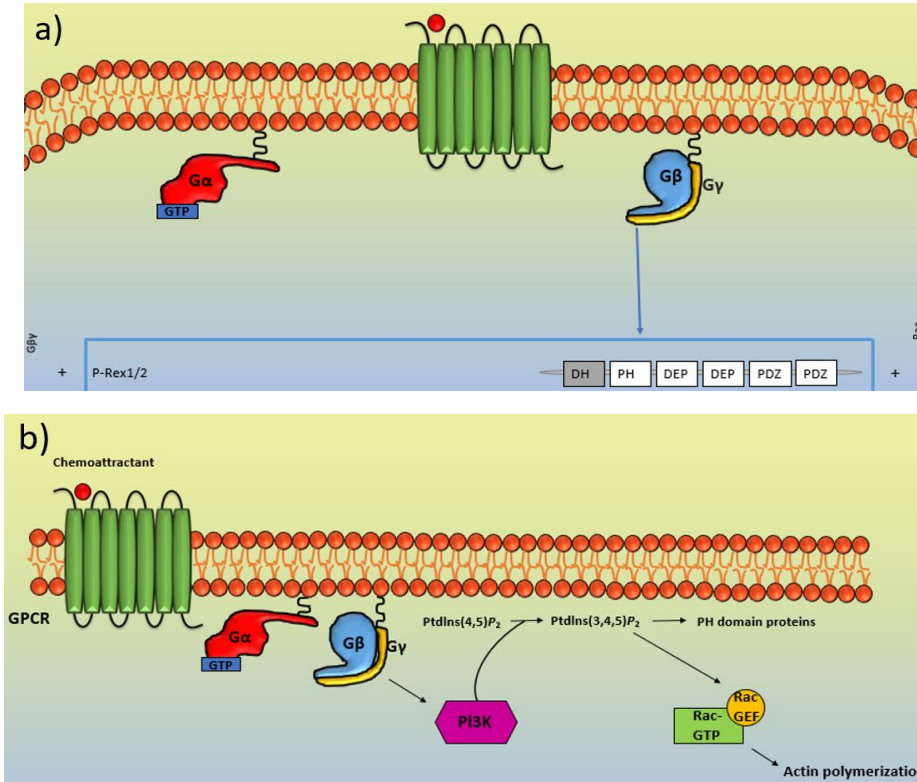


Figura 2. Modelo clásico de activación de GPCRs. Se observa la disociación de  $G\alpha$  del heterodímero  $G\beta\gamma$  después del intercambio de GDP por GTP promovido por el receptor activo.



### Señalización quimiotáctica dependiente de $G\beta\gamma$

De acuerdo con el modelo clásico, la activación de un GPCR lleva a la disociación de  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$ . Así, ambas subunidades tienen sus caras efectoras disponibles para activar a sus efectores (Dorsam y Gutkind, 2007). Particularmente, las vías de señalización dependientes de  $G\beta\gamma$  están implicadas en la migración celular quimiotáctica durante la progresión del cáncer. La activación de estas vías conduce al rearrreglo del citoesqueleto de actina a través de GTPasas de la familia de Rho, de las que se conocen tres principales miembros: RhoA, Rac1 y Cdc42 (Vázquez-Prado *et al.*, 2016). Se han descrito diferentes mecanismos a través de los cuales  $G\beta\gamma$  lleva a la activación de GTPasas de la familia de Rho, que pueden implicar a GEFs y otros efectores de este heterodímero (Schwindinger y Robishaw, 2001). Como ejemplos de efectores quimiotácticos de  $G\beta\gamma$ , se pueden mencionar los siguientes: la cinasa de lípidos PI3K (que produce al segundo mensajero PIP3) y el factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF) P-Rex1 (figura 3) (Smrcka, 2008).

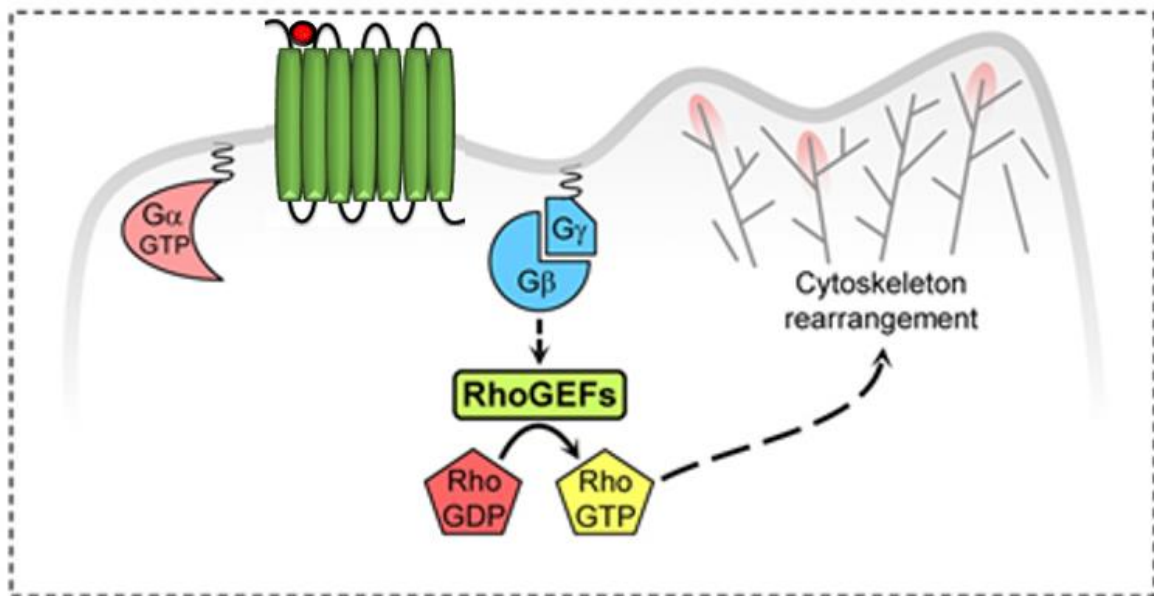


**Figura 3. Efectores quimiotácticos de  $G\beta\gamma$ .**

a) Posterior a la activación del GPCR, se disocian  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$ , por lo tanto, el heterodímero tiene sus caras efectoras disponibles para señalizar y puede activar a su efector, el GEF P-Rex1 (modificado de Vázquez-Prado *et al.*; 2016). b) Otro efector quimiotáctico de  $G\beta\gamma$  es la cinasa de lípidos PI3K, que fosforila a PIP2 para producir el 2º mensajero PIP3, clave para la señalización quimiotáctica de  $G\beta\gamma$  (modificado de Merlot y Filter, 2003).

## Participación de $G\beta\gamma$ en el movimiento celular

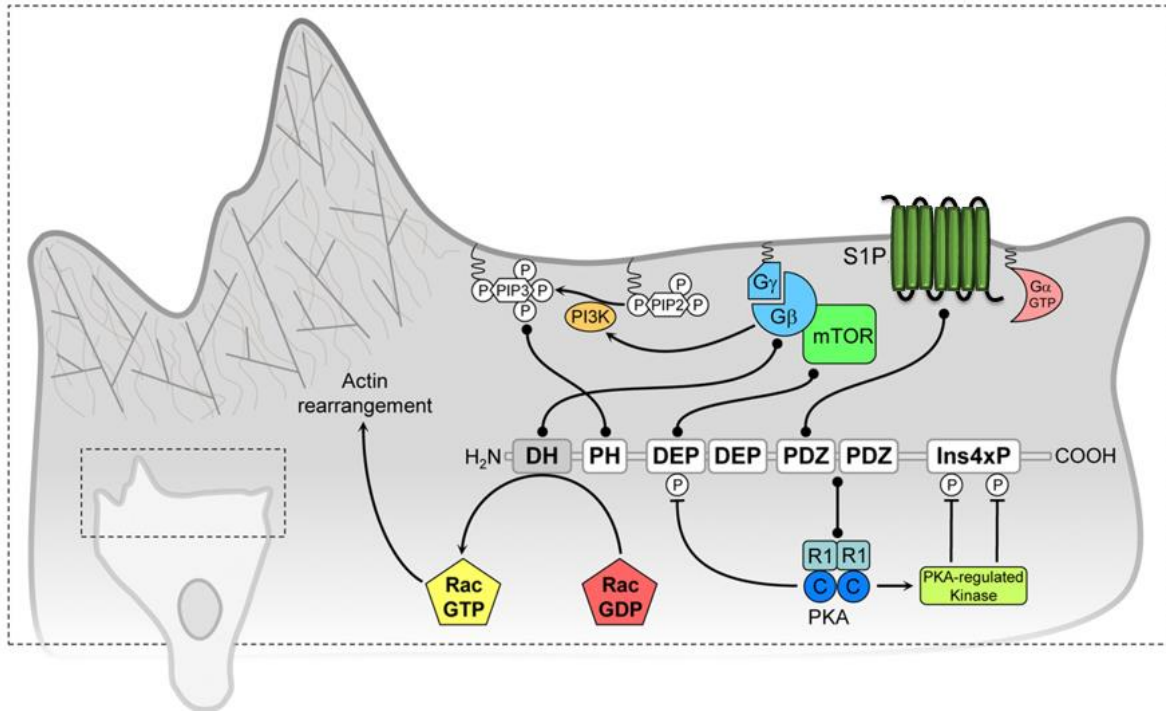
¿De qué manera lleva  $G\beta\gamma$  a que una célula se mueva en favor de un gradiente quimiotáctico? La activación de un GPCR por un factor quimiotáctico, lleva a la separación de  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  para que puedan activar a sus efectores, particularmente, este último puede activar a GTPasas de la familia de Rho que, como se mencionó previamente, pueden llevar a cabo el rearreglo del citoesqueleto de actina (figura 4) (Vázquez-Prado *et al.*, 2016).



**Figura 4. La señalización de  $G\beta\gamma$  lleva al rearreglo del citoesqueleto.** El heterodímero  $G\beta\gamma$  puede activar a GEFs, que, a su vez, activan a GTPasas de la familia de Rho, las cuales están implicadas en el rearreglo del citoesqueleto de actina (modificado de Vázquez-Prado *et al.*, 2016).

Para que  $G\beta\gamma$  dé lugar a la migración celular dirigida, suceden diferentes eventos moleculares. Se sabe que, para moverse, las células se polarizan, de tal manera que se produce una extensión de la membrana celular (debido a Rac) formando un frente de avance hacia el gradiente quimiotáctico (figura 5), mientras que del lado opuesto la membrana se contrae (principalmente por la acción de RhoA), y estos procesos de extensión y contracción se repiten de manera dinámica. Así, el citoesqueleto empuja a la membrana a favor del gradiente quimiotáctico (Vázquez-Prado *et al.*, 2016).

Con respecto a los eventos moleculares inducidos por  $G\beta\gamma$  durante el movimiento celular, una vez que se encuentra disponible después de la activación de un GPCR, puede activar a PI3K que produce el segundo mensajero PIP3, clave para reclutar a diferentes proteínas a la membrana (figura 5) (Hirsch *et al.*, 2000).



**Figura 5. Mecanismos moleculares dependientes de  $G\beta\gamma$  que generan movimiento celular** Cuando el heterodímero  $G\beta\gamma$  está disponible para señalizar activa a sus efectores PI3K y P-Rex1. El primero produce el segundo mensajero PIP3, que, junto con  $G\beta\gamma$  participa en la activación de P-Rex1, que es una proteína conformada por varios dominios, que le confieren la capacidad de interactuar con otras proteínas y es, por lo tanto, una posible plataforma de señalización. Este GEF activa a la GTPasa Rac, la cual, a través del rearrreglo del citoesqueleto de actina promueve la formación de lamelipodios, que le permiten a la célula moverse a favor de un gradiente quimiotáctico (modificado de Vázquez-Prado *et al.*, 2016).

## Señalización diferencial de $G\beta\gamma$ entre las familias de proteínas G heterotrimericas

El modelo clásico de activación de proteínas G heterotrimericas postula que  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  siempre se disocian. Sin embargo, algunos autores han reportado que la señalización quimiotáctica dependiente  $G\beta\gamma$  es más eficiente cuando proviene de  $G_i$  con respecto a las demás familias de proteínas G heterotrimericas (Dillenburger-Pilla *et al.*, 2015; Hao *et al.*, 2007).

De manera adicional, existe evidencia de que el movimiento celular dependiente de  $G\beta\gamma$  es sensible a la inhibición de  $G_i$  por PTx (toxina pertussis) (Smrcka, 2008). Esto da origen a la siguiente pregunta ¿por qué si, en teoría,  $G\beta\gamma$  es el mismo heterodímero en todas las familias, su señalización quimiotáctica solo es eficiente cuando proviene de  $G_i$ ?

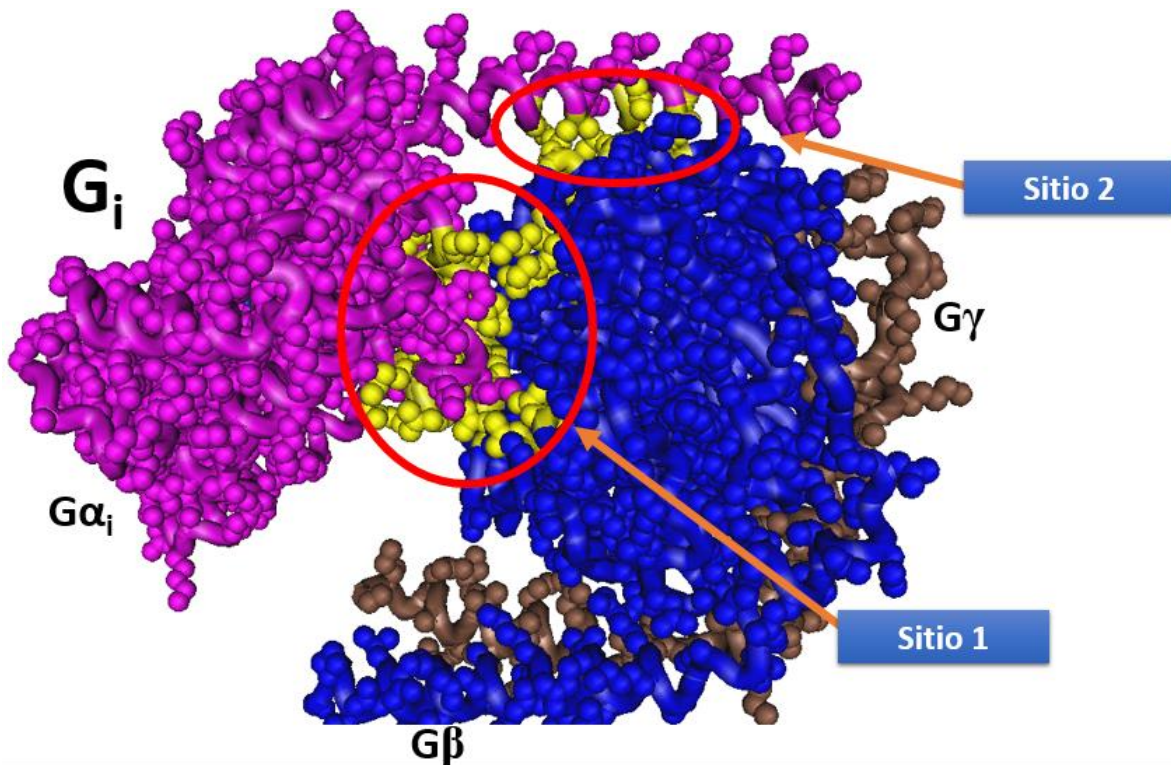
Para explicar lo anterior, se han generado diferentes propuestas, entre estas se encuentran las siguientes: expresión diferencial de los diferentes heterotrimeros, es decir, que  $G_i$  se exprese en mayores niveles y, por lo tanto, la disponibilidad de  $G\beta\gamma$  sea más alta (Kehrl, 2016).

Otra posible explicación es que exista una localización subcelular diferencial, esto implica que las diferentes familias se encuentren distribuidas de manera distinta en los organelos celulares (Hewavitharana y Wedegaertner, 2012; Khan *et al.*, 2006). Incluso, cabe la posibilidad de que en el contexto del GPCR activado existan microdominios en la membrana celular en los que se vea favorecido el reclutamiento de  $G_i$ .

Una tercera propuesta sostiene que hay una dinámica de disociación diferencial entre las proteínas G heterotriméricas, es decir, que  $G\beta\gamma$  se disocie de manera más efectiva de  $G_i$  comparado con otros heterotrimeros (Lambert, 2008), entre otras posibles explicaciones. En el presente trabajo se exploró esta tercera propuesta.

### **Superficies de interacción entre $G\alpha$ y $G\beta\gamma$**

Para estudiar si la señalización diferencial de  $G\beta\gamma$  se debe a una dinámica de disociación diferencial entre las diferentes familias de proteínas G heterotriméricas, es necesario conocer la estructura de las mismas. A partir de las estructuras cristalizadas, Lambright *et al.* (1996) y Wall *et al.* (1995) determinaron que existen dos sitios de interacción entre  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  cuando el heterotrímico se encuentra inactivo. Estos dos sitios se pueden identificar mediante los siguientes nombres: sitio 1 o dominio de GTPasa de  $G\alpha$  (también incluye al dominio helicoidal), mientras que el sitio 2 corresponde a la  $\alpha$ -hélice N-terminal (o  $\alpha$ N) de  $G\alpha$  (figura 6).



**Figura 6. Sitios de interacción entre  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  en  $G_i$ .** Se observa la estructura cristalizada del heterotrímero  $G_i$ ,  $G\alpha_i$  en color rosa,  $G\beta$  en azul y  $G\gamma$  en café. Se resalta el sitio 1 de interacción, correspondiente al dominio de GTPasa de la subunidad  $G\alpha$  y también el sitio 2, conformado por la  $\alpha$ -hélice N-terminal de  $G\alpha$ . Además, se muestran en amarillo los aminoácidos que participan en la interacción en cada sitio (diseñado a partir del programa bioinformático Cn3D, Wang *et al.*, 2000).

Una dinámica de disociación diferencial implica que los sitios de interacción entre  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  no se separan de la misma manera en todos los casos. La evidencia sugiere que, en el caso de  $G_i$ , ambos sitios se disocian completamente, dejando suficientemente disponible a  $G\beta\gamma$  para que señalice (Lambert, 2008). Mientras que, en otros heterotrímeros, por ejemplo,  $G_q$  y  $G_{13}$ , la disociación pudiera ser parcial, de tal manera que solo uno de los dos sitios se separa o al menos la disociación no resulta en una liberación efectiva de  $G\beta\gamma$ .

## Antecedentes

Se ha reportado en diferentes trabajos que la activación de receptores acoplados a  $G_i$ , y no a otros heterotrímeros, da lugar al movimiento celular. Y, además, se sabe que este proceso es dependiente de  $G\beta\gamma$  y no de  $G\alpha_i$  (Neptune y Bourne, 1999).

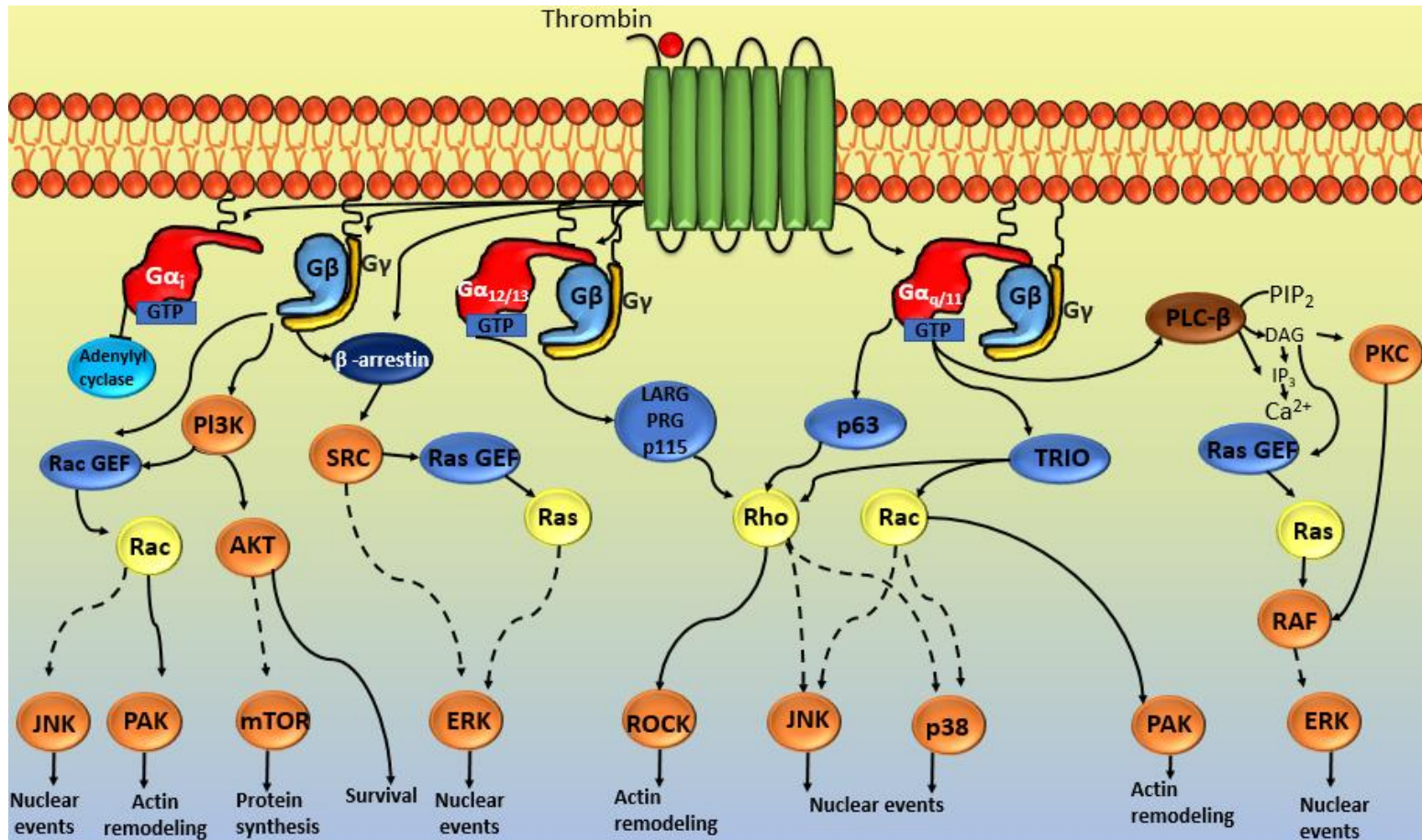
Por ejemplo, en un hallazgo clásico, Neptune y Bourne (1997) evaluaron la migración celular al activar a receptores acoplados a  $G_i$  y otros acoplados a  $G_q$ . Obtuvieron que solo los receptores acoplados al heterotrímero  $G_i$  inducen quimiotaxis y, de manera específica, esto es dependiente del heterodímero  $G\beta\gamma$ .

Adicionalmente, Cervantes-Villagrana *et al.* (2018a) reportaron que al activar a receptores de LPA, los cuales presentan un acoplamiento múltiple y, por lo tanto, pueden activar a diferentes familias de proteínas G heterotriméricas, la migración celular es sensible a la inhibición de  $G_i$  por PTx y, específicamente, a la inhibición de  $G\beta\gamma$  por galleína.

El tema de GPCRs que presentan un acoplamiento promiscuo ha sido abordado previamente (Woehler y Ponimaskin, 2009), e implica que, como resultado de la activación de un mismo receptor, se puede dar una diversidad de eventos celulares (como remodelación del citoesqueleto de actina, síntesis de proteínas, sobrevivencia, entre otros) dependiendo de las proteínas G que se activen y la integración por parte de la célula (O'Hayre *et al.*; 2014) (figura 7).

De acuerdo con una dinámica de disociación diferencial, cuando un receptor con acoplamiento múltiple (por ejemplo, un receptor de trombina o de LPA) es activado por un factor quimiotáctico, podemos mencionar que  $G\beta\gamma$  se disocia completamente de  $G\alpha_i$  y puede activar a sus efectores como PI3K y P-Rex1 (RacGEF). En contraste, para el caso de heterotrímeros como  $G_q$  o  $G_{13}$ , la disociación de  $G\beta\gamma$  no es lo suficientemente efectiva, impidiendo la señalización del mismo y, por lo tanto, el movimiento celular dependiente de este heterodímero (figura 7).





**Figura 7. La activación de GPCRs con acoplamiento múltiple puede dar lugar a una diversidad de eventos celulares.** Se sabe que receptores como los de ácido lisofosfatídico (LPARs) o los de trombina (PARs) se acoplan a diferentes familias de proteínas G y, por lo tanto, las pueden activar. En este caso, el receptor de trombina se acopla a  $G_i$ ,  $G_{13}$  y  $G_q$ . De tal manera que, dependiendo de los heterotrímeros que se activen y la integración de la célula, se puede dar como resultado una diversidad de respuestas celulares. De acuerdo con una dinámica de disociación diferencial, de manera específica para cada heterotrímero sucede lo siguiente: en  $G_i$ , posterior a la activación por el receptor, se disocian  $G\alpha_i$  y  $G\beta\gamma$  completamente, así, ambas subunidades pueden señalizar y  $G\beta\gamma$  promueve el movimiento celular. Contrastantemente, con base en la evidencia experimental, en  $G_{13}$  y  $G_q$ , después de la activación por el receptor  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  se disocian, sin embargo; lo hacen de manera parcial, de tal manera que  $G\alpha$  sí puede señalizar, pero  $G\beta\gamma$  se mantiene inhibida (modificado de O'Hayre *et al.*; 2014)

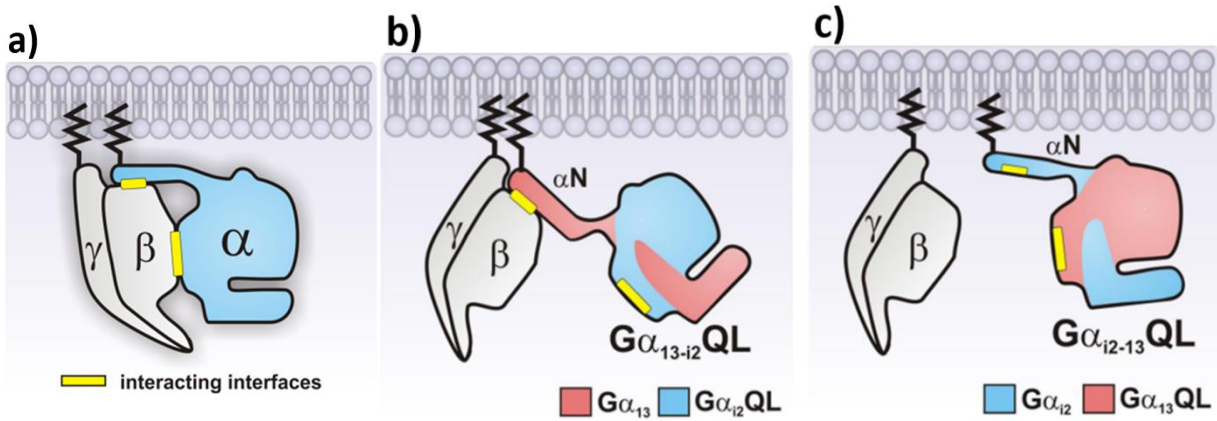
Además, Cervantes-Villagrana *et al.* (2018b) evaluaron la interacción de  $G\beta\gamma$  con subunidades  $G\alpha$  WT y con subunidades  $G\alpha$ QL mutantes deficientes de GTPasa, que corresponden al estado activo de esta subunidad (unido a GTP) y, de acuerdo con el modelo clásico, deberían encontrarse disociadas de  $G\beta\gamma$ .

Sorpresivamente, obtuvieron que las mutantes QL  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{13}$  se mantienen unidas a  $G\beta\gamma$ . Particularmente, la subunidad  $G\alpha_q$ QL es de alta relevancia clínica, ya que causa un tipo de cáncer en el ojo conocido como melanoma uveal (Feng *et al.*; 2019). Estos hallazgos resultan de alto interés, ya que contrastan con el modelo clásico de activación de proteínas G heterotriméricas y, si esto también sucede con las proteínas endógenas, implicaría un reajuste en dicho modelo.

También, Cervantes-Villagrana *et al.* (2018b) llevaron a cabo experimentos funcionales para evaluar la señalización de  $G\beta\gamma$ , ellos emplearon sistemas de receptores sintéticos o DREADDs, que pueden acoplarse de manera exclusiva a una familia de proteínas G heterotriméricas y son activados solamente por el ligando sintético CNO (Wess *et al.*, 2013). Obtuvieron que la activación de AKT, que depende principalmente de  $G\beta\gamma$ , es más efectiva cuando se activa a un DREADD acoplado a  $G_i$  en comparación a cuando se activa a un DREADD acoplado a  $G_q$ , sustentando un modelo de dinámica de disociación diferencial.

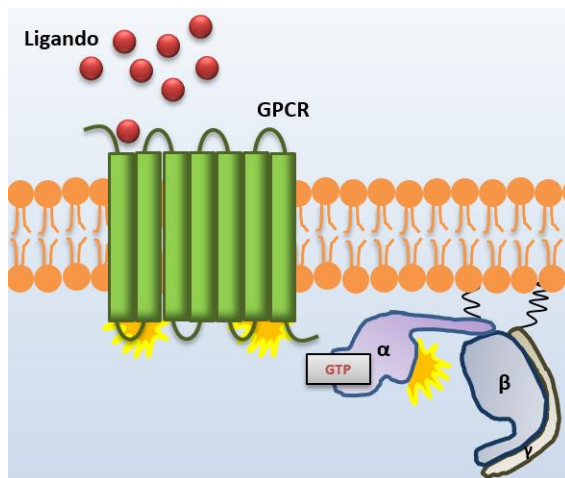
Lo anterior da lugar a cuestionarnos por qué  $G\beta\gamma$  se mantiene asociada a las mutantes deficientes de GTPasa  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{13}$ . Para responder a esta pregunta, Cervantes-Villagrana *et al.* (2018b), partiendo de las dos superficies de interacción conocidas entre  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$ , el sitio 1 o dominio de GTPasa de  $G\alpha$  y el sitio 2 o  $\alpha$ -hélice N-terminal (identificada también como  $\alpha$ N) de  $G\alpha$ , emplearon construcciones de subunidades  $G\alpha$  quiméricas y evaluaron su interacción con  $G\beta\gamma$ . Una quimera estaba conformada por la  $\alpha$ N de  $G\alpha_{i2}$  y el dominio de GTPasa de  $G\alpha_{13}$ QL, mientras que la segunda quimera era recíproca a la anterior, con la  $\alpha$ N de  $G\alpha_{13}$  y el dominio de GTPasa de  $G\alpha_{i2}$ QL. Obtuvieron que, de manera similar a  $G\alpha_{13}$ , la proteína quimérica que tiene la  $\alpha$ N de  $G\alpha_{13}$ , pero no la quimera con la  $\alpha$ N de  $G\alpha_{i2}$ , interactúa con  $G\beta\gamma$  (figura 8). Así, se puede concluir que el sitio 2 es esencial para mantener la interacción con  $G\beta\gamma$  en estas mutantes deficientes de GTPasa.





**Figura 8. La  $\alpha N$  de la subunidad  $G\alpha$  como sitio esencial para mantener la interacción con  $G\beta\gamma$ .** a) Se muestran las dos superficies de interacción entre la subunidad  $G\alpha$  y el heterodímero  $G\beta\gamma$ . b) La quimera que tiene la  $\alpha N$  de  $G\alpha_{13}$  interactúa con  $G\beta\gamma$ . c) La quimera que tiene la  $\alpha N$  de  $G\alpha_{i2}$  no interactúa con  $G\beta\gamma$ . (Tomado de Cervantes-Villagrana *et al.*, 2018b).

De manera interesante (reforzando una posible dinámica de disociación diferencial), con respecto a la superficie de interacción de la  $\alpha N$  o sitio 2, existe una propuesta de un modelo denominado como “clam-shell” (concha de almeja), el cual postula que, después de la activación por el receptor, se producen cambios conformacionales entre  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  que llevan a su disociación, sin embargo, ésta no sucede completamente ya que la  $\alpha N$  tiene cierta flexibilidad y hace las veces de una bisagra, de tal forma que  $G\beta\gamma$  se puede mantener unida a  $G\alpha$ -GTP (McIntire, 2009). Por lo tanto, solo disociaría el sitio 1, mientras que el sitio 2 sería suficiente para mantener la interacción con  $G\beta\gamma$  (figura 9).



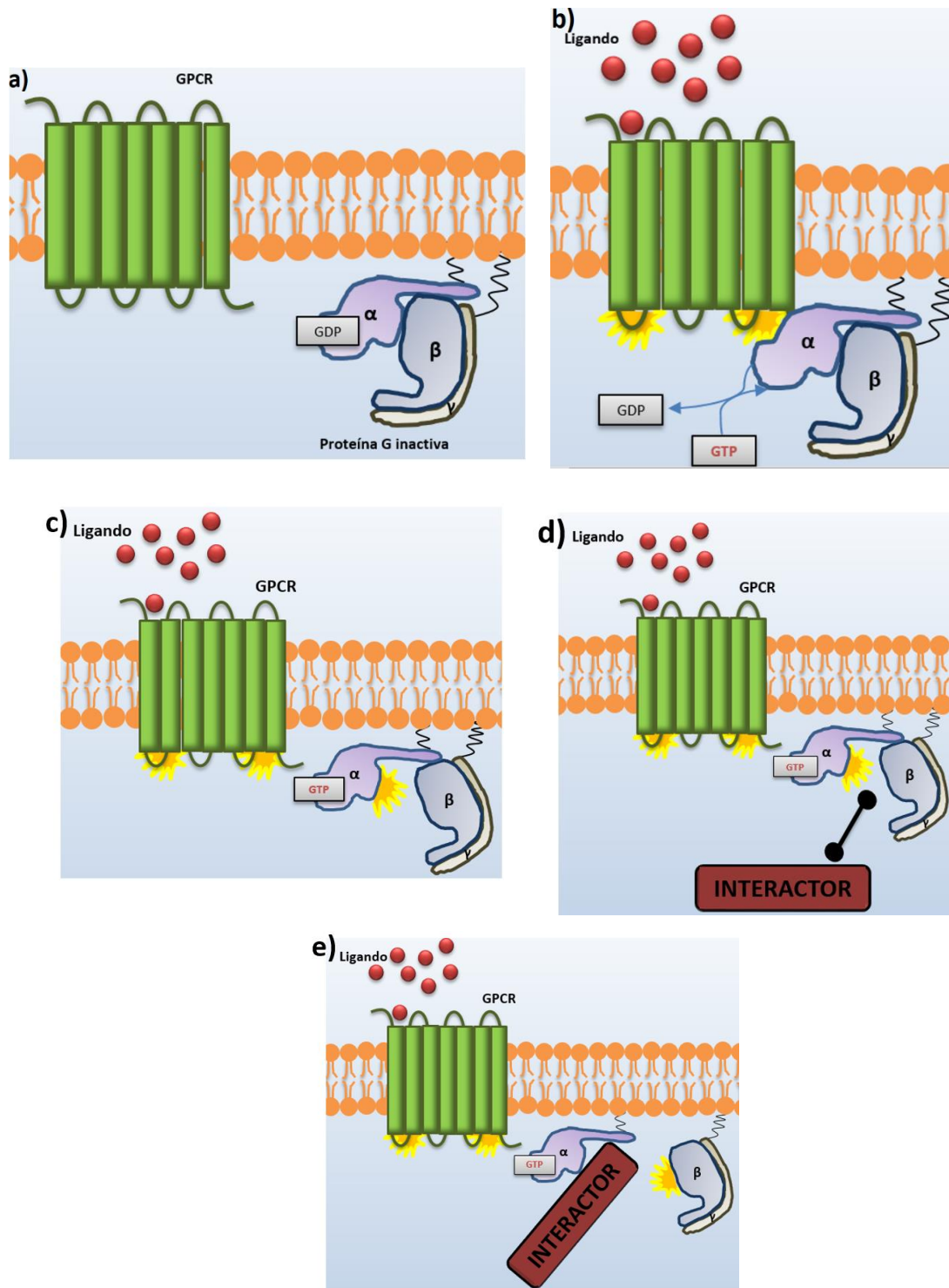
**Figura 9. Modelo de “clam-shell”.** De acuerdo con este modelo,  $G\beta\gamma$  se puede mantener unida a  $G\alpha$ -GTP mediante la  $\alpha N$  de ésta, la cual presenta flexibilidad.

## **Modelo alternativo de activación de proteínas G heterotriméricas**

Con base en los hallazgos obtenidos por Cervantes-Villagrana *et al.* (2018b) y el modelo de “clam-shell”, junto con la evidencia experimental reportada por otros autores, el modelo clásico de activación de proteínas G heterotriméricas aplicaría para el caso de  $G_i$ , pero no explicaría por qué, por ejemplo, para  $G_{q/11}$  y  $G_{12/13}$  la señalización quimiotáctica que proviene del heterodímero  $G\beta\gamma$  no es eficiente.

Así, en este trabajo se propone un modelo alternativo de activación, que, de manera específica para  $G_q$ , consistiría de un efecto secuencial.

En el primer paso, el GPCR activo lleva a la activación de  $G\alpha_q$  y promueve la separación del sitio 1, sin embargo,  $G\beta\gamma$  se mantiene unida a  $G\alpha_q$  mediante el sitio 2. Entonces,  $G\alpha_q$  es capaz de señalizar al estar activa mientras que  $G\beta\gamma$  no porque sus caras efectoras permanecen cubiertas debido a la interacción. Por lo tanto, se requiere un segundo paso o segundo “hit”, que estaría dado por un interactor (ya sea regulador o efector) de  $G\alpha_q$  que se introduzca en el espacio que existe entre  $G\alpha_q$  y  $G\beta\gamma$  como resultado de la disociación del sitio 1, desplazando de su nicho al heterodímero  $G\beta\gamma$  y dejándolo disponible para señalizar y activar a sus efectores (figura 10).



**Figura 10. Modelo alternativo de activación de proteínas G heterotrimericas.** a) En un estado inactivo,  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  se encuentran unidas por ambos sitios formando un complejo. b) Cuando el ligando activa al receptor, éste promueve un cambio conformacional sobre  $G\alpha$ , que libera GDP y es intercambiado por GTP y  $G\alpha$  se activa. c) Como resultado del primer paso (activación por el receptor), se disocia el sitio 1 pero  $G\beta\gamma$  se mantiene unida al sitio 2 y no puede señalizar. d) Para liberar a  $G\beta\gamma$  se requiere un segundo paso, dado por un interactor de  $G\alpha$  que se introduce en el espacio existente entre  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$ . e) El interactor de  $G\alpha$  desplaza a  $G\beta\gamma$  del sitio 2, y una vez libre, ésta puede señalizar.

## **Melanoma uveal: $G\alpha_q$ QL y su efector TRIO como proteínas clave**

Previamente se mencionó la importancia clínica de la subunidad mutante deficiente de GTPasa  $G\alpha_q$ QL porque se ha determinado que produce un tipo de cáncer en el ojo conocido como melanoma uveal (Feng *et al.*, 2019).

El melanoma uveal es el cáncer intraocular más frecuente en adultos, se origina a partir de los melanocitos localizados en el tracto uveal del ojo (Smit *et al.*, 2019). Presenta una incidencia promedio de 5.1 casos por millón por año. Los tumores se pueden encontrar en el iris (4%), cuerpo ciliar (6%) o en el coroides (90%) (Kaliki y Shields, 2017).

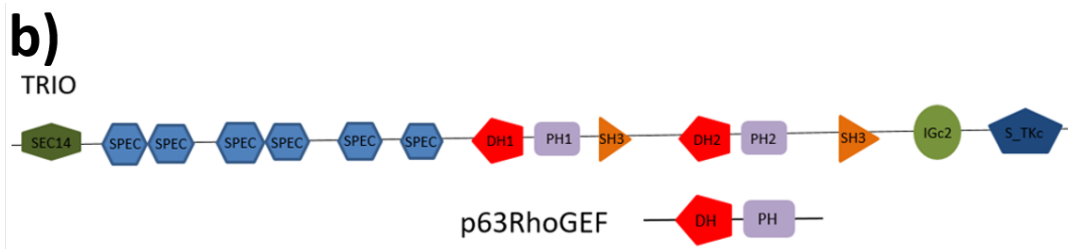
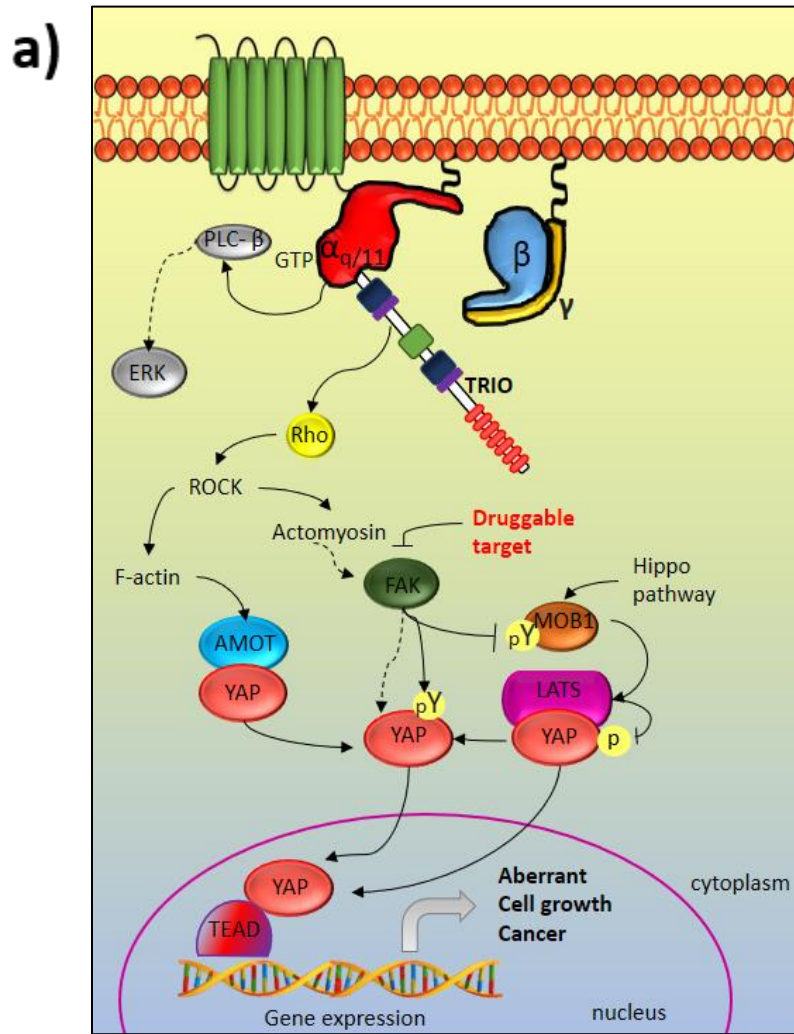
Es un cáncer altamente agresivo, y puede hacer metástasis a otros órganos, principalmente el hígado (Smit *et al.*, 2019). Con respecto al pronóstico, este suele ser pobre, ya que el 50% de los pacientes desarrolla metástasis incluso después de un tratamiento local efectivo del tumor primario, presentando una supervivencia de seis a doce meses (Augsburger *et al.*, 2009).

En cuanto a su tratamiento, para el tumor primario se puede aplicar enucleación ocular, radioterapia estereotáctica, braquiterapia, entre otros (Smit *et al.*, 2019). Sin embargo, no hay tratamientos para cuando se ha desarrollado metástasis.

Recientemente, en modelos de ratón, se probaron los fármacos VS-4718 y FR9000359 (FR) (Feng *et al.*, 2019; Annala *et al.*, 2019, respectivamente), los cuales inhiben proteínas específicas de la vía que lleva al melanoma uveal. Estos fármacos parecen prometedores ya que, en los modelos de ratón probados, lograron inhibir la proliferación celular.

Adicionalmente, la vía mediante la cual  $G\alpha_q$ QL conduce al melanoma uveal fue determinada por Feng *et al.* (2019) (figura 11). De manera general, en esta vía, la mutante  $G\alpha_q$ QL activa a su efector TRIO (RacGEF y RhoGEF), que es una proteína grande y compleja, conformada por varios dominios. Río abajo de TRIO, se inhibe una vía supresora de tumores, conocida como la vía de Hippo. Esto da como resultado la liberación del coactivador transcripcional YAP, que ahora puede dirigirse al núcleo y promover el crecimiento celular aberrante.

Cabe resaltar que TRIO presenta un módulo DH2-PH2 muy similar al módulo DH-PH de otro efector de  $G\alpha_q$ , conocido como p63 (RhoGEF) (Rojas *et al.*, 2007) (figura 11). Por lo tanto, retomando nuestro modelo alternativo de activación de proteínas G heterotriméricas, tanto TRIO como p63 son candidatos interesantes como interactores de  $G\alpha_q$  que den el segundo “hit” para desplazar a  $G\beta\gamma$ , permitiendo que ésta ahora se encuentre disponible para señalar.



**Figura 11. Gα<sub>q</sub>QL y su efector TRIO como proteínas clave en el melanoma uveal.** a) En la vía de señalización que lleva al melanoma uveal, Gα<sub>q</sub>QL activa a su efector, el GEF TRIO que, a su vez, activa a RhoA. Río abajo de RhoA, se activa la cinasa FAK, la cual está implicada en la inhibición de la vía supresora de tumores Hippo. Al inhibir a esta vía, se libera el coactivador transcripcional conocido como YAP. Así, YAP puede ir al núcleo y promover la expresión de genes implicados en el crecimiento celular aberrante. Los fármacos previamente mencionados, FR y VS-4718, inhiben a Gα<sub>q</sub>QL y FAK, respectivamente (modificado de Feng *et al.*, 2019). b) Arquitectura de dominios de los efectores de Gα<sub>q</sub>, TRIO y p63. TRIO es una proteína grande que comprende varios dominios. Particularmente, el módulo DH2-PH2 (implicado en la activación de RhoA) tiene un alto grado de homología con el módulo DH-PH de p63 (que, de igual manera puede activar a RhoA).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La actividad quimiotáctica controlada por receptores acoplados a proteínas G es fundamental en procesos como la respuesta inmune y puede estar alterada en eventos de cáncer metastásico.

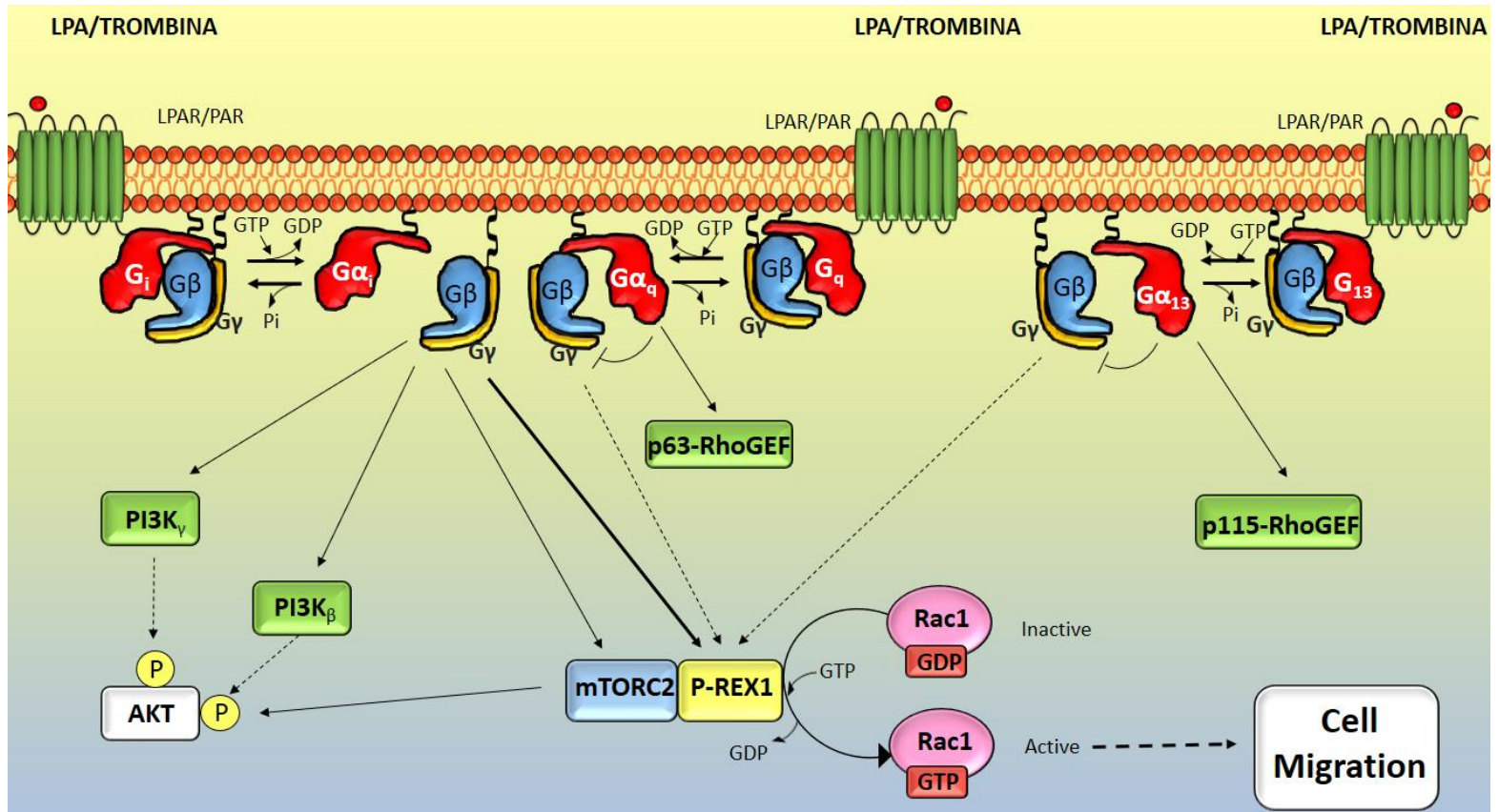
Los GPCRs quimiotácticos, aun cuando tengan un acoplamiento múltiple, activan a efectores de  $G\beta\gamma$  principalmente vía  $G_i$  y no de otros heterotrímeros. Puesto que las alteraciones en estas cascadas de transducción pueden ser determinantes en un contexto patológico, la dilucidación de estos mecanismos sienta las bases para el desarrollo de estrategias terapéuticas.

Debido a lo anterior, es fundamental entender, a nivel molecular, la dinámica de activación de vías que dependen de  $G\beta\gamma$ .



### 3. HIPÓTESIS

Los **GPCRs** con **actividad quimiotáctica** señalizan a través de **Gβγ** derivada de  $G_i$  aun cuando puedan además activar a  $G_q$  y  $G_{13}$ , por lo que la **disociación** de los distintos heterotrimeros puede depender de la intervención de **efectores y reguladores** de las subunidades **Gα**. En particular, proponemos que la **liberación de Gβγ** de  $G_q$ , requiere de un **efecto secuencial** iniciado por el receptor activo y seguido de la intervención de interactores de  $Gα_q$  para **separar las dos superficies de contacto** entre  $Gα$  y  $Gβγ$ .



**Figura 12. Regulación de la señalización quimiotáctica de Gβγ por interactores de Gαq.** Un mismo receptor que presenta acoplamiento múltiple, como LPAR o PAR, puede activar a  $G_i$ ,  $G_q$  y  $G_{13}$ . Para  $G_i$ , posterior a la activación por el receptor, se disocian completamente  $Gα_i$  y  $Gβγ$ , éste último puede señalizar y activar a sus efectores como PI3K y P-Rex1. En contraste, para  $G_q$  y  $G_{13}$ , posterior a la activación por el receptor solo se disocia el sitio 1, de tal manera que  $Gα$  es capaz de señalizar, pero  $Gβγ$  no. De manera específica para  $G_q$ , proponemos que se requiere un segundo "hit" dado por un interactor de  $Gα_q$ , como p63RhoGEF, que lleve a la disociación de  $Gβγ$  del sitio 2, dejándola disponible para señalizar y activar a sus efectores quimiotácticos (modificado de Cervantes-Villagrana *et al.*, 2018b).



## **4. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Analizar la dinámica de disociación de diversas proteínas G heterotriméricas con énfasis en la señalización quimiotáctica de  $G\beta\gamma$  y su liberación que en algunos casos pudiera requerir de la participación de efectores e interactores de las subunidades  $G\alpha$ , particularmente de  $G\alpha_q$ .

### **Objetivos particulares**

1. Analizar si interactores de  $G\alpha_q$  favorecen la liberación de  $G\beta\gamma$ .
2. Indagar cómo las superficies de interacción entre las diversas subunidades  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  influyen en la disociación de las proteínas G heterotriméricas.
3. Evaluar la dinámica de activación de efectores de  $G\beta\gamma$ , vinculados a procesos de migración celular, resultante de la acción de efectores e interactores de  $G\alpha_q$ .

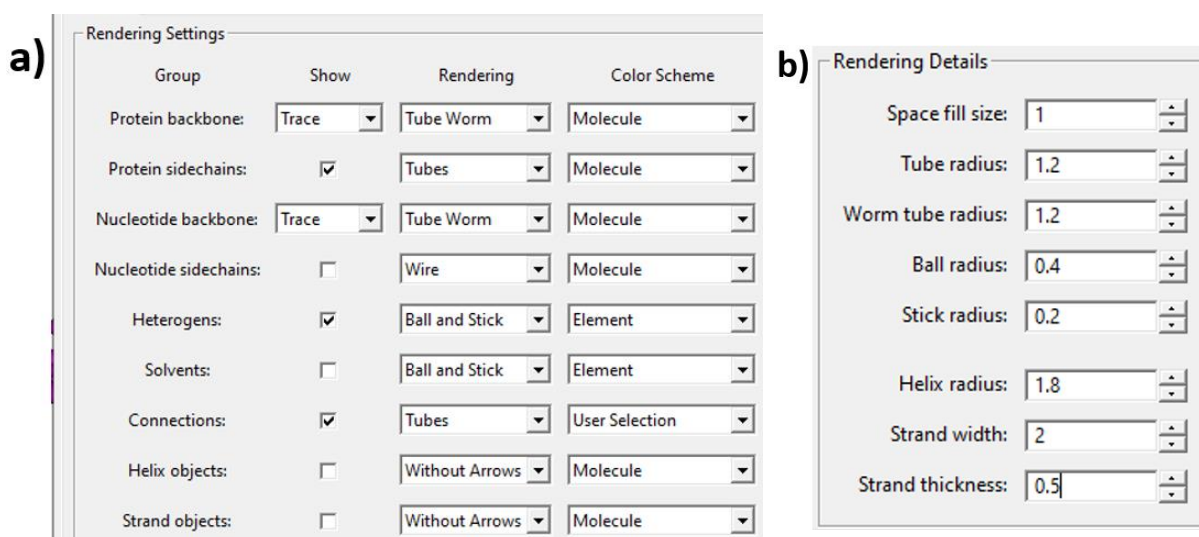
## 5. ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES

### Análisis bioinformático de estructuras de proteínas G heterotriméricas

Para indagar cómo las superficies de interacción entre  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  influyen en la disociación de las proteínas G heterotriméricas, se realizó un análisis bioinformático, a una resolución de 3.5 Å, del sitio 1 y el sitio 2 a partir de las estructuras cristalizadas disponibles de los heterotrimeros  $G_i$  (Liu *et al.*, 2016) y  $G_q$  (Nishimura *et al.*, 2010). Para dicho análisis, se empleó el programa bioinformático Cn3D (figura 13) (Wang *et al.*, 2000), que se encuentra disponible de manera gratuita en el siguiente enlace:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>

Los parámetros empleados para visualizar las estructuras fueron los siguientes:



**Figura 13. Configuración del programa Cn3D empleada para visualizar las estructuras de las proteínas G heterotriméricas.** a) Se muestran los parámetros empleados para la representación de las estructuras de  $G_i$  y  $G_q$ . b) Se muestra la configuración empleada para los detalles de representación de las estructuras de  $G_i$  y  $G_q$ .

Para realizar el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la  $\alpha$ N de  $G\alpha_i$  y de  $G\alpha_q$ , primero se obtuvieron las secuencias de aminoácidos (aa)  $G\alpha_{i2}$  (número de acceso: NP\_002061.1, seleccionada por ser la isoforma más ubicua de  $G\alpha_i$ ) y de  $G\alpha_q$  (número de acceso: NP\_002063) de *Homo sapiens* a partir de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

Una vez obtenidas las secuencias, se determinó hasta qué aminoácido comprende la región de la  $\alpha$ N en  $G\alpha_{i2}$  y  $G\alpha_q$  mediante el *Common G $\alpha$  Numbering system* (Flock *et al.*, 2015) (<https://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/CGN/>). Esta herramienta bioinformática permite comparar las secuencias y estructuras de las diferentes proteínas  $G\alpha$ . Así, se determinó que la  $\alpha$ N de  $G\alpha_{i2}$  va de M1 a K29, mientras que la  $\alpha$ N de  $G\alpha_q$  engloba desde M1 hasta R37.

Después de que se determinó la secuencia comprendida por la  $\alpha$ N de  $G\alpha_{i2}$  y de  $G\alpha_q$ , se realizó el alineamiento de ambas secuencias mediante la herramienta bioinformática Pairwise Sequence Alignment del European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), disponible en línea en el siguiente enlace: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>.

Posteriormente, se determinó la composición de aminoácidos mediante la herramienta bioinformática *BioEdit Sequence Alignment Editor* (disponible en <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

### **Diseño de construcciones**

Con el fin de analizar de manera más profunda cómo las superficies de interacción entre  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  influyen en la disociación de las proteínas G heterotriméricas, se diseñó la construcción de una proteína quimérica que está conformada por el sitio 2 de  $G\alpha_{i2}$  (M1-K29) y el sitio 1 de  $G\alpha_q$  (R38-V359), la cual puede ser referida como  $G\alpha_{i2(1-29)}-G\alpha_{q(38-359)}$  o, de manera más práctica,  $G\alpha_{i2}-G\alpha_q$ . De acuerdo con nuestra hipótesis, esta quimera transfectada en un sistema de receptor sintético acoplado de manera exclusiva a  $G_q$  ( $G_q$ -DREADD) y que únicamente es activado por un ligando sintético (CNO), permitiría que el receptor se comportara como si estuviera

acoplado a  $G_i$ , ya que postulamos que la disociación de  $G\beta\gamma$  es más efectiva cuando proviene de  $G_i$ , debido a que la afinidad de éste heterodímero por el sitio 2 de  $G\alpha_i$  es menor con respecto a la afinidad que presenta por el sitio 2 de  $G\alpha_q$  a la cual permanece unida después de la activación por un GPCR.

Para elaborar la construcción de esta proteína quimérica, se obtuvo la secuencia de nucleótidos tanto de  $G\alpha_{i2}$  (número de acceso: NM\_002070.4) como de  $G\alpha_q$  (número de acceso: NM\_002072.5), que se encuentran disponibles en la base de datos del NCBI y después, se aplicó la técnica de PCR de traslape, que consiste de tres reacciones (figura 14).

### **PCR de traslape para obtener la secuencia codificante para la proteína quimérica $G\alpha_{i2(1-29)}$ - $G\alpha_{q(38-359)}$**

Como se indicó anteriormente, la PCR de traslape consiste de tres reacciones, en la primera reacción (figura 14) se amplifica la región correspondiente a la  $\alpha N$  de  $G\alpha_{i2}$ , empleando como templado el cDNA de  $G\alpha_{i2}$  de *Homo sapiens*. Para este fin, se diseñó el siguiente par de oligonucleótidos a partir de la secuencia de nucleótidos de  $G\alpha_{i2}$  y de  $G\alpha_q$ :

> $G\alpha_{i2}$ -5'HindIII

ata**AAGCTT**atgGGCTGCACCGTGAGCGCC

En mayúsculas y verde, se observa la secuencia que reconoce la enzima de restricción HindIII (AAGCTT) para clonar el producto de PCR en el vector pCEFL2.

> $G\alpha_{i2(K29)-q(R38)}$  Rv

**CTTGAGCTCCCG**cttctctccgtcctcccgcag

Para este segundo oligonucleótido, se añadió una secuencia de traslape (resaltada en rojo y mayúsculas) que codifica para los primeros 4 aa de  $G\alpha_q$  a partir de R38.

En la segunda reacción (figura 14), se amplifica la secuencia correspondiente al dominio de GTPasa de  $G\alpha_q$ , empleando como templado el cDNA de  $G\alpha_q$  de *Homo sapiens*. Por lo tanto, se diseñó el siguiente par de oligonucleótidos:

> $G\alpha_{i2(K29)-q(R38)}$  Fw

GACGGAGAGAAGcgggagctcaagctgctgctg

Este oligonucleótido, tiene de manera adicional una secuencia de traslape (resaltada en azul y mayúsculas) que codifica para los últimos 4 aa de la  $\alpha N$  de  $G\alpha_{i2}$ .

El oligonucleótido Rv para esta segunda reacción fue el siguiente:

> $G\alpha_q$ -3'BamHI

ataggatccTTAGACCAGATTGTACTCCTTC

Se añadió la secuencia que reconoce la enzima de restricción BamHI (ggatcc, en verde) para clonar el producto de PCR en el vector pCEFL2.

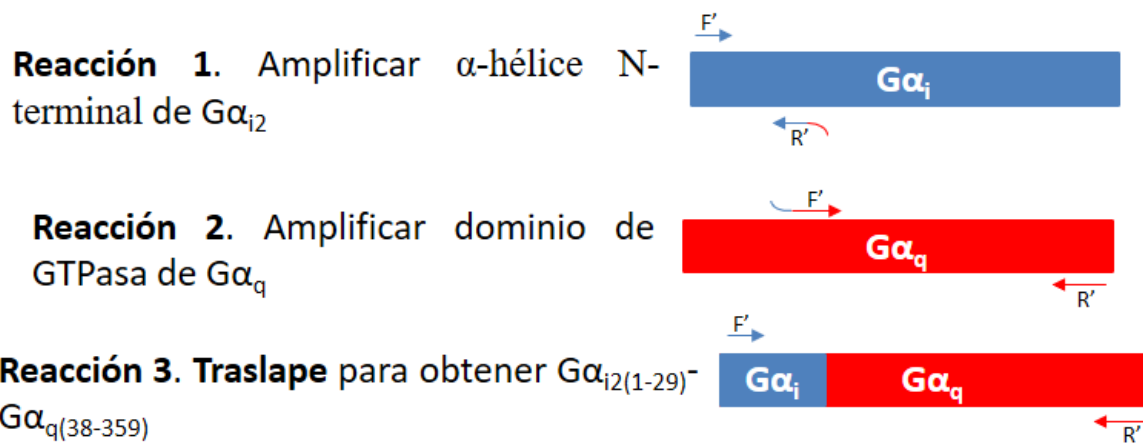
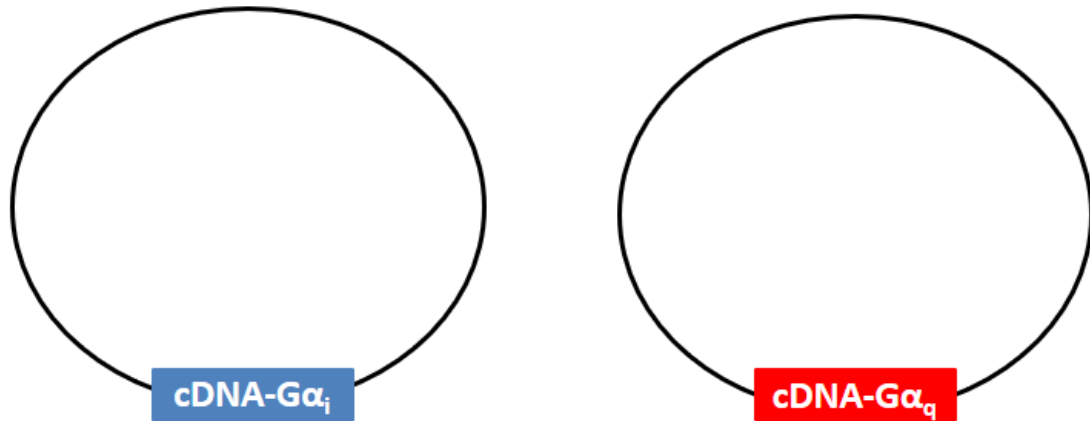
Por último, una vez que se obtienen los productos de las dos reacciones anteriores, se lleva a cabo la tercera reacción, que es una reacción de traslape (figura 14). En ésta, se emplean como templado los productos de la primera y segunda reacción, utilizando los oligonucleótidos de los extremos de las mismas reacciones, es decir, el oligonucleótido Fw de la reacción 1 y el oligonucleótido Rv de la reacción 2, que son los siguientes:

> $G\alpha_{i2}$ -5'HindIII

ataAAGCTTatgGGCTGCACCGTGAGCGCC

> $G\alpha_q$ -3'BamHI

ataggatccTTAGACCAGATTGTACTCCTTC



**Figura 14. PCR de traslape para generar el cDNA que codifica para la quimera  $G\alpha_{i2(1-29)}-\alpha_{q(38-359)}$ .** Para todas las reacciones, los oligonucleótidos se representan mediante flechas rojas, azules o la combinación de ambas. En la **reacción 1**, se amplifica la  $\alpha$ N de  $G\alpha_{i2}$ , empleando como templado el cDNA de  $G\alpha_{i2}$  (azul), el oligonucleótido  $Rv'$  para esta reacción presenta la particularidad de tener una región de traslape con la secuencia de  $G\alpha_q$ , como se observa en la figura (flecha azul con rojo). En la **reacción 2**, se amplifica el dominio de GTPasa de  $G\alpha_q$ , empleando como templado el cDNA de  $G\alpha_q$  (rojo). En este caso, el oligonucleótido  $Fw'$  presenta la particularidad de tener una región de traslape con la secuencia de  $G\alpha_{i2}$  como se puede observar en la figura (flecha roja con azul). La **reacción 3** es la reacción de **traslape**, mediante la cual se obtiene la secuencia que codifica para la proteína quimérica  $G\alpha_{i2}-\alpha_q$ . Para esta reacción se emplean como templado los productos de las dos reacciones anteriores y el oligonucleótido  $Fw'$  de la reacción 1 junto con el oligonucleótido  $Rv'$  de la reacción 2.

## Amplificación por PCR de las secuencias correspondientes a la $\alpha$ N de $G\alpha_{i2}$ y el dominio de GTPasa de $G\alpha_q$

Como se mencionó previamente, para obtener la secuencia codificante para la proteína quimérica  $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$ , se llevaron a cabo tres reacciones de PCR. En la reacción 1, se amplificó la  $\alpha$ N de  $G\alpha_{i2}$ , mientras que en la reacción 2, se amplificó el dominio de GTPasa de  $G\alpha_q$ . Para ambas reacciones, se empleó el kit Expand High Fidelity PCR System® de Roche, con el número de catálogo 11 732 650 001. Se empleó un vial específico para PCR en cada reacción, con un volumen de reacción de 53  $\mu$ L cada uno.

>  $\alpha$ N de  $G\alpha_{i2}$

Tabla 1. Mezcla para reacción 1 de PCR de traslape para quimera  $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$ .

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)
Buffer 10X con $MgCl_2$ 15 mM	5
$MgCl_2$ 25 mM	4
dNTPs 10 mM	1
> $G\alpha_{i2}$ -5'HindIII 10 $\mu$ M	2.5
> $G\alpha_{i2}(K29)$ -q(R38) Rv 10 $\mu$ M	2.5
DMSO	2.5
Betaína	2.5
pcDNA- $G\alpha_{i2}$ 100 ng/mL	1
Taq polimerasa Expand High Fidelity	0.5
H <sub>2</sub> O Pisa	31.5

> Dominio de GTPasa de  $G\alpha_q$

Tabla 2. Mezcla para reacción 2 de PCR de traslape para quimera  $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$ .

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)
Buffer 10X con $MgCl_2$ 15 mM	5
$MgCl_2$ 25 mM	4

dNTPs 10 mM	1
>G $\alpha_{i2(K29)-q(R38)}$ Fw 10 $\mu$ M	2.5
>G $\alpha_q$ -3'BamHI 10 $\mu$ M	2.5
DMSO	2.5
Betaína	2.5
pcDNA-G $\alpha_q$ 100 ng/ $\mu$ L	1
Taq polimerasa Expand High Fidelity	0.5
H <sub>2</sub> O Pisa	31.5

Se prepararon las mezclas de reacción en los mismos viales para PCR, en hielo y dentro de una campana de flujo laminar. Una vez preparada la mezcla, se llevaron a cabo ambas reacciones de PCR en el termociclador, que fue programado para funcionar con las siguientes condiciones:

Tabla 3. Programa de amplificación para reacción 1 y 2 de PCR de traslape para quimera G $\alpha_{i2}$ -G $\alpha_q$ .

Ciclos	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	Inicio	94	5
30	Desnaturalización	94	1
	Alineamiento	60	1
	Extensión	72	1
1	Extensión final	72	5

Posteriormente, se verificó la amplificación de ambos fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa. Para esto, se elaboró un gel de agarosa al 1% (50 mL de buffer, 0.5 g de agarosa y 1  $\mu$ L de bromuro de etidio). El bromuro de etidio empleado en la preparación del gel tiene la función de marcar el DNA, ya que se intercala en el mismo y emite luz tras la exposición a luz UV. Para cargar las muestras del producto de amplificación, se mezclaron 5  $\mu$ L de cada producto de amplificación y 1  $\mu$ L del buffer de muestra 5X DNA (Gel Loading buffer de Sigma-



Aldrich) para cargarlos en un pozo de manera individual. También, se cargaron 2  $\mu\text{L}$  del marcador de peso molecular de 100 bp. Para la electroforesis se aplicó una corriente de 60 mA durante 20 minutos. Después, el gel fue observado en un transiluminador para comprobar la presencia de las bandas en el peso esperado, 99 bp para la  $\alpha\text{N}$  de  $\text{G}\alpha_{i2}$  y 978 bp para el dominio de GTPasa de  $\text{G}\alpha_q$ .

En seguida, los 45  $\mu\text{L}$  restantes de cada producto de reacción se purificaron por columna mediante el kit QIAquick® de Qiagen (número de catálogo: 28106), siguiendo el protocolo de purificación de DNA en solución indicado en el manual del usuario. Después, se verificó la pureza de ambos productos a partir de un gel diagnóstico de agarosa al 1%, empleando las condiciones previamente mencionadas.

#### **Amplificación por PCR de la secuencia que codifica para la proteína quimérica $\text{G}\alpha_{i2(1-29)}$ - $\text{G}\alpha_q(38-359)$**

Una vez obtenidos los productos de la reacción 1 y 2, se llevó a cabo la reacción 3 o reacción de traslape. Como se muestra en la figura 14, los productos de las dos primeras reacciones poseen una secuencia de 12 bases complementarias entre sí, lo cual permite que hibriden durante la reacción de traslape. Para esta tercera reacción, las mezclas de reacción se prepararon (en hielo en campana de flujo laminar) dos viales que contenían un volumen de 54  $\mu\text{L}$ , cada uno.

**Tabla 4. Mezcla para reacción 3 de PCR de traslape para quimera  $\text{G}\alpha_{i2}$ - $\text{G}\alpha_q$ .**

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Buffer 10X con $\text{MgCl}_2$ 15 mM	5
$\text{MgCl}_2$ 25 mM	4
dNTPs 10 mM	1
$>\text{G}\alpha_{i2}$ -5'HindIII 10 $\mu\text{M}$	2.5
$>\text{G}\alpha_q$ -3'BamHI 10 $\mu\text{M}$	2.5
DMSO	2.5
Betaína	2.5

$\alpha$ N de $G\alpha_{i2}$ 100 ng/ $\mu$ L	1
Dominio de GTPasa de $G\alpha_q$ 100 ng/ $\mu$ L	1
Taq polimerasa Expand High Fidelity	0.5
H <sub>2</sub> O Pisa	31.5

Los viales fueron colocados en el termociclador, que fue configurado de la siguiente manera para realizar la PCR:

Tabla 5. Programa de amplificación para reacción 3 de PCR de traslape para quimera  $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$ .

Ciclos	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	Inicio	94	5
30	Desnaturalización	94	1
	Alineamiento	60	1
	Extensión	72	1
1	Extensión final	72	5

Nuevamente, se confirmó la obtención del producto, con un peso esperado de 1077 bp, mediante electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, se purificó el producto a través del protocolo de extracción en gel (especificado en el manual del usuario), en el cual se utiliza una navaja para cortar el fragmento deseado a partir del gel, y para observar la banda correspondiente se utiliza un transiluminador. Para llevar a cabo este protocolo, se empleó el kit QIAquick® de Qiagen. Se comprobó la correcta purificación del producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa.

### **Digestión enzimática de la secuencia codificante para la quimera $G\alpha_{i2(1-29)}$ - $G\alpha_q(38-359)$**

El cDNA codificante para la quimera  $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$  que, a partir de ahora se le puede llamar inserto, se clonó en el vector de expresión pCEFL2. Por lo tanto, se aplicó una digestión al producto y al vector, empleando de manera simultánea las enzimas

de restricción HindIII y BamHI. La digestión enzimática da origen a extremos pegajosos, tanto en el inserto como en el vector, que son complementarios entre sí y esto permite introducir el inserto en el vector de expresión aplicando una reacción de ligación.

Como se mencionó anteriormente, se emplearon las enzimas HindIII y BamHI, junto con el buffer B SuRE/Cut, manufacturados por Roche Applied Science.

Para las reacciones de digestión, se prepararon las mezclas en dos viales de 1500  $\mu$ L como se indica en la siguiente tabla:

**Tabla 6. Mezcla de reacción para la digestión enzimática del vector y del inserto  $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$ .**

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)	
DNA	4 (pCEFL2, 250ng/ $\mu$ L)	20 (inserto, $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$ )
Buffer B	5	5
HindIII	0.5	0.5
BamHI	0.5	0.5
H <sub>2</sub> O	40	24

Una vez preparados los viales, se introdujeron en una incubadora a 37°C durante 12 horas. Después, se comprobó la digestión mediante una electroforesis en gel de agarosa, utilizando como control negativo vector pCEFL2 sin digerir (500 ng).

Tras comprobar que la digestión fue exitosa, se realizó la purificación del vector y del inserto (por medio del kit previamente mencionado) con el fin de eliminar los restos de enzimas y buffer. La purificación fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa.

### **Ligación del inserto $G\alpha_{i2(1-29)}$ - $G\alpha_q(38-359)$ al vector de expresión pCEFL2**

Para introducir el inserto  $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$  en el vector pCEFL2, se llevó a cabo una reacción de ligación de DNA. Previo a la reacción, se preparó una dilución 1:10 del vector pCEFL2 digerido y purificado. Para aplicar la reacción, se empleó la enzima ligasa

de DNA T4 y el buffer de ligación 10X de Roche Applied Science. La reacción se preparó a temperatura ambiente en un vial para PCR añadiendo los siguientes reactivos:

Tabla 7. Mezcla para la reacción de ligación del vector con inserto  $G\alpha_{i2}-G\alpha_q$ .

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)
Inserto $G\alpha_{i2}-G\alpha_q$ digerido y purificado	7.5
pCEFL2 digerido y diluido	0.5
Buffer de ligación 10X	1
Ligasa T4	1

El vial se incubó a 16°C durante 16 horas en el termociclador.

Así, el inserto quedó introducido entre el sitio de reconocimiento para HindIII (posición 1495) y para BamHI (posición 1513) del vector pCEFL2 (figura 15).

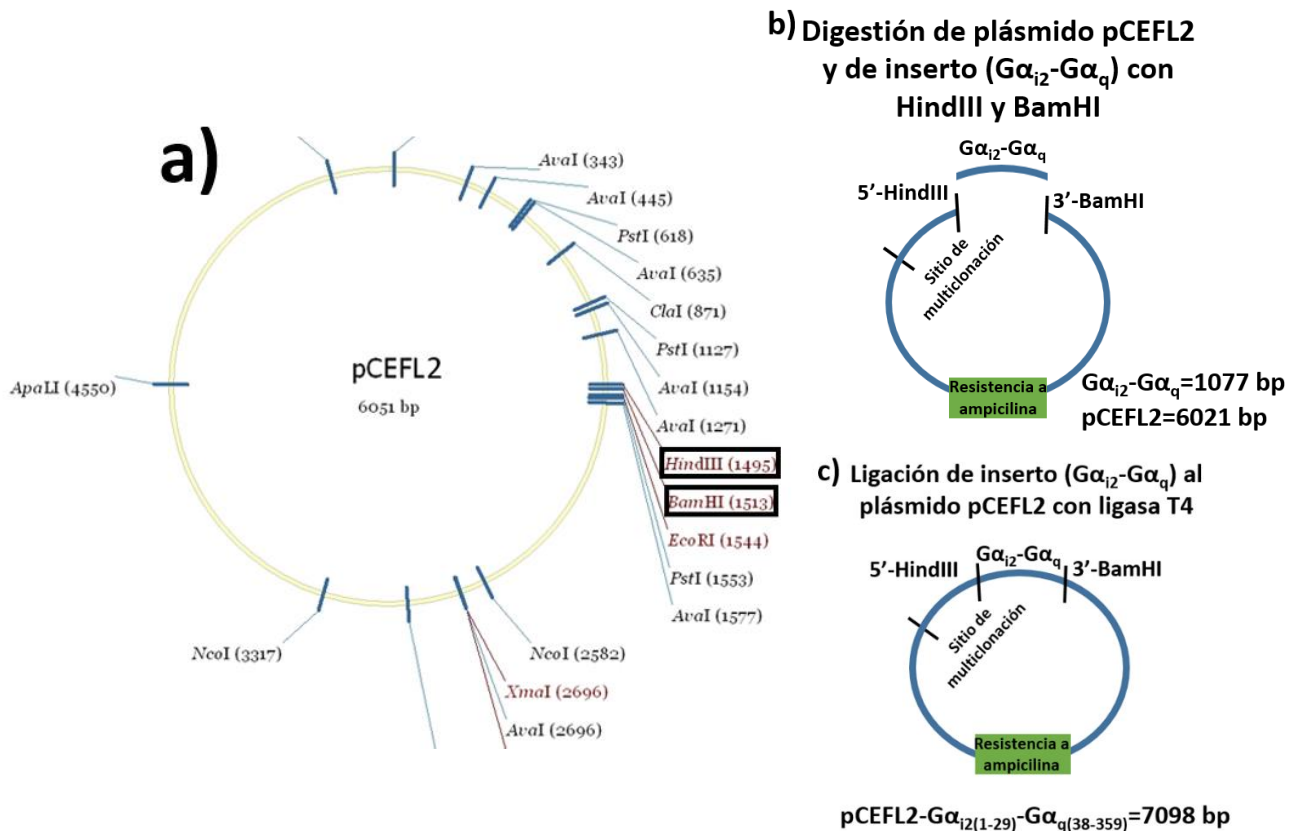


Figura 15. Proceso de ligación de inserto  $G\alpha_{i2}-G\alpha_q$  en el vector de expresión pCEFL2. a) Se observa el mapa de pCEFL2 y su sitio de multiclonación, en el cual se encuentran las secuencias de reconocimiento para HindIII (posición 1495) y BamHI (posición 1513), enmarcadas en negro. b) Se esquematiza la digestión del inserto y el vector con las enzimas de restricción HindIII y BamHI. c) Esquema del inserto ligado al vector entre los sitios previamente mencionados, generando un plásmido de 7134 bp.

## **Transformación de bacterias competentes *Escherichia coli* DH5α**

Una vez que se obtuvo el producto de ligación, se empleó el mismo para transformar bacterias de *E. coli* DH5α mediante el siguiente protocolo:

1. Descongelar vial de bacterias competentes sumergiéndolo en hielo durante 10 minutos.
2. Añadir 1 µL del producto de reacción de ligación a 50 µL de bacterias competentes.
3. Incubar las bacterias en hielo durante 30 minutos.
4. Realizar un choque térmico, introduciendo el vial con las bacterias competentes en agua a una temperatura de 42°C durante 60 segundos.
5. Inmediatamente después, incubar las bacterias en hielo durante 10 minutos.
6. Añadir 300 µL de medio S.O.C. al vial en campana de flujo.
7. Incubar en agitación (180-200 rpm) durante 1 hora a 37°C.
8. Centrifugar el vial a 2300 rpm durante 4 minutos.
9. Eliminar sobrenadante, dejando únicamente 50 µL del mismo. Resuspender pellet con los 50 µL de sobrenadante.
10. Plaquear toda la solución en una caja de Petri con medio sólido LB con ampicilina (100 µg/mL) e incubar a 37°C durante 12 horas toda la noche.

El vector de expresión tiene como parte de su secuencia un gen que le atribuye resistencia a ampicilina (figura 15). Por lo tanto, solo las bacterias que incorporan el producto de ligación, tenga o no el inserto, son capaces de crecer en medio con antibiótico para formar colonias (figura 16).

### **Extracción de plásmido**

Al siguiente día, por la tarde, se picaron colonias individuales usando un asa de plástico para después inocular tubos de ensayo que contenían 5 mL de medio LB líquido con ampicilina. Después, se incubaron los tubos agitándolos a 180-200 rpm durante 12 horas a 37°C toda la noche. Pasado este tiempo, se llevó a cabo la técnica de extracción de plásmido a partir de bacterias mediante el kit QIAprep® Spin Miniprep de QIAGEN, siguiendo el procedimiento del manual del usuario.

## Digestión diagnóstica para corroborar que el plásmido contiene el inserto $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$

Posterior a la extracción de DNA plasmídico bacteriano, se realizó una digestión diagnóstica (figura 16) para verificar que el plásmido tenía el inserto  $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$ . Para esta reacción de digestión enzimática, se emplearon de nuevo las enzimas HindIII y BamHI que cortan exactamente en las regiones que flanquean el inserto, de tal manera que se esperaba que se liberara un fragmento de 1077 bp.

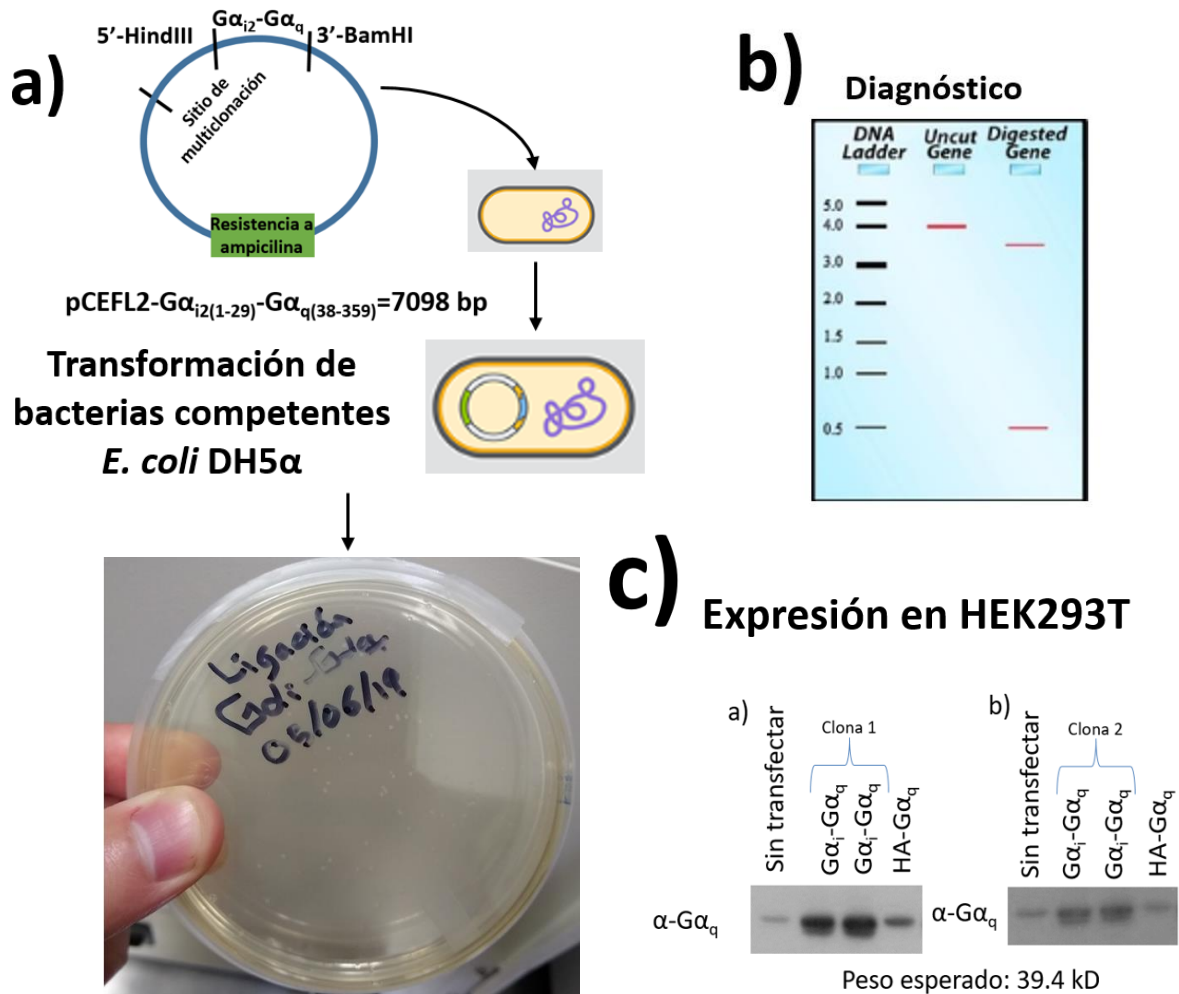
También, se aplicó una digestión diagnóstica a otra serie de plásmidos extraídos, pero esta vez se empleó la enzima de restricción XhoI, que corta entre las posiciones 1495 y 2815, las cuales no se encuentran dentro de la secuencia del inserto y, por lo tanto, se esperaba la liberación de un fragmento con peso de 1320 bp.

Se emplearon las enzimas de restricción y buffers SuRE/Cut de Roche Applied Science, con la siguiente combinación de reactivos:

Tabla 8. Mezcla de reacción para la digestión diagnóstica de construcción pCEFL2-  $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$ .

Reactivo		Volumen ( $\mu$ L)
Plásmido producto de ligación ( $pCEFL2$ - $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$ )	Plásmido producto de ligación ( $pCEFL2$ - $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$ )	3
Buffer B	Buffer H	2
	XhoI	1
HindIII		0.5
BamHI		0.5
H <sub>2</sub> O pisa	H <sub>2</sub> O pisa	14

Los viales fueron incubados a 37°C durante 12 horas y se verificó la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa, bajo las condiciones anteriormente especificadas. Se utilizó como control  $pCEFL2$  sin digerir y  $pCEFL2$  vacío y digerido con las mismas enzimas que el producto de ligación.



**Figura 16. Etapas posteriores a la ligación para obtener la construcción pCEFL2- $G\alpha_{12(1-29)}$ - $G\alpha_{q(38-359)}$ .** a) En el proceso posterior a la ligación, se transforman bacterias con el producto de reacción de ligación y se obtienen colonias que crecen en medio sólido con antibiótico que permite seleccionar solo las clonas que tienen el plásmido, como se observa en la figura. b) Después de la transformación, se pican colonias para cultivarlas en medio líquido y, a partir de éstas, extraer el plásmido para realizar una digestión diagnóstica la cual permite comprobar que el plásmido contiene el inserto del peso esperado. c) Por último, las clonas positivas (que liberan el inserto) se transfectan en células HEK 293T para comprobar que se expresan de acuerdo con el peso esperado.

## Expresión de $G\alpha_{i2(1-29)}$ - $G\alpha_{q(38-359)}$ en células HEK 293T

Para expresar la construcción de la proteína quimérica (figura 16), se sembraron células HEK 293T en una placa de 6 pozos de 35 mm de diámetro, se marcó cada pozo con un número del 1 al 6. Para favorecer la capacidad de adhesión de las células, cada pozo fue tratado previamente con 2 mL de poli-D-lisina 1X. La placa fue incubada durante 15 minutos y después, se retiró la poli-D-lisina con sistema de vacío y se lavó cada pozo con 1 mL de PBS.

A partir de una caja de 100 mm de diámetro (stock), en la cual se habían sembrado células HEK 293T con suero fetal bovino (SFB) al 10% y se habían dejado crecer hasta una confluencia del 100%, se tomaron células después de tripsinizar el stock, para cultivar 600  $\mu$ L en cada pozo.

### Transfección

Para el día posterior, las células habían alcanzado una confluencia del 60% y fueron transfectadas con dos clonas positivas de pCEFL2- $G\alpha_{i2(1-29)}$ - $G\alpha_{q(38-359)}$  que liberaron el inserto con el peso esperado. Además, se transfectó HA- $G\alpha_q$ , mientras que un pozo no fue transfectado, éstos dos últimos se emplearon como control.

Para la transfección, se utilizó el reactivo PEI (Polysciences, Inc.) y se aplicó el siguiente protocolo:

1. Se emplearon 6 viales de 1500  $\mu$ L que fueron etiquetados dependiendo del plásmido que se transfectó, control negativo,  $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$  (clona 1, 750 ng),  $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$  (clona 2, 750 ng), HA- $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$  (clona 1, 1000 ng) y  $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$  (clona 2, 1000 ng). A cada tubo se le añadieron 75  $\mu$ L de OptiMEM® (Thermo Scientific) y a un séptimo tubo también se le añadieron 455  $\mu$ L de OptiMEM®.
2. Se agregaron las siguientes cantidades de DNA plasmídico para cada tubo:  
Tubo 1, no se le añadió nada  
Tubo 2, 750 ng de  $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$  (clona 1)  
Tubo 3, 750 ng de  $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$  (clona 2)  
Tubo 4, 500 ng de HA- $G\alpha_q$   
Tubo 5, 1000 ng de  $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$  (clona 1)



- Tubo 6, 1000 ng de  $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$  (clona 2)
3. Después, al séptimo tubo con Opti-MEM, se le añadieron 16  $\mu$ L de PEI precalentado a 72°C durante 2 minutos.
  4. A partir de la mezcla del tubo 7, se le añadieron 75  $\mu$ L a cada tubo y se dejaron incubando durante 15 minutos.
  5. Durante los 15 minutos, se retiró el medio completo a cada pozo y, después de un lavado con 1 mL de PBS, éste fue intercambiado por medio de ayuno (sin suero ni antibiótico).
  6. Al finalizar la incubación de 15 minutos, se añadió la mezcla de cada tubo (1-6) a su respectivo pozo.
  7. La placa con los 6 pozos se incubó a 37°C.

### **Análisis de expresión de la construcción**

#### Lisis

Los seis pozos con células transfectadas se lisaron. Para este fin, se prepararon 1800  $\mu$ L de buffer de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas. A continuación, se presenta el contenido del stock del buffer de lisis:

**Tabla 9. Composición del stock del buffer de lisis.**

Reactivo	Volumen (mL)
Tris-HCl 1M	25
EDTA 0.5 M	5
NaCl 2.5 M	30
Tritón-X100	5
H <sub>2</sub> O MQ	435

Así, el buffer de lisis empleado quedó preparado de la siguiente manera:

Tabla 10. Composición del buffer empleado para la lisis celular.

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Buffer de lisis	1800
Aprotinina	1.8
Leupeptina	1.8
NaF	1.8
$\text{Na}_3\text{VO}_4$	1.8
PMSF 0.1 M	18
$\beta$ -glicerol fosfato	18

Durante el proceso de lisis, la placa de seis pozos fue colocada en hielo, se removió el medio a cada pozo y se lavó con 200  $\mu\text{L}$  de PBS. Posteriormente, se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis a cada pozo y se procedió a raspar los mismos utilizando un gendarme de plástico para cada uno. El lisado fue concentrado en la zona inferior del pozo para recolectarlo por medio de una pipeta de 1000  $\mu\text{L}$  en un vial de 1500  $\mu\text{L}$ . Después, se centrifugaron los viales a 13000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4°C. En seguida, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cada tubo para agregarlos a un nuevo tubo de 1500  $\mu\text{L}$ . A los 200  $\mu\text{L}$  de lisado se les añadieron 70  $\mu\text{L}$  de buffer de muestra 4X con  $\beta$ -mercaptoetanol y se hirvieron durante cinco minutos. Después de hervir las muestras, se centrifugaron a 13000 rpm por cinco minutos.

#### Western Blot

- a) Primeramente, se elaboró un gel de poliacrilamida al 10% en el cual se corrieron las muestras aplicando una corriente de 20 mA en una cámara de electroforesis y empleando buffer de corrida 1X.
- b) En el siguiente paso, las proteínas en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF (activada con metanol previamente) por un período de dos horas

con treinta minutos a una corriente de 320 mA en una cámara de transferencia y se empleó un buffer de transferencia.

- c) Después, se bloqueó la membrana utilizando leche Svelty al 5% en TBS-Tween (o TBS-T) al 0.05% por un período de una hora a temperatura ambiente, en el shaker FINEPCR CR300t.
- d) En seguida, la membrana fue lavada con H<sub>2</sub>O destilada para retirar la leche completamente y se aplicaron tres lavados de cinco minutos con TBS-T a temperatura ambiente en el shaker.
- e) Se retiró el TBS-T y se agregó el anticuerpo (Ab) 1° anti-G $\alpha_{q/11}$  SC-392 (rabbit policlonal, número 509, Aby 283, producido por Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:10000 en TBS-T, éste Ab reconoce la región que comprende a los aa 60-359 de la subunidad G $\alpha_{q/11}$ . Se incubó la membrana con Ab 1° durante toda la noche a 4°C y en agitación constante en el shaker.
- f) El día siguiente, el Ab 1° fue retirado y se llevaron a cabo tres lavados de cinco minutos con TBS-T a temperatura ambiente en el shaker.
- g) Posteriormente, se añadió el Ab 2°  $\alpha$ -rabbit (Kpl) a una dilución 1:10000 en leche al 5% en TBS-T y se incubó la membrana durante una hora a T ambiente en el shaker.
- h) Se retiró el Ab 2° y se lavó la membrana con H<sub>2</sub>O para eliminar la leche completamente. Después, se hicieron tres lavados de 10 minutos con TBS-T a T ambiente en shaker.
- i) Finalmente, se reveló la proteína. Para ello, se preparó una mezcla del sustrato quimioluminiscente Immobilon® (MILIPORE) a una proporción 1:1, es decir, 400  $\mu$ L de sustrato peróxido y 400  $\mu$ L de luminol. La membrana fue incubada con esta mezcla durante un minuto y, posteriormente, se colocó en un cassette para autorradiografía (hypercassette, Amersham Biosciences). El revelado de la proteína se hizo en cuarto oscuro, y se expuso a la membrana una placa para rayos X, dividida en 4 cuadrantes, cada cuadrante para un tiempo diferente, de 30 segundos, un minuto y medio, tres minutos y cinco minutos.

Se detectó a la quimera G $\alpha_{i2}$ -G $\alpha_q$  con un peso esperado de 39.4 kD.

La generación de la construcción pCEFL2-G $\alpha_{i2(1-29)}$ - $\alpha_{q(38-359)}$  nos llevó a sugerir una serie de construcciones complementarias para demostrar que la  $\alpha_N$  de la subunidad G $\alpha_q$  es suficiente para mantener la interacción con el heterodímero G $\beta\gamma$ . De estas construcciones, se llevaron a cabo los primeros pasos para ser completadas en trabajos posteriores.

La primera construcción corresponde a la quimera recíproca de G $\alpha_{i2(1-29)}$ - $\alpha_{q(38-359)}$ . Es decir, una quimera que tenga la  $\alpha_N$  de G $\alpha_q$  y el dominio de GTPasa de G $\alpha_{i2}$ , o bien, G $\alpha_q$ -G $\alpha_{i2}$ . Para esta construcción, proponemos el nombre de pCEFL2-G $\alpha_{q(1-37)}$ - $\alpha_{i2(30-355)}$ . Esta quimera, transfectada en un sistema de receptor sintético acoplado de manera exclusiva a G $_i$  (G $_i$ -DREADD) y que únicamente es activado por un ligando sintético (CNO), permitiría que el receptor se comportara como si estuviera acoplado a G $_q$ , actuando como una dominante negativa, ya que impediría la disociación de G $\beta\gamma$ .

Además de la construcción anterior, sugerimos las construcciones de la  $\alpha_N$  de G $\alpha_q$  (pCEFL2-G $\alpha_{q(1-37)}$ -GST) y la  $\alpha_N$  de G $\alpha_{i2}$  (pCEFL2-G $\alpha_{i2(1-29)}$ -GST) fusionadas a GST en la región C-terminal de ambas para realizar ensayos de pull-down y evaluar su interacción con G $\beta\gamma$ . De acuerdo con nuestra hipótesis, esperamos que la  $\alpha_N$  de G $\alpha_q$  interactúe con mayor afinidad con G $\beta\gamma$  en comparación con la  $\alpha_N$  de G $\alpha_{i2}$ . Cabe resaltar que proponemos que la proteína GST quede del lado C-terminal de ambas  $\alpha_N$  para evitar que se vea afectada la interacción con G $\beta\gamma$  de acuerdo con la estructura cristalizada de las proteínas G heterotriméricas (figura 6). Por lo tanto, también se debe generar una construcción donde la secuencia codificante para la proteína GST quede hacia la región 3' del sitio de multiclonación (pCEFL2-3'-GST) y así, las  $\alpha_N$ s se puedan introducir antes de la secuencia codificante para GST.

### **Construcción pCEFL2-G $\alpha_{q(1-37)}$ - $\alpha_{i2(30-355)}$**

Con respecto a la quimera G $\alpha_q$ -G $\alpha_{i2}$ , el diseño se realizó de la misma manera que para la quimera G $\alpha_{i2}$ - $\alpha_q$ , pero con base en sus regiones correspondientes y también se aplicó una PCR de traslape para obtener el cDNA correspondiente (ver figura 14). El inserto está propuesto para quedar insertado entre los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción NdeI y EcoRI. De tal manera que,

para amplificar la  $\alpha$ N de  $G\alpha_q$  (reacción 1) se diseñó el siguiente par de oligonucleótidos:

> $G\alpha_q$ -5'Ndel

atacatatgATGACTCTGGAGTCCATCATGGC

En verde, se resalta la secuencia que reconoce la enzima de restricción NdeI (catatg) para clonar el producto de PCR en el vector pCEFL2.

> $G\alpha_q(R37)$ -i2(A30) Rv

CTCCCGCGCCGCGcgggcgctcccgcttgccct

Para este segundo oligonucleótido, se añadió una secuencia de traslape (resaltada en azul y mayúsculas) que codifica para los primeros 4 aa de  $G\alpha_{i2}$  a partir de A30.

En cuanto a la amplificación del dominio de GTPasa de  $G\alpha_{i2}$  (reacción 2), se diseñó el siguiente par de oligonucleótidos:

> $G\alpha_q(R37)$ -i2(A30) Fw

cgggacgcccgcGCGGCGCGGGAGGTGAAGTTG

Este oligonucleótido, tiene de manera adicional una secuencia de traslape (resaltada en rojo y mayúsculas) que codifica para los últimos 4 aa de la  $\alpha$ N de  $G\alpha_q$ .

El oligonucleótido Rv para esta segunda reacción fue el siguiente:

> $G\alpha_{i2}$ -3'EcoRI

atagaattctcaGAAGAGGCCGCGAGTCCTTCAGG

Se añadió la secuencia que reconoce la enzima de restricción EcoRI (gaattc, en verde) para clonar el producto de PCR en el vector pCEFL2.

Ambas reacciones se llevaron a cabo de manera similar a como se indica en las tablas 1, 2 y 3, pero añadiendo los oligonucleótidos y cDNA templado correspondientes.

Por último, una vez que se obtuvieron los productos de las dos reacciones anteriores, se llevó a cabo la tercera reacción (traslape). Se emplearon como templado los productos de la primera y segunda reacción, utilizando los oligonucleótidos de los extremos de las mismas reacciones, es decir, el oligonucleótido Fw de la reacción 1 y el oligonucleótido Rv de la reacción 2, que son los siguientes:

>G $\alpha_q$ -5'NdeI

atacatatgATGACTCTGGAGTCCATCATGGC

>G $\alpha_{i2}$ -3'EcoRI

atagaattctcaGAAGAGGCCGCGAGTCCTTCAGG

Esta reacción se llevó a cabo de manera similar a como se indica en las tablas 4 y 5, pero añadiendo los oligonucleótidos correspondientes.

Se confirmó la obtención del producto, con un peso esperado de 1113 bp, mediante electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, se purificó el producto a través del protocolo de extracción en gel (mencionado previamente). Se comprobó la correcta purificación del producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa.

### **Construcciones pCEFL2-G $\alpha_q(1-37)$ -GST y pCEFL2-G $\alpha_{i2(1-29)}$ -GST**

Para la construcción de la  $\alpha N$  de G $\alpha_q$ , ya se había determinado previamente la secuencia que codifica para esta región y se llevó a cabo una PCR de punto final, que consiste únicamente de una reacción. Se diseñó el siguiente par de oligonucleótidos:

>G $\alpha_q$ -5'NdeI

atacatatgATGACTCTGGAGTCCATCATGGC

En verde, se resalta la secuencia que reconoce la enzima de restricción NdeI (catatg) para clonar el producto de PCR en el vector pCEFL2.

>G $\alpha_q(R37)$ -3'EcoRI

atagaattcGCGGGCGTCCCGCTTGTCCCTGC

Se añadió la secuencia que reconoce la enzima de restricción EcoRI (gaattc, en verde) para clonar el producto de PCR en el vector pCEFL2.

Mientras que, para la construcción de la  $\alpha$ N de  $G\alpha_{i2}$ , de igual manera ya se había determinado previamente la secuencia codificante para la misma y se llevó a cabo una PCR de punto final. Se diseñó el siguiente par de oligonucleótidos:

> $G\alpha_{i2}$ -5'NdeI

atacatatgATGGGCTGCACCGTGAGCGCC

En verde, se resalta la secuencia que reconoce la enzima de restricción NdeI (catatg) para clonar el producto de PCR en el vector pCEFL2.

> $G\alpha_{i2(K29)}$ -3'EcoRI

atagaattctcaGAAGAGGCCGCGAGTCCTTCAGG

Se añadió la secuencia que reconoce la enzima de restricción EcoRI (gaattc, en verde) para clonar el producto de PCR en el vector pCEFL2.

Para llevar a cabo la reacción de PCR punto final, se emplearon las mismas condiciones a las indicadas en las tablas 1 y 3, pero con los oligonucleótidos correspondientes y utilizando como templado el cDNA codificante para  $G\alpha_q$  en el caso de la  $\alpha$ N de  $G\alpha_q$ , o bien, el cDNA codificante para  $G\alpha_{i2}$  en el caso de la  $\alpha$ N de  $G\alpha_{i2}$ .

Se confirmó la obtención de los productos de ambas reacciones, con un peso esperado de 123 bp para la  $\alpha$ N de  $G\alpha_q$ , y de 99 bp para la  $\alpha$ N de  $G\alpha_{i2}$ , mediante electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, cada producto de reacción se purificó mediante el protocolo de purificación de DNA en solución (anteriormente mencionado).

Se comprobó la correcta purificación del producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa.

### Construcción pCEFL2-3'-GST

En cuanto a la construcción pCEFL2-3'-GST, se diseñó el siguiente par de oligonucleótidos:

>GST-5'EcoRI

atagaattcATGTCCCCTATACTAGGTTATTGG

En verde, se resalta la secuencia que reconoce la enzima de restricción EcoRI (gaattc) para clonar el producto de PCR en el vector pCEFL2.

>GST-3'XbaI

ataTCTAGAtcaTTTTGGAGGATGGTCGCCACC

Se añadió la secuencia que reconoce la enzima de restricción XbaI (TCTAGA, en verde y mayúsculas) para clonar el producto de PCR en el vector pCEFL2.

Para llevar a cabo la reacción de PCR punto final, se emplearon las mismas condiciones a las indicadas en las tablas 1 y 3, pero con los oligonucleótidos correspondientes y utilizando como templado el cDNA codificante para GST en la región 5' del sitio de multiclonación del vector pCEFL-GST.

Se confirmó la obtención del producto de PCR, con un peso esperado de 668 bp, mediante electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, el producto de reacción se purificó mediante el protocolo de purificación de DNA en solución (anteriormente mencionado).

Se comprobó la correcta purificación del producto mediante electroforesis en gel de agarosa.

El cDNA codificante para 3'-GST que, a partir de ahora se le puede llamar inserto, se clonó en el vector de expresión pCEFL2. Por lo tanto, se aplicó una digestión al producto y al vector, empleando de manera simultánea las enzimas de restricción EcoRI y XbaI para generar extremos pegajosos, tanto en el inserto como en el vector, lo cual permite introducir el inserto en el vector de expresión mediante una reacción de ligación.



Como se mencionó anteriormente, se emplearon las enzimas EcoRI y XbaI, junto con el buffer H SuRE/Cut, manufacturados por Roche Applied Science.

Para las reacciones de digestión, se prepararon las mezclas en dos viales de 1500 µL como se indica en la tabla 6, pero con las enzimas EcoRI y XbaI, además del buffer H. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de ligación como se señala en la tabla 7, añadiendo el inserto y vector correspondiente, y se esperaba obtener un producto de ligación de 6656 bp. Después, se transformaron células de *E. coli* DH5α competentes con el producto de ligación, mediante el protocolo especificado previamente.

Se purificó DNA a partir de las bacterias transformadas (kit indicado previamente) y se realizó el diagnóstico de clonas positivas (con inserto) a través de una reacción de PCR punto final, como se muestra en la tabla 1, pero con los oligonucleótidos correspondientes y empleando como templado el DNA purificado a partir de clonas transformadas.

Después, para expresar la construcción, las clonas positivas fueron transfectadas en células HEK293T con el reactivo PEI, mediante el protocolo indicado anteriormente. Para la lisis celular, se preparó un buffer como se señala en la tabla 10.

Posteriormente, se elaboró un gel de poliacrilamida al 10% y se cargaron en el mismo las muestras obtenidas a partir de la lisis celular para aplicar una electroforesis a una corriente de 20 Ma. Las proteínas en el gel fueron transferidas a una membrana de PVDF mediante un buffer de transferencia, como se indica previamente.

Para detectar a la proteína GST, la membrana fue incubada con el Ab 1° α-GST (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:10000 toda la noche a 4°C en agitación constante. Después, se realizaron tres lavados de 5 minutos con TBS-T y se incubó la membrana con el Ab 2° α-mouse en leche, durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante, se retiró el Ab 2° y se hicieron tres lavados de 10 minutos con

TBS-T. En seguida, se reveló la membrana (como se indica previamente para la quimera  $G\alpha_{i2}$ - $G\alpha_q$ ) y se detectó a la proteína con un peso esperado de 25.4 kD.

## **Regulación de la señalización de $G\beta\gamma$ por interactores de $G\alpha_q$**

### **Experimento funcional. Transfección de células COS-7.**

Para evaluar si interactores de  $G\alpha_q$  llevan a la disociación de  $G\beta\gamma$ , y, por lo tanto, a la activación de las vías que dependen de éste heterodímero, se llevó a cabo el siguiente experimento en células COS-7, las cuales, en comparación con las células HEK293T presentan bajos niveles basales de pAKT, esta característica permite evaluar las vías de activación dependientes de  $G\beta\gamma$ .

Se partió de un stock de células en una caja p100 a una confluencia de 100%, éstas células fueron despegadas del fondo de la placa con 1 mL de tripsina, y se utilizaron 4 mL de DMEM completo para neutralizar a la tripsina, la solución celular fue resuspendida nueve veces y se tomaron 1.5 mL de la misma para añadirlos a un tubo cónico de 50 mL con 12 mL de DMEM completo. Se resuspendió nueve veces y, a partir de esta solución, se agregaron 2 mL a cada pozo de una placa de seis pozos p35 (figura 17) y ésta fue incubada a 37 °C durante 1 día.

Al día siguiente, las células en cada pozo se encontraban a un 80% de confluencia, listas para ser transfectadas.

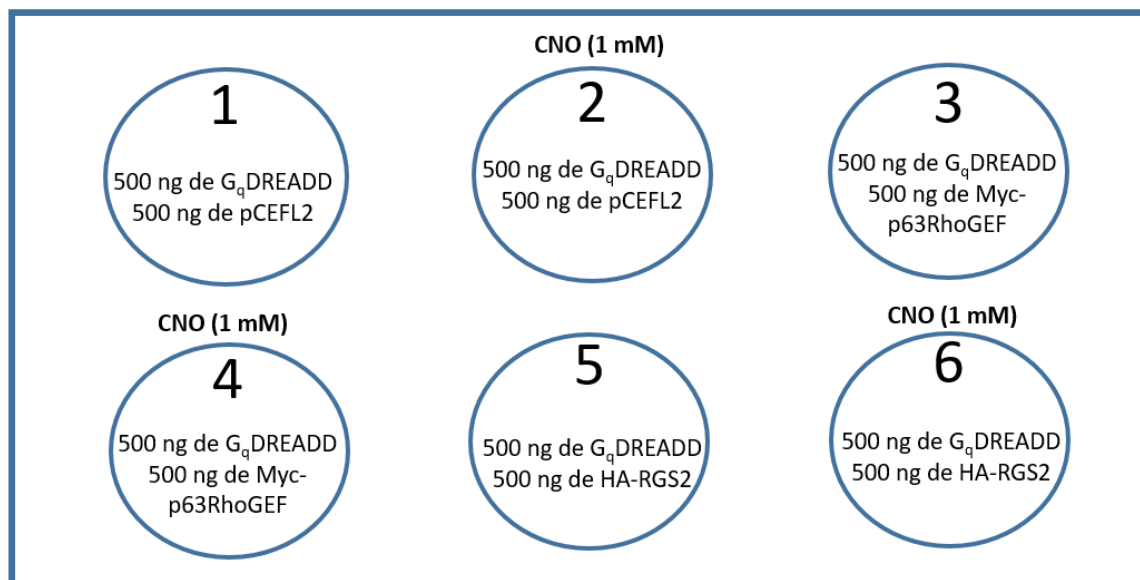
### Transfección

Todo el procedimiento se realizó en campana de flujo laminar. Primero, se rotularon cuatro tubos de 1500  $\mu$ L que fueron expuestos a luz UV con la tapa abierta durante 15 minutos. Los tubos fueron rotulados de la siguiente manera:

1.  $G_q$ -DREADD
2. pCEFL2
3. p63RhoGEF
4. RGS2

Al tubo 1 se le añadieron 1300  $\mu\text{L}$  de DMEM de ayuno (sin suero ni antibiótico) y 16  $\mu\text{L}$  de plásmido de  $G_q$ -DREADD (receptor sintético exclusivamente acoplado a  $G_q$ ) a 250  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . El tubo fue vortexeado durante 3 segundos y centrifugado levemente para bajar los residuos de medio en la tapa.

Después, se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de la mezcla del tubo 1 a los tubos 2, 3 y 4. Entonces, al tubo 2 se le añadieron 4  $\mu\text{L}$  de vector vacío pCEFL2 (a 250  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), mientras que al tubo 3 se le añadieron 6  $\mu\text{L}$  de Myc-p63RhoGEF (a 250  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) y, por último, al tubo 4 se le añadieron 4  $\mu\text{L}$  de HA-RGS2 (a 250  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ). Cada tubo fue vortexeado por tres segundos y centrifugado levemente para bajar los residuos de medio en la tapa. A continuación, a los mismos tubos 2, 3 y 4 se les añadieron 4  $\mu\text{L}$  del reactivo de transfección Turbofect® (Thermo Scientific), se vortexearon 3 segundos y luego se centrifugaron levemente. Los tubos se dejaron incubando en la campana durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del tubo 2 y se añadieron lentamente al pozo 1, los 200  $\mu\text{L}$  restantes se añadieron al pozo 2. De manera similar, la mezcla del tubo 3 se repartió a los pozos 3 y 4 (200  $\mu\text{L}$ , cada uno). Igualmente, la mezcla del tubo 4 se repartió entre los pozos 5 y 6 (200  $\mu\text{L}$ , cada uno) (figura 17). La placa fue agitada levemente para distribuir la mezcla de manera uniforme en cada pozo y se incubó a 37 °C toda la noche.



**Figura 17. Diseño de experimento funcional: regulación de la señalización de  $G\beta\gamma$  por interactores de  $G\alpha_q$  en células COS-7.** En todos los pozos se transfectó al  $G_q$ -DREADD. Mientras que los pozos 1 y 2 fueron transfectados además con el vector vacío pCEFL2 como control. Los pozos 3 y 4 fueron transfectados con el efector de  $G\alpha_q$ , p63; y los pozos 5 y 6 fueron transfectados con el regulador negativo de  $G\alpha_q$ , RGS2. Los pozos 2, 4 y 6 fueron estimulados por 5 minutos con el ligando sintético del  $G_q$ -DREADD, CNO.

Al día siguiente, por la mañana se retiró el medio a cada pozo y se añadieron 2 mL de DMEM completo, se incubó de nuevo la placa a 37°C toda la tarde. Después del período de incubación, se les volvió a retirar el medio a las células, cada pozo se lavó con 1 mL de PBS y se añadieron 2 mL DMEM de ayuno a cada pozo, la placa se incubó a 37°C durante toda la noche. Por la mañana del día siguiente, las células de los pozos 2, 4 y 6 fueron estimuladas durante 5 minutos con 2  $\mu$ L del ligando sintético del G<sub>q</sub>-DREADD, CNO a una concentración de trabajo de 1 mM, como se observa en la figura 17. Inmediatamente después, las células fueron lisadas siguiendo el protocolo previamente mencionado y se preparó el buffer de lisis como se indica en la tabla 10. Se preparó un gel de poliacrilamida al 10% para cargar las muestras y se aplicó una corriente de 20 mA. Las proteínas en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF y se revelaron empleando los siguientes anticuerpos:

**Tabla 11. Anticuerpos empleados para el experimento funcional.**

Ab 1°	Dilución	Ab 2°	Dilución
$\alpha$ -pAKT (Santa Cruz Biotechnology)	1:10000	$\alpha$ -rabbit	1:10000
$\alpha$ -pERK (Cell Signal)	1:30000	$\alpha$ -rabbit	1:20000
$\alpha$ -AKT totales (Sigma-Aldrich)	1:20000	$\alpha$ -mouse	1:10000
$\alpha$ -ERK totales (Santa Cruz Biotechnology)	1:30000	$\alpha$ -rabbit	1:20000
$\alpha$ -Myc (Sigma-Aldrich)	1:5000	$\alpha$ -mouse	1:10000
$\alpha$ -HA (Covance)	1:5000	$\alpha$ -mouse	1:10000

### **Experimento de interacción (ensayo de Pull-Down). Transfección de células HEK293T.**

Para evaluar si interactores de G $\alpha_q$  llevan a la disociación de G $\beta\gamma$ , se llevó a cabo el siguiente experimento en células HEK 293T, las cuales presentan una alta eficiencia de transfección.

Se partió de un stock de células en una caja p100 a una confluencia de 100%, éstas células fueron despegadas del fondo de la placa con 1 mL de tripsina, y se utilizaron 4 mL de DMEM completo para neutralizar a la tripsina, la solución celular fue resuspendida nueve veces y se tomó 1 mL de la misma para añadirlo a un tubo cónico de 50 mL con 12 mL de DMEM completo. Se resuspendió nueve veces y, a partir de esta solución, se agregaron 2 mL a los pozos 1-4 de una placa de seis pozos p35 (figura 18) pretratada con poli-D-lisina 1X durante 15 minutos y ésta fue incubada a 37 °C durante 1 día.

Al día siguiente, las células en cada pozo se encontraban a un 60% de confluencia, listas para ser transfectadas.

### Transfección

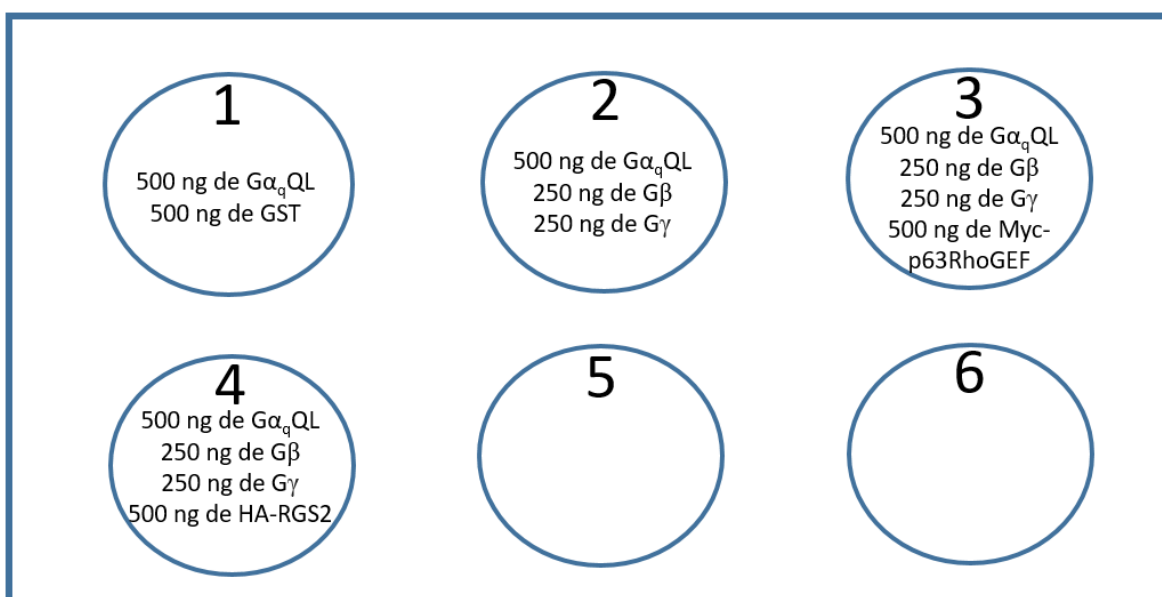
Todo el procedimiento se realizó en campana de flujo laminar. Primero, se rotularon seis tubos de 1500 µL que fueron expuestos a luz UV con la tapa abierta durante 15 minutos. Los tubos fueron rotulados de la siguiente manera:

1. Pool Gα<sub>q</sub>QL
2. GST
3. Solo Gβγ
4. Gβγ y Myc-p63
5. Gβγ y RGS2
6. OptiMEM PEI

Al tubo 1 y al 6 se les añadieron 305 µL de OptiMEM (ThermoFisher Scientific). Luego, al tubo 1 se le agregaron 9 µL de plásmido de Gα<sub>q</sub>QL a 250 ng/µL. El tubo fue vortexeado durante 3 segundos y centrifugado levemente para bajar los residuos de medio en la tapa.

Después, se añadieron 75 µL de la mezcla del tubo 1 al tubo 2 y 225 µL al tubo 3. Entonces, al tubo 2 se le añadieron 2 µL de plásmido de GST (a 250 ng/µL), mientras que al tubo 3 se le añadieron 3 µL de GST-Gβγ (a 250 ng/µL) y 3 µL de Gγ (a 250 ng/µL) y los tubos fueron vortexeados durante 3 segundos y centrifugados levemente para bajar los residuos de medio en la tapa. En el paso siguiente, a los

tubos 4 y 5 se les añadieron 75  $\mu$ L de la mezcla del tubo 3. En seguida, al tubo 4 se le agregaron 2  $\mu$ L de Myc-p63 (a 250 ng/ $\mu$ L) y, al tubo 5, 2  $\mu$ L de HA-RGS2 (a 250 ng/ $\mu$ L). Ambos tubos fueron vortexeados por tres segundos y centrifugados levemente para bajar los residuos de medio en la tapa. A continuación, al tubo 6 se le añadieron 12  $\mu$ L del reactivo de transfección PEI precalentado a 72°C durante dos minutos, este tubo se vortexeó durante 3 segundos y se centrifugó levemente. Entonces, a los tubos 2-5 se les añadieron 75  $\mu$ L de la mezcla del tubo 6, se vortexearon 3 segundos y luego se centrifugaron levemente. Los tubos se dejaron incubando en la campana durante 15 minutos. Pasado este tiempo, toda la mezcla de los tubos 2, 3, 4 y 5 se añadió a los pozos 1, 2, 3 y 4, respectivamente (figura 18). La placa fue agitada levemente para distribuir la mezcla de manera uniforme en cada pozo y se incubó a 37 °C toda la noche.



**Figura 18. Diseño de experimento de interacción: regulación de la señalización de G $\beta\gamma$  por interactores de G $\alpha_q$  en células HEK 293T.** En todos los casos se transfectó a G $\alpha_q$ QL. Mientras que el pozo 1 fue transfectado además con GST, empleado como control negativo. Al pozo 2 se le transfectó también el heterodímero G $\beta\gamma$ , mientras que, a los pozos 3 y 4, además del heterodímero se les transfectó p63RhoGEF y RGS2, respectivamente.

Al día siguiente, por la mañana se retiró el medio a cada pozo y se añadieron 2 mL de DMEM completo, se incubó de nuevo la placa a 37°C toda la tarde. Después del período de incubación, se les volvió a retirar el medio a las células, cada pozo se lavó con 1 mL de PBS y se añadieron 2 mL DMEM de ayuno a cada pozo, la placa se incubó a 37°C durante toda la noche.

Por la mañana del día siguiente, las células fueron lisadas siguiendo el protocolo previamente mencionado, pero en este caso cada pozo fue lisado con 500  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis. Se preparó el buffer de lisis como se indica en la siguiente tabla para llevar a cabo el ensayo de Pull-Down:

**Tabla 12.** Composición del buffer empleado para la lisis celular y el ensayo de Pull-Down del experimento de interacción.

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Buffer de lisis	17000
Aprotinina	17
Leupeptina	17
NaF	17
$\text{Na}_3\text{VO}_4$	17
PMSF 0.1 M	170
$\beta$ -glicerol fosfato	170

### Pull-Down

Después de la lisis celular, se centrifugaron los 4 tubos durante 10 minutos a 13000 rpm a  $4^\circ\text{C}$  y, durante este tiempo, se añadieron 30  $\mu\text{L}$  de perlas de glutatión-sefarosa (General Electric Healthcare, la glutatión-sefarosa interactúa con la proteína GST) a 4 tubos designados para realizar el Pull-Down (PD). Posterior a la centrifugación, se tomaron 75  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de cada tubo y se añadieron a 4 tubos designados para el lisado total. El resto del sobrenadante de cada tubo fue transferido a los 4 tubos que se emplearon para el PD que ya tenían perlas de glutatión-sefarosa y, cada vez que se añadió el sobrenadante, se vortexó el tubo durante 3 segundos. En seguida, los 4 tubos para PD fueron colocados en hielo y se incubaron durante 45 minutos en agitación constante.

Después del período de incubación, los tubos fueron centrifugados a 5000 rpm por 2 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . A continuación, el sobrenadante de cada tubo fue retirado mediante sistema de vacío (dejando una mínima cantidad de sobrenadante) y la

pastilla se resuspendió (lavado 1) con 1 mL de buffer de lisis y se vortexeó cada tubo durante 3 segundos, después, los tubos se centrifugaron a 5000 rpm por 2 minutos a 4°C. Lo anterior se repitió dos veces más y, en el tercer y último lavado, se retiró la mayor cantidad posible de sobrenadante para dejar únicamente la pastilla (perlas de glutatión sefarosa que “atraparon” a la proteína GST) y se añadieron 30 µL de buffer de muestra 1X. Luego, los tubos se hirvieron durante 5 minutos, se vortexearon durante tres segundos y, finalmente, se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos a T ambiente.

Se preparó un gel de poliacrilamida al 10% para cargar las muestras y se aplicó una corriente de 20 mA. Las proteínas en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF y se revelaron empleando los siguientes anticuerpos

**Tabla 13. Anticuerpos empleados para el experimento de interacción.**

Ab 1°	Dilución	Ab 2°	Dilución
α-Myc (Sigma-Aldrich)	1:5000	α-mouse	1:10000
α-HA (Covance)	1:5000	α-mouse	1:10000
α-GST (Santa Cruz Biotechnology)	1:5000	α-mouse	1:10000



## 6. RESULTADOS

### **Análisis bioinformático de las estructuras de las proteínas G heterotriméricas**

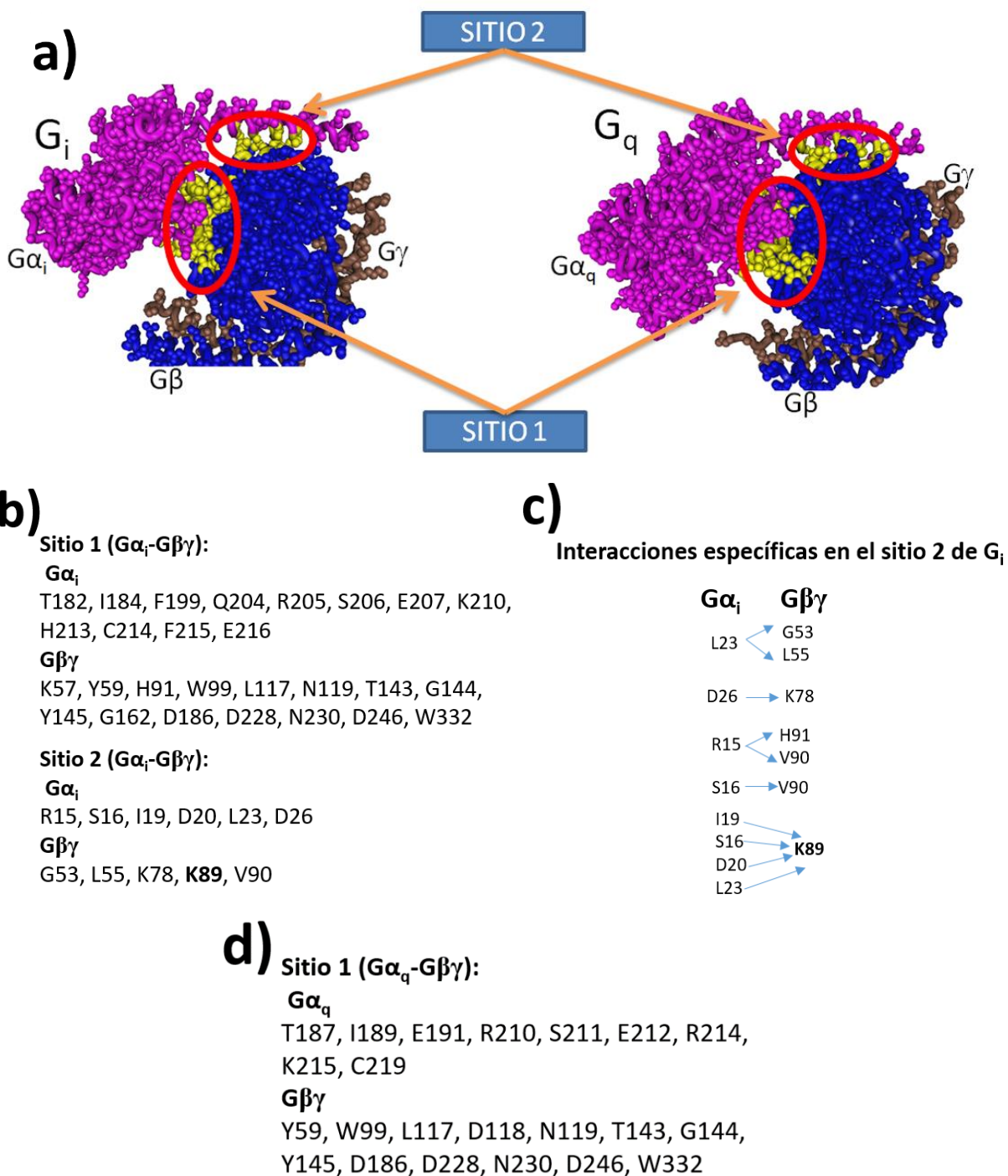
Para indagar cómo las superficies de interacción entre  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  influyen en la disociación de las proteínas G heterotriméricas, se realizó un análisis bioinformático, a una resolución de 3.5 Å, del sitio 1 (dominio de GTPasa) y el sitio 2 ( $\alpha N$ ) a partir de las estructuras cristalizadas disponibles de los heterotrimeros  $G_i$  (ID: 5TDH) y  $G_q$  (ID: 3AH8) mediante el programa bioinformático Cn3D (figura 19).

Para el heterotrimerero  $G_i$ , se determinó que los aa del sitio 1 de la subunidad  $G\alpha_i$  que interactúan con  $G\beta\gamma$  son los siguientes: T182, I184, F199, Q204, R205, S206, E207, K210, H213, C214, F215 y E216. Mientras que los aa correspondientes para  $G\beta\gamma$  son: K57, Y59, H91, W99, L117, N119, T143, G144, Y145, G162, D186, D228, N230, D246 y W332.

Con respecto a los aa del sitio 2 de la subunidad  $G\alpha_i$  que interactúan con  $G\beta\gamma$  se determinaron los siguientes: R15, S16, I19, D20, L23 y D26. Los aa correspondientes en  $G\beta\gamma$  para éste sitio son: G53, L55, K78, K89 y V90. De éstos últimos, K89 parece ser muy relevante, ya que interactúa hasta con 4 aa de  $G\alpha_i$ .

Para el caso de  $G_q$ , se determinó que los aa del sitio 1 de la subunidad  $G\alpha_q$  que interactúan con  $G\beta\gamma$  son los siguientes: T187, I189, E191, R210, S211, E212, R214, K215 y C219. Y, en cuanto a los aa correspondientes de  $G\beta\gamma$  para el mismo sitio, se determinaron los siguientes: Y59, W99, L117, D118, N119, T143, G144, Y145, D186, D228, N230, D246 y W332.

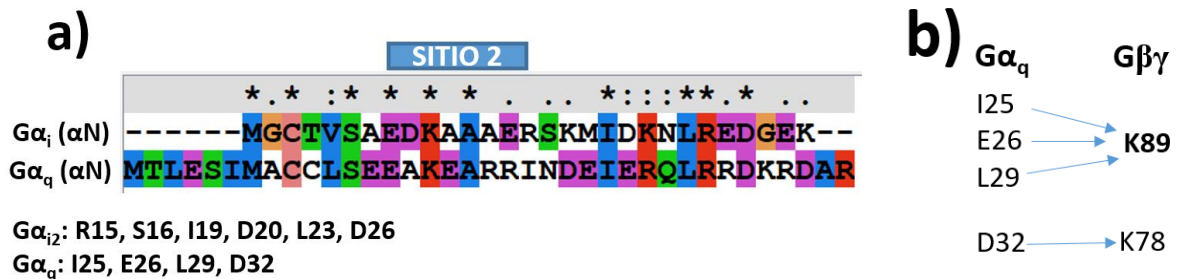
Cabe señalar que, para el sitio 2 de  $G_q$ , no fue posible determinar los aa implicados en la interacción entre  $G\alpha_q$  y  $G\beta\gamma$ , debido a que, en dicha estructura,  $G\alpha_q$  consiste de una subunidad quimérica que posee la  $\alpha N$  de  $G\alpha_i$  y el dominio de GTPasa de  $G\alpha_q$ . Por lo tanto, decidimos realizar un alineamiento de las secuencias de la  $\alpha N$  de  $G\alpha_i$  y  $G\alpha_q$  para inferir los aa de  $G\alpha_q$  que están implicados en la interacción en el sitio 2 con  $G\beta\gamma$  (figura 20).



**Figura 19. Análisis de las interacciones en el sitio 1 y sitio 2 de los heterotrimeros  $G_i$  y  $G_q$ .** a) Estructuras de  $G_i$  y  $G_q$ , en ambos casos,  $G\alpha$  está en rosa,  $G\beta$  en azul y  $G\gamma$  en café. Se indica con flechas el sitio 1 y el sitio 2 de interacción y se resaltan en amarillo los aa involucrados en las interacciones. b) aa de  $G_i$  que se determinó que participan en la interacción en ambos sitios. c) Interacciones específicas entre aa del sitio 2 de  $G_i$  determinadas. Se resalta a K89 de  $G\beta\gamma$  que interactúa hasta con 4 aa de  $G\alpha_i$ . d) aa de  $G_q$  que se determinó que participan en la interacción en el sitio 1.

Adicionalmente, determinamos las interacciones específicas entre aa para el sitio 2 en  $G_i$ , como se observa en la figura 19.

Como se mencionó previamente, se realizó un alineamiento de las secuencias de la  $\alpha N$  de  $G_{\alpha_i}$  y  $G_{\alpha_q}$  para deducir los aa de este último que interactúan con  $G_{\beta\gamma}$  y se obtuvieron los siguientes: I25, E26, L29 y D32. De éstos, tres tendrían interacción con K89 en  $G_{\beta\gamma}$  (figura 20), acentuando la importancia de este aminoácido.

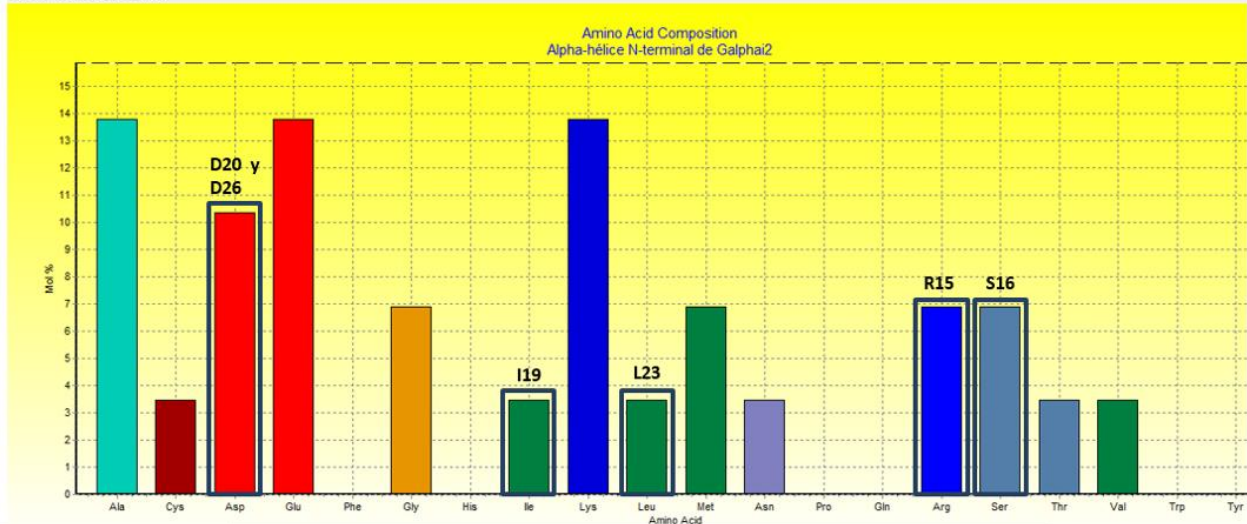


**Figura 20. Alineamiento de secuencias de  $\alpha N$  de  $G_{\alpha_i}$  y  $G_{\alpha_q}$ .** a) Parte de superior: se observan los aa que coinciden para el sitio dos en ambas subunidades  $G_{\alpha}$ . Parte inferior: aa de  $\alpha N$  de  $G_{\alpha_q}$  que inferimos que interactúan con  $G_{\beta\gamma}$ . b) Interacciones específicas de aa entre  $G_{\alpha_q}$  y  $G_{\beta\gamma}$  para el sitio 2, se resalta K89, que podría interactuar con tres aa de  $G_{\alpha_q}$ .

De acuerdo con nuestra hipótesis, postulamos que la interacción  $G_{\alpha_q}$ - $G_{\beta\gamma}$  es más fuerte que la interacción  $G_{\alpha_i}$ - $G_{\beta\gamma}$  y que esto se debe al sitio 2. Por lo tanto, decidimos determinar y analizar la composición de aa para la  $\alpha N$  de  $G_{\alpha_i}$  y  $G_{\alpha_q}$  (figura 21). A grandes rasgos, se puede observar que la  $\alpha N$  de  $G_{\alpha_q}$  tiene mayor número de cargas (sean positivas o negativas) con respecto a la de  $G_{\alpha_i}$ .

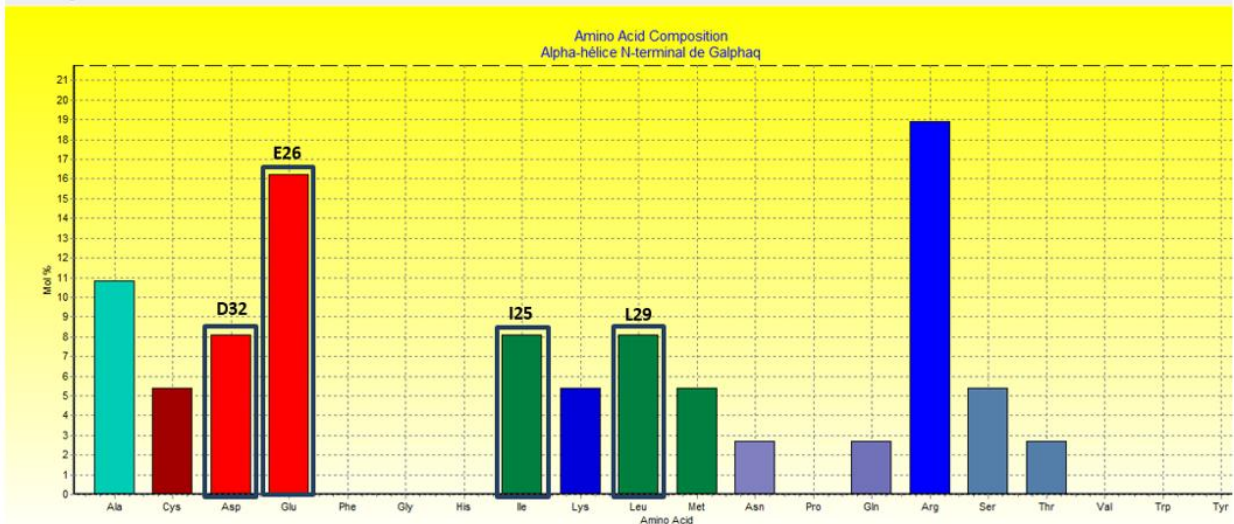
a)

Protein: Alpha-hélice N-terminal de Galpha2  
 Length: 29 amino acids  
 Molecular weight: 3183.41 Daltons



b)

Protein: Alpha-hélice N-terminal de Galphaq  
 Length: 37 amino acids  
 Molecular weight: 4436.83 Daltons



**Figura 21. Composición de aminoácidos de la  $\alpha$ N de  $G\alpha_i$  y  $G\alpha_q$ .** a) Para  $G\alpha_i$ , se resaltan los aa que interactúan con  $G\beta\gamma$ . b) En el caso de  $G\alpha_q$ , de igual manera se resaltan los aa que inferimos que interactúan con  $G\beta\gamma$  y, además, se observa un mayor número de cargas (positivas y negativas) en comparación con  $G\alpha_i$ .

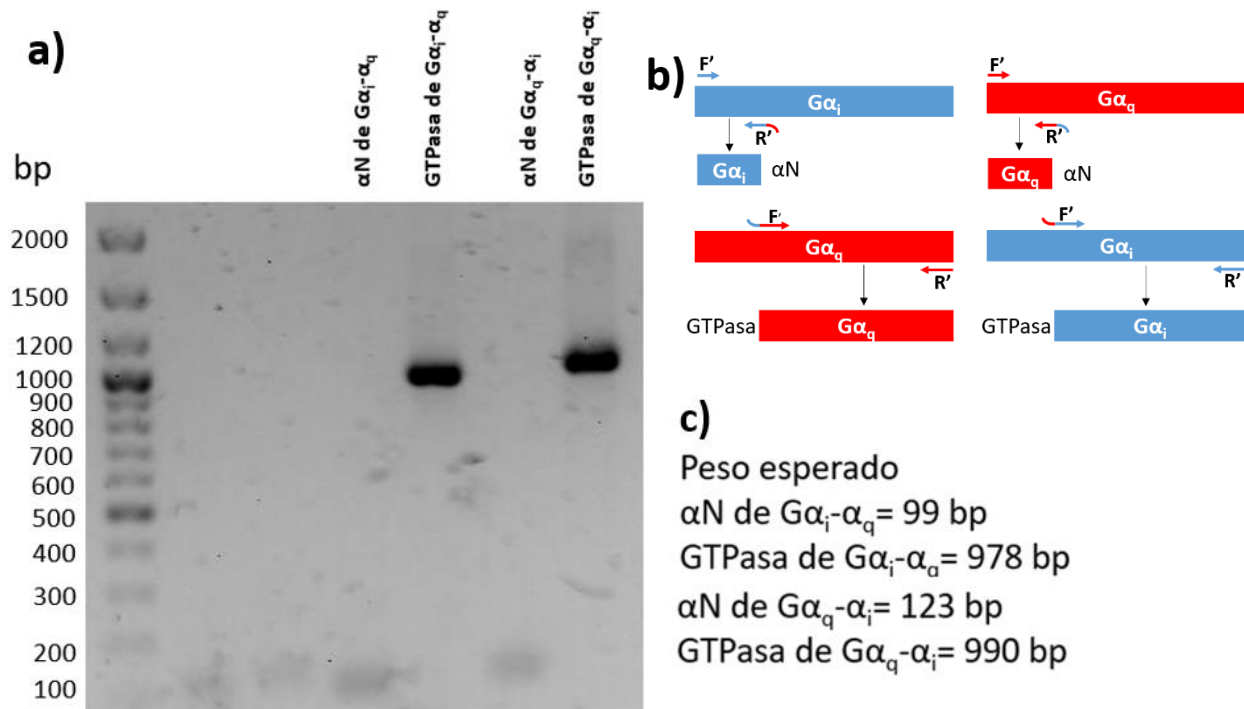
## La $\alpha N$ de $G\alpha$ como región esencial para mantener la interacción con $G\beta\gamma$

Obtención de construcciones

Quimera  $G\alpha_i-\alpha_q$

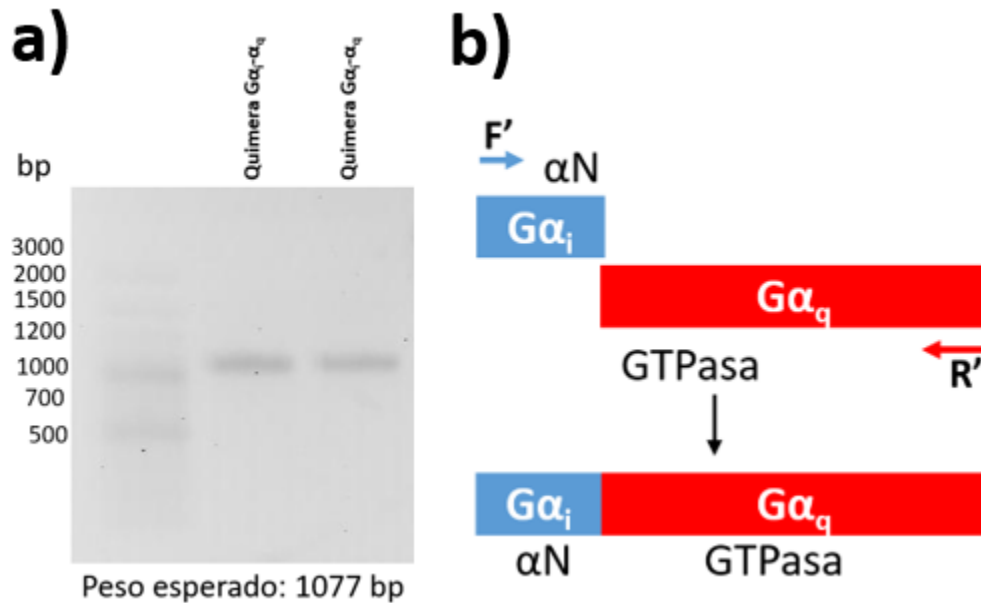
Para analizar de manera más profunda cómo las superficies de interacción entre  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  influyen en la disociación de las proteínas G heterotriméricas, se realizó la construcción de una proteína quimérica que está conformada por el sitio 2 de  $G\alpha_{i2}$  (M1-K29) y el sitio 1 de  $G\alpha_q$  (R38-V359), la cual puede ser referida como  $G\alpha_{i2}-G\alpha_q$ .

Para obtener esta construcción, primero se amplificaron de manera simultánea la  $\alpha N$  de  $G\alpha_{i2}$  y el dominio de GTPasa de  $G\alpha_q$  (figura 22).



**Figura 22. Amplificación de  $\alpha N$  y dominio de GTPasa para quimeras  $G\alpha_i-\alpha_q$  y  $G\alpha_q-\alpha_i$ .** a) Carril 1: marcador de 100 bp. Carril 4: amplificación de  $\alpha N$  de quimera  $G\alpha_i-\alpha_q$ . Carril 5: amplificación de dominio de GTPasa  $G\alpha_i-\alpha_q$ . Carril 6: amplificación de  $\alpha N$  de quimera  $G\alpha_q-\alpha_i$ . Carril 7: amplificación de dominio de GTPasa  $G\alpha_q-\alpha_i$ . b) Izquierda: se muestran las regiones amplificadas para obtener la quimera  $G\alpha_i-\alpha_q$ ; derecha: se muestran las regiones amplificadas para obtener la quimera  $G\alpha_q-\alpha_i$ ; en ambos casos lo correspondiente a  $G\alpha_i$  se muestra en azul y lo correspondiente a  $G\alpha_q$  se muestra en rojo. c) Se indican los pesos esperados para cada producto de PCR.

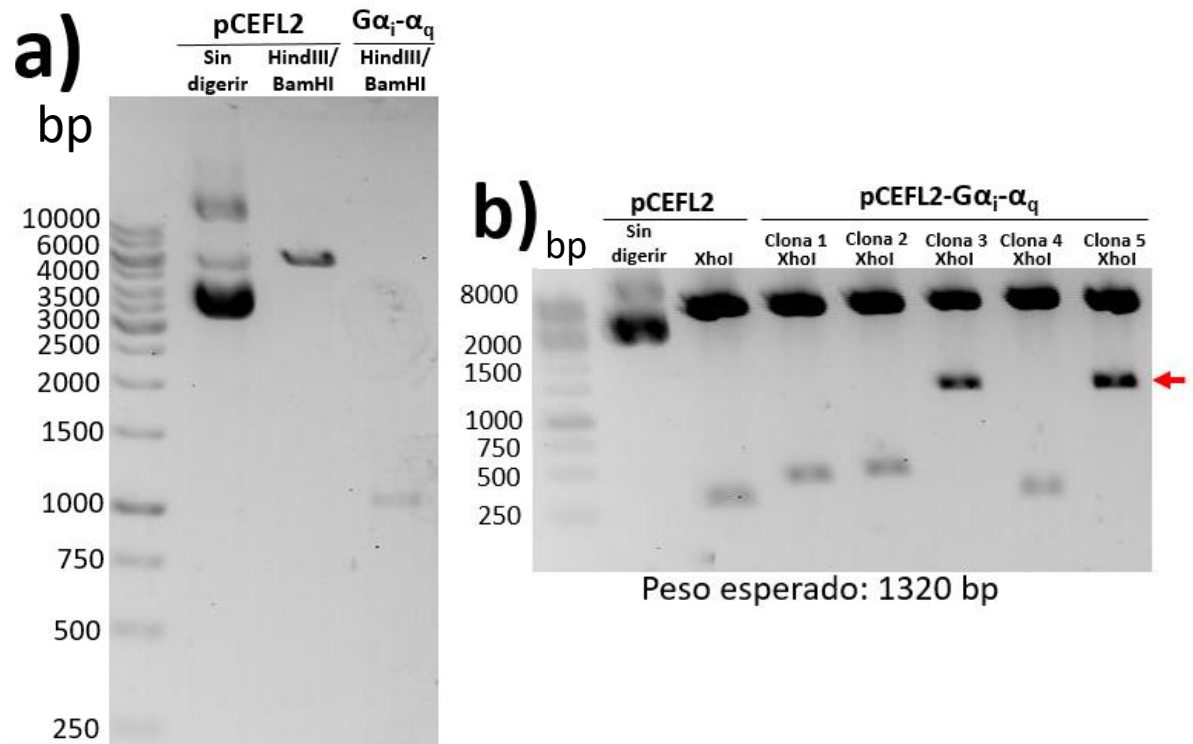
Una vez obtenidos los productos anteriores, se llevó a cabo la reacción de traslape para obtener la secuencia codificante para la proteína quimérica (figura 23).



**Figura 23. Amplificación de la secuencia de la quimera  $G\alpha_i-\alpha_q$ .** a) Carril 1: marcador de 100 bp. Se llevaron a cabo dos reacciones de traslape por separado de manera simultánea para la quimera. En ambas, se obtuvo el producto del peso esperado de 1077 bp (carril 2 y 3). b) Se muestra la reacción de traslape utilizando como plantillas la  $\alpha N$  de  $G\alpha_i$  y el dominio de GTPasa de  $G\alpha_q$  obtenidos en las reacciones previas.

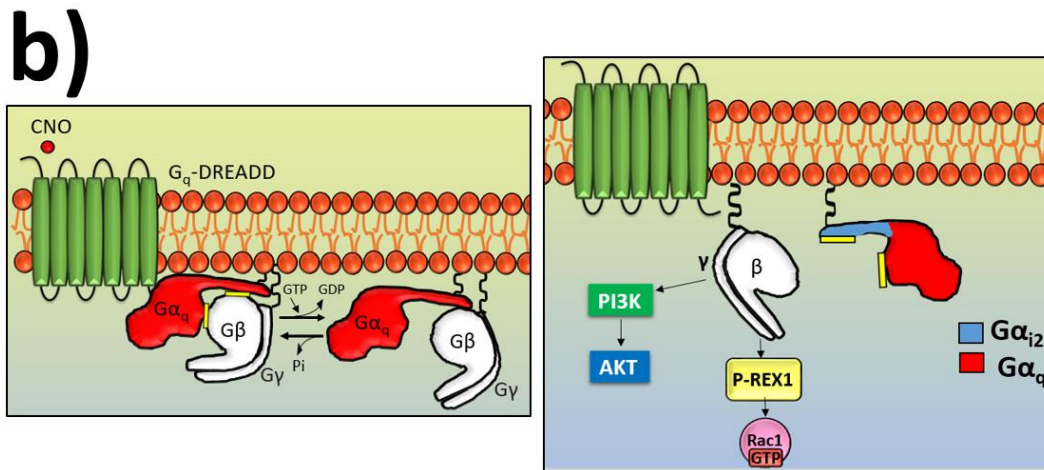
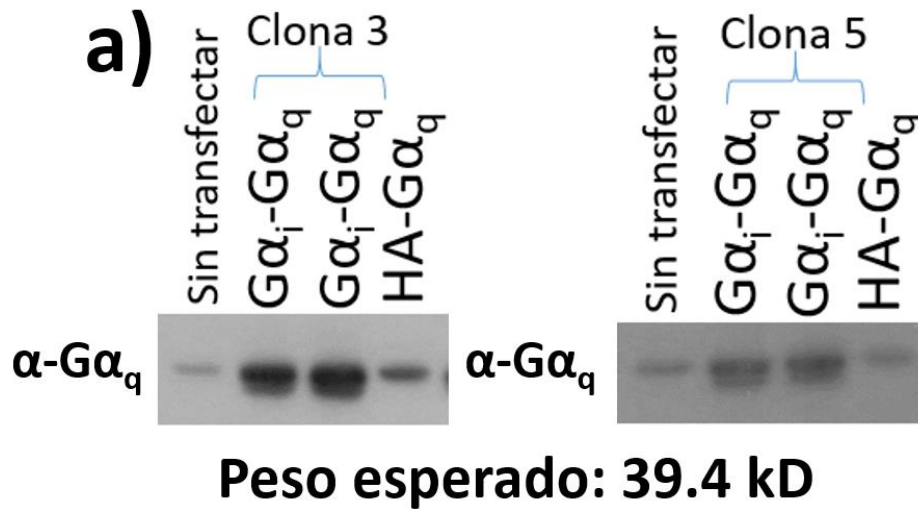
Después, el producto de la reacción de traslape y el vector pCEFL2 fueron digeridos con las enzimas de restricción HindIII y BamHI para ligarlos y transformar bacterias (figura 16). Posteriormente, se picaron colonias para extraer DNA plasmídico y diagnosticar por medio de digestión con XhoI las clonas positivas para el inserto mediante digestión enzimática, se obtuvieron dos clonas positivas (figura 24).





**Figura 24. Clonación de construcción pCEFL2-Gα<sub>i</sub>-Gα<sub>q</sub>.** a) Digestión enzimática de pCEFL2 y Gα<sub>i</sub>-α<sub>q</sub>. Carril 1: marcador de 1000 bp, carril 2: pCEFL2 sin digerir, carril 3: pCEFL2 digerido con HindIII y BamHI, carril 4: Gα<sub>i</sub>-Gα<sub>q</sub> digerido con HindIII y BamHI. b) Diagnóstico con XhoI de clonas positivas para el inserto Gα<sub>i</sub>-Gα<sub>q</sub>. Se esperaba la liberación de un fragmento de 1320 bp (indicado con flecha roja), se obtuvieron dos clonas positivas (3 y 5).

Entonces, las dos clonas positivas para Gα<sub>i</sub>-Gα<sub>q</sub> se transfectaron en células HEK 293T para detectar su expresión mediante Western Blot (figura 25). Con esta construcción, sería posible hacer que un receptor acoplado solo a G<sub>q</sub>, se comporte como si estuviera acoplado a G<sub>i</sub>, liberando a Gβγ para que se activen las vías dependientes de ésta (figura 25).



**Figura 25. Detección y función esperada de la proteína quimérica  $G\alpha_i$ - $\alpha_q$ .** a) Detección de la quimera  $G\alpha_i$ - $\alpha_q$  mediante Western Blot. Las dos clonas positivas para  $G\alpha_i$ - $\alpha_q$  expresaron la proteína correspondiente con un peso de 39.4 kD (se observa un doblete, la proteína quimérica corresponde a la banda inferior). b) Modelo de la función de  $G\alpha_i$ - $\alpha_q$ . En un sistema de receptor que se acopla exclusivamente a  $G_q$  (no libera a  $G\beta\gamma$ ) (panel de la izquierda), esta proteína quimérica permitiría que dicho receptor se comporte como si estuviera acoplado a  $G_i$ , liberando a  $G\beta\gamma$  para que active sus vías de señalización, como AKT y Rac (panel de la derecha).

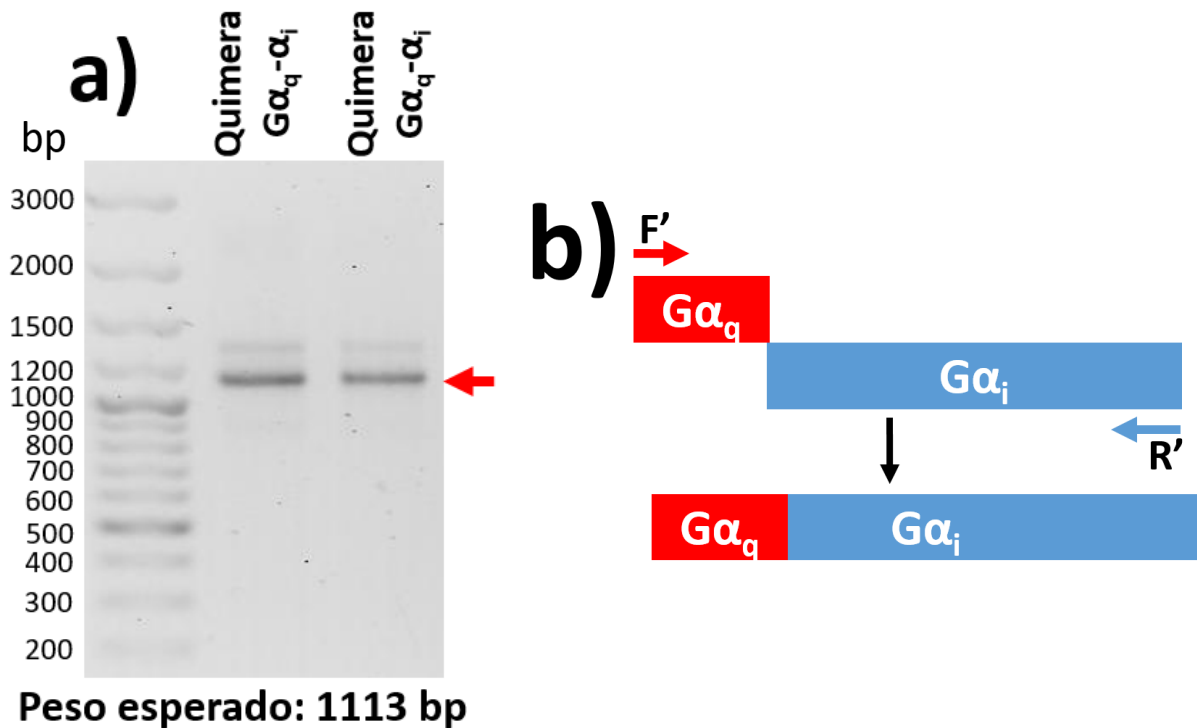
La obtención de la construcción pCEFL2- $G\alpha_i$ - $G\alpha_q$  nos llevó a sugerir construcciones complementarias para demostrar que la  $\alpha N$  de  $G\alpha_q$  es suficiente para mantener unida a  $G\beta\gamma$ , de las cuales se llevaron a cabo los pasos iniciales para que sean concretadas posteriormente. Las construcciones propuestas consisten de las siguientes: la quimera recíproca a  $G\alpha_i$ - $G\alpha_q$ , es decir, una quimera  $G\alpha_q$ - $G\alpha_i$ ; la  $\alpha N$  de



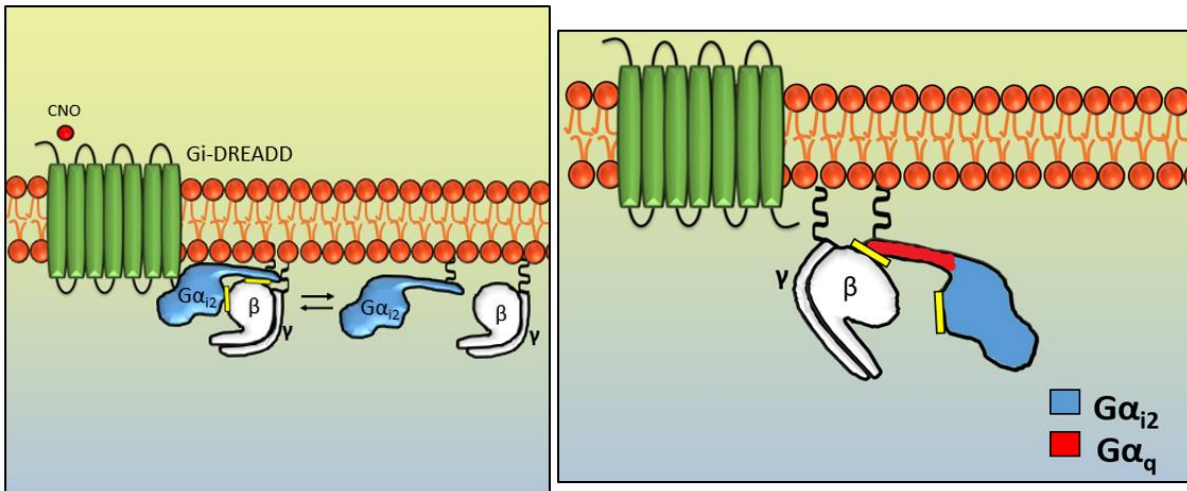
$G\alpha_q$  y la  $\alpha N$  de  $G\alpha_i$ . Además, se requiere una construcción de la proteína GST que permita su fusión hacia la región C-terminal de ambas  $\alpha N$ s de tal manera que no interfiera en la interacción con  $G\beta\gamma$  y permita realizar ensayos de pull-down de GST.

#### Quimera $G\alpha_q-\alpha_i$

Para obtener esta construcción, primero se amplificaron de manera simultánea la  $\alpha N$  de  $G\alpha_q$  y el dominio de GTPasa de  $G\alpha_{i2}$  (figura 22). Una vez obtenidos los productos anteriores, se llevó a cabo la reacción de traslape para obtener la secuencia codificante para la proteína quimérica (figura 26). La función de esta construcción sería actuar como una dominante negativa, puesto que, en un sistema de receptor acoplado exclusivamente a  $G_i$ , la quimera  $G\alpha_q-\alpha_i$  impediría la disociación de  $G\beta\gamma$ , impidiendo la señalización de la misma (figura 27).



**Figura 26. Amplificación de la quimera  $G\alpha_q-\alpha_i$ .** a) Carril 1: marcador de 100 bp. Se llevaron a cabo 2 reacciones de traslape de manera simultánea. En ambas, se obtuvo el producto del peso esperado de 1113 bp (carril 2 y 3, flecha roja). b) Reacción de traslape utilizando como templates la  $\alpha N$  de  $G\alpha_q$  y el dominio de GTPasa de  $G\alpha_i$ .

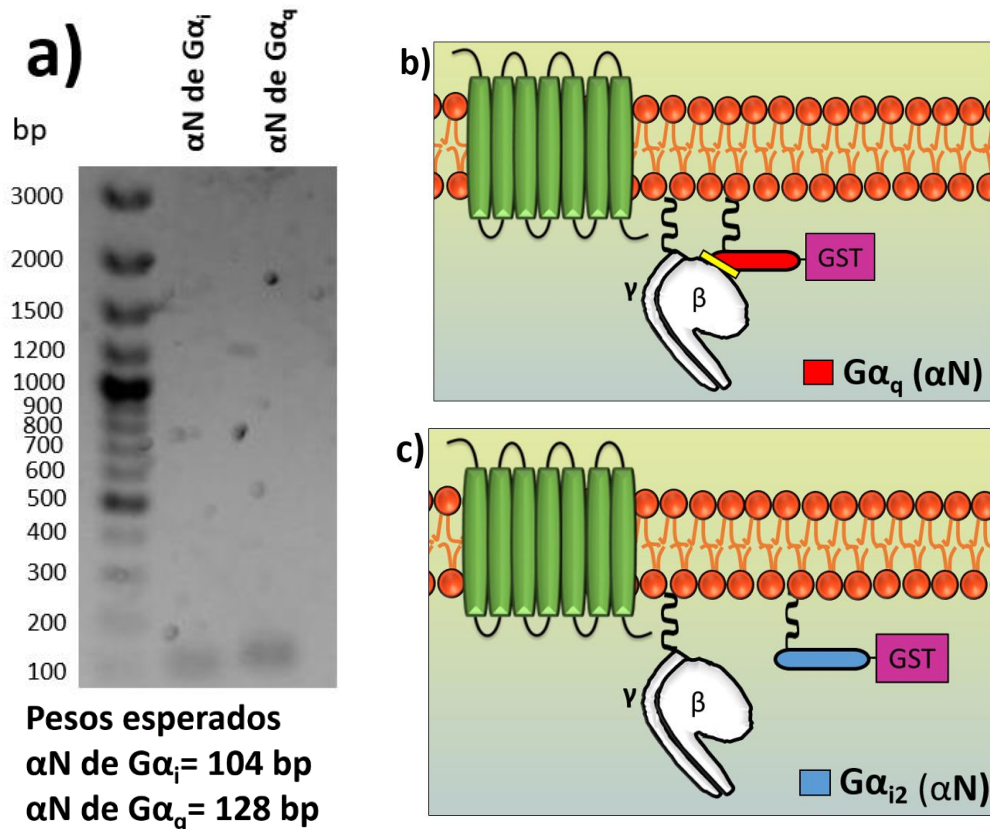


**Figura 27. Función esperada de la proteína quimérica  $G\alpha_q-\alpha_i$ .** En un sistema de receptor que se acopla exclusivamente a  $G_i$  (libera completamente a  $G\beta\gamma$ ) (panel izquierdo), esta proteína quimérica impediría la disociación de  $G\beta\gamma$  y, por lo tanto, la activación de las vías dependientes de la misma (panel derecho), actuando como dominante negativa.

$\alpha N$  de  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{i2}$

Se determinó previamente que la secuencia de la  $\alpha N$  en GNAQ comprende los nucleótidos 1-111, mientras que para GNAI2 comprende los nucleótidos 1-87. Para obtener la secuencia codificante para ambas regiones se aplicó PCR punto final (figura 28).

Mediante estas construcciones se espera demostrar, mediante ensayos de PD que la  $\alpha N$  de  $G\alpha_q$  tiene mayor afinidad por el heterodímero  $G\beta\gamma$  en comparación con la  $\alpha N$  de  $G\alpha_i$ , reforzando así, la propuesta de dinámica diferencial entre las proteínas G heterotriméricas (figura 28).



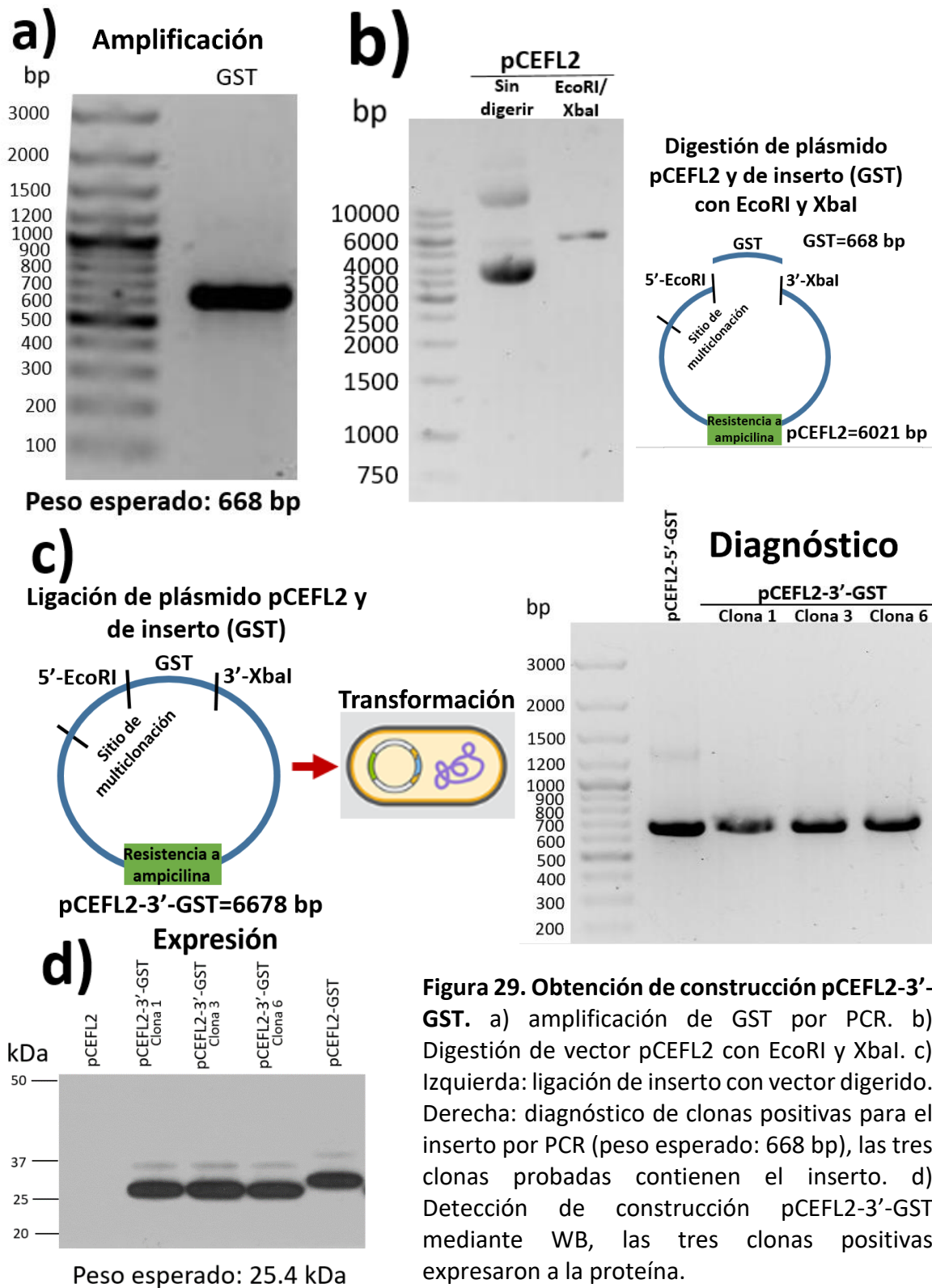
**Figura 28. Amplificación de la  $\alpha N$  de  $G\alpha_q$  y de  $G\alpha_i$  y función esperada de ambas como proteínas.** a) Se amplificaron ambas  $\alpha N$  y se obtuvieron los productos de acuerdo con el peso esperado. b) Se espera que, al evaluar la interacción de  $\alpha N$ - $G\alpha_q$  con  $G\beta\gamma$ , ésta sea más fuerte comparada con la interacción  $\alpha N$ - $G\alpha_i$  con  $G\beta\gamma$  (c).

GST fusionada en el C-terminal de las  $\alpha N$  de  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_i$

Esta construcción se realizó para realizar ensayos de PD de las  $\alpha N$  de  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_i$ , además, está diseñada de tal forma que la proteína GST quede fusionada hacia la región C-terminal de ambas  $\alpha N$  para prevenir que interfiera con la interacción con  $G\beta\gamma$ , como se muestra en la figura 28.

Primero, la secuencia codificante para GST (inserto) se amplificó mediante PCR punto final, después se llevó a cabo la digestión del vector pCEFL2 y del inserto con las enzimas EcoRI y XbaI para proceder con la reacción de ligación. Luego, se transformaron bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  con el producto de ligación y se realizó un diagnóstico de las clonas positivas para el inserto por medio de PCR y,

posteriormente, se transfectaron células HEK 293T para expresar la construcción (figura 29).



**Figura 29. Obtención de construcción pCEFL2-3'-GST.** a) amplificación de GST por PCR. b) Digestión de vector pCEFL2 con EcoRI y XbaI. c) Izquierda: ligación de inserto con vector digerido. Derecha: diagnóstico de clonas positivas para el inserto por PCR (peso esperado: 668 bp), las tres clonas probadas contienen el inserto. d) Detección de construcción pCEFL2-3'-GST mediante WB, las tres clonas positivas expresaron a la proteína.

## **Interactores de $G\alpha_q$ como posibles reguladores de la señalización de $G\beta\gamma$**

### **Análisis bioinformático de las estructuras $G\alpha_q$ con interactores**

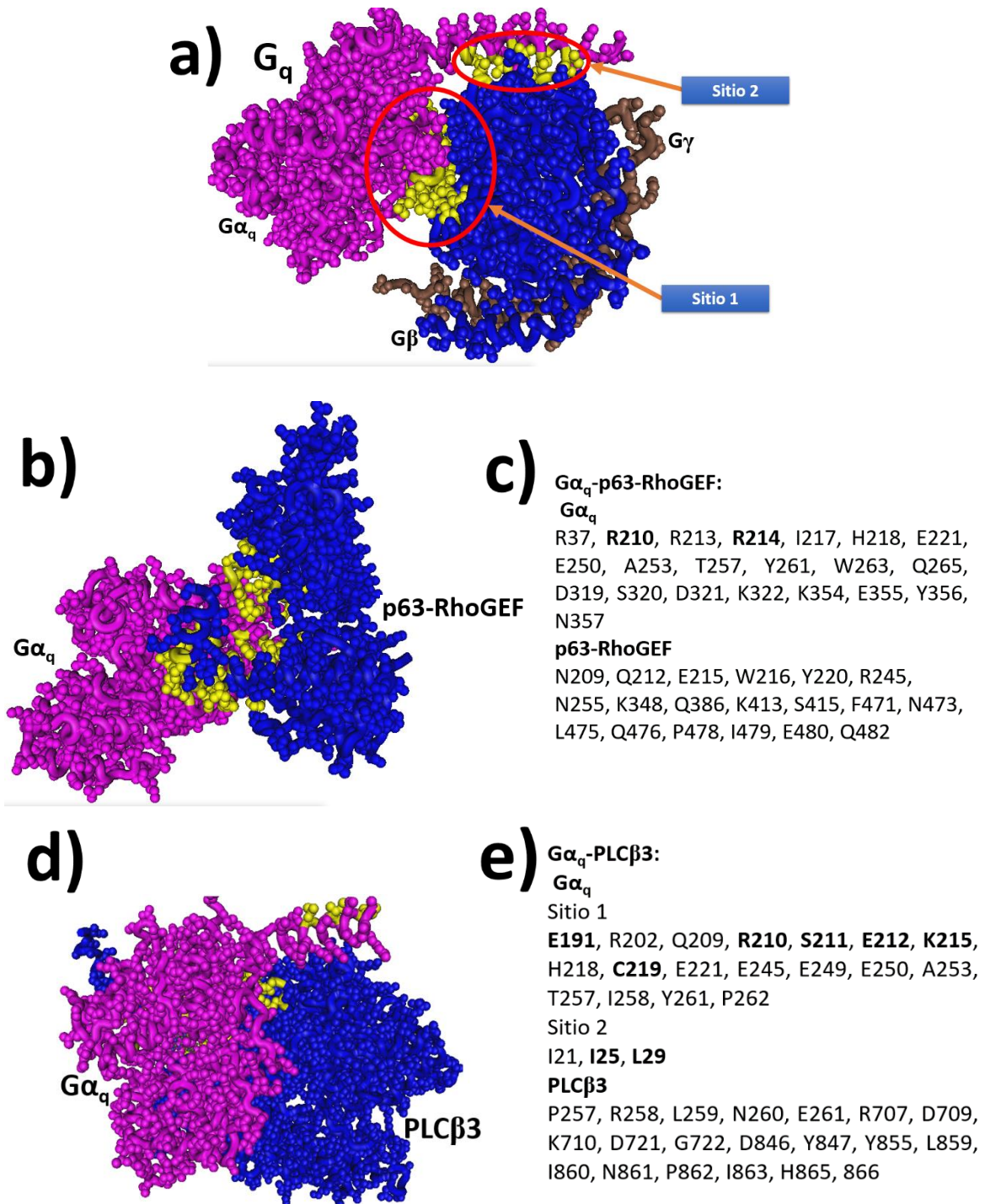
Para analizar si los interactores de  $G\alpha_q$  favorecen la liberación de  $G\beta\gamma$ , se realizó el análisis bioinformático de las estructuras de  $G\alpha_q$  con sus interactores p63RhoGEF (ID: 2RGN) y PLC $\beta$  (ID: 4GNK) a una resolución de 3.5 Å.

Con respecto a la interacción  $G\alpha_q$ -p63RhoGEF, se determinó que los aa del sitio 1 de  $G\alpha_q$  implicados en la interacción son: R210, R213, R214, I217, H218, E221, E250, A253, T257, Y261, W263, Q265, D319, S320, D321, K322, K354, E355, Y356 y N357; de éstos R210 y R214 coinciden con la interacción con  $G\beta\gamma$ , mientras que para el sitio dos solo se determinó a R37, el cual no interactúa con  $G\beta\gamma$  (figura 30). Cabe señalar que, en esta estructura, la  $\alpha$ N de  $G\alpha_q$  está truncada.

Los aa de p63-RhoGEF que interactúan con  $G\alpha_q$  son: N209, Q212, E215, W216, Y220, R245, N255, K348, Q386, K413, S415, F471, N473, L475, Q476, P478, I479, E480 y Q482. Estos aa se encuentran dentro del módulo catalítico DH-PH de p63 (Lutz *et al.*, 2007).

Además, se realizó el análisis de la interacción  $G\alpha_q$ -PLC $\beta$  y se determinó que los aa del sitio 1 de  $G\alpha_q$  implicados en la interacción son: E191, R202, Q209, R210, S211, E212, R213, K215, H218, C219, E221, E245, E249, E250, A253, T257, I258, Y261 y P262. De éstos últimos, 6 coinciden con la interacción con  $G\beta\gamma$  para el mismo sitio: E191, R210, S211, E212, K215 y C219 (figura 30). En cuanto a los aa del sitio 2 de  $G\alpha_q$  que participan en la interacción fueron determinados los siguientes: I21, I25 y L29; los dos últimos coinciden con la interacción con  $G\beta\gamma$ . Mientras que los aa de PLC $\beta$  correspondientes son P257, R258, L259, N260, E261, R707, D709, K710, D721, G722, D846, Y847, Y855, L859, I860, N861, P862, I863, H865 y V866. Éstos residuos corresponden al dominio C2, implicado en el direccionamiento a la membrana (Lyon *et al.*, 2013).





**Figura 30. Análisis de las interacciones de  $G\alpha_q$  con interactores.** En todos los casos,  $G\alpha_q$  está en color rosa y sus interactores en azul. a) Estructura de  $G_q$ . b) Estructura  $G\alpha_q$ -p63RhoGEF, la  $\alpha N$  de  $G\alpha_q$  está truncada, pero se encontraría apuntando hacia la derecha, como en a). Se observa que p63 ocupa un nicho similar al de  $G\beta\gamma$ . c) Aminoácidos de  $G\alpha_q$  y p63RhoGEF implicados en la interacción, se resaltan en negritas los que coinciden con la interacción con  $G\beta\gamma$ . d) Estructura  $G\alpha_q$ -PLCβ3. La  $\alpha N$  de  $G\alpha_q$  apunta hacia la derecha, pero está ligeramente desplazada hacia arriba. El nicho de PLCβ3 no se observa tan similar al de  $G\beta\gamma$ , sino que más bien PLCβ3 flanquea a  $G\alpha_q$ . e) Aminoácidos de  $G\alpha_q$  y PLCβ3 implicados en la interacción, se resaltan en negritas los que coinciden con la interacción con  $G\beta\gamma$ .

Como se observa en la figura 30, a pesar de que PLC $\beta$  interactúa con ambos sitios, solo flanquea a G $\alpha_q$ . En contraste, el nicho que ocupa p63 en G $\alpha_q$  parece ser más íntimo en los dos sitios, similar al de G $\beta\gamma$ , haciéndolo un candidato interesante para probar el desplazamiento de G $\beta\gamma$  por interactores de G $\alpha_q$ .

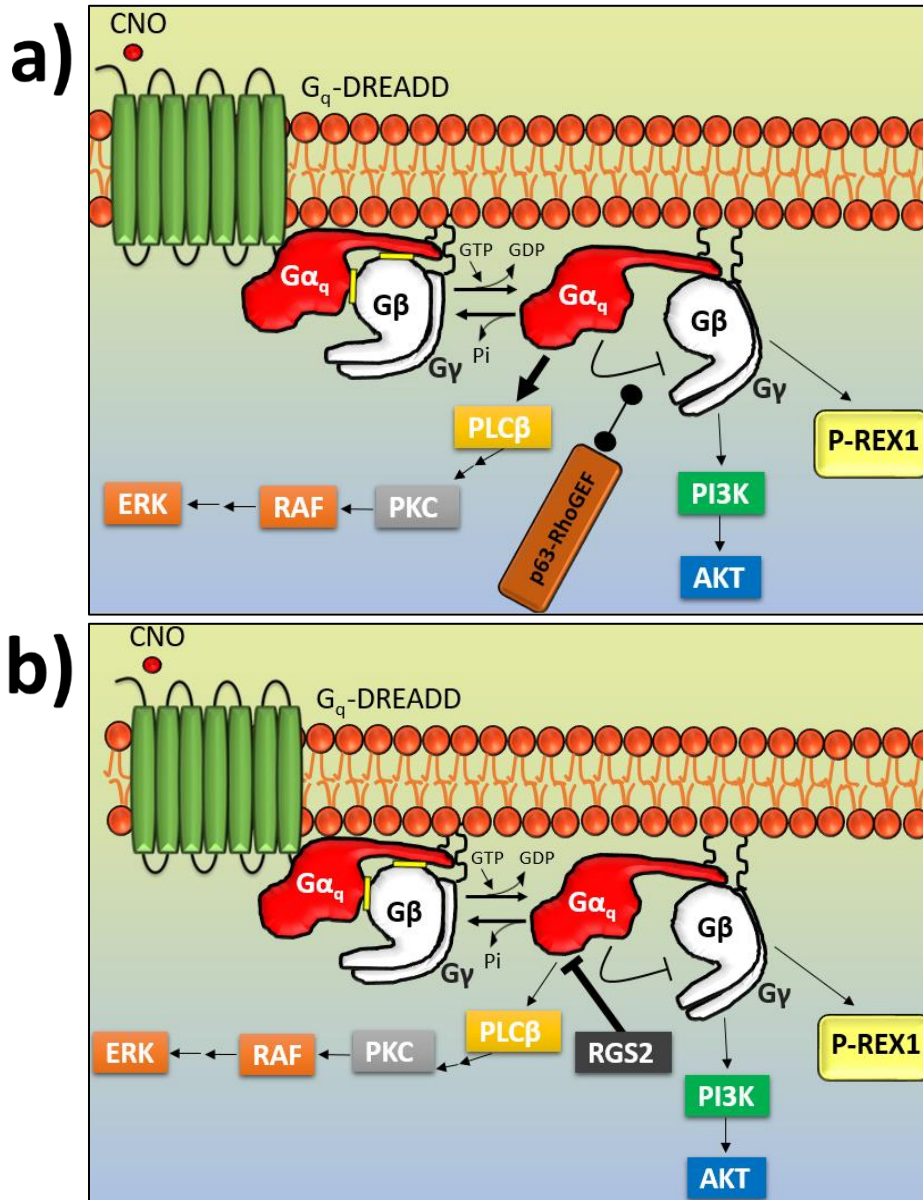
## **Los interactores de G $\alpha_q$ provocan la disociación de G $\beta\gamma$**

### **Experimento funcional**

Para determinar si interactores de G $\alpha_q$  ocasionan la liberación de G $\beta\gamma$ , se realizó el siguiente experimento funcional en el cual se empleó un sistema de receptor sintético (G $_q$ -DREADD) que se acopla únicamente con el heterotrímero G $_q$  endógeno y es activado de manera exclusiva por el ligando sintético CNO. En este sistema podemos evaluar la activación de dos vías (figura 31): por una parte, la vía de las MAPK que lleva al aumento en los niveles de pERK. Dicha vía depende principalmente de G $\alpha_q$  en el sistema utilizado. Por otra parte, el eje G $\beta\gamma$ /PI3K/Akt, lo cual resulta en el incremento en los niveles de pAKT. Esta vía depende principalmente de G $\beta\gamma$ . Por lo tanto, el aumento en pAKT estaría dado por G $\beta\gamma$  disociada de G $\alpha_q$ . Se evaluaron tres condiciones (figura 31): en la primera, se transfectó el vector pCEFL2 vacío como control; en la segunda, se transfectó al efector de G $\alpha_q$ , p63-RhoGEF, ya que de acuerdo con el análisis de las estructuras (figura 30), es un candidato interesante para llevar a la disociación de G $\beta\gamma$  y, por lo tanto, a la activación de sus vías. En la tercera condición; se transfectó al regulador negativo de G $\alpha_q$ , RGS2, que promueve su actividad de GTPasa e inactiva a esta subunidad. Entonces, tanto la activación de ERK como la de AKT, disminuirían. En todos los casos se transfectó a G $_q$ -DREADD y se comparó en cada condición al activar al receptor con CNO y el receptor inactivo.

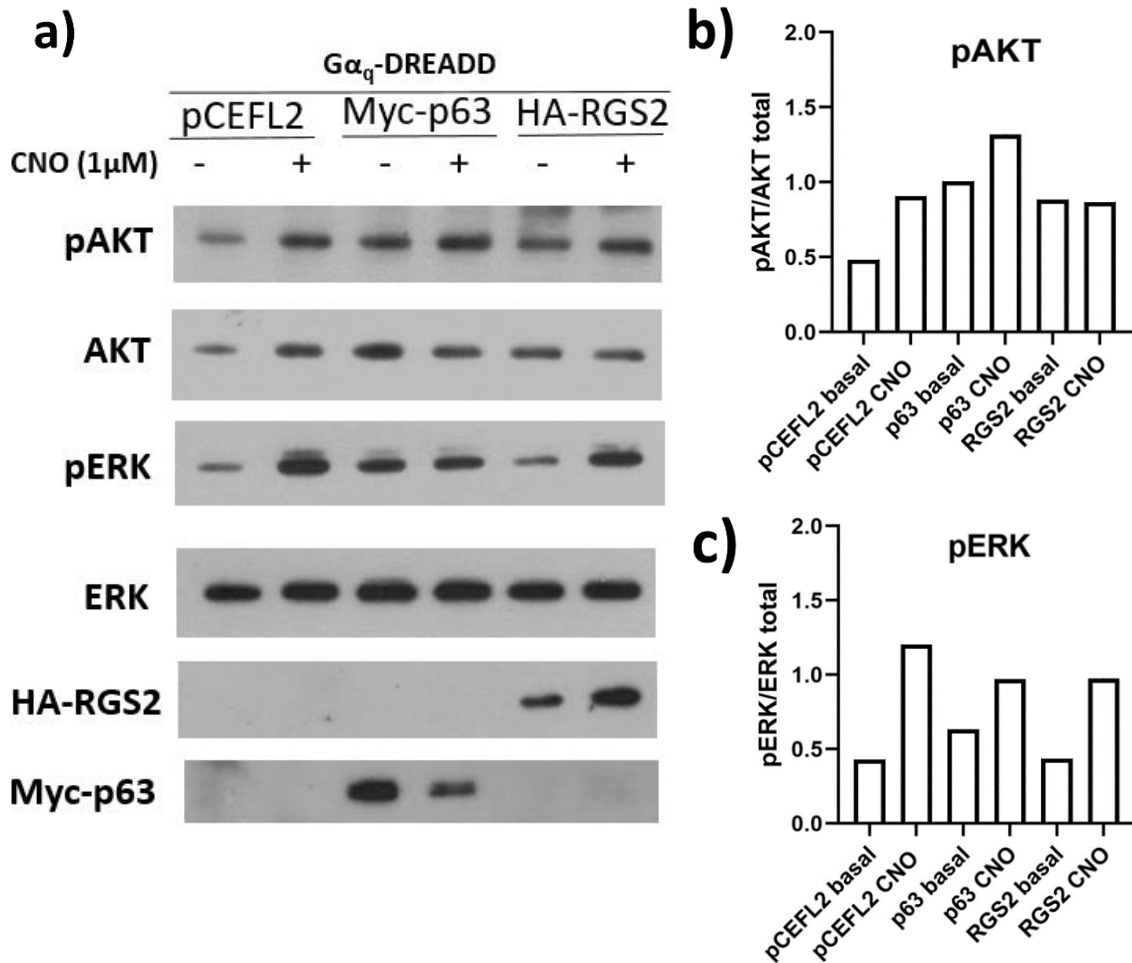
Como se observa en la figura 32, en la condición control (pCEFL2), la activación del receptor llevó al aumento de pAKT. De manera interesante, en la condición en la que se transfectó a p63, al activar el receptor los niveles de pAKT aumentaron de manera considerable con respecto al control. Incluso, también hubo un aumento en

pAKT cuando se transfecta a p63 y no se activa al receptor. Lo cual sugiere que  $G\beta\gamma$  fue disociada de  $G\alpha_q$  por éste efector de  $G\alpha_q$ , incrementando su disponibilidad señalizante. Cuando se sobreexpresa a RGS2 y se activa el receptor, la activación de AKT es similar a la de la condición control. No parece haber efecto inhibitorio de RGS2 sobre  $G\alpha_q$ , posiblemente debido a una baja eficiencia de transfección de éste interactor.



**Figura 31. Regulación de la señalización de  $G\beta\gamma$  por interactores de  $G\alpha_q$ .** a) Al activar el  $G_q$ -DREADD,  $G\alpha_q$  lleva a la activación de ERK y, de acuerdo con nuestra hipótesis, su efector p63 produce la liberación de  $G\beta\gamma$ , que promueve la activación de AKT. b) El regulador negativo de  $G\alpha_q$ , RGS2, inhibe la activación de ERK y de AKT.



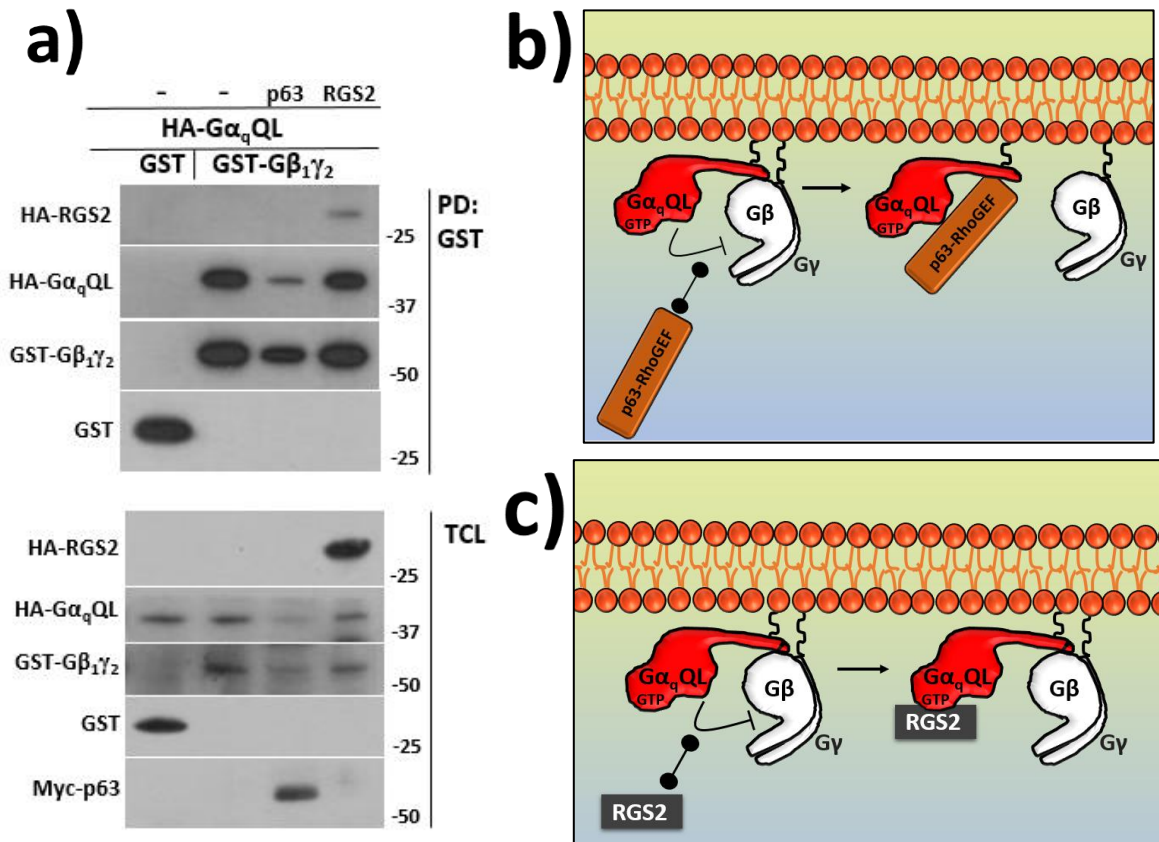


**Figura 32. Efecto de interactores de G $\alpha_q$  sobre la señalización de G $\beta\gamma$ .** a) Detección de pAKT y pERK mediante WB. En todos los casos se transfectó a G $\alpha_q$ -DREADD (receptor) y además se evalúan las siguientes condiciones: con el vector pCEFL2 vacío; con el interactor de G $\alpha_q$ , p63; y con otro interactor de G $\alpha_q$ , RGS2. Además, se compara para cada uno de los casos anteriores cuando el G $\alpha_q$ -DREADD está inactivo y cuando se activa con CNO durante 5 minutos. En cuanto a pAKT, se observan los niveles más altos cuando se transfecta a p63 y se activa al receptor (carril 4). Incluso, también hay un aumento en pAKT cuando se expresa a éste interactor de G $\alpha_q$  sin activar al receptor (carril 3). Mientras que los niveles de pAKT cuando se transfecta pCEFL2 y RGS2 al activar el receptor son semejantes (carriles 2 y 6). Con respecto a pERK, en todos los casos en los que se activa al receptor (carriles 2, 4 y 6), los niveles son similares. Específicamente, cuando se transfecta a p63 y no se activa al receptor se observa un ligero aumento en pERK (carril 3). b) y c) Cuantificación de pAKT y pERK, respectivamente, a partir de dos experimentos representativos.

## Experimento de interacción

Para determinar si interactores de  $G\alpha_q$  inducen la liberación de  $G\beta\gamma$ , se realizó un ensayo de PD en el cual se probaron las siguientes condiciones: en la primera condición se transfectó a la subunidad mutante deficiente de GTPasa  $G\alpha_qQL$  junto con la proteína GST como control; en la segunda condición, se transfectaron HA- $G\alpha_qQL$  y GST- $G\beta\gamma$ , cuya interacción por medio del sitio 2 ha sido demostrada previamente (Cervantes-Villagrana *et al.*, 2018b); mientras que en una tercera condición se transfectaron HA- $G\alpha_qQL$  y GST- $G\beta\gamma$  junto con el efector de  $G\alpha_q$ , Myc-p63-RhoGEF, y se esperaba que éste último produjera la disociación de  $G\beta\gamma$  (figura 33). En la cuarta y última condición se transfectaron HA- $G\alpha_qQL$  y GST- $G\beta\gamma$  además del regulador de  $G\alpha_q$ , HA-RGS2. En este caso, se esperaba la formación de un complejo ternario que ya había sido detectado anteriormente por Cervantes-Villagrana *et al.* (2018b) (figura 33).

Como se muestra en la figura 33, se detectó la interacción HA- $G\alpha_qQL$ -GST- $G\beta\gamma$  (condición 2); en contraste, en la condición en la cual se transfectó a Myc-p63 se observa una notable disminución en la cantidad de HA- $G\alpha_qQL$  que fue precipitada junto con GST- $G\beta\gamma$  con respecto a la condición anterior. Esto implica que Myc-p63 produjo el desplazamiento de GST- $G\beta\gamma$  de HA- $G\alpha_qQL$ , sin embargo, los niveles detectados de GST- $G\beta\gamma$  son menores. En cuanto a la última condición, se reprodujo la detección del complejo ternario HA-RGS2-HA- $G\alpha_qQL$ -GST- $G\beta\gamma$ .



**Figura 33. Desplazamiento de G $\beta\gamma$  de G $\alpha_q$ QL por interactores de G $\alpha_q$ .** a) Pull-Down de GST-G $\beta\gamma$ . Carril 1: GST no interactúa con HA-G $\alpha_q$ QL. Carril 2: HA-G $\alpha_q$ QL se asoció con GST-G $\beta\gamma$  al precipitar a ésta. Carril 3: Myc-p63 provocó una disminución importante de HA-G $\alpha_q$ QL asociada a GST-G $\beta\gamma$  en comparación con la condición anterior, lo cual sugiere que hubo desplazamiento de GST-G $\beta\gamma$ . Carril 4: Al bajar a GST-G $\beta\gamma$  se detectaron asociadas a HA-G $\alpha_q$ QL y HA-RGS2. b) De acuerdo con nuestra hipótesis, interactores de G $\alpha_q$  causan la disociación de G $\beta\gamma$  de G $\alpha_q$ -GTP, lo cual corresponde con el carril 3 del panel a). c) G $\alpha_q$ QL es capaz de formar un complejo ternario con G $\beta\gamma$  y RGS2, dicho complejo fue detectado en el carril 4 del panel a) (Pull-Down).

## 7. DISCUSIÓN

Se sabe que la señalización quimiotáctica de  $G\beta\gamma$  es primordial en procesos como respuesta inmune, aunque también en eventos patológicos como la metástasis. Se ha demostrado que dicha señalización es más eficiente cuando proviene del heterotrímero  $G_i$ , en comparación con otros heterotrímeros, por ejemplo,  $G_q$ . Para explicar esto, se ha propuesto que hay una dinámica de disociación diferencial (Lambert, 2008). De manera concordante, se ha comparado la capacidad de GPCRs acoplados a  $G_i$  y  $G_q$  para inducir migración celular, obteniendo que este evento solo sucede cuando se activan receptores acoplados a  $G_i$  y, además, depende específicamente de  $G\beta\gamma$  (Neptune y Bourne, 1997). Adicionalmente, Cervantes-Villagrana *et al.* (2018b) demostraron que  $G\beta\gamma$  permanece unida a la subunidad mutante deficiente de GTPasa  $G\alpha_q$ QL. Estos hallazgos soportan la idea de que existe una disociación diferencial entre las familias de proteínas G heterotriméricas.

Debido a la relevancia de las vías de transducción de las proteínas G heterotriméricas en contextos patológicos como el cáncer, es necesario dilucidar los mecanismos implicados en estas vías para sentar las bases para el desarrollo de estrategias terapéuticas. En este estudio se evaluó si la disociación de  $G\beta\gamma$  de  $G_q$  requiere un efecto secuencial, en el que el primer hit está dado por la activación por el receptor mientras que en el segundo hit estarían implicados interactores de  $G\alpha_q$ .

### Estructuras de $G_i$ y $G_q$

De acuerdo con la figura 19, la estructura de ambos heterotrímeros pareciera ser muy similar, no obstante, existen diferencias en cuanto a los aa del sitio 1 tanto de  $G\alpha_i$  como de  $G\alpha_q$  que interactúan con  $G\beta\gamma$ . De igual manera, los aa de  $G\beta\gamma$  implicados en la interacción en el sitio 1 con ambas subunidades, son distintos en ambos casos. Esto podría implicar diferencias sutiles para la dinámica de disociación de ambas familias. Con respecto al sitio 2, sobre el cual postulamos que presenta una interacción más fuerte, particularmente para  $G_q$ , obtuvimos que hay 4

aa de la  $\alpha$ N de  $G\alpha_q$  que interactúan con  $G\beta\gamma$ . De éstos, Evanko *et al.* (2005) determinaron la importancia de I25 y E26 para la interacción con  $G\beta\gamma$  y obtuvieron que las mutantes I25E o I25A (sean WT o deficientes de GTPasa) son incapaces de interactuar con el heterodímero. Por lo tanto, este residuo parece ser crucial para la interacción en el sitio 2. De manera interesante, en las interacciones específicas de aa para ese sitio, determinamos que I25 interactúa con K89 en  $G\beta\gamma$ , que puede ser otro aa clave para mantener la interacción ya que interactúa hasta con 4 aa de  $G\alpha_i$  y con al menos 3 aa de  $G\alpha_q$ . Inclusive, mutantes de  $G\beta\gamma$  para esta posición tienen una alta relevancia clínica, ya que se han encontrado en diferentes tipos de leucemias, y se sabe que promueven la transformación celular y confieren resistencia a inhibidores de cinasas, siendo la mutación K89E una de las más letales (Yoda *et al.*, 2015). Esta mutación implica un cambio drástico de cargas (positiva por negativa), por lo cual podríamos conjeturar que, en esos casos,  $G\beta\gamma$  no interactúa con  $G\alpha$  y puede señalizar constitutivamente.

Especulamos que la razón por la cual la  $\alpha$ N de  $G\alpha_q$  presenta una interacción más fuerte con  $G\beta\gamma$  con respecto a la  $\alpha$ N de  $G\alpha_i$ , se debe en parte a que la  $\alpha$ N de  $G\alpha_q$  presenta un mayor número de cargas positivas y negativas (figura 21). Particularmente, las cargas positivas podrían interactuar también con la membrana celular (cuya carga es predominantemente negativa en la superficie intracelular) haciendo la interacción más fuerte. Además, cabe la posibilidad de que haya más aa del sitio 2 de  $G\alpha_q$  que interactúen con  $G\beta\gamma$  adicionales a los que nosotros determinamos.

### **Estructuras de $G\alpha_q$ con interactores**

Con respecto a la estructura  $G\alpha_q$ -p63-RhoGEF (figura 30), se observa que p63 ocupa un nicho muy similar al de  $G\beta\gamma$  en  $G\alpha_q$ . Parece ser que el GEF abarca una gran parte del sitio 1, incluso mayor a la correspondiente a  $G\beta\gamma$ , esto implica cierto impedimento estérico para el heterodímero. Cabe resaltar que la  $\alpha$ N de  $G\alpha_q$  en esta estructura se encuentra truncada, por lo cual desconocemos los aa implicados en la interacción. Sin embargo, de acuerdo con la estructura, podríamos suponer que la  $\alpha$ N tiene una interacción importante con p63, así, diferentes aa de dicha región

podrían ser críticos para la interacción, incluidos algunos que participan en la unión con  $G\beta\gamma$ . Esta íntima interacción  $G\alpha_q$ -p63 sugiere que la posibilidad de que se forme un complejo ternario  $G\alpha_q$ -p63- $G\beta\gamma$  es muy baja y, por lo tanto, p63 produce una disociación completa de  $G\beta\gamma$  posterior a la disociación del sitio 1 por el receptor. A menos que, tomando como referencia el modelo de clam-shell (McIntire, 2009), la  $\alpha N$  fuera lo suficientemente flexible para permitir la interacción de  $G\alpha_q$  con ambas proteínas, lo cual no parece factible, debido al impedimento estérico que p63 aparenta ejercer sobre  $G\beta\gamma$ .

Por otra parte, la interacción  $G\alpha_q$ -PLC $\beta$  no parece ser tan estrecha como  $G\alpha_q$ -p63, ya que, como se observa en la figura 30, PLC $\beta$  a pesar de que interactúa con buena parte de los aa del sitio 1, más bien flanquea a  $G\alpha_q$ . Para el sitio 2, determinamos que PLC $\beta$  interactúa hasta con tres aa, de los cuales dos coinciden con la interacción con  $G\beta\gamma$ , I25 y L29. El primero es clave para la interacción con PLC $\beta$ , ya que Evanko *et al.* (2005) demostraron que la mutante de  $G\alpha_q$  I25A es incapaz de interactuar con PLC $\beta$  y, por lo tanto, de activarla. Sin embargo, tomando ambos sitios en cuenta y la estructura cristalizada, PLC $\beta$  no parece ocupar un nicho muy similar al de  $G\beta\gamma$  en  $G\alpha_q$  y podría no ejercer un impedimento estérico suficiente para dar el segundo hit que lleva a la disociación del heterodímero, aunque no es totalmente descartable y permanece como un candidato por probar.

### **Disociación de $G\beta\gamma$ y activación de sus vías de señalización tras la sobreexpresión de interactores de $G\alpha_q$**

Los resultados mostrados en las figuras 32 y 33 sugieren que el efector de  $G\alpha_q$ , p63, es capaz de dar el segundo hit para separar a  $G\beta\gamma$  del sitio 2 después de la disociación del sitio 1 debida a la activación por el receptor. Sin embargo, es interesante que en el experimento funcional (figura 32) la mera expresión de p63 sin estimular al receptor con CNO produjo un aumento en los niveles de pAKT comparados con el control. Esto sugiere que la actividad basal de los  $G_q$ -DREADD es suficiente para causar el primer hit y dicha actividad basal se exagera al sobreexpresar a p63, que parece aprovechar el momento en que se disocia el sitio 1 para interactuar con  $G\alpha_q$  y provocar la liberación de  $G\beta\gamma$ , cambiando el equilibrio

del sistema. Para demostrar lo anterior, sería deseable realizar un experimento en el que se utilizara un agonista inverso. Además, en el experimento de interacción (figura 33) también fue sorprendente el hecho de que la expresión de p63 alteró los niveles detectables de  $G\beta\gamma$ . Lo cual implica que (integrando lo que se obtuvo en el experimento funcional) p63 toma ventaja de la actividad basal de los receptores y eso es suficiente para tener un efecto a corto plazo. No obstante, en una situación crónica es posible que el exceso de p63 altere la temporalidad del ciclo de  $G_q$ , impidiendo que  $G\beta\gamma$  se reasocie con  $G\alpha_q$  y, por lo tanto, la reconstitución del heterotrímero. Esto podría dar lugar a la participación de otros mecanismos de regulación de las proteínas G, posiblemente a través de procesos de degradación. Descartamos la opción de que haya una menor expresión de  $G\beta\gamma$  porque para la transfección se prepararon pools, entonces, la disponibilidad de DNA debería ser la misma.

Así, la activación de vías de degradación parece factible. De tal manera que, la inhibición de estos mecanismos, ya sea vía proteosoma o lisosoma, permitiría comprobar si la disociación mediada por p63 tiene como consecuencia la degradación de  $G\beta\gamma$ .

## 8. CONCLUSIONES

Comprender la dinámica de activación de las proteínas G heterotriméricas es fundamental debido a su implicación en contextos patológicos como el cáncer. A partir de los resultados obtenidos en esta investigación, es posible concluir que el aumento en la activación de AKT al transfectar al efector de  $G\alpha_q$ , p63-RhoGEF, sugiere que el heterodímero  $G\beta\gamma$  se disocia e incrementa su disponibilidad señalizante. Además, la sobreexpresión de p63-RhoGEF por sí sola es suficiente para llevar a la activación de las vías de señalización dependientes de  $G\beta\gamma$ , implicando que este efector aprovecha la actividad basal de los receptores para dar el segundo hit que disocia a  $G\beta\gamma$ .

También, obtuvimos que la sobreexpresión de p63-RhoGEF altera los niveles de detección de  $G\beta\gamma$ , lo cual es inesperado y, por lo tanto, es necesario evaluar si esto se debe a la activación de vías de degradación.

Estos resultados nos permiten profundizar en la comprensión de la dinámica de las proteínas G heterotriméricas, particularmente, en la activación de vías de señalización dependientes de  $G\beta\gamma$ , que son importantes en eventos patológicos como la metástasis.



## 9. REFERENCIAS

Annala, S.; Feng, X.; Shridhar, N.; Eryilmaz, F.; Patt, J.; Yang, J.; Pfeil, E.; Cervantes-Villagrana, D.; Inoue, A.; Häberlein, F.; Slodczyk, T.; Reher, R.; Kehraus, S.; Monteleone, S.; Schrage, R.; Heycke, N.; Rick, U.; Engel, S.; Pfeifer, A.; Kolb, P.; König, G.; Bünemann, M.; Tüting, T.; Vázquez-Prado, J.; Gutkind, J.; Gaffal, E.; Kostenis, E. 2019. Direct targeting of  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{11}$  oncoproteins in cancer cells. *Sci Signal* 12, 1-14.

Augsburger, J.; Correa, Z.; Shaikh, A. 2009. Effectiveness of treatments for metastatic uveal melanoma. *Am J Ophthalmol* 148, 119-127.

Cervantes-Villagrana, D.; Color-Aparicio, V.; Reyes-Cruz, G.; Vázquez-Prado, J. 2018a. Protumoral bone marrow-derived cells migrate via  $G\beta\gamma$ -dependent signalling pathways and exhibit a complex repertoire of RhoGEFs. *Cell Commun Signal* 13, 179-191.

Cervantes-Villagrana, D.; Adame-García, S.; García-Jiménez, I.; Color-Aparicio, V.; Beltrán-Navarro, Y.; König, G.; Kostenis, E.; Reyes-Cruz, G.; Gutkind, J.; Vázquez-Prado, J. 2018b.  $G\beta\gamma$  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* 294, 531-546.

Devreotes, P.; Horwitz, A. 2015. Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7, 1-16.

Dillenburg-Pilla, P.; Patel, V.; Mikelis, C.; Zárate-Bladés, C.; Doçi, C.; Amornphimoltham, P.; Wang, Z.; Martin, D.; Leelahavanichkul, K.; Dorsam, R.; Masedunskas, A.; Weigert, R.; Molinolo, A.; Gutkind, J. 2015. SDF-1/CXCL12 induces directional cell migration and spontaneous metastasis via a CXCR4/ $G\alpha_i$ /mTORC1 axis. *Faseb J* 29, 1056-1068.

Dorsam, R.; Gutkind, J. 2007. G-protein coupled receptors and cancer. *Nat Rev Can* 7, 79-94.

Evanko, D.; Thiyagarajan, M.; Takida, S.; Wedegaertner, P. 2005. Loss of association between activated  $G\alpha_q$  and  $G\beta\gamma$  disrupts receptor-dependent and receptor-independent signaling. *Cell Signal* 17, 1218-1228.

Feng, X.; Arang, N.; Rigiriacciolo, D.; Lee, J.; Yeerna, H.; Wang, Z.; Lubrano, S.; Kishore, A.; Pachter, J.; König, G.; Maggiolini, M.; Kostenis, E.; Schlaepfer, D.; Tamayo, P.; Chen, Q.; Ruppin, E.; Gutkind, J. 2019. A Platform of Synthetic Lethal Gene Interaction Networks Reveals that the GNAQ Uveal Melanoma Oncogene Controls the Hippo Pathway through FAK. *Cancer Cell* 35, 457-472.

Flock, T.; Ravarani, C.; Sun, D.; Venkatakrishnan, A.; Kayikci, M.; Tate, C.; Veprintsev, D.; Babu, M. 2015. A universal allosteric mechanism for  $G\alpha$  protein activation. *Nature* 524, 173-179.

Friedl, P.; Alexander, S. 2011. Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity. *Cell* 147, 992-1009.

Hao, F.; Tan, M.; Xu, X.; Han, J.; Miller, D.; Tigyi, G.; Cui, M. 2007. Lysophosphatidic acid induces prostate cancer PC3 cell migration via activation of LPA<sub>1</sub>, p42 and p38 $\alpha$ . *Biochim Biophys Acta* 1771, 883-892.

Hewavitharana, T.; Wedegaertner, P. 2012. Non-canonical signaling and localizations of heterotrimeric G proteins. *Cell Signal* 24, 25-34.

Hirsch, E.; Katanaev, V.; Garlanda, C.; Azzolino, O.; Pirola, L.; Silengo, L.; Sozzani, S.; Mantovani, A.; Altruda, F.; Wymann, M. 2000. Central Role for G Protein-Coupled Phosphoinositide 3-Kinase  $\gamma$  in Inflammation. *Science* 287, 1049-1053.

Kaliki, S.; Shields, C. 2017. Uveal melanoma: relatively rare but deadly cancer. *Eye* 31, 241-257.

Khan, S.; Sung, J.; Hébert, T. 2016.  $G\beta\gamma$  subunits-Different spaces, different faces. *Pharmacol Res* 111, 434-441.

Kehrl, J. 2016. The impact of RGS and other G-protein regulatory proteins on  $G\alpha_i$ -mediated signalling in immunity. *Biochem Pharmacol* 114, 40-52.

Kitamura, T.; Qian, B.; Soong, D.; Cassetta, L.; Noy, R.; Sugano, G.; Kato, Y.; Li, J.; Pollard, J. CCL2-induced chemokine cascade promotes breast cancer metastasis by enhancing retention of metastasis-associated macrophages. *J Exp Med* 212, 1043-1059.

Lambert, N. 2008. Dissociation of Heterotrimeric G Proteins in Cells. *Sci Signal* 1, re5.

Lambright, D.; Sondek, J.; Bohm, A.; Skiba, N.; Hamm, H.; Sigler, P. 1996. The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 379, 311-319.

Liu, P.; Jia, M.; Zhou, X.; De Waal, P.; Dickson, B.; Liu, B.; Hou, L.; Yin, Y.; Kang, Y.; Shi, Y.; Xu, H.; Jiang, Y. 2016. The structural basis of the dominant negative phenotype of the G $\alpha_{i1}\beta_{1}\gamma_2$  G203A/A326S heterotrimer. *Acta Pharmacol Sin* 37, 1259-1272.

Lutz, S.; Shankaranarayanan, A.; Coco, C.; Ridilla, M.; Nance, M.; Vettel, C.; Baltus, D.; Evelyn, C.; Neubig, R.; Wieland, T.; Tersmer, J. 2007. Structure of G $\alpha_q$ -p63RhoGEF-RhoA complex reveals a pathway for the activation of RhoA by GPCRs. *Science* 318, 1923-1927.

Lyon, A.; Dutta, S.; Boguth C.; Skiniotis, G.; Tesmer, J. Full-length G $\alpha(q)$ -phospholipase C- $\beta_3$  structure reveals interfaces of the C-terminal coiled-coil domain. *Nat Struct Mol Biol* 20, 355-362.

McIntire, W. 2009. Structural Determinants Involved in the Formation and Activation of G Protein G $\beta\gamma$  Dimers. *Neurosignals* 17, 82-99.

Merlot, S.; Firtel, R. 2003. Leading the way: directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signalling pathways. *J Cell Sci* 116, 3471-3478.

Milligan, G.; Kostenis, E. 2006. Heterotrimeric G proteins: a short story. *Br J Pharmacol* 147, S45-S45.

Neptune, E.; Bourne, H. 1997. Receptors induce chemotaxis by releasing the  $\beta\gamma$  subunit of G $_i$ , not by activating G $_q$  or G $_s$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 14489-14494.

Neptune, E.; Bourne, H. 1999. G $\alpha$  is not required for chemotaxis mediated by G $\beta\gamma$ -coupled receptors. *J Biol Chem* 274, 2824-2828.

Nishimura, A.; Kitano, K.; Takasaki, J.; Taniguchi, M.; Mizuno, N.; Tago, K.; Hakoshima, T.; Itoh, H. 2010. Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric G $\alpha_q$  protein by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 13666-13671.

O'Hayre, M.; Degese, M.; Gutkind, J. 2014. Novel insights into G protein and G protein-coupled receptor signaling in cancer. *Curr Opin Cell Biol* 27, 126-135.

Pierce, K.; Premont, R.; Lefkowitz, R. 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3, 639-650.

Rasmussen, S.; DeVree, B.; Zou, Y.; Kruse, A.; Chung, K.; Kobilka, T.; Thian, F.; Chae, P.; Pardon, E.; Calinski, D.; Mathiesen, J.; Shah, S.; Lyons, J.; Caffrey, M.; Gellman, S.; Steyaert, J.; Skiniotis, G.; Weis, W.; Sunahara, R.; Kobilka, B. 2011. Crystal structure of the  $\beta_2$  adrenergic receptor-G $\alpha_s$  protein complex. *Nature* 477, 549-555.

Rojas, R.; Yohe, M.; Gershburg, S.; Kawano, T.; Kozasa, T.; Sondek, J. 2007. G $\alpha_q$  Directly Activates p63RhoGEF and Trio via a conserved extension of the Dbl homology-associated pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 282, 29201-29210.

Smit, K.; Jager, M.; Klein, A.; Kiliç, E. 2019. Uveal melanoma: towards a molecular understanding. *Prog Retin Eye Res*, In Press, Journal Pre-proof.

Schwindinger, W.; Robishaw, J. 2001. Heterotrimeric G-protein  $\beta\gamma$ -dimers in growth and differentiation. *Oncogene* 20, 1653-1660.

Smrcka, A. 2008. G protein  $\beta\gamma$  subunits: Central mediators of G protein-coupled receptor signalling. *Cell Mol Life Sci* 65, 2191-2214.

Vázquez-Prado, J.; Bracho-Valdés, I.; Cervantes-Villagrana, R. D.; Reyes-Cruz, G. 2016. G $\beta\gamma$  Pathways in Cell Polarity and Migration Linked to Oncogenic GPCR Signaling: Potential Relevance in Tumor Microenvironment. *Mol Pharmacol* 90, 573-586.

Wall, M.; Coleman, D.; Lee, E.; Iniguez-Lluhi, J.; Posner, B.; Gilman, A.; Sprang, S. 1995. The structure of the G protein heterotrimer  $G_{i\alpha 1\beta 1\gamma 2}$ . *Cell* 83, 1047-1058.

Wang, Y.; Geer, L.; Chappay, C.; Kans, J.; Bryant, S. 2000. Cn3D: sequence and structure views for Entrez. *Trends Biochem Sci* 25, 300-302.

Wess, J.; Nakajima, K.; Jain, S. 2013. Novel designer receptors to probe GPCR signalling and physiology. *Trends Pharmacol Sci* 34, 385-392.

Woelher, A.; Ponimaskin, E. 2009. G protein-mediated signaling: same receptor, multiple effectors. *Curr Mol Pharmacol* 3, 237-248.

Wu, V.; Yeerna, H.; Nohata, N.; Chiou, J.; Harismendy, O.; Raimondi, F.; Inoue, A.; Russel, R.; Tamayo, P.; Gutkind, J. 2019. Illuminating the Onco-GPCRome: Novel G protein-coupled receptor-driven oncocrine networks and targets for cancer immunotherapy. *J. Biol. Chem* 294, 11062-11086.

Yoda, A.; Adelmant, G.; Tamburini, J.; Chapuy, B.; Shindoh, N.; Yoda, Y.; Weiger, O.; Kopp, N.; Wu, S.; Kim, S.; Liu, H.; Tivey, T.; Christie, A.; Elpek, K.; Card, J.; Gritsman, K.; Gotlib, J.; Deininger, M.; Makishima, H.; Turley, S.; Javidi-Sharifi, N.; Maciejewski, J.; Jaiswal, S.; Ebert, B.; Rodig, S.; Tyner, J.; Marto, J.; Weinstock, D.; Lane, A. 2015. Mutations in G protein  $\beta$  subunits promote transformation and kinase inhibitor resistance. *Nat Med* 21, 71-75.

Páginas de internet

National Center for Biotechnology Information. 2019. Disponible en <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>> [8 de octubre de 2019].

El jurado designado por el Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional aprueba la tesis de maestría titulada: “Señalización quimiotáctica por GPCRs: proteínas interactoras de  $G\alpha_q$  como posibles reguladoras de  $G\beta\gamma$ ”.

Que presenta el C. Raúl Vega Fonseca para su examen final para obtener el grado de Maestro en Ciencias en la especialidad de Farmacología el día 13 de diciembre de 2019.

Dra. María del Carmen García García

Dra. Guadalupe Reyes Cruz

Dr. José Vázquez Prado

