



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Una población protumoral de células de la médula ósea exhibe una expresión diferencial de P-REX1, un efector quimiotáctico cuya activación es finamente regulada por proteínas G heterotriméricas”**

## **T E S I S**

Que presenta

**M. EN C. RODOLFO DANIEL CERVANTES VILLAGRANA**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA**

Director de la tesis:

**DR. JOSÉ VÁZQUEZ PRADO**

Ciudad de México

Diciembre, 2018





## **Agradecimiento al Conacyt**

El trabajo fue realizado en el Laboratorio 35 del Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional. La tesis fue dirigida por el Dr. José Vázquez Prado, investigador Cinvestav 3D y miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel II.

Este proyecto fue realizado gracias al apoyo del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** con la beca de doctorado para Rodolfo Daniel Cervantes Villagrana con número de registro 346964. El financiamiento global de la investigación fue por los siguientes proyectos aprobados por el CONACyT:

Proyecto de infraestructura 2014 con el número de registro **229719**

Proyecto de Ciencia Básica con el número de registro **286274**



## **Dedicatoria**

El presente trabajo y todo mi esfuerzo en cada meta de mi vida se lo dedico a mi madre Rafaela Villagrana Félix (1952-2006) y a mi padre Alberto Cervantes Mascorro (1946-2014), por darme su amor, cuidado, educación y la fuerza para culminar esta etapa y continuar; son y serán mi inspiración. A mis hermanos Rosa Isela Cervantes Villagrana, María Auxilio Cervantes Villagrana y Alberto Rafael Cervantes Villagrana, por su gran apoyo y cariño incondicional. A mis sobrinos Jorge, Alexis, Kytzia, Sofia, Dana y Mateo.



## Agradecimientos

Agradezco enormemente al Dr. José Vázquez Prado por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de doctorado bajo su dirección, por su esfuerzo, preocupación y dedicación en mi formación académica, por compartir sus conocimientos y experiencia, por su confianza y paciencia... Gracias.

También agradezco a la Dra. Guadalupe Reyes Cruz por aportar su conocimiento, colaboración e infraestructura para el desarrollo de mi proyecto.

Agradezco al personal del laboratorio Estanislao Escobar Islas y David Perez Rangel del laboratorio 35 de Farmacología Lab. 35 por todo el soporte técnico-experimental y administrativo para realizar mi proyecto doctoral y por su compañerismo. También a Margarita Raquel Veladez Sánchez y Jaime Estrada Trejo del Laboratorio 19 de Biología Celular Lab. 19 por su apoyo técnico. También agradezco a las secretarías Beatriz Alcántara Castro y Lucero Maricela Fernández Hernández por su apoyo secretarial.

Agradezco al personal del Bioterio (UPEAL-Cinvestav) Ricardo Gaxiola Centeno y Benjamín Emmanuel Chavez Álvarez por su soporte técnico en el mantenimiento de las colonias de ratones y en la atención al equipo de irradiación Faxitron y al Dr. Jorge Fernández Hernández por todo el apoyo logístico y lo relacionado con la discusión y aprobación del protocolo de uso de animales de laboratorio. Gracias a Víctor Hugo Rosales-García de laboratorios centrales del Cinvestav por su asistencia técnica para los experimentos de Citometría.

Compañeros del laboratorio 35 con los que tuve la oportunidad de trabajar en el transcurso de mi doctorado: Lydia, Ricardo, Ismael, Evelyn, Paola, Magda, Sendi, Alejandro, Víctor, Irving, Yarely y Raúl. A todos ellos(as) por compartir sus conocimientos y momentos alegres inolvidables. Con mención adicional a mis compañeros que contribuyeron en algunos experimentos de esta tesis para la publicación: Sendi, Víctor, Irving y Yarely.

Agradezco a mi familia y amigos(as) por apoyarme en mis metas y decisiones, a Damaris Albores por acompañarme en cada momento y por su apoyo incondicional.

Finalmente, agradezco a los doctores que conformaron mi comité tutorial: la Dra. Guadalupe Reyes Cruz, la Dra. Claudia González Espinosa, la Dra. María del Carmen García, el Dr. José Segovia Vila y el Dr. Fernando López Casillas, por enriquecer el presente trabajo con sus críticas constructivas y sugerencias durante las evaluaciones correspondientes.

Por todo lo anterior y más... Gracias



## Contenido

<b>1. Índice de Figuras</b> .....	<b>vii</b>
<b>2. Índice de Tablas</b> .....	<b>xii</b>
<b>3. Abreviaturas</b> .....	<b>xiii</b>
<b>4. Resumen</b> .....	<b>xvii</b>
<b>5. Abstract</b> .....	<b>xix</b>
<b>6. Introducción</b> .....	<b>1</b>
6.1 El cáncer y los procesos celulares y moleculares que subyacen.....	1
6.2 Neovascularización tumoral .....	2
6.2.1 Reclutamiento de células endoteliales y células progenitoras para la formación de nueva vasculatura .....	2
6.3 Migración y contribución de células derivadas de la médula ósea (BMDC) en el desarrollo de tumores y metástasis .....	4
6.4 Mecanismos de reclutamiento de BMDC a los tumores.....	6
6.5 Monocitos y macrófagos Tie2+ como células pro-tumorales derivadas de la médula ósea....	9
6.6 Participación de receptores acoplados a Gi en la migración celular polarizada.....	10
6.7 GPCRs en la progresión de tumores y metástasis: Contribución de receptores quimiotácticos	12
6.7.1 Vías de señalización clásicas de los GPCRs: Señalización de G $\beta\gamma$ en el contexto de la migración celular.....	12
6.7.2 Señalización de G $\beta\gamma$ en migración celular .....	15
6.8 Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina de GTPasas de Rho (RhoGEFs) y las RhoGTPasas como efectores quimiotácticos .....	16
6.8.1 RhoGEFs activados por GPCRs.....	20
6.8.2 El RacGEF P-Rex1, un efector quimiotáctico de G $\beta\gamma$ en la migración celular dependiente de GPCRs.....	22

<b>7. Justificación .....</b>	<b>25</b>
<b>8. Hipótesis y Objetivos.....</b>	<b>27</b>
8.1 Hipótesis .....	27
8.2 Objetivo.....	27
8.3 Objetivos Particulares .....	27
<b>9. Material y Métodos .....</b>	<b>29</b>
9.1 Cultivos Celulares .....	29
9.1.1 Cultivo primario de células derivadas de la médula ósea (BMDCs, Bone Marrow-Derived Cells) de ratones .....	29
9.1.2 Cultivo de células tumorales de carcinoma de pulmón murino.....	33
9.1.3 Cultivos de líneas celulares y plásmidos utilizados.....	33
9.2 Métodos de Transfección .....	38
9.2.1 Método de transfección con Lipofectamina-Plus .....	38
9.2.2 Transfección de células HEK293T, COS7, HeLa y PAE con el método de PolyFect .....	39
9.2.3 Método de transfección con PEI 1X.....	39
9.2.4 Método de transfección con TurboFect.....	40
9.2.5 Knock down de P-Rex1 en células MCF7.....	40
9.3 Mediadores angiogénicos y quimiotácticos asociados al microambiente tumoral .....	41
9.3.1 Estímulos pro-tumorales definidos.....	41
9.3.2 Obtención de medios condicionados de células tumorales y de BMDC .....	42
9.4 Procedimientos de lisis de células, pulldown, inmunoprecipitación y western blot.....	43
9.4.1 Lisis de las células derivadas de la médula ósea cultivada y frescas, y células tumorales .....	43
9.4.2 Inmunofluorescencia de células fijadas.....	45
9.4.3 Captura de RhoGTPasas activas (Rho-GTP, Rac-GTP y Cdc42-GTP) y RhoGEFs activos.....	45
9.4.4 Ensayos de pulldown de His6- y GST-.....	49
9.4.5 Ensayo de Inmunoprecipitación .....	50



9.4.6	Detección de proteínas por Western blot .....	51
9.5	Modelo tumoral en ratones con fondo genético C57 y FVB .....	55
9.5.1	Inoculación de células tumorales en ratones .....	55
9.5.2	Participación de células cultivadas de la médula ósea en el crecimiento del tumor primario.....	57
9.5.3	Disgregación de tumor y aislamiento de células de interés.....	58
9.5.4	Análisis por citometría de flujo de los marcadores celulares.....	59
9.6	RT-PCR de la expresión de RhoGEFs y marcadores celulares.....	60
9.6.1	Genotipos de ratones transgénicos por PCR punto final a partir de biopsias de la cola.....	65
9.7	Ensayos de migración celular .....	67
9.7.1	Migración de células tumorales y células endoteliales en ensayos de cierre de herida .....	67
9.7.2	Migración de células derivadas de la médula ósea en ensayos de cierre de herida .....	70
9.8	Análisis de los resultados y pruebas estadísticas .....	71
<b>10.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>73</b>
10.1	Resultados del OBJETIVO 1.....	74
10.1.1	Búsqueda de una población de la médula ósea potencialmente pro-tumoral .....	75
10.1.2	Enriquecimiento de células Tie2+ en los cultivos de células derivadas de la médula ósea .....	80
10.1.3	Las células de la médula ósea expandidas <i>in vitro</i> (Tie2+/CD11b+/CD45+), promueven el crecimiento del tumor primario en ratones .....	85
10.1.4	Comunicación bidireccional entre células tumorales y células derivadas de la médula ósea.....	91
10.1.5	Efecto de mediadores asociados al microambiente tumoral sobre la activación de las vías de señalización de AKT y ERK en BMDC.....	93
10.1.6	Contribución de GPCRs→Gi en la activación de AKT y ERK en BMDC.....	95
10.1.7	Migración de células derivadas de la médula ósea estimuladas por medios condicionados de células tumorales .....	97
10.1.8	Activación de AKT y ERK en células de carcinoma de pulmón (LAP0297 y LLC) estimuladas con factores asociados al microambiente tumoral.....	100

10.1.9 Las células tumorales LAP0297 migran en respuesta a los medios condicionados de BMDCs y es dependiente de $G_i \rightarrow G_{\beta\gamma}$ .....	102
10.1.10 Las células endoteliales (PAE) migran en respuesta a los medios condicionados de células tumorales y BMDCs vía $G_{\beta\gamma}$ .....	106
10.2 Resultados del OBJETIVO 2.....	109
10.2.1 Perfil de expresión del RNA mensajero de los RhoGEFs en células derivadas de la médula ósea .....	110
10.2.2 Expresión diferencial de proteínas de señalización en médula ósea fresca versus células derivadas de la médula ósea evaluadas por western blot.....	115
10.2.3 Activación de RhoGTPasas y RhoGEFs en BMDCs estimuladas por medios condicionados de células tumorales.....	118
10.3 Resultados del OBJETIVO 3.....	123
10.3.1 Análisis de la vía SDF-1/CXCR4/ $G_i$ /P-Rex1/Rac1 potencialmente relevante en células de la médula ósea utilizando modelos celulares .....	124
10.3.2 Interacción de las subunidades $G_{\alpha}$ con el heterodímero $G_{\beta\gamma}$ .....	126
10.3.3 La quimera $G_{\alpha_{13-12}QL}$ mantiene interacción estable con $G_{\beta\gamma}$ : evidencia de la contribución de la región $\alpha N$ -terminal de $G_{\alpha_{13}}$ para mantener la interacción.....	129
10.3.4 Activación de la vía SDF-1/CXCR4/ $G_{\beta\gamma}$ /P-Rex1/Rac.....	132
10.3.5 Mapeo de la interacción de $G_{\beta\gamma}$ con P-Rex1: posible relevancia de los dominios PDZs en la activación secuencial de P-Rex1 inducida por $G_{\beta\gamma}$ .....	134
10.3.6 Las subunidades $G_{\alpha_q}QL$ y $G_{\alpha_{13}QL}$ inhiben la activación de P-Rex1 y AKT inducida por $G_{\beta\gamma}$ ....	141
10.3.7 Las subunidades $G_{\alpha_q}QL$ y $G_{\alpha_{13}QL}$ inhiben la interacción $G_{\beta\gamma}$ con P-Rex1 y la migración celular .....	143
10.3.8 Dinámica de interacción de $G_{\beta\gamma}$ con las subunidades $G_{\alpha_q}QL$ y $G_{\alpha_{13}QL}$ .....	146
10.3.9 Validación de la activación quimiogénica de proteínas $G_i$ y $G_q$ por receptores diseñados para activarse exclusivamente por fármacos diseñados ( $G_i$ - y $G_q$ -DREADDs).....	152
10.3.10 Evidencia quimiogénica (DREADDs) de la activación de P-Rex1 y migración celular por $G_i$ , pero no por $G_q$ .....	155
10.3.11 Los receptores para LPA acoplados a $G_q/G_i$ incrementan la señalización a P-Rex1 cuando $G_{\alpha_q}$ es inhibida.....	157

<b>11. Discusión .....</b>	<b>161</b>
11.1 Los RhoGEFs como proteínas multidominio indispensables para la migración celular .....	161
11.2 Efecto pro-tumoral y anti-tumoral de células de la médula ósea.....	163
11.3 Mecanismos de regulación de P-Rex1 por receptores acoplados a $G_i$ : contribución de $G\beta\gamma$ y de $G\alpha_i$ .....	164
11.4 La interacción del extremo amino de $G\alpha_q$ - y $G\alpha_{13}$ -QL con $G\beta\gamma$ : regulación negativa sobre los efectores quimiotácticos de $G\beta\gamma$ .....	166
11.5 Modelo que integra los mecanismos de señalización quimiotáctica por $G\beta\gamma$ derivada de $G_i$ , pero no de otros heterotrímeros como $G_q$ y $G_{13}$ .....	168
<b>12. Conclusiones .....</b>	<b>171</b>
<b>13. Perspectivas Experimentales .....</b>	<b>173</b>
<b>14. Referencias .....</b>	<b>175</b>
<b>15. Publicaciones .....</b>	<b>187</b>
15.1 Artículo Original: $G\beta\gamma$ signaling to the chemotactic effector P-REX1 and mammalian cell migration is directly regulated by $G\alpha_q$ and $G\alpha_{13}$ proteins ( <i>en prensa</i> ) .....	187
15.2 Artículo Original: Protumoral bone marrow-derived cells migrate via $G\beta\gamma$ and exhibit a complex repertoire of RhoGEFs.....	205
15.3 Artículo de Revisión: $G\beta\gamma$ Pathways in Cell Polarity and Migration Linked to Oncogenic GPCR Signaling: Potential Relevance in Tumor Microenvironment.....	223
15.4 Artículo Original: Protein Kinase A (PKA) Type I Interacts with P-Rex1, a Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor EFFECT ON PKA LOCALIZATION AND P-Rex1 SIGNALING 237	
15.5 Artículo Original: cAMP-dependent activation of the Rac guanine exchange factor P-REX1 by type I protein kinase A (PKA) regulatory subunits.....	257
15.6 Artículo Original: Direct targeting of GNAQ and GNA11 oncogenes in cancer cells .....	259

<b>16. Anexos .....</b>	<b>261</b>
16.1 Primers utilizados para determinar la expresión de los RhoGEFs .....	261
16.2 Primers utilizados para determinar la expresión de marcadores celulares .....	264
16.3 Premio Cinvestesis 180.....	265

# 1. Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Comunicación de las células tumorales con diferentes células..	2
<b>Figura 2.</b> Quimio-atracción de células derivadas de la médula ósea al estroma tumoral.....	5
<b>Figura 3.</b> Comunicación oncogénica entre células tumorales y células del entorno. ....	6
<b>Figura 4.</b> Migración de las células de la médula ósea hacia el tumor y diseminación de las células tumorales hacia el hueso. ....	7
<b>Figura 5.</b> Contribución de GPCRs en la migración celular asociada a procesos oncogénicos. ....	11
<b>Figura 6.</b> Vías de señalización clásicas de los receptores acoplados a las proteínas G representativas..	13
<b>Figura 7.</b> Diagrama de Venn del acoplamiento preferencial de los GPCRs a las 4 familias de proteínas G heterotriméricas. ....	14
<b>Figura 8.</b> Mecanismos de activación e inactivación de las RhoGTPasas..	18
<b>Figura 9.</b> Dominios de los principales RhoGEFs activados por GPCRs: RGS-RhoGEFs y P-Rex1/2. ....	19
<b>Figura 10.</b> RhoGEFs reconocidos por proteínas G heterotriméricas.....	21
<b>Figura 11.</b> Mecanismos de modulación de P-Rex1.....	23
<b>Figura 12.</b> Cultivo de células de la médula ósea con propiedades pro-tumorales. ....	31
<b>Figura 13.</b> Resumen del procedimiento para el cultivo de médula ósea de ratones. ....	32
<b>Figura 14.</b> Fundamento de la captura de GTPasas activas y RhoGEFs activos.....	46
<b>Figura 15.</b> Resinas para la captura de RhoGEFs activos. ....	47
<b>Figura 16.</b> Resinas para la captura de RhoGTPasas activas.....	48
<b>Figura 17.</b> Esquema del ensayo de pulldown para interpretación de los resultados.....	50
<b>Figura 18.</b> Diagrama del procedimiento para generar tumores murinos..	55
<b>Figura 19.</b> Esquemas para el procedimiento para la co-inoculación de células tumorales con células cultivadas de la médula ósea, o bien, células de la médula ósea fresca. ....	57

**Figura 20.** Genotipos de ratones por PCR. .... 67

**Figura 21.** Diseño experimental para la migración celular de células tumorales LAP0297. .... 68

**Figura 22.** Línea temporal del experimento de cierre de herida en células HeLa..... 69

**Figura 23.** Línea temporal del experimento de cierre de herida en células derivadas de la médula ósea..... 70

**Figura 24.** La migración de células derivadas de la médula ósea (BMDC) atraídas por mediadores quimiotácticos secretados por las células tumorales distantes y la comunicación pro-tumoral recíproca que establecen..... 74

**Figura 25.** Existe una población escasa de células Tie2-GFP+ en la médula ósea de ratones transgénicos que expresan GFP bajo el promotor de Tie2 (<1%).. .... 76

**Figura 26.** Cultivo de células derivadas de la médula ósea de ratones..... 77

**Figura 27.** Expresión del mRNA de marcadores (células endoteliales, progenitoras y hematopoyéticas) en las células derivadas de la médula ósea (cultivadas) y en células de la médula ósea recién extraída..... 80

**Figura 28.** Cultivos de BMDC son enriquecidos de células Tie2+CD45+..... 81

**Figura 29.** Las BMDC Tie2+/CD45+ expresan el marcador de monocitos CD11b..... 83

**Figura 30.** Los tumores murinos son infiltrados por células Tie2+CD11b+CD45+. .... 84

**Figura 31.** Cultivo de células de la médula ósea enriquecido de poblaciones celulares (Tie2+/CD11b+/CD45+) que promueven el crecimiento tumoral.. .... 86

**Figura 32.** Las células de la médula ósea recién extraída disminuyen el crecimiento de tumores murinos en un modelo de co-inoculación..... 88

**Figura 33.** Co-inoculación de células derivadas de la médula ósea junto con células tumorales LLC, favorece el crecimiento tumoral.. .... 89

**Figura 34.** Comunicación bidireccional entre células derivadas de la médula ósea y células tumorales. .... 92

**Figura 35.** Activación de ERK y AKT inducida por diferentes estímulos asociados al microambiente tumoral en células derivadas de la médula ósea. .... 94

<b>Figura 36.</b> La activación de AKT y ERK inducida por los medios condicionados es parcialmente dependiente de GPCRs que señalizan vía Gi, pero no participa CXCR4.....	96
<b>Figura 37.</b> Migración de células derivadas de la médula ósea inducida por medios condicionados de células tumorales y SDF-1.....	98
<b>Figura 38.</b> Activación de ERK y AKT inducida por diferentes estímulos definidos y la migración eficiente de células tumorales estimuladas con SDF-1, LPA y HGF.....	100
<b>Figura 39.</b> Las células tumorales migran individuales y de manera grupal en respuesta a los medios condicionados de las BMDCs.....	102
<b>Figura 40.</b> Los medios condicionados de células derivadas de la médula ósea (BMDCs), el SDF-1, LPA y HGF, inducen la migración de células tumorales LAP0297.....	104
<b>Figura 41.</b> La migración de células tumorales inducida por los medios condicionados de BMDCs y LPA, es dependiente de Gi vía el dímero Gβγ.....	105
<b>Figura 42.</b> Medios condicionados de BMDCs y células tumorales promueven la migración de células endoteliales vía dependiente de GPCRs→Gβγ.....	106
<b>Figura 43.</b> Modelo que representa la migración celular y la señalización general involucrada en la contribución de GPCRs quimiotácticos en un escenario tumoral.....	109
<b>Figura 44.</b> Perfil de expresión de los RhoGEFs de la Rama 1A en BMDCs y BM.....	111
<b>Figura 45.</b> Perfil de expresión de los RhoGEFs de la Rama 1B en BMDCs y BM.....	112
<b>Figura 46.</b> Perfil de expresión de los RhoGEFs de la Rama 2A en BMDCs y BM.....	113
<b>Figura 47.</b> Perfil de expresión de los RhoGEFs de la Rama 2B en BMDCs y BM.....	114
<b>Figura 48.</b> Expresión de proteínas de señalización en células de la médula ósea recién extraída y cultivada.....	116
<b>Figura 49.</b> Los medios condicionados de células tumorales activan a RhoGEFs (P-Rex1 y PDZ-RhoGEF) y a RhoGTPasas en BMDCs.....	119
<b>Figura 50.</b> Hallazgos relevantes de la comunicación celular entre BMDCs pro-tumorales, células tumorales y células endoteliales.....	121

**Figura 51.** Modelo que representa hipotéticamente la activación de P-Rex1 vía GPCR/Gi/Gβγ para llevar a la migración celular, pero no por otros heterotrimeros como Gq y G13 que pudiesen ser activados..... 123

**Figura 52.** El SDF-1/CXCL12 promueve la migración celular inducida por la activación de receptores CXCR4 y de manera dependiente de Gi..... 125

**Figura 53.** El heterodímero Gβγ interacciona con mutantes activas de Gα<sub>q</sub>-QL y Gα<sub>13</sub>-QL, pero no con Gα<sub>i</sub>-QL y Gα<sub>s</sub>-QL..... 128

**Figura 54.** La α-hélice del extremo amino terminal (αN) de la subunidad Gα<sub>13</sub>-QL es importante para mantener la interacción con Gβγ.. ..... 130

**Figura 55.** Caracterización del eje de señalización SDF-1/CXCR4/Gβγ/P-Rex1/Rac1..... 133

**Figura 56.** El heterodímero Gβγ interacciona con los dominios DH-PH y PDZ-PDZ de P-Rex1..... 136

**Figura 57.** El heterodímero Gβγ interacciona con los dominios PDZ-PDZ de la quimera Q-Rhox.. 137

**Figura 58.** Dominios PDZ-PDZ relevantes para la activación de P-Rex1 inducida por Gβγ..... 138

**Figura 59.** Gβγ interacciona con los dominios PDZ-PDZ y DH-PH de P-Rex1 con caras distintas..140

**Figura 60.** Las subunidades Gα<sub>q</sub>QL y Gα<sub>13</sub>QL inhiben la activación de P-Rex1 y AKT inducida por la sobreexpresión de Gβγ..... 142

**Figura 61.** Las subunidades Gα<sub>q</sub>-QL y Gα<sub>13</sub>-QL inhiben la migración celular inducida por SDF-1/CXCL12, pero no inhiben la migración inducida por suero.. ..... 145

**Figura 62.** Complejo tetramérico de Gβγ/Gα<sub>q</sub>QL/RGS2..... 147

**Figura 63.** Complejo tetramérico de Gβγ-Gα<sub>13-12</sub>QL-RGS4..... 149

**Figura 64.** Evidencia de la disociación de Gα<sub>13</sub> de Gβγ dependiente de efectores de Gα<sub>13</sub>.. ..... 151

**Figura 65.** Activación de P-Rex1 por el receptor Gi-DREADD, pero no por Gq-DREADD..... 154  
..... 156

**Figura 66.** La migración celular y la activación de P-Rex1 son eficientes a través de GPCRs acoplados a Gi, pero no por Gq..... 156



<b>Figura 67.</b> Los receptores a LPA con acoplamiento múltiple llevan a la activación de ERK via $G_q$ , mientras que la activación de P-Rex1 es vía $G_i$ .....	158
<b>Figura 68.</b> Los receptores para LPA acoplados a $G_q/G_i$ incrementan la activación de P-Rex1 cuando se inhibe a $G_{\alpha_q}$ farmacológicamente o por RGS2.....	160
<b>Figura 69.</b> Modelo que representa la activación de P-Rex1 dependiente de un receptor acoplado a $G_i$ .....	165
<b>Figura 70.</b> Estructura de $G_i$ , sitios de interacción entre $G\beta\gamma$ y $G\alpha_i$ .....	167
<b>Figura 71.</b> Modelo final.....	169

## 2. Índice de Tablas

---

<b>Tabla 1.</b> Ligandos y las concentraciones utilizadas para estimular a las células derivadas de la médula ósea y en células tumorales de pulmón.....	42
<b>Tabla 2.</b> Inhibidores de proteasas y fosfatasa utilizados buffer de lisis.....	44
<b>Tabla 3.</b> Anticuerpos utilizados para western blot e inmunoprecipitación.....	53
<b>Tabla 4.</b> Soluciones necesarias para la preparación de geles de acrilamida para western blot.....	54
<b>Tabla 5.</b> Soluciones necesarias para la preparación del gel concentrador.....	54
<b>Tabla 6.</b> Anticuerpos utilizados para citometría de flujo.....	60
<b>Tabla 7.</b> Preparación de la mezcla para eliminar contaminación de DNA en las muestras de RNA, previo a la RT.....	61
<b>Tabla 8.</b> Preparación de la mezcla previa a la RT para hibridar el RNA con el Oligo dT.....	62
<b>Tabla 9.</b> Preparación de la mezcla para la retrotranscripción (RT).....	63
<b>Tabla 10.</b> Preparación para degradar el RNA posterior a la RT.....	63
<b>Tabla 11.</b> Mezcla de para PCR de actina, DH-RhoGEFs y marcadores celulares a partir del cDNA.....	64
<b>Tabla 12.</b> Condiciones del termociclador para la PCR punto final utilizadas para marcadores celulares, DH-RhoGEFs y genotipos de ratones.....	64
<b>Tabla 13.</b> Preparación de la mezcla para PCR de los genotipos de los ratones.....	66
<b>Tabla 14.</b> Secuencia de los primers utilizados para el genotipo de ratones.....	66
<b>Tabla 15.</b> Condiciones de PCR para los genotipos de ratones C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)131Osb/LeySopJ....	67
<b>Tabla 16.</b> Efecto de los estímulos evaluados en células derivadas de la médula ósea.....	95

### 3. Abreviaturas

AC	Adenilatociclasa
Ang-1/2	Angiopoyetina 1 y 2 (Angiopoyetin-1 or -2)
ANOVA	Análisis de varianza (Analysis of variance)
BM	Médula ósea (Bone Marrow)
BMDC	Célula derivada de la médula ósea (Bone Marrow Derived Cell)
CNO	Clozapina-N-óxido (Clozapine-N-oxide)
CRIB	Dominio de unión a Cdc42/Rac (Cdc42/Rac Interactive Binding)
DAG	Diacilglicerol (Diacylglycerol)
DEP	Dominio Disheveled/EGL-10/Pleckstrin
DH	Dominio de homología a Dbl (Dbl-Homology domain)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DREADD	Receptor diseñado para activarse únicamente por un ligando diseñado (Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drug)
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor)
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada (Enhanced Green Fluorescent Protein)
EGM-2MV	Medio de crecimiento endotelial 2 microvascular (Endothelial Growth Media-2 Microvascular)
EPC	Célula progenitora endotelial (Endothelial Progenitor Cell)
ERK	Cinasa regulada por señal extracelular (Extracellular signal regulated kinase)
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (Fibroblast growth factor)
Gal	Galeína (Gallein)
GBM	Glioblastoma multiforme
GDP	Guanosín difosfato (Guanosine diphosphate)
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina (Guanine nucleotide exchange factor)
GPCR	Receptor acoplado a proteína G (G protein-coupled receptor)
GRK	Cinasa de receptor acoplado a proteína G (G protein-coupled receptor kinase)
GST	Glutación-S-transferasa (Glutathione-S-transferase)
GTP	Guanosín trifosfato (Guanosine triphosphate)

HGF	Factor de crecimiento de hepatocito (Hepatocyte growth factor)
HIF-1	Factor inducible por hipoxia-1 (Hypoxia-inducible factor 1)
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina (Insulin-like Growth Factor),
IL-8	Interleucina 8 (Interleukine-8)
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato (Inositol-1,4,5-trisphosphate)
LLC	Carcinoma de pulmón de Lewis (Lewis lung carcinoma)
LPA	Ácido lisofosfatídico (Lysophosphatidic acid)
LPAR	Receptor para ácido lisofosfatídico (Lysophosphatidic acid receptor)
MDSC	Célula supresoras derivada mieloide (Myeloid-derived suppressor cell)
mTOR	Blanco mamífero de rapamicina (mammalian target of rapamycin)
mTORC2	Complejo 2 del blanco mamífero de rapamicina (mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 2)
PAE	Endoteliales de aorta de porcino (Porcine Aortic Endothelial)
PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos (Phosphate buffered saline)
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet derived growth factor)
PDZ	Dominio PSD-95/Dlg/ZO-1 (PSD-95/Dlg/ZO-1 domain)
PFA	Paraformaldehído
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub> (Prostaglandin E <sub>2</sub> )
PH	Dominio de homología a pleckstrina (Pleckstrin homology domain)
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa (Phosphatidylinositol-3-kinase)
PIP <sub>2</sub>	Fosfatilinositol-4,5-bifosfato (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate)
PIP <sub>3</sub>	Fosfatilinositol-3,4,5-trifosfato (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate)
PKA	Proteína cinasa A (Protein kinase A)
PKC	Proteína cinasa C (Protein kinase C)
PLCβ	Fosfolipasa C β (Phospholipase Cβ)
PIGF	Factor de crecimiento placentario (Placental growth factor)
PPC	Células precursoras de pericitos (Pericyte progenitor cell)
P-Rex1	Proteína 1 intercambiador de Rac dependiente de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1 protein)
PTX	Toxina pertussis (Pertussis toxin)

RacGEF	Factor intercambiador de nucleótido de guanina para Rac ( <u>R</u> ac <u>g</u> uanine nucleotide <u>e</u> xchange <u>f</u> actor)
RASSL	Receptor activado solamente por ligandos sintéticos ( <u>R</u> eceptor <u>a</u> ctivated <u>s</u> olely by <u>s</u> ynthetic <u>l</u> igands)
RBD	Dominio de unión a Ras ( <u>R</u> as <u>B</u> inding <u>D</u> omain)
RGD	motivo Arg-Gly-Asp / Arginina-Glicina-Aspartato (R-G-D)
RGS2/4	Regulador de la señalización de proteína G ( <u>R</u> egulator of <u>G</u> protein <u>s</u> ignaling 2/4)
RhoGAP	Proteína activadora de la actividad de RhoGTPasa ( <u>R</u> ho- <u>G</u> TPase- <u>a</u> ctivating <u>p</u> rotein)
RhoGDI	Inhibidor de la disociación de nucleótido de guanina específico para Rho ( <u>R</u> ho- <u>s</u> pecific <u>g</u> uanine nucleotide <u>d</u> issociation <u>i</u> nhibitor)
RhoGEF	Factor intercambiador de nucleótido de guanina de la familia de Rho ( <u>R</u> ho family <u>g</u> uanine nucleotide <u>e</u> xchange <u>f</u> actor)
S1P	Esfingosina-1-fosfato ( <u>S</u> phingosine- <u>1</u> - <u>p</u> hosphate)
S1P1R	Receptor de esfingosina-1-fosfato ( <u>S</u> phingosine- <u>1</u> - <u>P</u> hosphate <u>R</u> eceptor)
SDF-1 $\alpha$	Factor derivado de célula estromal ( <u>S</u> tromal cell- <u>d</u> erived <u>f</u> actor <u>1</u> ;
SFB	<u>S</u> uero <u>f</u> etal <u>b</u> ovino (Fetal Bovine Serum, FBS)
TAMs	Macrófagos asociados a tumor ( <u>T</u> umor- <u>a</u> ssociated <u>m</u> acrophages)
TEMs	Monocitos que expresan Tie2 ( <u>T</u> ie2- <u>e</u> xpressing <u>m</u> onocytes)
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular ( <u>V</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
VEGFR	Receptor para VEGF ( <u>V</u> EGF <u>r</u> eceptor)



## 4. Resumen

La **migración celular** contribuye al crecimiento y diseminación del **cáncer**. Los tumores secretan factores que atraen a células de tejidos adyacentes y derivadas de la médula ósea (**BMDC**). Diversos receptores acoplados a proteínas G (**GPCR**) dirigen estos procesos de migración celular. Las **GTPasas** de la familia de Rho, activadas por **factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (RhoGEFs)**, controlan la reorganización del citoesqueleto durante la migración celular. En este trabajo caracterizamos a una población de BMDC que contribuye al crecimiento de tumores. Revelamos su repertorio de RhoGEFs y la regulación recíproca que sostienen con células tumorales. Además, analizamos la transducción de señales vinculada a su migración. Estas células expresaron marcadores **Tie2+/CD11b+/CD45+**, característicos de monocitos/macrófagos asociados a tumores. Tanto BMDCs como células tumorales respondieron a agonistas de GPCRs acoplados a  $G_i$  cuya señalización vía  $G\beta\gamma$  fue fundamental en el proceso. Por western blot demostramos la expresión de RhoGTPasas y RhoGEFs regulados por GPCRs, destacando **P-Rex1, un efector de  $G\beta\gamma$** . Caracterizamos que la activación de P-Rex1 depende de receptores acoplados a  $G_i$ . Descubrimos que mutantes constitutivamente activas de  $G_{\alpha_q}$  y  $G_{\alpha_{13}}$ , pero no de  $G_{\alpha_i}$  o  $G_{\alpha_s}$ , mantienen interacciones estables con  $G\beta\gamma$ . Además, formaron complejos que pueden incluir a proteínas RGS. Nuestros resultados mostraron que el heterotrímero  $G_i$  fue más efectivo para liberar a  $G\beta\gamma$  y promover movimiento celular. **Las subunidades  $G_{\alpha_q}$  y  $G_{\alpha_{13}}$  inhibieron que  $G\beta\gamma$  estimulara a P-Rex1**, así como a AKT, y la migración celular inducida por SDF-1/CXCR4/ $G_i$ . Una estrategia quimiogénica, con receptores acoplados específicamente a  $G_i$  o  $G_q$  ( $G_i$ - o  $G_q$ -DREADD), nos permitió confirmar que  **$G_i$ , pero no  $G_q$ , estimula a la vía  $G\beta\gamma$ /P-Rex1 y la migración celular**. Los receptores para LPA, acoplados tanto a  $G_q$  como a  $G_i$ , tuvieron un mejor efecto como activadores de esta vía cuando  $G_q$  fue inhibida. Nuestros resultados evidenciaron diferencias entre proteínas G heterotriméricas en cuanto a su capacidad de señalizar vía  $G\beta\gamma$ , demostrando que el efecto mediado por  $G_i$  es más efectivo que el de  $G_q$  y  $G_{13}$ , cuyas subunidades  $G_{\alpha}$  parecen inhibir directamente a  $G\beta\gamma$ . Estos datos ponen de manifiesto que el modelo tradicional de activación de proteínas G heterotriméricas, de acuerdo con el cual los receptores promueven el intercambio de nucleótido en  $G_{\alpha}$  y la liberación de  $G\beta\gamma$ , constituyente habitual de todos los heterotrímeros, requiere ajustes para contemplar la participación de efectores que pudieran intervenir para promover la señalización de  $G\beta\gamma$ . Esta dinámica diferencial tiene un impacto en procesos de quimiotaxis.





## 5. Abstract

---

Cell migration plays a critical role in cancer growth and dissemination. Chemotactic factors secreted by cancer cells recruit bone marrow-derived cells (BMDC). G protein-coupled receptors (GPCR) control BMDC migration to tumors and to future metastatic niches. This process depends on the activation of Rho GTPases by guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs), leading to cytoskeleton reorganization and cell polarization. Here, we cultured and characterized a pro-tumoral population of BMDC, their repertoire of RhoGEFs, their reciprocal regulation with tumor cells and the signaling pathways controlling their migration. Using immunocompetent mice, we showed that Tie2+/CD11b+/CD45+ (monocytes/macrophages-Tie2+) cells promoted growth of co-inoculated carcinoma cells. BMDC- and tumor cell-conditioned media promoted cell migration by activating Gi-coupled GPCRs with Gβγ playing a fundamental role. Regarding RhoGEFs regulated by GPCRs, P-Rex1 was particularly enriched in BMDC. We analyzed the mechanistic basis of P-Rex1 activation by diverse G protein heterotrimers. We found that constitutively active Gα<sub>q</sub> and Gα<sub>13</sub> mutants, but not Gα<sub>i</sub> or Gα<sub>s</sub>, maintain stable interactions with the Gβγ, which can also include RGS proteins, and inhibit Gβγ interaction with P-Rex1, its chemotactic effector. Moreover, Gα<sub>q</sub> and Gα<sub>13</sub> QL mutants inhibited P-Rex1 activation as well as that of AKT, and cell migration induced by SDF-1. Using a chemogenetic strategy with receptors specifically coupled to Gi or Gq and activated by a synthetic ligand (Gi- or Gq-DREADD), we confirm that Gi, but not Gq, stimulates the Gβγ/P-Rex1 pathway and cell migration. LPA receptors, coupled to Gq and Gi, were more effective activating this pathway when Gq was inhibited. Altogether, our results highlight family-specific differences among heterotrimeric G proteins in terms of the traditional model of G protein activation by GPCRs, indicating that effectors of Gα might play a role to release Gβγ. Our data contribute to explain why chemotaxis mainly occurs via Gi and not other G protein heterotrimers, even though all of them contain Gβγ, an essential transducer in this process.



## 6. Introducción

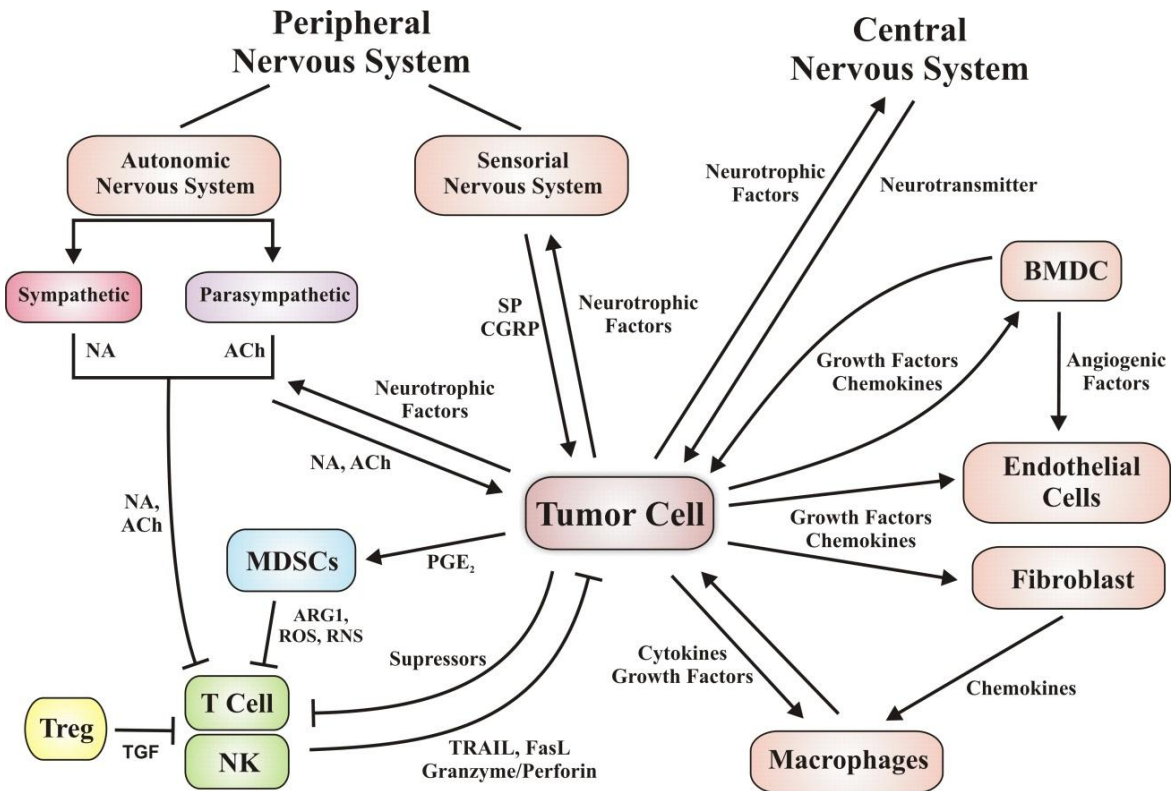
### 6.1 El cáncer y los procesos celulares y moleculares que subyacen

El cáncer es una de las enfermedades que se encuentra en la lista de las primeras causas de muerte en México y el mundo. La enfermedad se caracteriza por la desdiferenciación y proliferación descontrolada de células comúnmente mutadas en oncogenes que promueven la sobrevivencia, división celular y pérdida de la función natural del tejido de donde se originó. Las células malignas se multiplican de manera descontrolada hasta formar una masa tumoral que en determinado momento alcanza un tamaño y densidad en que los nutrientes y el oxígeno requeridos por estas células no llegan adecuadamente; llegado a este punto, se dispara la secreción de factores quimiotácticos y angiogénicos para la generación de nuevos vasos sanguíneos que se infiltran para irrigar y nutrir a los tumores. La progresión de la enfermedad conlleva que las células malignas continúen invadiendo el tejido circundante, desplazando tejido normal, y manipulando células estromales para que proporcionen sustento al tumor. Posteriormente las células malignas adquieren capacidades que les permiten acceder a la circulación sistémica y trasladarse e implantarse en órganos distantes con un ambiente particularmente favorable para su colonización y expansión, alterando nuevamente la eficiencia funcional de dicho órgano <sup>1-3</sup>

Para la progresión del cáncer, las células malignas requieren el reclutamiento y contribución de células normales para enriquecer el microambiente tumoral y crecer a voluntad. Se sabe que células fibroblastos, células endoteliales, pericitos <sup>4</sup>, células derivadas de la médula ósea como monocitos/macrófagos asociados a tumor <sup>5</sup>, células progenitoras de endoteliales <sup>6</sup>, T reguladoras, MDSCs (Myeloid-derived suppressor cells) <sup>7-9</sup> y prolongaciones neuronales<sup>10,11</sup> son reclutados para la generación de vasos sanguíneos tumorales, la evasión de la respuesta inmunológica anti-tumoral y el enriquecimiento de factores mitogénicos para las células tumorales. En la Figura 1 se muestran algunas de las redes de comunicación oncogénica que las células tumorales pueden establecer con células del estroma como fibroblastos y endoteliales, células del sistema inmunológico e incluso neuronas autonómicas o sensoriales <sup>12</sup>.

En concreto, las células tumorales establecen comunicación con células adyacentes y lejanas para reclutarlas con fines oncogénicos. Los factores quimiotácticos derivados de tumores son

fundamentales en los procesos patológicos de las células tumorales en el cáncer. Diversos factores secretados por células tumorales pueden atraer a células adyacentes como fibroblastos <sup>13,14</sup>, células endoteliales <sup>15</sup>, leucocitos residentes del tejido e inclusive fibras nerviosas periféricas de naturaleza sensorial o motora (axonogénesis tumoral) <sup>10-12</sup>. Además, los factores derivados de tumores, por su distribución sistémica, también pueden reclutar células alejadas como diversas poblaciones derivadas de la médula ósea <sup>16</sup>.



**Figura 1. Comunicación de las células tumorales con diferentes células.** Las células tumorales generan y mantienen comunicación oncogénica con diferentes tipos celulares, tales como células estromales (fibroblastos y células endoteliales), células del sistema inmunológico, células derivadas de la médula ósea e incluso neuronas con funciones autonómicas o sensoriales (Cervantes-Villagrana y cols., manuscrito en preparación).

## 6.2 Neovascularización tumoral

### 6.2.1 Reclutamiento de células endoteliales y células progenitoras para la formación de nueva vasculatura

La **neovascularización** (neogénesis vascular) o formación de nuevos vasos sanguíneos es un proceso indispensable para el crecimiento de tumores primarios y diseminación de metástasis. La

neovascularización tumoral ocurre de manera coordinada a través de la ramificación de los vasos adyacentes al tumor y de la incorporación de células precursoras que se desplazan desde la médula ósea y generan vasos sanguíneos al diferenciarse a células endoteliales, conocidas como **células progenitoras de endoteliales** (EPCs por sus siglas en inglés: Endothelial Progenitor Cells). Estos procesos son conocidos como angiogénesis y vasculogénesis, respectivamente, en referencia al origen distinto de las células que forman o dan origen a los nuevos capilares y comúnmente estos eventos son simultáneos <sup>3,17,18</sup>.

La **angiogénesis tumoral**, que consiste en la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la ramificación de los vasos preexistentes, ocurre por la proliferación y migración de células endoteliales de vasos sanguíneos adyacentes al tumor y también pericitos que intentan recubrir la vasculatura tortuosa que se genera en el tumor <sup>19-21</sup>. El proceso inicia a partir de la liberación de **mediadores pro-angiogénicos como VEGF, SDF-1, FGF, EGF, LPA**, entre otros, así como de exosomas provenientes de células tumorales y células del estroma tumoral <sup>3</sup>.

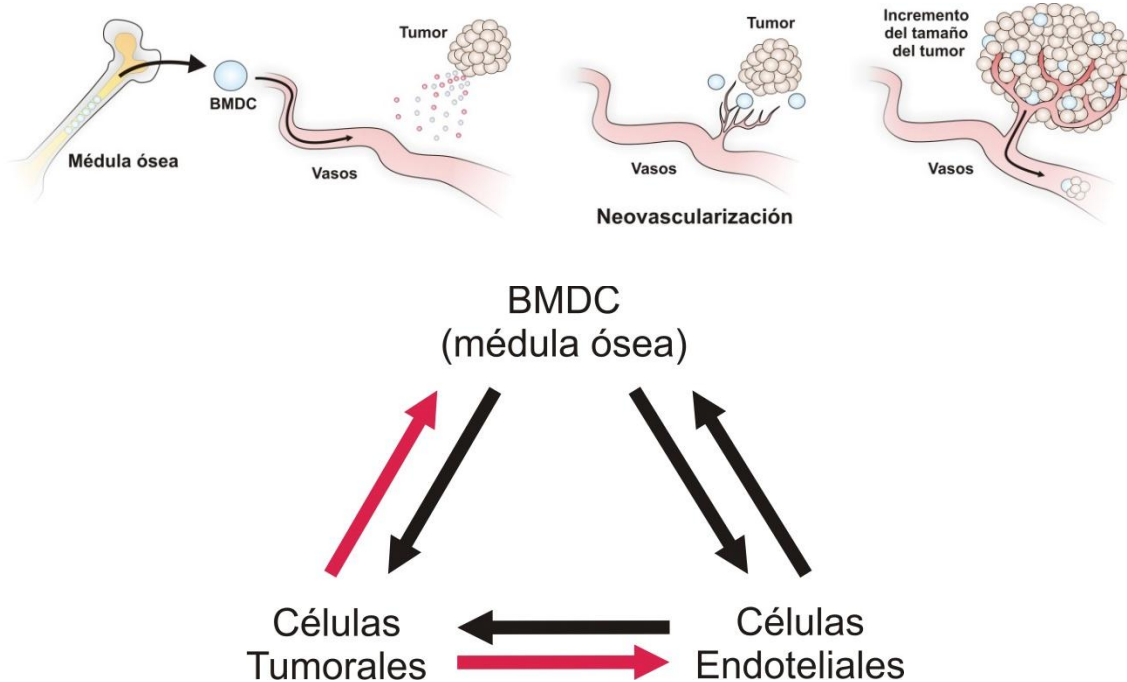
Por su parte, **la vasculogénesis** se define como la generación de nuevos vasos sanguíneos mediante el reclutamiento de células precursoras circulantes en la etapa postnatal o durante el desarrollo <sup>22</sup>. Inicialmente la vasculogénesis era considerada un proceso exclusivo de la etapa embrionaria dependiente de la migración y diferenciación de células precursoras positivas al receptor VEGFR-2 del mesodermo, denominadas como angioblastos y/o hemangioblastos <sup>23</sup>. Las células progenitoras vasculares incluyen a células progenitoras de endoteliales <sup>6</sup> y células progenitoras de pericitos (PPC) <sup>24</sup>. Adicionalmente, algunas poblaciones de células hematopoyéticas del tronco mieloide también pueden diferenciarse en una población similar a las células endoteliales y otras más que pueden participar en la angiogénesis como los macrófagos asociados a tumor, los monocitos Tie2+, hemangiocitos, entre otros. Actualmente, es un hecho establecido que **los tumores secretan sustancias proangiogénicas que reclutan a células derivadas de la médula ósea en respuesta a la estimulación de receptores acoplados a proteína G (GPCR, G protein-coupled receptor) y receptores acoplados a cinasas**. Estos promueven la migración celular desde la médula ósea hasta los tumores y futuros nichos metastásicos. El tumor produce y secreta factores como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, vascular endothelial growth factor) y el factor de crecimiento placentario (PIGF, placental growth factor) que movilizan a células progenitoras de endoteliales <sup>25</sup>, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, platelet-derived growth factor) que moviliza a

células progenitoras de pericitos, y el SDF-1 $\alpha$  que recluta y retiene a diversas poblaciones de células provenientes de la médula ósea dentro del tumor <sup>26-28</sup>.

Las EPC fueron descritas en 1997 por Asahara y cols., como una población de células circulantes CD34+ con marcadores endoteliales como CD31 y VEGFR2 <sup>6</sup>. Diversos marcadores membranales son utilizados como criterio para establecer y estudiar una población de EPC, pero hasta el momento no se ha identificado un marcador exclusivo para este tipo celular. El criterio comúnmente utilizado para asumir que una población de células de la médula ósea son EPC es la combinación de marcadores progenitores/troncales (Sca-1, c-kit o CD34) y marcadores endoteliales (acLDL, CD31, VE-cadherin, Tie2 o VEGFR2), en poblaciones celulares con expresión baja o nula de marcadores leucocitarios como CD11b o CD45 <sup>6,29</sup>.

### 6.3 Migración y contribución de células derivadas de la médula ósea (BMDC) en el desarrollo de tumores y metástasis

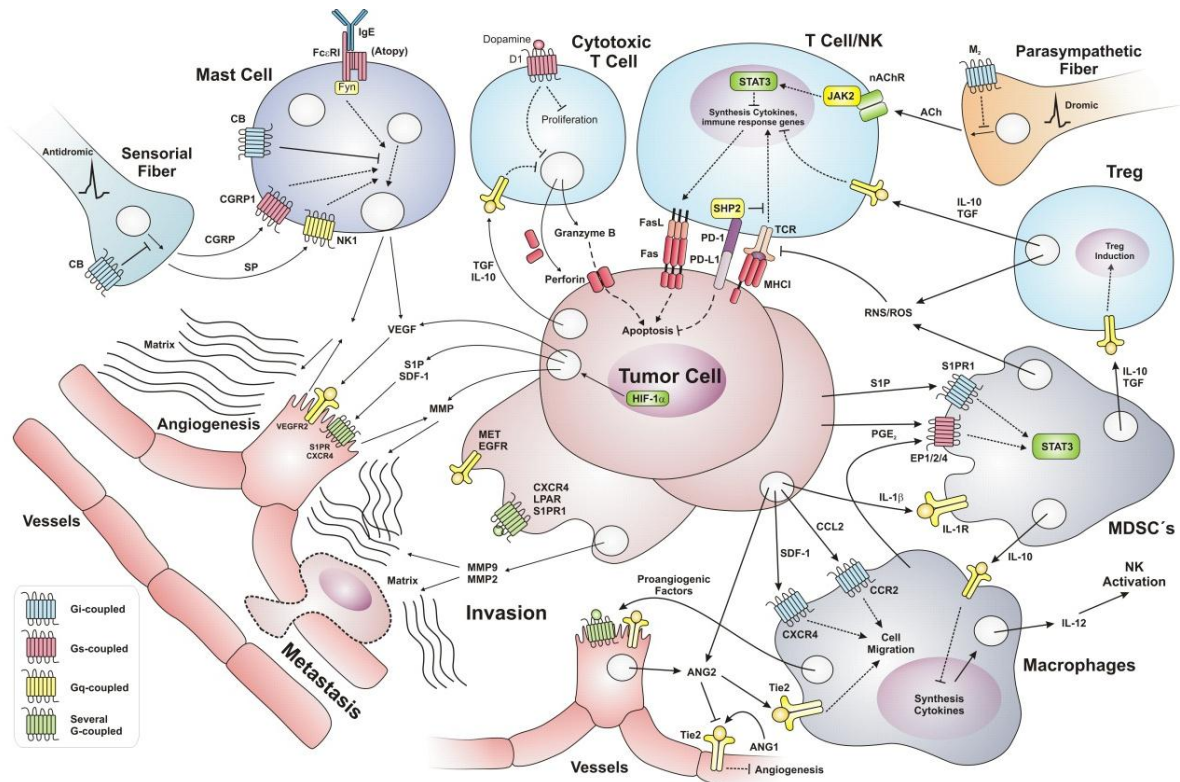
La médula ósea contiene poblaciones celulares que favorecen el desarrollo de tumores. Un tumor incorpora a su estroma a diversos tipos celulares que en conjunto favorecen el proceso oncogénico. En este proceso, la comunicación entre poblaciones celulares puede ocurrir a distancia a través de la secreción de factores que atraen poblaciones **celulares derivadas de la médula ósea (BMDC** por sus siglas en inglés: **Bone Marrow-Derived Cells**). Una vez incorporadas al estroma tumoral, estas células favorecen la proliferación y diseminación de las células tumorales, así como el crecimiento de vasos sanguíneos asociados a los tumores (Figura 2, panel superior) <sup>30,31</sup>. El papel que tienen las células de la médula ósea como promotores del crecimiento tumoral y metástasis, ha sido motivo de estudios de frontera que han llevado a la identificación de diversas poblaciones celulares que tienen una participación inequívoca en el proceso oncogénico. Las células pro-tumorales que derivan de la médula ósea incluyen células progenitoras endoteliales y células del sistema inmune como monocitos pro-angiogénicos y leucocitos (Figura 3). Tales poblaciones celulares derivadas de la médula ósea, han sido reconocidas por su capacidad para preparar el microambiente en el que se establecerán las células tumorales provenientes del tumor primario para formar nichos metastásicos <sup>32</sup>. Las células hematopoyéticas pro-angiogénicas se originan de la médula ósea y participan activamente en la neovascularización tumoral, por definición estas células no formarán parte de la pared del vaso, pero liberarán sustancias pro-angiogénicas localizadas en el microambiente de las células endoteliales para favorecer la formación y maduración de los vasos sanguíneos (Figura 2, panel inferior).



**Figura 2. Quimio-atracción de células derivadas de la médula ósea al estroma tumoral.** En el cáncer, las células tumorales secretan sustancias que difunden a la circulación sistémica hasta la médula ósea donde diferentes poblaciones celulares con capacidad de responder son movilizadas fuera de la médula ósea y se trasladan hasta el tumor al que fueron atraídas para colonizar y contribuir al enriquecimiento del microambiente y el crecimiento del tumor. De esta manera, se establece la comunicación recíproca entre células tumorales, células derivadas de la médula ósea y células endoteliales (Cervantes-Villagrana y cols., manuscrito en preparación).

Comprender a nivel molecular los mecanismos que determinan la respuesta de las células derivadas de la médula ósea a factores de origen tumoral, constituye una etapa necesaria en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas orientadas a interferir con este proceso para evitar el crecimiento tumoral y particularmente el establecimiento de metástasis que, como se sabe, son la principal causa de muerte en sujetos con padecimientos oncológicos. Además, se vislumbra el potencial aprovechamiento de estas poblaciones celulares como vehículos de agentes anti-oncogénicos<sup>33,34</sup>, por su capacidad para desplazarse a sitios en los que se desarrollan metástasis, representan alternativas para combatir la diseminación del cáncer hacia sitios que por su ubicación son inaccesibles a estrategias quirúrgicas. Esta meta, que se vislumbra a largo plazo, requiere de acumular conocimiento sobre las bases moleculares responsables del proceso de reclutamiento de células de la médula ósea hacia el estroma tumoral y nichos metastásicos, y la comunicación recíproca que se establece entre las BMDC y las células tumorales (Figura 3).





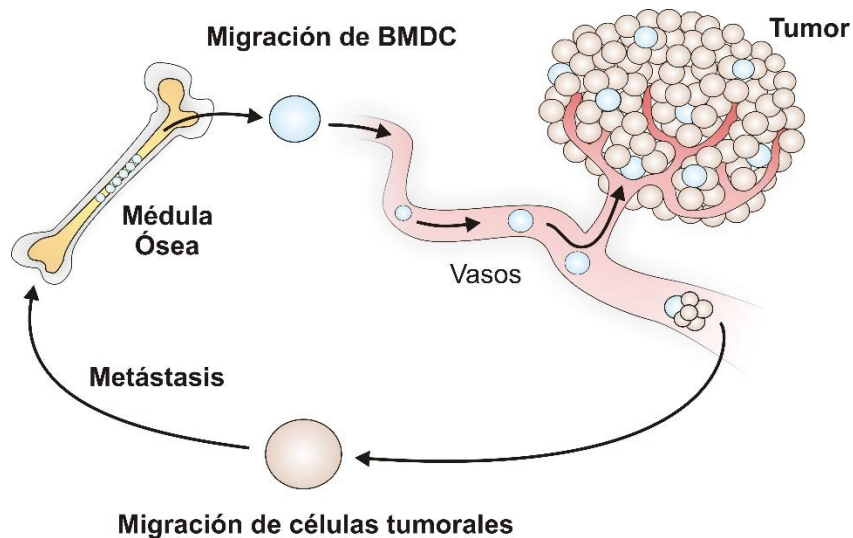
**Figura 3. Comunicación oncogénica entre células tumorales y células del entorno.** La migración celular, como parte de la respuesta funcional a la comunicación entre diferentes tipos celulares involucrados en el tumor, es un proceso relevante para la progresión del cáncer. Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) contribuyen en los diferentes procesos asociados al cáncer, en la migración celular son fundamentales para reclutar células protumorales, por ejemplo: células endoteliales, macrófagos y MDSCs; pero también para que las células tumorales puedan invadir tejidos adyacentes o establecerse en órganos distantes (*Cervantes-Villagrana y cols., manuscrito en preparación*).

### 6.4 Mecanismos de reclutamiento de BMDc a los tumores

Existen diversas poblaciones celulares incorporadas al estroma tumoral que mantienen la comunicación favoreciendo el microambiente permisivo para la proliferación y supervivencia de las células tumorales, entre ellas se encuentran los fibroblastos, células endoteliales, y células derivadas de la médula ósea (células progenitoras de endoteliales, MDSCs, macrófagos proangiogénicos, etc.), Figura 4. Esta organización multicelular que favorece el potencial oncogénico de células transformadas es establecida mediante la comunicación local y a distancia que depende del reconocimiento de sustancias secretadas por los diversos tipos celulares que constituyen al tumor en desarrollo. Entre ellas, destaca el poder quimiotáctico del factor derivado del estroma 1 (CXCL-12/SDF-1) y el poderoso efecto angiogénico del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF),



un agente contra el cual se han desarrollado terapias combinadas que incluyen el uso clínico de anticuerpos con poder antitumoral <sup>35-38</sup>.



**Figura 4. Migración de las células de la médula ósea hacia el tumor y diseminación de las células tumorales hacia el hueso.** Poblaciones de la médula ósea con características favorables para las células tumorales, son atraídas mediante la secreción de factores quimiotácticos y en sentido opuesto, células de la médula ósea pueden secretar factores para establecer un ambiente favorable para que se implanten células metastásicas (Cervantes-Villagrana y cols., manuscrito en preparación).

La quimiocina SDF-1 (*Stromal cell-Derived Factor-1*, SDF-1 o CXCL12) es considerada como una de las principales moléculas peptídicas encargada de promover la movilización y retención de células de la médula ósea que expresan a los receptores CXCR4 <sup>27,39,40</sup>, pero también induce la migración de células tumorales para metastatizar al hueso, por ejemplo <sup>41,42</sup>, circuito de la Figura 4. El antagonista del receptor CXCR4, conocido como plexafor o AMD3100, promueve la movilización de las células de la médula ósea CXCR4+ y VEGFR1+ en el transcurso de pocas horas, cuando se aplica de forma aguda. En contraste, el tratamiento crónico inhibe posteriormente la movilización <sup>43</sup>. Gradientes de hipoxia en tejido lesionado inducen la expresión de la quimiocina SDF-1 en células endoteliales para promover el tráfico de células progenitoras de la médula ósea <sup>40</sup>. El reclutamiento de células a través de la activación de receptores a quimiocinas como el CXCR4, activado por CXCL12/SDF-1, es relevante también en la reparación de tumores previamente tratados <sup>44,45</sup>. La recurrencia de algunos tumores que lamentablemente ocurre posterior al tratamiento es consecuencia de una terapia antitumoral ineficiente.

En el glioblastoma multiforme (GBM) existe recurrencia en el crecimiento de tumores posterior al tratamiento con radiación focalizada. Inicialmente el tumor es reducido, sin embargo, en poco tiempo vuelve a crecer. En pacientes y modelos animales de GBM se ha determinado la ausencia de células provenientes de la médula ósea en el tumor primario, mientras que después del tratamiento con radiación, en aquellos pacientes con recurrencia del tumor se detecta infiltración de células CD11b+. Por lo anterior, se propone que las células provenientes de la médula ósea que ingresan al microambiente del tumor irradiado favorecen su recurrencia. En tal caso, si se evita el ingreso de estas células el tumor deja de crecer y sufre una regresión importante. La activación del CXCR4 por SDF-1 induce el reclutamiento de células Tie2+/CD11b+ y macrófagos (F4/80). Durante el tratamiento, la radiación focalizada induce hipoxia en el tumor con la subsecuente activación del factor inducible por hipoxia (HIF-1), probablemente por la destrucción de células endoteliales y disminución de la perfusión del tumor. La activación de HIF-1 promueve la expresión de SDF-1, en tanto que el tratamiento con un inhibidor de HIF-1 (NSC134754) previene la producción de SDF-1 y el reclutamiento de macrófagos <sup>46</sup>.

Los mecanismos mediante los cuales las células del estroma tumoral favorecen el desarrollo de tumores coinciden en sus diversas capacidades para secretar quimiocinas, citocinas, factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular <sup>47</sup>. La regulación recíproca que se genera una vez que las BMDC se han infiltrado al estroma tumoral o bien alcanzan los potenciales nichos metastásicos depende de la capacidad secretora de estas células. El receptor para fibronectina  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4, integrina) es importante para que las células progenitoras (CD34+) derivadas de la médula ósea lleguen a los tumores y contribuyan a la neovascularización una vez que se diferencian a células endoteliales, células hematopoyéticas o fibroblastos. Los linfocitos expresan al receptor de fibronectina  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4) y es responsable de la adhesión a VCAM de células endoteliales para la extravasación en tejidos inflamados <sup>48</sup>; pero además se expresa en células progenitoras circulantes derivadas de la médula ósea y éstas pueden integrarse a los tumores mediante el reconocimiento de endotelios adhesivos por VCAM, una vez extravasada la célula progenitora, puede diferenciarse en células hematopoyéticas o endoteliales para contribuir al crecimiento del tumor. Algunos estudios señalan que las células progenitoras derivadas de la médula ósea pueden contribuir al 16% de la vasculatura tumoral <sup>49</sup>.

Las terapias anti-angiogénicas inducen hipoxia en el tumor; sin embargo, esto eventualmente da lugar a la producción masiva de sustancias pro-angiogénicas como el SDF-1 que recluta a

poblaciones heterogéneas de la médula ósea con capacidad pro-angiogénica. La refractariedad de los tumores inicia vías alternativas de angiogénesis y quizá la movilización de células progenitoras derivadas de la médula ósea para disparar la vasculogénesis <sup>50</sup>.

## 6.5 Monocitos y macrófagos Tie2+ como células pro-tumorales derivadas de la médula ósea

Los monocitos son reclutados al entorno tumoral donde contribuyen a la proliferación y metástasis de las células tumorales y a la vascularización de los tumores, algunas de estas poblaciones celulares son los monocitos-Tie2+ (Tie2-expressing monocyte, TEMs) y los macrófagos asociados a tumor (Tumor-associated macrophages, TAMs) que pueden o no ser Tie2+. Estas células son reclutadas a los tumores por estímulos quimiotácticos como el SDF-1 y el CCL2. Las células que expresan el receptor Tie2 en tumores, comprenden tres poblaciones celulares: células endoteliales, células progenitoras hematopoyéticas y progenitoras de pericitos <sup>5</sup>. La angiopoyetina-1 (Ang-1) mantiene estable la vasculatura sanguínea mientras que angiopoyetina-2 antagoniza a la Ang-1, desestabilizando a las células endoteliales para promover la angiogénesis, Ang-2 participa en la angiogénesis tumoral y su inhibición disminuye la vasculatura tumoral y la infiltración de células proangiogénicas Tie2+CD11b+, además potencia el efecto de fármacos quimioterapéuticos convencionales <sup>51</sup>.

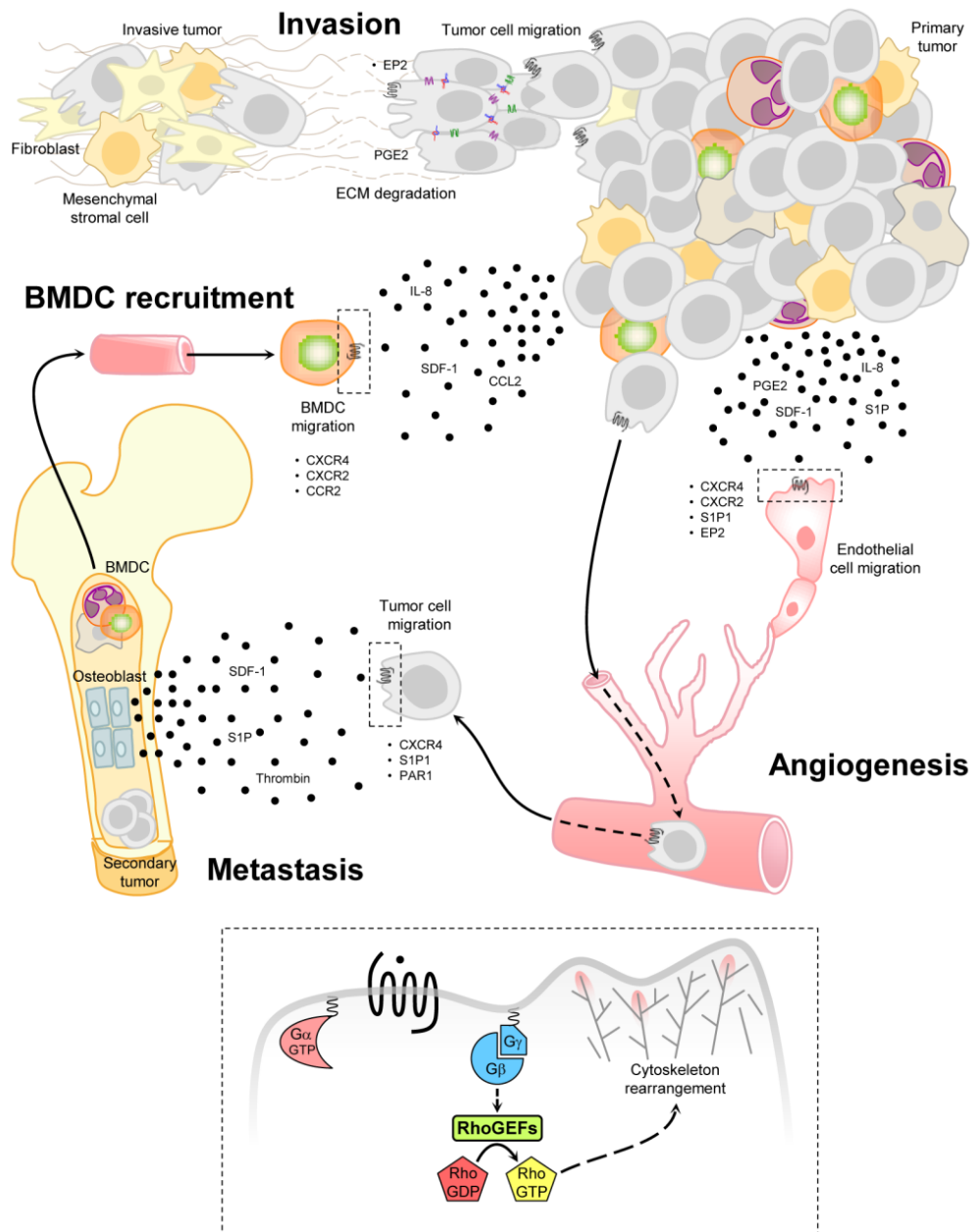
La angiogénesis es un blanco terapéutico contra el cáncer, las estrategias han sido dirigidas contra el VEGF y su vía de señalización, anti-angiogénicos como bevacizumab (anticuerpo anti-VEGF), sunitinib y sorafenib (inhibidores de la actividad catalítica del receptor). La resistencia de los tumores a los tratamientos anti-angiogénicos con bevacizumab se relaciona claramente al reclutamiento de macrófagos asociados a tumor <sup>52</sup>. El sistema de angiopoyetina-Tie consiste en dos tipos de receptores tirosina cinasa (Tie1 y Tie2) y tres ligandos secretados (Ang-1, Ang-2 y Ang-4). La Ang-2 es producida por células endoteliales activadas. El ligando de Tie2, angiopoyetina-2 es considerado una promesa como blanco terapéutico de segunda generación, el desarrollo de fármacos antiangiogénicos puede ser combinado con terapias anti-VEGF/VEGFR <sup>53</sup>. Los macrófagos M2 son reclutados por células iniciadoras de tumores para suprimir a las células inmunológicas antitumorales, promoviendo la proliferación y estimulando la angiogénesis. La activación de la vía de Hippo y YAP en las células tumorales, lleva a la secreción de citocinas responsables de atraer a los macrófagos M2 <sup>54</sup>.

## 6.6 Participación de receptores acoplados a Gi en la migración celular polarizada

Las células tumorales secretan factores que atraen a células endoteliales de los vasos sanguíneos adyacentes y a células de la médula ósea. Ligandos como SDF-1, IL-8 (interleucina 8), S1P (esfingosina-1-fosfato), PGE<sub>2</sub> (prostaglandina E<sub>2</sub>), entre otros; promueven la angiogénesis tumoral. Tanto células tumorales, como endoteliales y de la médula ósea pueden migrar en respuesta a ligandos quimiotácticos que activan a receptores acoplados a proteínas G. Entre los GPCRs que contribuyen a la migración asociada al cáncer destacan receptores para quimiocinas, entre ellos el CXCR4, CXCR2 y CCR2; y receptores para agonistas derivados de lípidos, como los receptores para esfingosina-1-fosfato (S1PR), para ácido lisofosfatídico (LPA) y para PGE<sub>2</sub> (EP<sub>2</sub>). En la Figura 5 se muestra el mecanismo fisiopatológico en el desarrollo del cáncer, con énfasis en la contribución de GPCRs en la comunicación entre diferentes células involucradas en la progresión de los tumores. Los GPCRs quimiotácticos desencadenan cascadas de transducción de señales que promueven el movimiento celular polarizado, controlan la localización y activación polarizada de proteínas relacionadas a la activación de GTPasas de la familia de Rho, la polimerización de actina y el movimiento celular <sup>4,55</sup>.

Los GPCRs de ligandos quimiotácticos comúnmente activan a proteínas G de la familia de Gi. La migración celular, en estos casos, involucra particularmente al heterodímero Gβγ <sup>56,57</sup>, liberado de las proteínas G, como un transductor fundamental para activar efectores que promueven el movimiento celular mediante cambios del citoesqueleto. Entre los efectores regulados por Gβγ se encuentran algunos RhoGEFs que cuya función es promover el intercambio de GDP por GTP en las RhoGTPasas. A su vez, éstas actúan sobre proteínas encargadas de remodelar el citoesqueleto de actina. De esta manera, se generan las fuerzas necesarias dentro de la célula para empujar mediante la polimerización de actina y el ensamble de fibras necesarias para la contracción celular en dirección del ligando quimioatrayente que actúa sobre el GPCR <sup>58-60</sup>; por ejemplo, el SDF-1 sobre su receptor CXCR4. Las estructuras del citoesqueleto se forman en función de la GTPasa que es estimulada. En el caso de la RhoGTPasa Cdc42, ésta promueve la formación de estructuras celulares conocidas como filopodios, que son extensiones muy finas de la célula que se extienden en el frente de la célula en movimiento, son capaces de explorar el entorno y detectar el estímulo quimioatrayente para guiar a la célula en dirección del estímulo atrayente. La RhoGTPasa Rac promueve la generación de

estructuras conocidas como lamelipodios, con forma de “ruffles”, que simulan olas en el frente celular y son requeridas para la migración <sup>61,62</sup>.



**Figura 5. Contribución de GPCRs en la migración celular asociada a procesos oncogénicos.** Las células tumorales migran en respuesta a ligandos presentes en el microambiente tumoral. Por ejemplo, la prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) activa a receptores  $EP_2$  en células tumorales para que invadan el tejido adyacente. Otras células cómplices de las células tumorales son reclutadas y manipuladas, en parte por la activación de GPCRs. Células derivadas de la medula ósea (BMDC, *bone marrow-derived cell*) y células endoteliales pueden migrar en respuesta a la activación de GPCRs, como  $CXCR4$  y  $CXCR2$ , presentes en la superficie celular. Tomada de Vázquez-Prado y cols., 2016 <sup>4</sup>.

## 6.7 GPCRs en la progresión de tumores y metástasis: Contribución de receptores quimiotácticos

Los receptores acoplados a proteína G o GPCRs, son receptores con 7 pases transmembranales y de los cuales existen cerca de 1000 miembros; generalmente monoméricos funcionales que activan principalmente a proteínas G compuestas por tres subunidades:  $G\alpha$ ,  $G\beta$  y  $G\gamma$  <sup>63–66</sup>. Las proteínas G heterotriméricas son diversas ya que existen distintas subunidades de cada una de ellas, generando distintas combinaciones. Con base a la identidad de la subunidad  $G\alpha$ , se conocen cuatro principales clases de proteínas G heterotriméricas:  $G_s$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_{q/11}$  y  $G_{12/13}$  (con vías de señalización bien diferenciadas entre ellas <sup>67–69</sup>, algunas consideradas clásicas y que son mostradas en la Figura 6). Además, esfuerzos de muchos grupos de investigación han ampliado el conocimiento de las vías de señalización de estas proteínas G sumando el descubrimiento de nuevos efectores, alcanzando gran complejidad y especificidad.

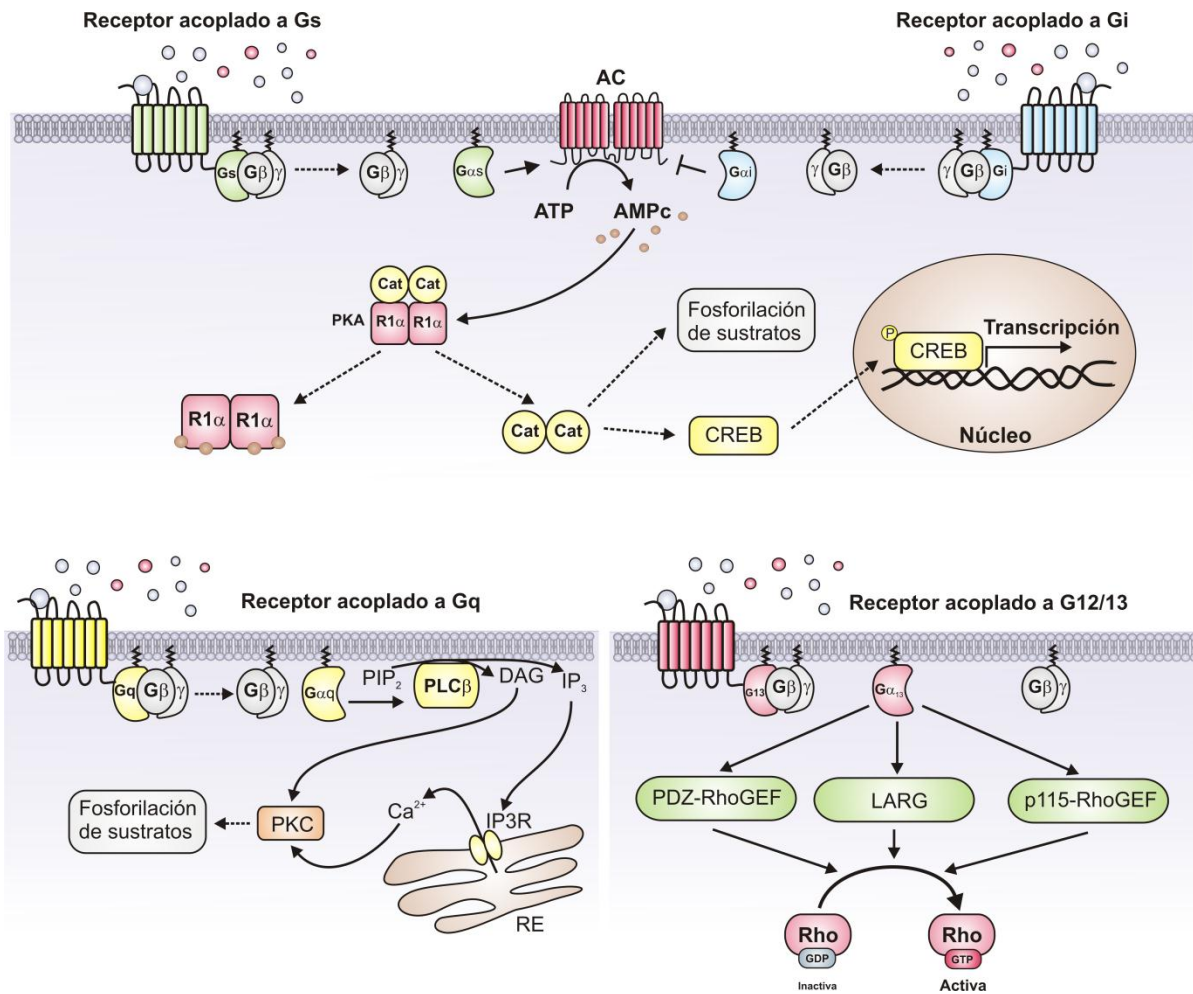
### 6.7.1 Vías de señalización clásicas de los GPCRs: Señalización de $G\beta\gamma$ en el contexto de la migración celular

Los GPCRs representan una superfamilia de múltiples receptores divididos en varios subgrupos. Un gran reto para la investigación es aclarar los mecanismos que llevan a su activación y acoplamiento, tanto a las vías clásicas de las proteínas G como a vías no clásicas, con relevancia creciente. Adicionalmente, diversos GPCRs tienen la capacidad de activar a diferentes familias de proteínas G por lo que hipotéticamente podrían activar señalizaciones antagónicas (Figura 7, diagrama de Venn que agrupa a los GPCRs según las proteínas G que puede activar). Esta diversidad de posibilidades hace que los efectos de los GPCRs sean funcionalmente complejos, resultando evidente que deben existir mecanismos de integración que expliquen sus efectos fisiológicos y patológicos.

Los agonistas inducen cambios conformacionales en los receptores constituidos por 7 segmentos transmembranales unidos por tres asas a cada lado de la membrana, de forma tal que éstos exponen sitios de las asas intracelulares y el extremo carboxilo para unir con alta afinidad a las proteínas G correspondientes <sup>66,69–71</sup>. Esta unión favorece el intercambio de nucleótido de GDP por GTP en la subunidad  $G\alpha$  y la liberación del heterodímero  $G\beta\gamma$ . Por lo tanto, según el modelo clásico, la activación de cualquier proteína G lleva a la disociación de la subunidad  $G\alpha$ -GTP y el dímero  $G\beta\gamma$ , resultando en estados activos que puede asociarse con sus efectores correspondientes, estimulándolos. Sin embargo, diversos grupos reportaron que la migración inducida por GPCRs es

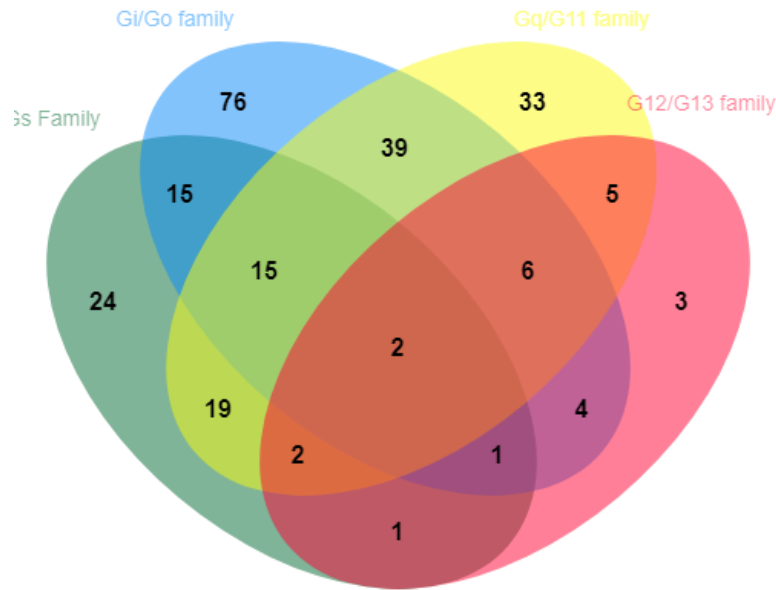


dependiente la señalización del dímero  $G\beta\gamma$  derivado de  $G_i$ , pero no de otros heterotrímeros<sup>72,73</sup>. Los receptores para quimiocinas se acoplan, principalmente, a la proteína  $G_i$ . Aunque algunos muestran acoplamiento múltiple, sus acciones quimiotácticas generalmente son sensibles a toxina pertusis, lo que confirma el papel de  $G_i$  y no de otras proteínas G en la migración quimiotáctica.



**Figura 6. Vías de señalización clásicas de los receptores acoplados a las proteínas G representativas. A)** Vía de señalización de  $G_s$  y  $G_i$ . La activación de una proteína  $G_s$ , por un GPCR, ocurre por el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $G\alpha_s$ , promoviendo su separación de  $G\beta\gamma$ . Una vez libre, la subunidad  $G\alpha_s$ -GTP activa directamente a la enzima membranal adenilato ciclasa (AC), misma que produce AMPc a partir de ATP. El AMPc estimula a proteínas como la cinasa PKA mediante la unión de 4 moléculas de este segundo mensajero a las subunidades reguladoras. Esto conduce a la liberación de las dos subunidades catalíticas que fosforilan a diversos sustratos, entre ellos el factor de transcripción CREB, que como resultado se trasloca al núcleo y comienza la expresión de genes clave. Por el contrario,  $G\alpha_i$ -GTP inhibe al adenilato ciclasa. **B)** Señalización de  $G_q$ . La subunidad  $G\alpha_q$ -GTP activa directamente a la fosfolipasa C $\beta$  (PLC $\beta$ ) que hidroliza al fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP $_2$ ) para producir inositol-3,4,5-trifosfato (IP $_3$ ) y diacilglicerol (DAG). El IP $_3$  activa al receptor para IP $_3$  en el retículo endoplásmico, un canal que al abrirse permite la salida de  $Ca^{2+}$  al citosol y el DAG

producido y el incremento de calcio intracelular activan a cinasas como PKC. En el caso de G12/13, las subunidades G $\alpha$  de estos heterotrimeros activan directamente a GEFs para Rho que cuentan con un dominio homólogo a RGS. Cabe señalar que, si bien todos los heterotrimeros cuentan con G $\beta\gamma$ , la señalización por este heterodímero parece ser diferencial (Cervantes-Villagrana y cols., manuscrito en preparación).



**Figura 7. Diagrama de Venn del acoplamiento preferencial de los GPCRs a las 4 familias de proteínas G heterotrimericas.** La mayoría de los GPCRs tienen acoplamiento a Gi. De 245 receptores representados, 76 tienen acoplamiento exclusivo de Gi, 33 a Gq, 24 a Gs, y sólo 3 a G12/13. Acoplamiento a Gi en azul, para Gs en verde, Gq/11 en amarillo y G12/13 en rojo. Resulta evidente que muchos receptores se acoplan a múltiples proteínas G. Tomada de la base de datos en: gpcrdb.org.

La migración de células de la médula ósea y células tumorales puede desencadenarse mediante la señalización de receptores a quimiocinas, estos GPCRs son acoplados de manera clásica a la proteína Gi; sin embargo, algunos de ellos pueden activar a otras proteínas G. Se considera que parte de la efectividad de estos GPCRs quimiotácticos se debe a la participación del heterodímero G $\beta\gamma$ <sup>4,56</sup>. La evidencia sugiere que la activación de sus efectores, como PI3K $\beta$ , PI3K $\gamma$  y P-Rex1, es fundamental para la migración celular inducida por GPCRs quimiotácticos<sup>4</sup>.

La quimiocina SDF-1/CXCL12 tiene efectos oncogénicos activando a receptores CXCR4 que señalizan vía proteínas G heterotrimericas, activando RhoGTPasas en eventos de migración y metástasis. Además, el bloqueo de esta quimiocina inhibe la vascularización tumoral y el desarrollo de tumores cerebrales. El SDF-1, a través del receptor CXCR4, es la principal molécula encargada de la



movilización de EPC desde la médula ósea. La sobreexpresión experimental del CXCR4 en EPC, mediante vectores virales, incrementa el reclutamiento y re-endotelización con EPC en arterias carótidas dañadas <sup>74</sup>. La señalización del CXCR4 controla la retención y migración de células de la médula ósea. De hecho, antagonistas de CXCR4 disminuyen el crecimiento de tumores en ratones BALB/c desnudos, inoculados con células tumorales (vía subcutánea con 8 millones de células Colon38 o bien, Panco2); mediante inhibición de la angiogénesis independiente de VEGF <sup>75</sup>. También está demostrado que los receptores CXCR4 estimulan a la GTPasa Rac, con la intervención del GEF P-Rex1, en células endoteliales que migran y forman cordones endoteliales *in vitro* como consecuencia de la activación de esta vía <sup>76</sup>.

### 6.7.2 Señalización de Gβγ en migración celular

El heterodímero Gβγ juega un papel fundamental en la migración celular quimiotáctica estimulada por receptores acoplados a proteínas Gi <sup>56,57</sup>. Esto fue inicialmente establecido mediante el uso de inhibidores que compiten en la unión de Gβγ con sus efectores, tales como construcciones derivadas del carboxilo terminal de la cinasa GRK2 <sup>77</sup>, así como por la sobreexpresión de Gα que captura al heterodímero. Gβγ activa a efectores involucrados en la migración celular, como RhoGEFs y a PI3Kβ/γ <sup>78,79</sup>, la cual fosforila lípidos para producir en la cara interna de la membrana plasmática a PIP<sub>3</sub>, un segundo mensajero reconocido por proteínas involucradas en la migración celular que son reclutadas de manera polarizada a la membrana.

En el caso de neoplasias, además de mutaciones que han sido detectadas en las subunidades Gα (presentes en el 4-5 % de todos los cánceres humanos) <sup>80</sup>, destacan estudios en los que se han detectado mutaciones en Gβ cuya expresión correlaciona con la activación de vías celulares asociadas al cáncer. Al ubicar tales mutaciones en la estructura tridimensional de Gβ se encontró que se localizan en la interfaz que regularmente reconoce a la α-hélice de la primera sección del dominio de GTPasa de la subunidad Gα (GNB1 K89E). **Las mutaciones GNB1 K89E, I80T, K57E disminuyen la unión con Gα<sub>i2</sub>, Gα<sub>i3</sub>, Gα<sub>q/11</sub> y Gα<sub>13</sub>** y promueven la transformación maligna de las células y la resistencia farmacológica a inhibidores de cinasas <sup>81</sup>. Estas evidencias sugieren que la asociación que Gβγ establece con la región amino de Gα es fundamental para mantener el control en la señalización de este heterodímero y permiten sugerir que una alteración en esta interfase conduce a un fenotipo exacerbado.

La generación de segundos mensajeros lipídicos por la PI3K (*Phosphoinositide-3-kinase*) está intrínsecamente asociada a la activación de RhoGEFs. Para el caso de P-Rex1, existe una correlación directa de la vía. En mieloma múltiple, por ejemplo, tanto la PI3K como la cinasa AKT están sobreexpresadas. En este caso, el tratamiento con un inhibidor de la PI3K $\delta/\gamma$ , bloquea la migración inducida por SDF-1, el crecimiento de los tumores y aumenta la supervivencia en modelos murinos (células U266) <sup>82</sup>.

## 6.8 Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina de GTPasas de Rho (RhoGEFs) y las RhoGTPasas como efectores quimiotácticos

Los tumores secretan factores que estimulan a receptores con actividad de cinasa de tirosina (receptores para factores de crecimiento como el VEGF, EGF y HGF), así como a receptores acoplados a proteínas G (por ejemplo, los receptores CXCR4 y CCR2). Todos estos receptores generan cascadas de transducción de señales que activan mecanismos de movimiento celular, fundamentales en la participación de células de la médula ósea en el desarrollo de tumores y metástasis.

**Las RhoGTPasas como Rac, Rho, Cdc42 y RhoJ**, son miembros de la superfamilia de GTPasas pequeñas representada por Ras (150 GTPasas conforman la superfamilia en humanos y son clasificadas en 5 subgrupos: Ras, Ran, Rho, Rab y Arf). En el caso particular de la familia de Rho, existen 20 RhoGTPasas y contribuyen en la dinámica del citoesqueleto para proveer adhesión, polaridad y movilidad celular en dirección a un estímulo quimioatrayente <sup>83-85</sup>. En estado inactivo, las RhoGTPasas se encuentran unidas a GDP. Pasan a un estado activo cuando intercambian el GDP por GTP, para reconocer a sus proteínas efectoras (Ver Figura 8). Para ser activadas, las RhoGTPasas requieren estar ancladas a la cara interna de la membrana plasmática; esto lo hacen mediante una modificación pos-traduccional en su extremo carboxilo, en el que tienen una isoprenilación que les permite contar con una pequeña extensión hidrofóbica para insertarse en la membrana fosfolipídica <sup>86</sup>. La actividad de las RhoGTPasas es modulada por 3 tipos de proteínas principales que responden a señales transducidas por receptores membranales: los RhoGEFs, RhoGAPs y RhoGDIs (Figura 8).

Los **RhoGEFs** o factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (*Rho-Guanine Nucleotide Exchange Factors*), son proteínas que, como su nombre lo dice, favorecen el intercambio de nucleótido de GDP a GTP en la GTPasa, conduciendo al estado activo que estimula a los efectores

correspondientes <sup>87-89</sup>. Es decir, los RhoGEFs encienden el switch constituido por la GTPasa para el reordenamiento del citoesqueleto de actina. Existen alrededor de 80 RhoGEFs de la familia Dbl (tienen el dominio DH con la función de activar a las RhoGTPasas) <sup>90</sup>. Además, existe otra familia de RhoGEFs de la familia DOCK y esta conformada por 11 miembros, tienen una región de homología a DOCK (DHR2, DOCK-homology region 2) con la función de activar a la GTPasa, y un dominio DHR1 que interacciona con fosfolípidos para localizarse en membrana plasmática <sup>91</sup>.

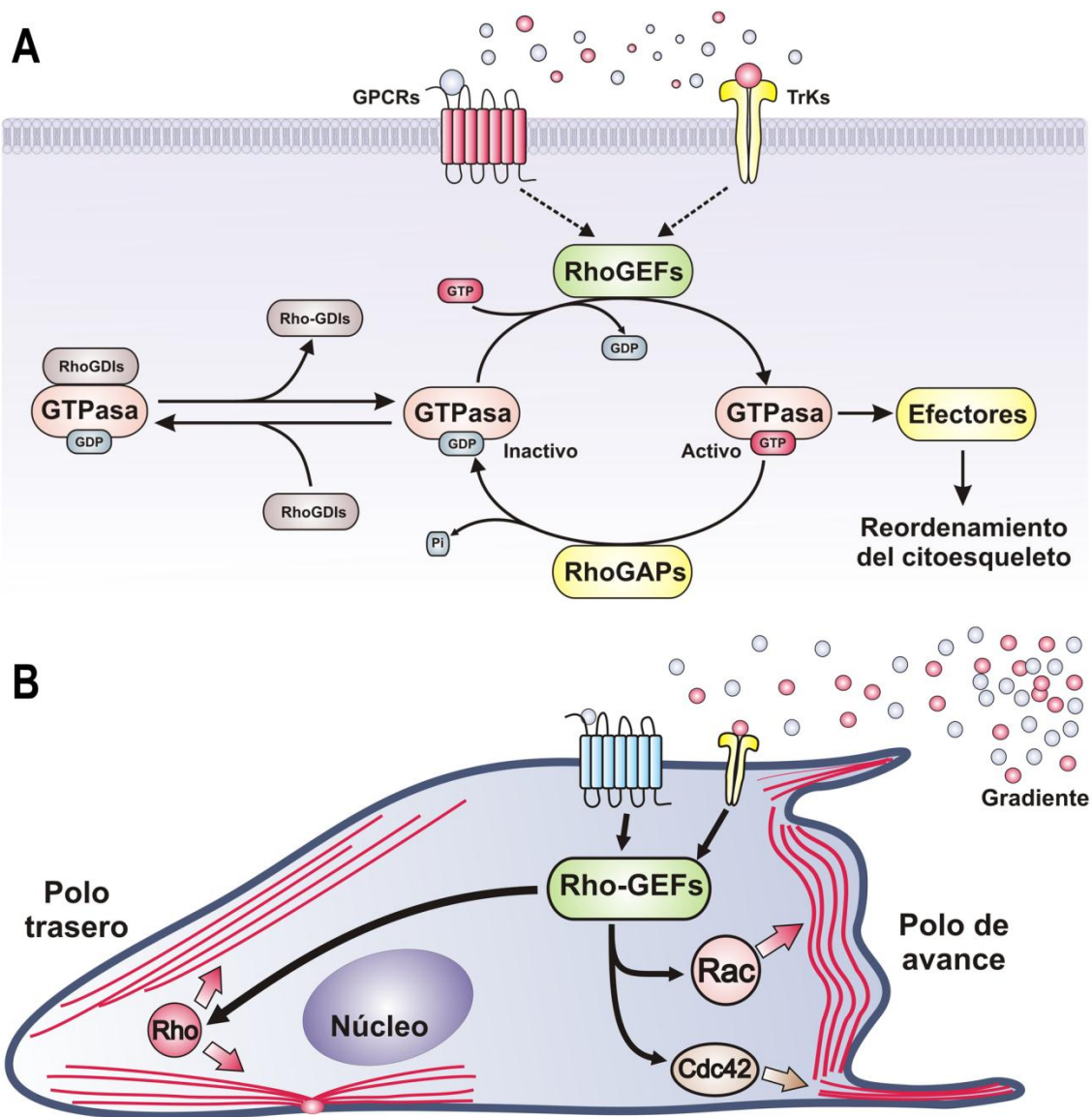
Los **RhoGAPs** son proteínas que estimulan la actividad GTPasa (*Rho-GTPase-Activating Proteins*). En contraste con los RhoGEFs, los RhoGAPs favorecen el estado inactivo de la RhoGTPasa. Específicamente, los RhoGAP promueven que las GTPasas, como switches moleculares, se apaguen al contribuir a que éstas hidrolicen al GTP, dejando en un estado con GDP + fosfato inorgánico (Pi) que eventualmente se disocia <sup>62,92</sup>. Existen alrededor de 70 RhoGAPs <sup>92</sup>.

Finalmente, los **RhoGDIs** (*Rho-specific guanine nucleotide dissociation inhibitor*) son proteínas que secuestran en el citosol a las RhoGTPasas en un estado unido GDP, ocultando la isoprenilación de la RhoGTPasa para evitar su localización en membranas fosfolipídicas y de esta manera evitan que puedan ser activadas por RhoGEFs en el plano interno de la membrana plasmática <sup>93-96</sup>. Únicamente existen tres RhoGDIs.

De manera clásica, las RhoGTPasas están localizadas en el polo de avance de células durante la migración polarizada (Figura 8B). Las GTPasas Cdc42 y Rac contribuyen a establecer la polaridad (particularmente Cdc42), respondiendo a los estímulos para proporcionar direccionalidad y avance frontal de la célula, mientras que en el polo trasero, o de arrastre, la GTPasa Rho orchestra la retracción mediante las fibras de estrés y contracción de los filamentos de actina por miosina, proporcionando el impulso necesario para empujar el movimiento celular desde atrás <sup>97</sup>.

En fechas más recientes, la GTPasa RhoJ ha despertado interés en el campo de la angiogénesis y en particular en la angiogénesis tumoral. Esta GTPasa pequeña se ha encontrado expresada principalmente en células endoteliales tumorales, donde da lugar a la formación de estructuras similares a filopodios, con una actividad parecida a la de Cdc42. En modelos experimentales, el knock down de RhoJ en células endoteliales disminuye el crecimiento de tumores de pulmón y mama. Además, una disminución en la expresión de RhoJ potencia los efectos citotóxicos de fármacos como el cisplatino y los efectos anti-angiogénicos de anticuerpos para VEGF y el

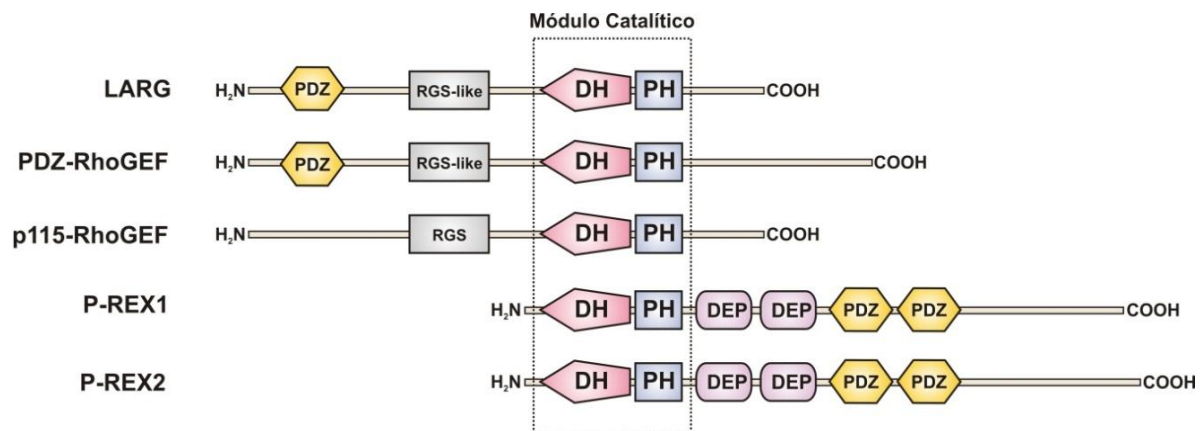
destructor de vasos combastatina 2-fosfato. En muestras de pacientes, la expresión alta de RhoJ correlaciona con metástasis. La inhibición de RhoJ en células endoteliales disminuye su migración y angiogénesis e incrementa la permeabilidad por incremento de la cascada de Rho <sup>98</sup>.



**Figura 8. Mecanismos de activación e inactivación de las RhoGTPasas.** A) Las RhoGTPasas son activadas en el plano interno de la membrana plasmática mediante el intercambiador de nucleótido de guanina (RhoGEF), esta proteína al ser activado su dominio catalítico DH, induce el intercambio de GDP por GTP en la GTPasa, generando la forma activa de la GTPasa en la cual puede activar a sus diferentes efectores. Las GTPasas unidas a GTP son inactivadas mediante la hidrólisis del GTP a GDP por proteínas activadoras de la GTPasa (RhoGAPs). Además, existen proteínas que pueden secuestrar a las GTPasas en el citoplasma, los RhoGDI que interaccionan con las GTPasas y atrapan la isoprenilación de

la GTPasa para internalizarla en el citosol, en un estado inactivo. **B)** Migración celular polarizada, las RhoGTPasas Cdc42 y Rac se localizan en el frente de la célula para inducir la polimerización de actina y formación de las estructuras como filopodios y lamelipodios, respectivamente; mientras que en el polo trasero de la célula se generan fibras de estrés para la retracción (Cervantes-Villagrana y cols., manuscrito en preparación).

Las RhoGTPasas, una vez activadas por los RhoGEFs, interactúan con sus efectores para llevar a efectos celulares particulares. Dentro de ellos, los cambios en el reordenamiento del citoesqueleto para la migración celular son efectos funcionales interesantes que estudiar por su papel implícito en los mecanismos que subyacen la historia natural del cáncer. En particular, el ciclo de activación de las GTPasas de la familia de Rho está intrínsecamente vinculado a procesos de reorganización del citoesqueleto que controlan ajustes en la forma celular y el movimiento quimiotáctico para la migración celular. Por lo tanto, los activadores directos de estas GTPasas, cuya diversidad se ubica en el orden de varias decenas de proteínas, codificadas en ~80 genes, están situados en puntos clave de las cascadas de transducción de señales que integran, de manera específica, una respuesta a estímulos derivados de tumores<sup>83,86,87</sup>. Por ejemplo, y dada su naturaleza estructural, caracterizada por la existencia de múltiples dominios, pueden servir como soporte para el establecimiento de complejos multi-proteicos que determinan la comunicación recíproca que enriquece el microambiente tumoral y favorece el establecimiento de metástasis.



**Figura 9. Dominios de los principales RhoGEFs activados por GPCRs: RGS-RhoGEFs y P-Rex1/2.** El grupo de los RGS-RhoGEFs está conformado por LARG (ARHGEF12), PDZ-RhoGEF (ARHGEF11) y p115-RhoGEF (ARHGEF1); todos ellos cuentan con un dominio homólogo a RGS (que es reconocido por el estado activo de las subunidades  $G\alpha_{12/13}$ ) adyacente al dominio catalítico DH; tanto LARG como PDZ-RhoGEF, tienen además un dominio PDZ en el extremo amino. El grupo de P-Rex1 está conformado por el P-Rex1 y P-Rex2, que además del módulo catalítico cuentan con dos dominios DEP y dos PDZ ubicados en tándem (Cervantes-Villagrana y cols., manuscrito en preparación).

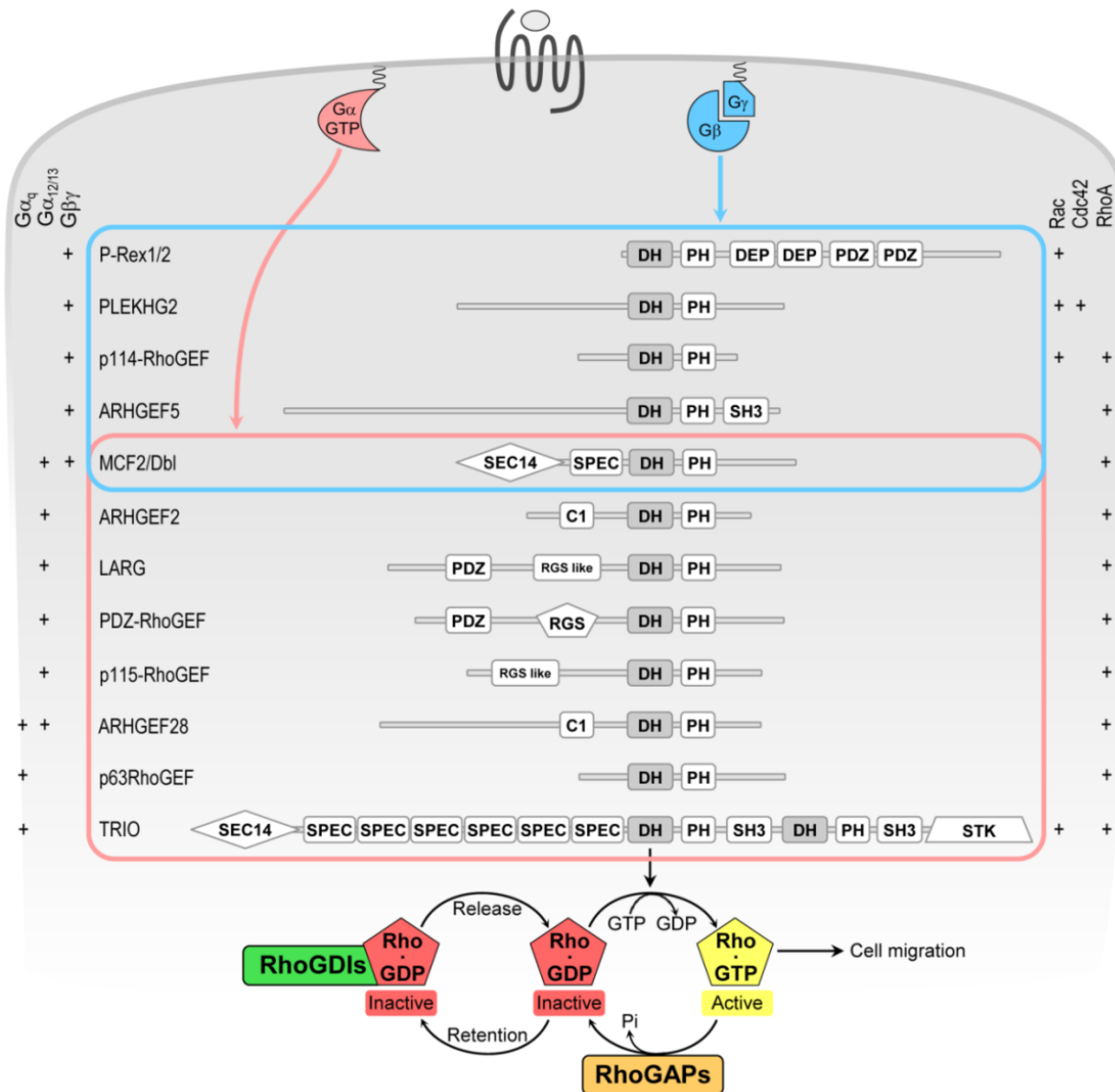
Los RhoGEFs son proteínas multi-dominio que integran cascadas de señalización de receptores membranales para activar selectivamente a una o varias GTPasas de la familia de Rho. Su acción catalítica se ubica en sus dominios intercambiadores de nucleótidos de guanina DH (*Dbl Homology*) y comúnmente incluye la intervención de un dominio PH (*Pleckstrin Homology*) adyacente. Además, los RhoGEFs difieren entre sí por una amplia variedad de dominios adicionales y por la especificidad del dominio DH que puede ser exclusivo o activar a varias GTPasas<sup>83,86</sup>. Tal diversidad estructural define la capacidad de integrar diversas vías de señalización. En un estado activo, los RhoGEFs se asocian a la cara citosólica de la membrana celular, comúnmente mediante la interacción del dominio PH con fosfoglicéridos membranales, donde llevan a la activación de GTPasas disponibles que se encuentran ancladas en la membrana<sup>86</sup>. Algunos ejemplos de RhoGEF se muestran en la Figura 9. Los RhoGEFs LARG, PDZ-RhoGEF y p115-RhoGEF, tienen el módulo catalítico (DH-PH) en el centro de la molécula, mientras que en los GEFs P-REX1 y 2, éste se encuentra en el extremo amino. Los dominios adyacentes al módulo catalítico regulan la activación e inhibición del GEF y pueden tener funciones independientes a las vías de RhoGTPasas, mecanismos que se encuentran en investigación.

Existen ~68 RhoGEFs codificados en el genoma de ratones y son expresados diferencialmente en los tejidos<sup>99</sup>. Identificar e inhibir aquellos RhoGEFs que activan a las RhoGTPasas indispensables para el movimiento polarizado en las células derivadas de la médula ósea hacia los tumores y nichos metastásicos, sería una estrategia terapéutica interesante.

### 6.8.1 RhoGEFs activados por GPCRs

Entre los DH-RhoGEFs existen algunos que son activados directamente por las proteínas G, algunos de ellos por la subunidad  $G\alpha$ , mientras que otros por el dímero  $G\beta\gamma$  (Figura 10). En su estado unido a GTP, la subunidad  $G\alpha_q$  activa a ARHGEF28, p63-RhoGEF y TRIO<sup>100-102</sup>; las subunidades  $G\alpha_{12/13}$  a LARG, PDZ-RhoGEF, p115-RhoGEF<sup>103-105</sup> (algunos grupos han propuesto que también a MCF2, ARHGEF2, y ARHGEF28, mismos que no cuentan con dominios homólogos a RGS). Por su parte, el dímero  $G\beta\gamma$  interacciona y activa a P-Rex1 y P-Rex2<sup>106,107</sup> (en este caso además se han mencionado a PLEKHG2, p114-RhoGEF, ARHGEF5 y MCF2 como posibles efectores. P-Rex1 y P-Rex2 son RacGEFs que además de  $G\beta\gamma$  responden al  $PIP_3$  (Figura 11), producido por  $PI3K\beta/\gamma$ , por lo que puede ocurrir una acción sinérgica en respuesta a  $G\beta\gamma$  y  $PIP_3$  o bien ser exclusivamente activados

por PIP<sub>3</sub> en el caso de cascadas que involucran a la PI3K, pero no a Gβγ, como las activadas por receptores del tipo de cinasas de tirosina que reconocen a factores de crecimiento.



**Figura 10. RhoGEFs reconocidos por proteínas G heterotriméricas.** Los RhoGEFs marcados en el recuadro azul establecen interacciones con el dímero Gβγ (P-Rex1/2, PLEKHG2, p114-RhoGEF, ARHGEF5, MCF2/Dbi), mientras que los RhoGEFs en el recuadro rojo son reconocidos por subunidades Gα<sub>q</sub> (ARHGEF28, p63-RhoGEF y TRIO) y Gα<sub>12/13</sub> (MCF2/Dbi, ARHGEF2, LARG, PDZ-RhoGEF, p115-RhoGEF y ARHGEF28). Las interacciones generalmente conducen a la activación, si bien no en todos los casos mostrados esto ha sido formalmente demostrado. Las subunidades de las proteínas G se encuentran señaladas en el lado izquierdo de la Figura mientras que las RhoGTPasas que son activadas por los RhoGEFs representados se encuentran a la derecha de la Figura. Tomada de Vázquez-Prado y cols., 2016 <sup>4</sup>.

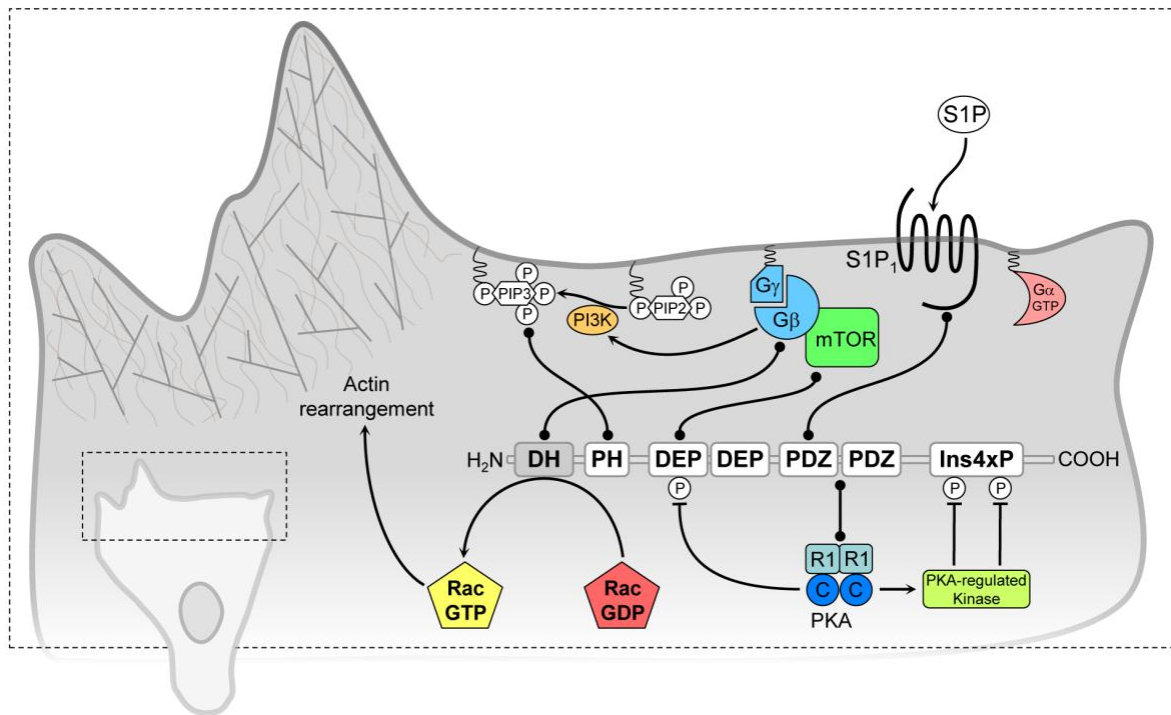


La investigación continua en determinar los mecanismos de activación de cerca el centenar de RhoGEFs que existe, dentro de los cuales seguramente se encontraran algunos más que puedan ser activados directamente por subunidades de las proteínas G y que resulten relevantes en el contexto de la migración celular asociada al cáncer, particularmente aquellos que sean activados por G $\beta\gamma$  que es responsable de la polaridad y migración celular.

### 6.8.2 El RacGEF P-Rex1, un efector quimiotáctico de G $\beta\gamma$ en la migración celular dependiente de GPCRs

La señalización del dímero G $\beta\gamma$  es responsable de la polarización y migración celular dependiente de GPCRs, particularmente su señalización es efectiva cuando proviene de Gi pero no parece ser relevante en otros heterotrimeros <sup>56,57,72</sup>. G $\beta\gamma$  tiene efectores quimiotácticos que contribuyen en la migración celular como las cinasas de fosfolípidos PI3K $\beta$  y PI3K $\gamma$  <sup>73,78,79</sup>, pero también activa al RacGEF P-Rex1 por tres diferentes mecanismos hasta ahora descritos (Figura 11). El primero consiste en la interacción directa de G $\beta\gamma$  libre con P-Rex1, particularmente se señala la interacción con el dominio DH para activar al GEF <sup>106</sup>. Simultáneamente, G $\beta\gamma$  libre puede interaccionar y activar a PI3K $\beta/\gamma$  para producir PIP<sub>3</sub> en la membrana plasmática donde el dominio PH de P-Rex1 (adyacente al dominio catalítico DH) se asocia para llevar a la activación máxima del GEF <sup>106,108,109</sup>. Por otra parte, un tercer mecanismo se explica porque G $\beta\gamma$  interacciona con mTOR para promover la activación del complejo de cinasa <sup>110</sup>, y se ha demostrado que el complejo de mTOR interacciona directamente con los dominios DEP-DEP de P-Rex1 llevando a la activación del GEF y a la migración celular <sup>111</sup>, el mecanismo de esta activación podría ser únicamente por la interacción o quizá la fosforilación de P-Rex1 por mTOR en un sitio hasta ahora desconocido. Los avances en la caracterización de las proteínas que interaccionan con P-Rex1 y la acumulación de información de la contribución de G $\beta\gamma$ , nos lleva a postular a **P-Rex1 como una proteína de andamiaje quimiotáctica** (chemotactic scaffold) que soporta la interacción de varias proteínas donde **G $\beta\gamma$  orquesta el ensamble de los elementos sobre P-Rex1 para generar vías de señalización eficientes** (por ejemplo, G $\beta\gamma$ /PI3K/AKT/P-Rex1/Rac, o bien, G $\beta\gamma$ /mTOR/AKT/P-Rex1/Rac) y muy relevantes en el contexto de la migración asociada al cáncer <sup>4</sup>. Sin duda, profundizar en las vías de señalización y la regulación molecular de proteínas responsables de la migración celular, es de particular interés para la comprensión de las bases moleculares de procesos fisiológicos y patológicos con una perspectiva a la búsqueda de blancos terapéuticos.





**Figura 11. Mecanismos de modulación de P-Rex1.** Múltiples evidencias señalan que P-Rex1 es necesario para que algunos tipos celulares puedan migrar eficientemente, como es el caso de células tumorales y células endoteliales. Esto ha llevado a pensar que el RacGEF P-Rex1 puede funcionar como una proteína de andamiaje quimiotáctica. Al ser una proteína multidominio, puede interactuar con diversas proteínas relacionadas a la polaridad y migración celular. A través del dominio DH, P-Rex1 activa a Rac para llevar a cambios del citoesqueleto para formar lamelipodios y que la célula pueda migrar. Diferentes proteínas que interaccionan con dominios adyacentes al DH modulan al GEF. El extremo carboxilo del receptor S1P<sub>1</sub> interactúa con los dominios PDZ-PDZ; la cinasa mTOR, particularmente el complejo 2, interactúa con los dominios DEP-DEP para promover la activación de P-Rex1. Pero los mecanismos más estudiados son vía PIP<sub>3</sub> y su interacción con el dominio PH, así como la interacción de Gβγ con el dominio DH. En contraste, la PKA puede fosforilar directamente el dominio DEP1 en la Ser436, o bien promover múltiples fosforilaciones, de manera indirecta, en el extremo carboxilo de P-Rex1 que favorecen interacciones intramoleculares inhibitorias. Tomada de Vázquez-Prado y cols., 2016<sup>4</sup>.



## 7. Justificación

En el cáncer, la comunicación y migración celular son procesos fundamentales para el crecimiento de tumores y su diseminación metastásica hacia órganos distantes. En dicho proceso, células derivadas de la médula ósea (BMDC) son reclutadas siguiendo el gradiente de factores secretados por células que conforman al tumor. Una vez incorporadas al microambiente tumoral, las BMDC contribuyen al proceso neoplásico. **La migración celular y angiogénesis requieren de la activación de cascadas de señalización, generadas por receptores de sustancias pro-angiogénicas, que conducen a la activación de RhoGEFs→RhoGTPasas dando lugar a la reorganización del citoesqueleto para generar un fenotipo móvil.** Estas GTPasas (~20 proteínas) son activadas por intercambiadores de nucleótido de guanina (RhoGEFs), de los cuales se conocen 62 codificados en el genoma del ratón expresados diferencialmente y activados en la señalización generada por receptores membranales. Actualmente **se desconocen los RhoGEFs que se expresan y que contribuyen a la migración de BMDC pro-tumorales inducida por factores pro-angiogénicos liberados de tumores.** Consideramos que algunos RhoGEFs, mismos que identificaremos durante el desarrollo de este proyecto, son fundamentales en la migración polarizada de BMDCs hacia los tumores, mediante la activación de RhoGEFs/GTPasas a través de receptores acoplados a proteínas  $G_i$ , principalmente. Por ello determinaremos cuáles RhoGEFs están expresados en BMDCs pro-tumorales, y en modelos celulares evaluaremos el mecanismo de regulación de una vía estimulada por SDF-1, un agonista fundamental para controlar la movilización de células de la médula ósea. Particularmente, siendo que este agonista es reconocido por receptores acoplados a proteínas  $G$ , el eje SDF-1/CXCR4/ $G_i$  podría conducir a migración celular vía  $G\beta\gamma$ /P-Rex1/Rac. Esto potencialmente estaría relacionado con el reclutamiento de BMDCs hacia el microambiente tumoral. Puesto que **la migración dependiente de GPCRs es comúnmente asociada a la activación de proteínas  $G_i$  y particularmente a  $G\beta\gamma$ ,** es de relevancia dilucidar por qué la señalización de  $G\beta\gamma$  es presumiblemente más eficiente si es liberada de una proteína  $G_i$  y no de otras como  $G_q$  o  $G_{13}$ , esto podría explicar la naturaleza de los receptores de quimiocinas (todos acoplados a  $G_i$ ), la migración dependiente de  $G_i$  cuando es inducida por GPCRs con acoplamiento múltiple ( $G_i$ ,  $G_q$ ,  $G_{13}$ , por ejemplo) y justificar la farmacología coadyuvante contra el cáncer enfocada en la inhibición de la vía de señalización de receptores acoplados a  $G_i$ → $G\beta\gamma$ /RhoGEFs/RhoGTPasas.



## 8. Hipótesis y Objetivos

---

### 8.1 Hipótesis

Una población seleccionada de células de la médula ósea exhibe una expresión diferencial de RhoGEFs fundamentales en la migración quimiotáctica inducida por quimiocinas del microambiente tumoral como el SDF-1 vía CXCR4/Gi.

### 8.2 Objetivo

Caracterizar a una **población pro-tumoral de la médula ósea** en términos de la **regulación recíproca** que sostiene con células tumorales y los **mecanismos moleculares relevantes para su migración**.

### 8.3 Objetivos Particulares

- Caracterizar una población de **células de la médula ósea** que contribuyen al desarrollo de tumores, con énfasis en la **comunicación recíproca** por activación de vías de señalización y migración celular.
- Caracterizar de forma comparativa la **expresión de RhoGEFs** en las células pro-tumorales derivadas de la médula ósea respecto a la médula ósea fresca con el fin de identificar RhoGEFs expresados diferencialmente.
- Caracterizar los mecanismos moleculares que determinan el efecto quimiotáctico de agonistas como el **SDF-1**, relevante en el microambiente tumoral, con énfasis en la participación de **RhoGEFs regulados por proteínas G**, que pudieran estar expresados diferencialmente en células pro-tumorales derivadas de la médula ósea.



## 9. Material y Métodos

### 9.1 Cultivos Celulares

#### 9.1.1 Cultivo primario de células derivadas de la médula ósea (BMDCs, Bone Marrow-Derived Cells) de ratones

##### *Preparación de cajas Petri para cultivo de médula ósea*

Las células de la médula ósea recién extraídas tienen una baja eficiencia de adhesión a las cajas de Petri, por ello es necesario facilitar la adhesión de las células de la médula ósea mediante el recubrimiento de las cajas Petri (Corning) con una matriz extracelular. Para recubrir las cajas se utilizó ProNectin (Fibronectin-like Engineered Protein Polymer-Plus Genetically Engineered, Sigma-Aldrich, cat F8141), una proteína de matriz extracelular modificada (con múltiples copias de motivos RGD: Arg-Gly-Asp, Arginina-Glicina-Aspartato) que favorece una mejor adhesión de células de la médula ósea, según lo reportado <sup>29</sup>. Dentro de una campana estéril, se preparó la ProNectin añadiendo 1 mL al vial que contiene 1 mg para obtener el stock de 1 mg/mL. Para recubrir las cajas se preparó cada vez la cantidad necesaria de ProNectin 10 µg/mL mediante la dilución 1:100 en PBS 1X (10 µL del stock de ProNectin en 1 mL de PBS 1X). La solución se adicionó a las cajas de Petri (1 mL por cada p100) y se aseguró que toda la superficie estuviera humedecida, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se recuperó la pronectina (es posible reutilizarla) y se realizaron dos lavados con PBS 1X (4 mL para p100), con vacío se retiró y las cajas se almacenaron a temperatura ambiente o a 4°C hasta realizar la siembra de células de la médula ósea extraídas de ratones, pero comúnmente se sembraron inmediatamente.

##### *Extracción de la médula ósea de ratones silvestres y transgénicos*

Durante el desarrollo de este proyecto se tomó la decisión de implementar modelos animales que permitieran enriquecer las estrategias experimentales de laboratorio para el estudio del desarrollo tumoral. Para el manejo de animales de laboratorio, particularmente ratones silvestres y transgénicos, se sometieron dos protocolos a evaluación y fueron aprobados por el comité de ética del UPEAL para el manejo de ratones, los protocolos corresponden al No. 33-13 y 0205-16.

Los ratones con 6 a 8 semanas de edad de las cepas **FVB/NJ** (Stock 001800, Jackson Laboratory), **C57BL/6J** (Stock 000664, Jackson Laboratory) y transgénicos correspondientes **Tg(TIE2GFP)287Sato/J** (Stock 003658, Jackson Laboratory), el cual expresa la proteína verde fluorescente bajo el promotor del receptor Tie2; y el ratón **C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)131Osb/LeySopJ** (Stock 006567, Jackson Laboratory) que expresa la proteína verde fluorescente bajo el promotor de actina de pollo; fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub> o bien, por dislocación cervical para realizar los cultivos de médula ósea. Inmediatamente después del sacrificio, el ratón se colocó en posición decúbito dorsal sobre una sanita y se realizó asepsia superficial del animal con etanol al 70% (con atomizador). Las extremidades posteriores fueron extendidas con las pinzas y cortadas con las tijeras de disección tratando de incluir la mayor parte del fémur. Una vez aisladas las piernas, se cortaron los pies justo en la articulación entre la tibia y el pie. La piel se retiró con pinzas tomando el extremo donde está la rodilla y jalando en dirección contraria. El músculo se retiró con las pinzas más delgadas y de punta fina para atravesar y jalar el músculo en dirección de la rodilla hasta disecar la tibia (y en su caso, junto con rodilla y fémur); las piezas óseas disecadas se colocaron en una caja de Petri (p100) con PBS 1X. Posteriormente, la caja Petri se transfirió dentro de la campana de flujo estéril para proceder a la extracción de la médula ósea de los huesos disecados (Figura 12).

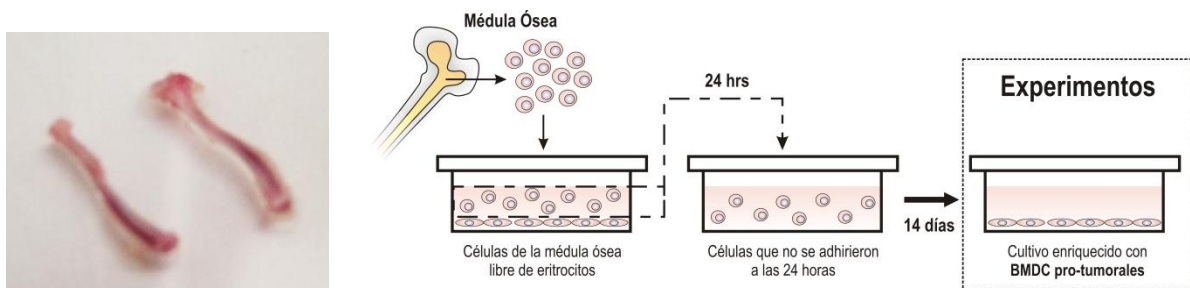
La tibia fue sujeta con las pinzas y con las micro-tijeras se realizaron cortes en las epífisis de cada hueso (en el extremo de la rodilla, de preferencia hasta ver un punto rojo). El fragmento del fémur disecado requirió un corte considerable en el extremo de la rodilla para permitir la extracción. Posteriormente con una jeringa para insulina con aguja de calibre 31GX6mm, se tomó medio de cultivo EGM-2MV (o bien, PBS 1X con agilidad) y se pasó a través de la tibia (y fémur) repetidas veces recuperando en una caja Petri (p35) hasta haber extraído la totalidad de la médula ósea del hueso. Nota: nunca tomar con la jeringa medio con células para volver a pasar a través de la médula ósea, este manejo puede lisar a las células. Una vez aislada la médula ósea, se suspendió repetidamente con pipeta hasta que se disgregaron lo más posible los grumos y después se filtraron con redes de nylon con poro de 40 µm (cell strainer, BD Falcon, Tokyo, Japan; catalogo #352340) pasando a un tubo falcon de 15 mL (Corning 430828).

Una vez recolectada la médula ósea de los ratones, fue centrifugada a 1,200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente en un tubo falcon de 15 mL, posteriormente las células fueron suspendidas en 1 mL de medio, este proceso fue opcional en caso de tener un volumen grande de suspensión de



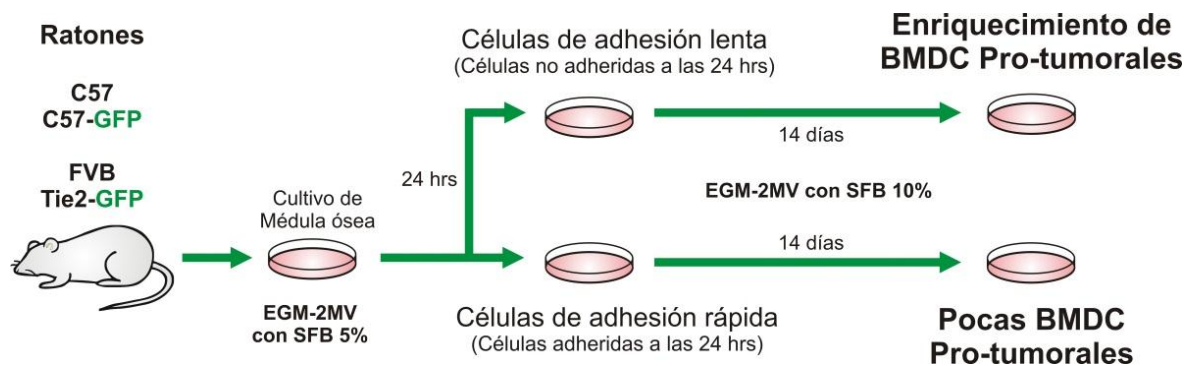
médula ósea. Los eritrocitos se lisaron con cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; StemCell technologies, cat# 07850, cat# 07800), se agregó 4 mL de la solución de lisis para eritrocitos a las células extraídas de la médula ósea y suspendidas en 1 mL (dilución 1:5), se mezcló suavemente y se incubó durante 10 min para permitir una lisis eficiente de los eritrocitos. Después de la incubación, las células fueron lavadas con PBS 1X y centrifugadas a 1,200 rpm durante 5 min para la extracción del sobrenadante con vacío. Finalmente, las células fueron re-suspendidas en 10 mL correspondientes para sembrar en cajas P100 recubiertas con pronectina. Para cultivar las células de la médula ósea se utilizó el medio **EGM-2MV** (Endothelial Growth Media-2 Microvascular suplementado con SingleQuots™ Kit, Lonza, cat. CC-4147), el contenido del suplemento corresponde a los siguientes reactivos. Nota: las concentraciones son de carácter confidencial por parte de Lonza.

- Factor de crecimiento epidermal humano recombinante (rhEGF)
- Hidrocortisona
- Factor de crecimiento de fibroblastos beta humano (hFGF-b)
- Factor de crecimiento del endotelio vascular humano recombinante (VEGF)
- Factor de crecimiento similar a la insulina (Insulin-like Growth Factor, R<sup>3</sup>-IGF-1)
- Ácido ascórbico
- 25 mL de suero fetal bovino, SFB (Fetal Bovine Serum, FBS), concentración final de 5%
- Gentamicina/Anfotericina (Gentamicin/Amphotericin-B, GA)



**Figura 12. Cultivo de células de la médula ósea con propiedades pro-tumorales.** Fotografía de la tibia disecada de ratón, diagrama del procedimiento general del cultivo de médula ósea. Las tibias fueron disecadas y se obtuvieron las células de la médula ósea, posteriormente se lisaron los eritrocitos y se sembraron las células filtradas en cajas recubiertas con pronectina en medio EGM-2MV. Después de 24 horas, se recuperaron las células que no se adhirieron durante este tiempo, y se resembraron en una nueva caja recubierta con pronectina que fue cultivada por 14 días, a partir de los cuales se comenzaron a utilizar en los experimentos correspondientes.

Las células de la médula ósea extraídas de ratones se mantuvieron durante 24 horas en incubadora a 37°C con 0.5% de CO<sub>2</sub>, después se recuperaron las células que no se adhirieron en este periodo de tiempo y se pasaron a nuevas cajas recubiertas de ProNectin, la caja con células adheridas durante las primeras 24 horas se descartaron (Figura 12). En este punto, las células suspendidas se dividieron con base en el número de ratones utilizados, para cada caja p100 corresponde la médula ósea de 3 ratones. Nuevamente se cultivaron y al cuarto día se realizaron lavados con PBS 1X para eliminar los restos de las células de la médula ósea que no se adhirieron en este periodo de tiempo. Una vez añadido el medio EGM-2MV a la caja correspondiente (p100), se agregó 500 µL de SFB para alcanzar una concentración final de 10% de SFB para favorecer una mejor proliferación de las células cultivadas hasta alcanzar 15 días de cultivo en total (Figura 13).



**Figura 13. Resumen del procedimiento para el cultivo de médula ósea de ratones.** De las cepas de ratones señaladas se obtuvo la médula ósea de las tibias y fémur, y se cultivaron en cajas recubiertas con pronectina con medio EGM-2MV suplementados con SFB 5%. 24 horas después se separaron en cajas independientes recubiertas con ProNectin aquellas que permanecían flotando y fueron resembradas; las que quedaron adheridas se mantuvieron en la primera etapa de estandarización. Después de 4 días, ambos cultivos se lavaron para retirar todos los restos de las células que no se adhirieron y se cultivaron un total de 14 días en medio EGM-2MV con SFB al 10%. Nuestra expectativa fue que en los cultivos de las células que fueron resembradas a las 24 horas, se enriquecería una población de células derivadas de la médula ósea potencialmente pro-tumoral.

Las células fueron separadas en cajas o pozos independientes para los experimentos, los cultivos originales de médula ósea sembrados en cajas p100 se les retiró el medio suplementado y se lavaron 3 veces con PBS 1X. Posteriormente se añadió 1 mL de tripsina 0.25% (2.5 gr) con EDTA 0.2 gr (Sigma-Aldrich, cat T4049); la tripsina es necesaria para despegar las células de manera más eficiente, y las cajas se colocaron en la incubadora por 20 min a 1 hr (depende de la fuerza de adhesión de las células), se monitorearon al microscopio para averiguar si se estaban despegando.

Finalmente, con ayuda de pipeta facilitar que se despeguen ejerciendo un poco de presión física y se añadió lentamente el medio con suero para neutralizar a la tripsina y evitar que se formen grupos de células. Las cajas de cultivo utilizadas fueron p100 (Corning 430167) Cajas de cultivo de 6 pozos (Corning 3506), cajas de cultivo de 12 pozos (Corning 3512).

### 9.1.2 Cultivo de células tumorales de carcinoma de pulmón murino

Para el modelo de cáncer murino en los ratones C57/BL6 se utilizaron células de carcinoma de pulmón de Lewis (**LLC** con o sin expresión de GFP para su identificación), que fueron amablemente donadas por la Dra. Iruela de la Universidad de California (UCSD, University of California, San Diego) y fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de SFB y antibiótico (Invitrogen, cat. 15240112). Las células fueron sembradas en cajas Petri sin necesidad de adicionar algún sustrato a la caja, sólo en experimentos de cierre de herida las células tumorales fueron sembradas sobre gelatina 0.02%, como se describe más adelante en la sección correspondiente.

Para los ratones de la cepa FVB, se utilizó la línea celular de carcinoma alveolar-bronquial de pulmón (**células LAP0297**), además se obtuvo una línea de adenocarcinoma mamario (células MCaP0008), ambas líneas celulares fueron desarrolladas y facilitadas amablemente por el Dr. Peigen Huang y colaboradores (Department of Radiation Oncology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA) <sup>112</sup>. Las células tumorales para ratones FVB fueron cultivadas y expandidas en medio DMEM con SFB al 10% con antibiótico, para los experimentos fueron ayunadas con medio DMEM sin suero o bien, EBM-2 sin suplementos.

### 9.1.3 Cultivos de líneas celulares y plásmidos utilizados

Las células **HEK293T** (células embrionarias de riñón humano), **COS7** (células similares a fibroblastos de riñón del mono verde africano), **MCF7** (adenocarcinoma mamario de humano, MCF7: Michigan Cancer Foundation-7), y células **HeLa** (células de cáncer cervicouterino), fueron cultivadas en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de SFB y antibiótico (Invitrogen, cat. 15240112), fueron mantenidas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en incubadora. Para realizar experimentos con las células HEK293T se sembraron en cajas recubiertas con poli-D-lisina 1X, las células fueron divididas a partir de 1 caja P100 confluyente en 5 cajas P100 recubiertas con poli-D-lisina 1X (cajas tratadas durante 20 min y lavadas con PBS 1X). Para introducir plásmidos de expresión de

proteínas fusionadas a epitopes (HA, GST, His6 y 3XFlag) o sin epitopes, las células HEK293T y COS7 se transfectaron con el método de lipofectamina-plus (Invitrogen, cat. 18324-20, cat. 11514-015), mientras que las células HeLa se transfectaron con Polyfect. Por otro lado, las células MCF7 fueron transfectadas con lipofectamina-RNAiMAX para introducir esiRNAs. Los métodos de transfección se describen en la sección siguiente. Después de 48 horas posteriores a la transfección, las células fueron lisadas bajo las condiciones del diseño experimental correspondiente, por ejemplo, ayunadas por varias horas, estimuladas y/o tratadas con inhibidores farmacológicos.

Para los experimentos *in vitro* realizados en modelos celulares como HEK293T y COS-7, utilizamos los siguientes plásmidos y construcciones disponibles en el laboratorio: pCEFL-GST-G $\beta$ <sub>1</sub>, pCEFL-3XFlag-G $\beta$ <sub>1</sub>, His6-G $\beta$ <sub>1</sub>, His6-G $\gamma$ <sub>2</sub>, pCEFL-G $\gamma$ <sub>2</sub>, pCEFL-EGFP, pCEFL-HA-G $\alpha$ <sub>12</sub>WT, pCEFL-HA-G $\alpha$ <sub>12</sub>Q205L, pCEFL-HA-G $\alpha$ <sub>5</sub>WT, pCEFL-HA-G $\alpha$ <sub>5</sub>Q227L, pCEFL-HA-G $\alpha$ <sub>q</sub>WT, pCEFL-HA-G $\alpha$ <sub>q</sub>Q209L, pCEFL-HA-G $\alpha$ <sub>13</sub>WT, pCEFL-HA-G $\alpha$ <sub>13</sub>Q226L, pCEFL-HA-RGS2, pCEFL-HA-RGS4, AU1-RGL-PDZ-RhoGEF, AU1-RGS-p115RhoGEF, AU1-RGS-LARG, pCEFL-3XFlag-P-Rex1. Además, utilizamos DNAs comerciales (Guthries) sin epitopes: pcDNA3.1-G $\alpha$ <sub>q</sub>WT, pcDNA3.1-G $\alpha$ <sub>13</sub>WT, pcDNA3.1-G $\alpha$ <sub>q</sub>QL, pcDNA3.1-G $\alpha$ <sub>13</sub>QL, HA-Gi-DREADD, HA-Gq-DREADD. Las quimeras utilizadas fueron: pcDNA3.1-G $\alpha$ <sub>13-12</sub>QL, pcDNA3.1-G $\alpha$ <sub>12-13</sub>QL. Construcciones del GEF P-Rex1: pCEFL-GST-DH-PH, pCEFL-GST-DEP-DEP, pCEFL-GST-PDZ-PDZ, pCEFL-GST-PDZ1, pCEFL-GST-PDZ2, pCEFL-GST-Nter-P-Rex1, pCEFL-GST-Cter-P-Rex1, pCEFL-3XFlag-DH-PH, pCEFL-3XFlag-DEP-DEP, pCEFL-3XFlag-PDZ-PDZ, pCEFL-3XFlag-Nter-P-Rex1, pCEFL-EGFP-Q-Rhox.

Para preparar proteínas recombinantes necesarias para atrapar GTPasas y RhoGEFs activos se transformaron bacterias BL-21 con los siguientes vectores de expresión en bacterias: pGEX-GST-Rac1-G15A, pGEX-GST-Cdc42-G15A, pGEX-GST-Rho-G17A, pGEX-GST-CRIB-PAKN, pGEX-GST-RBD-Rhotekin.

### ***Procedimiento para obtener plásmidos para transfectar (miniPreps)***

Para realizar los experimentos de transfección de plásmidos en células de mamífero, primero se obtuvieron los DNAs plasmídicos a partir de bacterias DH5 $\alpha$ . Para este procedimiento se descongelaron bacterias competentes DH5 $\alpha$  almacenadas en el revco -70°C y se dejaron descongelar en hielo durante 20 min aproximadamente. A partir del tubo descongelado, se tomaron 50  $\mu$ L de bacterias y se pasaron a un tubo eppendorff y en este se añadió 1  $\mu$ L del plásmido que se deseaba

obtener, por lo tanto, utilizamos 50  $\mu$ L de bacterias para cada plásmido diferente. El choque térmico se realizó en el baño maría calentado previamente a 42°C, los tubos con bacterias a las cuales se les añadió el plásmido correspondiente se colocaron en flotadores y se dejaron en el baño maría durante 60 segundos y rápidamente se colocaron en hielo durante 10 minutos. Se agregaron 500  $\mu$ L de medio LB o TB a cada tubo y se colocaron en el agitador (180-200 rpm) a 37°C durante 1 hora. Después de la expansión de las bacterias, los tubos fueron centrifugados a 6,000 rpm durante 30 seg a 1 min para obtener el pellet de bacterias se eliminó el sobrenadante y se añadieron 50  $\mu$ L de medio con el antibiótico correspondiente al gen de resistencia del plásmido para resuspender a las bacterias y plaquear.

Las bacterias fueron sembradas (preferencialmente en la noche) en cajas con agar y antibiótico correspondiente al gen de resistencia incluido en el plásmido (ampicilina, kanamicina o gentamicina), pipeteando comúnmente 5  $\mu$ L a cada caja y distribuyendo con perlas de silicon estériles. Las cajas sembradas fueron incubadas a 37°C (incubadora de bacterias previamente con la temperatura) durante toda la noche. Al día siguiente las cajas fueron retiradas de la incubadora y a temperatura ambiente dentro de la campana estéril se buscaron colonias en el agar.

Las colonias se picaron con asas estériles y se inocularon tubos de vidrio con capuchón que contenían 5 mL del medio LB. Por cada colonia que se picaba se inoculaba un tubo, por lo que no mezclamos bacterias provenientes de diferentes colonias a pesar de que fueron transformadas con el mismo plásmido. Los tubos inoculados con bacterias se incubaron toda la noche en shaker a 37°C, para ello se colocaron en una gradilla y los tubos se colocaron con una inclinación de 45 grados aproximadamente, para una mejor agitación. Al día siguiente los tubos se secaron de la incubación, aquellos donde crecieron adecuadamente las bacterias transformadas se observaron muy turbios y posteriormente se centrifugaron a 2,500 rpm durante 5 min para obtener un pellet de bacterias e iniciar el procedimiento de extracción del plásmido.

Se utilizó el kit de **minipreps para la extracción de plásmido** (GenElute Plasmid Miniprep Kit, Sigma-Aldrich, cat. PLN350), que contiene todas las soluciones necesarias para lisar las bacterias y purificar los plásmidos deseados. De los tubos centrifugados se retiró el sobrenadante (medio LB) y el pellet de bacterias se suspendió 200  $\mu$ L de la solución de re-suspensión suplementada con la RNAasa A del kit y se transfirió todo el volumen a un tubo eppendorff en el cual se añadió 200  $\mu$ L de la solución

de lisis y los tubos se invirtieron suavemente y de manera repetida (sin usar vortex) y se dejaron reposar un par de minutos.

Posteriormente se añadió 350  $\mu$ L de la solución neutralizante para detener la lisis, se invirtieron los tubos de 4-6 veces y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos. Mientras tanto, se prepararon las columnas para atrapar a los plásmidos, para ello se añadieron 500  $\mu$ L de la solución de preparación a cada columna previamente colocada en tubos eppendorf de 2 mL y se centrifugaron por 1 minuto a 14,000 rpm, la solución acumulada en el fondo del tubo se tiró y nuevamente se colocó la columna en el microtubo para añadir ahora el lisado de las bacterias que corresponde al sobrenadante de los tubos centrifugados y nuevamente los microtubos se centrifugaron por 1 minuto a 14,000 rpm para pasar el sobrenadante a través de la columna y se realizaron dos lavados con los buffers correspondientes. Finalmente, se seco la columna con centrifugación sin buffers de lavado y se añadió solución elute o agua miliQ esteril para solubilizar y centrifugar el DNA plasmídico de las columnas para cuantificar por espectrometría.

### ***Preparación de medios de cultivos para bacterias***

**El medio LB** (lysogeny broth) se preparó en lotes de 1 litro, disolviendo 10 gramos de bacto triptona (Becton Dickinson, cat 211705), 5 gramos de extracto de levadura (212750) y 5 gramos de cloruro de sodio (sigma S-7653) en 950 mL de agua miliQ. El pH se ajustó a 7.2-7.4 con hidróxido de sodio 1N (NaOH JT Caker 3722), se aforó a 1 litro y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min y 15 psi. El antibiótico se añadió hasta que se la temperatura estaba por debajo de 40°C y en campana: 1 mL de ampicilina 100  $\mu$ g/ $\mu$ L (final 100  $\mu$ g/mL); 500  $\mu$ L de kanamicina 100  $\mu$ g/ $\mu$ L (final 50  $\mu$ g/mL); 500  $\mu$ L de gentamicina 50 mg/mL (final 10  $\mu$ g/mL).

Para preparar **cajas con agar LB o SB** (1 L) para cultivos de bacterias fue igual que el medio de cultivo líquido pero adicionalmente se agregó 12 gr de bacto agar (Beckton Dickinson, cat 2115000), el antibiótico se agrego a 40°C. Distribuir en cajas Petri para bacterias previamente rotuladas en el interior de la campana de bacterias, cubrir 2/3 de la caja de 10 cm y dejar reposar para que solidifique (30-60 min), después se apilaron boca abajo y se almacenaron en bolsas de plástico a 4°C (viables 2 meses). Los antibioticos utilizados se prepararon de la siguiente manera:

Ampicilina: Disolver 1 gr de ampicilina (sigma A-0166) en 10 mL de agua desionizada para obtener una concentración de 100 µg/µL, alícuotas de 1 mL almacenadas a -20°C, para usar descongeló en hielo.

Kanamicina: Pesar 1 gr de kanamicina (gibco 11815-024) y disolver en 10 mL de agua, después almacenar a -20°C.

Gentamicina: Tomar 20 µL de la solución de gentamicina 50 mg/mL (Gibco 15750-060) por cada 100 mL de medio de cultivo de bacterias.

### ***Preparación de DMEM (dulbecco's modified Eagle's médium)***

El **medio DMEM** se preparó de la siguiente manera: para 4 litros, se disolvió todo el contenido del sobre DMEM (Sigma, cat. D-7777) en 3.5 L de agua estéril (PiSA, 4000253) y bicarbonato de sodio (sigma cat: S-5761) 3.7g/L (HEK293T) o 1.8 g/L (HEK293 y HeLa), posteriormente se ajustó el pH a 7.2 con HCl (Beker cat. 9535-05) concentrado. Una vez ajustado el pH, se aforó a 4 litros y se esterilizó por filtración con vacío y una membrana de 0.22 µm (Corning, cat 430758) dentro de la campana de flujo laminar. Finalmente, el medio dividió en alícuotas en botellas de vidrio y se almacenaron a 4°C. El medio DMEM suplementado con SFB 10% y antibióticos para crecer a las células se preparó de la siguiente manera. Para cada 450 mL de DMEM agregar 5 mL de antibióticos penicilina, sulfato de estreptomicina y anfotericina B (Anti-Anti (100X), Gibco by Life Technologies, cat 15240-062, 100 mL) y 50 mL de suero fetal bovino (gibco cat 10437-028).

### ***Poli-D-Lisina para sembrar células HEK293T***

Diluir 5 mg de poli-D-lisina (poly-D-lysine hydrobromide, Sigma, cat. P7280) en 500 mL de agua estéril (PISA), de esta manera se preparó el stock 100X y se almaceno en botella de vidrio a 4°C, para realizar experimentos con las células HEK293T, se tomó, por ejemplo, 1 mL del stock 100X y se aforó a 1L de PBS 1X que se mantuvo almacenado a 4°C. Antes de tripsinizar y sembrar las células, los pozos o cajas Petri fueron humedecidas con poli-D-lisina 1X e incubadas durante 15 minutos a 37°C.

### ***PBS (phosphate buffered saline) para cultivo***

Para preparar 1 litro de PBS 1X disolver todo el contenido del vial: dulbecco's phosphate buffered saline (cat 5773, Sigma) en 900 mL de agua estéril (PISA), posteriormente se aforó a 1 litro y se



esterilizó por filtración usando una membrana con poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (cat 430758, Corning) en la campana de flujo, finalmente se almacenó a 4°C.

## 9.2 Métodos de Transfección

### 9.2.1 Método de transfección con Lipofectamina-Plus

Previo al procedimiento de transfección de células HEK293T y COS7, las células deben dividirse un día antes a la confluencia adecuada, generalmente baja. En el caso de células HEK293T, deben ser sembradas sobre cajas previamente tratadas con poli-D-lisina y lavadas con PBS 1X. Las HEK son divididas a una dilución 1/5 a partir de una caja de 10 cms que haya alcanzado la confluencia el día en que se van a sembrar células para la transfección.

Para este método se realizan dos mezclas con medio DMEM sin suero y sin antibiótico, una que contiene el reactivo PLUS junto con los DNAs que se transfectaran, y otra mezcla que tiene el reactivo lipofectamina. En tubos de polipropileno se añadió 750  $\mu\text{L}$  de DMEM sin suero por cada caja p100 más 10  $\mu\text{L}$  PLUS por caja y el DNA (máximo 4  $\mu\text{g}$  de DNA total por caja p100). Cuando varias cajas tendrán el mismo plásmido según el diseño experimental, se realizan pools dependiendo del número de cajas se añaden el volumen correspondiente. Por otra parte, en otro tubo de polipropileno se añade también 750  $\mu\text{L}$  de DMEM sin suero + 10  $\mu\text{L}$  de lipofectamina por cada caja p100. Las preparaciones se mezclaron bien, preferentemente con un toque en vortex y se incubaron durante 15 min dentro de la campana estéril.

Posteriormente se mezclan las preparaciones con plus y con lipofectamina, nuevamente se agita la mezcla y se incubó durante otros 15 min. Mientras tanto las células que fueron transfectadas, se prepararon retarando el medio de cultivo, lavando con PBS 1X y añadiendo medio DMEM sin suero y sin antibióticos, 5 mL para el caso de cajas p100. La mezcla correspondiente se añadió a las células (un volumen ~1520  $\mu\text{L}$ ) y se incubaron a 37°C en la incubadora durante 3 horas. Finalmente, las células se recuperaron retirando el medio de transfección y añadiendo el DMEM con suero y antibiótico.

Mezcla 1. En un tubo de propileno, se añadió 750  $\mu\text{L}$  (para una caja p100), o bien 100  $\mu\text{L}$  (para una caja o pozo p35) de DMEM libre de suero y antibióticos.



Mezcla 2. Se añadió el mismo volumen de medio que en la mezcla 1, pero a este tubo sólo se añade 10  $\mu$ L (para una caja p100) o bien, 3  $\mu$ L (para una caja p35) de lipofectamina.

### 9.2.2 Transfección de células HEK293T, COS7, HeLa y PAE con el método de PolyFect

Las células HeLa y algunos experimentos con células HEK293T y COS7, fueron transfectadas con el reactivo PolyFect (Qiagen, cat 301107), el protocolo general se describe a continuación para transfectar células cultivadas en cajas de p100 (10 cm). Un día antes de la transfección células confluentes fueron divididas y sembradas con medio DMEM con 10% de suero y antibióticos; para el caso de las HEK293T (sembradas sobre placas tratadas previamente con poli-D-lisina durante 10 min y lavadas con PBS 1X).

El día de la transfección inicialmente se preparó el PolyFect sólo utilizando 300  $\mu$ L de DMEM sin suero y sin antibióticos en un tubo de polipropileno, a este medio se añadieron 25  $\mu$ L del reactivo PolyFect, estos volúmenes corresponden únicamente para transfectar una caja p100, en los diseños experimentales con 2 o más cajas se calculó el volumen final de DMEM y PolyFect para tener un stock. Si algún DNA será transfectado por igual en todas las cajas, se agregó al stock y a partir de este se dividió en volúmenes equivalentes en tubos según corresponda el número de cajas que se transfectaran, una vez separados, se añadieron el resto de DNAs según correspondiera, se agitaron en vortex preferencialmente y se incubaron a temperatura ambiente durante 10-15 minutos.

Durante la incubación, las células fueron preparadas para la transfección, se lavaron con PBS 1X y se agregó 7 mL de DMEM con suero 10% y antibióticos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación de la mezcla de transfección, se añadió 1 mL de DMEM con 10% de suero a cada tubo de mezcla y de transfirió a la caja con las células preparadas, se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente las se les realizó cambio de medio con suero y antibióticos. Las células se utilizaron para los experimentos 48 horas después.

### 9.2.3 Método de transfección con PEI 1X

Este método de transfección se utilizó en las células HEK293T para algunos experimentos en cajas de 6 pozos (p35). Se establecieron dos mezclas, en el primer tubo se añadió 75  $\mu$ L de DMEM al cual se añadió el DNA de los plásmidos a transfectar (cantidad que corresponde a un pozo p35), en

algunos casos se prepararon “pools” con el volumen y la cantidad de DNA correspondiente a todos los pozos que se deseaban transfectar. En un segundo tubo se preparo el reactivo de transfección con DMEM y PEI 1X. A partir de un PEI 100X (almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) se obtuvo una dilución de PEI 1X la cual fue usada para las transfecciones. La alícuota en uso se mantuvo a  $4^{\circ}\text{C}$ , antes de utilizar se permitía aclimatarse unos minutos y posteriormente el tubo con PEI 1X se calentó a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos en baño maría y se añadió 3  $\mu\text{L}$  por cada 75  $\mu\text{L}$  de medio (para cada condición) en condiciones de esterilidad, una vez homogeneizado el pool con medio y PEI 1X, se añadió el volumen correspondiente a cada mezcla con los DNAs y se incubaron durante 15 min antes de añadir a las células HEK293T con medio libre de suero y antibióticos. Las células se dejaron con la mezcla de transfección toda la noche y al día siguiente se retiró el medio y se añadió nuevo medio suplementado.

#### 9.2.4 Método de transfección con TurboFect

Con el reactivo TurboFect (Thermo Scientific, cat. R0531) se lograron transfectar células MCF7, HeLa, COS7, PAE y HEK293T. Seguimos un protocolo similar a la transfección con el reactivo PolyFect; transfectamos células MCF7 sembradas en cajas con 6 pozos (tamaño p35 de cada pozo). Para transfectar un pozo, en campana estéril se preparó la mezcla con 100  $\mu\text{L}$  de DMEM libre de suero y antibióticos al cual añadió el o los plásmidos a transfectar y posteriormente 3  $\mu\text{L}$  de turbofect se añadió y se homogenizó en vortex para dejar en reposo durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. Durante la incubación, se retiró el medio de cultivo a las células y se cambió por nuevo medio con suero/antibióticos. Después de la incubación de la mezcla de plásmidos con TurboFect, se añadió al medio de las células y se incubaron en transfección toda la noche (incubadora con  $\text{CO}_2$ ) para el caso de MCF7, mientras que para las células HeLa es suficiente con 3 a 5 horas porque se pueden dañar. Al día siguiente se cambió el medio de cultivo por nuevo para retirar el medio con la mezcla de transfección.

#### 9.2.5 Knock down de P-Rex1 en células MCF7

Se realizó transfección inversa de células MCF7 se realizó con lipofectamina RNAiMAX y 30 pmoles de esiRNA-P-Rex1 (Sigma-Aldrich, cat. EHU136571) o esiRNA-EGFP (Sigma-Aldrich, cat. EHUEGFP) como control. Utilizamos optiMEM para preparaciones de lipofectamina y esiRNA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la transfección inversa, las células se tripsinizaron y se suspendieron en DMEM 5% de SFB dentro de antibióticos, luego se mezclaron con complejos de

lipofectamina/esiRNA y se sembraron en cajas p60 y se incubaron durante la noche a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS 1X y se añadió DMEM 10% de SFB con antibióticos. Los experimentos se realizaron 72 h después de la transfección para knock down eficiente. Se estimularon células con hambre durante 18 h con CXCL12/SDF-1 $\alpha$  (50 ng/mL, PeproTech, cat. 300-28A) o HGF (10 ng/mL, factor de crecimiento de hepatocitos, R&D Systems, cat. 294-HGN) durante 5 minutos antes de lisar.

## 9.3 Mediadores angiogénicos y quimiotácticos asociados al microambiente tumoral

### 9.3.1 Estímulos pro-tumorales definidos

Como parte de la caracterización de las células tumorales y las células derivadas de la médula ósea, evaluamos el efecto de mediadores comúnmente secretados en un microambiente tumoral, sobre las células derivadas de la médula ósea y sobre células tumorales, con la finalidad de caracterizar funcionalmente a nuestros cultivos celulares y establecer algunos mediadores que posiblemente se encuentren en los medios condicionados tanto de BMDC, como de células tumorales.

Después de cultivar células de la médula ósea durante 15 días, las BMDC provenientes de ratones FVB fueron tripsinizadas y sembradas en 2 cajas de 6 pozos recubiertas con pronectin, después de 48 horas, las células fueron ayunadas toda la noche en medio EBM-2. Al día siguiente se cambió el medio de ayuno por nuevo y se añadieron los estímulos y durante 5 minutos se incubaron a 37°C con ligandos que activan GPCRs (SDF-1, S1P, LPA e IL-8), receptores tirosina cinasa (VEGF, HGF, EGF, FGF), en medio EGM-2MV y el medio condicionado de células tumorales LAP0297 (Las concentraciones de los estímulos utilizados se muestran en la Tabla 1). Las células después fueron lisadas con buffer de lisis y desnaturalizadas con buffer de muestra. Los lisados celulares fueron corridos en geles de 12 y 10% de acrilamida y posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana (Immobilon-P, Millipore, cat. IPV00010) para revelar con anticuerpos específicos para fosfo-Ser473 de AKT1/2/3, fosfo-MAPK 44/42, AKT1 y ERK2, como se describe en las secciones correspondientes.

**Tabla 1.** Ligandos y las concentraciones utilizadas para estimular a las células derivadas de la médula ósea y en células tumorales de pulmón.

Estímulo	Empresa/Catalogo	Stock	Concentración	Vol por mL de medio
<b>CXCL12/SDF-1<math>\alpha</math></b>	PeptoTech / 300-28A	5 $\mu$ g/mL *	50-100 ng/mL	10-20 $\mu$ L
<b>S1P</b>	Sigma / S9666	100 $\mu$ M *	1 $\mu$ M	10 $\mu$ L
<b>LPA</b>	Biomol / LP-100	1mM / 5mM #	1 $\mu$ M / 5 $\mu$ M	1 $\mu$ L
<b>IL-8</b>	Sigma / I1645	300 nM *	3 nM	10 $\mu$ L
<b>VEGF 165</b>	PeptoTech / 100-20	1 $\mu$ g/mL *	100 ng/mL	100 $\mu$ L
<b>HGF</b>	R&D Systems / 294-HGN	1 $\mu$ g/mL *	10 ng/mL	10 $\mu$ L
<b>EGF</b>	Gibco / 13,247-051	10 $\mu$ g/mL *	100 ng/mL	10 $\mu$ L
<b>bFGF</b>	PeptoTech / 100-18B	25 $\mu$ g/mL *	25 ng/mL	25 $\mu$ L
<b>PDGF</b>	Sigma / P3326	5 $\mu$ g/mL *	100 ng/mL	20 $\mu$ L
<b>MC de BMDC</b>	-	-	14 hrs	1-2 mL
<b>MC de LAP</b>	-	-	14 hrs	1-2 mL

\*Stock de estímulos disueltos en BSA 0.1% / PBS 1X; #solo PBS1X

### 9.3.2 Obtención de medios condicionados de células tumorales y de BMDC

Las células tumorales de carcinoma de pulmón (LAP0297 y LLC) fueron sembradas en cajas p100 con medio DMEM SFB 10%, cuando alcanzaron confluencia, fueron lavadas con PBS 1X de 5 a 10 veces (2-3 mL) para asegurarse de haber eliminado residuos del medio con suero. Posteriormente se añadió el volumen deseado de medio DMEM sin suero o EBM-2 sin suero (10 mL para cajas p100), las células se incubaron durante ~14 horas. Transcurrido el tiempo de ayuno, se recuperó el medio con pipeta y se colocó en tubos de 15 mL, los cuales se centrifugaron durante 20 min a 3,000 rpm a 4°C y se decantó el medio en nuevos tubos evitando tomar el pellet de residuos celulares, de esta manera se obtuvieron medios condicionado sin restos celulares que pudieran contener complejos que pudieran activar nuestras células a evaluar.

Los medios condicionados de las células derivadas de la médula ósea se obtuvieron a partir de células cultivadas durante 15 días, posteriormente fueron lavadas en repetidas ocasiones con PBS 1X (por lo menos 5 veces) para retirar los completamente los residuos del suero y factores de crecimiento del medio suplementado. Una vez lavadas las células se añadió medio sin suplementos y sin

antibióticos EBM-2, un total de 10 mL por cada caja p100 o bien, 2 mL de medio por cada pozo p35 durante 14 horas. El medio se recuperó y se colocó en tubos falcon de 15 mL para centrifugar durante 20 min a 3,000 rpm a 4°C, el sobrenadante se decantó nuevos tubos para su uso o almacenamiento. Los medios condicionados obtenidos fueron almacenados a -70°C para posteriormente utilizarse o bien, se puede utilizar inmediatamente para estimular células de ser necesario.

## 9.4 Procedimientos de lisis de células, pulldown, inmunoprecipitación y western blot

### 9.4.1 Lisis de las células derivadas de la médula ósea cultivada y frescas, y células tumorales

Las células HEK293T, COS-7, MCF7, células tumorales para ratón (LAP0297 y LLC), células de la médula ósea fresca y cultivada de ratones, fueron lisadas con un buffer especial para lisar que contiene los siguientes componentes: inicialmente se preparó un buffer con TBS-Tritón (50 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100) mantenido a 4°C, pocos minutos antes de lisar se adicionaron los inhibidores de proteasas: 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonylo (PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride), 10 µg/mL leupeptina, y 10 µg/mL aprotinina; también inhibidores de fosfatasa: 10 mM β-glicerolfosfato, 1 mM NaF y 1 mM ortovanadato de sodio, y para los ensayos de pulldown de GTPasas activas se añadió MgCl<sub>2</sub> 1 mM (Tabla 2). Toda la mezcla se preparó antes de iniciar el procedimiento de lisis y se mantuvo en hielo junto a PBS 1X para lavar de células.

El procedimiento general para la lisis de células fue el siguiente: Las células derivadas de la médula ósea que fueron lisadas en sus cajas de cultivo, posteriormente a realizar la estimulación de las células, se colocaron sobre una cama de hielo y el medio de cultivo o de estímulo se retiró con punta de micropipeta conectada a un kitasato y a un sistema de vacío, posteriormente se añadió PBS 1X frío para lavar las células y nuevamente se retiró con vacío, se inclinaron un momento para retirar todo el PBS 1X después fueron lavadas con PBS 1X frío y se retiró con vacío, asegurándose de retirar todo el líquido manteniendo inclinadas las cajas por un momento.

Se añadió 1 mL del buffer de lisis a cada caja p100, 0.6 mL para cajas p60 y 0.2 mL en cada pozo (caja de 6 pozos) o caja p35; sólo para el caso de los cultivos de células derivadas de la médula ósea en cajas p100, se liso con 0.7 mL. Utilizando un gendarme, se lisaron las células raspando toda el área de la caja de cultivo y recolectando en un extremo todo el lisado. Con micropipeta el lisado se

re-suspendió repetidamente y se transfirió a tubo eppendorf para centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min para obtener lisados citosólicos. Se tomó volumen suficiente para western blot y estos lisados citosólicos fueron diluidos 4:1 con buffer laemmli 4X que contiene  $\beta$ -mercaptoetanol. Finalmente, los lisados fueron hervidos por 5 minutos en baño maría y centrifugados a 13,000 rpm por 5 min antes de realizar el western blot. En el caso de la lisis de las células de la médula ósea recién extraídas de ratones, el buffer de lisis se añadió al pellet de células una vez que los eritrocitos fueron lisados totalmente con cloruro de amonio y que las células fueron lavadas con PBS 1X.

**Tabla 2.** Inhibidores de proteasas y fosfatasas utilizados buffer de lisis.

Soluciones	[Stock]	[Final]	Volumen
Buffer de tritón 1X			~10 mL
PMSF	0.1 M	1 mM	100 $\mu$ L
$\beta$ -glicerolfosfato	1 M	10 mM	100 $\mu$ L
NaF	1 M	1 mM	10 $\mu$ L
Leupeptina	1 mg/mL	10 $\mu$ g/mL	10 $\mu$ L
Aprotinina	1 mg/mL	10 $\mu$ g/mL	10 $\mu$ L
Ortovanadato	1 M	1 mM	10 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	1 M	1 mM	100 $\mu$ L

Los tubos con lisados se centrifugaron durante 10 min a 13,000 rpm con temperatura de 4°C. Se tomó un volumen 150  $\mu$ L en caso de cajas p35 y p100, 75  $\mu$ L para cajas p60, del lisado evitando el pellet formado y se mezcló con buffer de muestra 4X con el volumen correspondiente de 50 o 25  $\mu$ L para obtener lisados citosólicos totales con buffer de muestra 1X. Los lisados preparados se almacenaron a -20°C o bien, fueron corridos en western blot el mismo día.

### ***PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 0.1 M***

Para preparar el inhibidor de proteasas PMSF 0.1 M, se pesaron 435 mg de PMSF (cat. P7626, Sigma) y se disolvió en 25 mL de isopropanol (cat. I9516, Sigma,), para este procedimiento se utilizaron guantes y cubrebocas dada la toxicidad del reactivo. La concentración de PMSF necesaria en el buffer de lisis final es de 1 mM, por lo tanto, se agregaron 10  $\mu$ L del stock de PMSF (0.1 M) por cada mL de buffer de lisis.

### 9.4.2 Inmunofluorescencia de células fijadas

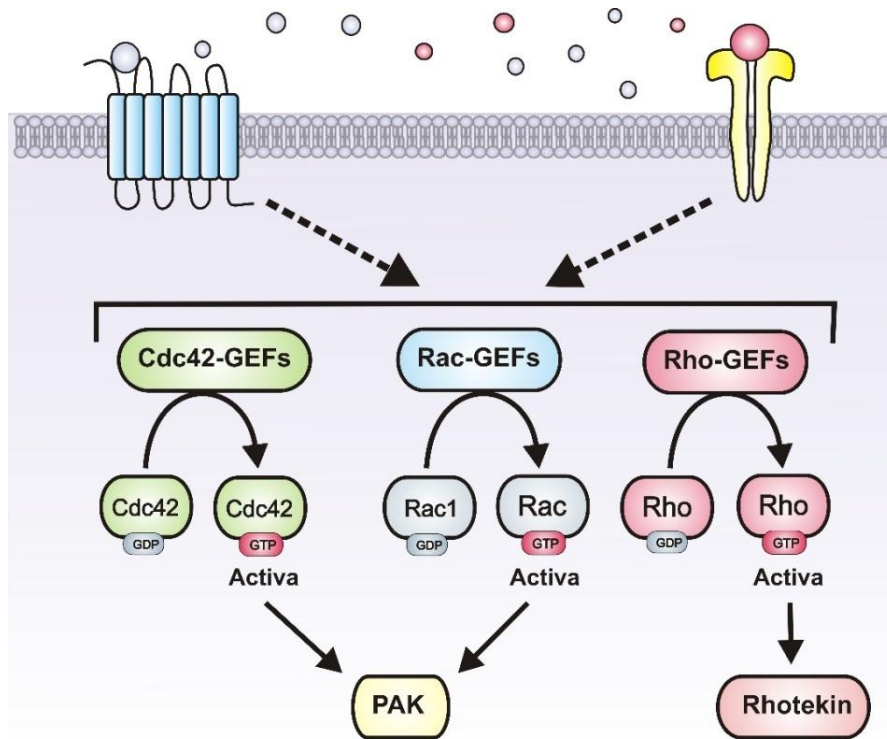
Las células fueron sembradas en un cubreobjeto dentro de una caja p35, para esto primero se añadió alcohol a la caja para desinfectar y se retiró y permitió secar al aire antes de poner el cubreobjeto. Posteriormente se añadió la gelatina 0.02% por una hora (incubación). Las células PAE fueron tripsinizadas y neutralizadas con medio completo DMEM, y se sembraron sobre el cubreobjetos a baja confluencia.

Posteriormente las células fueron transfectadas según las condiciones establecidas, para las células PAE la transfección de las subunidades G $\alpha$  versiones QL fue por el método de polyfect, siguiendo la metodología en la sección correspondiente. Las células fueron ayunadas toda la noche, se lavaron con PBS 1X y se añadió PFA 4% para fijar durante 30 min y luego se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Las células fijadas fueron permeabilizadas con Triton 0.5%, después 3 lavados con triton 0.1% y se tiñó el citoesqueleto de actina con faloidina. Finalmente, las células fueron fotografiadas en un microscopio confocal donde se obtuvieron capturas del citoesqueleto de actina teñido con faloidina y la proteína verde fluorescente para identificar las células transfectadas.

### 9.4.3 Captura de RhoGTPasas activas (Rho-GTP, Rac-GTP y Cdc42-GTP) y RhoGEFs activos

Para determinar la activación de RhoGTPasas y RhoGEFs recurrimos a técnicas de precipitación por afinidad o “pulldown”, en esta captura de RhoGTPasas y RhoGEFs activos se tiene como fundamento los mecanismos de activación de las proteínas y la interacción con sus efectores que continúan la señalización (Figura 14). Los RhoGEFs se unen a las GTPasas con GDP para activarlas, en este proceso el GEF promueve que la GTPasa libere al GDP y en ese momento el GEF tiene mayor afinidad por la GTPasa cuando esta no tiene nucleótido, la naturaleza le dio la propiedad a los GEFs de mantener la interacción fuerte con la GTPasa libre de nucleótido para asegurar que adquiriera un nuevo nucleótido, cuando ingresa el GTP a la GTPasa induce un cambio conformacional que provoca la pérdida de la afinidad del GEF y se separan. Este mecanismo natural se considera para aprovechar las particularidades de la interacción RhoGEF-GTPasa, utilizando como carnadas a proteínas recombinantes de RhoGTPasas mutadas libres de nucleótido (no tienen ni GDP ni GTP), es posible atrapar RhoGEFs activos disponibles en los lisados de células de mamífero que tienen alta afinidad por la GTPasa correspondiente cuando. Las mutantes libres de nucleótido de Rac-G15A, Cdc42-G15A y Rho-G17A fueron preparadas como proteínas recombinantes en bacterias y ancladas a

glutación safarosa para poder precipitar a los GEFs que tengan afinidad por las respectivas GTPasas  
 113. Figura 15



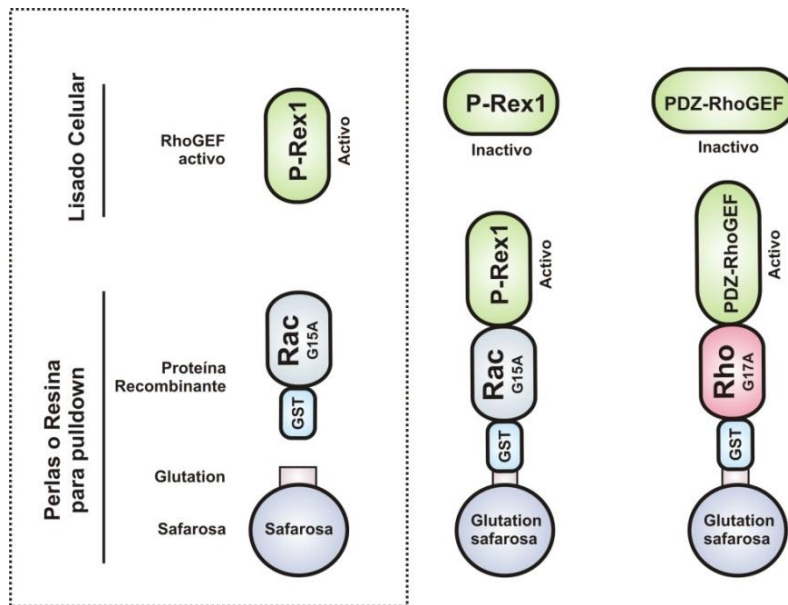
**Figura 14. Fundamento de la captura de GTPasas activas y RhoGEFs activos.** Receptores membranales pueden llevar a la activación de diferentes GEFs con especificidades para Cdc42, Rac y/o Rho; a su vez, estas GTPasas activas (unidas a GTP), interactúan con las proteínas efectoras, para el caso de Cdc42 y Rac pueden activar a la cinasa PAK a través del dominio CRIB de PAK, mientras que Rho interactúa con el dominio RBD de Rhotekina.

Los RhoGEFs activos se capturaron a partir de lisados celulares y se pudo realizar simultáneamente con la captura de RhoGTPasas al dividir los lisados en dos fracciones, o bien, recuperando el lisado celular de una primera exposición a la captura RhoGTPasas activas. Para la captura de RhoGEFs activos los lisados se incubaron durante 1.5 horas con perlas GST-RacG15A para capturar Rac-GEFs activos como P-Rex1, o bien con RhoG17A para capturar GEFs activos para Rho como PDZ-RhoGEF (Figura 15). Las perlas se lavaron tres veces con buffer de lisis y después se añadió buffer 1X Laemmli con  $\beta$ -mercaptoetanol y se hirvió durante 5 min y finalmente los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 min.

La captura de RhoGTPasas activas se realizó siguiendo el concepto para los RhoGEFs, se sabe que las GTPasas como Rac y Cdc42 cuando están activas (unidas a GTP) reconocen e



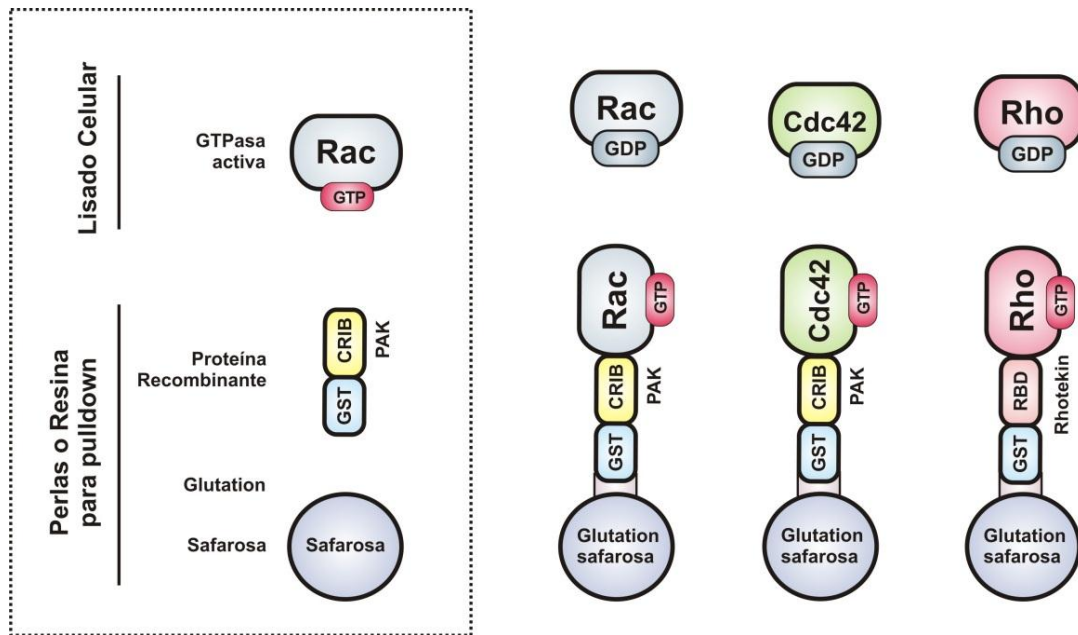
interaccionan con sus efectores para poder activarlos de manera directa, se han caracterizado dominios de unión a GTPasas en las proteínas efectoras, por ejemplo, la cinasa PAK es activada por ambas GTPasas y preparaciones recombinantes del dominio de unión a Cdc42/Rac o CRIB (Cdc42/Rac Interactive Binding) de la cinasa permite capturar a las GTPasas Rac y Cdc42 en su forma activa. Por otro lado, para capturar a la GTPasa Rho activa se utiliza el dominio RBD (Ras Binding Domain) de Rhotekina, una proteína de andamiaje reconocida por esta GTPasa (Figura 14 y 16).



**Figura 15. Resinas para la captura de RhoGEFs activos.** Las perlas utilizadas para capturar GEFs fueron preparadas con perlas de glutatión-safarosa que se incubaron con lisados de bacterias para capturar las proteínas recombinantes fusionadas a GST, como GST-Rac-G15A, GST-Rho-G17A, o bien GST-Cdc42-G15A, todas estas GTPasas mutantes son libres de nucleótido (no tienen ni GDP ni GTP) y la resina fue lavada repetidamente para obtener perlas de calidad libres de proteínas bacterianas, para capturar a los RhoGEFs activos correspondientes (en lisados de células de mamífero) que reconocen a las GTPasas libres de nucleótido con alta afinidad <sup>113</sup>.

En el ensayo de captura de GTPasas activas fue importante realizar el proceso de estimulación de manera precisa y, la lisis y pulldown con rapidez hasta obtener las muestras con el buffer laemmli mercaptoetanol. Las células ayunadas toda la noche con el medio correspondiente libre de suero, fueron estimuladas según el diseño experimental y lisadas sobre una cama de hielo con 1 mL de buffer de lisis para una caja p100, con gendarme se recuperó el lisado y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min, tomando del sobrenadante un volumen para el lisado total citosólico (75  $\mu$ L de lisado + 25  $\mu$ L de buffer de muestra). El resto del lisado se pasó a un nuevo tubo (descartando el pellet) con 35 a

40  $\mu$ L de perlas GST-PAK-CRIB (dominio CRIB de la cinasa PAK fusionado a GST) para capturar a Rac1-GTP y Cdc42-GTP, mientras que para capturar a Rho-GTP se utilizaron perlas de GST-Rhotekin-RBD (dominio RBD de Rhotekina fusionado a GST). Las perlas fueron homogenizadas antes de añadir a los lisados y las muestras fueron incubadas en hielo y shaker durante 45 min (Figura 15).



**Figura 16. Resinas para la captura de RhoGTPasas activas.** Las perlas utilizadas para capturar GEFs fueron preparadas con perlas de glutación-safarosa que se incubaron con lisados de bacterias para capturar las proteínas recombinantes fusionadas a GST, como GST-Rac-G15A, GST-Rho-G17A o bien GST-Cdc42-G15A, todas estas GTPasas mutantes son libres de nucleótido (no tienen ni GDP ni GTP) y la resina fue lavada repetidamente para obtener perlas de calidad para capturar a RhoGEFs activos correspondientes (en lisados de células de mamífero) que reconocen a las GTPasas libres de nucleótido con alta afinidad

Transcurrido el tiempo de incubación los tubos fueron se centrifugaron a 5,000 rpm durante 2 minutos a 4°C. El sobrenadante se retiró cuidadosamente utilizando vacío y la pastilla que corresponde a las perlas GST-PAK-CRIB y las GTPasas activas unidas por afinidad, se lavaron 3 veces con 1 mL de buffer de lisis con inhibidores, en cada ocasión se utilizó el vortex brevemente para suspender adecuadamente las perlas en el buffer de lavado. Finalmente, se retiró lo mejor posible el sobrenadante y a la pastilla de perlas se adicionó 40  $\mu$ L de buffer de muestra de Laemmli 1X con mercaptoetanol, después las muestras de pull down y de lisado total citosólico correspondiente, se hirvieron en baño maría por 5 minutos y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.

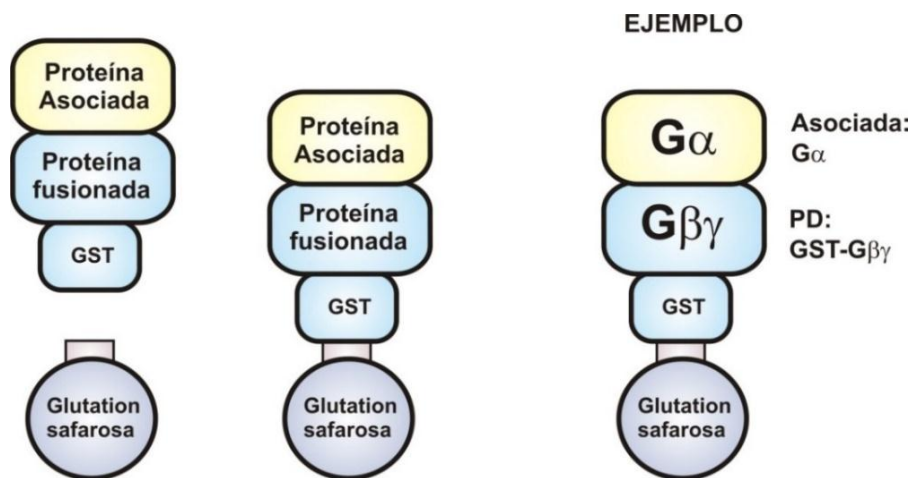
Para capturar las GTPasas activas y RhoGEFs en lisados de células derivadas de la médula ósea, estas fueron ayunadas toda la noche con medio EBM-2 libre de suero y suplementos, al día siguiente se realizó la estimulación con medios condicionados de células tumorales en un curso temporal. Las células HEK293T transfectadas con P-Rex1,  $G\beta_1\gamma_2$  y  $G\alpha_qQL$  o  $G\alpha_{13}QL$ , y las células MCF7 se privaron durante 14 y 24 horas, respectivamente, con DMEM libre de suero antes de estimular de ser el caso y de lisar a las células. Los lisados obtenidos a partir de células transfectadas se incubaron de igual manera durante 45 minutos con 25  $\mu$ L perlas de GST-PAK-CRIB en hielo y shaker para la captura de Rac-GTP o bien, 1 hora con 25  $\mu$ L perlas de GST-RacG15A para capturar RacGEFs activos como P-Rex1.

Nota: Brevemente, las proteínas recombinantes se prepararon en bacterias *E. coli* BL-21 transformadas con los plásmidos correspondientes, se crecieron en 5 mL de medio (toda la noche) y posteriormente se escalaron a 250 mL de medio LB durante 3 horas a 37°C en agitación (150-200 rpm). Una vez obtenidas suficientes bacterias en este volumen de medio, se añadió 250  $\mu$ L de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido, sigma, stock 0.2M, final 0.2mM) para inducir la síntesis de la proteína recombinante durante toda la noche a 18°C (para evitar más proliferación) en agitación. Al día siguiente se centrifugaron (5,000 rpm/10 min a 4°C) y el pellet de bacterias fue suspendido en buffer y sometido a 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento con nitrógeno líquido. Después, el lisado de bacterias se sonicó 3 veces, se centrifugó (10,000 rpm/30 min) y el sobrenadante fue recuperado e incubado con 250  $\mu$ L de glutatión-safarosa durante una hora en shaker/hielo para atrapar a la proteína recombinante fusionada a GST. Finalmente, se realizaron 3 lavados de las perlas y se resuspendieron en un volumen de 750  $\mu$ L con 120  $\mu$ L de glicerol para almacenar a -20°C.

#### 9.4.4 Ensayos de pulldown de His6- y GST-

Las interacciones proteína-proteína fueron de relevancia en este proyecto para caracterizar cascadas de señalización y regulaciones intramoleculares que permitieran postular mecanismos de activación de los RhoGEFs, por ejemplo, realizando ensayos de precipitación por afinidad o pulldown de un elemento y buscar la asociación de otro elemento que hipotéticamente podría interactuar (Figura 17). Se realizaron ensayos de pulldown de His6- y GST- en las células HEK293T transfectadas con GST- $G\beta_1\gamma_2$  o bien, His6- $G\beta_1/His6-\gamma_2$ , utilizando las resinas de glutatión-safarosa 4B (GE healthcare, cat. 17-0756-05) y talon (Clontech, cat. 8908-2), respectivamente. En el caso de los ensayos de pulldown en HEK293T, las células fueron sembradas en cajas recubiertas con Poli-D-

Lisina 1X, mientras que las células COS7 fueron sembradas sin matriz de adhesión. Al día siguiente, las células HEK293T fueron transfectadas con GST-G $\beta_1\gamma_2$  o His6-G $\beta_1$ /His6- $\gamma_2$ , y con diferentes subunidades G $\alpha$  (WT o QL) utilizando el sistema de transfección con lipofectamina-plus. Después de 48 horas de transfección, las células ayunadas con medio libre de suero se lisaron con buffer de lisis y gendarme como se describió previamente. Para el ensayo de pull down de His6, al buffer de lisis se añadió imidazol 20 mM. Los lisados se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C y se tomó lisado total citosólico (75  $\mu$ L de lisado + 25  $\mu$ L de buffer de muestra). El resto de los lisados fueron transferidos a tubos nuevos con 25  $\mu$ L de perlas de glutatión-safarosa (GST-) o bien talón (His-) y se incubaron en hielo por 30 minutos con agitación constante, para separar el heterodímero G $\beta_1\gamma_2$  y sus proteínas asociadas, y luego se lavaron tres veces con buffer de lisis. Finalmente, las perlas se suspendieron en 40  $\mu$ L de buffer Laemmli 1X con  $\beta$ -mercaptoetanol, se hirvieron durante 5 min y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min, posteriormente se realizó western blot.



**Figura 17. Esquema del ensayo de pulldown para interpretación de los resultados.** Para los ensayos de pulldown de GST- (o bien, 6His), los lisados de células que previamente fueron transfectadas con una proteína fusionada a GST y la cual se desea aislar del resto de las proteínas celulares, aprovechando la alta afinidad de perlas de safarosa unidas a glutatión y el GST de la proteína de fusión; de esta manera detectamos proteínas que tuvieran interacciones estables con la proteína fusionada a GST. Como ejemplo, para el caso donde transfectamos GST-G $\beta\gamma$ , fue aislada del resto del lisado con perlas de glutatión-safarosa y detectamos algunas subunidades G $\alpha$  que interaccionaron fuertemente con GST-G $\beta\gamma$ .

#### 9.4.5 Ensayo de Inmunoprecipitación

Los lisados totales citosólicos obtenidos a partir de células HEK293T transfectadas con HA-G $\alpha_{13}$  o bien HA-G $\alpha_q$  se incubaron con anti-HA (1:1000) toda la noche en una hielera sobre un shaker en refrigeración a 4°C. Al día siguiente, los mismos lisados se incubaron con 30  $\mu$ L de proteína G-

safarosa (Millipore, cat. 16-266) durante 3 horas en hielo / agitador para la región Fc de captura de anticuerpos-HA. Después los lisados se centrifugaron a 5,000 rpm durante 2 min y los sobrenadantes se desecharon con ayuda de vacío. Las perlas de safarosa se lavaron 3 veces con buffer de lisis y se suspendieron en Buffer 1X de Laemmli y se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron 13,000 rpm durante 5 minutos antes de realizar la cromatografía en capa fina.

Las células HEK293T se transfectaron con plásmido apropiado usando el método de lipofectamina, y se cultivaron con  $^{32}\text{P}$  (169  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ ), estas condiciones de cultivo se incorporaron en el metabolismo celular. Posteriormente realizado pulldown e inmunoprecipitaciones, lisados fueron eluidos por cromatografía en capa fina, GDP o GTP se unen a las subunidades  $\text{G}\alpha$  se reveló por autorradiografía de fósforo-32.

Para el análisis de competencia de la interacción  $\text{G}\beta\gamma$ - $\text{G}\alpha_{13}\text{QL}$  con los dominios RGL de PDZ-RhoGEF, los lisados celulares fueron sometidos a pulldown GST con la finalidad de bajar  $\text{G}\beta\gamma$ - $\text{G}\alpha_{13}\text{QL}$ , posteriormente se recuperaron nuevamente los lisados celulares a los cuales se realizó inmunoprecipitación utilizando anti-AU1 para bajar al dominio AU1-RGL y detectar a  $\text{G}\alpha_{13}\text{QL}$  como control positivo de que la interacción entre la subunidad  $\text{G}\alpha$  y el dominio RGL está ocurriendo en los mismos lisados. La incubación se realizó toda la noche en shaker/hielo/4°C y al día siguiente los lisados se incubaron con 25  $\mu\text{L}$  de proteína G. Finalmente se realizaron 3 lavados y se añadió buffer de muestra. Anticuerpos utilizados se encuentran incluidos en la Tabla 3.

#### 9.4.6 Detección de proteínas por Western blot

Una vez obtenidos los lisados de las células bajo los tratamientos correspondientes, se preparó un gel de acrilamida según la mezcla de las soluciones indicadas en la Tabla 4 y 5. Para identificar proteínas pesadas arriba de 100 kDa (kilo-daltones), se prepararon geles SDS-PAGE bifásicos de 6%/10% o bien 6%/12%. Para observar de manera adecuada proteínas con peso de 20 kDa como es el caso de las RhoGTPasas y proteínas por debajo de 100 kDa los geles de acrilamida fueron preparados al 12%. Los geles se montaron en la cámara de electroforesis de sigma con buffer de corrida 1X. Para correr los lisados celulares se utilizaron cámaras de western blot y se conectaron a una fuente de poder (BIO-RAD PowerPac Basic).

Los lisados fueron descongelados y aclimatados, posteriormente se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron al máximo durante 5 min para precipitar complejos de proteínas que se hayan

formado. Las muestras fueron cargadas en los carriles según el orden del diseño experimental tomando de 20 a 50  $\mu\text{L}$  según sea el caso con ayuda de una Hamilton con capacidad de 50  $\mu\text{L}$ . Para pulldowns e inmunoprecipitaciones se cargó el total del volumen obtenido (40  $\mu\text{L}$ ) mientras que para los lisados citosólicos totales se cargó de 20 a 30  $\mu\text{L}$ . Los carriles vacíos fueron cargados con buffer laemmli 1X para limitar la extensión de la muestra adyacente. Para tener una referencia del peso de las proteínas a evaluar, se cargó 2-3  $\mu\text{L}$  de un marcador de peso molecular (Precision Plus, Bio-Rad, cat 161-0374), preferentemente se dio un carril de distancia a las muestras de lisados. Las muestras se corrieron a 20 mA durante 4 horas aproximadamente en una fuente de poder Bio-Rad, hasta que las proteínas de interés se distribuyan de manera adecuada para poder transferir y revelar.

Las proteínas separadas en los geles de acrilamida fueron transferidas a membranas Immobilon-P (Millipore, cat. IPV00010), utilizando una cámara de transferencia de Sigma y una fuente de poder a 320 mA por 200 min, o bien 350 mA por 250 min para proteínas arriba de 100 kDa. Primero, el gel de acrilamida se desmontó de la cámara de electroforesis y se sumergió durante 5 minutos en buffer de transferencia para equilibrar, al mismo tiempo la membrana de PVDF se activó al sumergir en metanol. La cámara para transferencia de Sigma se llenó con Buffer de Transferencia 1X, en casetes con esponjas y papel filtro se colocó el gel y encima la membrana de PVDF, asegurándose que la dirección de los electrodos promueva la transferencia de las proteínas en el gel hacia la membrana de PVDF.

Transcurrido el periodo de transferencia, las membranas de PVDF con las proteínas se bloquearon con leche al 5% en 1X TBS-Tween 0.05% durante 1 hora en el shaker a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 5 min con 1X TBS-Tween 0.05%, se cortaron según las necesidades del experimento y se incubaron los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4°C en un agitador. Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces con 1X TBS-Tween 0.05% para retirar el exceso de anticuerpo y se incubaron anticuerpos secundarios (anti-mouse o anti-rabbit) en leche al 5% en 1X TBS-Tween durante 1 hora. Las membranas se lavaron 3 veces con 1X TBS-Tween 0.05% y se revelaron usando el sustrato de HRP de Immobilon Western Chemiluminescent (Millipore, cat. WBKLS0500), reactivo de revelado, reactivo fijador y placas fotográficas. Los anticuerpos utilizados para western blot se encuentran enlistados en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Anticuerpos utilizados para western blot e inmunoprecipitación.

Anticuerpo	Origen	Marca	Catálogo	Dilución	Incubación
Anti-PDZ-RhoGEF	rabbit	Sigma-Aldrich	HPA014658	1:10000	TBS-T
Anti-LARG	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-25638	1:5000	TBS-T
Anti-p115-RhoGEF	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-20804	1:5000	leche/TBS-T
Anti-P-Rex1	rabbit	Sigma-Aldrich (D808D) Cell Signaling	HPA001927 13168S	1:1000	leche/TBS-T
Anti-Trio	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-28,564	1:5000	TBS-T
Anti-Tiam1	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-872	1:5000	TBS-T
Anti-pMAPK 44/42	rabbit	Cell Signaling	9191	1:10000	TBS-T
Anti-ERK2 total	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-154	1:10000	TBS-T
Anti-pAKT 1/2/3 ser473	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-7985-R	1:5000	TBS-T
Anti-PKB $\alpha$ /AKT1	mouse	Sigma-Aldrich	P2482	1:10000	TBS-T
Anti-pS6	rabbit	Cell Signaling	5364	1:5000	TBS-T
Anti-S6	mouse	Santa Cruz Biotechnology	sc-74459	1:10000	TBS-T
Anti-CREB	rabbit	Cell Signaling	9197S	1:5000	TBS-T
Anti-Rac1	mouse	BD Transduction Laboratories	610651	1:10000	TBS-T
Anti-Rho	mouse	Santa Cruz Biotechnology	sc-418	1:5000	TBS-T
Anti-Cdc42	mouse	Santa Cruz Biotechnology	sc-8401	1:5000	TBS-T
Anti-RhoJ	mouse	Abcam	ab57584	1:5000	TBS-T
Anti-pan-Ras	mouse	Merck Millipore	OP40	1:10000	TBS-T
Anti-G $\beta$	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-261	1:5000	TBS-T
Anti-G $\alpha_q$	rabbit	Santa Cruz Biotechnology,	sc-392	1:5000	TBS-T
anti-G $\alpha_{13}$ (Cter / Nter)	rabbit	Serum / Santa Cruz	sc-410	1:10000	Leche/TBS-T
anti-G $\alpha_{12}$	rabbit	Santa Cruz Biotechnology,	sc-409	1:3000	TBS-T
mTOR	rabbit	Millipore		1:3000	TBS-T
anti-PRKAR1 $\alpha$	mouse	BD Transduction Laboratories	610165	1:10000	TBS-T
anti-GST	mouse	Santa Cruz Biotechnology	sc-138	1:2000	TBS-T
anti-Flag	mouse	Sigma-Aldrich	F3165	1:10000	TBS-T
anti-HA	mouse	Covance		1:10000	TBS-T
anti-GFP	mouse	Santa Cruz Biotechnology	sc-9996	1:10000	TBS-T
anti-His	mouse	Sigma-Aldrich	H-1029	1:10000	TBS-T
anti-AU1	mouse	Covance	MMS-130P	1:10000	TBS-T
anti-actina	mouse	suero	-	1:10000	TBS-T
Anti-mouse		KPL	074-1802	1:10000	leche/TBS-T
Anti-rabbit		KPL	074-1516	1:10000	leche/TBS-T
Anti-goat				1:10000	leche/TBS-T



Tabla 4. Soluciones necesarias para la preparación de geles de acrilamida para western blot.

Gel Separador								
Volumen final	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	46 mL	50 mL
<b>6%</b>								
H <sub>2</sub> O	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
Acrilamida 30%	1	2	3	4	5	6	8	10
Tris 1.5M (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
Sulfato de amonio 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
<b>8%</b>								
H <sub>2</sub> O	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
Acrilamida 30%	1.3	2.7	4	5.3	6.7	8	10.7	13.3
Tris 1.5M (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
Sulfato de amonio 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
<b>10%</b>								
H <sub>2</sub> O	1.9	4	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
Acrilamida 30%	1.7	3.3	5	6.7	8.3	10	13.3	16.7
Tris 1.5M (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
Sulfato de amonio 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
<b>12%</b>								
H <sub>2</sub> O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
Acrilamida 30%	2	4	6	8	10	12	16	20
Tris 1.5M (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
Sulfato de amonio 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
<b>15%</b>								
H <sub>2</sub> O	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
Acrilamida 30%	2.5	5	7.5	10	12.5	15	20	25
Tris 1.5M (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
Sulfato de amonio 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

Tabla 5. Soluciones necesarias para la preparación del gel concentrador.

Gel Concentrador										
Volumen final	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL	8 mL	10 mL	15 mL	20 mL
H <sub>2</sub> O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8	10.2	13.6
Acrilamida 30%	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1	1.3	1.7	2.53	3.4
Tris 1.5M (pH 8.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1	1.25	1.88	2.5
SDS 10%	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1	0.15	0.2
Sulfato de amonio 10%	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1	0.15	0.2
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01	0.015	0.02



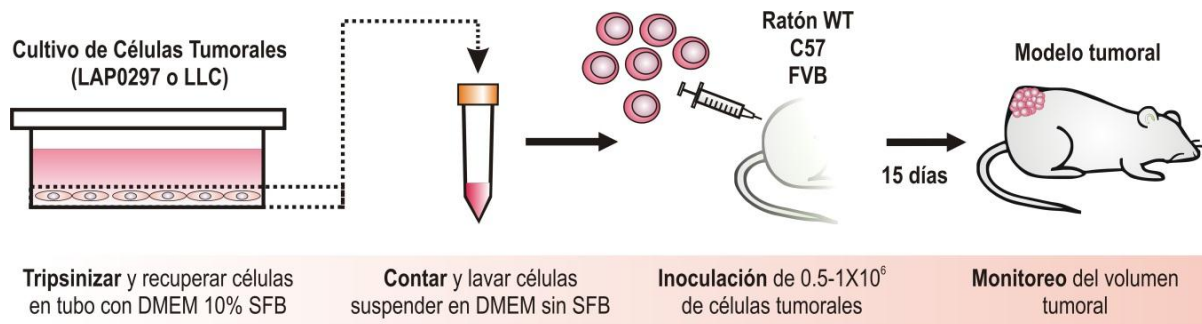
## Solución de Stripping para retirar anticuerpos

Para retirar los anticuerpos revelados en una primera ocasión, las membranas fueron desnudadas con solución de stripping (10 mL) preparada con SDS-glicina a pH de 2.0. Se añadió de 5 a 10 mL a la membrana que se desea procesar y durante 30 minutos se colocó en shaker horizontal, posteriormente se retiró y se enjuagó con agua bidestilada, se realizaron 3 lavados con TBS-T para bloquear 1 hora con leche antes de añadir el nuevo anticuerpo primario. En el caso donde el anticuerpo que se desea retirar es muy fuerte (por ejemplo, ERK total, pERK), se añade antes de la solución de stripping, agua hirviendo en shaker durante 2 minutos.

## 9.5 Modelo tumoral en ratones con fondo genético C57 y FVB

### 9.5.1 Inoculación de células tumorales en ratones

Establecimos un modelo de tumor murino, utilizando los cultivos de células tumorales de pulmón, indujimos el desarrollo de tumores en los ratones correspondientes. Para el desarrollo de tumores murinos, los ratones C57/BL6 fueron inoculados con un millón de células de carcinoma de pulmón de Lewis (LLC/D122 con o sin expresión de GFP para su identificación) obtenidas de cultivos confluentes *in vitro* con medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico. Por otro lado, los ratones de la cepa FVB/N fueron inoculados con células de carcinoma alveolar-bronquial de pulmón (LAP0297).



**Figura 18. Diagrama del procedimiento para generar tumores murinos.** Cultivos de células tumorales confluentes fueron tripsinizados para suspender a las células, la tripsina se neutralizó con medio suplementado suero y las células recuperadas en tubo se centrifugaron para preparar una dilución adecuada para contar las células en cámara de Neubauer. Se prepararon diluciones que tuvieran la cantidad de células requeridas en un volumen de 100  $\mu$ L para inocular via subcutánea en el dorso de ratones correspondientes. Finalmente, se monitoreo el crecimiento de los tumores durante 15 días.

Para realizar la inoculación de células tumorales en los ratones, se generaron suspensiones de  $1 \times 10^6$  células en  $100 \mu\text{L}$  de vehículo, es decir  $10 \times 10^6$  células/mL, y se inocularon vía subcutánea en el dorso del animal con una jeringa para insulina 31G X 6mm de 0.3 mL. Consideramos que este procedimiento permite evitar pérdida de la movilidad del ratón y ofrece las mejores condiciones para el seguimiento del desarrollo del tumor.

El procedimiento general para la implantación de células tumorales se muestra en la Figura 18 y se describe a continuación. Las células fueron desprendidas de las cajas p100 con Tripsina-EDTA (0.05- 0.1%), en pocos minutos se neutralizó la proteasa con medio completo (5 mL de DMEM) y se centrifugaron a 1,200 rpm durante 5 min para retirar el medio y suspenderlas en un volumen menor para realizar el conteo de células viables. Se tomaron  $10 \mu\text{L}$  de la suspensión de células y se añadió  $10 \mu\text{L}$  de azul de tripano, posteriormente se realizó el conteo en el hemocitómetro en los 4 cuadrantes esquinados y se prosiguió a calcular la cantidad de células tumorales obtenidas. La cantidad de células se ajustó a diferente concentración ( $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  y  $10 \times 10^6$  células) en un volumen de  $100 \mu\text{L}$  de medio DMEM sin SFB, posteriormente fueron inyectadas por vía subcutánea con una jeringa de 0.3 mL y una aguja 31G x 6mm en el dorso del animal. Los animales controles recibieron el volumen correspondiente de vehículo. Los cálculos realizados en este paso se muestran a continuación.

Cálculo

$$\frac{\text{Conteo celular en cuadrantes}}{4} (10,000)(\text{Dilución}) = \text{Células/mL}$$

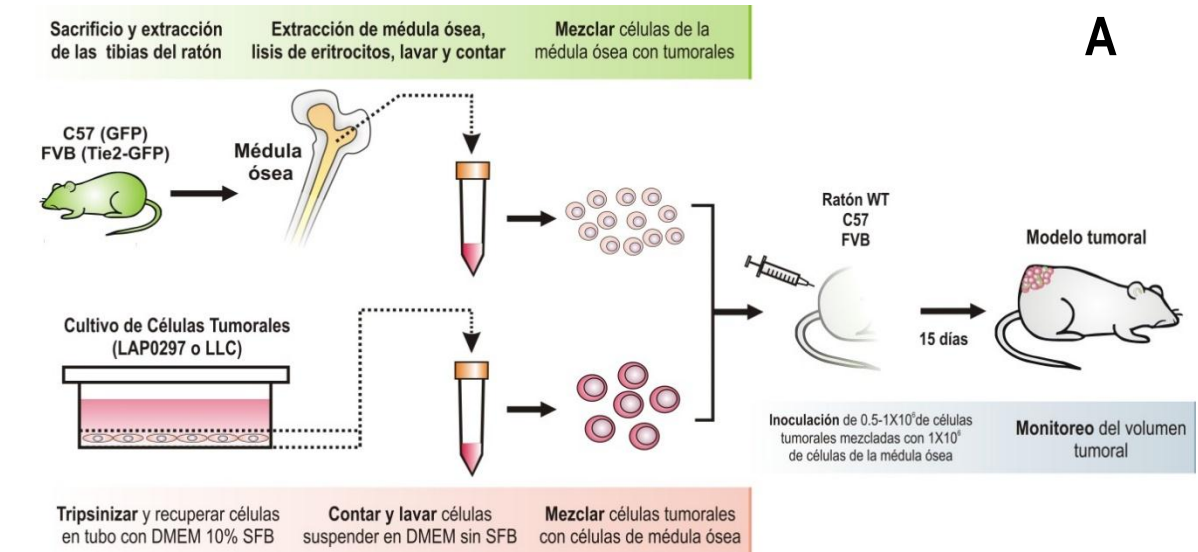
$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} (\text{Volumen total de suspensión de células}) = \text{Total de células}$$

El desarrollo de tumores se evaluó tomando mediciones periódicas del diámetro del tumor una vez que este fue evidente al tacto y macroscópicamente visible. Los tumores comenzaron a detectarse al tacto entre el tercer y cuarto día, el volumen del tumor en el ratón se determinó mediante mediciones del ancho y largo del tumor con un Caliper (Flexbar 18314-C), con estos valores obtenidos el volumen del tumor se calculó mediante la siguiente ecuación:

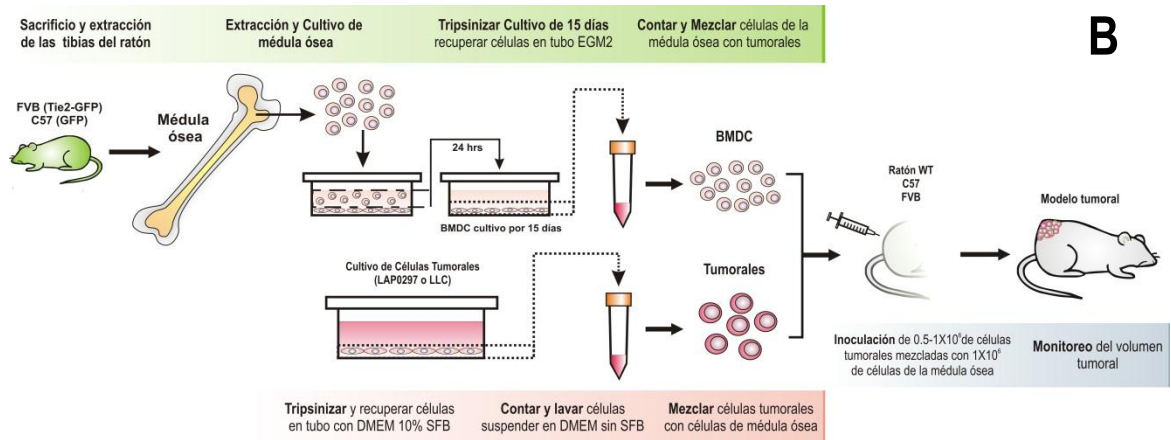
$$\text{Volumen tumoral} = \text{ancho}(\text{largo} * \text{largo})(3.1416/6)$$

## 9.5.2 Participación de células cultivadas de la médula ósea en el crecimiento del tumor primario

### Co-inoculación de células de médula ósea recién extraídas junto con células tumorales



### Co-inoculación de células derivadas de la médula ósea junto con células tumorales



**Figura 19.** Esquemas para el procedimiento para la co-inoculación de células tumorales con células cultivadas de la médula ósea, o bien, células de la médula ósea fresca. **A)** Co-inoculación de células tumorales con células de la médula ósea recién extraídas. Ratones fueron sacrificados y se les extrajo la médula ósea de la tibia, posteriormente se lisaron los eritrocitos y se lavaron las células nucleadas, se contaron y se mezclaron con células tumorales con una relación  $1 \times 10^6$  de tumorales +  $0.5 \times 10^6$  células de la médula ósea. **B)** Co-inoculación de células tumorales con células derivadas de la médula ósea cultivadas durante 15 días en EGM-2MV, tripsinizadas, contadas y mezcladas con células tumorales antes de inocular en los ratones.

Evaluamos en un modelo in vivo el efecto de la co-inoculación de células tumorales con células cultivadas o células recién extraídas de la médula ósea (Figura 19). Los cultivos de la médula ósea una vez que alcanzaron 15 días de cultivo, se les retiró el medio completo (EGM-2MV) y fueron lavadas en dos ocasiones con PBS 1X por lo menos, posteriormente se añadió 1 a 2 mL de tripsina y se incubaron durante ~20 min hasta despegar las células con ayuda de la micropipeta de 1 mL. Una vez que se observen células parcialmente despegadas se añadió EGM-2MV (suplementado) para neutralizar la tripsina; la suspensión de células se trasladó a un tubo falcon de 15 mL y se elevó el volumen para centrifugar a 1,200 rpm durante 5 min, antes de ello se tomó una muestra (10  $\mu$ L) para realizar el conteo y cálculo de las células viables con azul de tripan y con ayuda del hemocitómetro. El sobrenadante se retiró y se añadió el volumen correspondiente para obtener la cantidad de células/ $\mu$ L necesarios para la inoculación.

Simultáneamente se prepararon las células tumorales para la inoculación, para ellos se tomaron cajas P100 de células LAP0297 o bien, LLC confluentes para retirarles el medio suplementado (DMEM con SFB 10% y antibióticos) con ayuda de vacío; fueron lavadas con PBS 1X y se despegaron con 1 mL de tripsina por caja. La tripsina se neutralizó con DMEM suplementado (relación 1:5 de tripsina:medio); se tomó una muestra de la suspensión de células para cuantificar con azul de tripan y hemocitómetro. Para el caso de LLC fue necesario filtrar con redes cell strainer 40  $\mu$ m después de tripsinizar y antes de tomar muestra para el conteo de células, esto se realizó para evitar inocular grumos de células tumorales. Posteriormente se centrifugaron a 1,200 rpm durante 5 min para preparar la suspensión de células con el volumen adecuado para inocular las células tumorales deseadas. Las células se suspendieron en DMEM sin suero y sin antibióticos para la inoculación de los ratones en el dorso.

### **9.5.3 Disgregación de tumor y aislamiento de células de interés**

Realizamos algunos análisis en las células que conformaron los tumores murinos, así como los pulmones de los animales experimentales. Los ratones inoculados, fueron sacrificados y los tumores murinos fueron extirpados con material quirúrgico evitando extraer tejido del entorno tumoral como piel o musculo. El tumor extirpado se lavó tres veces con PBS 1X y es pesado en una balanza analítica, posteriormente el tumor fue triturado con ayuda de pinzas y tijeras quirúrgicas en un vidrio sobre una cama de hielo, después el tejido tumoral se coloca en un tubo falcon de 50 mL con 10 mL de

colagenasa II (concentración) en DMEM y un agitador magnético. El tubo se incubó en baño maría a 37°C con un agitador a velocidad suave durante 45 min a 1 hr (preferentemente hasta observar turbio el DMEM con tripsina, como consecuencia de células disgregadas flotantes).

Una vez obtenida la disgregación del tumor, la suspensión del disgregado tumoral fue filtrada a un nuevo tubo de 50 mL con cell strainer 40  $\mu$ m para obtener sólo la suspensión de células individuales y desechar el tejido tumoral parcialmente disgregado. Posteriormente se añadieron 40 mL con una solución de SFB al 5% en PBS 1X para neutralizar a la colagenasa II y se centrifugó a 1,200 rpm por 5 min. Se retiró el sobrenadante y el pellet de células se re-suspendieron en 100  $\mu$ L de PBS 1X y se dividió en tubos para incubar con anticuerpos marcados con colorante fluorescente para citometría de flujo. Los anticuerpos fueron incubados durante 30 min en los tubos colocados en hielo y envueltos con papel aluminio para protegerlos de la luz blanca. Después del tiempo de incubación, las células fueron suspendidas en un volumen de 15 mL de PBS 1X y centrifugadas para realizar lavado de los anticuerpos. Finalmente, las células fueron suspendidas en 2 mL de PBS 1X y colocadas en tubos para citometría en hielo hasta la evaluación en el citómetro.

#### 9.5.4 Análisis por citometría de flujo de los marcadores celulares

Realizamos análisis de citometría en células de la médula ósea extraídas de las tibias de ratones, en células cultivadas de la médula ósea (por 15 días), en tumores y pulmones extirpados y disgregados de los modelos murinos de tumor. La citometría en células extraídas de la médula ósea se realizó mediante el sacrificio de un ratón (de fondo genético FVB o bien, C57), estas fueron sometidas a lisis de eritrocitos con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  durante 10 min y después se añadió PBS1X y se centrifugo durante 5 min a 1,200 rpm. El pellet de células de la médula ósea se resuspendió en un volumen adecuado para incubar cada condición con 100  $\mu$ L de células + anticuerpo(s) en tubos independientes durante media hora en hielo y cubiertos de la luz.

Las BMDC fueron tripsinizadas y neutralizadas con el medio suplementado EGM-2MV, posteriormente fueron centrifugadas para retirar el medio y suspendidas en 50  $\mu$ L de PBS 1X, se añadieron los anticuerpos correspondientes para citometría con volumen de 0.5-1  $\mu$ L (según la Tabla 6) y fueron incubados en hielo durante 30 minutos. Pasado el tiempo de incubación, las células fueron lavadas con PBS 1X (llevar a 15 mL) y centrifugadas a 1,200 rpm, se retiró el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur conectada a vacío y el pellet de células se re-suspendió en PBS-1X en un

volumen de 2 a 3 mL para evaluar en citómetro. Los marcadores de la superficie celular se evaluaron en los citómetros Fortessa y Cyan. Los datos fueron analizados en Summit 5.1 y Kaluza.

**Tabla 6.** Anticuerpos utilizados para citometría de flujo.

Anticuerpo	Volumen	Marca	Catálogo
Tie2-PE,	1 $\mu$ L	eBioscience	12-5987
CD45-PE-cyanine7,	0.5 $\mu$ L	eBioscience	25-0451
CD34-eFluor 450	1 $\mu$ L	eBioscience	48-0341
CD31-APC	0.5 $\mu$ L	eBioscience	17-0311
VEGFR2-Alexafluor700	1 $\mu$ L	eBioscience	56-5821
CXCR4-V450	1 $\mu$ L	BD Bioscience	560875
CD11b-FITC,	1 $\mu$ L	eBioscience	553310
CD11b-BV605	0.5 $\mu$ L	BD Bioscience	563015

## 9.6 RT-PCR de la expresión de RhoGEFs y marcadores celulares

Determinamos la expresión de los DH-RhoGEFs y algunos marcadores celulares, para ello obtuvimos el RNA mensajero de células cultivadas (BMDC) y células frescas (BM) recién extraídas de la médula ósea, utilizamos el método de extracción de RNA con TRIzol. Todo el procedimiento se realizó con guantes humedecidos con inhibidor de RNAasas (Molecular BioProducts, RNase away, cat. 7000), y este mismo reactivo se utilizó para limpiar, con ayuda de gasas, el material requerido como las micropipetas.

A partir de una caja p100 de cultivo de la médula ósea se colocó en hielo dentro de la campana de esterilidad, con ayuda de pipeta Pasteur conectada a vacío se retiró el medio suplementado de las células y se realizó un lavado con PBS 1X, nos aseguramos de retirar el exceso de PBS 1X inclinando la caja. Posteriormente se añadió 1 mL de TRIzol (Invitrogen, cat. 15596-018) directamente para lisar las células en la caja de cultivo y con un gendarme se raspó y se recolectó en un tubo eppendorf re-suspendiendo repetidamente con pipeta de 1 mL de manera suave para una lisis más eficiente.

En los casos donde se utilizaron las células de la médula ósea recién extraída, se sacrificó un ratón FVB-Tie2 y se obtuvieron el fémur y tibia de ambas extremidades posteriores, fueron disecadas para extraer la médula ósea como se describe en la sección de cultivo de médula ósea. Utilizando PBS 1X se obtuvo la médula ósea en cajas Petri, posteriormente se pasó a tubos de 15 mL, en el cual

se añadió 4 mL de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  para lisar los eritrocitos durante 10 min. El tubo se llenó de PBS 1X y se centrifugó a 1,200 rpm para retirar el sobrenadante y lavar las células de la médula ósea nuevamente, nos aseguramos de retirar todo rastro de eritrocitos.

Los tubos con lisados fueron incubados durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de nucleoproteínas y posteriormente se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se agitaron manualmente de manera vigorosa durante 15 segundos dejándolos en reposo a temperatura ambiente por 3 min para que se separen las fases adecuadamente. Transcurrido el tiempo de reposo, los tubos se centrifugaron 13,000 rpm por 15 min a  $4^\circ\text{C}$  para la completa separación de 3 fases claramente definidas: una fase roja abajo, una interfase de fenol-cloroformo (blanca), y una capa acuosa incolora arriba. El RNA de las células lisadas se encuentra exclusivamente en la capa acuosa, por ello se transfirió esta fase a un nuevo tubo estéril evitando contaminación de otras fases.

EL RNA fue precipitado de la fase acuosa añadiendo 0.5 mL de isopropanol (2-propanol, Fluka, cat 59298), se homogenizaron los tubos y se incubaron a  $-20^\circ\text{C}$  durante toda la noche. Al día siguiente los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 min a una temperatura de  $4^\circ\text{C}$ . El RNA generalmente no formó un pellet claramente visible por la cantidad de células lisadas, pero aun así el sobrenadante se retiró con ayuda de vacío y se realizó un lavado del RNA añadiendo 1 mL de etanol al 75%, las muestras se agitaron en vortex y centrifugaron a 8,000 rpm por 5 min a  $4^\circ\text{C}$ . Todo el sobrenadante se retiró completamente y el residuo de etanol se dejó evaporar por varios minutos para secar la pastilla de RNA manteniendo el tubo destapado dentro de la campana estéril. Finalmente, el RNA se disolvió en 30  $\mu\text{L}$  de agua DEPC incubando en baño maría a  $55-60^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. Los RNA se cuantificaron y almacenaron a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su uso.

**Tabla 7.** Preparación de la mezcla para eliminar contaminación de DNA en las muestras de RNA, previo a la RT.

Mezcla	Vol ( $\mu\text{L}$ )	Programa Termociclador
DNAsa	0.5	30 min $25^\circ\text{C}$ 15 min $68^\circ\text{C}$ $\infty$ $4^\circ\text{C}$
Buffer 10X	0.5	
RNA	2.5 $\mu\text{g}$ necesarios (p ej. 4 $\mu\text{L}$ )	
DEPC	completar (p ej. 3 $\mu\text{L}$ )	

Volumen final debe ser 8  $\mu\text{L}$ , añadir cada componente de la mezcla en orden ascendente.



Como control realizamos una prueba de PCR que podría considerarse opcional y se describe a continuación. Antes de obtener el DNA complementario (cDNA), se realizó una PCR control utilizando el RNA como templado con la finalidad de evaluar si existe contaminación con DNA, el procedimiento completo para la PCR se describe más adelante. Primero se preparó la mezcla de PCR, mostrada en la Tabla 11. Utilizando el primer de actina y RNA, se preparó y se utilizaron las condiciones del termociclador de la Tabla 12. Posteriormente se preparó un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio en cual se cargaron los productos de PCR (5 y 10  $\mu$ L), un control positivo y un marcador de 100 pb, se corrieron en la cámara de electroforesis a 70 mA y una vez separados adecuadamente se observaron en UV para la búsqueda de bandas correspondientes al amplificado de actina en un gel de agarosa. En caso de obtener amplificado de actina en el RNA extraído, se realizó un tratamiento con DNAasa para degradar los restos de DNA que contaminan el RNA. Para degradar el DNA en las muestras de RNA previo a la RT, se utilizaron las condiciones descritas en la Tabla 7, los volúmenes de los reactivos y las temperaturas del ciclo. Se utilizó: DNasa I recombinant RNase-free (Roche, 04 716 7289) y el kit de RT: SuperScript III First-Strand (Invitrogen, 18080-051).

Los reactivos utilizados se descongelaron en una charola de hielo dentro de la campana previamente esterilizada en UV. Después del tratamiento con la DNAasa para eliminar la posible contaminación con DNA, a los productos de esta reacción (8  $\mu$ L) se le añadió dNTPs y Oligo dT para hibridar las colas de poli-adenina de los RNA mensajeros con el oligo dT (Tabla 8).

**Tabla 8.** Preparación de la mezcla previa a la RT para hibridar el RNA con el Oligo dT.

Mezcla	Vol ( $\mu$ L)	Programa Termociclador
Producto de DNasa	8	5 min 65°C $\infty$ 4°C
dNTPs	1	
Oligo dT	1	

**Volumen final debe ser 10  $\mu$ L**

La mezcla de RT se prepara en hielo dentro de campana y se tiene lista para cuando salga la preparación descrita en la Tabla anterior, se añadan los 10  $\mu$ L de la mezcla RT a cada tubo. Esta mezcla se puede preparar para más de una RT, pero solo se añadan los 10  $\mu$ L correspondientes a cada tubo, Tabla 9. El kit de RT utilizado fue: SuperScript III First-Strand (Invitrogen, 18080-051).



**Tabla 9.** Preparación de la mezcla para la retrotranscripción (RT).

Mezcla	Vol ( $\mu$ L)	para 5 RT (X 5)	Programa Termociclador
<b>Mezcla tratada con DNAsa y con dNTPs/Oligo DT</b>	<b>10</b>		50 min 50°C 10 min 25°C 50 min 50°C
Buffer 10X	2	10	
MgCl <sub>2</sub>	4	20	
DTT	2	10	5 min 85°C
RNA out	1	5	$\infty$ 40°C
Script II	1	5	

Volumen final debe ser 20  $\mu$ L

Finalmente, se añadió la RNAsa Eco y a un ciclo en el termociclador con las condiciones señaladas en la (Tabla 10), para degradar el RNA y conservar el cDNA obtenido de la RT en la mezcla.

**Tabla 10.** Preparación para degradar el RNA posterior a la RT.

Mezcla	Vol ( $\mu$ L)	Programa Termociclador
Producto de la RT	20	20 min 37°C
RNAsa Eco	1	$\infty$ 4°C

Volumen final debe ser 21  $\mu$ L

Los productos finales de RT (cDNA) se guardaron a -20°C hasta que se utilizaron para realizar las PCRs. Para realizar las PCRs se utilizó una mezcla comercial para disminuir variabilidad experimental a la cual únicamente se añadió el cDNA, DMSO y agua, además permitió cargar los productos finales directo al gel de agarosa, dado su color rojo permitió ver el corrimiento de la muestra en el gel. La mezcla comercial fue: Ready mix JumpStar (Sigma Aldrich, cat. P0982). Los reactivos utilizados para la PCR se enlistan en la Tabla 11 y **la secuencia de los primers de los DH-RhoGEFs y de marcadores celulares utilizados se incluye en la sección de Anexos.** Los reactivos se descongelaron en hielo dentro de campana esteril y se prepararon las mezclas requeridas y posteriormente se colocaron en el termociclador con las condiciones mostradas en la Tabla 12.

**Tabla 11.** Mezcla de para PCR de actina, DH-RhoGEFs y marcadores celulares a partir del cDNA.

Mezcla	Vol (µL)	Vol (µL) X 10 DH-RhoGEFs
Ready Mix JumpStart	12.5	125
DMSO	1.25	12.5
H <sub>2</sub> O	10.25	102.5
Primer Actina R	0.5	-
Primer Actina F	0.5	-
RNA	1	10
cDNA	1	c/muestra
*Primer R	1	c/muestra
*Primer F	1	c/muestra

\*Primers utilizados para RhoGEFs o marcadores, sustituyen a los primers de actina y se ajusta el volumen de H<sub>2</sub>O para un volumen total de 25 µL, la tercera columna es un ejemplo para la mezcla necesaria para 10 RhoGEFs o bien, 10 marcadores. La secuencia de los primers se incluye en la sección de Anexos.

Nota: Se realizaron pools cuando se prepararon varias PCRs simultáneas

Ready Mix: JumpStar Ready, Sigma-Aldrich, cat. P0982

**Tabla 12.** Condiciones del termociclador para la PCR punto final utilizadas para marcadores celulares, DH-RhoGEFs y genotipos de ratones.

	Temp	Tiempo
	94°C	10 min
30 ciclos	94°C	30 seg
	61°C	30 seg
	72°C	1 min
	72°C	10 min
	4°C	∞

Una vez que se obtuvieron las PCRs correspondientes a los marcadores y DH-RhoGEFs, se procedió a correr las muestras en geles de agarosa. Para eso, se prepararon geles al 2% de agarosa dado el peso de los productos de PCRs que se esperan entre 100 y 300 pb. La preparación se realizó utilizando buffer TAE 1X, agarosa y bromuro de etidio. Se prepararon geles grandes con 30 carriles para evaluar simultáneamente los marcadores o los RhoGEFs, a 98 mL de TAE 1X se le añadió 2 gr

de agarosa y se calentó en microondas en intervalos de 30 segundos hasta con seguir disolver totalmente la agarosa.

### 9.6.1 Genotipos de ratones transgénicos por PCR punto final a partir de biopsias de la cola

El procedimiento para obtener el genotipo de los ratones fue según las recomendaciones de Jackson Laboratory. Se obtuvo un pequeño fragmento de la cola del ratón mediante el uso de tijeras y pinzas quirúrgicas bajo condiciones de asepsia con etanol al 70% e isodine dentro de una campana de flujo. El fragmento de la cola se colocó dentro de un tubo eppendorf y posteriormente se almacenó a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el procesamiento de las muestras (o de manera inmediata). Para la extracción de DNA a partir de las biopsias del ratón, se preparó un buffer de digestión con proteinasa K a una concentración final de 0.5 mg/mL y se añadió 0.5 mL a cada tubo.

- Buffer de digestión de ADN: 50 mM de Tris-HCl, pH 8.0
- 100 mM de EDTA de pH 8.0
- 100 mM NaCl
- 1% de SDS

Después los tubos fueron incubados toda la noche a  $50-55^{\circ}\text{C}$  con agitación suave para favorecer la disgregación completa de la cola. Al día siguiente se retiraron los tubos de la incubación y se añadió a cada uno 0.7 mL de fenol / cloroformo / alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma Aldrich), y se mezclaron vigorosamente (sin utilizar vortex) durante 1 hr en shaker a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min y se transfirió la fase superior (fase acuosa) a un nuevo tubo. Se añadió 1 mL de etanol 100% (previamente enfriado) al tubo con la fase acuosa a temperatura ambiente y se agitó suavemente repetidas veces hasta que se formó un precipitado de ADN. (Aproximadamente 1 minuto), Se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se retiró cuidadosamente. Posteriormente se realizó un lavado con 1 mL de etanol al 70% ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) y se invirtió varias veces asegurándose de que se despegó el pellet para un mejor lavado. Nuevamente centrifugar 13,000 rpm durante 5 min y retirar cuidadosamente el sobrenadante (con pipeta). Dar otro spin durante 1 min y retirar la última gota con pipeta. El tubo se dejó destapado varias horas o toda la noche dentro de campana para secar al aire y a temperatura ambiente el pellet de DNA seco (o en el

desecador). Finalmente se añadió 200 µL de agua PISA y se incubó a 65 °C durante 15 minutos para disolver el DNA y guardar a -20°C hasta su utilización. Cuantificar la concentración de DNA en el espectrofotómetro y realizar los cálculos correspondientes para obtener una concentración final de 100 ng/mL, concentración ideal para la PCR del transgen y el control (secuencias de primers en Tabla 14). Para la PCR de los genotipos se preparó una mezcla con un volumen final de 25 µL y a partir de este se establecieron los volúmenes como se muestra en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Preparación de la mezcla para PCR de los genotipos de los ratones.

Número	Mezcla	Vol. c/gen (µL)	X 10
1	Ready mix JumpStart	12.5	125
2	H <sub>2</sub> O (Pisa)	7.75	77.5
3	DMSO	1.25	12.5
4	Primer Transgen F	1	10
5	Primer Transgen R	1	10
6	Primer Control F	0.25	2.5
7	Primer Control R	0.25	2.5
8	DNA de ratón	1	10

Nota: Para realizar varias PCRs simultáneas se prepararon pools, la tercera columna muestra el volumen necesario para un genotipo (un tubo), ajustar para el número de muestras que se evaluarán, en la última columna se ejemplifican las cantidades para 10 genotipos. Ready Mix JumpStar: Sigma-Aldrich, cat P0982.

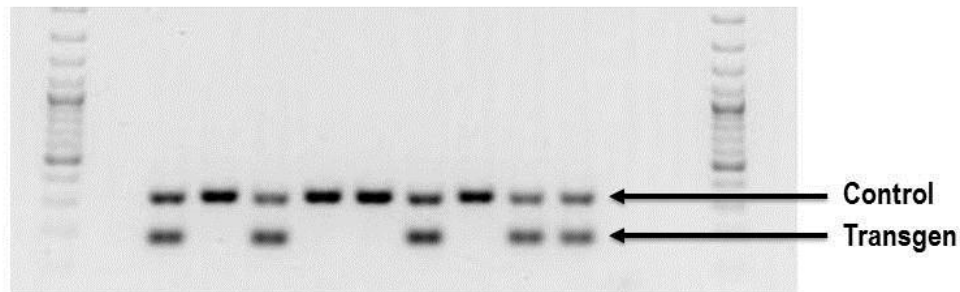
**Tabla 14.** Secuencia de los primers utilizados para el genotipo de ratones.

Primer	Dirección	Secuencia 5' > 3'
Transgen	F	AAG TTC ATC TGC ACC ACC G
Transgen	R	TCC TTG AAG AAG ATG GTG CG
Control positivo	F	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT
Control positivo	R	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C

**Tabla 15.** Condiciones de PCR para los genotipos de ratones C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)131Osb/LeySopJ.

	Temp	Tiempo
35 ciclos	94°C	5 min
	94°C	30 seg
	58°C	1 min
	72°C	1 min
	72°C	10 min
	4°C	∞

Una vez obtenidos los productos de PCR, se preparó un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio en el cual se cargaron las muestras cuidando de no confundir el orden establecido y se cargaron de 5 a 10  $\mu$ L del producto de PCR, fue suficiente para observar las bandas control y en su caso el transgen al visualizar con luz UV (Figura 20).



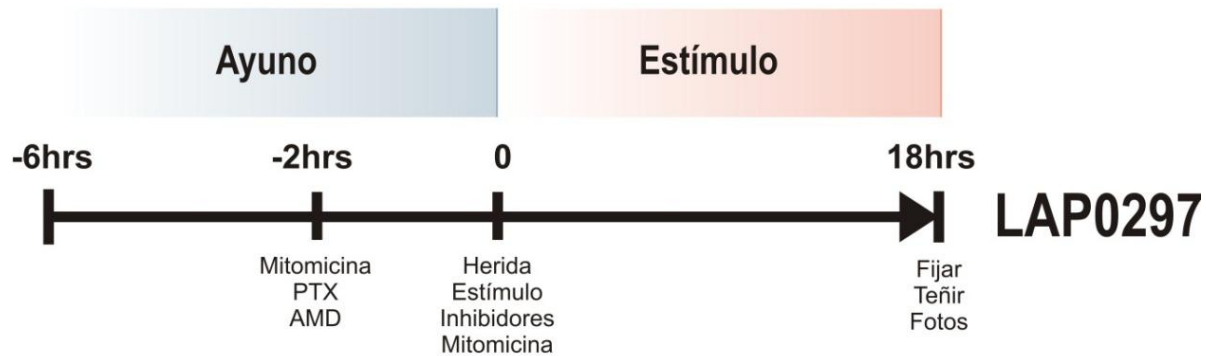
**Figura 20. Genotipos de ratones por PCR.** Fotografía representativa de las bandas correspondientes a los genotipos realizados a partir de muestras de una camada de ratones C57-GFP y WT. La banda de arriba representa al control positivo de la PCR, mientras que la segunda banda (inferior) representa el transgén, las muestras con ausencia de la banda inferior son animales silvestres.

## 9.7 Ensayos de migración celular

### 9.7.1 Migración de células tumorales y células endoteliales en ensayos de cierre de herida

Los ensayos de cierre de herida con las células tumorales LAP0297 (Figura 21) se realizaron en cajas de 6 pozos (p35) y 12 pozos recubiertas con gelatina 0.02% durante 30 minutos, la gelatina (Sigma-Aldrich, cat. G9391, gelatin from bovine skin) fue disuelta en agua miliQ estéril, inicialmente se

preparó un stock al 2%, para ello la solución fue calentada a 37°C para que la gelatina se disolviera, posteriormente se filtró (22 µm), a partir de este stock se realizó una dilución para obtener la gelatina a 0.02%. Aproximadamente 14 horas después fueron ayunadas con DMEM sin suero durante 6 horas, pasadas 4 horas se añadió 6 µL/mL de mitomicina C (Mitomycin C from *Streptomyces caespitosus*, Sigma-Aldrich, cat. M0440) preparada a 2 mM (concentración final de 12 µM) para detener la división celular. Pasadas las 6 horas de ayuno, se realizó la herida con una punta de una pipeta de 10 µL utilizando un portaobjetos como guía para trazar una línea en el centro de la caja de células confluentes. Las células despegadas por la ralladura de la monocapa de células fueron lavadas con PBS 1X. Se realizaron lavados con PBS 1X. El medio de ayuno fue retirado y se añadió medio DMEM nuevo para realizar la estimulación y se tomaron fotografías en tiempo cero para tener el área de herida inicial.

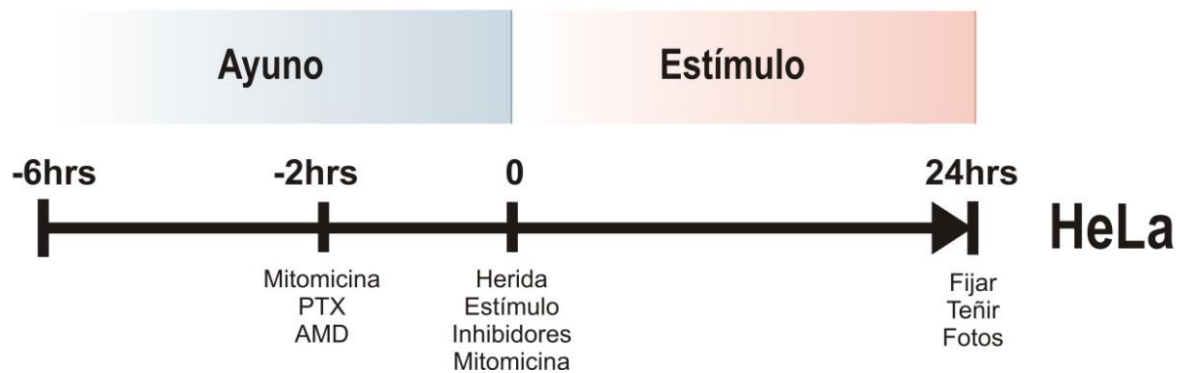


**Figura 21. Diseño experimental para la migración celular de células tumorales LAP0297.** Línea temporal del experimento de cierre de herida de células tumorales LAP0297, fueron ayunadas por lo menos 6 horas y 2 horas antes de la herida se añadió mitomicina y los inhibidores según sea el caso. Al realizar la herida se lavaron las células para retirar los restos celulares y en el medio que se añadió nuevamente se pusieron los inhibidores y el estímulo correspondiente. Finalmente, las células tumorales se fijaron a las 18 horas.

En el caso de la estimulación de células LAP0297 con los medios condicionados de las células derivadas de la médula ósea, el medio de ayuno se sustituyó por EBM-2, en el cual fueron añadidos los estímulos definidos y las diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 del medio condicionado de BMDC. Los ensayos de cierre de herida de células tumorales se llevaron a cabo por 18 horas (tiempo al que cierran herida con medio DMEM con 10% de suero fetal bovino), finalizado el tiempo las células fueron lavadas con PBS 1X y fijadas con 4% de paraformaldehído (PFA) en PBS 1X durante 30 min. Las células son lavadas con PBS 1X y almacenadas a 4°C. Las células fueron teñidas con cristal violeta (0.1% con metanol al 10%) durante 5 minutos y lavadas con PBS 1X, posteriormente se tomaron

fotografías en diferentes campos de la herida. Las fotos fueron analizadas en Image J para obtener el área cubierta de la herida en la monocapa de células. Los inhibidores fueron adicionados a las células tumorales después de realizar la herida y se incubaron durante 2 horas antes de añadir los estímulos a evaluar, las fotografías basales fueron realizadas en este periodo. La toxina pertussis 200 ng/mL o bien, galeína se añadió de manera simultánea con mitomicina C (2 horas antes de estimular) y se volvió a añadir junto con los estímulos a evaluar (Figura 21).

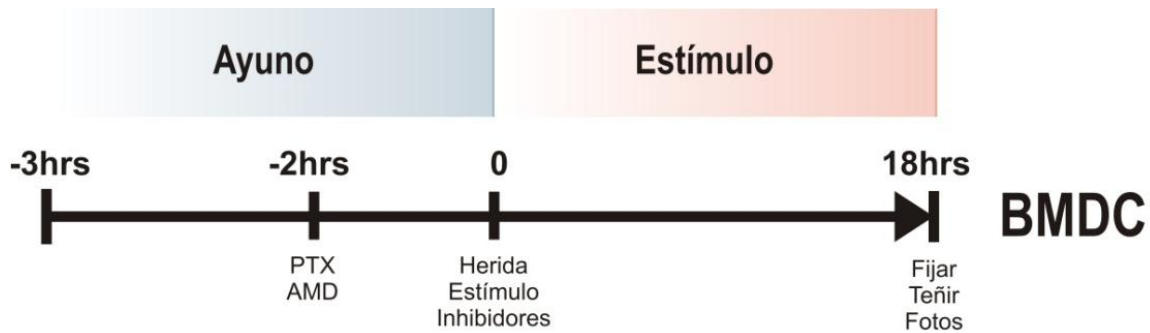
Para evaluar el efecto de las G $\alpha$  constitutivamente activas en la migración, utilizamos células HeLa que se sembraron en gelatina al 0.02% en cajas p35 y se transfectaron (PolyFect, Qiagen cat. 301105) con vector vacío o subunidades G $\alpha$  (Figura 22). Estas células fueron ayunadas durante 4 hrs con DMEM libre de suero y 2 hrs antes de la herida y el estímulo se añadió mitomicina C a 12  $\mu$ M junto con toxina pertussis (200 ng/mL, Calbiochem, cat. 516560) o el antagonista de CXCR4 AMD3100 (10  $\mu$ g/mL, Sigma-Aldrich, cat. A5602). La herida se realizó con una punta de pipeta y cada pozo se lavó con PBS 1X tres veces y finalmente el estímulo como CXCL12/SDF-1 $\alpha$  (100 ng/mL, PeproTech, cat. 300-28A) o DMEM 10% de SFB e inhibidores Se añadieron de nuevo en 2 mL de DMEM para fotografiar la herida. Después de 24 horas, las células se fijaron con paraformaldehído al 4%, se tiñeron con violeta de cristal y se lavaron tres veces con PBS 1X para fotografiar.



**Figura 22. Línea temporal del experimento de cierre de herida en células HeLa.** Los cultivos celulares tumorales HeLa fueron sembradas sobre gelatina 0.02%, después las células fueron ayunadas durante 3 horas con medio sin suero o estímulos. Los inhibidores fueron añadidos 2 horas antes de estimular. Una vez cumplido el ayuno, se realizó la herida con una punta de micropipeta, se lavaron y se añadió el estímulo. Finalmente, las células fueron fijadas con PFA 18 horas después.

### 9.7.2 Migración de células derivadas de la médula ósea en ensayos de cierre de herida

Los ensayos de cierre de herida con las células derivadas de la médula ósea se realizaron en cajas de 12 pozos recubiertas con gelatina 0.02% durante 30 minutos (Figura 23). Las BMDC fueron tripsinizadas y sembradas en las cajas recubiertas con gelatina para que se adhirieran, al día siguiente Aproximadamente 14 horas después fueron ayunadas con EBM-2 sin suero durante 3 horas, pasadas horas de ayuno, se realizó la herida con una pipeta de 10  $\mu$ L utilizando un portaobjetos como guía. Para estos ensayos no se agregó la mitomicina C ya que produce la muerte de las células de la médula ósea en pocos minutos, sin embargo, la proliferación de las células es lenta y por tal razón consideramos que las células no se dividieron durante el tiempo que se pusieron a migrar. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X para retirar las células que murieron durante el tiempo de migración.



**Figura 23.** Línea temporal del experimento de cierre de herida en células derivadas de la médula ósea. Los cultivos celulares de médula ósea posterior a los 15 días; las células fueron ayunadas durante 3 horas con medio sin suero o estímulos. Los inhibidores fueron añadidos 2 horas antes de estimular. Una vez cumplido el ayuno, se realizó la herida con una punta de micropipeta, se lavaron y se añadió el estímulo. Finalmente, las células fueron fijadas con PFA 18 horas después.

Los ensayos de cierre de herida de BMDC se llevaron a cabo por 18 horas (tiempo al que cierran herida con PDGF 100 ng/mL), finalizado el tiempo las células fueron lavadas con PBS 1X y fijadas con 4% de paraformaldehído (PFA) en PBS 1X durante 30 min y después fueron lavadas repetidas veces con PBS 1X y almacenadas a 4°C. Las células fueron teñidas con cristal violeta durante 5 minutos y lavadas con PBS 1X, posteriormente se tomaron fotografías en diferentes campos de la herida. Las fotos fueron analizadas en Image J para obtener el área cubierta de la herida. La toxina pertussis (200 ng/mL) se añadió 2 horas antes de estimular y se volvió a añadir junto con los estímulos a evaluar.



El estímulo utilizado para activar GPCRs fue el SDF-1 (100 ng/mL) y para receptores TrKs utilizamos el PDGF. En el caso de la estimulación con los medios condicionados de las células tumorales, el medio utilizado para ayunar a las células tumorales se sustituyó por EBM-2, en el cual fueron añadidos los estímulos definidos y las diluciones del medio condicionado de tumorales para estimular sin variables del medio a las células derivadas de la médula ósea.

## 9.8 Análisis de los resultados y pruebas estadísticas

Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de tres a cinco experimentos independientes como se indica en el pie de las figuras. Los resultados de citometría se analizaron en el software **Kaluz** y **Summit 5.1**, en los cuales se realizaron las compensaciones y los gráficos. La densitometría para la cuantificación de los westerns blot y las áreas en los ensayos de cierre de herida fueron analizados con el software **Image J**. Los datos de los pixeles de la intensidad de las bandas analizadas por western blot que corresponden por ejemplo a una proteína en estado fosforilado, como pAKT, se ajustó en algunos casos a la cantidad de la proteína total, como AKT total, y a valores que preferencialmente fueran del 0 al 10. Para las comparaciones de tratamiento versus control utilizamos prueba t, mientras que, para los ensayos de cursos temporales de activación para comparar múltiples condiciones experimentales, utilizamos análisis de varianza (ANOVA) de una vía o dos vías seguida de la prueba de Tukey o Dunnett con respecto al basal. Se consideró significancia estadística para valores de  $p < 0.05$ . La descripción de la prueba estadística utilizada se señala en lo pies de figura correspondientes. Las pruebas estadísticas de los datos se realizaron en el software **Sigma Plot 11.0**, mientras que para realizar las gráficas en el software **GraphPad Prisma V6.0**.

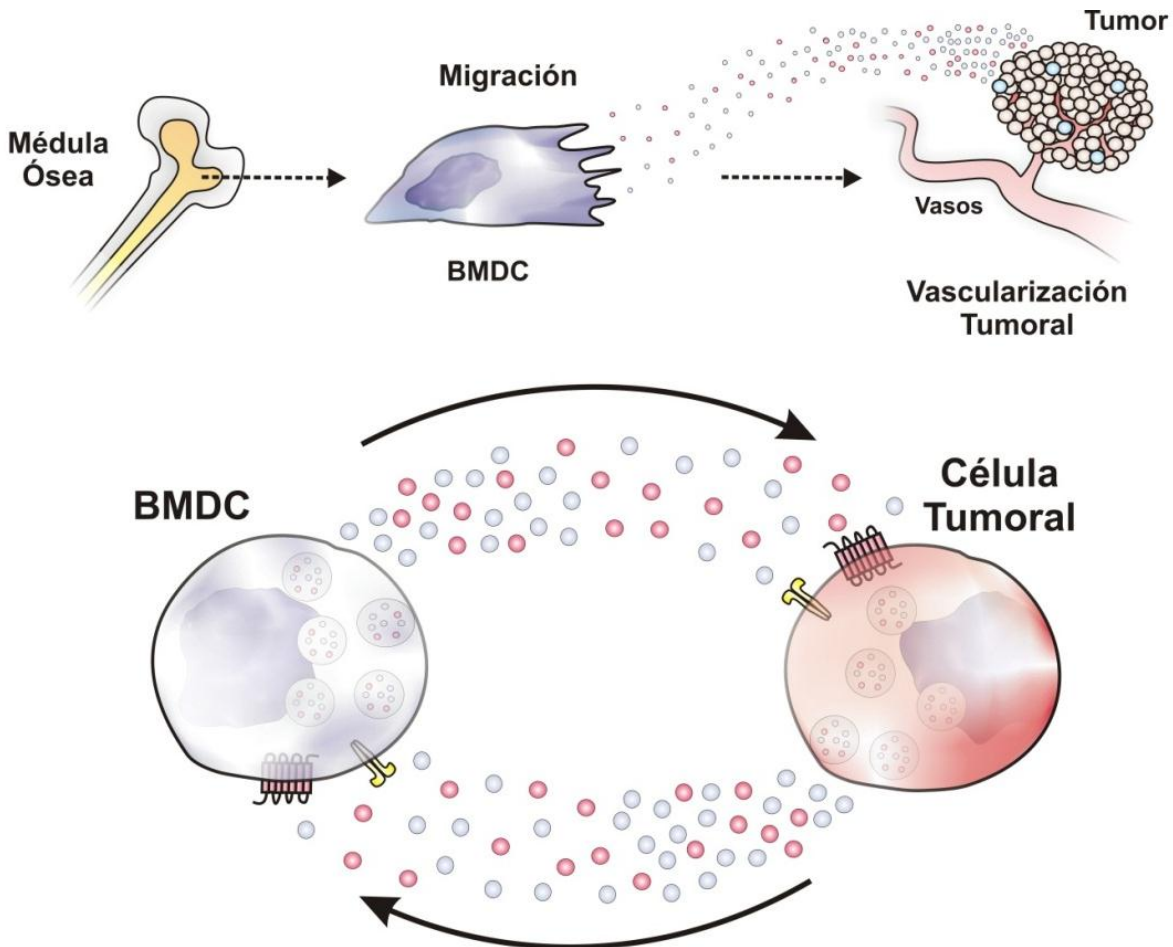


## 10. Resultados

En este proyecto estudiamos la comunicación oncogénica y recíproca entre células derivadas de la médula ósea y células tumorales; profundizamos en aspectos moleculares de la señalización de SDF-1/CXCR4 que llevan a la activación de RhoGEFs como P-Rex1 y cuya vía está involucrada estrechamente en la comunicación entre células de la médula ósea y células tumorales. Como parte del **primer objetivo** estudiamos a células derivadas de la médula ósea (BMDC) con un perfil de marcadores consistente con monocitos/macrófagos-Tie2, y con propiedades pro-tumorales en un modelo murino de carcinoma de pulmón. Profundizamos en la comunicación entre las células tumorales y BMDC mediante la evaluación de vías de señalización clásicas y la migración celular como parte de los mecanismos de comunicación celular que promueven el crecimiento de tumores. Los resultados del **segundo objetivo** se enfocaron en identificar los DH-RhoGEFs que son expresados en las BMDC, encontramos un amplio perfil de RhoGEFs (46 de 62 evaluados) de los cuales algunos fueron diferencialmente expresados con respecto a la médula ósea total. Después, por western blot buscamos algunos RhoGEFs regulados por GPCRs, dentro de los que destacó P-Rex1, un GEF claramente enriquecido en las BMDCs y activado por los medios condicionados de células tumorales, así como las RhoGTPasas Rac, Cdc42 y Rho. Con base en antecedentes y nuestros resultados consideramos que la vía de  $G_i \rightarrow G\beta\gamma/P\text{-Rex1}/\text{Rac}$  es relevante para la migración dependiente de GPCRs quimiotácticos. En el **tercer objetivo**, exploramos en modelos celulares las propiedades intrínsecas de las subunidades  $G\alpha$  de las proteínas G que llevan a señalizar o no por la vía de  $G\beta\gamma$  para explicar por qué la migración dependiente de GPCRs quimiotácticos es comúnmente vía  $G_i$ . Encontramos que la activación de P-Rex1 por  $G\beta\gamma$  se previene por las subunidades  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{13}$  constitutivamente activas (mutantes  $Q \rightarrow L$ ), que mantienen interacción con el dímero  $G\beta\gamma$  (a través de  $\alpha N$ ), inhibiendo también la activación de AKT y la migración celular inducida por SDF-1/CXCR4/ $G_i/P\text{-Rex1}$ . Esta interacción permitió identificar complejos tetraméricos de  $G\beta\gamma\text{-}G\alpha_q\text{QL-RGS2}$ , mientras que para  $G_{13}$  sugerimos un mecanismo para la disociación de  $G\beta\gamma\text{-}G\alpha_{13}\text{QL}$  dependiente del efector de  $G_{13}$ . Finalmente, con una estrategia quimiogénica ( $G_i$ - y  $G_q$ -DREADD) y un sistema endógeno (LPAR acoplado a  $G_q$  y  $G_i$ ), validamos que P-Rex1 y AKT se activan eficientemente por  $G_i$ , pero no por  $G_q$ . Este mecanismo molecular estaría implicado en la modulación de la migración de BMDCs hacia los tumores y en dirección opuesta.

## 10.1 Resultados del OBJETIVO 1

Caracterizar una población de células de la médula ósea que contribuyen al desarrollo de tumores, con énfasis en la comunicación recíproca por activación de vías de señalización y migración celular.



**Figura 24.** La migración de células derivadas de la médula ósea (BMDC) atraídas por mediadores quimiotácticos secretados por las células tumorales distantes y la comunicación pro-tumoral recíproca que establecen. Los tumores en crecimiento liberan mediadores quimiotácticos que activan la migración de células de la médula ósea hasta los tumores y futuros nichos metastásicos. Después de que las células derivadas de la médula ósea invaden los tumores primarios, se sugiere una comunicación intratumoral recíproca entre células tumorales y células derivadas de la médula ósea, activando vías de señalización para la supervivencia, proliferación y migración celular. Por ello, decidimos establecer un cultivo de células derivadas de la médula ósea con efectos pro-tumorales para analizar sus propiedades oncogénicas y los aspectos moleculares para la migración celular en el presente y futuros estudios.

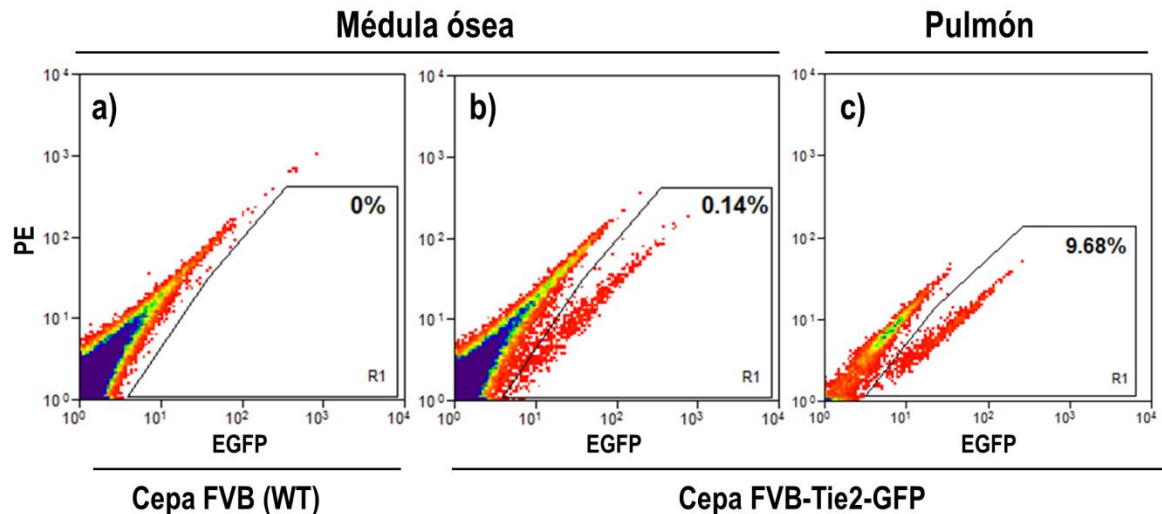
### 10.1.1 Búsqueda de una población de la médula ósea potencialmente pro-tumoral

#### *Cuantificación de células Tie2-GFP en médula ósea fresca por citometría de flujo*

Con base en la literatura, consideramos que varias poblaciones de médula ósea con marcadores proteicos relacionados a células endoteliales pueden reclutarse y contribuir activamente en el crecimiento de tumores en respuesta a la activación de GPCRs quimiotácticos <sup>5,6</sup>. En un primer acercamiento evaluamos cuantas células nucleadas de la médula ósea aisladas de ratones expresan el **receptor Tie2 para angiopoyetina** (FVB/N-TgN(TIE2-GFP) o bien, FVB-Tie2-GFP), comúnmente asociado a células endoteliales <sup>114–116</sup> y a una población macrófagos M2 <sup>5,117</sup>. Este análisis se realizó de manera indirecta en células de la médula ósea extraídas de ratones FVB-Tie2-GFP, los cuales expresan la proteína verde fluorescente (EGFP, Enhanced Green Fluorescent Protein) bajo el promotor del receptor Tie2, es decir, tienen los vasos sanguíneos e hipotéticamente poblaciones de la médula ósea verde fluorescente. En la médula ósea de estos ratones transgénicos se realizó la búsqueda de células positivas a GFP por citometría de flujo que posiblemente correspondería a una población pro-angiogénica (Figura 25).

En la médula ósea recién extraída o fresca, se identificó una población pequeña de células con expresión de Tie2-GFP (~0.14%) que corresponde a una población hematopoyética y probablemente de células progenitoras endoteliales y/o monocitos Tie2+. Validamos el resultado de células Tie2-GFP con el contraste simultáneo de células de la médula ósea de ratones silvestres (FVB/NJ), en los cuales establecimos la región de los plots que señalan la auto-fluorescencia inherente de las células de la médula ósea como control negativo. Además, evaluamos a células disgregadas de pulmones de los ratones transgénicos y encontramos que el 10% de las células de este órgano corresponden a células Tie2+ consideradas como células endoteliales del pulmón; este resultado concuerda con hallazgos previos en los cuales se reportó un ~9% de células endoteliales (Tie2-GFP) que constituyen a los pulmones <sup>118</sup>, nuestros datos de citometría arrojan valores similares. Para contrastar con la auto-fluorescencia se utilizó el canal para el color PE, lo cual nos permitió observar el desplazamiento de las células con fluorescencia GFP positiva. La población Tie2+ cuantificada por citometría fue muy escasa y, por lo tanto, no representó una estrategia eficiente para obtener células Tie2+ u otro tipo de poblaciones celulares putativamente pro-angiogénicas como monocitos-Tie2+ o células progenitoras de endoteliales para evaluar sus propiedades pro-tumorales. Sin embargo, más adelante evaluamos

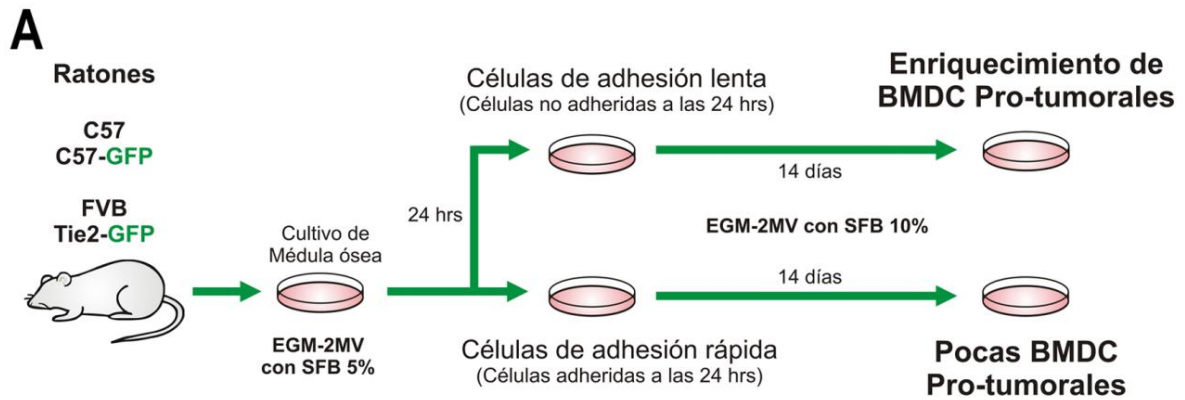
las propiedades de las células nucleadas de la médula ósea fresca (sin cultivar) en el crecimiento de tumores.



**Figura 25.** Existe una población escasa de células Tie2-GFP+ en la médula ósea de ratones transgénicos que expresan GFP bajo el promotor de Tie2 (<1%). Citometría de flujo de células de la médula ósea de ratón FVB WT (plot a), médula ósea de ratón FVB-Tie2-GFP (plot b) y de pulmón de ratón FVB-Tie2-GFP (plot c). La médula ósea de los ratones WT (control negativo) y Tie2-GFP fue extraída de tibias, los eritrocitos fueron lisados y la citometría se realizó en células vivas. Adicionalmente, los pulmones fueron extraídos y disgregados (colagenasa II) para cuantificar las células GFP+ como control positivo, donde se ha publicado que existen ~9% de células Tie2-GFP+ que corresponden a las células endoteliales de los vasos sanguíneos de los pulmones. Los gráficos de densidad son representativos de 3 experimentos independientes.

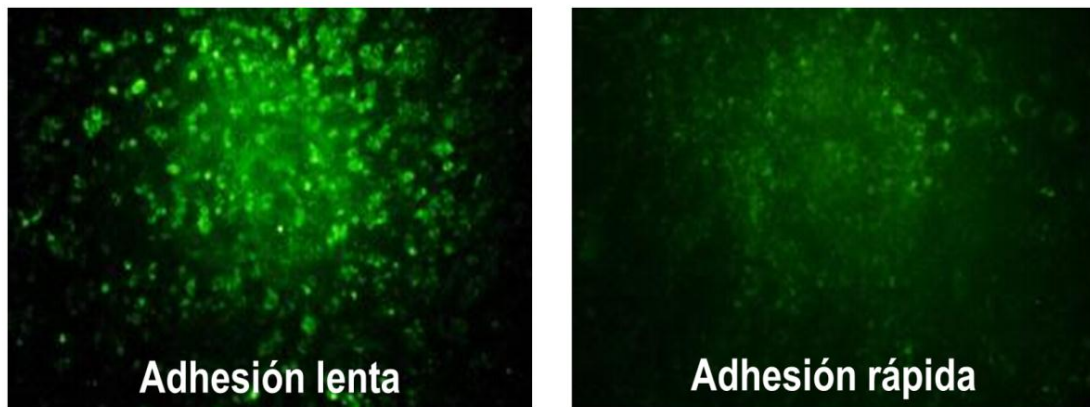
### ***Establecimiento de un cultivo de células derivadas de la médula ósea (BMDC) de ratones y evaluación de la expresión de marcadores celulares por PCR***

Para el desarrollo de este proyecto, implementamos un cultivo de células derivadas de médula ósea de ratones silvestres FVB/NJ y C57/BL6, y ratones transgénicos C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) 131Osb/LeySopJ) y FVB/N-TgN(TIE2-GFP) 287Sato/J siguiendo algunas de las condiciones señaladas en el protocolo reportado previamente por Sekiguchi y colaboradores en 2008, quienes desarrollaron un cultivo de médula ósea enriquecido con células progenitoras de endoteliales que evaluadas funcionalmente, contribuyeron a la vasculogénesis inducida por isquemia cardíaca <sup>29</sup>, por ello, nosotros hipotetizamos que este tipo de cultivos promotores de neovascularización podrían contribuir al crecimiento de tumores.



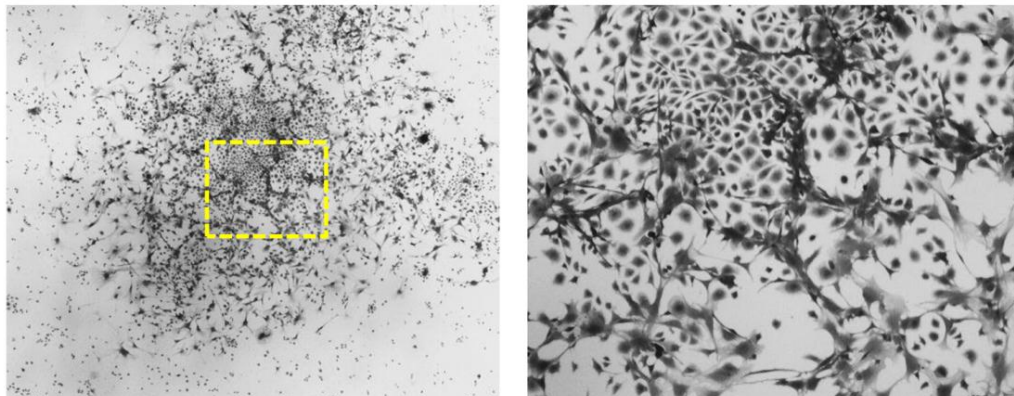
**B**

BMDC cultivadas de médula ósea de ratones Tie2-GFP



**C**

Colonias



**Figura 26. Cultivo de células derivadas de la médula ósea de ratones. A)** Diseño experimental para el cultivo de células de la médula ósea y la predicción de sus propiedades pro-tumorales con base en la literatura. **B)** Fotografías representativas de los cultivos de médula ósea (ratones FVB-Tie2-GFP) donde encontramos enriquecimiento de células verde fluorescente. **C)** Colonias de cultivos de BMDC a los 15 días, fijadas y teñidas con cristal violeta. Fotografías en microscopio estereoscópico de fluorescencia Nikon SMZ25.



Brevemente, en nuestro trabajo las células nucleadas de la médula ósea fueron extraídas de la tibia y fémur de ratones de 6-8 semanas y sembradas sobre pronectina durante 24 horas en un medio de cultivo para células endoteliales (EGM-2MV, 5% de SFB). Las células que permanecieron flotando a las 24 horas de la siembra, fueron separadas en otras cajas recubiertas con pronectina (las células de interés se adhieren de 48-72 horas). Finalmente, las escasas células adheridas forman colonias que crecen durante 14 días en EGM-2MV con 10% de SFB, para comenzar a utilizarlas. El esquema del proceso de cultivo de médula ósea y fotografías de las colonias formadas se muestran en la Figura 26. En los cultivos de médula ósea que realizamos con ratones FVB-Tie-GFP encontramos que **las células verdes fluorescente (hipotéticamente Tie2+) eran enriquecidas particularmente en el cultivo de las células que se adhirieron después de 24 horas de la primera siembra**, las cuales denominamos de adhesión lenta, mientras que en los cultivos de células que se adhirieron durante las primeras 24 horas (adhesión rápida) observamos menor cantidad de células GFP+ (Figura 26B). En el cultivo de médula ósea, encontramos colonias celulares tanto pequeñas como grandes, con fenotipos diferentes, algunas células se observaron muy granulares y redondas, mientras que otras células se observaron lisas y alargadas comúnmente más grandes que las primeras (Figura 26C). Posteriormente a los experimentos realizados para la estandarización de cultivos de médula ósea, se descartaron las células que fueron adheridas en las 24 hrs (adhesión rápida), y trabajamos sólo con células que se adhieren después de las 24 horas, y que según lo reportado podrían tener un efecto pro-tumoral.

Durante el desarrollo del cultivo de las células de la médula ósea nos quedó claro que las células adheridas finalmente a la caja de cultivo y las cuales proliferaron hasta desarrollar las colonias de células, fue una fracción mínima del total de las células de la médula ósea. Este hecho nos hizo pensar que las células que se obtuvieron al finalizar las dos semanas de cultivo celular, tendrían una expresión diferencial de proteínas como marcadores celulares con respecto al total de las células nucleadas de la médula ósea por las siguientes razones: 1) consideramos que pocas poblaciones celulares fueron las que se adhirieron del total de las poblaciones celulares que existen en la médula ósea, funcionó como un método de selección; 2) las pocas células adheridas fueron las que proliferaron, por lo tanto, se enriquecieron durante las dos semanas de cultivo, como un método de clonación; y 3) es muy posible que el medio de cultivo utilizado favorezca la adhesión y proliferación de células seleccionadas que respondan a los factores de crecimiento contenidos y/o se promueva una diferenciación particular de las células adheridas como consecuencia del medio de cultivo



favorable para células endoteliales. Por esta razón decidimos evaluar la expresión de algunas proteínas a nivel del mRNA, algunos westerns de proteínas de lisados celulares que se muestran en secciones más adelante, así como una prueba funcional para contrastar las poblaciones que fueron cultivadas y expandidas con respecto al total de las células nucleadas de la médula ósea.

Las células derivadas de la médula ósea (como denominamos a las cultivadas durante dos semanas) y células de la médula ósea fresca, mostraron un perfil de marcadores muy similar a nivel del mRNA entre las dos condiciones de las células de la médula ósea (Figura 27). Analizamos por PCR punto final, la expresión de algunos marcadores para células endoteliales (Tie2, CD31, Ang1, VEGFR2, VE-cadherina), células progenitoras (CD133, CD34, Id1 y c-Kit), y otros marcadores que señalan células de la médula ósea y células hematopoyéticas (CXCR4, PDGFR $\beta$  y CD45). Consideramos evaluar marcadores de células endoteliales con base en información reportada correspondiente al enriquecimiento de estos marcadores en células progenitoras de endoteliales y células pro-angiogénicas derivadas de la médula ósea <sup>29</sup>. Como control incluimos a la actina que nos permitió normalizar en cada experimento para detectar las diferencias en la expresión de los marcadores señalados (además de la cuantificación del mRNA que se ajustó previo a la obtención del cDNA).

En la Figura 27 se muestra la gráfica de la expresión de los marcadores donde se contrasta la médula ósea cultivada versus médula ósea recién extraída. Encontramos diferencias significativas: **la expresión de los marcadores CD31, CD133, CD34 y c-kit el mRNA disminuyó en células cultivadas de la médula ósea (BMDC)**; por otro lado, **el mRNA del receptor a PDGFR2 incrementó significativamente en estas BMDC**. Por su parte, el mRNA del receptor Tie2 mostró una tendencia a disminuir en las células cultivadas de la médula ósea, aunque no fue significativo, sugiere que el receptor a nivel de proteína podría estar disminuyendo bajo las condiciones de cultivo, contrastando con nuestra hipótesis a nivel de la expresión del mRNA, esperábamos diferencias claramente definidas en la condición donde las células de la médula ósea son seleccionadas mediante la adhesión a la ProNectin y el medio de cultivo para células endoteliales durante 15 días, versus aquellas células nucleadas recién extraídas de la médula ósea. Sin embargo, en las siguientes secciones mostramos resultados de citometría de flujo del receptor Tie2 en la superficie de las células de la médula ósea y una comparación de las propiedades pro-tumorales de las células cultivadas y las células obtenidas en fresco.

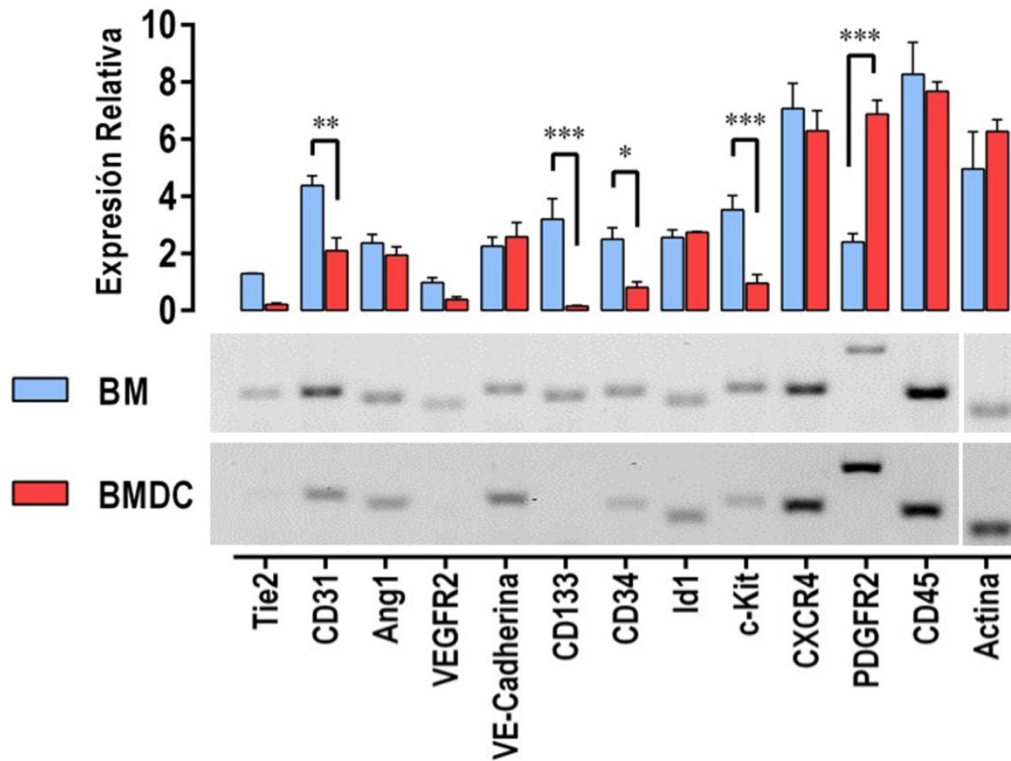
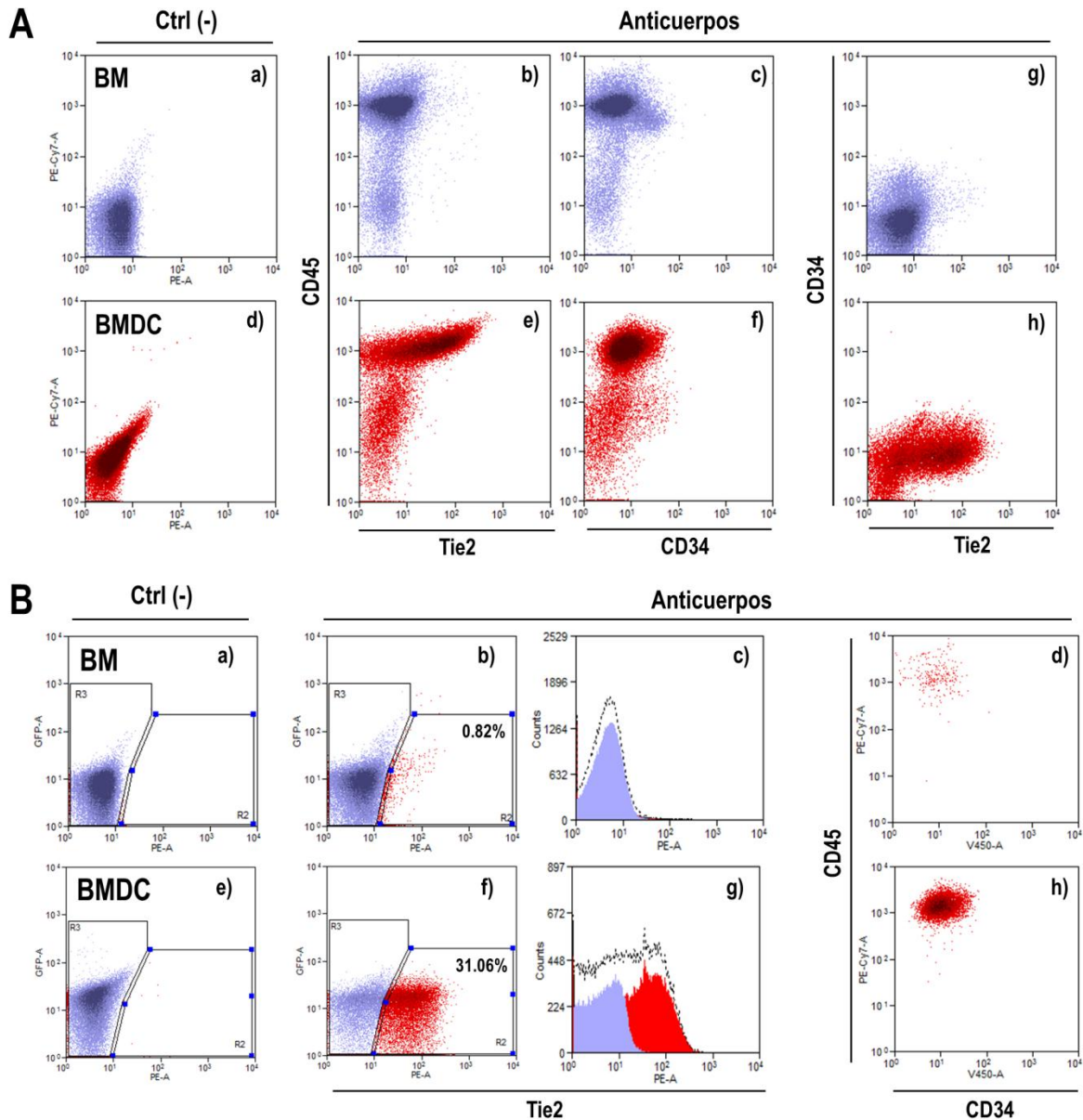


Figura 27. Expresión del mRNA de marcadores (células endoteliales, progenitoras y hematopoyéticas) en las células derivadas de la médula ósea (cultivadas) y en células de la médula ósea recién extraída. Se obtuvo el mRNA de células de la médula ósea fresca (BM) de ratones FVB y de células derivadas de la médula ósea que fueron cultivadas por dos semanas (BMDC), posteriormente se realizó RT-PCR de diferentes marcadores celulares. Los datos representan la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Tukey.

### 10.1.2 Enriquecimiento de células Tie2<sup>+</sup> en los cultivos de células derivadas de la médula ósea

Para determinar las poblaciones celulares que se encontraban en el cultivo de células derivadas de la médula ósea, realizamos citometría de flujo para evaluar a proteínas expuestas en la superficie celular como el receptor Tie2 de angiopoyetina que es asociado a células endoteliales principalmente (Figura 28), el marcador CD34 de células troncales y CD45 como marcador de células hematopoyéticas; estos marcadores fueron analizados en las células cultivadas de la médula ósea (BMDC) y comparamos simultáneamente con células de la médula ósea extraídas en fresco para averiguar si hubo cambios en las poblaciones celulares cultivadas, en estos experimentos encontramos algunos resultados interesantes que se describen a continuación.



**Figura 28. Cultivos de BMDC son enriquecidos de células Tie2+CD45+.** Se evaluaron simultáneamente células cultivadas de la médula ósea por 15 días y células de la médula ósea extraídas en fresco por citometría de flujo de células vivas. **A)** Plots de células distribuidas en los marcadores CD45, Tie2 y CD34. **B)** Análisis del Gate de las células Tie2+ y distribución en los marcadores CD45 y CD34.

En la Figura 28A se muestran las citometrías de las células de la médula ósea recién extraída (BM: plot a, b, c y g) y talB de células cultivadas de la médula ósea (BMDC: plot d, e, g y h). La mayoría de las células nucleadas de la médula ósea recién extraída de las tibias de ratones silvestres (BM), fue CD45 positivas y una escasa población fue Tie2+ (plot b) que se encuentra distribuida como

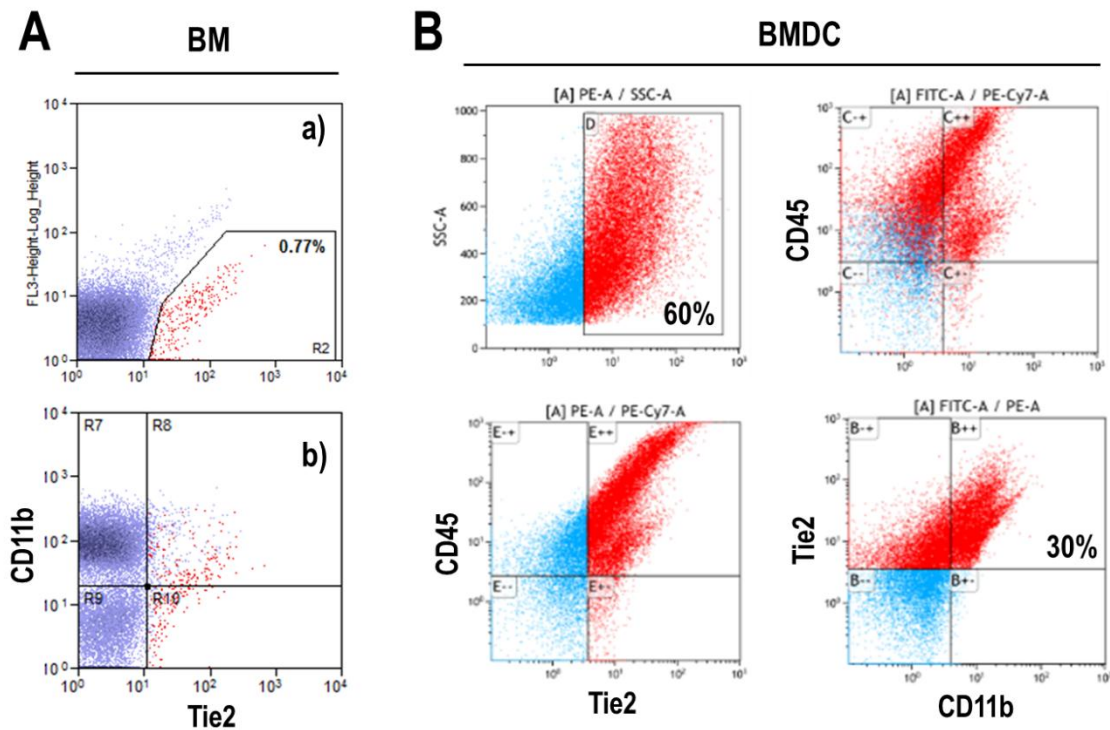
fracciones CD45 positiva y negativa. También encontramos una población CD34+/CD45+ (plot c) pero que no expresaban en la superficie el receptor Tie2 (plot g). En contraste, **en el cultivo de células de la médula ósea encontramos claramente enriquecida una población de células con el receptor Tie2** y que además tienen el marcador de células hematopoyéticas CD45 (BMDC, Figura 28A, plots e/h). Por su parte, las poblaciones celulares con el marcador CD34 parecen disminuir y distribuirse como CD45+ y CD45- en los cultivos de médula ósea (A plot f). La auto-fluorescencia de las células inicialmente se consideró la señal obtenida al pasar una fracción de las células de médula ósea fresca BM (plot a) y cultivadas BMDC (plot d) que no fueron incubadas con los anticuerpos contra los marcadores y se contrastó el desplazamiento en el plot de la otra fracción de células que sí fueron incubadas con los anticuerpos señalados.

En las células derivadas de la médula ósea, al realizar el gate de células Tie2+, confirmamos que todas las células Tie2+ fueron también CD45+ y que además, pocas de estas células Tie2+/CD45+ fueron CD34 positivas, similar a las células separadas de la médula ósea fresca (Figura 28B plot b, c, d); sin embargo, bajo las condiciones del cultivo celular, claramente se enriquece una población de células Tie2+/CD45+ si se contrasta con la cantidad de células que se encuentran en la médula ósea fresca con estos marcadores, como se puede observar en la Figura 28 las células en rojo como Tie2+ (Figura 28B plot b/c/d versus f/g/h), pocas células se detectaron. Los cultivos provenientes de la médula ósea mostraron un enriquecimiento de una población Tie2+/CD45+ que va desde el 30% hasta el 50% del total de células cuantificadas por citometría (experimentos con 10,000-100,000 eventos), mientras que en la médula ósea fresca sólo se detectó menos del 1% del total de células cuantificadas. El efecto de las condiciones de cultivo es muy claro cuando se contrasta la población Tie2+/CD45+.

Estos resultados sugieren que el cultivo de células derivadas de la médula ósea sobre una matriz similar a fibronectina (ProNectin) y con un medio de células endoteliales, se enriqueció de células Tie2+/CD45+, esta subpoblación celular es compatible con la idea de una estirpe celular cercana a leucocitos y con base en la literatura estipulamos que son células similares a una población pro-angiogénica de monocitos Tie2+ asociados a tumores.

En la literatura se reporta una población de la médula ósea con propiedades pro-tumorales, consiste con una subpoblación de monocitos que expresan el receptor Tie2. En la figura tal observamos que en el cultivo de BMDC se enriqueció una población de células que expresó el

receptor Tie2+ y que además presentó el marcador CD45, esto nos hizo considerar que esta población se trata de monocitos, así pues, evaluamos un marcador de monocitos CD11b mediante citometría de flujo de células vivas, estos resultados se muestran en la Figura 29.

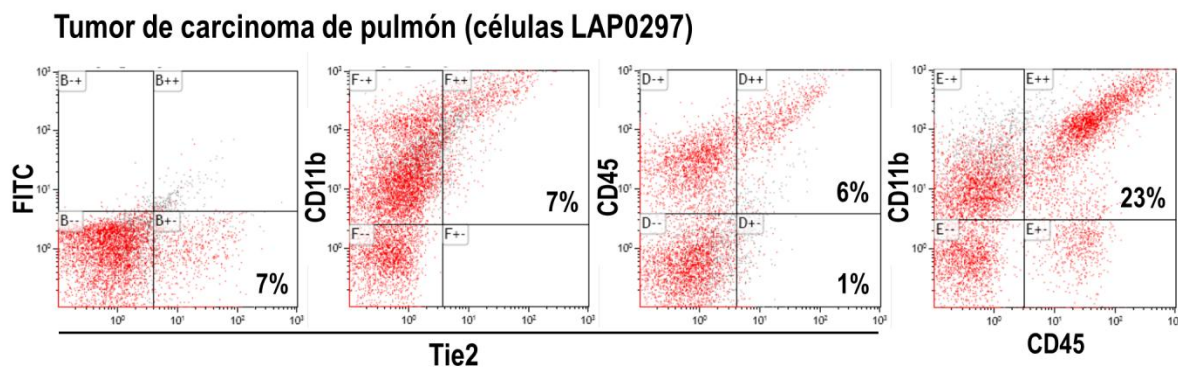


**Figura 29. Las BMDC Tie2+/CD45+ expresan el marcador de monocitos CD11b.** A) Citometría de células vivas de la médula ósea recién extraída; fueron incubadas con anti-CD11b y anti-Tie2, los cuadrantes se establecieron según la autofluorescencia de las células que no fueron incubadas con anticuerpos. B) Citometría de células vivas derivadas de la médula ósea donde identificamos las células Tie2+ (mostradas en rojo células positivas y en azul células negativas), y cómo estas células se distribuyen con los marcados de CD45 (PE-Cy7) y CD11b (FITC).

En la Figura 29A nuevamente observamos en el plot a) la escasa cantidad de células Tie2+ en las células de la médula ósea completa, adicionalmente, cerca de la mitad de las células Tie2+ presenta la expresión CD11b de monocitos, en médula ósea el marcador CD11b es muy abundante y una fracción pequeña de estas células tenían el receptor Tie2 (plot b). Observamos en la Figura 29B a las células Tie2+ (en rojo células positivas y en azul células negativas) y cómo se distribuyen en los otros marcadores membranales analizados. En las células cultivadas, encontramos el enriquecimiento de población celular con los marcadores Tie2+ y CD11b+, sugiere fuertemente que corresponden a una población de monocitos, todas las células tienen el marcador CD45+ y una gran cantidad de ellas son CD11b+. Mientras tanto, en médula ósea fresca observamos una pequeña población Tie2

(0.77%), de la cual una escasa cantidad de ellas presentó el marcador CD11b, una cantidad alta de células de la médula ósea fresca es CD11b+, pero una escasa cantidad de ellas tiene el marcador Tie2+.

Nuestros resultados previos apoyan que **los cultivos de células de la médula ósea son enriquecidos de una población de monocitos Tie2+/CD45+/CD11b+** y con base en la literatura, consideramos que células con estas características podríamos encontrar en tumores de ratones, con la finalidad de validar que las células derivadas de la médula ósea que cultivamos durante 15 días en un medio favorable para células endoteliales pueden mimetizar en cultivo a aquellas células que son atraídas al tumor y manipuladas para contribuir al crecimiento del mismo adquiriendo el fenotipo adecuado para dicha función pro-tumoral. Por lo anterior, indujimos tumores en ratones mediante la inoculación de  $1 \times 10^6$  de células tumorales en el dorso del animal y permitimos su crecimiento durante 15 días, alcanzado este tiempo, los ratones fueron sacrificados y los tumores obtenidos para disgregar las células que lo conformaban y evaluar por citometría de flujo los marcadores de la superficie celular de nuestro interés.



**Figura 30. Los tumores murinos son infiltrados por células Tie2+CD11b+CD45+.** Ratones FVB fueron inoculados con un millón de células tumorales LAP0297, después de dos semanas, cada ratón fue sacrificado, y extirpado el tumor para disgregar con colagenasas y realizar la citometría de las células que componen el tumor primario. Las células fueron incubadas con anticuerpos para Tie2, CD11b y CD45, en el plot a) se muestra el desplazamiento de la población Tie2 (PE) de todas las células del tumor. En el plot b) se muestra la distribución de las células Tie2 y CD11b (BV605) mientras que en el plot c) la distribución de las células Tie2 con CD45 (PE-Cy7) y en el plot d) la distribución de células CD45+/CD11b+.

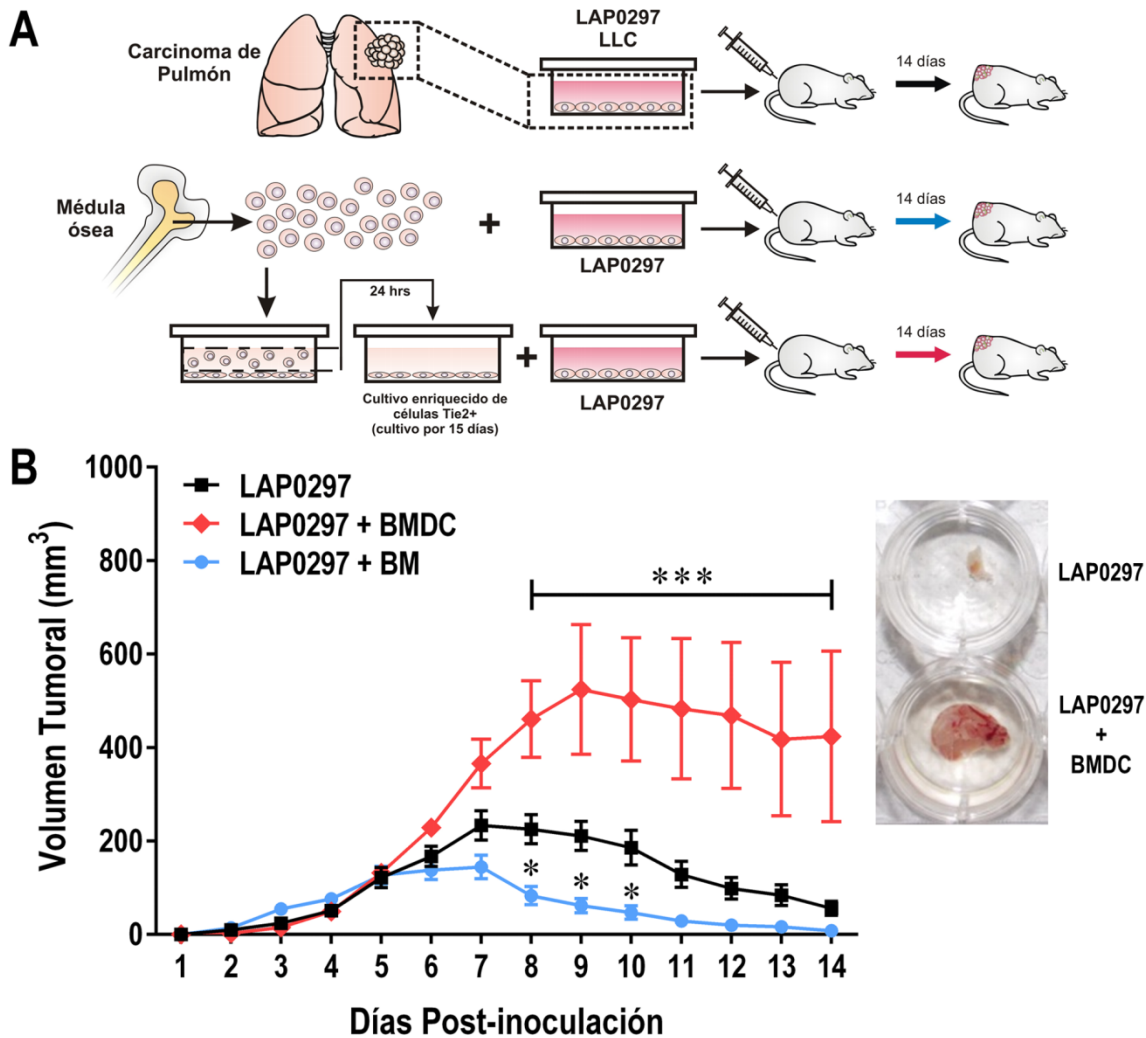
En tumores murinos en ratones inmunocompetentes FVB utilizando las células tumorales de carcinoma de pulmón LAP0297<sup>112</sup>, buscamos células que cumplieran con los marcadores Tie2+, CD45+ y CD11b+, que previamente observamos se encuentran enriquecidas en los cultivos de médula



ósea que estandarizamos. Evaluamos por citometría de flujo a las células presentes en el tumor primario que creció durante dos semanas; en la Figura 30 observamos en el primer plot que una pequeña fracción de células es Tie2<sup>+</sup> que corresponde al cuadrante inferior derecho, después si observamos cuales de estas células Tie2 expresan el marcador CD11b (segundo plot), encontramos que todas las células Tie2<sup>+</sup> cuentan con CD11b (cuadrante superior derecho), y una gran cantidad de células presentes en los tumores cuentan con este marcador. Al analizar CD45 y Tie2 juntos, de manera similar la mayoría de las células Tie2<sup>+</sup> fueron positivas a CD45. En el tumor hubo una población enriquecida de células CD45<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>. Estos datos apoyan la idea de que **células de la médula ósea Tie2<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> son atraídas al ambiente tumoral** para contribuir en el crecimiento de este.

### 10.1.3 Las células de la médula ósea expandidas *in vitro* (Tie2<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>), promueven el crecimiento del tumor primario en ratones

Las células derivadas de la médula ósea que fueron cultivadas mostraron enriquecimiento de una población de monocitos-Tie2 previamente reportada en tumores donde las células endoteliales asociadas a tumores secretan Ang2 para reclutarlos <sup>117</sup>; por lo tanto analizamos funcionalmente el papel que podrían jugar las células que cultivamos de la médula ósea en un modelo de tumor murino, la literatura señala que los tumores reclutan células de la médula ósea para favorecer su crecimiento y el desarrollo de metástasis, nosotros facilitamos el encuentro de las células tumorales con las células de la médula ósea en nuestro modelo para determinar su contribución directamente. En ratones FVB inmunocompetentes desarrollamos un modelo de tumor, inoculamos células de carcinoma de pulmón LAP0297 en el dorso de los ratones vía s.c. y monitoreamos la aparición y el incremento en el volumen del tumor durante 15 días. En la Figura 31A, se muestra el diseño experimental que representa los tres grupos experimentales que se analizaron para contrastar el incremento del volumen de tumor, el primero fue inoculado únicamente con las células tumorales LAP0297, el segundo grupo fue inoculado con células tumorales mezcladas con células nucleadas de la médula ósea obtenida en el momento, y un tercer grupo de ratones inoculados con células tumorales mezcladas con células de la médula ósea que fueron cultivadas durante 15 días según el protocolo descrito previamente.



**Figura 31.** Cultivo de células de la médula ósea enriquecido de poblaciones celulares (Tie2+/CD11b+/CD45+) que promueven el crecimiento tumoral. **A)** Diseño experimental que representa la inoculación del primer grupo experimental sólo con células tumorales, el segundo grupo inoculado con células de la médula ósea sin cultivar junto con células tumorales, y el tercer grupo con células cultivadas de la médula ósea junto con células tumorales. **B)** Las células derivadas de la médula ósea aceleran el crecimiento del tumor en ratones FVB. Los ratones se dividieron en 3 grupos, el primero fue inoculado únicamente con  $0.5 \times 10^6$  de células LAP0297 (en negro, n=12), el segundo con  $1 \times 10^6$  BMDC +  $0.5 \times 10^6$  células LAP0297 (en rojo, n=6) y el tercer grupo con  $1 \times 10^6$  células médula ósea fresca +  $0.5 \times 10^6$  células LAP0297 (en azul, n=10). Los datos representan la media  $\pm$  EE. \* $p < 0.05$  LAP0297 vs (LAP0297+BM); \*\*\* $p < 0.001$  Ctrl vs (LAP0297+BMDC); ANOVA de dos vías de mediciones repetidas seguida de la prueba de Tukey.

Nuestros resultados arrojaron hallazgos interesantes, en la cepa de ratones FVB inmunocompetentes, observamos el crecimiento tumoral cuando fueron inoculados con baja cantidad de células tumorales (medio millón de células LAP0297), alcanzando el volumen máximo entre 7 y 9

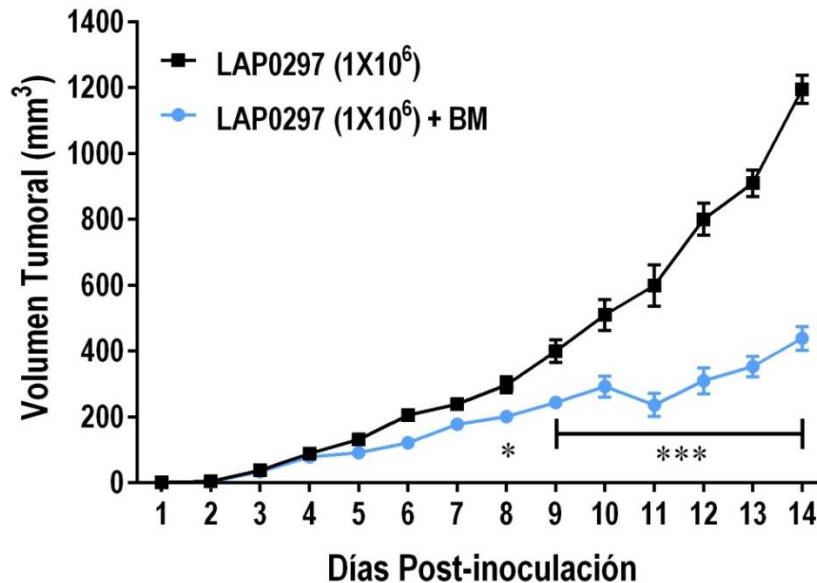


días, para posteriormente disminuir. Hubo regresión del tumor, posiblemente por la respuesta inmune del animal que logra contrarrestar el crecimiento de pocas células tumorales (Figura 31, línea negra). Un hallazgo que nos pareció desconcertante fue obtenido en el grupo experimental donde co-inoculamos las células tumorales con células de la médula ósea recién extraída; encontramos que los tumores crecieron más lento (Figura 31B, línea azul), incluso observamos aceleración en la regresión del volumen tumoral. El hecho de que **las células tumorales se inocularan junto con células de la médula ósea (sin cultivar) produjo inhibición del crecimiento del tumor**, sugiriendo que estas células de la médula ósea ejercen un efecto antitumoral por uno o varios mecanismos desconocidos. En contraste, cuando co-inoculamos las células tumorales junto con las células cultivadas de la médula ósea mediante nuestro protocolo de enriquecimiento de poblaciones proangiogénicas (células Tie2+/CD11b+/CD45+), encontramos que los tumores alcanzan mayor volumen tumoral de manera significativa a partir del día 8 (Figura 31B, línea roja) con respecto a los ratones inoculados únicamente con las células tumorales LAP0297 (Figura 31B, línea negra), y resistieron la regresión del volumen tumoral por más días (8 a 14 días, \*\*\* $p < 0.001$  versus el grupo únicamente con células tumorales). En resumen, **las células de la médula ósea cultivadas promueven el crecimiento tumoral**.

A pesar de la celularidad en las dos condiciones, BM y BMDC, los efectos fueron totalmente contrarios, la selección de las células que fueron adheridas de la médula ósea sometidas a un procedimiento de cultivo y que fueron expandidas mediante la exposición del medio de cultivo para células endoteliales, promovió el crecimiento de células con capacidad pro-tumoral como se observó en el incremento del volumen tumor murino. Nuestros resultados muestran que las células cultivadas de la médula ósea favorecen el crecimiento de tumores, particularmente este cultivo de médula ósea con un claro enriquecimiento de células Tie2+.

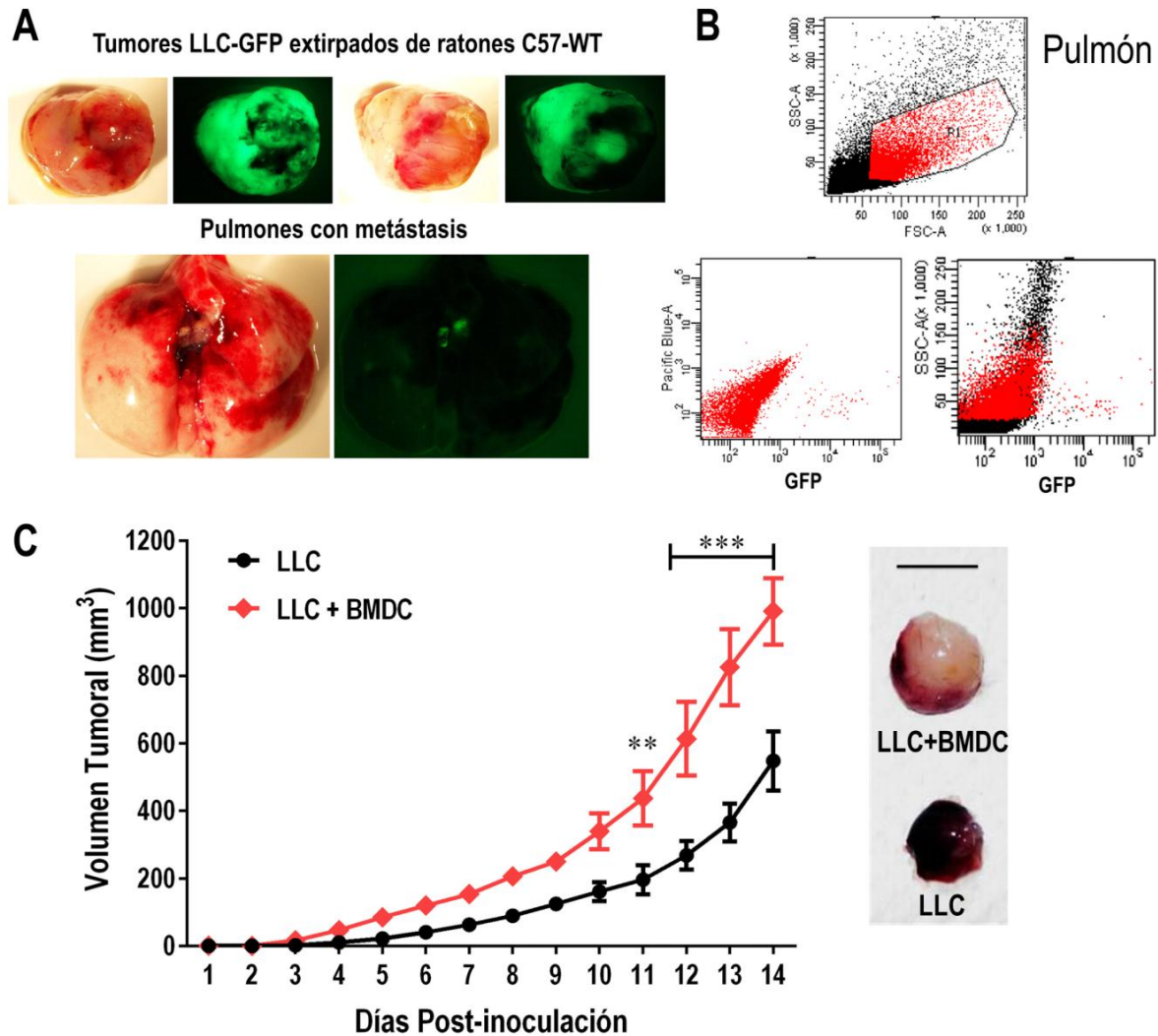
Validamos el efecto antitumoral de las células de la médula ósea que no pasaron por el proceso de cultivo, anteriormente observamos en la Figura 31 que medio millón de células tumorales en ratones FVB, hubo una regresión del tumor una semana posterior a la inoculación. Entonces, evaluamos una cantidad mayor de células tumorales en la cual ya no ocurra la regresión de los tumores y bajo estas condiciones experimentales, pudiéramos observar el posible efecto depresor de las células de la médula ósea sin cultivar en el crecimiento exponencial del tumor (Figura 32). En este experimento cultivamos células tumorales LAP0297 y a partir de cultivos confluentes, se tripsinizaron y se contaron las células para ajustar la cantidad de un millón de células para inocular. Simultáneamente

se obtuvo la médula ósea de un ratón, se eliminaron los eritrocitos, se lavaron y se contaron las células nucleadas. Previo a la inoculación, las células tumorales ( $1 \times 10^6$  células) y las células de la médula ósea ( $1 \times 10^6$ ) se mezclaron y se cargaron en la jeringa para inocular en el dorso del animal, otros animales fueron inoculados únicamente con las células tumorales.



**Figura 32.** Las células de la médula ósea recién extraída disminuyen el crecimiento de tumores murinos en un modelo de co-inoculación. Los ratones FVB fueron co-inoculados con una mezcla de células tumorales y células de la médula ósea extraída de otro ratón FVB, mientras que otro grupo experimental fue inoculado solamente con células tumorales. LAP (n=4), LAP+BM (n=5). \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ANOVA de dos vías de mediciones repetidas seguida de la prueba de Tukey.

Un millón de células tumorales LAP0297 fue suficiente para evitar la regresión del tumor, creciendo exponencialmente durante el tiempo de evaluación ( $\sim 1,200 \text{ mm}^3$  a los 14 días). Sin embargo, en los animales que además de células tumorales, inoculamos células de la médula ósea sin cultivar, el tumor creció significativamente más lento ( $400\text{-}500 \text{ mm}^3$  a los 14 días); los animales fueron sacrificados una vez transcurridos los días reportados de evaluación. Consideramos que el efecto antitumoral de la co-inoculación de las células de la médula ósea (frescas) junto con las tumorales, se debe exclusivamente a los fenotipos celulares presentes en la médula ósea total y que por mecanismos celulares desconocidos favorecen posiblemente una respuesta inmunológica antitumoral, considerando que el modelo tumoral que utilizamos tiene como característica que los ratones fueron inmunocompetentes. Sin duda, esta observación es de interés para posteriores estudios.



**Figura 33. Co-inoculación de células derivadas de la médula ósea junto con células tumorales LLC, favorece el crecimiento tumoral.** **A)** Tumores de carcinoma de Lewis (LLC-GFP  $1 \times 10^6$  vía s.c.) en ratones C57 WT con un mes de crecimiento, en pulmones es posible observar macrometástasis en fluorescencia (LLC-GFP). **B)** Búsqueda de células tumorales LLC-GFP en pulmones. Las metástasis fueron corroboradas mediante citometría de tumores disgregados. **C)** Las BMDCs promueven el crecimiento de tumores de LLC(-GFP). En ratones C57, la población cultivada BMDC favorece el crecimiento tumoral ( $1 \times 10^6$  BMDC +  $1 \times 10^6$  LLC-GFP). Las células tumorales y las células derivadas de la médula ósea fueron mezcladas e inoculadas en el dorso de los ratones C57 mientras que otro grupo únicamente se inoculó con las células tumorales; se tomaron mediciones diariamente del ancho y largo del tumor utilizando un caliper. LLC (en negro,  $n=7$ ), LLC+BMDC (en rojo,  $n=6$ ); \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ANOVA de dos vías de mediciones repetidas seguida de la prueba de Tukey.

Continuando con la caracterización de células de la médula ósea pro-tumorales, en otro modelo tumoral en el cual utilizamos ratones C57/BL6 machos (ratones negros), inoculamos un millón de

células tumorales correspondientes al fondo genético; células de un carcinoma de pulmón de Lewis (Lewis Lung Carcinoma, LLC) con la proteína verde fluorescente (Figura 33A), estas células han sido ampliamente utilizadas en estudios preclínicos para inducir tumores en ratones, por esta razón estandarizamos la formación de tumores primarios en ratones silvestres y también buscamos metástasis generadas en los pulmones mediante fluorescencia y citometría de los pulmones disgregados (Figura 33B). Para realizar estos experimentos, preparamos cultivos de la médula ósea de ratones C57(-GFP), los cuales fueron mantenidos durante 15 días para posteriormente co-inocular un millón de BMDC junto con las células tumorales de pulmón LLC en ratones macho C57 (WT), como el procedimiento que se describió para los ratones FVB.

De manera consistente, nuestros resultados mostraron que al igual que para los ratones de la cepa FVB, **los tumores crecieron más rápido cuando las células tumorales fueron co-inoculadas con BMDCs** alcanzando cerca del doble del volumen de la masa tumoral a los 14 días de medición ( $500 \text{ mm}^3$  vs  $1000 \text{ mm}^3$ ), como se muestra en la Figura 33C. En este modelo murino, las células tumorales inducen el desarrollo del tumor de manera exponencial sin mostrar una regresión del tumor, por ello los ratones fueron sacrificados a los 15 días, evitando el crecimiento excesivo del tumor primario. Los resultados anteriores refuerzan que las células que fueron cultivadas de la médula ósea representan poblaciones interesantes a estudiar por sus propiedades para comunicarse con las células tumorales y por su efecto funcional como células pro-tumorales, favoreciendo el crecimiento de los tumores murinos. Por lo anterior, nos propusimos a analizar la comunicación celular entre las células de la médula ósea y las células tumorales en el contexto de la migración celular, un proceso relevante en cáncer.

Como perspectiva, este modelo de co-inoculación fue implementado dentro de las estrategias experimentales del laboratorio, y nos permitirá evaluar la contribución de células derivadas de la médula ósea en el crecimiento de tumores y el esparcimiento de metástasis, particularmente bajo condiciones en las que podamos inhibir o sobre-expresar proteínas de nuestro interés en células tumorales o en células de la médula ósea, con énfasis en aquellas proteínas de señalización que pudiesen contribuir a la migración celular polarizada y a la secreción de factores quimiotácticos que participan en la comunicación oncogénica entre las células.

### 10.1.4 Comunicación bidireccional entre células tumorales y células derivadas de la médula ósea

Considerando que las células se pueden comunicar mediante la secreción de factores solubles capaces de activar receptores membranales en las células blanco, decidimos recolectar medios condicionados con los productos secretados por las células derivadas de la médula ósea, o bien, por células tumorales en un periodo de tiempo (14 horas). Con los medios condicionados se probó estimular a las otras células (**BMDC ↔ Tumorales**), midiendo el estado de fosforilación de proteínas de señalización involucradas en proliferación, sobrevivencia y síntesis de proteínas (ERK, AKT y S6, respectivamente).

El estímulo con los medios condicionados se realizó en un curso temporal (1, 5, 15, 30 y 60 minutos de estimulación) para evaluar la activación de estas proteínas y la fosforilación de S6 como evidencia del efecto de los medios condicionados de células tumorales (LAP0297) sobre las células cultivadas derivadas de la médula ósea (**Tumorales → BMDC**, Figura 34A), los resultados fueron revelados por western blot de los lisados totales celulares. Inicialmente, utilizando los medios condicionados de células tumorales (LAP0297) recolectados a las 14 horas, fueron capaces de activar de manera intensa las cascadas de señalización de AKT (pSer473 AKT), ERK (pERK) y mTOR (pS6) en un curso temporal de estimulación de células derivadas de la médula ósea ayunadas toda la noche, alcanzando el máximo de efecto para pSer473-AKT1/2/3 a los 15 minutos de estimulación, para pERK a los 5 minutos y para pS6 a los 30 minutos se observó el efecto más intenso. Las proteínas totales de AKT1, ERK2 y S6 se muestran como control de la cantidad equivalente de proteína en cada carril.

En sentido opuesto, cuando exploramos los efectos celulares de los medios condicionados de las células derivadas de la médula ósea (obtenidos a las 14 horas) sobre la activación de proteínas en las células tumorales LAP0297 (**BMDC → Tumorales**, Figura 34B), encontramos **los medios condicionados de BMDC activan las cascadas de señalización de AKT, ERK y S6 de manera dependiente de la temporalidad en las células de carcinoma de pulmón (LAP0297)**, con máximos de activación entre 5 y 15 minutos de estimulación. Particularmente, en estas células tumorales se observó que ERK fosforilado se encontraba alto desde el basal (ayuno de 14 horas), sugiriendo que la vía de ERK es muy activa en estas células tumorales; a pesar de ello, fue posible observar el efecto estimulante de los medios condicionados de BMDC.

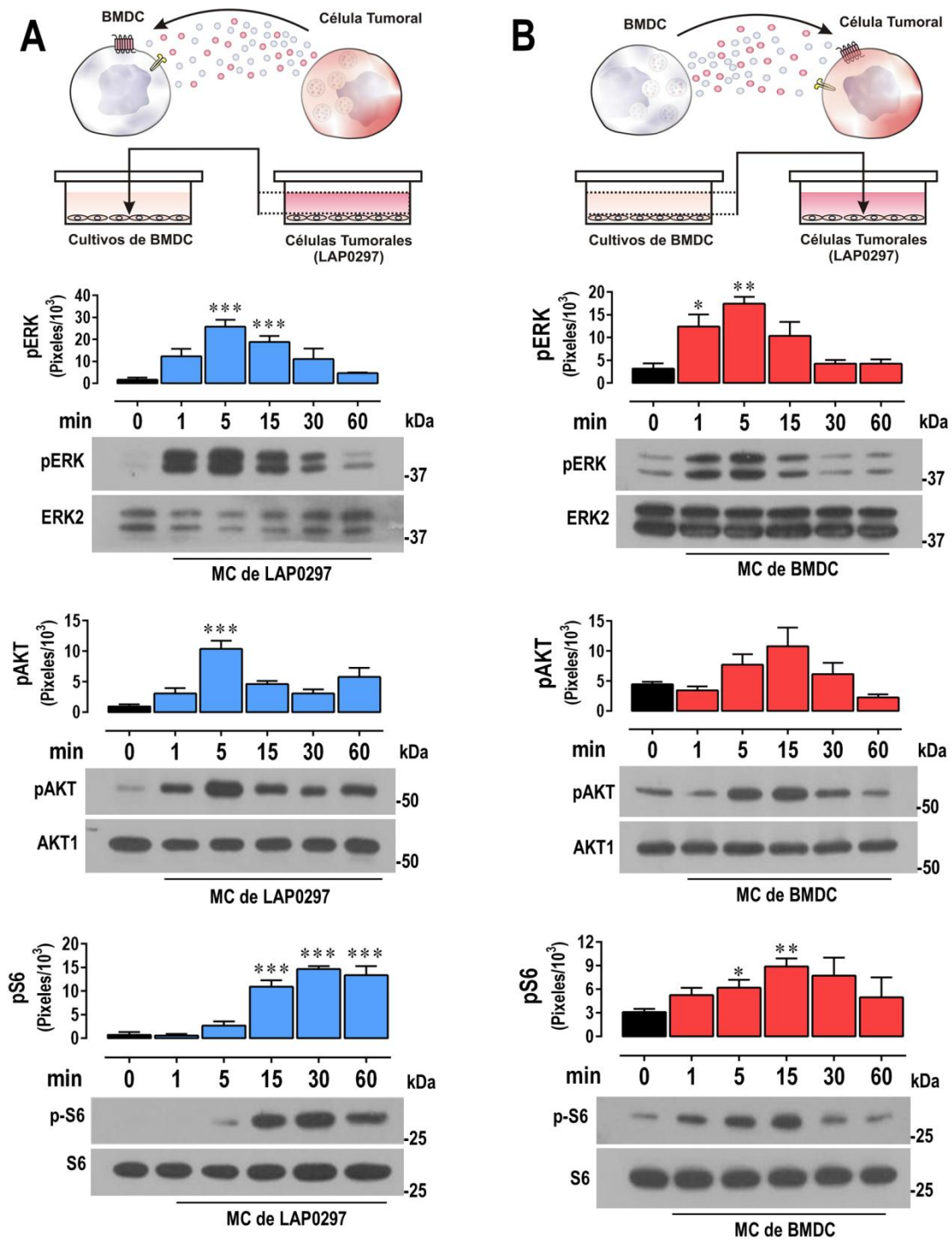


Figura 34. Comunicación bidireccional entre células derivadas de la médula ósea y células tumorales. A) Los medios condicionados de células tumorales (MC de LAP0297) activan las cascadas de señalización de AKT, ERK y mTOR en BMDC. Las células de la médula ósea cultivadas durante dos semanas fueron resembradas en cajas de 6 pozos recubiertas con pronectina, finalmente ayunadas por 14 horas y estimuladas con los medios condicionados durante 1, 5, 15, 30 y 60 minutos antes de ser lisadas. Los datos representan la media  $\pm$  EE de 3 experimentos independientes.



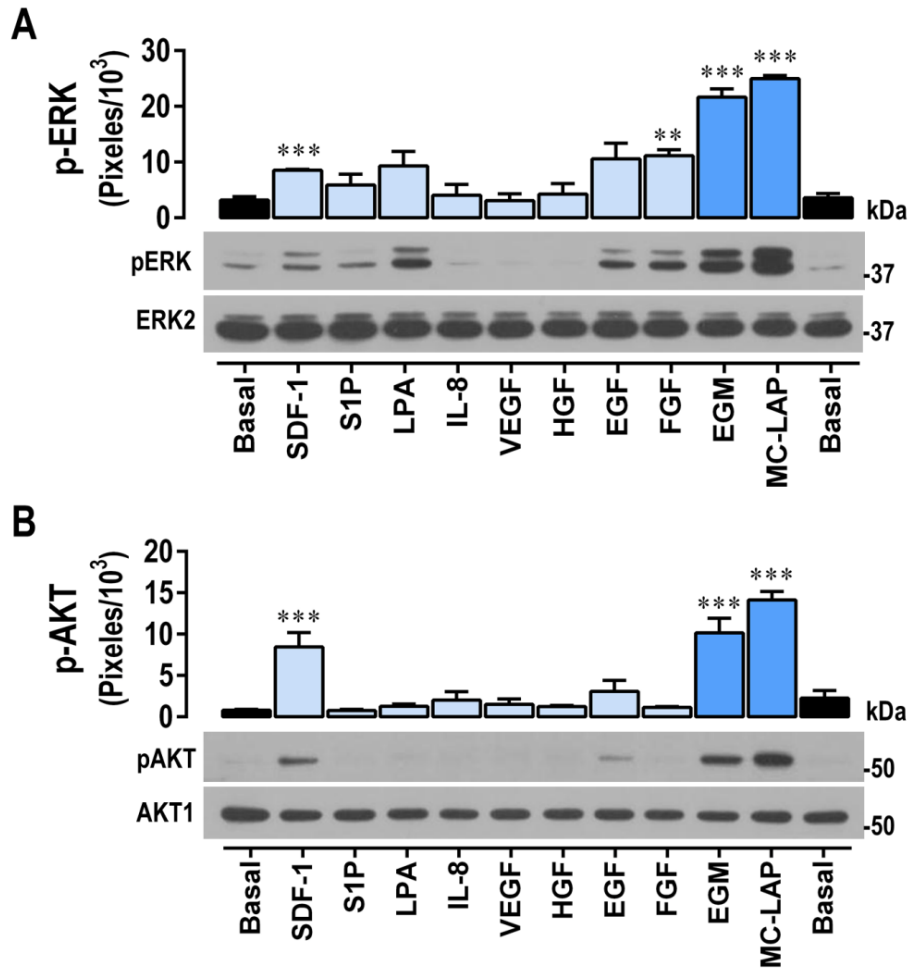
\*\*\* $p < 0.001$  (todos versus Basal), ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. **B)** Las células derivadas de la médula ósea, secretan factores (presentes en medio condicionado de BMDC) que estimulan cascadas de señalización de AKT, ERK y mTOR en células tumorales (representados como pAKT, pERK y pS6). Las células tumorales fueron sembradas en cajas de 6 pozos, posteriormente fueron ayunadas durante 14 horas y ayunadas en medio EBM-2 y fueron estimuladas con medios condicionados de BMDC según el curso temporal indicado en las gráficas. Los datos representan la media  $\pm$  EE de 3 experimentos independientes. pERK: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (todos versus Basal), ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. pS6: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (todos versus basal), prueba T.

### 10.1.5 Efecto de mediadores asociados al microambiente tumoral sobre la activación de las vías de señalización de AKT y ERK en BMDC

Con base en los resultados de la activación de AKT y ERK en las BMDC estimuladas con los medios condicionados de las células tumorales (Figura 35A), nos propusimos averiguar cuales estímulos angiogénicos (comúnmente asociados al microambiente de los tumores), pueden estimular cascadas de señalización clásicas en las células cultivadas de la médula ósea. Como el cultivo de médula ósea se realizó bajo condiciones adecuadas para cultivar células endoteliales microvasculares, consideramos que las células cultivadas de la médula ósea fueron seleccionadas por adhesión a la matriz extracelular ProNectina del total de células de la médula ósea y proliferaron aquellas células con las características adecuadas para crecer en un ambiente endotelial. Por lo anterior, evaluamos la respuesta a algunos estímulos que activan receptores acoplados a proteínas G, como son el SDF-1, S1P, LPA e IL-8; también estímulos que activan a receptores acoplados a tirosina cinasas, particularmente factores de crecimiento como el VEGF, HGF, EGF, FGF y PDGF. Además, incluimos controles utilizando estímulos complejos como el medio en el cual se sembraron las células de la médula ósea EGM-2MV con SFB al 5% y el medio condicionado (EBM-2 libre de suero y suplemento) obtenido de células tumorales de pulmón LAP0297 cosechado a las 14 horas.

Los experimentos de western blot de la estimulación de las células derivadas de la médula ósea arrojaron resultados interesantes, diferentes estímulos definidos logran conducir a la activación de ERK (pMAPK 44/42) en células derivadas de la médula ósea (Figura 35A), algunos de ellos como LPA, FGF, EGF y SDF-1, en orden de intensidad del efecto sobre pERK. El medio condicionado de células tumorales LAP0297 estimula fuertemente a ERK incluso de manera más intensa que el medio completo donde las células de la médula ósea fueron cultivadas (EGM-2MV). Por otro lado, la evaluación de diferentes estímulos pro-angiogénicos sobre la activación de AKT (pSer473-AKT1/2/3) en células cultivadas de la médula ósea arrojó diferencia en el efecto con respecto a lo observado para

ERK. El SDF-1 activa a AKT de manera intensa, mientras que el EGF activa ligeramente, un efecto muy claro sobre AKT es con la estimulación de medio completo y los medios condicionados de células tumorales como LAP0297. A pesar de que LPA, FGF y EGF pueden activar a ERK en las BMDC, estos estímulos no llevaron a la activación de AKT (Figura 35B).



**Figura 35. Activación de ERK y AKT inducida por diferentes estímulos asociados al microambiente tumoral en células derivadas de la médula ósea. A)** Comparación de la activación de ERK (pERK) inducida por diferentes estímulos (SDF1, S1P, LPA, IL-8, VEGF, HGF, EGF, FGF, medio con 5% de suero (EGM-2MV) y el medio condicionado de células tumorales) en las células derivadas de la médula ósea cultivadas durante dos semanas sobre ProNectin en medio EGM-2MV, posteriormente se tripsinizaron y se distribuyeron en cajas de 6 pozos recubiertas con ProNectin. Las células fueron ayunadas por 14 horas con medio EBM-2 y estimuladas durante 5 minutos antes de lisar. Los datos representan la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (todos versus Basal), ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. **B)** Activación de AKT (pAKT Ser473) en BMDC cultivadas durante dos semanas y ayunadas toda la noche previo a la estimulación con ligandos para GPCRs, receptores tirosinacinas y medios condicionados, como se



describe en el inciso A. Los datos representan la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes; \*\*\* $p < 0.001$  (todos versus Basal), ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

**Tabla 16.** Efecto de los estímulos evaluados en células derivadas de la médula ósea.

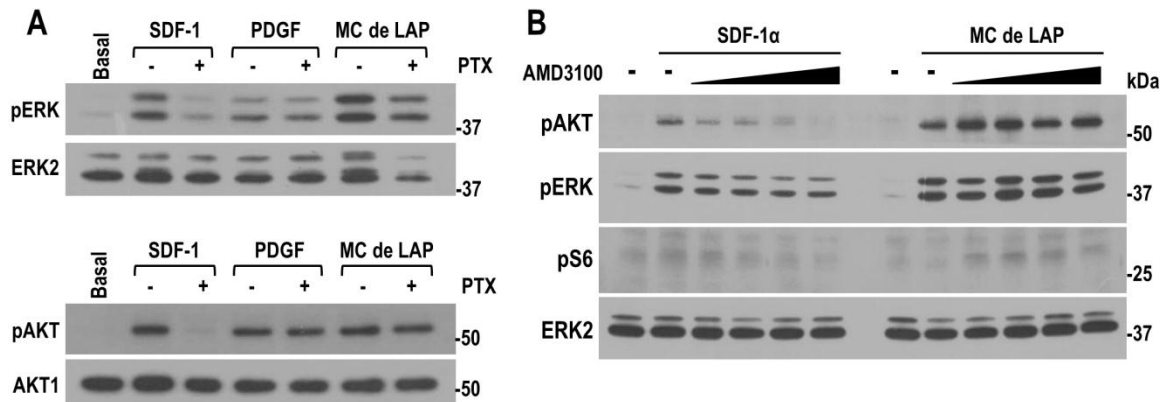
Estímulo	Concentración	Receptores	pAKT	pERK
SDF-1	50 ng/mL	CXCR4	+	+
S1P	1 $\mu$ M	S1PR	-	-
LPA	1-5 $\mu$ M	LPA1-6	-	+
IL-8	3 nM	CXCR2	-	-
VEGF	100 ng/mL	VEGFR1,2,3	-	-
HGF	10 ng/mL	MET	-	-
EGF	100 ng/mL	EGF-R	+	+
FGF	25 ng/mL	FGF-R	-	+
PDGF	100 ng/mL	PDGF-R	+	+
EGM-2MV	SFB 5%	-	+	+
MC de LAP	-	-	+	+

En la Tabla 16 se resumen los resultados del efecto de los diferentes estímulos evaluados sobre las células derivadas de la médula ósea; además, se muestran los receptores reportados para los estímulos utilizados, sugiriendo que uno o varios de ellos son expresados y son funcionales en las células derivadas de la médula ósea, algunos de ellos posiblemente responsables de la respuesta celular a los medios condicionados secretados por las células tumorales en el ensayo de estimulación y western blot de las proteínas de señalización activadas (pAKT y pERK).

### 10.1.6 Contribución de GPCRs $\rightarrow$ Gi en la activación de AKT y ERK en BMDC

Como parte de las vías de señalización, se sabe que el heterodímero  $G\beta\gamma$  es importante para la activación de vías de señalización relevantes en la migración celular y que el efecto de  $G\beta\gamma$  suele ser intenso cuando proviene de proteínas  $G_i$  <sup>4,56,57</sup>. Por lo anterior, evaluamos si la activación de la proteína  $G_i$  es responsable de la activación de AKT y ERK en las BMDC cuando son estimuladas por un ligando de GPCR, ligando de TrK y de los medios condicionados de las células tumorales. Las BMDCs cultivadas de ratones FVB-Tie2-GFP por 15 días fueron estimuladas con SDF-1, PDGF o medios condicionados de células tumorales LAP0297, todos los estímulos en presencia o ausencia de toxina pertussis (PTX 100 ng/mL) con 2 horas de incubación previamente al estímulo. Nuestros

resultados arrojaron que las BMDC estimuladas con SDF-1, una quimiocina relevante en el cáncer promueve la activación de AKT (pSer473-AKT1/2/3) y ERK (pMAPK) pero los efectos fueron sensibles a la toxina pertussis, la cual inhibió completamente el efecto de SDF-1 $\alpha$  en la activación de AKT y ERK en BMDC, sugiriendo que la proteína Gi es necesaria en la señalización del CXCR4.



**Figura 36. La activación de AKT y ERK inducida por los medios condicionados es parcialmente dependiente de GPCRs que señalizan vía Gi, pero no participa CXCR4. A)** Activación de ERK (pERK) y AKT (pAKT) inducida por SDF-1 (50 ng/mL), PDGF (100 ng/mL) y MC de tumorales, en células derivadas de la médula ósea estimuladas durante 5 min y algunas de ellas previamente incubadas con toxina pertussis (PTX 100 ng/mL 2 horas antes y durante el tiempo de estimulación). **B)** Activación de ERK y AKT inducida con SDF-1 y medios condicionados de células tumorales (LAP0297) en BMDC tratadas con concentraciones crecientes del antagonista AMD3100 del receptor CXCR4 (0.1, 1, 10).

Por otro lado, las células estimuladas con PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) sorprendentemente responden de manera adecuada (Figura 36A), el PDGF tiene un efecto intenso sobre la activación de AKT y ERK, superando el efecto del máximo alcanzado por los estímulos evaluados en la Figura 35. Además, este resultado es congruente con el incremento del mRNA del receptor a PDGFR $\beta$  en BMDC, sugiriendo que el receptor de este factor incrementa en las células y el ensamble de su señalización es eficiente. Como se esperaba, el efecto de PDGF no fue alterado por la toxina pertussis, es decir, la proteína Gi, G0 y Gt (blancos moleculares de PTX), no participan en el efecto de PDGF sobre las BMDC, sino que su señalización es mediada exclusivamente por cascadas de señalización de receptores para PDGF, y no parece existir la activación de receptores acoplados a Gi, por ejemplo, vía la transactivación.

El efecto de los medios condicionados de células tumorales LAP0297 sobre la activación de ERK y AKT en BMDC fue intenso, como lo habíamos observado previamente (Figura 34); sin embargo, fue parcialmente dependiente de la activación de proteínas Gi (Figura 36A), el efecto de la PTX inhibió parcialmente la activación de AKT y ERK inducida por este estímulo complejo, lo cual sugiere que los factores secretados por las células tumorales que tienen efecto sobre las células de la médula ósea dependen parcialmente de la activación de GPCRs que activan a la proteína Gi. Lo anterior establece que la activación de AKT y ERK en BMDC estimuladas con los medios condicionados de células tumorales son parcialmente dependientes de la proteína Gi y posiblemente de otras proteínas G, así como receptores acoplados a cinasas, como son los receptores de factores de crecimiento.

Además, concentraciones crecientes del antagonista AMD3100 para el receptor CXCR4 abatió completamente el efecto sobre AKT (Figura 36B). Pero esto no ocurrió sobre la activación de ERK inducida por SDF-1 lo cual sugiere que posiblemente la activación de pocos receptores es suficiente para llevar a la activación significativa de ERK o bien, el receptor CXCR7 que también es activado por SDF-1 está contribuyendo parcialmente a la activación de ERK, pero no participa en la activación de AKT. Por otro lado, cuando las células fueron estimuladas con los medios condicionados de células tumorales y el receptor CXCR4 se antagoniza, no se observó inhibición de la activación de AKT y ERK, incluso parece incrementar ligeramente el grado de activación de las cinasas, lo que sugiere que el receptor CXCR4 no participa en el efecto de los medios condicionados sobre la activación de AKT y ERK, o bien, se ve enmascarado por el efecto total del resto de los ligandos suspendidos en los medios condicionados.

### 10.1.7 Migración de células derivadas de la médula ósea estimuladas por medios condicionados de células tumorales

Como demostramos que los medios condicionados de las células tumorales pueden activar vías de señalización en las células derivadas de la médula ósea, hipotetizamos que los factores solubles de los medios condicionados serían quimiotácticos y en un ensayo de migración celular en cierre de herida, estos medios condicionados promoverían la migración, teniendo la premisa de que los tumores reclutan células de la médula ósea para favorecer el crecimiento y el desarrollo de metástasis. Las BMDC fueron sembradas en cajas Petri recubiertas con gelatina 0.02%, fueron tripsinizadas y sembradas para su adhesión. Al día siguiente se realizó la herida con una punta de pipeta, o en caso

de no tener la confluencia necesaria se mantuvieron uno o dos días antes de hacer la herida. **Los medios condicionados de células tumorales indujeron la migración de las BMDC** (cierre de herida detenida y fijada a las 24 horas) (Figura 37A), correlacionando con el efecto intenso sobre AKT y ERK, sugiere que las moléculas secretadas por las células tumorales activan receptores membranales para desencadenar vías de señalización, las cuales pueden llevar a la migración de células de la médula ósea.

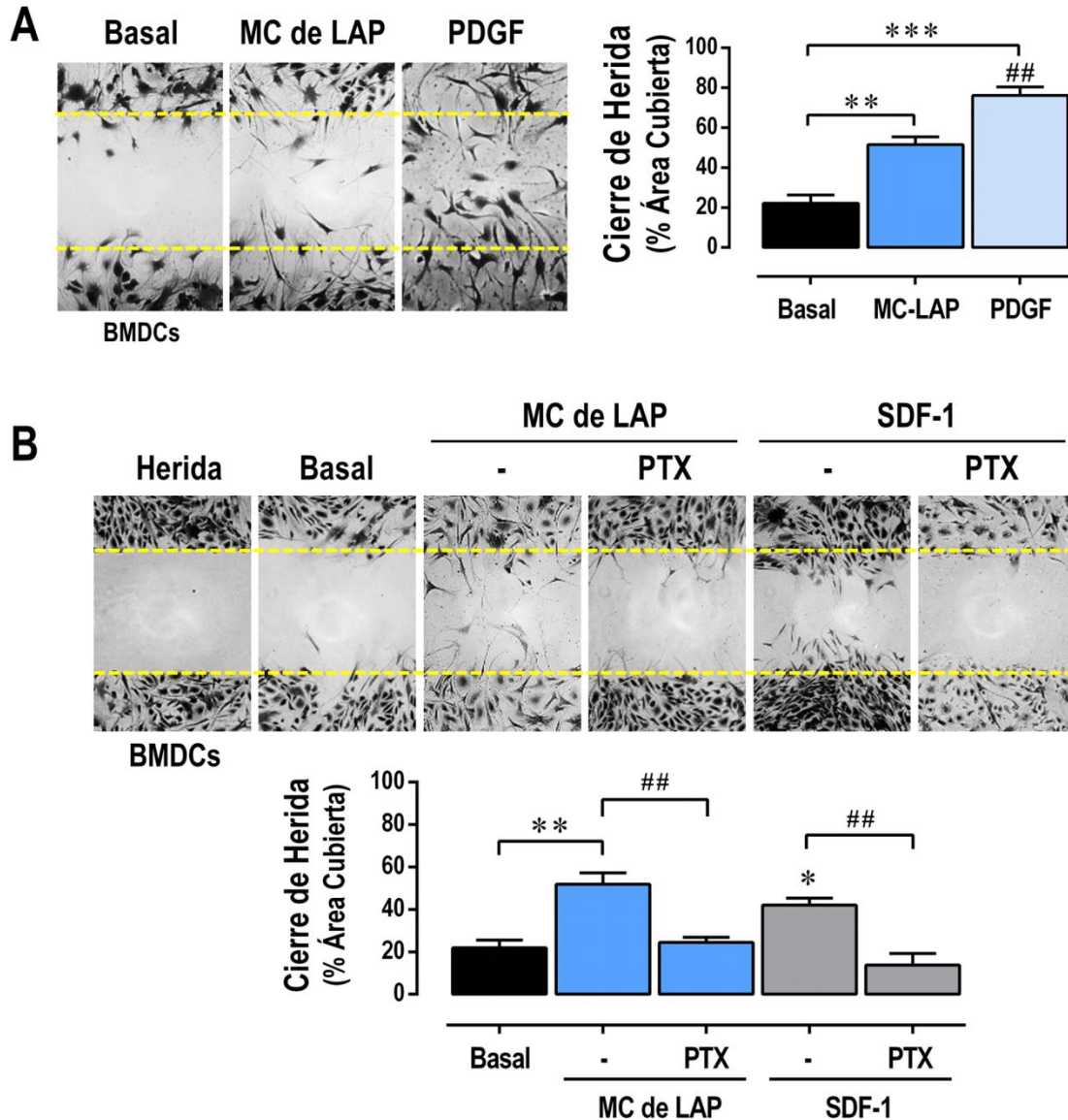


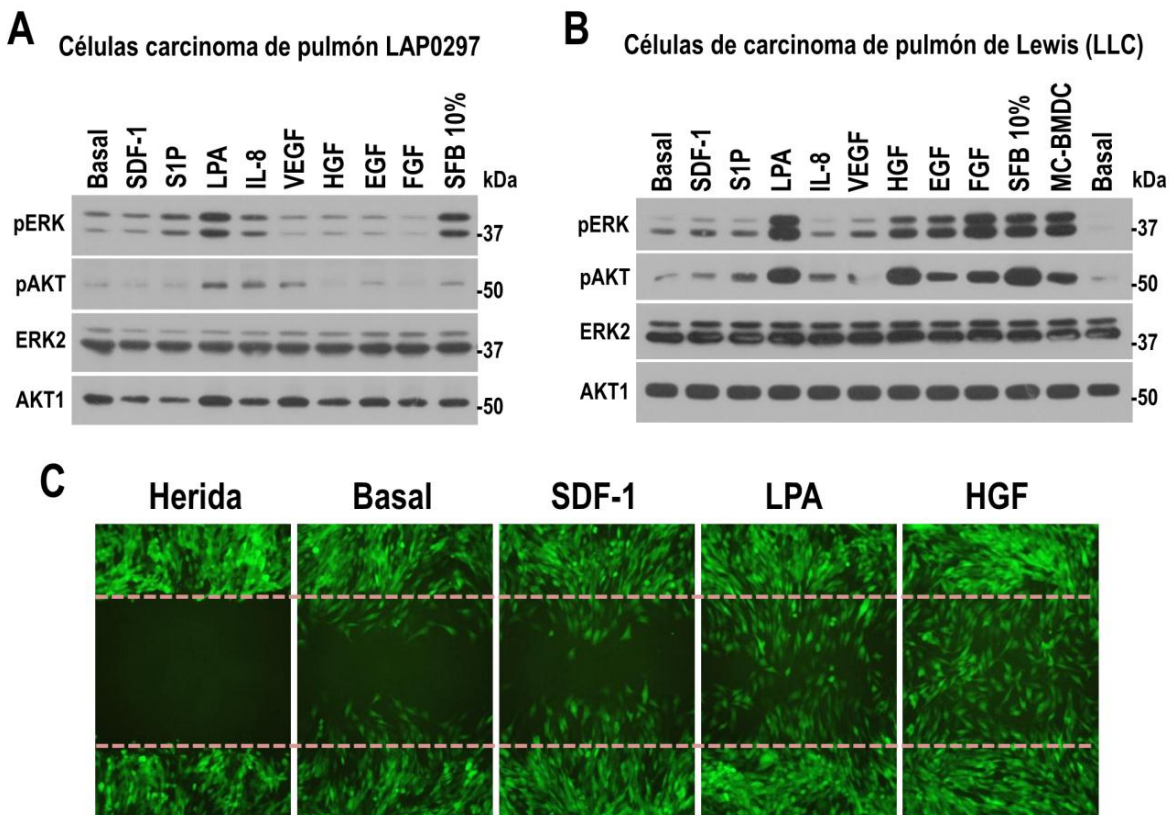
Figura 37. Migración de células derivadas de la médula ósea inducida por medios condicionados de células tumorales y SDF-1. **A)** Cierre de herida de BMDC estimuladas con PDGF y medios condicionados de células tumorales (LAP0297). Las BMDCs fueron cultivadas sobre pronectina durante dos semanas en medio EGM-2MV, después fueron

tripsinizadas y sembradas sobre gelatina 0.02% en cajas de 6-12 pozos. Para el ensayo, fueron ayunadas 3 horas con medio EBM-2 (sin suplementos) y estimuladas durante 24 horas con medios condicionados de LAP0297 (MC de LAP) y PDGF (100 ng/mL), finalmente fueron fijadas y teñidas con cristal violeta para tomar fotografías. Los datos representan la media  $\pm$  EE de 3 a 4 experimentos independientes, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (vs basal); ## $p < 0.01$  (MC-LAP vs PDGF); ANOVA de una vía seguida de Tukey. **B)** Ensayo de cierre de herida, BMDCs fueron cultivadas durante dos semanas y posteriormente sembradas sobre gelatina 0.02%; fueron ayunadas durante 3 horas. Las células fueron incubadas con toxina pertussis (200 ng/mL) dos horas antes de realizar la herida y de estimular con los medios condicionados o bien, con SDF-1 (100 ng/mL). Panel inferior muestra la cuantificación del ensayo de migración, los datos representan la media  $\pm$  EE de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (basal vs MC-LAP o SDF-1); ## $p < 0.01$  (-PTX vs +PTX); ANOVA de una vía seguida de Tukey.

A diferencia de otras células, las BMDCs migraron principalmente de manera individual y sólo algunas migran de manera grupal, mostraron generación de extensiones citoplasmáticas para cubrir los sitios de la herida. Por otro lado, las células derivadas de la médula ósea responden de manera adecuada a PDGF, como previamente se observó en la activación de AKT y ERK, sorpresivamente **el PDGF induce la migración de las BMDCs**, con un efecto superior al de SDF-1 y otros estímulos explorados. El efecto quimiotáctico de PDGF, correlaciona con los resultados observados de la alta expresión del RNA mensajero del receptor PDGFR $\beta$  en las células cultivadas de la médula ósea.

Posteriormente decidimos evaluar la contribución de la proteína Gi en la migración de células derivadas de la médula ósea. En ensayos de cierre de herida, **las BMDCs migraron con los medios condicionados de células tumorales de manera dependiente de Gi**, la migración fue inhibida con el tratamiento con toxina pertussis (Figura 37B, barras azules ## $p < 0.01$ ), en este ensayo esperábamos inhibición parcial sin embargo la contribución de Gi parece fundamental en la migración de estas células. **La migración de las BMDC inducida por SDF-1/CXCR4 fue dependiente de Gi** (inhibida con toxina pertussis 100 ng/mL, Figura 37B barras en gris ## $p < 0.01$ ), por lo cual sugiere que a pesar de que el receptor CXCR4 puede activar otras proteínas G como Gq y G13, según algunas publicaciones, el efecto quimiotáctico del SDF-1/CXCR4 es dependiente de la proteína Gi. El antagonista AMD3100 del receptor CXCR4 inhibió parcialmente la migración inducida por los medios condicionados de células tumorales y totalmente la migración inducida por SDF-1 (datos no mostrados).

### 10.1.8 Activación de AKT y ERK en células de carcinoma de pulmón (LAP0297 y LLC) estimuladas con factores asociados al microambiente tumoral



**Figura 38. Activación de ERK y AKT inducida por diferentes estímulos definidos y la migración eficiente de células tumorales estimuladas con SDF-1, LPA y HGF. A)** Activación de ERK y AKT inducida por diferentes estímulos definidos en células tumorales LAP0297. Evaluación de la activación a los 5 minutos de las proteínas ERK (pERK) y AKT (pAKT Ser473) por estímulos definidos: SDF-1, S1P, LPA, IL-8, VEGF, HGF, EGF, FGF; y estímulos complejos: SFB al 10% y medio condicionado de BMDC (MC de BMDC). Las células tumorales fueron sembradas en cajas de 6 pozos y ayunadas durante 14 horas antes de la estimulación con los ligandos correspondientes. **B)** Evaluación de la activación a los 5 minutos de las proteínas ERK (pERK) y AKT (pAKT Ser473) por estímulos definidos: SDF-1, S1P, LPA, IL-8, VEGF, HGF, EGF y FGF; y estímulos complejos: SFB al 10% y medio condicionado de BMDC (MC de BMDC). **C)** Migración de LLC estimuladas con SDF-1, LPA o HGF. Las células de carcinoma de pulmón de Lewis mostraron demasiada actividad en los ensayos de migración en cierre de herida, por ello se ayunaron 24 horas para atenuar el movimiento basal y valorar el efecto de los ligandos evaluados.

Evaluamos cuáles de los estímulos definidos tienen efecto sobre la activación de AKT y ERK en las células tumorales LAP0297 (Figura 38A). Las células tumorales fueron sembradas en cajas de 6 pozos, ayunadas durante 14 horas y estimuladas por 5 minutos con los diferentes estímulos presentes

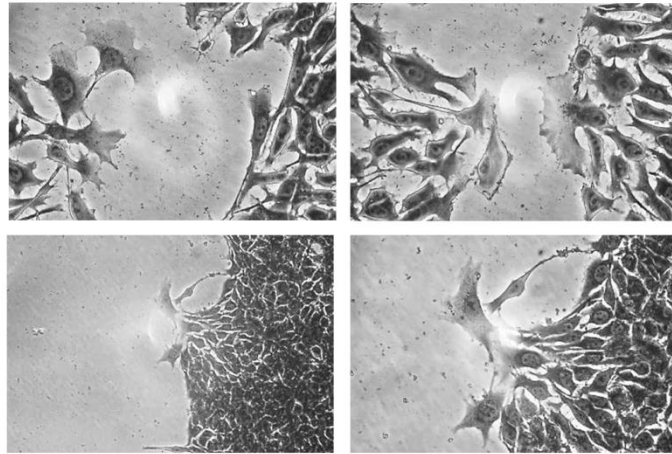


en el microambiente tumoral. En la Figura 38A se muestra el western blot representativo del efecto en la activación de AKT (pSer473-AKT1/2/3) y la activación de ERK (pMAPK 44/42) por ligandos que activan a GPCRs: SDF-1, S1P, LPA, IL-8; estímulos para receptores para cinasas: VEGF, HGF, EGF, FGF; y estímulos complejos como el SFB al 10% y medios condicionados de BMDC. Encontramos que las células tumorales LAP0297 respondieron a LPA, IL-8 y VEGF en la activación de AKT a los 5 min, mientras que para la activación de ERK (pERK) fue inducida por algunos estímulos como: S1P, LPA, IL-8 y SFB al 10%.

Las células tumorales de carcinoma de Lewis (LLC) respondieron a diferentes ligandos, para identificar aquellos ligandos que tienen la capacidad de estimular vías de señalización de AKT y ERK (Figura 38B), evaluamos diferentes estímulos sobre las LLC cultivadas y ayunadas, las cuales fueron estimuladas durante 5 min y lisadas para obtener muestras para analizar por western blot. Encontramos que de los ligandos para GPCRs evaluados, **el LPA indujo activación intensa de ERK y AKT en las células de carcinoma de Lewis**, mientras que S1P e IL-8 activaron ligeramente a AKT, pero no mostraron un efecto sobre la activación de ERK. Los ligandos para receptores acoplados a cinasas evaluados, encontramos que HGF, EGF y FGF activaron intensamente a ERK y AKT, en particular el HGF activó más fuerte a AKT mientras que FGF activo más a ERK; por su parte, el VEGF no tuvo efecto sobre las células tumorales a la concentración y el tiempo de estimulación utilizado. Finalmente, los estímulos complejos evaluados como son el suero y **los medios condicionados de las BMDCs (ratones C57) activaron fuertemente a AKT y ERK en células de carcinoma de pulmón de Lewis**, al igual que en la línea tumoral LAP0297, sugiriendo posiblemente la presencia de LPA, HGF, EGF y FGF dentro de los estímulos secretados por las BMDC, en esta línea tumoral LLC resalta su mayor respuesta a los estímulos utilizados. Los resultados mostraron que **el LPA induce fuertemente la activación de ERK y AKT en células de carcinoma de pulmón (LAP0297 y LLC)**. Adicionalmente, en ensayos de migración células tumorales LLC en cierre de herida encontramos que **SDF-1, LPA y HGF inducen la migración de las células LLC** (Figura 38C). Es importante señalar que las células tumorales LLC migran bastante de manera basal, fue necesario ayunar durante 24 horas para disminuir su motilidad y poder observar el efecto de los estímulos evaluados.

### 10.1.9 Las células tumorales LAP0297 migran en respuesta a los medios condicionados de BMDCs y es dependiente de $G_i \rightarrow G_{\beta\gamma}$

Células tumorales (LAP) polarizadas en cierre de herida



**Figura 39.** Las células tumorales migran individuales y de manera grupal en respuesta a los medios condicionados de las BMDCs. Monocapas de células tumorales sembradas sobre gelatina 0.02% en un ensayo de cierre de herida cuando fueron estimuladas con medios condicionados de BMDC.

La migración de las células tumorales es indispensable para la progresión del cáncer, en términos de invasión y metástasis, dada la importancia de los procesos moleculares que subyacen al movimiento de las células tumorales, decidimos evaluar si las células derivadas de la médula ósea promueven el movimiento de las células tumorales como parte del mecanismo pro-tumoral de las células provenientes de la médula ósea. Realizamos ensayos de cierre de herida para evaluar la migración de células tumorales de carcinoma de pulmón LAP0297 cuando son estimuladas con los medios condicionados obtenidos de células derivadas de la médula ósea y, además, evaluamos algunos factores que han sido reportados en el microambiente tumoral. Las células tumorales fueron sembradas en cajas de 6 o 12 pozos recubiertas con gelatina 0.02%, 24 horas después de la siembra, las células se ayunaron durante 6 horas y a la cuarta hora se añadió mitomicina C para inhibir la mitosis de las células tumorales inducida por los estímulos. Finalmente, se realizó una herida con ayuda de una punta de micropipeta y se lavaron las células para fotografiar las heridas y añadir el estímulo y tratamientos evaluados. Las células fueron fijadas a las 18 horas, teñidas con cristal violeta y fotografiadas.

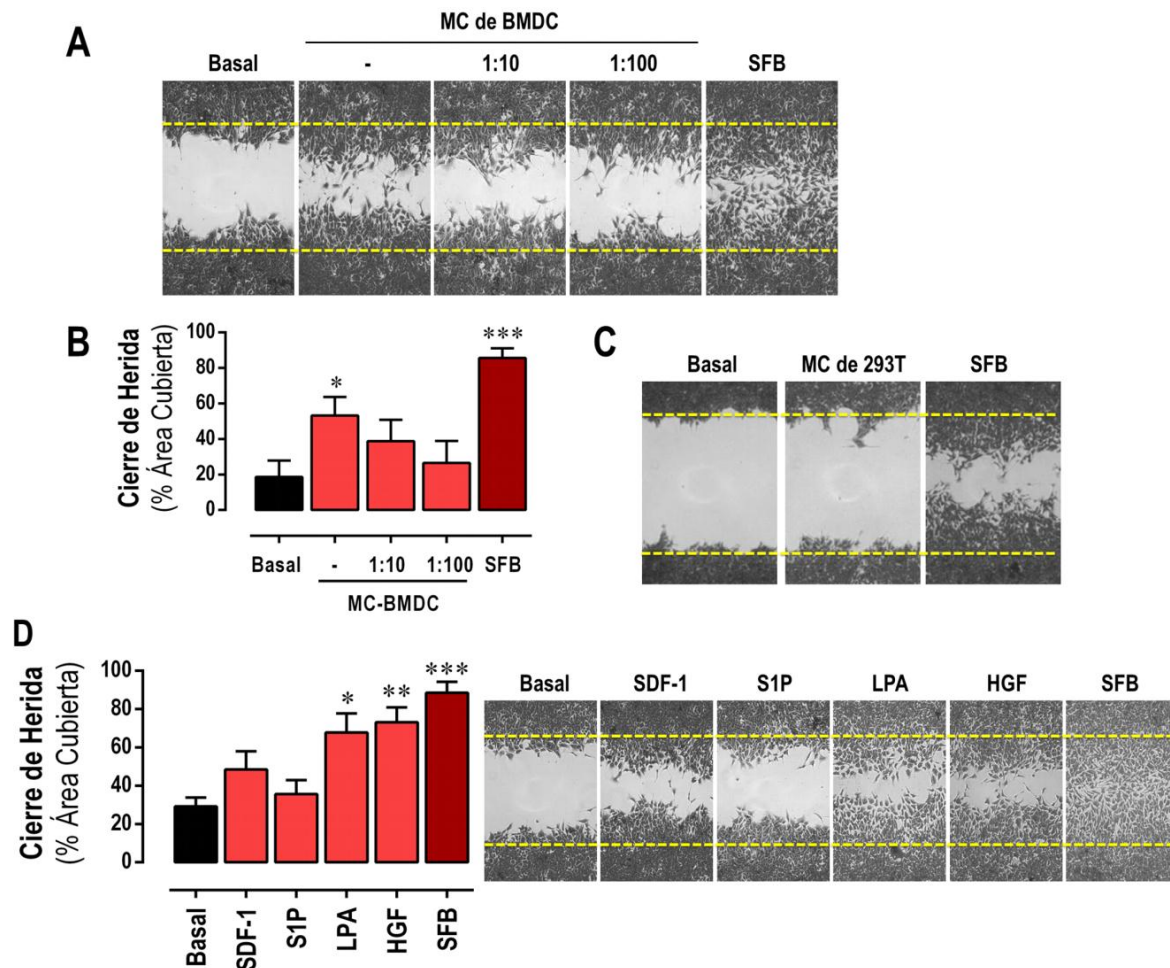


Las células tumorales mostraron que pueden migrar en el ensayo de cierre de herida de manera individual, liberándose de las células adyacentes y moviéndose sobre la matriz comprometida en el espacio de la herida. También observamos que, algunas células tumorales pueden seleccionarse como líderes en la migración grupal, dirigiendo al conjunto celular hacia el espacio de la herida. Estudiar los mecanismos que subyacen a los dos tipos de migración celular escapa al alcance del presente trabajo; sin embargo, es un tema relevante para estudiar, considerando que el primer tipo de migración (individual) podría ser parte de los procesos patológicos para la metástasis mientras que la migración grupal como parte de los procesos de invasión. Imágenes representativas en la Figura 39.

Observamos que **los medios condicionados obtenidos de células cultivadas de la médula ósea favorecen la migración de células tumorales** de manera dependiente de la concentración (cierre de herida detenida a las 18 horas) (Figura 40A y B), utilizamos los medios condicionados con la concentración obtenida de las células derivadas de la médula ósea y, además, realizamos diluciones 1:10 y 1:100 utilizando el medio EBM-2 sin suplementar para diluir los medios condicionados. En contraste, **las células tumorales LAP0297 no migran en respuesta a los medios condicionados de células no relevantes** como las células HEK293T (Figura 40C). Estos son mecanismos por los cuales esta población de células derivadas de la médula ósea podría favorecer el crecimiento de los tumores. Además, evaluamos otros estímulos definidos y observamos que **el LPA y HGF son ligandos que promovieron eficientemente la migración de células tumorales**, el SDF-1 indujo migración parcial mientras que esfingosina-1-fosfato no mostró efecto sobre la migración de células tumorales de carcinoma de pulmón (Figura 40D).

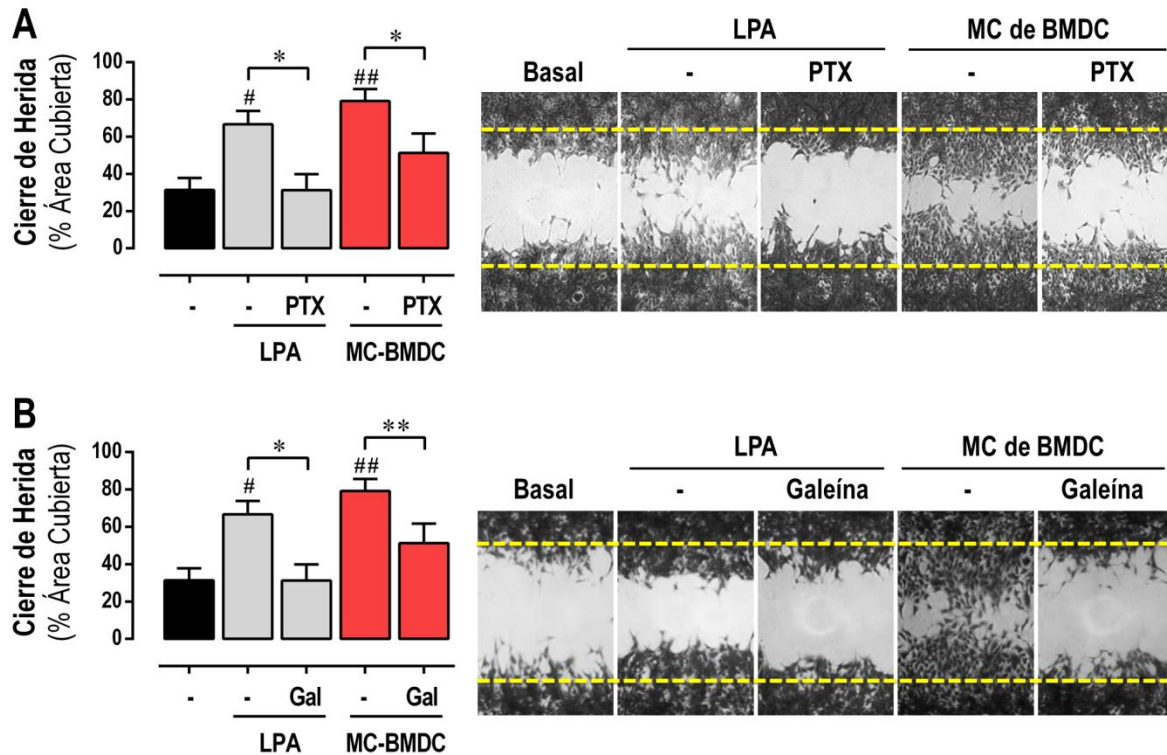
Posteriormente, evaluamos si la migración de células tumorales inducida por los medios condicionados de BMDC era dependiente de la activación de receptores acoplados a  $G_i$ . Incluimos en el experimento a células estimuladas con LPA, un agonista de GPCRs que indujo migración de células tumorales LAP0297 y que hipotetizamos que su efecto sobre la migración sería dependiente de  $G_i$ , es decir sensible a la toxina pertussis. El LPA indujo la migración de las células tumorales como lo habíamos visto previamente (Figura 40C), pero en las células tumorales tratadas con toxina pertussis encontramos que la migración de las células se prevenía, sugiriendo que **la migración inducida por LPA es dependiente de la señalización de receptores acoplados a la proteína  $G_i$**  (Figura 41A), a pesar de que los receptores  $LPA_{1-6}$  son característicos por la capacidad de activar a múltiples proteínas G, en algunos casos a todas las familias. Simultáneamente, los medios condicionados de

BMDCs indujeron la migración de las células tumorales (LAP0297) como lo habíamos observado en la Figura anterior, a pesar de que en estos medios condicionados los consideramos como estímulos complejos porque contienen diversos mediadores solubles secretados por las BMDCs con capacidad de activar múltiples vías de señalización, encontramos que la migración fue inhibida significativamente en las células tratadas con la toxina pertussis (Figura 41B). En resumen, estos resultados demuestran que los medios condicionados de BMDC y el LPA inducen la migración de células tumorales de manera dependiente de  $G_i$  y mediada por  $G_{\beta\gamma}$ .



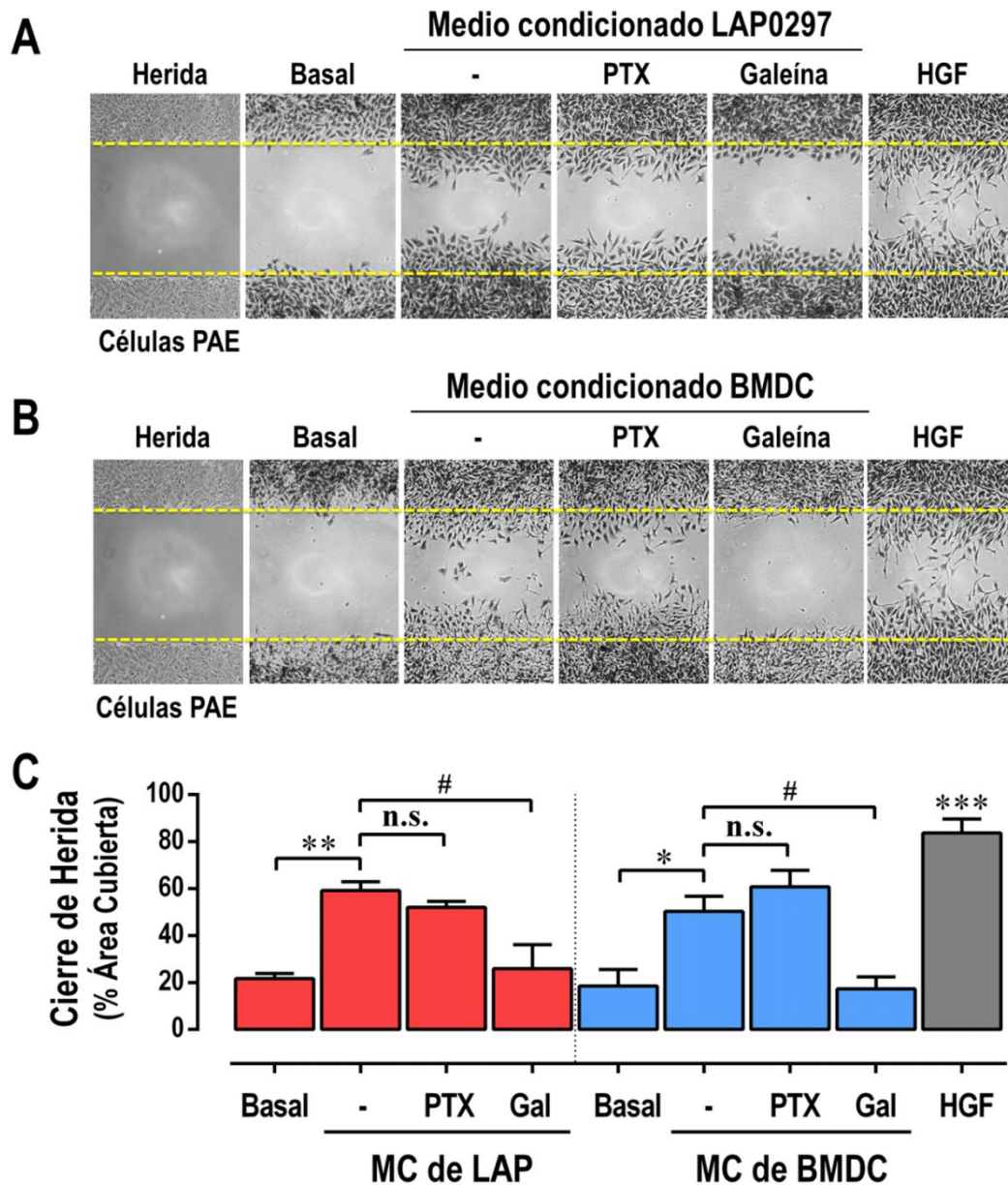
**Figura 40.** Los medios condicionados de células derivadas de la médula ósea (BMDCs), el SDF-1, LPA y HGF, inducen la migración de células tumorales LAP0297. **A)** Migración de células tumorales estimuladas con medios condicionados de células derivadas de la médula ósea (MC de BMDC). El cierre de herida se realizó en la caja de 6 pozos, las células tumorales se ayunaron por 6 horas con 2 horas tratadas con mitomicina C, la migración se detuvo a las 18 horas de exposición a los estímulos: MC de BMDC y sus diluciones 1:10 y 1:100, además del control positivo SFB al 10%. **B)** Cuantificación de la migración de las células tumorales mostrada en A. Los datos representan la media  $\pm$  EE de tres

experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. **C)** Los medios condicionados de células no relevantes (HEK293T) no inducen la migración de células tumorales LAP0297. **D)** Migración de células tumorales estimuladas con agonistas para GPCRs: SDF-1 (50 ng/mL), S1P (1  $\mu$ M) y LPA (5  $\mu$ M); agonista para receptores TrKs: HGF (10 ng/mL) y nuestro control positivo el SFB al 10%. Los datos representan la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.



**Figura 41.** La migración de células tumorales inducida por los medios condicionados de BMDCs y LPA, es dependiente de  $G_i$  vía el dímero  $G\beta\gamma$ . **A)** Migración de las células tumorales y la contribución de  $G_i$  revelada por su inhibición con toxina pertussis. Ensayos de cierre de herida con células tumorales LAP0297 sembradas sobre gelatina 0.02%. Las células fueron ayunadas y estimuladas con LPA (5  $\mu$ M) o con medios condicionados de células derivadas de la médula ósea, algunos pozos fueron incubados con PTX (200 ng/mL) 2 horas antes y durante el estímulo para inhibir la proteína  $G_i$ . Finalmente, las células fueron fijadas a las 18 hrs de iniciar la estimulación. Los datos representan la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes, \* $p < 0.05$  (-PTX vs +PTX); # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  (vs basal); ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey, \* $p < 0.05$  (MC vs. MC-PTX), prueba T. **B)** La migración de las células tumorales inducida por medios condicionados de BMDC y por LPA es inhibida por galeína, un inhibidor de  $G\beta\gamma$ . Las células tumorales LAP0297 siguieron el procedimiento descrito para A, algunos pozos fueron incubados con galeína (10  $\mu$ M) 2 horas antes y durante el estímulo con medio condicionado de BMDC, o bien con LPA (5  $\mu$ M). Los datos representan 3 experimentos independientes; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (-Gal vs +Gal); # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  (basal vs estímulo); ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

### 10.1.10 Las células endoteliales (PAE) migran en respuesta a los medios condicionados de células tumorales y BMDCs vía $G\beta\gamma$



**Figura 42.** Medios condicionados de BMDCs y células tumorales promueven la migración de células endoteliales vía dependiente de GPCRs  $\rightarrow G\beta\gamma$ . **A)** La migración de células endoteliales inducida por los medios condicionados de células tumorales fue inhibida por galeína (inhibidor de  $G\beta\gamma$ ), y parcialmente inhibida cuando el estímulo fue el medio condicionado de BMDCs. Ensayos de cierre de herida de células endoteliales ayunadas durante 14 horas y estimuladas durante 16 horas, fueron pre-incubadas con toxina pertussis 100 ng/mL toda la noche, mientras que la galeína se añadió 2 horas antes de realizar la herida. Como control positivo de la migración celular se utilizó HGF (10 ng/mL). **B)** La migración



de células endoteliales inducida por los medios condicionados de células derivadas de la médula ósea fue sensible a la inhibición de  $G\beta\gamma$ . **C)** Gráfica de las migraciones de células endoteliales por medios condicionados de células tumorales y de BMDCs mostradas en los incisos A y B. Los datos representan la media  $\pm$  EE de 3 experimentos independientes \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (vs basal); # $p < 0.05$  (MC vs MC+galeína), n.s. no significativo. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

Durante el crecimiento de los tumores primarios y metástasis, la migración de células endoteliales de los vasos sanguíneos adyacentes es relevante para la progresión y supervivencia de las células tumorales <sup>19</sup>, es por ello que se espera que los mediadores solubles secretados por las células tumorales promuevan la migración de células endoteliales para este fin. Con este concepto en mente decidimos evaluar la migración de una línea celular endotelial de aorta de porcino (PAE, Porcine Aortic Endothelial) utilizando medios condicionados de células tumorales, pero también el efecto pro-angiogénico que podrían tener las BMDCs. Las células endoteliales fueron sembradas en cajas de 12 pozos recubiertos con gelatina 0.02%, fueron ayunadas toda la noche y en su caso, incubadas con PTX 100 ng/mL para inhibir las proteínas  $G_i$ ; en otros ensayos de migración con otro tipo celular se incubó la toxina pertussis junto dos horas antes de la herida, sin embargo, ensayos preliminares no mostraban efecto inhibitorio de PTX en células endoteliales estimuladas con ligando que se esperaba migraran vía  $G_i$ . Dos horas antes de realizar la herida, se añadió mitomicina C y en su caso, se añadió galeína para inhibir a  $G\beta\gamma$ .

En los ensayos de cierre de herida observamos que **las células endoteliales migraron en respuesta a los medios condicionados de células tumorales y también en respuesta a los medios condicionados de las BMDCs** (Figura 42A, B y C). Lo cual sugiere que los mediadores solubles secretados tanto por células tumorales como células derivadas de la médula ósea promueven la migración de las células endoteliales. En este mecanismo de migración, el dímero  $G\beta\gamma$  es un elemento de señalización importante para la migración inducida por estos medios condicionados, curiosamente la inhibición del heterotrímero  $G_i$  no parece ser relevante en este tipo celular y en el proceso evaluado, esto lo podemos observar en las células que fueron pre-tratadas con toxina pertussis, en estas condiciones, la migración de las células no fue abatida como ocurrió en las células tumorales (Figura 42A) y células de la médula ósea (Figura 42B), lo que sugiere que posiblemente otro heterotrímero es el donador de  $G\beta\gamma$ , ya que la migración fue abatida con el inhibidor de  $G\beta\gamma$  galeína. Las células endoteliales fueron afectadas cuando tenían el medio EBM-2 con tiempos prolongados y

por ello la migración celular se detuvo antes del cierre. En experimentos no mostrados observamos que las células endoteliales utilizadas (PAE) migran con estímulos como HGF, FGF, EGF, S1P y LPA, particularmente la migración inducida por S1P y LPA que activan a GPCRs, tampoco fue prevenida con toxina pertussis como esperábamos, apoyando la hipótesis de que este tipo celular puede migrar a través de otro heterotrímero como Gs, evidencia que se tiene en el laboratorio por la migración inducida por el receptor EP<sub>2</sub> de prostaglandina E<sub>2</sub>. En resumen, **las células endoteliales migran en respuesta a los medios condicionados de células tumorales y BMDCs vía Gβγ, pero de manera independiente de Gi.**

## 10.2 Resultados del OBJETIVO 2

Caracterizar de forma comparativa la expresión de RhoGEFs en las células pro-tumorales derivadas de la médula ósea respecto a la médula ósea fresca con el fin de identificar RhoGEFs expresados diferencialmente.

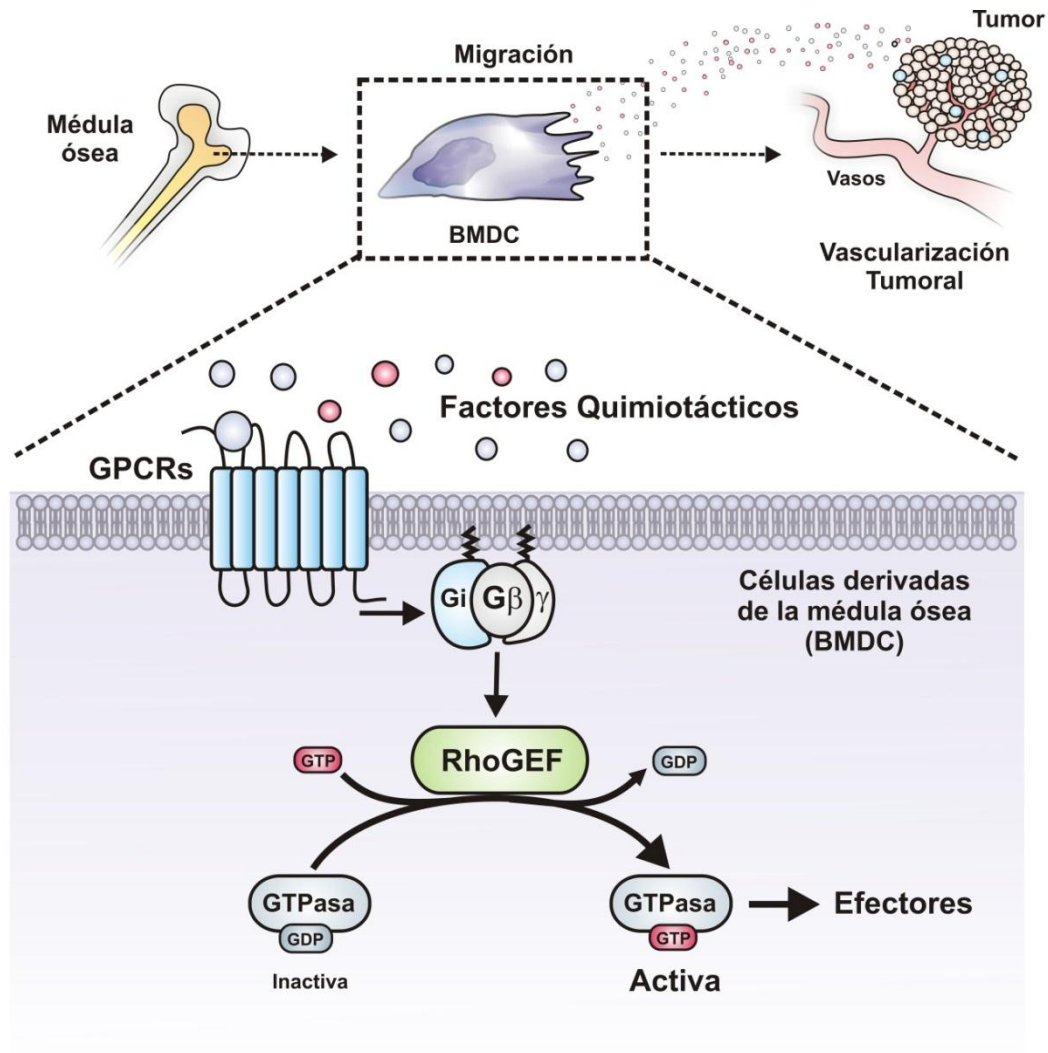


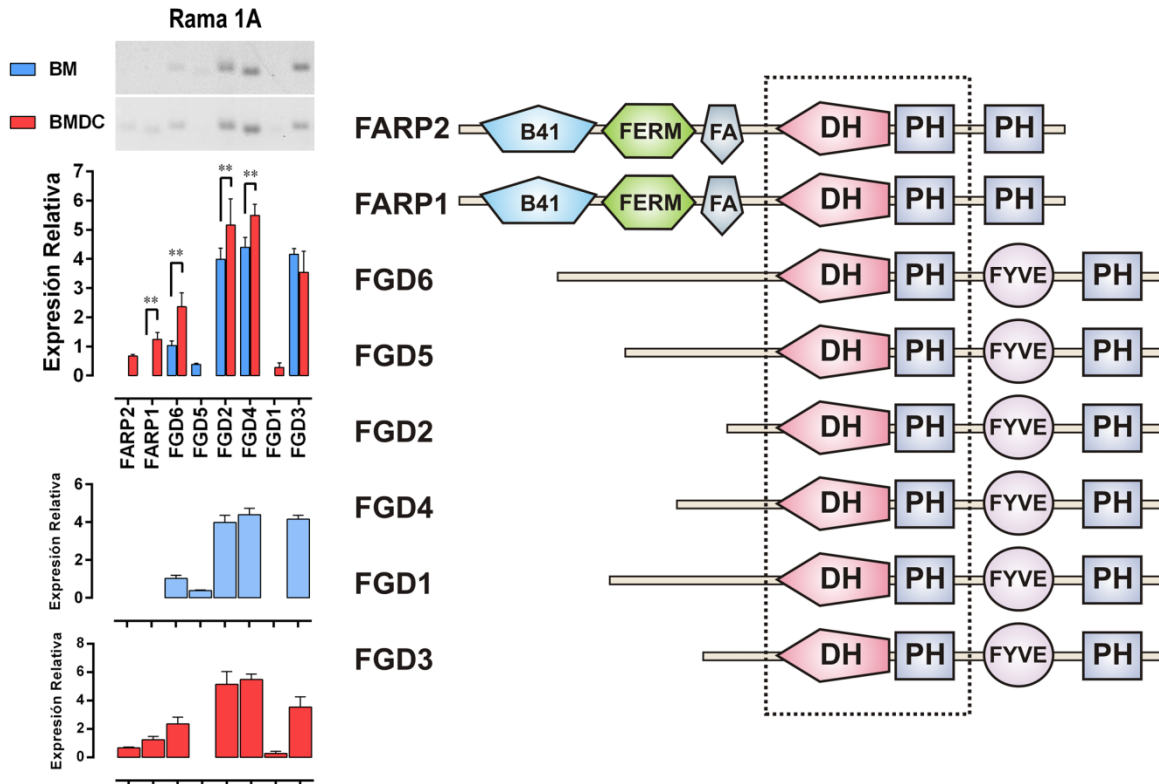
Figura 43. Modelo que representa la migración celular y la señalización general involucrada en la contribución de GPCRs quimiotácticos en un escenario tumoral. Los GPCRs quimiotácticos requieren activar de manera intracelular a proteínas responsables del reordenamiento del citoesqueleto de actina, proteínas de señalización como los RhoGEFs y las RhoGTPasas son activadas a partir de GPCRs involucrados en la migración celular como el CXCR4 y LPAR.

### 10.2.1 Perfil de expresión del RNA mensajero de los RhoGEFs en células derivadas de la médula ósea

Utilizando la base de datos SMART (Simple Modular Architecture Research Tool), identificamos las secuencias de **62 RhoGEFs** codificados en el genoma de ratón. Utilizando primers para los 62 RhoGEFs, evaluamos su expresión por RT-PCR en las células cultivadas de la médula ósea y contrastamos con el perfil expresado en células de la médula ósea fresca de ratones FVB-Tie2-GFP (Figura 44). Las secuencias de los primers utilizados para los RhoGEFs de ratón, se encuentran en la sección de Anexos y fueron reportados previamente <sup>99</sup>, donde se analizó la expresión de los RhoGEFs en células endoteliales. Para obtener estos resultados realizamos extracción del mRNA de las células cultivadas de la médula ósea (cultivadas durante 2 semanas) y células de la médula ósea recién obtenidas de la tibia de ratones (y depuradas de eritrocitos) para comparar, utilizando el método de TRIZOL para la extracción, posteriormente se realizó la transcripción reversa del mRNA y finalmente se preparó la PCR de los RhoGEFs a partir del cDNA. La expresión fue normalizada considerando el total de expresión de todos los RhoGEFs en cada tipo celular y como control se utilizó actina en cada experimento para seleccionar las exposiciones de las bandas a analizar.

Con base en el árbol filogenético de RhoGEFs expresados en humano que fue publicado por Hernández y colaboradores en 2015 <sup>99</sup>, presentamos a continuación los resultados de expresión de los RhoGEFs siguiendo el orden previamente establecido mediante el parecido de las secuencias codificantes del dominio DH de los RhoGEFs. **El árbol de RhoGEFs consistió en dos grandes ramas filogenéticas divididas cada una en dos: Rama 1A, 1B, 2A y 2B.** Los RhoGEFs que corresponden a la Rama 1A son ocho y todos ellos tienen los dominios DH-PH en tándem y son los siguientes: FARP2 y FARP1, con dominios del mismo tipo en su extremo amino y carboxilo (B41, FERM y PH); los RhoGEFs nombrados del FGD1 al FGD6 se ubican en esta rama con la característica común de tener un dominio FIVE y un PH en el extremo carboxilo (Figura 44). Nuestros resultados muestran que el **FGD2, FGD4 y FGD3 son los RhoGEFs más expresados de la rama filogenética 1A.** Pero de todos los GEFs evaluados aquí, cuatro de ellos mostraron cambios significativos, particularmente encontramos que el mensajero de **FARP1, FGD6, FGD2 y FGD4 incrementan en las BMDCs**, mientras que FGD5 y FGD1 son casi indetectables en las células evaluadas.

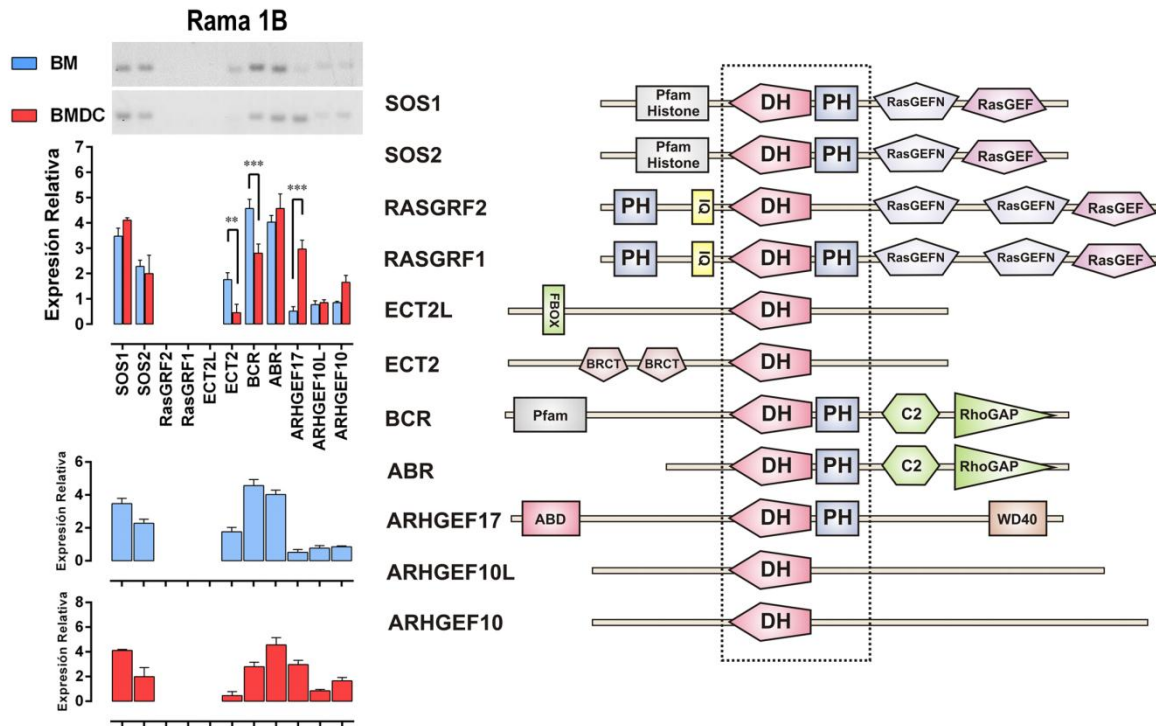




**Figura 44. Perfil de expresión de los RhoGEFs de la Rama 1A en BMDCs y BM.** Análisis de expresión del RNAm para los RhoGEFs de la Rama 1A, comparando la expresión de los GEFs entre células de la médula ósea completa versus células derivadas de la médula ósea.

La Rama 1B está conformada por 11 RhoGEFs, algunos de estos DH-RhoGEFs no tienen dominio PH adyacente al dominio PH como son: ARHGEF10, ARHGEF10L, ECT2 y ECT2L (Figura 45). El análisis de expresión del mensajero reveló que los RhoGEFs son SOS1, BCR y ABR de esta rama se expresan bien en células de la médula ósea, ya sea cultivada o no. En contraste, tres de los RhoGEFs que conforman esta rama, no fue detectada su expresión en las células de la médula ósea, corresponden a RASGRF1, RASGRF2 y ECT2L. Cuando comparamos la expresión de todos los RhoGEFs de la rama 1B entre los dos grupos de las células de la médula ósea, tres de ellos mostraron diferencia significativa, dos de ellos disminuyendo en BMDC y uno incrementando a nivel de mensajero. **Los RhoGEFs ECT2 y BCR de la Rama 1B fueron significativamente disminuidos en las células derivadas de la médula ósea**, aun así, conservan una expresión clara detectada en las bandas de PCR. Uno de los RhoGEF que parece ser relevante es el ARHGEF17, también conocido

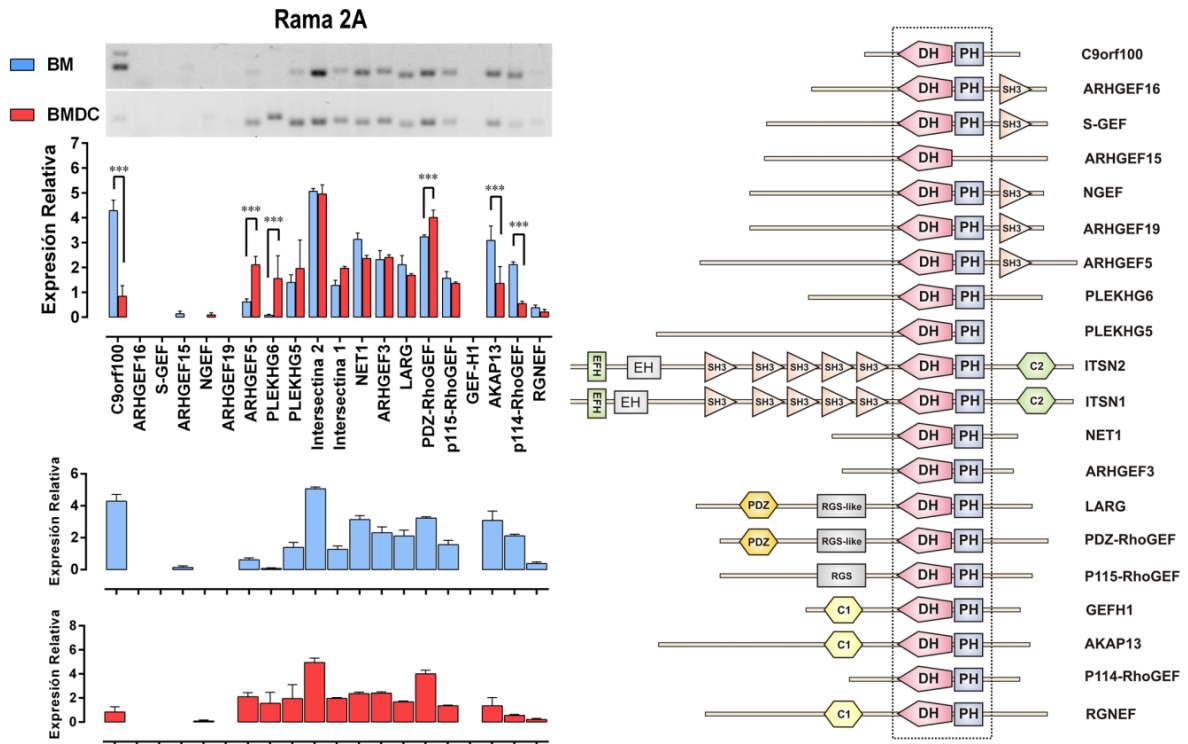
como marcador de endotelio tumoral 4 (TEM4, Tumor Endothelial Marker 4), detectamos que el mRNA de ARHGEF17 se incrementó significativamente en las BMDCs, con respecto a las células de médula ósea total; este resultado es interesante para nosotros, ya que es un RhoGEF que previamente se reportó como una proteína sobre-expresada en células endoteliales que se encuentran en los tumores de cáncer colorrectal <sup>119</sup>, sugiriendo que puede tener un papel en el proceso de angiogénesis tumoral en células endoteliales, y aquí, en células de la médula ósea pro-tumorales.



**Figura 45. Perfil de expresión de los RhoGEFs de la Rama 1B en BMDCs y BM.** Análisis de expresión del mRNA para los RhoGEFs de la Rama 1B, comparando la expresión de los GEFs entre células de la médula ósea completa versus células derivadas de la médula ósea.

Los RhoGEFs que conforman la Rama 2A cuentan con los dominios DH-PH con excepción del ARHGEF15; esta rama es de nuestro particular interés debido a que se encuentra un grupo de RhoGEFs regulado por GPCRs y son nombrados en conjunto como los RGS-RhoGEFs (LARG, PDZ-RhoGEF y p115-RhoGEF), los tres miembros fueron expresados a nivel de mensajero de manera adecuada en las células de la médula ósea (Figura 46). Uno de los RhoGEFs que resaltó a simple vista fue el C9orf100, el primero que se enlista en la rama, el mensajero de éste claramente disminuyó

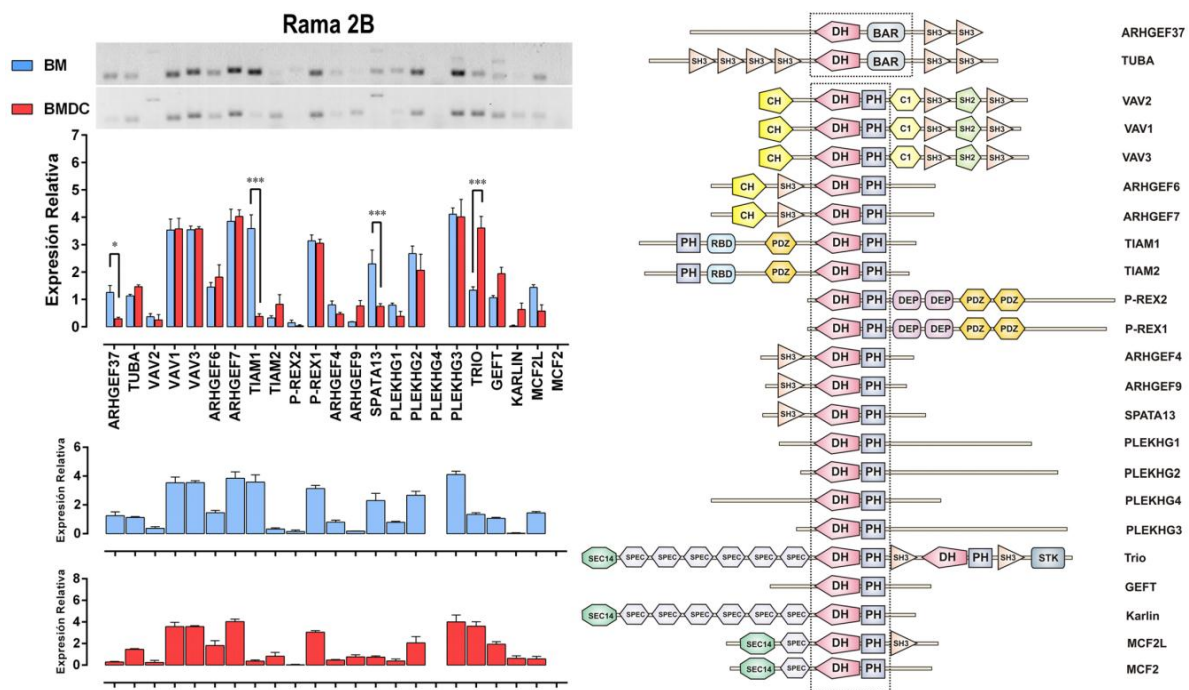
en BMDC, mientras que en el grupo BM, es uno de los RhoGEFs más expresados, inclusive se apreció un doble bandeo en gel de agarosa por la amplificación de una variante de “splicing”, la cual desaparece en el grupo de BMDC. Otro de los RhoGEFs que disminuyó significativamente en BMDC fue AKAP13.



**Figura 46. Perfil de expresión de los RhoGEFs de la Rama 2A en BMDCs y BM.** Análisis de expresión del mRNA para los RhoGEFs de la Rama 2A, comparando la expresión de los GEFs entre células de la médula ósea completa versus células derivadas de la médula ósea.

Encontramos en la Rama 2A que tres RhoGEFs incrementaron significativamente en las BMDCs, los dos primeros son ARHGEF5 y PLEKHG6, este último GEF incrementó bastante, de hecho, en células de la médula ósea sin cultivar fue prácticamente indetectable en contraste con la expresión en BMDC. Dentro de los RGS-RhoGEFs de nuestro interés, **el PDZ-RhoGEF incrementó significativamente en BMDCs** con respecto a las células de la médula ósea no cultivada, y a pesar de ello, este RhoGEF se expresa muy bien en las células de la médula ósea; **p115-RhoGEF y LARG son expresados en BMDCs**, aunque no hubo diferencia a nivel del mensajero con respecto a la

médula ósea completa (Figura 46). El Cdc42-GEF Intersectina 2 (ITSN2) fue uno de los RhoGEFs más expresados en las células de la médula ósea pero no encontramos cambios significativos entre las células cultivadas y no cultivadas. Finalmente, seis de los RhoGEFs de esta rama filogenética no fueron expresados o fueron casi indetectables y corresponden a los siguientes: ARHGEF16, S-GEF, ARHGEF15, NGEF, ARHGEF19 y GEF-H1.



**Figura 47. Perfil de expresión de los RhoGEFs de la Rama 2B en BMDCs y BM.** Análisis de expresión del RNA mensajero para los RhoGEFs de la Rama 2B, comparando la expresión de los GEFs entre células de la médula ósea completa versus células derivadas de la médula ósea.

Finalmente, la Rama 2B (Figura 47) está conformada por 23 DH-RhoGEFs, dos de ellos no cuentan el dominio PH adyacente al DH, sin embargo, en su lugar cuentan con un dominio BAR que sugiere la unión a membranas vesiculares, estos GEFs son: ARHGEF37 y TUBA. La expresión de los RhoGEFs PLEKHG4 y MCF2 no fue detectada en las células de la médula ósea. Encontramos que sólo el mensajero del RhoGEF **Trio incrementó significativamente su expresión en las BMDCs**. El mensajero de RacGEF Tiam1 disminuyó significativamente en las BMDC, en las células BM la señal de expresión fue intensa similar a ARHGEF7, Vav1, Vav3 y PLEKHG3. Otros dos RhoGEFs disminuyeron su expresión significativamente en BMDCs y fueron ARHGEF37 y SPATA13. Este último

GEF mostró una isoforma la cual desapareció en las BMDCs. De la misma manera los RhoGEFs como el GEFT y PLEKHG3 mostraron una isoforma en las células BM, pero estas isoformas no fueron expresadas en las BMDCs. **P-Rex1 se expresó muy bien en BMDCs**, aunque no hubo diferencia en el mRNA con respecto a la médula ósea total, mientras que el mensajero de P-Rex2 fue casi indetectable.

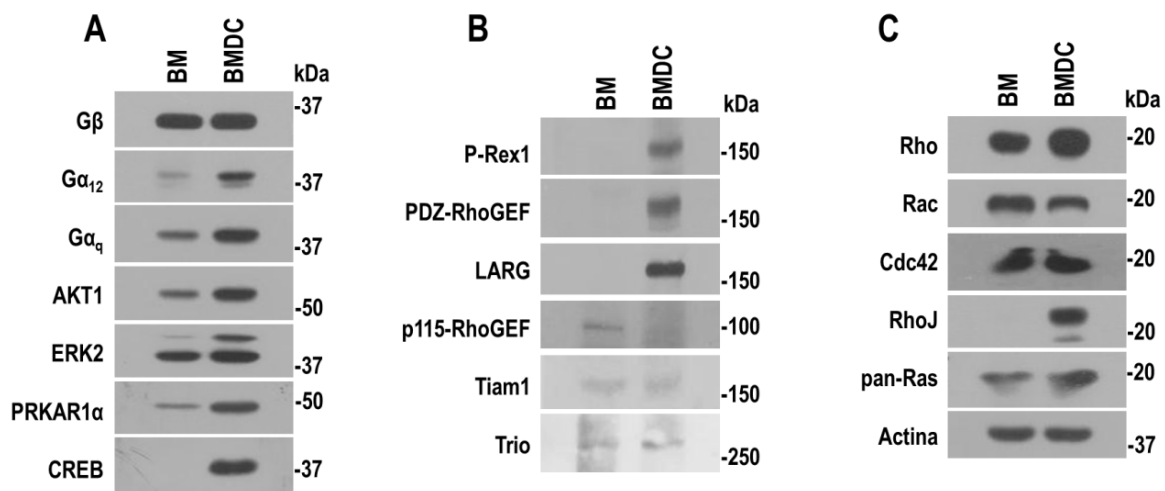
En resumen, detectamos la expresión de 49 RhoGEFs en células de la médula ósea no cultivada (BM) y 51 en las células derivadas de la médula ósea cultivada (BMDC). Los RhoGEFs cuya expresión del RNA mensajero incrementó significativamente en la población cultivada de la médula ósea capaz de promover el crecimiento de los tumores fueron: FARP1, FGD6, FGD2, FGD4, ARHGEF17, PDZ-RhoGEF y Trio. Mientras que aquellos RhoGEFs cuya expresión del RNA mensajero disminuyó significativamente en la población de células pro-tumorales fueron: ECT2, BCR, C9orf100, AKAP13, ARHGEF37, Tiam1 y SPATA13.

En estos resultados observamos que la intensidad de expresión de algunos RhoGEFs fue diferente entre las poblaciones celulares de la médula ósea evaluadas. **Los RhoGEFs regulados por GPCRs como P-Rex1, LARG, p115-RhoGEF y PDZ-RhoGEF, fueron expresados en las células que cultivamos de la médula ósea**, incluso PDZ-RhoGEF incrementó significativamente como consecuencia de las condiciones de cultivo. Estos y otros RhoGEFs que son expresados diferencialmente en la población enriquecida de BMDC-Tie2+ pro-tumorales, de ser validados en la expresión de la proteína, resultan interesantes para estudiar y profundizar en sus mecanismos moleculares de regulación, así como su posible contribución en los efectos pro-tumorales de las células derivadas de la médula ósea.

### 10.2.2 Expresión diferencial de proteínas de señalización en médula ósea fresca versus células derivadas de la médula ósea evaluadas por western blot

Una vez encontradas diferencias en la expresión de genes cuando comparamos las células de la médula ósea extraídas (BM) versus aquellas que se cultivaron por dos semanas (BMDCs), particularmente en la expresión del mensajero de los diferentes RhoGEFs codificados en el genoma del ratón. Nos propusimos realizar algunos westerns de proteínas de señalización para explorar si esta idea de que existen cambios en la expresión de mensajero se podía reflejar en cambios en la cantidad de proteína si comparamos los dos grandes grupos experimentales de células BM versus BMDC. Para

obtener los lisados citosólicos de las células, obtuvimos para el grupo experimental BM, las células nucleadas de la médula ósea (lisando eritrocitos y realizando lavados para retirar los restos celulares, según se describe en la sección de metodología) y fueron lisadas en tubo. Para el grupo experimental BMDC, las células fueron cultivadas durante dos semanas según el protocolo descrito de cultivo celular, posteriormente fueron lisadas con gendarme en las cajas de cultivo. Se comparó la cantidad de expresión de las proteínas de señalización mostradas en la Figura 48, decidimos ajustar la cantidad de actina, de manera que tuviéramos la señal de actina equivalente en ambos tipos celulares y partimos de ahí para buscar las proteínas expresadas diferencialmente, así pues, encontramos diferencias en varias proteínas de señalización evaluadas con particular interés. En la Figura 48 ordenamos los resultados de western blot en tres grupos: proteínas de señalización clásicas, RhoGEFs y RhoGTPasas.



**Figura 48. Expresión de proteínas de señalización en células de la médula ósea recién extraída y cultivada. A)** Western blot de proteínas de señalización clásicas, **B)** de RhoGEFs, **C)** y de GTPasas pequeñas. Las proteínas fueron obtenidas de la lisis de células nucleadas de la médula ósea recién extraída de ratones de la cepa FVB y libres de eritrocitos (BM), y el otro grupo experimental de cultivos de dos semanas de células derivadas de la médula ósea con medio EGM-2MV (BMDC). Para contrastar la expresión de proteínas de señalización, los experimentos se realizaron ajustando la cantidad de actina a niveles equivalentes y a partir de ello se buscaron por western blot el resto de las proteínas mostradas.

En la Figura 48A, mostramos la comparación de proteínas de vías de señalización clásicas en células cultivadas de la médula ósea en contraste con células de la médula ósea total. Algunas proteínas de señalización como son la PRKAR1α (subunidad reguladora de la PKA), la cantidad de



AKT y ERK incrementaron sutilmente en las células cultivadas (BMDCs), sugiriendo que estas células maduran las vías de señalización para mejorar su eficiencia donde participan estas proteínas mientras que las proteínas G. También exploramos algunas subunidades que conforman a las proteínas G, encontramos y **la subunidad  $G\alpha_q$  y la subunidad  $G\alpha_{12}$  incrementaron en las BMDCs considerablemente**, esta última subunidad junto con  $G\alpha_{13}$  tienen a un grupo de RhoGEFs como sus principales efectores directos. Por otro lado, subunidad  $G\beta$  se encontró con una expresión similar en ambas condiciones de células de la médula ósea, sin cambio aparente en la cantidad de proteína. Finalmente, un factor de transcripción clásico, CREB que responde a vías de señalización por incremento de AMPc y activación de ERK, incrementó en células derivadas de la médula ósea cultivadas, mientras que en aquellas que no se cultivaron no se detectó.

Validamos la expresión de la proteína de algunos RhoGEFs de nuestro interés que observamos expresados a nivel de mensajero en la Figura 48B. Encontramos que algunos RhoGEFs son enriquecidos en el esquema de cultivo de la médula ósea, particularmente aquellos regulados por GPCRs y que son parte de nuestro objetivo de estudio. El RhoGEF para Rac que es un efector del heterodímero  $G\beta\gamma$ , **P-Rex1 incrementó excesivamente en las BMDCs a nivel de proteína**, contrastando con las células de la médula ósea sin cultivar donde en los lisados citosólicos no fue observada la expresión. De manera similar, el **PDZ-RhoGEF (ARHGEF11) mostró un claro incremento en la expresión de la proteína en BMDCs**, una de las proteínas de nuestro interés, consistente con los resultados obtenidos en la expresión del mensajero, mientras que en el grupo experimental BM, fue casi indetectable el GEF. **Otro RGS-RhoGEF interesante es LARG (ARHGEF12), este GEF incrementó en BMDCs**, observamos una señal intensa de esta proteína en BMDC, pero en médula ósea sin cultivar no fue posible detectar por western blot. Estos resultados demostraron que **P-Rex1, PDZ-RhoGEF y LARG son proteínas enriquecidas en la población pro-tumoral de la médula ósea**, posiblemente son relevantes en los efectos pro-tumorales de las células derivadas de la médula ósea que se infiltran en los tumores.

En contraste al resultado de los RhoGEFs mencionados, el p115-RhoGEF que también pertenece a los RGS-RhoGEFs, se encontró expresado en células de la médula ósea recién extraída pero este GEF disminuyó en BMDCs y no fue detectado mediante western blot. El GEF Tiam1 mostró una tendencia a disminuir en las BMDCs, pero el nivel de expresión en ambos grupos experimentales fue bajo. Otro GEF analizado fue **Trio que en el análisis de expresión de mensajero incremento**

**significativamente en las células cultivadas de la médula ósea**, un GEF que puede activarse por  $G\alpha_q$ <sup>102</sup>; sin embargo, por western blot se encontró en niveles similares a las células de la médula ósea completa.

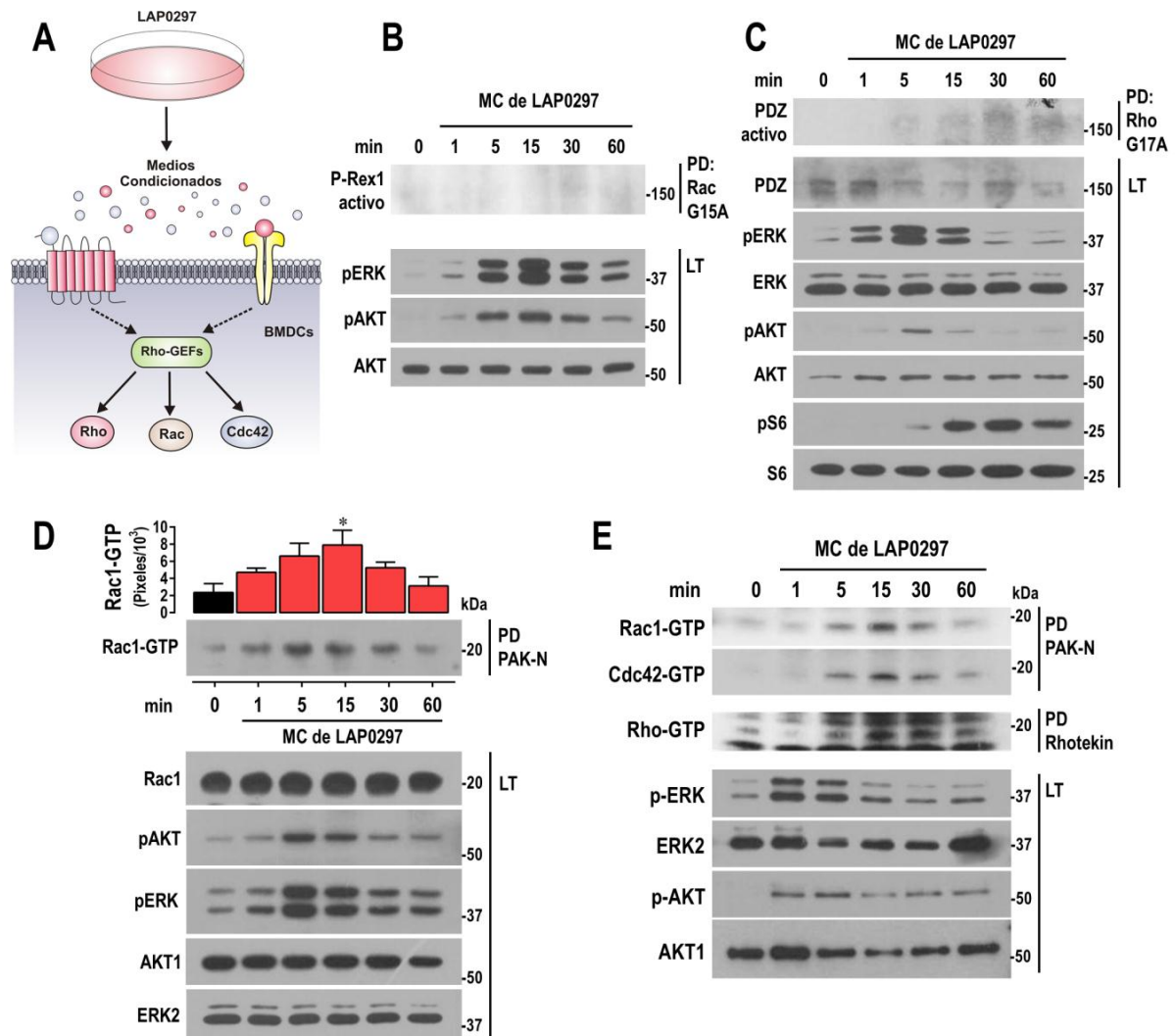
Analizamos la expresión de las RhoGTPasas clásicas que incluyen a RhoA, Rac1 y Cdc42, además de RhoJ que es una GTPasa asociada a la formación de filopodios en células endoteliales (Figura 48C). Como se esperaba, **la expresión de las proteínas de RhoA, Rac1 y Cdc42 fue intensa y similar entre los grupos experimentales de BMDC y BM**, estas GTPasas son importantes para modificar el citoesqueleto celular durante la migración, y también la cantidad de GTPasas de Ras fue similar entre las células de la médula ósea. Sorpresivamente, **la GTPasa RhoJ se encontró expresada en células derivadas de la médula ósea cultivadas** con respecto a las células de la médula ósea recién extraída, en estas últimas la GTPasa fue indetectable por western blot. La GTPasa RhoJ ha sido vinculada a procesos de angiogénesis tumoral y fue inicialmente identificada en células endoteliales y catalogada como una GTPasa expresada restringidamente en endotelio<sup>98,120</sup>; sin embargo, nuestros resultados demuestran que las BMDC protumorales expresan a RhoJ y posiblemente contribuye a las propiedades protumorales de la población celular.

### 10.2.3 Activación de RhoGTPasas y RhoGEFs en BMDCs estimuladas por medios condicionados de células tumorales

Después nos propusimos evaluar si los RhoGEFs dependientes de GPCRs como P-Rex1 y PDZ-RhoGEF, así como las RhoGTPasas como Rac, Cdc42 y Rho podrían ser activados en las células derivadas de la médula ósea, cuando estas son estimuladas con medios condicionados obtenidos de células tumorales LAP0297. La activación de estas proteínas es fundamental para la migración celular, ya que promueven el reordenamiento del citoesqueleto que favorece el movimiento polarizado de la célula. Previamente observamos que los factores solubles que se encuentran en los medios condicionados llevan a la activación de vías como AKT, ERK y mTOR; además, inducen migración de BMDCs en ensayos de cierre de herida. Por ello decidimos evaluar la activación de RhoGEFs y RhoGTPasas en un curso temporal (Figura 49). Para realizar estos experimentos utilizamos BMDCs provenientes de ratones FVB-Tie2-GFP que fueron cultivadas durante dos semanas y sembradas nuevamente sobre ProNectin, un día antes del ensayo fueron ayunadas con medio EBM-2 (sin suplementos ni suero). La activación de RhoGEFs modulados por GPCRs en BMDCs se determinó utilizando GTPasas libres de nucleótido recombinantes unidas a glutatió-



safarosa (GST-RacG15A y GST-RhoG17A). Estas GTPasas mutantes se encuentran en un estado de alta afinidad por los RhoGEFs activos correspondientes.



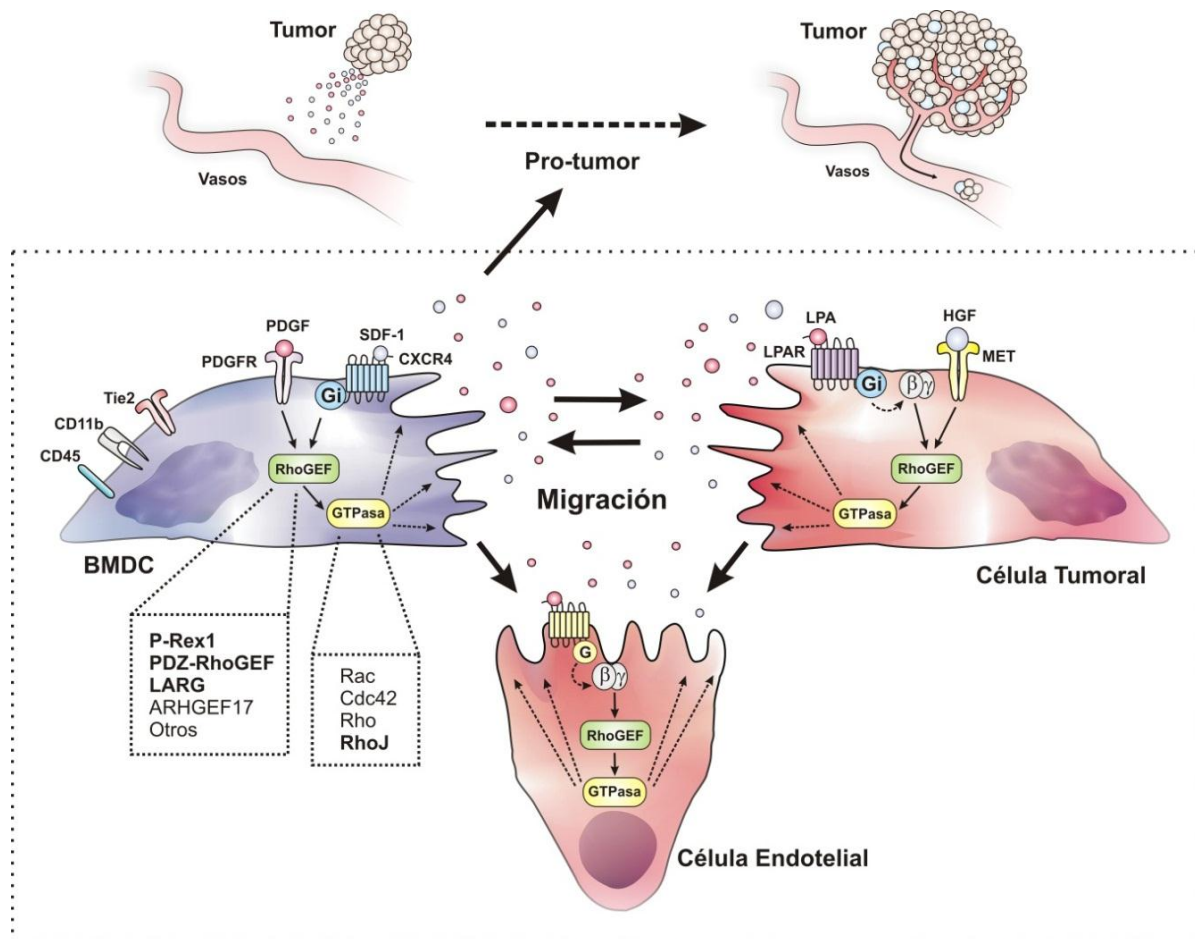
**Figura 49. Los medios condicionados de células tumorales activan a RhoGEFs (P-Rex1 y PDZ-RhoGEF) y a RhoGTPasas en BMDCs. A)** Esquema experimental que representa la activación de GEFs y GTPasas inducida por medios condicionados de células tumorales. **B)** Activación de P-Rex1 en BMDC estimuladas con medios condicionados de células tumorales. Ensayos de captura de RhoGEFs activos, utilizando proteínas recombinantes de RacG15A. **C)** Activación de PDZ-RhoGEF en BMDCs estimuladas con MC de células tumorales. Ensayo de captura de RhoGEFs activos utilizando proteínas recombinantes de GST-RhoG17A unida a glutatión-safarosa. **D)** Activación de Rac1 en BMDC estimuladas con medios condicionados de células tumorales. **E)** Activación de Rho, Cdc42 y Rac en BMDCs estimuladas con medios condicionados de células tumorales. Las BMDCs fueron obtenidas de ratones FVB-Tie2-GFP y cultivadas durante dos semanas. Se resembraron en cajas p60 recubiertas con ProNectin, fueron ayunadas 14 horas y finalmente estimuladas con medios condicionados de células tumorales (LAP0297) durante 1, 5, 15, 30 y 60 minutos antes de lisar.

Para evaluar si PDZ-RhoGEF se activa en respuesta a medios condicionados de células tumorales, utilizamos la recombinante GST-RhoG17A unida a glutatión-safarosa, mientras que para capturar a P-Rex1 en su estado activo utilizamos a GST-RacG15A unida a glutatión-safarosa. En estos ensayos, encontramos que **PDZ-RhoGEF y P-Rex1 endógenos son activados en las células derivadas de la médula ósea cuando son estimuladas por medios condicionados de células tumorales LAP0297**, con un máximo de activación a los 30 minutos (Figura 49B y 49C, respectivamente). Como controles del estímulo de las células de la médula ósea con los medios condicionados de las células tumorales, incluimos la activación de ERK y AKT, proteínas que responden muy bien al estímulo de medio condicionado de células tumorales como previamente se había mostrado. Para determinar la activación de las RhoGTPasas en los lisados celulares de BMDCs estimuladas por medios condicionados de células tumorales, realizamos precipitaciones por afinidad de RhoGTPasas activas (unidas a GTP) utilizando como carnadas a proteínas recombinantes unidas a glutatión-safarosa que corresponden a los dominios de interacción de proteínas efectoras para las GTPasas en cuestión. Para capturar Rac1 y Cdc42 se utilizó el dominio CRIB de PAK-N mientras que para RhoA se utilizó el dominio RBD de Rhotekina.

Nuestros resultados muestran que **los medios condicionados de las células tumorales LAP0297 activan las RhoGTPasas en las células derivadas de la médula ósea** provenientes de ratones FVB-Tie2-GFP. Las células fueron estimuladas en un curso temporal con medios condicionados de células tumorales LAP0297, activaron a Rac1 con un máximo entre 5 y 15 minutos, como controles del estímulo por los medios condicionados podemos observar que tanto ERK como AKT fueron detectados activos en el curso temporal con un máximo de activación en los mismos tiempos para Rac1 (Figura 49D). También encontramos la activación de Cdc42 y RhoA en las BMDCs estimuladas con medios condicionados, fueron activadas de manera dependiente del tiempo, observamos el máximo de activación entre 5 y 15 minutos después de la estimulación.

Con todos los resultados obtenidos en los modelos celulares de ratones, como la comunicación celular pro-tumoral, la migración dependiente de  $G_i \rightarrow G_{\beta\gamma}$ , así como la activación de cascadas relevantes donde participan cinasas, RhoGEFs y GTPasas en las células derivadas de la médula ósea, células endoteliales y en células tumorales (Figura 50), nos propusimos a indagar en una fracción de todos los eventos mencionados para profundizar en el mecanismo molecular de la modulación de la activación de RhoGEFs regulados por GPCRs, particularmente la vía de  $G_{\beta\gamma}/P-$

Rex1/Rac que hipotéticamente sería la responsable de la migración de las células evaluadas en el objetivo 1. Para adentrarnos en los aspectos moleculares de esta vía, utilizamos modelos de líneas celulares y estrategias bioquímicas que nos permitieran aclarar los mecanismos moleculares que pueden ocurrir en la migración celular dependiente de GPCRs quimiotácticos en las células de la médula ósea y células tumorales durante la progresión del cáncer.

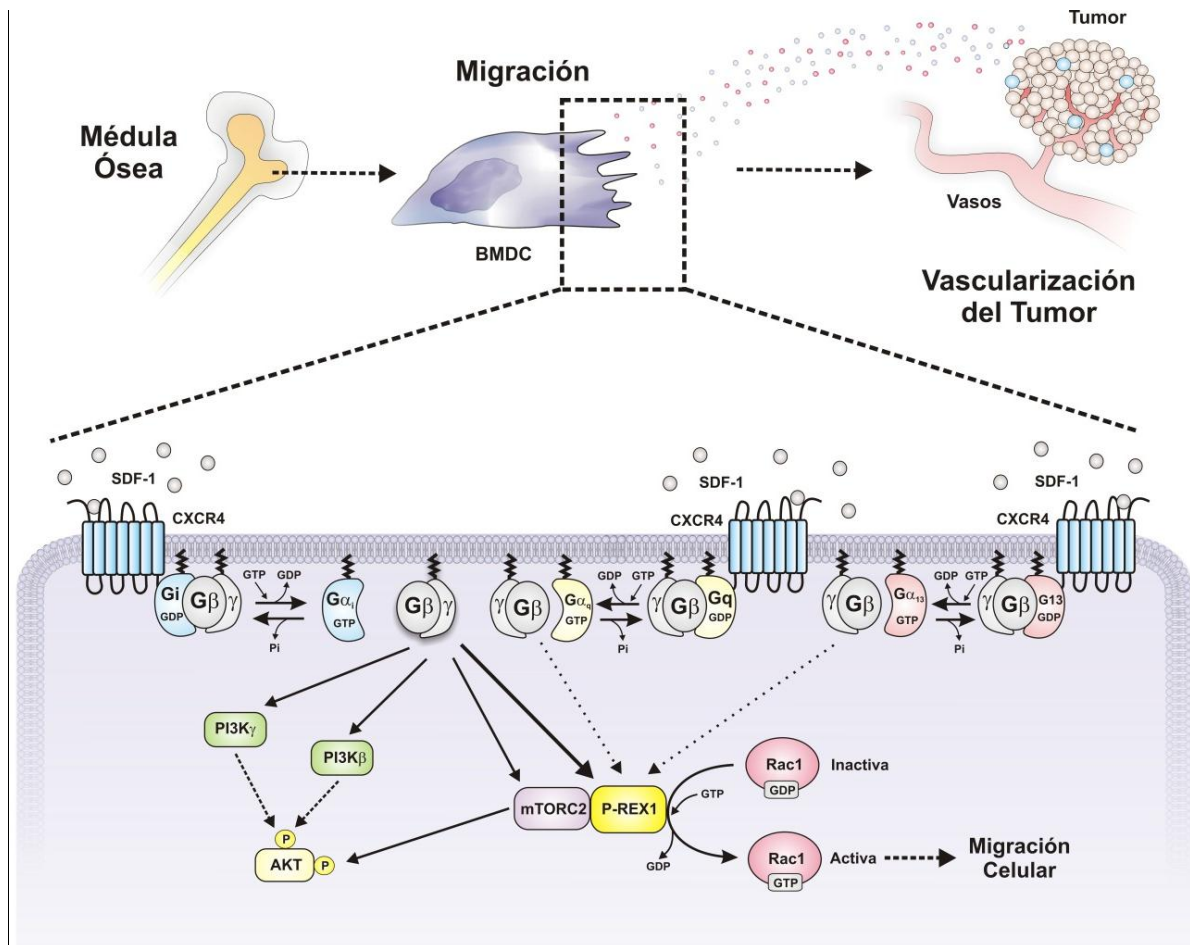


**Figura 50. Hallazgos relevantes de la comunicación celular entre BMDCs pro-tumorales, células tumorales y células endoteliales.** En el cultivo de médula ósea, se enriquecieron poblaciones pro-tumorales (Tie2/CD11b/CD45) que liberan factores que inducen la migración de células tumorales (de manera dependiente de  $G_i \rightarrow G_{\beta\gamma}$ ) y células endoteliales, en sentido opuesto, las células tumorales liberan factores que promueven la migración de células de la médula ósea (de manera dependiente de  $G_i$ ). Las células protumorales de la médula ósea expresan a RhoGEFs regulados por GPCRs como P-Rex1, llevando a la activación de GTPasas como Rac cuando son estimuladas por factores derivados de células tumorales.



### 10.3 Resultados del OBJETIVO 3

Caracterizar los mecanismos moleculares que determinan el efecto quimiotáctico de agonistas como el SDF-1, relevante en el microambiente tumoral, con énfasis en la participación de RhoGEFs regulados por proteínas G, que pudieran estar expresados diferencialmente en células pro-tumorales derivadas de la médula ósea.



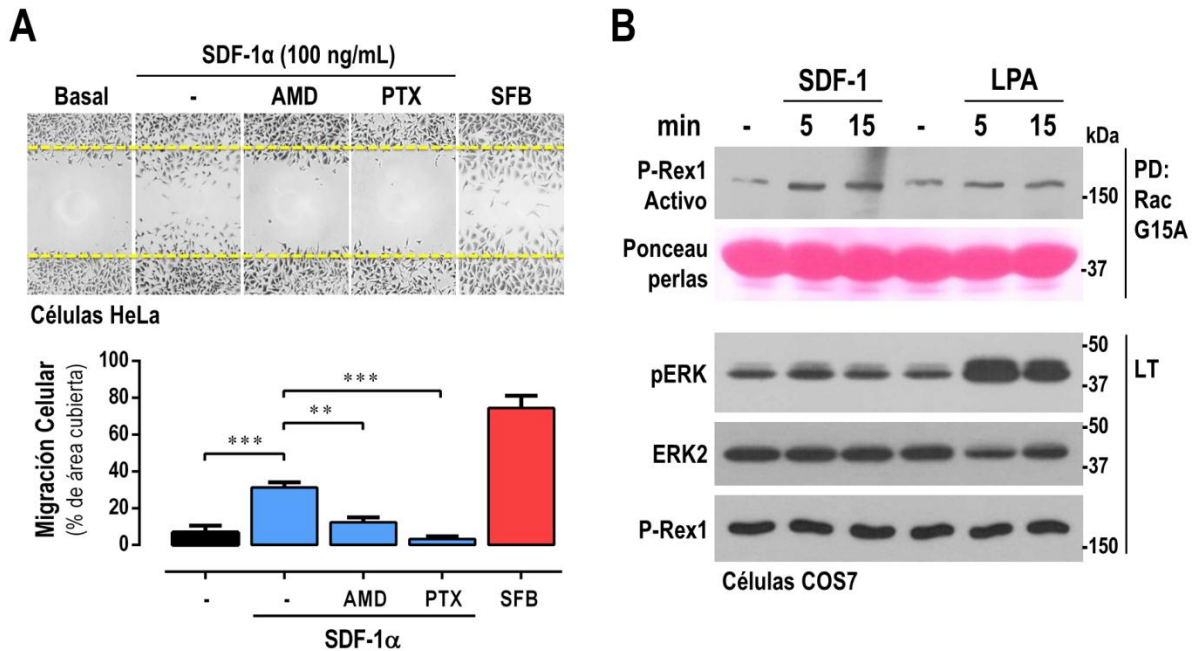
**Figura 51.** Modelo que representa hipotéticamente la activación de P-Rex1 vía GPCR/Gi/Gβγ para llevar a la migración celular, pero no por otros heterotrimeros como Gq y G13 que pudiesen ser activados. Nuestro modelo hipotético se sustenta en el hecho de que la migración celular dependiente de GPCRs suele ser sensible al tratamiento con toxina pertussis, un inhibidor de Gi, y es suficiente para inhibir la migración celular. Además, los GPCRs de quimiocinas, que por definición inducen migración celular, todos están acoplados a proteínas Gi exclusiva o principalmente. Por lo anterior, sugerimos que otros heterotrimeros como Gq y G13 no activan a P-Rex1 por que no son proveedores eficientes de Gβγ posiblemente como consecuencia de propiedades intrínsecas de las subunidades Gαq y Gα13 que no han sido aclaradas.

### 10.3.1 Análisis de la vía SDF-1/CXCR4/Gi/P-Rex1/Rac1 potencialmente relevante en células de la médula ósea utilizando modelos celulares

En los experimentos realizados en este objetivo decidimos utilizar modelos celulares que nos facilitaran explorar los mecanismos moleculares de las proteínas de nuestro interés; particularmente, proteínas de vías de señalización que contribuyen a la migración celular a través de la activación de GPCRs, RhoGEFs y GTPasas, con la finalidad de dilucidar algunos aspectos moleculares relevantes que contribuyen a la migración celular oncogénica. El SDF-1, como una de las quimiocinas importantes que contribuyen a la migración de células de la médula ósea y tumorales que ha sido relacionada a la progresión del cáncer <sup>39,41,42</sup>; fue un estímulo celular que nos permitió explorar mecanismos río abajo de su receptor CXCR4. Utilizando líneas celulares estudiamos la migración inducida por el SDF-1/CXCR4 y descendimos en la cascada para estudiar la activación de un GEF de particular interés, P-Rex1, además de la modulación de su estado de activación inducido por algunas subunidades  $G\alpha$  de las proteínas G como se representa en el modelo de la Figura 51, donde la evidencia histórica de los receptores quimiotácticos sugieren que la activación de un efector quimiotáctico como P-Rex1, sería activado exclusiva o principalmente por proteínas Gi.

Partiendo de la idea que la migración celular dependiente de GPCRs es dependiente de la proteína Gi, como observamos en la migración de células tumorales y BMDC; validamos la afirmación en un modelo celular. En la Figura 52A mostramos un ensayo de migración en ensayos de cierre de herida (Wound Closure/Scratch). Utilizamos las células HeLa como un modelo celular que responde adecuadamente a SDF-1, una de las quimiocinas de nuestro interés que activa a P-Rex1 <sup>76,121</sup>. Las células HeLa fueron sembradas sobre gelatina 0.02%, ayunadas y tratadas según sea el caso con el antagonista del CXCR4 o bien, con toxina pertussis. Las células fueron estimuladas con SDF-1 y fijadas 24 horas después para evaluar el área cubierta de la herida por las células que migraron. Como esperábamos, el SDF-1 indujo de manera adecuada la migración de células HeLa (Figura 52A), cabe mencionar que estas células también migraron cuando fueron estimuladas con LPA y HGF; sin embargo, otros estímulos como S1P, IL-8, EGF, FGF, PDGF y VEGF no indujeron migración en este modelo celular (datos no mostrados).





**Figura 52.** El SDF-1/CXCL12 promueve la migración celular inducida por la activación de receptores CXCR4 y de manera dependiente de Gi. **A)** Fotografías representativas del cierre de herida de células HeLa, consideran la migración de las células sin estimular, células estimuladas con SDF-1 (100 ng/mL) y que además se trataron con un antagonista del receptor CXCR4 (10  $\mu$ g/mL de AMD3100) o con un inhibidor de Gi (200 ng/mL de toxina pertussis); adicionalmente añadimos un control positivo de migración celular utilizando 10% de suero fetal bovino, las líneas punteadas representan la herida inicial que se realizó y 24 horas después se muestran las células que cruzaron el límite se consideraron como células que migraron. En el panel inferior se muestra la cuantificación del área cubierta por las células HeLa en los ensayos de cierre de herida representados en las fotografías. La gráfica representa la media  $\pm$  EE del área cubierta por células que migraron de cuatro experimentos independientes; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  ANOVA de una vía seguida de Tukey. **B)** SDF-1 activa a P-Rex1 de manera eficiente pero no LPA. Ensayo de pull-down de RacGEFs activos (perlas GST-RacG15A) en células COS7 estimuladas con SDF-1 o LPA durante 5 y 15 minutos. Se reveló ERK activo como control del efecto de los estímulos.

La migración de células inducida por SDF-1 fue sensible al antagonista AMD3100 (10  $\mu$ g/mL para el CXCR4 (Figura 52A), un receptor acoplado principalmente a proteínas Gi, aunque algunos reportes señalan el acoplamiento a Gq y G12/13<sup>122-124</sup>. Este resultado demuestra que el **SDF-1 induce la migración celular a través de la activación del receptor CXCR4**, y posiblemente el receptor CXCR7 (que también es un GPCR activado por SDF-1<sup>125</sup>, no parece participar en la migración de las células HeLa inducida por esta quimiocina en los ensayos de cierre de herida. También, la migración celular fue sensible a la inhibición de la proteína Gi utilizando el pre-tratamiento con toxina pertussis, la migración dependiente de SDF-1/CXCR4 fue inhibida con el pre-tratamiento de

200 ng/mL de PTX, por lo tanto, **la migración inducida por SDF-1/CXCR4 depende de la activación de las proteínas Gi** (proteínas G sensibles a PTX: Gi1/i2/i3, G0, Gt), pero no de otras como Gq y G13 en caso de que fueran activadas. Se sabe que el receptor CXCR4 es preferencialmente acoplado a Gi y que puede activar a P-Rex1, en la Figura 52B validamos que **SDF-1/CXCR4 activa a P-Rex1 de manera eficiente, pero los receptores para LPA no**; la activación del GEF fue analizada cuando las células fueron estimuladas durante 5 y 15 minutos, después se lisaron y capturamos a los RacGEFs con proteínas recombinantes GST-RacG15A unidas a glutatión safarosa; simultáneamente si comparamos la activación de P-Rex1 por SDF-1/CXCR4 y por LPAR, un receptor acoplado a múltiples familias de proteínas G activado por LPA, este último no es tan eficiente para activar al GEF pero si activa fuertemente a ERK (pERK mostrado en lisados totales, LT). Estos resultados apoyan fuertemente que la vía de señalización de los GPCRs para quimiocinas que promueven la migración celular, es dependiente de la activación de la proteína Gi, lo que sugiere que la vía de Gβγ/P-Rex1/Rac es relevante para el efecto quimiotáctico, esta idea nos llevó a profundizar en la vía de Gβγ y el motivo por el cual proteínas heterotriméricas no son tan efectivas para señalizar a través del dímero Gβγ, particularmente en el contexto de la migración celular, hipotetizamos que otras subunidades Gα podrían inhibir la vía Gβγ→P-Rex1.

### 10.3.2 Interacción de las subunidades Gα con el heterodímero Gβγ

El efecto de la toxina pertussis que observamos sobre la migración celular inducida por SDF-1 sugiere que a pesar de que el receptor CXCR4 es capaz de activar otras proteínas G<sup>122,123</sup>, señala preferencialmente vía la proteína Gi, o bien es suficiente para promover y controlar la migración celular, presumiblemente mediante la señalización de Gβγ liberada del heterotrímero Gi<sup>56</sup>. Nosotros hipotetizamos que la activación de Gi es requerida para la migración celular mediante la disociación adecuada de Gβγ y que este heterodímero active sus efectores como P-Rex1, estableciendo que las proteínas Gi heterotriméricas son las mejores proveedoras del heterodímero Gβγ, mientras que otros heterotrimeros no participarían e inclusive podrían estar impidiendo la señalización inducida por Gβγ para actuar sobre sus efectores promotores de la migración celular (Figura 53A).

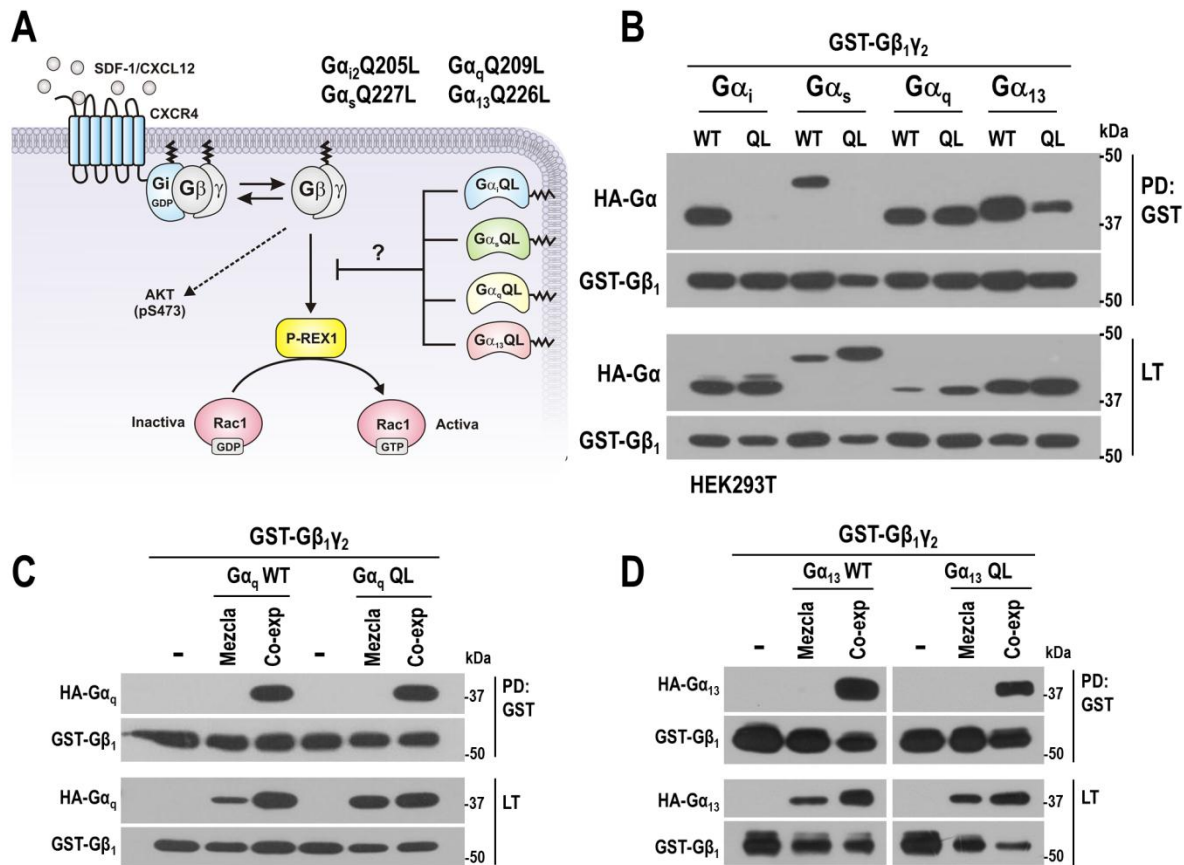
En un principio, **evaluamos la interacción entre el heterodímero Gβγ y diferentes subunidades Gα representativas (Gα<sub>i</sub>, Gα<sub>s</sub>, Gα<sub>q</sub> y Gα<sub>13</sub> marcadas con el epítopo HA) en su versión WT o mutantes Q→L**, estas últimas son mutantes deficientes en la actividad de GTPasa con el cambio de una glutamina (Q) por una leucina (L), como consecuencia de esta mutación, las



subunidades  $G\alpha$  no pueden hidrolizar el GTP a GDP, permaneciendo en un estado activo una vez que han incorporado GTP<sup>126,127</sup>. Las células HEK293T fueron transfectadas con GST- $G\beta_1\gamma_2$  y las versiones WT o QL de las subunidades  $G\alpha$  y 48 horas después de la transfección, las células ayunadas toda la noche se lisaron y los lisados citosólicos se sometieron a ensayos de precipitación por afinidad (GST- pulldown), utilizando glutatión-safarosa para atrapar a GST- $G\beta\gamma$  (Figura 53B) y detectar las subunidades  $G\alpha$  asociadas a  $G\beta\gamma$ . Se analizó la interacción entre las principales subunidades  $G\alpha$  mutantes QL ( $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{13}$ ) con  $G\beta_1\gamma_2$ . Para evaluar esto, realizamos un pulldown (GST-) a partir de lisados obtenidos de células HEK293T transfectadas con GST- $G\beta\gamma$  (vectores: pCEFL-GST- $G\beta_1$ , pCEFL- $\gamma_2$ ) y con las versiones silvestres y mutantes constitutivamente activas de la subunidad  $G\alpha_i$  (vectores: pCEFL-HA- $G\alpha_{i2}$ WT, pCEFL-HA- $G\alpha_{i2}$ Q205L), subunidad  $G\alpha_s$  (vectores: pCEFL-HA- $G\alpha_s$ WT, pCEFL-HA- $G\alpha_s$ Q227L), subunidad  $G\alpha_q$  (vectores: pCEFL-HA- $G\alpha_q$ WT, pCEFL-HA- $G\alpha_q$ Q209L) y subunidad  $G\alpha_{13}$  (vectores: pCEFL-HA- $G\alpha_{13}$ WT, pCEFL-HA- $G\alpha_{13}$ Q226L). En este experimento precipitamos por afinidad a  $G\beta\gamma$  (GST) y detectamos aquellas subunidades  $G\alpha$  asociadas, el western blot se muestra en la Figura 53B.

Hipotéticamente, el heterodímero  $G\beta\gamma$  interacciona fuertemente con subunidades  $G\alpha$  tipo silvestres (WT), mientras que no podría interactuar con subunidades  $G\alpha$  mutantes constitutivamente activas (Q→L), lo anterior con base en el modelo clásico el heterotrímero de la proteína G conformado por  $G\alpha$ -GDP y  $G\beta\gamma$ , se disocia en sus subunidades  $G\alpha$ -GTP y  $G\beta\gamma$  una vez activado un receptor acoplado a proteínas G que provocaría el intercambio de nucleótido GDP por GTP. Sorprendentemente, se encontró que algunas **subunidades  $G\alpha$  Q→L pueden interactuar con  $G\beta\gamma$ , en particular para el caso de las subunidades  $G\alpha_q$ QL y  $G\alpha_{13}$ QL**, mientras que las **versiones QL de  $G\alpha_i$  y  $G\alpha_s$  no interaccionaron con  $G\beta\gamma$** . Curiosamente, las mutantes consideradas en la literatura como constitutivamente activas de las subunidades  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{13}$  ( $G\alpha_q$ Q→L y  $G\alpha_{13}$ Q→L), interaccionaron fuertemente con el heterodímero  $G\beta_1\gamma_2$ , a pesar de la mutación en el dominio de GTPasa en estas subunidades  $G\alpha$ , el resultado fue reproducible en todos los casos. En contraste, las subunidades mutantes constitutivamente activas de las  $G\alpha_s$  y  $G\alpha_i$  ( $G\alpha_s$ Q→L y  $G\alpha_i$ Q→L) no interaccionaron con  $G\beta_1\gamma_2$ , la expresión de estas subunidades se muestra en los lisados totales (LT) donde se observa con claridad la cantidad de proteína en los lisados, pero no asociadas a  $G\beta\gamma$ . Como se esperaba, las versiones WT de todas las subunidades  $G\alpha$  evaluadas pueden interactuar con  $G\beta\gamma$  fuertemente (Figura 53B, panel superior PD:GST), cabe resaltar la alta afinidad de  $G\alpha_q$  por  $G\beta\gamma$

observada en todos los experimentos realizados, a pesar de la expresión menor de  $G\alpha_q$  (en LT), su interacción con  $G\beta\gamma$  es comparable a cualquier otra con sobreexpresión (en PD:GST).



**Figura 53. El heterodímero  $G\beta\gamma$  interacciona con mutantes activas de  $G\alpha_q$ -QL y  $G\alpha_{13}$ -QL, pero no con  $G\alpha_i$ -QL y  $G\alpha_s$ -QL. A)** Receptores quimiotácticos acoplados a  $G_i$  como el CXCR4, activa a P-Rex1 y la PI3K/AKT vía de señalización de  $G\beta\gamma$ . El modelo hipotético, representa la señalización del CXCR4 en la activación de la proteína  $G_i$ , promoviendo la liberación del heterodímero  $G\beta\gamma$  para activar a P-Rex1. Hipotéticamente subunidades  $G\alpha$  mutantes deficientes de la GTPasa podrían inhibir el efecto de  $G\beta\gamma$  sobre la activación de P-Rex1 y AKT. **B)** Caracterización de la interacción de  $G\beta\gamma$  con subunidades  $G\alpha$ -WT y subunidades  $G\alpha$  QL (deficientes en la GTPasa) en HEK293T transfectadas y analizada por precipitación de GST- $G\beta\gamma$  (segundo panel) y detección de subunidades  $G\alpha$  (marcadas con el epítipo HA) asociadas al heterodímero  $G\beta\gamma$  (panel superior). **C y D)** Los ensayos de precipitación por afinidad d GST- $G\beta\gamma$  muestran que las subunidades mutantes deficientes de la GTPasa de  $G\alpha_q$  (QL) y  $G\alpha_{13}$  (QL), así como versiones las versiones silvestres ( $G\alpha_q$  WT y  $G\alpha_{13}$  WT) interaccionaron con  $G\beta\gamma$  sólo cuando fueron co-expresadas (Co-exp), pero no cuando los lisados de células transfectadas diferencialmente con estas proteínas se mezclaron (mezcla). *Panel C y D, resultado obtenido con ayuda de Irving García-Jiménez.*

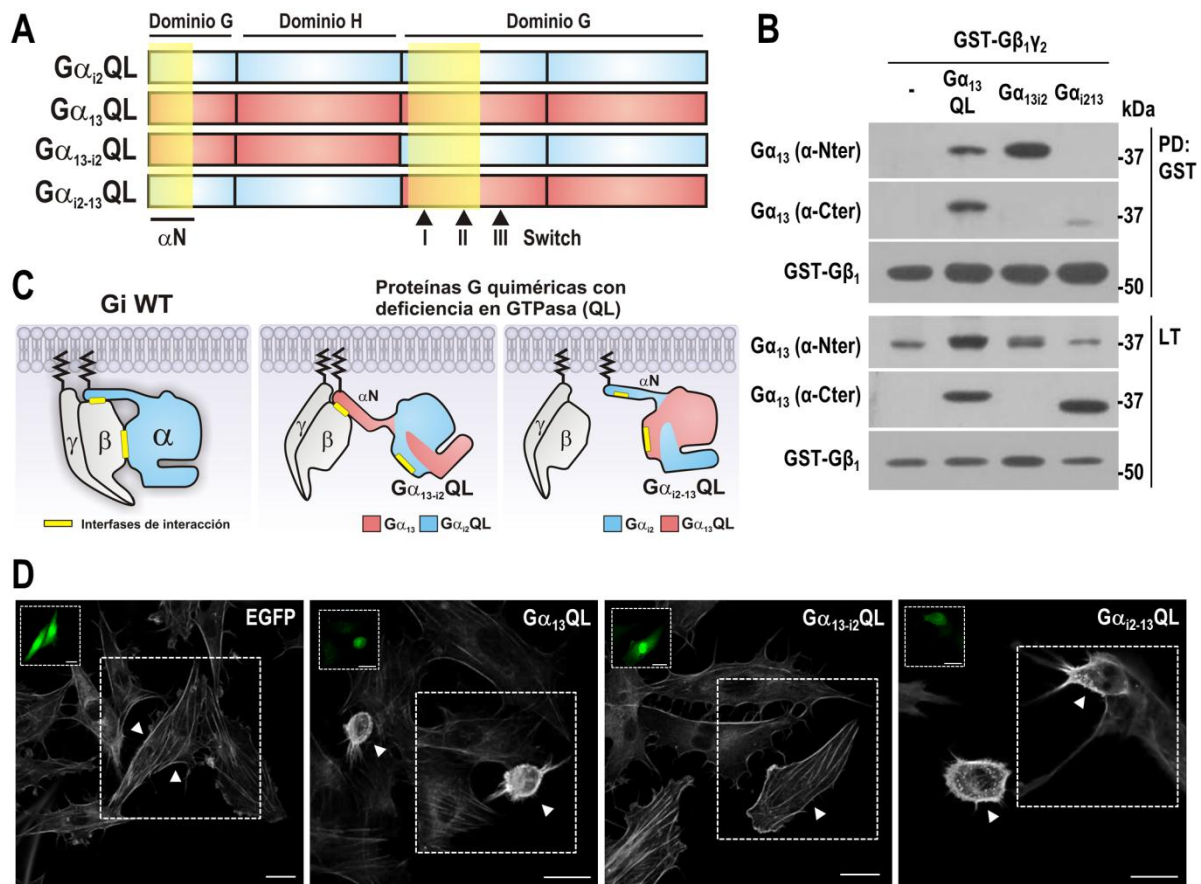
Con el fin de confirmar que las versiones mutantes constitutivamente activas de  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{13}$  se asocian con  $G\beta_{1\gamma_2}$ , evaluamos si la interacción requiere co-expresión de las subunidades  $G\alpha$ -QL ( $G\alpha_q$ -Q→L y  $G\alpha_{13}$ -Q→L; Figura 53C y 53D, respectivamente) y  $G\beta\gamma$ , o si la interacción puede ocurrir cuando las proteínas se expresan por separado y posteriormente los lisados celulares son mezclados. Este experimento nos permitió averiguar si la interacción ocurría dentro de las células vivas o si era un artefacto del procedimiento de precipitación por afinidad. Nuestros resultados mostraron que la interacción requería que ambas proteínas fueran co-expresadas, **GST- $G\beta_{1\gamma_2}$  formó complejos estables con HA- $G\alpha_q$ QL y HA- $G\alpha_{13}$ QL (además de las versiones WT) sólo cuando ambas subunidades fueron co-expresadas (Co-exp)**. Por el contrario, la interacción no se detectó cuando se mezclaron lisados de células con expresión separada de  $G\beta_{1\gamma_2}$  y subunidades  $G\alpha$ -QL donde se espera que los dímeros  $G\beta\gamma$  estén ocupados por subunidades  $G\alpha$  en los lisados correspondientes, en contraste cuando transfectadas todas las subunidades en las mismas células, las interacciones fueron fuertes, la expresión de las proteínas transfectadas se confirmó por western blot en los lisados celulares totales (Figura 53C y D).

A futuro, nos resulta interesante la interacción de  $G\alpha_q$ Q209L con  $G\beta\gamma$ , esta subunidad  $G\alpha$  mutante ah sido identificada como un oncogen en melanoma uveal, considerada como una forma constitutivamente activa<sup>128-130</sup> y en cuyas células la vía oncogénica  $G\alpha_q$ QL-Trio-Rho/Rac-YAP promueve el crecimiento del melanoma uveal<sup>131</sup>; con estos antecedentes relevantes y nuestros hallazgos de la interacción de  $G\alpha_q$ QL con  $G\beta\gamma$  nos surge la pregunta de como podría influir la persistencia en la interacción con  $G\beta\gamma$  en el melanoma uveal, particularmente sobre la señalización de  $G\alpha_q$ QL-Trio-Rho/Rac-YAP o bien, con otro RhoGEF activado por  $G\alpha_q$ : p63-RhoGEF, el cual es capaz de activar a Rho.

### 10.3.3 La quimera $G\alpha_{13-i2}$ QL mantiene interacción estable con $G\beta\gamma$ : evidencia de la contribución de la región $\alpha$ N-terminal de $G\alpha_{13}$ para mantener la interacción

Una vez confirmada la interacción de la subunidad  $G\alpha_q$ QL y  $G\alpha_{13}$ QL con  $G\beta\gamma$ , decidimos evaluar para el caso de  $G\alpha_{13}$ QL, cual región de la subunidad  $G\alpha_{13}$  le proporciona la capacidad de mantener interacciones con  $G\beta\gamma$ . Utilizamos quimeras conformadas por  $G\alpha_{13}$  y  $G\alpha_{i2}$  que fueron previamente descritas<sup>132</sup>, la estructura primaria se esquematiza en la Figura 54A; una de estas quimeras representada como  $G\alpha_{13-i2}$ QL ( $G\alpha_{13}(M1-S192)-i2(Q172-P366)$ QL) esta construída con la primera sección del dominio de GTPasa que incluye la hélice del extremo amino ( $\alpha$ N) y el dominio helicoidal de

$G\alpha_{13}$  (aa. M1-S192), la otra mitad es la segunda sección del dominio de GTPasa de  $G\alpha_{12}$ QL (aa. Q172-P366). De manera inversa, la quimera  $G\alpha_{12-13}$ QL ( $G\alpha_{12}(M1-T171)-13(Q193-P377)$ QL), tiene la primera sección el dominio de GTPasa (incluye  $\alpha$ N) y el dominio helicoidal de  $G\alpha_{12}$  (aa. M1-T171), la otra mitad es la segunda sección del dominio de GTPasa de  $G\alpha_{13}$ QL (aa. Q193-P377). En las estructuras primarias se señalan con una franja amarilla los sitios donde estas subunidades  $G\alpha$  interactúan con  $G\beta\gamma$ , tomando como modelo a  $G_i$ , se encuentra un sitio en el extremo amino, la primera hélice interactuando; mientras que el segundo sitio se encuentra en la segunda sección del dominio de GTPasa en los switches I y II.



**Figura 54.** La  $\alpha$ -hélice del extremo amino terminal ( $\alpha$ N) de la subunidad  $G\alpha_{13}$ -QL es importante para mantener la interacción con  $G\beta\gamma$ . **A)** Estructura primaria de las subunidades  $G\alpha$ -QL y quimeras de  $G\alpha_{13}$  con  $G\alpha_i$  <sup>132</sup>, las franjas amarillas señalan las regiones de la estructura primaria de las subunidades  $G\alpha$  que interactúan con  $G\beta\gamma$ . **B)** El  $\alpha$ N de  $G\alpha_{13}$  contribuye a mantener la interacción con  $G\beta\gamma$ . Ensayo de pulldown para determinar la interacción de las quimeras QL representadas en el panel A con  $G\beta\gamma$ . Las células fueron transfectadas con  $G\alpha_{13}$ QL,  $G\alpha_{13-12}$ QL o  $G\alpha_{12-13}$ QL y fueron detectadas utilizando anticuerpos para el extremo amino (N-ter) o contra el extremo carboxilo (C-ter) de  $G\alpha_{13}$ . **C)**

Esquemas que representan los hallazgos de la interacción de las quimeras con  $G\beta\gamma$ . La subunidad  $G\alpha_{13}$ -QL interacciona con  $G\beta\gamma$ , pero en la quimera donde se cambió el extremo amino por el de  $G\alpha_i$ , la interacción con  $G\beta\gamma$  disminuyó, mientras que la quimera de  $G\alpha_i$ -QL con el extremo amino de  $G\alpha_{13}$  adquirió la capacidad de interactuar fuertemente con  $G\beta\gamma$ . **D)** Efecto de  $G\alpha_{13}$ QL,  $G\alpha_{13-i2}$ QL o bien,  $G\alpha_{i2-13}$ QL sobre el citoesqueleto de actina de células endoteliales PAE. Más del 95% de células transfectadas con EGFP+  $G\alpha_{13-i2}$ QL mostraron un fenotipo extendido similar a las células no transfectadas; como se esperaba, las células transfectadas con  $G\alpha_{13}$ QL o bien,  $G\alpha_{i2-13}$ QL mostraron un fenotipo contraído compatible con la activación de Rho. Las células transfectadas fueron fijadas y teñidas con faloidina (en blanco), las flechas señalan a las células transfectadas observando EGFP como marcador (inserto), barra=25  $\mu$ M. *Panel D, resultado obtenido con ayuda de Irving García-Jiménez.*

Utilizamos las subunidades  $G\alpha$  quiméricas conformadas por secuencias de  $G\alpha_{13}$ QL y  $G\alpha_{i2}$ QL por el siguiente razonamiento: en el primer panel de la Figura 54C, se muestra un esquema de  $G_i$  WT, basados en el cristal de la proteína  $G_i$ <sup>133,134</sup>, sabemos que **las subunidades  $G\alpha$  interactúan con  $G\beta\gamma$  en dos sitios que corresponden al dominio de GTPasa** en la estructura terciaria, una interfase de interacción se encuentra en la hélice  $\alpha$ N de la subunidad  $G\alpha$ , mientras que otra interfase de interacción se encuentra al centro de subunidad  $G\alpha$  con el centro de  $G\beta\gamma$ . Las quimeras, cuentan también con las secuencias de las dos interfaces de interacción; sin embargo, cada una corresponde a subunidades  $G\alpha$  diferentes y como vimos en la Figura 53B,  $G\alpha_{13}$ QL mantiene interacción mientras  $G\alpha_{i2}$ QL no, hipotéticamente la combinación de ellas nos permitiría aclarar **cuál de las dos interfases de  $G\alpha_{13}$  mantiene la interacción con  $G\beta\gamma$** . El resultado de las interacciones se representa en la Figura 54C, donde la quimera  $G\alpha_{13-i2}$ QL mantiene la interacción con  $G\beta\gamma$  a través de la hélice del extremo amino ( $\alpha$ N) mientras que la quimera  $G\alpha_{i2-13}$ QL no interactúa eficientemente con  $G\beta\gamma$ , por lo tanto, la interacción de  $G\alpha_{13}$ QL con  $G\beta\gamma$  se impide al cambiar el sitio de interacción del extremo amino por el de  $G\alpha_i$ .

Analizamos interacción de las quimeras con el heterodímero  $G\beta\gamma$ , esto nos permitió mapear cual región es relevante para mantener la interacción de la subunidad  $G\alpha_{13}$ QL. Realizamos ensayos de pulldown de GST- $G\beta_{1\gamma_2}$  para comparar la interacción de la  $G\alpha_{13}$ QL con las quimeras  $G\alpha_{13-i2}$ QL y  $G\alpha_{i2-13}$ QL (Figura 54B). Para contrastar la unión de las subunidades quimeras, utilizamos anticuerpos contra el extremo amino (detecta la quimera  $G\alpha_{13-i2}$ QL) y contra el carboxilo (detecta la quimera  $G\alpha_{i2-13}$ QL) de  $G\alpha_{13}$ . En el experimento incluimos la subunidad  $G\alpha_{13}$ QL como control de la interacción (carril 2) y para comparar como se ve afectada la interacción de  $G\alpha_{13}$ QL por el intercambio de regiones con  $G\alpha_{i2}$ QL. El ensayo de afinidad reveló que el extremo amino de la subunidad  $G\alpha_{13}$  que incluye una región de interacción, le proporcionó interacción estable con GST- $G\beta\gamma$  al dominio de GTPasa de la

subunidad  $G\alpha_{i2}QL$  (tercer carril de pulldown de la Figura 54B), inclusive su interacción es mayor que sólo  $G\alpha_{i3}QL$  (carril 2); previamente observamos en la Figura 53B que la versión HA- $G\alpha_{i2}QL$  no interacciona con el dímero  $G\beta\gamma$ . En contraste, la quimera de  $G\alpha_{i3}QL$  con el extremo amino de  $G\alpha_{i2}$  disminuyó su interacción con  $G\beta\gamma$  con respecto a  $G\alpha_{i3}QL$ , es decir, el intercambio por el sitio de interacción  $\alpha N$  de  $G\alpha_{i2}$  disminuyó la capacidad de interaccionar con  $G\beta\gamma$ ; juntos estos resultados sugieren que el extremo amino de  $G\alpha_{i3}$  y posiblemente  $G\alpha_q$  donde se localiza una interfase de interacción con  $G\beta\gamma$  tiene particularidades que proveen el mantenimiento de las interacciones estables de las subunidades  $G\alpha_{i3}$  y  $G\alpha_q$  mutantes QL (y posiblemente unidas a GTP) con el dímero  $G\beta\gamma$ .

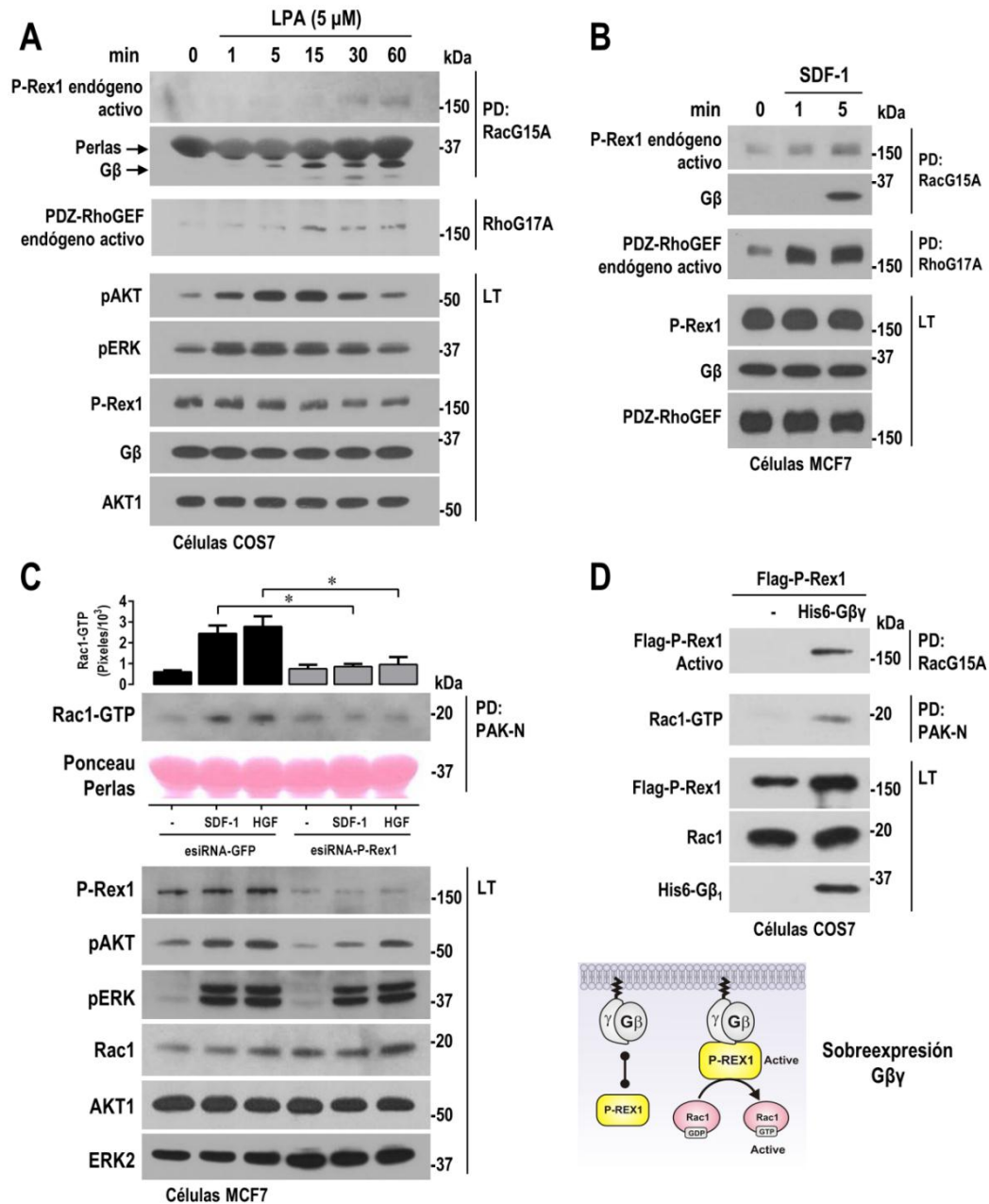
La salida catalítica de las quimeras, hipotéticamente, estaría dada por la segunda sección del dominio de GTPasa que tiene la cara efectora, es decir,  $G\alpha_{i2-13}QL$  que tiene el extremo amino de  $G\alpha_{i2}$  y el extremo carboxilo de  $G\alpha_{i3}QL$  debe tener la salida catalítica de  $G\alpha_{i3}$ . Al analizar la morfología celular por microscopia, esperábamos que la quimera que contiene el extremo carboxilo de  $G\alpha_{i3}QL$  ( $G\alpha_{i2-13}QL$ ) transfectada en células endoteliales genere formas celulares contraídas compatibles con una activación de Rho intensa. En la Figura 54D observamos que las células que expresan la quimera  $G\alpha_{i3-i2}QL$  generaron células extendidas como las células transfectadas sólo con EGFP; mientras que las células con  $G\alpha_{i3}QL$  o bien, con la quimera  $G\alpha_{i2-13}QL$  generaron células contraídas esperadas.

Dentro de nuestra hipótesis, consideramos que una posible cascada de señalización SDF-1/CXCR4/ $G_i$ → $G\beta\gamma$ /P-Rex1/Rac es responsable de la migración de distintas células y por lo tanto un blanco farmacológico interesante. En modelos celulares evaluamos si al activar el receptor CXCR4 con su ligando SDF-1, podría llevar a la activación de P-Rex1 y a su vez a la activación de Rac1, según estudios previos, se sabe que P-Rex1 puede ser activado por CXCR4 en células endoteliales <sup>76</sup>.

#### 10.3.4 Activación de la vía SDF-1/CXCR4/ $G\beta\gamma$ /P-Rex1/Rac

Nos interesa analizar la señalización de un receptor con acoplamiento múltiple y que induce migración celular de manera dependiente de  $G_i$ , el receptor para **LPA activa a P-Rex1 de manera discreta** si analizamos en un curso temporal (Figura 55A), consistente con el resultado mostrado en la Figura 52B, donde LPA no llevó a la activación de P-Rex1 en células COS7 (5 y 15 min), aquí el LPA activo aproximadamente a partir de los 30 minutos, con un incremento progresivo y de manera paralela en el mismo pulldown (RacG15A) donde se detectó asociado P-Rex1 se detectó al dímero  $G\beta\gamma$  asociado. Mientras SDF-1 mostro mejor activación de P-Rex1 con  $G\beta\gamma$  asociada (Figura 55B).





**Figura 55. Caracterización del eje de señalización SDF-1/CXCR4/G $\beta$ /P-Rex1/Rac1.** **A)** Activación de P-Rex1 y PDZ-RhoGEF endógenos en células COS7 estimuladas con LPA. **B)** Activación de P-Rex1 y PDZ-RhoGEF endógenos en células MCF7 estimuladas con SDF-1. **C)** El SDF-1/CXCL12 y el HGF activan a Rac vía el GEF P-Rex1. Células MCF7 fueron transfectadas con esiRNA-P-Rex1 o esiRNA-GFP (como control) y la activación de Rac se detectó mediante pull-down de Rac-GTP con perlas de GST-PAK-CRIB en lisados de células MCF7 estimuladas con SDF-1 (50 ng/mL) o HGF (10 ng/mL) durante 5 min. Para determinar la activación de AKT (pSer473 AKT) y ERK (pERK) se realizó el western blot con los anticuerpos correspondientes en los lisados totales citosólicos (LT). La gráfica representa la media  $\pm$  EE de los valores de densitometría de la fracción de Rac activo (Rac-GTP) de tres experimentos independientes, \* $p < 0.05$ , ANOVA de

una vía seguida de la prueba de Tukey. **D)** La sobreexpresión de  $G\beta\gamma$  es suficiente para inducir la activación de P-Rex1 y de Rac1. En células COS7 se transfectó 3XFlag-P-Rex1 con o sin His6- $G\beta\gamma$ , posteriormente se realizó captura de GEF activo con GST-RacG15A recombinante unida a safarosa, mientras que para capturar a Rac activo (Rac-GTP) se utilizó la recombinante GST-RBD-PAK unida a safarosa. *Panel C obtenido con ayuda de Sendi Rafael Adame-García.*

**El knock down de P-Rex1 inhibe totalmente la activación de Rac1 inducida por SDF-1/CXCR4** consistente con lo reportes previos <sup>135</sup>. También P-Rex1 mostró ser relevante en la activación de Rac1 inducida por HGF en las células MCF7 como se muestra en la Figura 55C, señalización que no había sido previamente reportada. En ensayos de migración en cierre de herida observamos que las células MCF7 no son un buen modelo para migración debido a que no migran adecuadamente a los diferentes estímulos, incluyendo el SDF-1. Aunque estas células mostraron activación de Rac dependiente P-Rex1, no se detectó una respuesta migratoria efectiva a SDF-1 estimulación (datos no mostrados).

Consideramos que  $G\beta\gamma$  liberado del heterotrímero  $G_i$  sería el responsable de inducir a la activación de P-Rex1/Rac1. En las células modelo COS7 evaluamos el estado de activación de P-Rex1 y Rac cuando sobre-expresamos  $G\beta\gamma$ , se sabe que el heterodímero  $G\beta\gamma$  puede inducir la actividad catalítica de P-Rex1 en ensayos *in vitro*, aquí evaluamos ese posible efecto en ensayos en células transfectadas con los plásmidos que contienen las secuencias de 3XFlag-P-Rex1 junto con o sin los plásmidos de His6- $G\beta_1$ /His6- $\gamma_2$ , consideramos que la sobreexpresión de  $G\beta\gamma$  sería suficiente para llevar a la activación de P-Rex1 (Figura 55D). Mediante ensayos de pulldown determinamos la activación de P-Rex1 (utilizando perlas de GST-Rac1G15A libre de nucleótido que tienen alta afinidad por P-Rex1 en estado activo) y de Rac (utilizando perlas de GST-PAK-CRIB) en las células que fueron co-transfectadas con  $G\beta\gamma$ . Confirmamos de esta manera que  $G\beta\gamma$  activa a P-Rex1 y este RhoGEF a su vez activa a Rac1, para nuestros fines, en un contexto de migración celular. Esta estrategia nos permitió evaluar de manera más sencilla en modelos celulares, la posibilidad de modular este efecto de  $G\beta\gamma$  sobre la activación de P-Rex1 en resultados mostrados más adelante.

### 10.3.5 Mapeo de la interacción de $G\beta\gamma$ con P-Rex1: posible relevancia de los dominios PDZs en la activación secuencial de P-Rex1 inducida por $G\beta\gamma$

Dentro de la caracterización de la activación de P-Rex1 inducida por  $G\beta\gamma$ , nos propusimos mapear el sitio o sitios de interacción del heterodímero  $G\beta\gamma$  con los diferentes dominios de P-Rex1 que nos permitiera modelar el mecanismo de activación de GEF. La interacción de  $G\beta\gamma$  con P-Rex1 fue

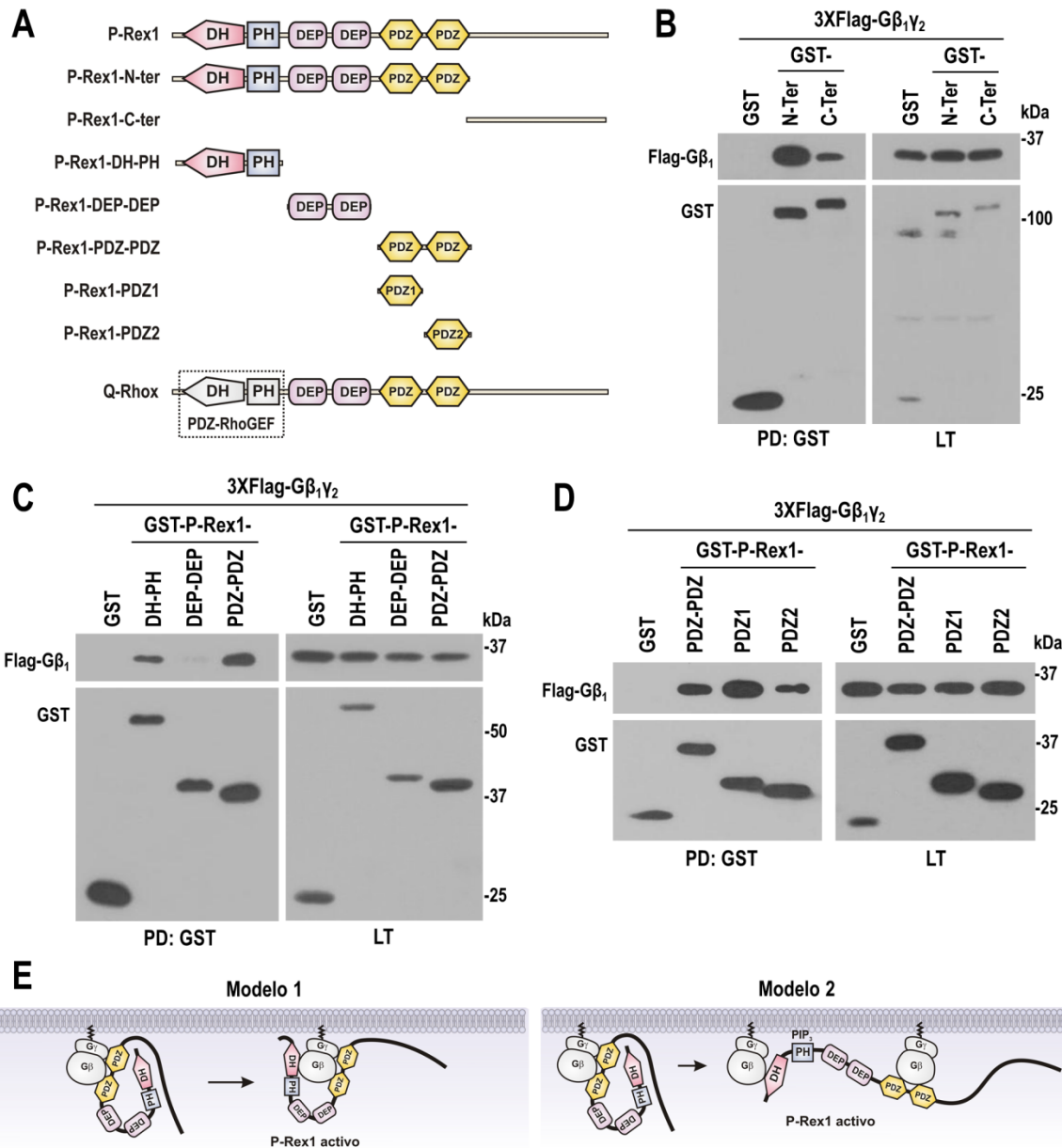


caracterizada *in vitro* donde se observó la interacción con el dominio DH para incrementar la actividad catalítica de RacGEF<sup>109</sup>; sin embargo, estudios en nuestro laboratorio demuestran que P-Rex1 se encuentra plegado con auto-interacciones inhibitorias que ocultan al dominio DH<sup>121</sup>, por ello hipotetizamos que Gβγ antes de interactuar con el dominio catalítico de P-Rex1, primero tiene que romper las interacciones intramoleculares del GEF para lograr exponer y acceder al dominio DH.

Realizando ensayos de pull down, precipitamos las construcciones de GST-P-Rex1 y buscamos la asociación de Gβγ a los diferentes segmentos de P-Rex1 que son esquematizados en la Figura 56A. El heterodímero Gβγ como vimos previamente (Figura 55D) lleva a la activación de P-Rex1, experimentos en modelos celulares encontramos que Gβγ interactúa fuertemente con el extremo amino de P-Rex1 que está conformado por los dominios DH-PH-DEP-DEP-PDZ-PDZ, pero también observamos una interacción ligera con el extremo carboxilo (Figura 56B). Posteriormente, analizamos la interacción de Gβγ con los dominios en tándem DH-PH, DEP-DEP y PDZ-PDZ que corresponden al extremo amino de P-Rex1 (N-Ter, Figura 56C). Cuando precipitamos por afinidad los segmentos de P-Rex1, observamos que el heterodímero **Gβγ se interaccionó con los dominios PDZ-PDZ y con el tándem DH-PH**, mientras que no hubo interacción con los dominios en tándem DEP-DEP (Figura 56C). Finalmente, evaluamos si Gβγ tiene mayor afinidad por alguno de los dominios PDZ, por ensayo de precipitación por afinidad, bajamos a los dominios PDZ1 o PDZ2 (unidos a GST) y detectamos al dímero Gβγ asociado. Encontramos que **Gβγ interacciona mejor con el dominio PDZ1**, incluso es mejor que la interacción con el tándem PDZ-PDZ, sin embargo, también se puede unir al PDZ2 (Figura 56D).

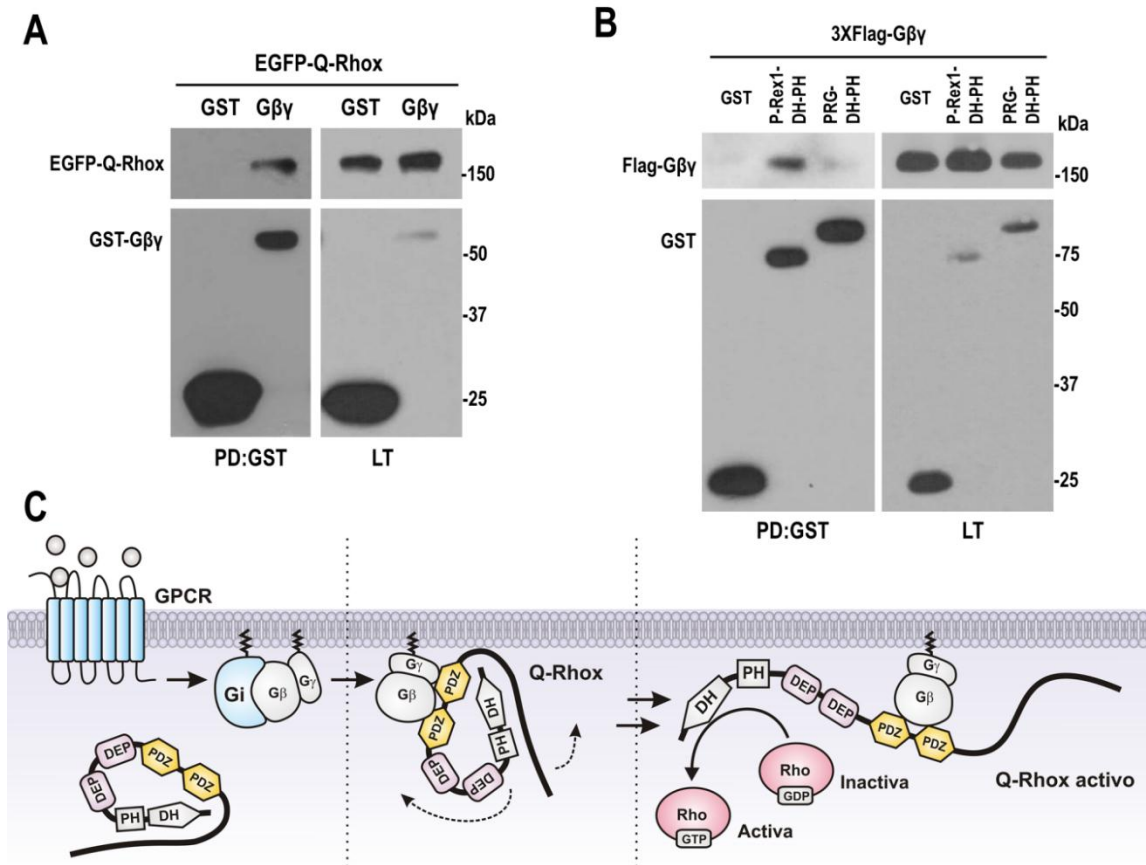
Estos resultados sugieren que el heterodímero Gβγ activa a P-Rex1 a través de la interacción directa con los dominios PDZ-PDZ y DH-PH, modelos hipotéticos de la dinámica de activación son mostrados en la Figura 56E. El heterodímero Gβγ posiblemente llevaría a la activación de P-Rex1 por alguno de los modelos hipotéticos mostrados; sugerimos que Gβγ interactúa en un primer paso con los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 presumiblemente accesibles, esta asociación rompería las interacciones intramoleculares inhibitorias de P-Rex1 para desdobl原因arlo y exponer al dominio catalítico DH. Una vez expuestos los dominios DH-PH, hipotéticamente el mismo dímero Gβγ de la interacción inicial con los PDZ-PDZ podría interactuar simultáneamente con los dominios DH-PH con caras efectoras diferentes como se representa en el modelo 1. Otra posibilidad es que otro dímero Gβγ interactúe con los dominios DH-PH y de esta manera dos Gβγ dímeros podrían mantener en un

estado abierto a P-Rex1, como se representa en el modelo 2. Estos hallazgos han dado lugar a nuevos proyectos para demostrar la dinámica de activación de P-Rex1 por  $G\beta\gamma$  y cuyo mecanismo puede extrapolarse a otros RhoGEFs.



**Figura 56. El heterodímero  $G\beta\gamma$  interacciona con los dominios DH-PH y PDZ-PDZ de P-Rex1. A)** Esquema de los dominios de P-Rex1 y las construcciones de fragmentos de P-Rex1 que se utilizaron para mapear la interacción con  $G\beta\gamma$ . **B)** Interacción de  $G\beta\gamma$  con los extremos amino (N-Ter) y carboxilo (C-Ter) de P-Rex1. Ensayos de pull-down de GST-P-Rex1-N-Terminal, GST-P-Rex1-C-Terminal y detectamos 3XFlag- $G\beta\gamma$  asociada a las construcciones de P-Rex1. Los blots

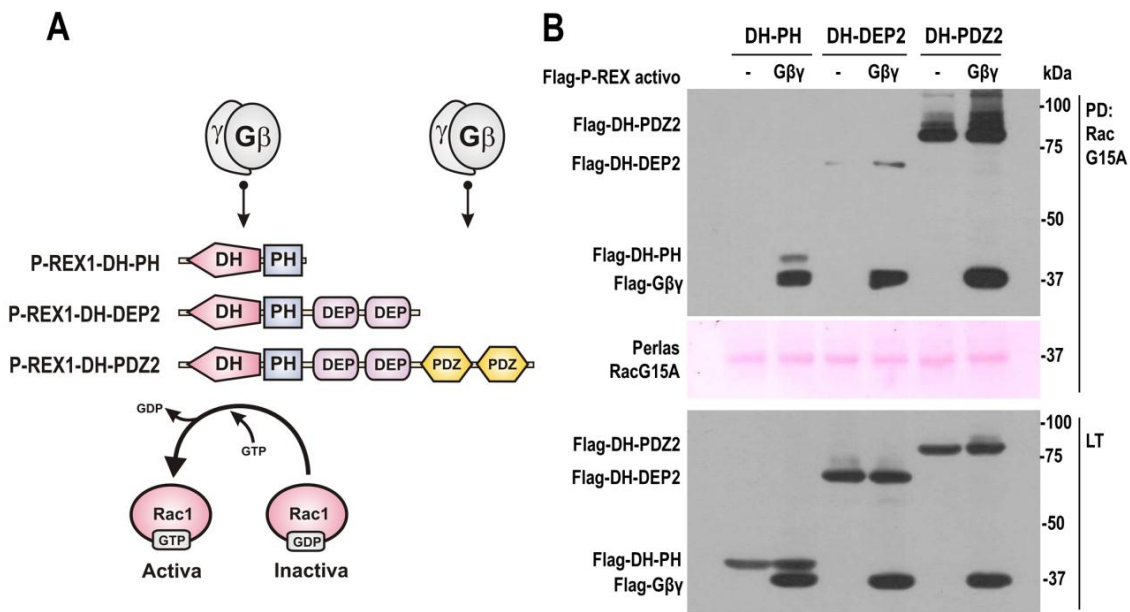
son representativos de 3 experimentos independientes. **C)** Interacción de  $G\beta\gamma$  con los dominios en tándem de DH-PH, DEP-DEP y PDZ-PDZ que conforman el extremo N-terminal de P-Rex1. Ensayo de pulldown de GST-P-Rex1-DH-PH, GST-P-Rex1-DEP-DEP, GST-P-Rex1-PDZ-PDZ y detectamos 3XFlag- $G\beta_1\gamma_2$  asociada a las construcciones de P-Rex1. Los blots son representativos de 3 experimentos independientes. **D)** Interacción de  $G\beta\gamma$  con el tándem PDZ-PDZ y los dominios independientes PDZ1 y PDZ2 de P-Rex1. Ensayo de pulldown de GST-P-Rex1-PDZ-PDZ, GST-P-Rex1-PDZ1, GST-P-Rex1-PDZ2 y detectamos 3XFlag- $G\beta_1\gamma_2$  asociada a las construcciones de P-Rex1. Los blots son representativos de 3 experimentos independientes. **E)** Modelos que pueden explicar la activación de P-Rex1 por la interacción de  $G\beta\gamma$  a través de los dominios PDZs y DH-PH.



**Figura 57.** El heterodímero  $G\beta\gamma$  interacciona con los dominios PDZ-PDZ de la quimera Q-RhoX. **A)**  $G\beta\gamma$  interacciona con PDZ-PDZ de Q-RhoX, una quimera constituida por P-Rex1 al cual se cambiaron los dominios DH-PH por los de PDZ-RhoGEF. Ensayo de pulldown de GST- $G\beta\gamma$  y se detectó a EGFP-Q-RhoX asociada. **B)**  $G\beta\gamma$  interacciona con los dominios DH-PH de P-Rex1, pero no con los dominios DH-PH de PDZ-RhoGEF. **C)** Esquema hipotético que puede explicar la dinámica de interacción de  $G\beta\gamma$  con los dominios de PDZ-PDZ de Q-RhoX para la exposición y activación del dominio catalítico que corresponde a PDZ-RhoGEF, como consecuencia tiene una salida catalítica a Rho.

La interacción de G $\beta$  $\gamma$  con los dominios PDZ-PDZ parece relevante en la dinámica de activación de P-Rex1, por una estrategia adicional confirmamos que G $\beta$  $\gamma$  puede interactuar con la estructura de P-Rex1 de manera independiente a los dominios DH-PH de P-Rex1. Utilizamos una quimera esquematizada en la Figura 56A, fue construida en nuestro laboratorio y denominada Q-Rhox, esta conformada por esqueleto de P-Rex1, pero el tándem DH-PH corresponde al de PDZ-RhoGEF y, por lo tanto, activa a Rho. En el ensayo de pulldown de GST-G $\beta$  $\gamma$  mostrado en la Figura 57A, encontramos que **EGFP-Q-Rhox interactuó con el dímero G $\beta$  $\gamma$** , en la Figura 57B, demostramos que la **G $\beta$  $\gamma$  interactúa con GST-DH-PH de P-Rex1, pero no con GST-DH-PH de PDZ-RhoGEF**, confirmando que la interacción G $\beta$  $\gamma$ /Q-Rhox es independiente de los dominios DH-PH. Como perspectiva, se planea evaluar la hipotética activación de Q-Rhox inducida por G $\beta$  $\gamma$  como se muestra en el modelo de la Figura 57C, la interacción con los dominios PDZ-PDZ de Q-Rhox, induciría una conformación abierta de la quimera para poder activar a Rho.

**Dinámica de activación de P-Rex1 por G $\beta$  $\gamma$ : Evidencia del rompimiento de interacciones intramoleculares en P-Rex1**



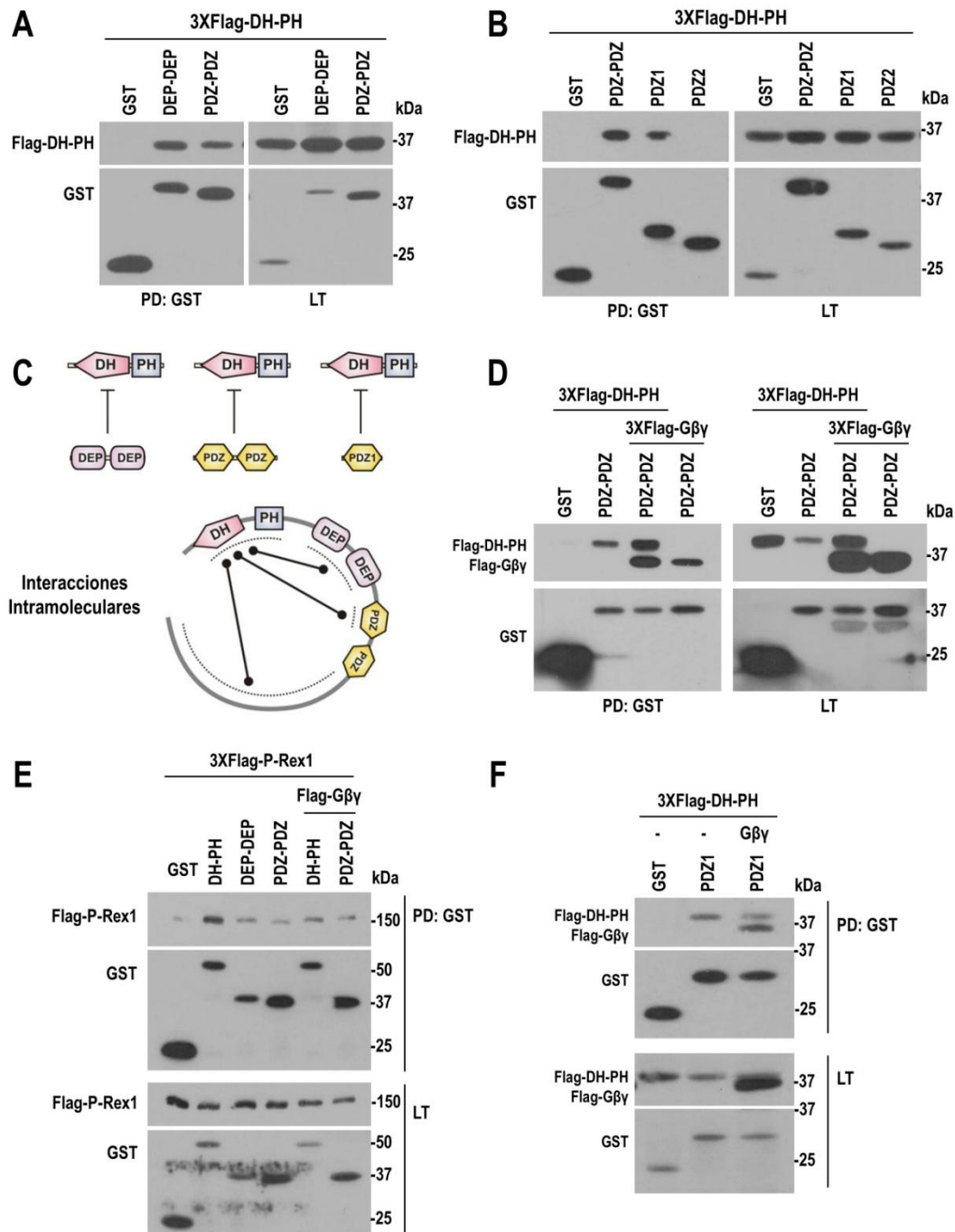
**Figura 58. Dominios PDZ-PDZ relevantes para la activación de P-Rex1 inducida por G $\beta$  $\gamma$ .** Se realizó pull down de RacGEFs utilizando perlas de GST-RacG15A (libre de nucleótido), se utilizaron construcciones crecientes de P-Rex1 con o sin G $\beta$  $\gamma$ , la primera construcción va del DH-PH, la segunda del DH-PH-DEP1-DEP2 y la última que se extiende DH-PH-DEP1-DEP2-PDZ1-PDZ2.

Posteriormente, evaluamos la contribución de los dominios PDZs de P-Rex1 en la activación de la actividad del GEF por G $\beta$  $\gamma$ . Para ello, evaluamos construcciones de P-Rex1 de expresión citosólica que incluyen el tándem DH-PH con la actividad catalítica y que se extienden hacia el carboxilo añadiendo los dominios DEP y la última que incluye a los dominios PDZ, como se muestra en la Figura 58A. El resultado fue interesante, analizamos la activación de estas construcciones de P-Rex1 con o sin G $\beta$  $\gamma$ , y para nuestra sorpresa, la construcción más grande que incluye los dominios PDZs fue más activa que el resto, esperábamos que la más activa sería el tándem DH-PH sin dominios extra porque estarían totalmente expuestos para tener actividad catalítica mientras que las construcciones con dominios adicionales autoinhibirían la actividad catalítica. Estos resultados sugieren que los dominios PDZ-PDZ contribuyen a que el DH tenga actividad catalítica, podrían tener un papel fundamental en la localización en la membrana, por ejemplo, para que el DH pueda alcanzar actividad máxima por PIP<sub>3</sub> y G $\beta$  $\gamma$ , esta hipótesis se apoya en el contraste con las mismas regiones de P-Rex1, pero ancladas en la membrana.

Hallazgos previos en el laboratorio demostraron que los dominios DEP-DEP y PDZ-PDZ pueden regular la actividad catalítica del GEF de manera negativa en ensayos de captura del GEF en un estado activo, en estos resultados observamos que las construcciones de DH-PH de P-Rex1 ancladas a la membrana (isoprenilación en la caja CAAX) son capturadas activas por RacG15A en ensayos de afinidad y activan a Rac; sin embargo, aquellas construcciones que se extienden del dominio DH hasta el DEP2 o bien, hasta el PDZ2, son menos activas. Además, algunas construcciones de P-Rex1 como el dominio DEP1 y la región denominada carboxilo terminal, inhiben la actividad catalítica del módulo DH-PH de P-Rex1 por interacción directa y se potencia cuando son fosforiladas <sup>121</sup>. Estos datos sugieren que una o varias conformaciones de auto-inhibición por interacciones intramoleculares en P-Rex1, las cuales, hipotéticamente el dímero G $\beta$  $\gamma$  tendría que romper o reorganizar para exponer y activar el dominio catalítico de P-Rex1 para que pueda asociarse a Rac.

Considerando la relevancia de las interacciones intramoleculares en la activación de P-Rex1, analizamos algunas de estas interacciones y si G $\beta$  $\gamma$  regula alguna de ellas (Figura 59). Encontramos que los dominios en tándem de DEP-DEP y PDZ-PDZ, interaccionan fuertemente con el módulo catalítico DH-PH de P-Rex1 en ensayos de afinidad (Figura 59A), particularmente el dominio PDZ1 interaccionó con el módulo catalítico (Figura 59B y C), esto sugiere que dentro de la dinámica de activación de P-Rex1, G $\beta$  $\gamma$  interacciona inicialmente con los dominios PDZ-PDZ que se encontrarían

más expuestos en la superficie de P-Rex1, después la interacción permitiría que libere a los dominios DH-PH para que sean expuestos a posibles interacciones como al dímero G $\beta$ y y al PIP $_3$ .



**Figura 59. G $\beta$ y interacta con los dominios PDZ-PDZ y DH-PH de P-Rex1 con caras distintas. A)** Interacción del tándem DEP-DEP y el PDZ-PDZ con el módulo catalítico DH-PH de P-Rex1. Ensayo de pulldown de GST-DEP-DEP, GST-P-Rex1-PDZ-PDZ, y detectamos el tándem 3XFlag-DH-PH asociado a las construcciones de P-Rex1. Los blots son representativos de 3 experimentos independientes. **B)** Interacción del PDZ1 con el tándem DH-PH. Mapeo de la interacción



del tándem DH-PH con los dominios separados GST-PDZ1 y GST-PDZ2 de P-Rex1, pulldown de GST-PDZs y detección de Flag-DH-PH asociado. **C)** Esquemas que representan las interacciones inhibitorias que ejercen los dominios DEP y PDZs. **D)** Evidencia de que G $\beta$  $\gamma$  interacciona con caras efectoras diferentes con DH-PH y PDZs. Ensayo de interacción del tándem GST-PDZ-PDZ con Flag-DH-PH y la influencia de G $\beta$  $\gamma$ . **E)** Interacción de tandems con P-Rex1 completo y efecto de G $\beta$  $\gamma$ . **F)** G $\beta$  $\gamma$  disminuye la interacción entre GST-PDZ1 y Flag-DH-PH.

Cuando analizamos la interacción de los dominios PDZ-PDZ con DH-PH en presencia de G $\beta$  $\gamma$  (Figura 59D), encontramos que no se compitieron las interacciones, por el contrario parecen enriquecerse, particularmente G $\beta$  $\gamma$ , sugiriendo que este heterodímero interacciona con interfases distintas tanto con PDZ-PDZ como con DH-PH, lo cual apoya la existencia del modelo 1 que se muestra en la Figura 56E, aquí G $\beta$  $\gamma$  interacciona por un lado con los dominios PDZ-PDZ y en otra cara interacciona con el tándem DH-PH.

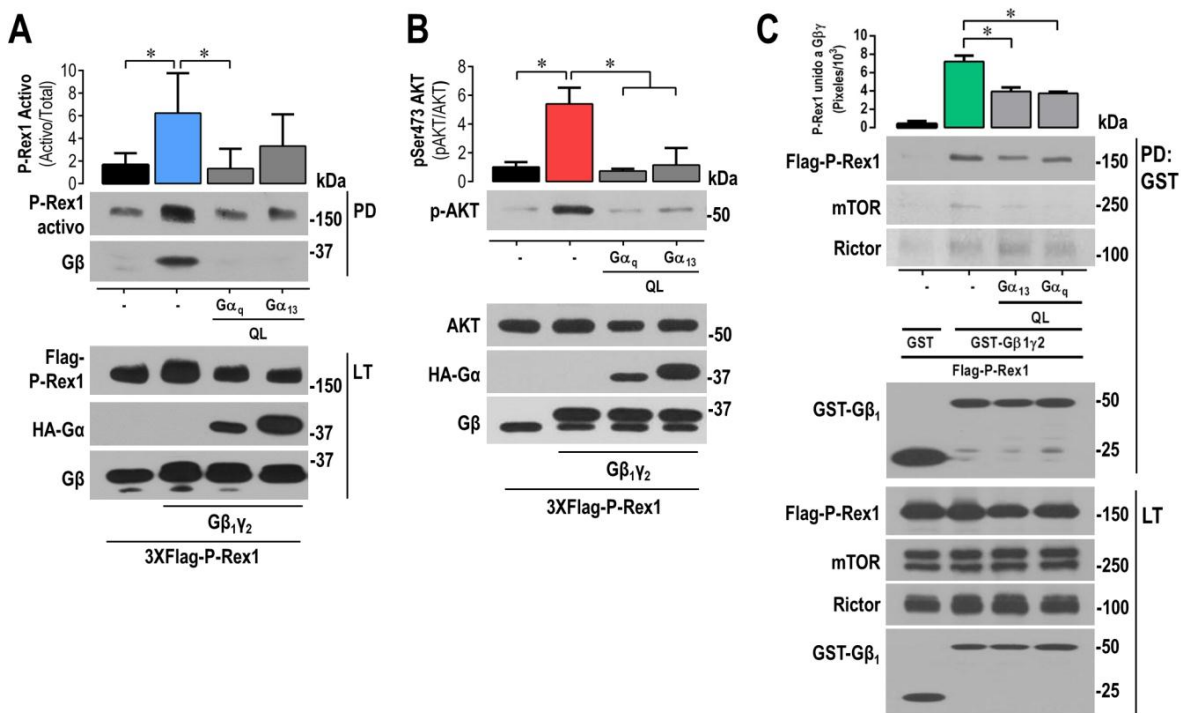
Después, pusimos a prueba la formación de interacciones homodiméricas de P-Rex1 y la conformación de posibles “pools” de moléculas de P-Rex1 inhibidas, y su regulación por G $\beta$  $\gamma$ . Obtuvimos un resultado interesante, analizamos la interacción de los tandems con P-Rex1 completo (Figura 59E), observamos que principalmente el tándem DH-PH se asoció con el P-Rex1 completo y esta interacción fue disminuida con G $\beta$  $\gamma$  sugiriendo que **la existencia de pools de P-Rex1 inter-inhibidos por interacción, los cuales podrían ser disgregados por G $\beta$  $\gamma$  para activar al los GEFs individualmente**. Finalmente, evaluamos si la interacción inhibitoria del dominio PDZ1 con el tándem DH-PH podría abatirse con G $\beta$  $\gamma$  (Figura 59F), en un ensayo de pulldown observamos que la expresión de G $\beta$  $\gamma$  compitió la interacción de GST-PDZ1 con Flag-DH-PH, desplazando a este último y detectando la interacción fuerte de G $\beta$  $\gamma$  con PDZ1. Este resultado apoya la idea que el dímero G $\beta$  $\gamma$  rompe la interacción entre dominios para llevar a la apertura de P-Rex1 y en consecuencia la exposición del dominio catalítico para secuencialmente ser activado en su totalidad para reconocer y activar a Rac. Estos resultados nos ayudaron a comprender más el mecanismo de activación de P-Rex1 por el heterodímero G $\beta$  $\gamma$  y con ello decidimos evaluar la influencia que tienen las subunidades G $\alpha$  constitutivamente activas en la interacción y activación de P-Rex1 por G $\beta$  $\gamma$ .

### 10.3.6 Las subunidades G $\alpha_q$ QL y G $\alpha_{13}$ QL inhiben la activación de P-Rex1 y AKT inducida por G $\beta$ $\gamma$

Como observamos, la sobreexpresión de G $\beta$  $\gamma$  en las células induce la activación de P-Rex1, bajo estas condiciones nos propusimos evaluar si las mutantes Q $\rightarrow$ L de G $\alpha_q$  y G $\alpha_{13}$  podrían inhibir la



señalización inducida por el heterodímero  $G\beta\gamma$  sobre sus efectores como P-Rex1 y los que llevan a la señalización sobre la activación de AKT. Para evaluar esto, las células fueron transfectadas con  $G\beta\gamma$  (vectores: pCEFL-3XFlag- $G\beta_1$  y pCEFL- $\gamma_2$ ) y con  $G\alpha_q$ -QL o bien,  $G\alpha_{13}$ QL (vectores HA- $G\alpha_q$ QL o HA- $G\alpha_{13}$ QL). Nuestros resultados mostraron que las subunidades  $G\alpha_q$ QL y  $G\alpha_{13}$ QL disminuyeron significativamente la activación de P-Rex1 (Figura 60A), así como la activación de AKT (p-Ser473-AKT1/2/3, Figura 60B) inducida por la sobreexpresión de  $G\beta\gamma$ . Además, en nuestro ensayo de activación de P-Rex1 en el cual realizamos el pulldown del GEF activo utilizando perlas de Rac1 libre de nucleótido (GST-RacG15A unido a glutatión-safarosa), encontramos que en el filtro donde revelamos el 3XFlag-P-Rex1 activo capturado, se vino asociado el dímero  $G\beta\gamma$ , pero esta interacción ya no fue detectada cuando estaban co-expresadas las subunidades  $G\alpha$  mutantes Q→L (Figura 60A, panel PD con anti- $G\beta$ ). Este resultado interesante, valido que la fracción activa de P-Rex1 es vía su interacción con  $G\beta\gamma$  y que las subunidades  $G\alpha$ -QL podrían estar compitiendo para secuestrar a los dímeros  $G\beta\gamma$  evitando que este active a su efector P-Rex1.



**Figura 60. Las subunidades  $G\alpha_q$ QL y  $G\alpha_{13}$ QL inhiben la activación de P-Rex1 y AKT inducida por la sobreexpresión de  $G\beta\gamma$ .** A) Los mutantes de  $G\alpha_q$ QL y  $G\alpha_{13}$ QL deficientes en la actividad de GTPasa, inhiben la activación de P-Rex1 inducida por la sobreexpresión de  $G\beta\gamma$ . La gráfica representa la media  $\pm$  EE de la densitometría de la fracción de P-Rex1 activado en 4 experimentos independientes; \* $p$ <0.05, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunn. B) Las

subunidades  $G\alpha_q$ QL y  $G\alpha_{13}$ QL inhiben la activación de AKT dependiente de  $G\beta_1\gamma_2$ , que evalúan la activación de AKT endógena detectada por western blot (fosfo-Ser473) en respuesta a la sobreexpresión  $G\beta_1\gamma_2$  en ausencia o presencia de mutantes  $G\alpha_q$ QL o  $G\alpha_{13}$ QL; La gráfica representa la media  $\pm$  EE de las densitometrías de cinco experimentos independientes, \* $p < 0.001$  ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. **C)** Las subunidades  $G\alpha_q$ QL y  $G\alpha_{13}$ QL compiten la interacción entre  $G\beta\gamma$  y P-Rex1. Células HEK293T transfectadas con los plásmidos correspondientes, se realizó ensayo de pulldown; la asociación entre P-Rex1 y  $G\beta\gamma$  se vio atenuada cuando se co-expresaron las subunidades mutantes  $G\alpha_q$ QL o  $G\alpha_{13}$ QL, también se vio atenuada la interacción del complejo mTORC2. La expresión de proteínas transfectadas se demostró en lisados celulares totales (LT, paneles inferiores). La gráfica representa la media  $\pm$  EE de los valores de densitometría de P-Rex1 asociado a  $G\beta\gamma$  obtenido en tres experimentos independientes, \* $p < 0.05$ . *Panel A y C obtenidos con repeticiones de Irving García-Jiménez.*

En conjunto, los resultados anteriores sugieren dos posibilidades inmediatas por las cuales las mutantes  $G\alpha$  Q $\rightarrow$ L evaluadas pudiesen inhibir la señalización de  $G\beta\gamma$  sobre la activación del RacGEF P-Rex1 y la cinasa AKT, una de ellas puede ser explicada por cascadas de señalización inducidas por las subunidades  $G\alpha$  constitutivamente activas que pudieran inhibir la activación de estos efectores río abajo de  $G\beta\gamma$ ; y la otra posibilidad puede ser la interacción directa de estas  $G\alpha$  Q $\rightarrow$ L (como lo respalda la Figura 53B) y de esta manera secuestrando los heterodímeros  $G\beta\gamma$  evitando su interacción funcional con los efectores. Para poner a prueba la posibilidad de la competencia en la interacción, evaluamos a continuación si las subunidades  $G\alpha_q$ QL y  $G\alpha_{13}$ QL compiten y disminuyen la interacción de  $G\beta\gamma$  con P-Rex1.

### 10.3.7 Las subunidades $G\alpha_q$ QL y $G\alpha_{13}$ QL inhiben la interacción $G\beta\gamma$ con P-Rex1 y la migración celular

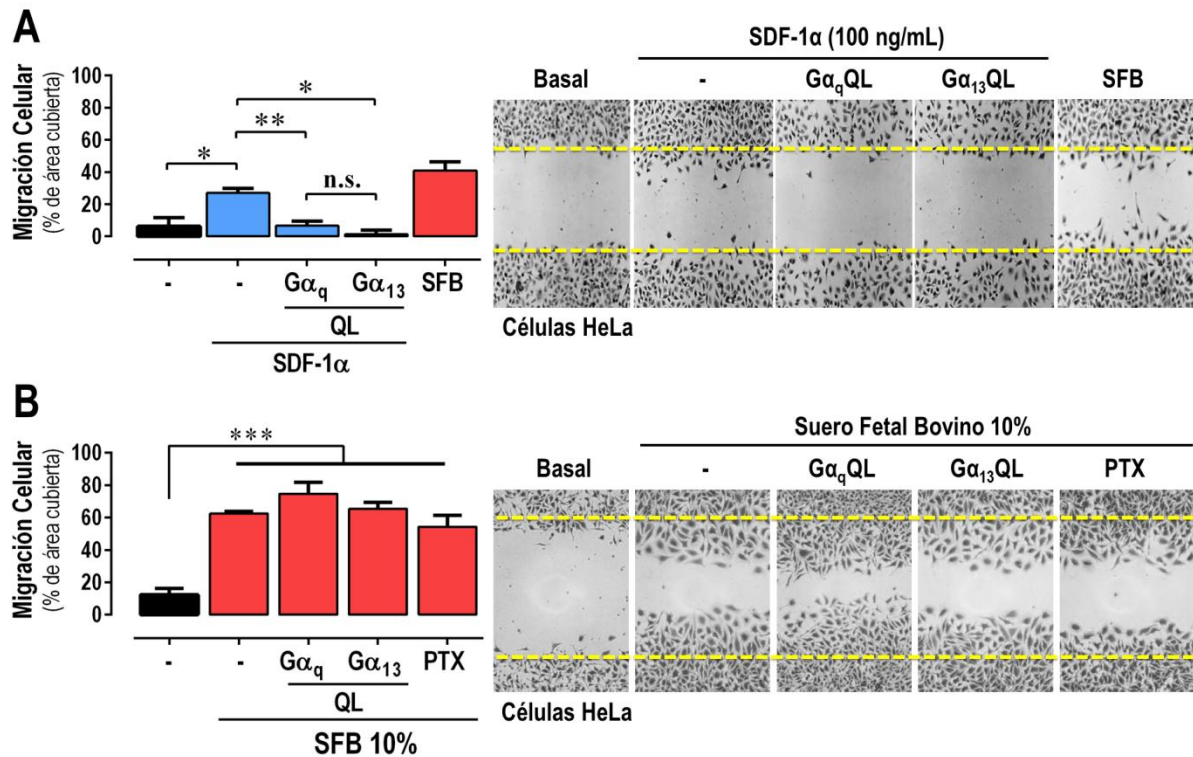
La inhibición de la señalización de  $G\beta\gamma$  ejercida por la expresión de las subunidades  $G\alpha_q$ QL y  $G\alpha_{13}$ QL, hipotéticamente podría ocurrir por dos mecanismos: el primero donde la señalización de las subunidades activas podría activar río abajo mecanismos de regulación negativa sobre  $G\beta\gamma$ . En un segundo mecanismo donde las subunidades  $G\alpha$ -QL interaccionan con  $G\beta\gamma$  (como se demostró en la Figura 53B), regulando directamente a  $G\beta\gamma$  para impedir la eficiencia en su señalización. Ambos mecanismos son consistentes con el hecho de que **Gq y G13 priorizan la señal hacia la activación de Rho, mientras que  $G\beta\gamma$  comúnmente se relaciona a la señal hacia Rac**, dichas GTPasas son excluyentes de manera espacio temporal en el contexto de la migración celular. Estrategias como competir la interacción de  $G\beta\gamma$  con su efector P-Rex1, es un mecanismo por el cual puede ser regulada la activación de P-Rex1/Rac y como consecuencia la inhibición de la migración celular en respuesta a estímulos que activen receptores acoplados preferencialmente a  $G_i$ . En células HEK293T

transfectadas nos propusimos a averiguar si la interacción de  $G\beta_1\gamma_2$  con P-Rex1 podría ser alterada por la presencia de las subunidades  $G\alpha_qQL$  y  $G\alpha_{13}QL$  (los plásmidos utilizados fueron GST- $G\beta_1\gamma_2$ , 3XFlag-P-Rex1, HA- $G\alpha_qQL$  y HA- $G\alpha_{13}QL$ ).

Nosotros postulamos que las subunidades  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{13}$  deficientes de la GTPasa, podrían modular negativamente la señalización de  $G\beta\gamma$  evitando la interacción con P-Rex1, su efector quimiotáctico. Evaluamos esta posibilidad en HEK293T transfectadas con GST- $G\beta_1\gamma_2$ , Flag-P-Rex1 y las versiones Q→L de estas subunidades  $G\alpha$ . En ensayos de pulldown de GST- $G\beta_1\gamma_2$  buscamos al P-Rex1 unido a  $G\beta_1\gamma_2$  mediante western blot. Como se muestra en la Figura 60C, el P-Rex1 que interacciona, disminuyó significativamente en las células que co-expresan las subunidades  $G\alpha_qQL$  o  $G\alpha_{13}QL$ , estas mutantes que forman interacciones estables con  $G\beta_1\gamma_2$  (Figura 60C).

En trabajos previos del laboratorio se caracterizaron dos interacciones relevantes, la cinasa mTOR interacciona con P-Rex1 para llevar a la activación de Rac y migración celular <sup>111</sup>, mientras que  $G\beta\gamma$  también interacciona con mTOR para promover su actividad catalítica <sup>110</sup>. Teniendo estos antecedentes, observamos que junto con P-Rex1 asociado a  $G\beta\gamma$ , se detectó a mTOR y Rictor que conforman el complejo 2 de mTOR (mTORC2) involucrado en migración celular. Para estas proteínas también disminuyó su asociación en el pulldown cuando se expresaron las mutantes  $G\alpha_qQL$  y  $G\alpha_{13}QL$ .

Funcionalmente, el impedimento en la interacción de  $G\beta\gamma$  con sus efectores como P-Rex1 y PI3K (además del complejo mTORC2), tendría como consecuencia la disminución en la migración celular inducida por GPCRs activados por ligando. Esta hipótesis la pusimos a prueba en un ensayo funcional de cierre de herida con células HeLa sembradas sobre gelatina 0.02% y transfectadas con las mutantes activas de  $G\alpha_qQL$ ,  $G\alpha_{13}QL$  o con vector pCEFL vacío. Las células HeLa migraron en respuesta a SDF-1 (100 ng/mL), sin embargo en las condiciones donde las células expresaron las subunidades  $G\alpha_qQL$  o bien,  $G\alpha_{13}QL$ , la migración de las células inducida por SDF-1/CXCR4 se inhibió (Figura 61A), lo cual nos sugiere que el mecanismo de competencia que observamos previamente donde las  $G\alpha$ -QL interaccionan fuertemente con  $G\beta\gamma$ , secuestran al heterodímero evitando que pueda interaccionar y activar a sus efectores como P-Rex1, un GEF que es necesario para la activación de Rac1 en la migración celular.



**Figura 61.** Las subunidades  $G\alpha_q$ -QL y  $G\alpha_{13}$ -QL inhiben la migración celular inducida por SDF-1/CXCL12, pero no inhiben la migración inducida por suero. **A)** Migración en cierre de herida de células HeLa estimuladas con SDF-1 (100 ng/mL) cuando expresan las subunidades  $G\alpha_q$ QL o bien,  $G\alpha_{13}$ QL. Los datos graficados representan la media  $\pm$  EE del área cubierta por células que migraron de cuatro experimentos independientes; n.s. no significativo, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. **B)** Migración en cierre de herida de células HeLa estimuladas con suero fetal bovino (SFB 10%) cuando expresan las subunidades  $G\alpha_q$ QL o bien,  $G\alpha_{13}$ QL. Los datos graficados representan la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes. \*\*\* $p < 0.001$  ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey. *Resultado del panel A, obtenido con repeticiones de Víctor Manuel Color-Aparicio.*

En contraste a la inhibición la migración inducida por SDF-1 cuando las células expresan a las subunidades  $G\alpha$  QL, cuando las células fueron estimuladas con 10% de suero fetal bovino, las células HeLa migraron adecuadamente a pesar de la expresión de las subunidades  $G\alpha_q$ QL o  $G\alpha_{13}$ QL (Figura 61B). Además, la toxina pertussis (200 ng/mL) que utilizamos como inhibidor de la proteína  $G_i$ , tampoco logró abatir significativamente la migración inducida por SFB. Lo anterior sugiere que la migración inducida por SFB incluye mecanismos independientes a la activación y migración inducida por GPCRs acoplados a  $G_i$ , y en particular, la contribución del dímero  $G\beta\gamma$  no es significativa cuando el estímulo es complejo como el suero, además las subunidades  $G\alpha_q$ QL y  $G\alpha_{13}$ QL no mostraron efectos inhibitorios dependientes de sus efectores directos que pudieran evidenciarse en la migración

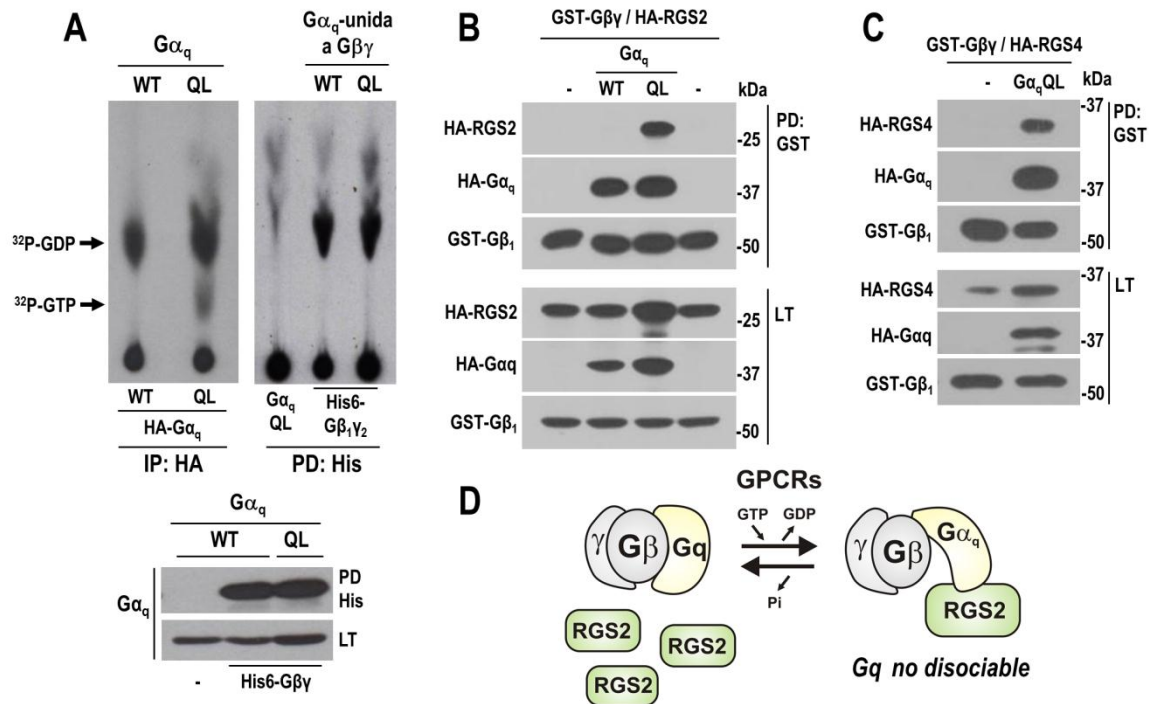
de las células por suero fetal (Figura 61B). Utilizando estos modelos celulares, determinamos mecanismos de regulación que incluyen elementos como SDF-1/CXCR4, las proteínas G y P-Rex1, dicho mecanismo consideramos que se extrapola a las células derivadas de la médula ósea y células tumorales para el crecimiento de los tumores y desarrollo de metástasis.

### 10.3.8 Dinámica de interacción de $G\beta\gamma$ con las subunidades $G\alpha_q$ QL y $G\alpha_{13}$ QL

Teniendo en mente que subunidades mutantes de  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{13}$  deficientes de la GTPasa (QL) pueden mantener interacción con  $G\beta\gamma$ , nos preguntamos si algunos efectores o proteínas reguladoras de la actividad de GTPasa (RGS) para las subunidades  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{13}$ , que interaccionan con subunidades  $G\alpha$  activas (unidas GTP), pueden asociarse a pesar de la interacción estable con  $G\beta\gamma$ , dando lugar a complejos tetraméricos de la proteína G con un efector o proteína reguladora, una posibilidad de heterotrimeros activos comúnmente hipotetizados como un estado transitorio, breve e inestable. Para evaluar lo anterior decidimos realizar un pulldown de  $G\beta\gamma$  (GST- $G\beta\gamma$ ) y detectar las subunidades  $G\alpha$  (HA- $G\alpha$ ) como en resultados previos, así como los efectores o proteínas reguladoras de la subunidad  $G\alpha$  correspondiente y que únicamente se reconocen a la subunidad  $G\alpha$  cuando está activa.

#### ***Detección de un complejo tetramérico conformado por $G\beta\gamma$ - $G\alpha_q$ QL-RGS2***

Primero evaluamos si en los pulldown de  $G\beta\gamma$  con  $G\alpha_q$ QL asociada, podríamos encontrar el nucleótido GTP cargado en la subunidad  $G\alpha_q$ QL, mediante cromatografía en capa fina y autorradiografía (Figura 62A). Para responder a esto, las células transfectadas con mutantes se incubaron con fosforo-32 ( $^{32}P$ ), realizamos el pull down de His- $G\beta\gamma$  y buscamos los nucleótidos asociados por cromatografía y se reveló el  $^{32}P$  presente en GDP o GTP asociado a las subunidades  $G\alpha$  que interactúan con  $G\beta\gamma$ ; como control utilizamos pull downs con  $G\alpha$ WT, o bien, sin His- $G\beta\gamma$  estos resultados se muestran a la derecha del panel A (PD:His). Como control de la distribución de nucleótidos en la cromatografía se realizó inmunoprecipitación de HA- $G\alpha_q$ WT o HA- $G\alpha_q$ QL, señaladas a la izquierda del panel A (IP:HA) y nuestro control de la interacción de las subunidades HA- $G\alpha_q$ WT o HA- $G\alpha_q$ QL con His- $G\beta\gamma$  se muestra en el panel inferior de la Figura 62A. Los lisados se eluyeron en cromatografía en capa fina para detectar las formas de nucleótidos que se unen a  $G\alpha$ .



**Figura 62. Complejo tetramérico de Gβγ/Gα<sub>q</sub>QL/RGS2.** **A)** Nucleótidos asociados a Gα<sub>q</sub> WT y QL evaluados en ensayos de inmunoprecipitación (HA) y pulldown (His). Células fueron transfectadas y mantenidas con medio <sup>32</sup>P. En ensayos de pulldown His6-Gβγ se buscaron los nucleótidos asociados a la subunidad Gα que estaban interaccionando con el heterodímero. Además, en inmunoprecipitados de HA-Gα<sub>q</sub> WT o QL, también se buscaron los nucleótidos asociados por cromatografía. **B)** Gβγ interacciona con RGS2 a través de Gα<sub>q</sub> constitutivamente activa (QL) pero no con la forma silvestre (WT). Ensayo de pulldown de GST-Gβγ y la detección de las proteínas asociadas como las subunidades Gα<sub>q</sub>WT y Gα<sub>q</sub>QL, así como el RGS2. **C)** El dímero Gβγ interacciona con RGS4 a través de Gα<sub>q</sub>QL. En ensayos de pulldown de GST-Gβγ se encontró la interacción con RGS4 cuando las células co-expresan a Gα<sub>q</sub>QL. **D)** Modelo que representa la activación del heterotrímero de Gq donde posiblemente una fracción permanezca unida a Gβγ a pesar de la incorporación de GTP, esta subunidad Gα<sub>q</sub> activa puede interaccionar proteínas reguladoras como el RGS2 y RGS4, la interacción simultánea con efectores de Gα<sub>q</sub> (como PLCβ y p63-RhoGEF) es una perspectiva de estos resultados. *Panel A obtenido con ayuda de José Vázquez-Prado.*

En estas condiciones experimentales solo nos fue posible detectar GDP asociado al pulldown de Gβγ con Gα<sub>q</sub>WT y Gα<sub>q</sub>QL. Mientras que, en nuestro control de inmunoprecipitación de HA, las subunidades HA-Gα<sub>q</sub>QL tenían asociado tanto GDP como GTP, como se señala en los blots correspondientes de la Figura 62A; mientras que para la subunidad HA-Gα<sub>q</sub>WT inmunoprecipitada únicamente se observó la señal correspondiente a GDP. Esta estrategia no nos evidenció un heterotrímero de Gq activo en términos de la unión a GTP, probablemente la señal es diluida



considerando que el pulldown de His-G $\beta\gamma$  de lisados celulares tendría asociadas las diferentes subunidades G $\alpha$  expresadas en las células y no exclusivamente a G $\alpha_q$ QL; además, existe la posibilidad que G $\beta\gamma$  podría promover la hidrólisis de GTP a GDP en aquellas subunidades G $\alpha$  con las cuales mantenga interacciones.

Por lo anterior, decidimos poner a prueba la interacción de un heterotrímero de GqWT o GqQL con proteínas reguladoras de la actividad de GTPasa de Gq (RGS2, Regulator Of G Protein Signaling 2) con capacidad de reconocer subunidades G $\alpha_q$  unidas a GTP (Figura 62B). En un ensayo de pulldown de GST-G $\beta\gamma$  buscamos a la subunidad G $\alpha_q$  en su versión WT o bien, mutante QL, y como esperábamos según nuestros resultados previos, encontramos asociadas ambas versiones de la subunidad G $\alpha_q$  al dímero G $\beta\gamma$ , todas las condiciones experimentales tenían adicionalmente se transfectaron con HA-RGS2, la proteína reguladora de G $\alpha_q$ GTP. Sorpresivamente encontramos al RGS2 asociado en el pulldown de GST-G $\beta\gamma$ , únicamente donde se encontraba co-expresada la subunidad G $\alpha_q$ QL, el RGS2 fue capaz de reconocer a la subunidad G $\alpha_q$ QL unida a G $\beta\gamma$  y formo un complejo lo suficientemente estable para detectarse por western blot, esto sugiere la formación de un heterotrímero presumiblemente activo ya que esto no ocurrió con el heterotrímero de G $\alpha_q$  WT.

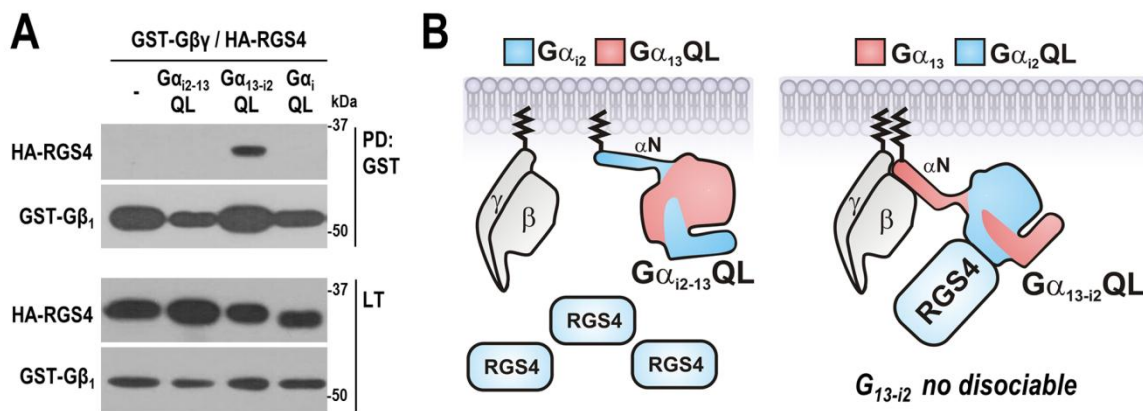
Encontramos un **complejo tetramérico conformado por G $\beta\gamma$ -G $\alpha_q$ QL-RGS2** (esquema de la Figura 62D), donde el heterodímero G $\beta\gamma$  interacciona con RGS2 a través de la subunidad G $\alpha_q$  constitutivamente activa, mientras que la subunidad G $\alpha_q$ WT no promovió la asociación de G $\beta\gamma$  con RGS2, donde consideramos que bajo esta condición experimental las subunidades G $\alpha_q$ WT se encontraban en estado inactivo unidas a GDP. Resultados similares fueron observados para el RGS4 (Figura 62C), esta proteína reguladora para las subunidades G $\alpha_q$  y G $\alpha_i$ , no con la especificidad de RGS2 (que solo reconoce a G $\alpha_q$ ), también se asoció al pulldown de GST-G $\beta\gamma$ , pero con menor eficiencia, únicamente cuando se co-expresaba la subunidad G $\alpha_q$ QL generando el **complejo tetramérico conformado por G $\beta\gamma$ -G $\alpha_q$ QL-RGS4**.

En contraste con el modelo clásico en la literatura, aquí mostramos un heterotrímero activo de Gq que es reconocido por el RGS2 como se representa en la Figura 62D, nuestros datos sugieren que por lo menos existe una fracción de la proteína Gq heterotrimérica en forma activa que es favorecida experimentalmente utilizando la subunidad G $\alpha_q$ QL con deficiencia de la GTPasa, una mutante oncogénica en melanoma uveal que resulta atractiva para profundizar en la contribución del



mantenimiento de la interacción con  $G\beta\gamma$  y lo que significa en términos de la función protumoral de la mutante y la sensibilidad de inhibidores farmacológicos de  $G_q$ . En este estudio de la migración celular dependiente de GPCRs, este complejo estable de  $G\beta\gamma$ - $G\alpha_q$ -RGS2 contribuye a explicar porque la activación de las proteínas  $G_q$  no señala de manera eficiente vía  $G\beta\gamma$ ; a pesar de que la subunidad  $G\alpha_q$  está unida a GTP, conserva afinidad por el heterodímero  $G\beta\gamma$  evitando que este pueda interactuar adecuadamente con sus efectores quimiotácticos como P-Rex1.

### Detección de un complejo tetramérico $G\beta\gamma$ - $G\alpha_{13-12}QL$ -RGS4, relevancia del amino terminal de $G\alpha_{13}$ para mantener interacción estable con $G\beta\gamma$



**Figura 63. Complejo tetramérico de  $G\beta\gamma$ - $G\alpha_{13-12}QL$ -RGS4.** **A)** Células MCF7 fueron transfectadas con HA-RGS4, GST- $G\beta\gamma$  y algunas de las subunidades  $G\alpha$  quiméricas utilizadas en la Figura 54. Se realizó el pull-down de GST- $G\beta\gamma$  y se detectó el RGS4 asociado en la condición donde se expresó la quimera  $G\alpha_{13-12}QL$ , pero no se asoció donde se co-expresó con las subunidades  $G\alpha_{12-13}QL$  o  $G\alpha_i$ . **B)** Modelo que representa el hallazgo de la formación de un complejo  $G\beta\gamma$ - $G\alpha_{13-12}QL$ -RGS4, en el cual confirma que el  $\alpha N$  de  $G_{13}$  tiene propiedades que permiten mantener interacción con  $G\beta\gamma$ , en este sentido  $G\alpha_{12}QL$  gana la propiedad de mantener la interacción con  $G\beta\gamma$  a través de la hélice  $\alpha N$  de  $G\alpha_{13}$ .

Con el hallazgo del complejo  $G\beta\gamma$ - $G\alpha_q$ QL-RGS2, nos interesó evaluar en este mismo sentido a las quimeras analizadas en la Figura 54B, donde encontramos que el dominio parcial de GTPasa de  $G\alpha_i$ QL puede mantener interacción con  $G\beta\gamma$  si se sustituye el extremo amino dominio de GTPasa por el  $G\alpha_{13}$  ( $\alpha N$ ). Hipotetizamos que el RGS4, una proteína reguladora de la subunidad  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_i$ , es capaz de reconocer a la quimera  $G\alpha_{13-12}QL$  porque tiene casi completo el dominio de GTPasa de la subunidad  $G\alpha_i$  donde el RGS4 se sabe que interactúa. Similar al experimento con  $G\alpha_q$ QL/RGS2, realizamos el pull-down de GST- $G\beta\gamma$  y por western blot encontramos asociado a HA-RGS4 únicamente

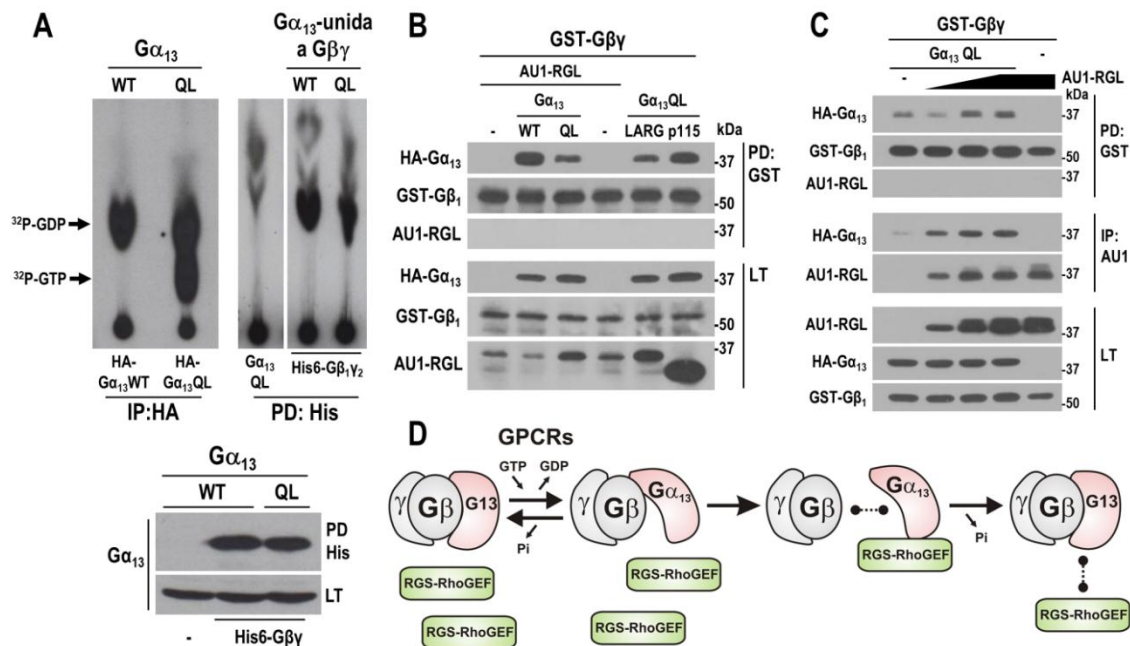
donde se encontraba co-expresada la químera  $G\alpha_{13-12}QL$ , pero no donde se co-expresó la químera  $G\alpha_{12-13}QL$  o bien,  $G\alpha_{12}QL$  la cual se espera que interactúe fuertemente con RGS4 pero según nuestros resultados previos (Figura 53B) no es capaz de interactuar con GST- $G\beta\gamma$ , lo cual explica que no se observa RGS4, mientras que la interacción con  $G\beta\gamma$  es una ganancia de función para la químera  $G\alpha_{13-12}QL$  que puede traer asociado a RGS4. Sugiere que el cambio de la región que contiene el sitio 1 de interacción de  $G\alpha_{13}$  le provee la interacción con  $G\beta\gamma$  al dominio de GTPasa de  $G\alpha_{12}QL$  unido a RGS4, esto generó un **complejo tetramérico  $G\beta\gamma$ - $G\alpha_{13-12}QL$ -RGS4** (Figura 63B), el cual no podría existir de no ser por la región de  $G\alpha_{13}$  que contiene el  $\alpha N$  donde se localiza uno de los dos sitios de interacción con  $G\beta\gamma$ .

### ***Modelo de la disociación de G13 (separación de $G\alpha_{13}$ y $G\beta\gamma$ ) dependiente de efectores de $G\alpha_{13}$***

Para el caso de  $G\alpha_{13}QL$  (Figura 64), también hipotetizamos una fracción de  $G\alpha_{13}QL$  unida a GTP interactúa con  $G\beta\gamma$  para formar una proteína G heterotrimérica activa por lo menos transitoriamente. Evaluamos si la mutante  $G\alpha_{13}QL$  asociada a pulldown de His- $G\beta\gamma$  tiene el nucleótido GDP o GTP. El análisis de marcaje radiactivo nos mostró que donde se expresaba  $G\alpha_{13}WT$  o  $QL$  en los pulldowns, se detectó a GDP, mientras que inmunoprecipitando directamente a las subunidades HA- $G\alpha_{13}$  se detectó GDP para la versión WT y para la QL se detectó además GTP (Figura 64A). Este resultado no apoya una conformación heterotrimérica de G13-GTP, pero como en el caso de Gq, asumimos que se podría enmascarar por el resto de las subunidades unidas a GDP que se vienen asociadas en el pulldown de  $G\beta\gamma$ ; además, como parte de las perspectivas de estos experimentos, hipotetizamos que la interacción de  $G\beta\gamma$  con las subunidades  $G\alpha_{13}QL$  o bien,  $G\alpha_qQL$  podría favorecer la actividad de la GTPasa en para la hidrólisis de GTP en GDP.

Como es claro que la subunidad  $G\alpha_{13}QL$  forma el complejo con  $G\beta\gamma$ , decidimos evaluar si en la formación de este heterotrimeró podríamos encontrar asociado a un efecto de G13, como una evidencia de la funcionalidad de un heterotrimeró activo de G13. Para evaluar esto, realizamos ensayos de pulldown donde bajamos a GST- $G\beta\gamma$  y buscamos la asociación de los dominios RGS de los efectores RhoGEFs (PDZ-RhoGEF, LARG y p115-RhoGEF) de  $G\alpha_{13}$ , ya sea con la co-expresión de  $G\alpha_{13}$  WT o la versión QL. Sin embargo, no se forma un complejo con el efector de G13, no encontramos interacción con ningún dominio RGS de los RhoGEFs LARG, PDZ-RhoGEF o p115-

RhoGEF, por el contrario, estos dominios parecen competir por la unión con  $G\alpha_{13}$ , sugiriendo el desplazamiento del heterodímero  $G\beta\gamma$  (Figura 64B).



**Figura 64. Evidencia de la disociación de  $G\alpha_{13}$  de  $G\beta\gamma$  dependiente de efectores de  $G\alpha_{13}$ .** **A)** Nucleótidos asociados a  $G\alpha_{13}$  WT y QL evaluados en ensayos de inmunoprecipitación (HA) y pull-down (His). Células fueron transfectadas y mantenidas con medio  $^{32}P$ . En ensayos de pull-down His6- $G\beta\gamma$  se buscaron los nucleótidos asociados a las subunidades  $G\alpha$  que estaban interaccionando con el heterodímero. Además, en inmunoprecipitados de HA- $G\alpha_q$  WT o QL, también se buscaron los nucleótidos asociados por cromatografía. **B)** El heterotrímero conformado por  $G\beta\gamma$ - $G\alpha_{13}$  no forma complejo con los dominios RGS de RhoGEFs efectores. El heterotrímero de G13-QL no se asocia a dominios RGS de PDZ-RhoGEF, LARG o bien, p115. **C)** Dominios RGS modifican de manera dependiente de la concentración, la interacción de  $G\alpha_{13}$ QL con  $G\beta\gamma$ . **D)** Modelo en cual se representa la activación del heterotrímero de G13 en el cual es posible que una fracción permanezca unida a  $G\beta\gamma$  a pesar de la incorporación de GTP, esta subunidad  $G\alpha_{13}$  activa puede interaccionar con efectores como los RGS-RhoGEFs. *Panel A obtenido con ayuda de José Vázquez-Prado.*

Analizamos la dinámica de la interacción de  $G\alpha_{13}$ QL con  $G\beta\gamma$  cuando co-expresamos concentraciones crecientes del dominio RGS de PDZ-RhoGEF (Figura 64C), encontramos la cantidad menor de RGS compite la interacción liberando a  $G\alpha_{13}$ QL de  $G\beta\gamma$ , sin embargo, el incremento en la cantidad de RGS incrementa la interacción con  $G\beta\gamma$  lo cual nos sugiere que se esta llevando acabo la hidrólisis de GTP a GDP y conformando más heterotrímeros G13-GDP. Con los resultados anteriores, proponemos el modelo mostrado en la Figura 64D, donde señalamos que a pesar de activarse G13

mantiene la interacción  $G\beta\gamma$  con  $G\alpha_{13}$  a través del amino, en un paso transitorio la subunidad  $G\alpha_{13}$ -GTP interacciona con su efector (RGS-RhoGEF) desplazando al heterodímero  $G\beta\gamma$ , esto en consecuencia puede retrasar la dinámica de liberación de  $G\beta\gamma$ , evitando que el heterodímero pueda señalar de manera efectiva sobre sus efectores como P-Rex1.

### 10.3.9 Validación de la activación quimiogénica de proteínas Gi y Gq por receptores diseñados para activarse exclusivamente por fármacos diseñados (Gi- y Gq-DREADDs)

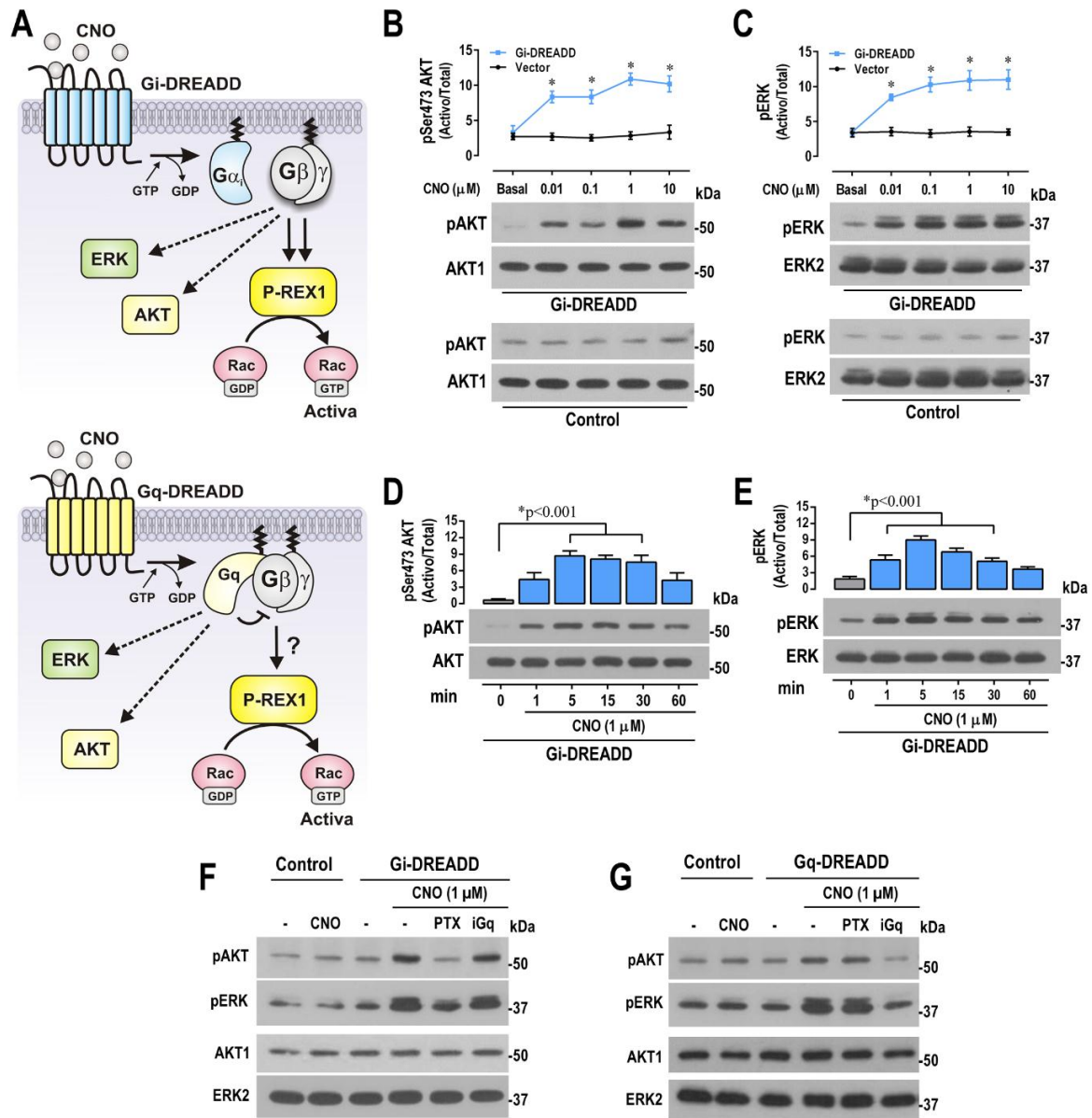
Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la migración celular inducida por los receptores quimiotácticos es principalmente vía la proteína Gi, y esto se explica porque el heterodímero  $G\beta\gamma$  es liberado adecuadamente una vez que se activa la proteína Gi, permitiendo su señalización sobre efectores quimiotácticos como P-Rex1. Siguiendo nuestra hipótesis de que el heterodímero  $G\beta\gamma$  que proviene de una proteína Gi, es más eficiente para activar a P-Rex1, pero no así por otras proteínas como Gq y G13, en las cuales, consideramos que en la dinámica de su activación, estas subunidades Ga mantienen interacciones temporales con el heterodímero  $G\beta\gamma$  en un estado putativamente activo (Ga-GTP). Este mecanismo reduciría el tiempo de  $G\beta\gamma$  libre para estar disponible y activar a sus efectores adecuadamente. Para fortalecer esta idea, consideramos utilizar una estrategia quimiogénica que nos permitirá controlar el sistema para esclarecer la activación de P-Rex1 por  $G\beta\gamma$  proveniente de heterotrímeros como Gi y Gq.

Para probar que las proteínas Gi activan mejor a P-Rex1, transfectamos a células COS7 con los receptores activados solamente por ligandos sintéticos (RASSL, Receptor activated solely by synthetic ligands) o también conocidos como DREADD (Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drug), los cuales fueron diseñados para que tengan un acoplamiento exclusivo a ciertas proteínas G y que, además, sólo pueden ser activados de manera específica por un ligando sintético como es clozapina-N-óxido (CNO, clozapine-N-oxide)<sup>70,136,137</sup>, evitando la activación de receptores endógenos presentes en las células blanco y disecando únicamente la señalización deseada, ya sea de proteínas Gi o Gq (Figura 65A).

Primero evaluamos que el ligando sintético no tuviera efectos *per se* sobre las células, por ello utilizamos concentraciones crecientes del ligando CNO para averiguar la concentración ideal donde se

observara el máximo de activación del Gi-DREADD y sin tener efecto sobre las células transfectadas solo con el vector vacío (sin expresar el DREADD). Utilizamos concentraciones de 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M del fármaco CNO, y como señal del efecto del estímulo buscamos la activación de AKT y ERK por western blot (Figura 65B y C). En esta curva de concentración-respuesta encontramos que la concentración de 1  $\mu$ M necesaria para alcanzar el máximo efecto sobre la activación de las cinasas AKT y ERK en las células transfectadas con Gi-DREADD, pero además el efecto del fármaco sobre las células transfectadas fue insignificante a todas las concentraciones de CNO evaluadas, como se observa en las curvas de activación con y sin DREADD. Seleccionamos la concentración de 1  $\mu$ M donde se activa de manera específica el Gi-DREADD con el máximo efecto y realizamos cursos temporales para la activación de AKT (Figura 65D) y ERK (Figura 65E) estimulando durante 1, 5, 15, 30 y 60 minutos con CNO. Los picos de activación para AKT y ERK se observaron a los 5 minutos, la señalización del Gi-DREADD fue intensa sobre la activación de ambas cinasas.

El sistema quimiogénico de los DREADD fue utilizado por primera ocasión en el laboratorio, por ello, decidimos poner a prueba la especificidad de acoplamiento por parte de los DREADD, experimentos control que nos dieran certeza de que la activación de P-Rex1 que evaluaríamos efectivamente era a través de las proteínas G activadas por el correspondiente DREADD. Se pusieron a prueba las vías de señalización activadas por los receptores Gi-DREADD y Gq-DREADD, donde esperábamos observar el efecto de inhibidores de Gi y Gq para validar la especificidad de la señalización de los DREADD correspondientes. En la Figura 65 se muestran los resultados, donde **la activación del Gi-DREADD con el ligando CNO, mostró un efecto claro en la activación de ERK y AKT, pero cuando las células fueron incubadas con toxina pertussis (PTX), se inhibió la señalización del Gi-DREADD sobre la activación de las cinasas, efecto que no tuvo el inhibidor para Gq. En contraste, el receptor Gq-DREADD llevó a la activación de AKT y ERK, no fue sensible al tratamiento con toxina pertussis, pero el inhibidor FR900359 abatió completamente el efecto** (Figura 65G) en ambos paneles incluimos el control de células estimuladas con CNO sin expresar los DREADD. El efecto de ambos inhibidores consiste en evitar la activación de las proteínas G correspondientes, manteniendo la conformación  $G\alpha$ -GDP- $G\beta\gamma$  138.



**Figura 65. Activación de P-Rex1 por el receptor Gi-DREADD, pero no por Gq-DREADD.** A) Modelo hipotético de la señalización de los DREADDs. B) Control de la especificidad en la señalización de los DREADD en una curva de concentración-respuesta evaluada por la activación de las cinasas AKT y C) ERK (p-Ser473-AKT1/2/3 y p42/44 MAPK, respectivamente). D) Curso temporal de la activación de AKT y E) ERK en células transfectadas con Gi-DREADD y estimuladas con CNO 1  $\mu$ M. Los datos representan la media  $\pm$  EE de 4 experimentos independientes, \* $p$ <0.001, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett (todos versus Basal), el mismo análisis se aplicó para AKT y ERK. F) Señalización los receptores activados por ligando sintético con especificidad para proteínas Gi o bien, G) proteínas Gq, evaluamos la activación de las cinasas AKT y ERK. Las células transfectadas con Gi-DREADD o Gq-DREADD, fueron pre-incubadas con inhibidores para Gi (toxina pertussis 100 ng/mL, toda la noche) o para Gq (inhibidor FR900359 500 nM, 30 min antes de estimular).



### 10.3.10 Evidencia quimiogénica (DREADDs) de la activación de P-Rex1 y migración celular por Gi, pero no por Gq

#### *Evidencia de la señalización eficiente de Gi→Gβγ/P-Rex1*

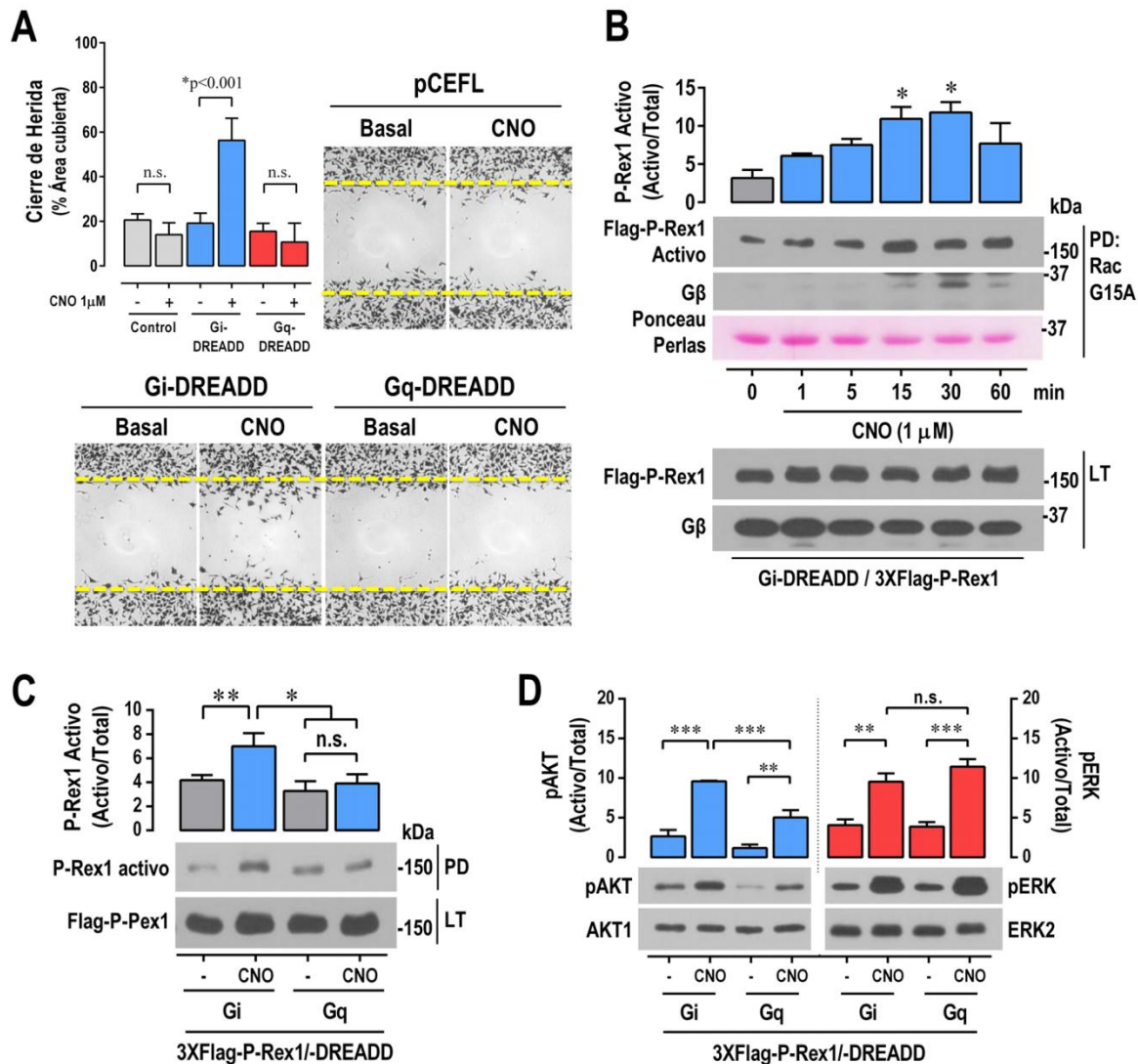
Evaluamos la migración celular cuando se activa específicamente la proteína Gi o Gq. Consistente con nuestra hipótesis, **las células transfectadas con Gi-DREADD y estimuladas con CNO migraron en ensayos de cierre de herida**, esta estrategia quimiogénica funcionó para inducir la migración celular y además reforzó la idea que los GPCRs acoplados a proteínas Gi promueven la migración celular (Figura 66A). En contraste, **las células transfectadas con Gq-DREADD no migraron en respuesta al ligando sintético CNO**, la señalización de este receptor con acoplamiento exclusivo a Gq no promovió la migración celular. Como condiciones control, el fármaco sintético CNO no tuvo efecto sobre las células transfectadas con vector vacío en los ensayos de migración celular en cierre de herida.

Según nuestros resultados previos, el Gi-DREADD debe tener la capacidad de activar a P-Rex1, el efector quimiotáctico activado por el dímero Gβγ que sería liberado del heterotrímero Gi. Probamos realizando un curso temporal de estimulación con el ligando sintético CNO, la capacidad de activar a P-Rex1 estimulando al receptor Gi-DREADD. Encontramos que P-Rex1 fue activado de manera dependiente del tiempo de estimulación vía la activación de proteínas Gi endógenas por el receptor sintético Gi-DREADD (Figura 66B), alcanzando el máximo de activación entre 15 y 30 minutos. Además, en el western blot se encontró asociada en el pulldown de RacGEFs activos, a Gβγ endógena particularmente entre 15 y 30 min, consideramos que P-Rex1 activo detectado traía asociado a su activador el dímero Gβγ que fue liberado de la proteína Gi activa.

Como en la Figura 66B observamos el pico de activación de P-Rex1 a los 15-30 min, decidimos comparar la activación de P-Rex1 a través de proteína Gi versus proteína Gq (Figura 66C). Cuando realizamos el ensayo de captura de RacGEFs activos y revelamos por western blot, encontramos que **P-Rex1 se activó por CNO/Gi-DREADD, pero no por CNO/Gq-DREADD**. Además, si comparamos la activación de AKT (pSer473 AKT1/2/3), también encontramos que Gi-DREADD activo a esta cinasa de manera eficiente, consistente con la idea de que Gβγ liberada de Gi, podría activar a PI3K y esta a su vez llevar a la activación de AKT (Figura 66D). Adicionalmente analizamos la activación de ERK, y la activación de esta cinasa fue similar vía Gi o Gq (Figura 66D), esto nos sirvió como control de



intensidad de estimulación de los receptores DREADD, que a pesar de activar con la misma intensidad a ERK, sólo Gi activó a P-Rex1.



**Figura 66. La migración celular y la activación de P-Rex1 son eficientes a través de GPCRs acoplados a Gi, pero no por Gq.** **A)** Comparación de la migración inducida por la activación de Gi-DREADD y Gq-DREADD. Ensayo de cierre de herida con células HeLa que fueron transfectadas con Gi-DREADD, Gq-DREADD o vector vacío y estimuladas con el ligando sintético CNO. Los datos representan la media  $\pm$  EE de 3 experimentos, n.s. no significativo,  $*p < 0.001$ , ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Tukey. **B)** Curso temporal de la activación de P-Rex1 en células COS7 fueron transfectadas con Gi-DREADD y 3XFlag-P-Rex1 y estimuladas con CNO 1  $\mu$ M durante el tiempo indicado. Se realizó la captura de P-Rex1 utilizando la recombinante GST-RacG15A (libre de nucleótido). Los datos representan la media  $\pm$  EE de 4 experimentos,  $*p < 0.05$ , ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett (todos versus basal). **C)** Comparación de la activación de P-Rex1 entre Gi-DREADD y Gq-DREADD. Células COS7 fueron transfectadas con Gi-DREADD o Gq-

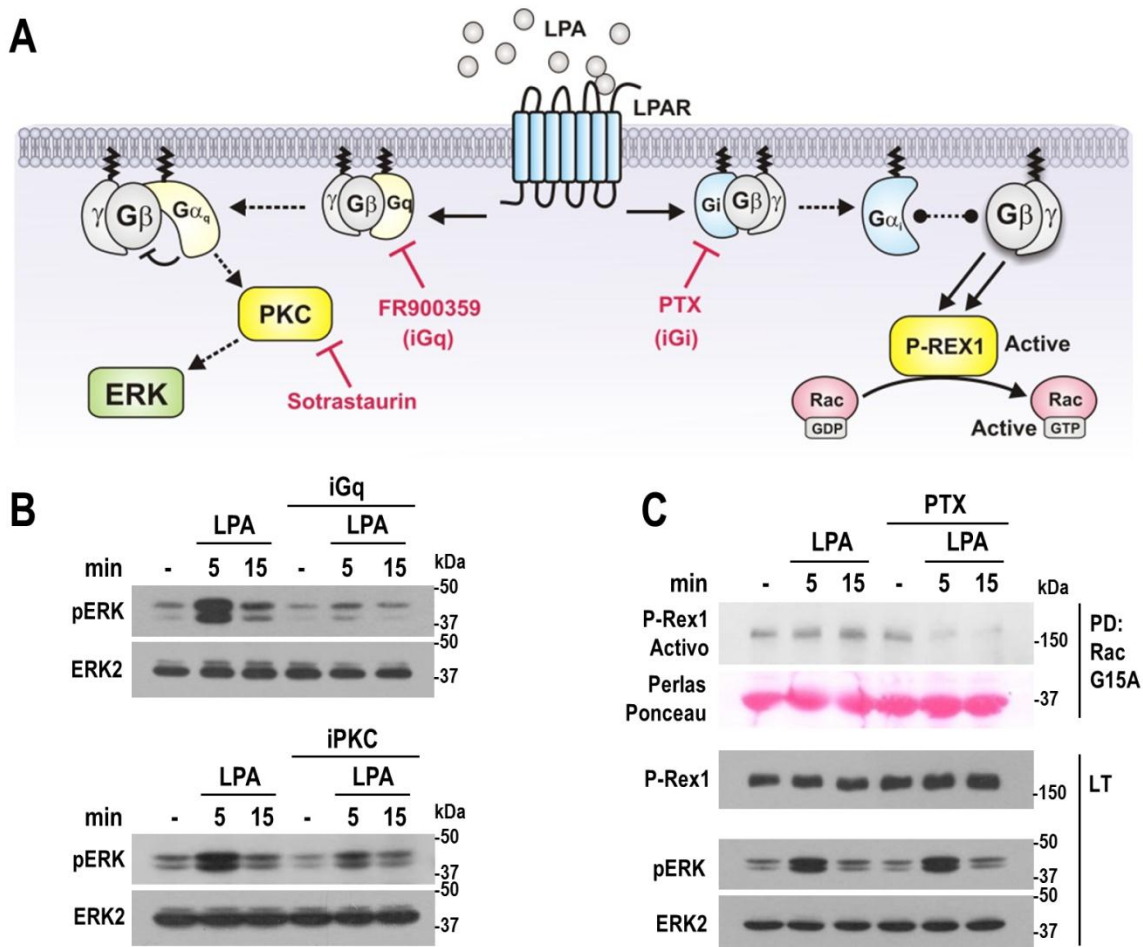
DREADD junto con P-Rex1 y estimuladas con CNO durante 15 minutos para capturar los RhoGEFs activos con RacG15A. Los datos representan la media  $\pm$  EE de 5 experimentos, n.s. no significativo, \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ , prueba T o bien, Mann-Whitney según corresponda la distribución de los datos. **D)** Comparación de la activación de AKT y ERK entre células con Gi-DREADD o con Gq-DREADD. Los datos representan la media  $\pm$  EE de 5 experimentos, n.s. no significativo, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey para el análisis de AKT y ERK. *Panel C y D, obtenidos con repeticiones de Irving García-Jiménez.*

### 10.3.11 Los receptores para LPA acoplados a Gq/Gi incrementan la señalización a P-Rex1 cuando $G\alpha_q$ es inhibida

Los resultados obtenidos quimiogénicamente, demostraron la activación de P-Rex1 por Gi, pero no por Gq utilizando receptores con acoplamiento específico, esta situación nos llevó a analizar la señalización diferencial de receptores acoplados a múltiples familias de proteínas G. Como se mostró en el diagrama de Venn en la introducción (Figura 7, <http://gpcrdb.org>), algunos GPCRs pueden tener acoplamiento a múltiples familias de proteínas G como los receptores para LPA (LPA Rs) <sup>139</sup>, usando esta propiedad de los GPCRs para LPA como modelo endógeno de señalización múltiple, analizamos la capacidad de llevar a la activación de P-Rex1 donde hipotetizamos que esta activación del GEF sería dependiente de proteínas Gi y no por otros heterotrimeros como Gq. Al principio consideramos analizar el acoplamiento múltiple con SDF-1/CXCR4, pero con frecuencia encontramos un acoplamiento preferencial sobre Gi en diferentes modelos celulares y, contrastando en la Figura 67B, SDF-1 activó a P-Rex1 eficientemente mientras LPA activó ligeramente al GEF, pero la activación de ERK fue intensa, sugiriendo otro acoplamiento que incluso pudiera estar modulando negativamente la activación del GEF, pero señalizando eficientemente hacia ERK.

Hipóticamente, en la Figura 67A, los receptores a LPA podrían activar heterotrimeros como Gi para activar a P-Rex1 que ocurriría por una liberación del dímero  $G\beta\gamma$  que llevaría a la activación del RacGEF, pero también podría activar a Gq para llevar a la activación de ERK, de tal suerte que de manera intrínseca hay una competencia de las proteínas G activables por los GPCRs para LPA y, con base en los resultados previos, las subunidades  $G\alpha_q$  modulan negativamente a  $G\beta\gamma$  impidiendo su señalización sobre sus efectores como P-Rex1 y posiblemente también a los dímeros  $G\beta\gamma$  provenientes de Gi. En la Figura 67B mostramos que la activación de ERK inducida por LPA se previene si las células son preincubadas con el inhibidor de Gq (FR, panel superior) o bien, con el inhibidor de PKC (panel inferior), en ambas situaciones observamos la inhibición de la activación de ERK inducida por LPA durante 5 y 15 minutos, con mejor eficiencia la inhibición de Gq. Por lo tanto, se

demostró que la **activación de ERK por LPA/LPAR es a través de la vía Gq/PKC** y se confirmó cuando observamos que la activación de ERK no fue sensible al tratamiento con toxina pertussis (Figura 67C panel inferior), confirmando que la activación de ERK inducida por LPA en este modelo celular no es vía proteínas Gi. Sin embargo, al evaluar la activación de P-Rex1 inducida por LPA, observamos que la activación de este Rac-GEF dependiente de Gβγ se previene con el tratamiento de toxina pertussis, es decir que P-Rex1 fue activado por Gβγ liberada de Gi, este heterotrímero sería la responsable de llevar a la activación de P-Rex1 inducida por LPA (Figura 67B panel superior); de estos resultados concluimos que **la vía de LPA/LPAR activa a P-Rex1 a través de Gi→Gβγ, mientras que la activación de ERK es vía Gq/PKC**.



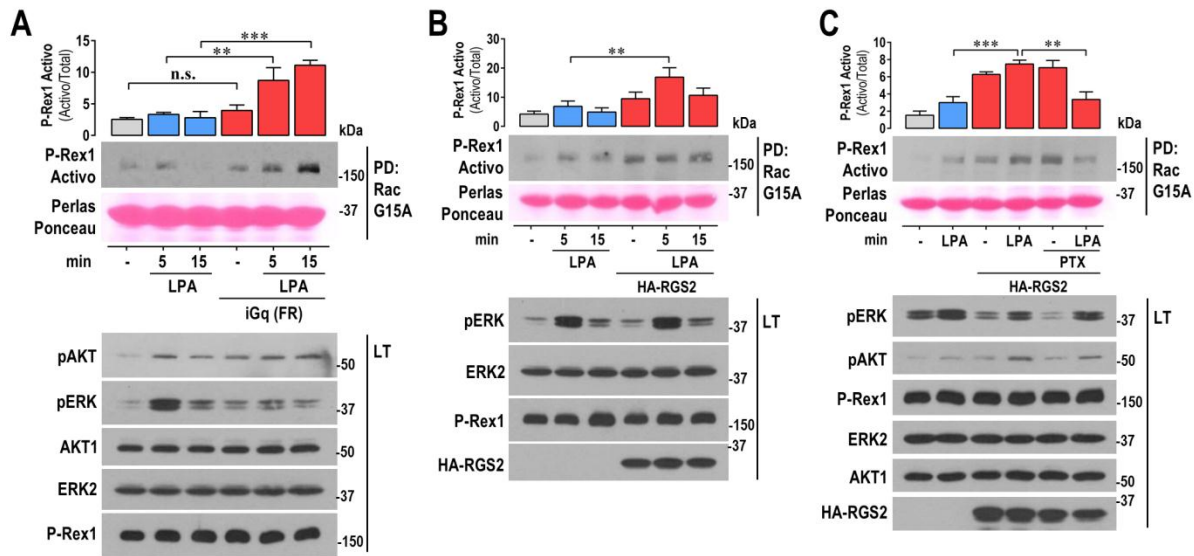
**Figura 67.** Los receptores a LPA con acoplamiento múltiple llevan a la activación de ERK vía Gq, mientras que la activación de P-Rex1 es vía Gi. **A)** Modelo que representa la activación de Gq y de Gi por el receptor a LPA, hipotetizamos que ERK sería activado principalmente vía Gq/PKC, mientras que la activación de P-Rex1 sería dependiente

de G $\beta\gamma$  proveniente del heterotrímero de Gi, esto podría ser evidenciado al inhibir a Gq a PKC y a Gi. **B)** La activación de ERK inducida por LPA se previene al inhibir Gq y PKC. Células MCF7 fueron ayunadas durante 24 horas e incubadas por 2 horas con el inhibidor de Gq (FR900359), o bien con el de PKC (Sotrastaurin), y estimuladas con LPA 5  $\mu$ M durante 5 o 15 minutos. **C)** La activación de P-Rex1 es sensible a la inhibición de Gi, pero la activación de ERK no se alteró. Células MCF7 fueron ayunadas durante 24 horas e incubadas toda la noche con toxina pertussis (100 ng/mL) y estimuladas con LPA 5  $\mu$ M durante 5 o 15 minutos.

Con la evidencia del acoplamiento múltiple de los receptores LPA en nuestro sistema, decidimos poner a prueba nuestra idea de que P-Rex1 dependiente de G $\beta\gamma$  libera de Gi, es regulado negativamente por otros heterotrímeros como Gq, de esta manera, un receptor capaz de activar a ambas proteínas G, al inhibir a Gq potenciaríamos la activación de P-Rex1 inducida por Gi, es decir, mimetizaríamos la señal de un receptor acoplado principalmente o exclusivamente a Gi, como observamos para el receptor CXCR4 con una activación eficiente de P-Rex1. En la Figura 68A mostramos los resultados de la activación de P-Rex1 inducida por LPA, cuando las células son tratadas previamente con el inhibidor farmacológico de Gq (FR900359), observamos resultados muy claros donde las **células tratadas con el inhibidor de Gq FR900359, no muestran activación de ERK inducida por LPA, mientras que la activación de P-Rex1 es potenciada** significativamente.

Después decidimos probar condiciones experimentales similares, pero promoviendo la inhibición de Gq por otro mecanismo, mediante la transfección transitoria de RGS2 (Figura 68B), esta proteína reguladora inhibirá a las subunidades G $\alpha_q$ -GTP promoviendo la hidrólisis a GDP y la formación de heterotrímeros inactivos de Gq. Previo al ensayo de captura de P-Rex1, las células transfectadas con RGS2 fueron seleccionadas con G418 para obtener el resultado más limpio posible en términos de la eficiencia de las células transfectadas. Las células ayunadas fueron estimuladas con LPA durante 5 y 15 minutos; los lisados celulares fueron sometidos a pulldown con Rac-G15A para atrapar a los GEFs activos. Encontramos **mayor cantidad de P-Rex1 activo en las células con la sobreexpresión de RGS2**, incluso la activación inducida por LPA fue modesta como consecuencia de umbrales máximos de activación del GEF. Finalmente, en la Figura 68C evaluamos si este incremento de la activación de P-Rex1 inducido por RGS + LPA era sensible a la inhibición de Gi por toxina pertussis. Nuevamente transfectamos células con RGS2 y fueron seleccionadas con G418, ayunadas 24 horas y tratadas con PTX durante 12 horas antes de estimular y lisar. Encontramos que la activación de P-Rex1 inducida por LPA en células que sobreexpresaban RGS2, se vio abatida al inhibir los heterotrímeros de Gi por toxina pertussis, fortaleciendo la afirmación de que P-Rex1 es

activado por G $\beta\gamma$  proveniente de Gi y que otras subunidades como G $\alpha_q$  puede regular negativamente la señal de G $\beta\gamma$  sobre su efector quimiotáctico P-Rex1.



**Figura 68. Los receptores para LPA acoplados a Gq/Gi incrementan la activación de P-Rex1 cuando se inhibe a G $\alpha_q$  farmacológicamente o por RGS2. A)** P-Rex1 es activado de manera eficiente, cuando las células son tratadas con inhibidor de Gq. Las células MCF7 fueron ayunadas durante 24 horas e incubadas con el inhibidor Gq (FR900359 250 nM) durante 2 horas antes de estimular con LPA (5  $\mu$ M). Los datos representan la media  $\pm$  EE de 3 experimentos independientes, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001, n.s. no significativo; ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Tukey. **B)** La sobreexpresión de RGS2, un regulador negativo de G $\alpha_q$ , incrementa la activación de P-Rex1 inducida por LPA. Las células MCF7 fueron transfectadas con EGFP o con HA-RGS2 y seleccionadas durante 4 días con G418 (500  $\mu$ g/mL), finalmente se ayunaron durante 24 horas y fueron estimuladas con LPA (5  $\mu$ M) durante 5 y 15 min antes de lisar. Los datos representan la media  $\pm$  EE de 3 experimentos independientes, \*\* $p$ <0.01, ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Tukey. **C)** El incremento de la activación de P-Rex1 por LPA cuando RGS2 esta sobreexpresado, se previene con la inhibición Gi. Celulas MCF7 transfectadas con RGS2 y seleccionadas, fueron ayunadas y pretratadas con PTX (100 ng/mL) y posteriormente estimuladas con LPA (5  $\mu$ M) para realizar captura de P-Rex1 activo. Los datos representan la media  $\pm$  EE de 3 experimentos independientes, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001; ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Tukey. *Panel C obtenido con repeticiones de Irving García-Jiménez.*

## 11. Discusión

En este trabajo doctoral, utilizando ratones inmunocompetentes y un modelo singénico de células de cáncer de pulmón, demostramos la existencia de una clara comunicación entre células tumorales y células derivadas de la médula ósea Tie2+ a favor del crecimiento tumoral, sugiriendo un atractivo escenario terapéutico donde se pretende explorar los eventos moleculares que subyacen al proceso y contrarrestar dicha comunicación, particularmente con fines de evitar la migración celular pro-tumoral. En este sentido, nuestras evidencias se profundizaron a lo largo del trabajo para entender a nivel molecular los mecanismos que controlan la migración celular dependiente de receptores acoplados a proteínas Gi mediante la señalización de Gβγ, como una proteína clave en la polarización y migración celular inducida por GPCRs, vía la activación de efectores quimiotácticos, como el RacGEF P-Rex1<sup>4</sup>. Postulamos que los RhoGEFs multidominio, tales como P-Rex1 y RGS RhoGEFs que activan a Rho GTPasas en las vías de señalización de receptores acoplados a proteínas G, juegan un papel fundamental en la migración de BMDCs. Por lo tanto, consideramos que los RhoGEFs sirven como nodos de integración que además contribuyen a la reciprocidad en la regulación entre BMDCs y células tumorales, coordinando las cascadas de transducción de señales que llevan a la activación de GTPasas y a la secreción de factores indispensables para mantener la comunicación entre poblaciones celulares del estroma tumoral y las mismas células tumorales.

### 11.1 Los RhoGEFs como proteínas multidominio indispensables para la migración celular

Considerando la importancia señalada para el sistema SDF-1/CXCR4 en el establecimiento y la movilización de células de la médula ósea, proponemos que el GEF P-Rex1 es un efector de este sistema en BMDCs que contribuye a la respuesta de estas células al ser atraídas hacia el estroma tumoral. Se sabe que P-Rex1 es un efector directo del heterodímero Gβγ de las proteínas G y que responde al segundo mensajero PIP<sub>3</sub><sup>106</sup>, a factores de crecimiento<sup>135,140-142</sup> y, de acuerdo con nuestros estudios, P-Rex1 es activado directamente por el complejo 2 de mTOR (mTORC2) para llevar a la activación de Rac1 y la migración celular<sup>111</sup>. En este contexto, es interesante que la vía de SDF-1/CXCR4 dispare la activación de la PI3K y promueva la migración de células de la médula ósea; además de que, en células endoteliales, la esfingosina-1-fosfato estimula procesos angiogénicos y migración celular vía Gβγ y PI3Kγ. También se ha caracterizado que P-Rex1 puede interactuar con



carboxilos de GPCRs, por ejemplo, el receptor de esfingosina (S1P1) a través de los dominios PDZ-PDZ <sup>55</sup>, sugiriendo que esta interacción puede contribuir a la localización polarizada del GEF y probablemente a su actividad, según nuestros datos apoyan la idea de que las interacciones en los dominios PDZ-PDZ promueven la activación del GEF.

Las evidencias que indican la participación de receptores acoplados a proteínas G en la migración de BMDCs inducida por factores derivados de tumores, permiten postular el papel central que juegan las GTPasas de la familia de Rho, ejemplificadas por las acciones de RhoA, Rac1 y Cdc42, destacando también un papel emergente de RhoJ en cáncer <sup>98</sup>, dadas sus funciones reconocidas como reguladoras de la dinámica del citoesqueleto durante la migración celular. Puesto que las GTPasas de la familia de Rho son switches moleculares encendidos por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (RhoGEFs), estas proteínas multidominio son reguladores obligados de los eventos dinámicos al nivel de citoesqueleto que ocurren durante una respuesta quimiotáctica. Ellos integran las cascadas de señalización generadas por receptores membranales que conducen a la activación de una o varias GTPasas para coordinar de forma localizada y temporalmente controlada, la polimerización de filamentos de actina y el ensamble de complejos contráctiles necesarios para que las células se muevan.

En el laboratorio se demostró que P-Rex1, RGS-RhoGEFs, ARHGEF17, ITSN1 y algunos otros RhoGEFs se expresan en células endoteliales tumorales <sup>99</sup>. Algunos de estos GEFs, como P-Rex1 y su más cercano homólogo P-Rex2, son directamente implicados en cáncer como consecuencia de la sobreexpresión o de mutaciones en células transformadas de mama <sup>141</sup>, próstata <sup>143</sup> y melanoma <sup>144</sup>. Un mecanismo alternativo está basado en la interacción entre P-Rex2 y la fosfatasa PTEN que es inhibida; como consecuencia se previene la destrucción del segundo mensajero PIP<sub>3</sub>, acumulándose y exacerbando las vías de señalización de proliferación y sobrevivencia hasta generar cáncer <sup>108</sup>. En cuanto a los RGS-RhoGEFs: p115-RhoGEF, PDZ-RhoGEF y LARG, su potencial implicación en cáncer se deriva de que son controlados directamente por Gα<sub>13</sub> y, en el caso de los dos últimos, también por Plexinas <sup>145,146</sup>. La subunidad Gα<sub>13</sub> ha demostrado una capacidad transformante que depende de las vías de Rho. En cuanto a su papel en el estroma tumoral y en la médula ósea como un elemento promotor del proceso canceroso, se ha demostrado que ratones reconstituidos con una médula ósea en la que Gα<sub>13</sub> está deficiente, debido a recombinación homóloga de uno de sus alelos, se previene el desarrollo de tumores ya que la formación de la vasculatura tumoral disminuyó <sup>147</sup>. En



este contexto, es interesante destacar que  $G\alpha_{13}$  activa vías de transducción que promueven la expresión de receptores para VEGF <sup>148</sup>, en tanto que  $G\alpha_q$ , otra GTPasa del grupo de proteínas G heterotriméricas, participa en la señalización de este factor de crecimiento <sup>149</sup>. Cabe destacar que  $G\alpha_{13}$  y sus efectores han sido implicados en angiogénesis embrionaria. Estos antecedentes son compatibles con la hipótesis de que los RhoGEFs efectores de las proteínas G heterotriméricas como Gq y G13, favorecen en la contribución de la médula ósea al desarrollo de tumores, participando en su respuesta a factores derivados de tumores y ensamblando complejos que incrementan las propiedades secretoras de estas células. Esta comunicación favorecería al estroma tumoral, una vez que las células derivadas de la médula ósea se hayan establecido en el ámbito del tumor y en los sitios de metástasis. Estas posibilidades no han sido directamente evaluadas y son motivo central de nuestros estudios.

## 11.2 Efecto pro-tumoral y anti-tumoral de células de la médula ósea

Los efectos de las células de la médula ósea en el crecimiento de tumores fueron interesantes ya que encontramos condiciones para promover o combatir el crecimiento tumoral. Una población de células de la médula ósea cultivadas en un medio favorable para células endoteliales mostró un efecto pro-tumoral, posiblemente por propiedades pro-angiogénicas. Bajo nuestras condiciones, observamos el enriquecimiento de poblaciones leucocitarias CD45+/CD11b+/Tie2+ que previamente han sido mencionadas como células pro-angiogénicas de tumores <sup>5,117</sup>. En contraste, células frescas de la médula ósea, co-inoculadas con células tumorales, disminuyeron el crecimiento de los tumores, un hallazgo particularmente interesante. Esto sugiere que existen células con la capacidad de generar una respuesta inmunológica contra el tumor y que, por otro lado, una subpoblación de células de la médula ósea requiere entrenamiento a distancia, por parte del tumor, mediante sustancias que secretan las células tumorales que deben promover el cambio fenotípico para que éstas puedan trasladarse y favorecer el crecimiento de los tumores. Un concepto similar fue descrito en el caso de células progenitoras endoteliales que son educadas con exosomas tumorales que contienen el receptor MET para HGF. En ese caso, la fusión de los exosomas en la superficie de las EPC les proporciona la capacidad de responder a HGF, un potente factor quimiotáctico que promueve la migración hasta el tumor <sup>150</sup>.

Por su expresión en células protumorales derivadas de la médula ósea, diversos RhoGEFs resultaron interesantes. Particularmente validamos la expresión de varios de ellos, los cuales, en otros

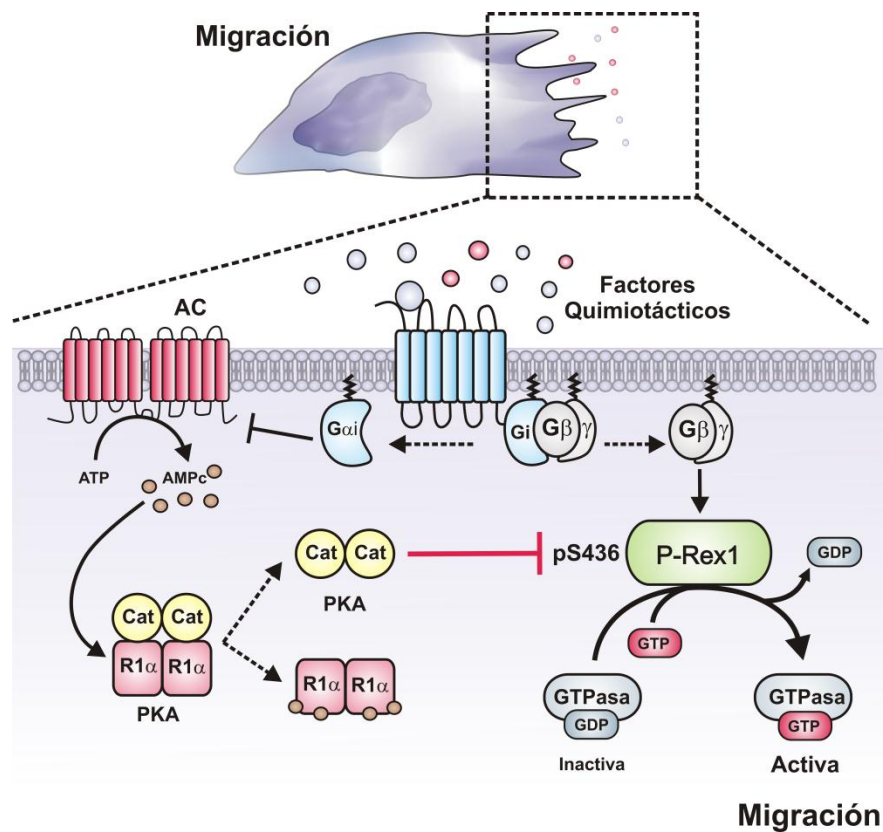
sistemas celulares, se ha confirmado su regulación por GPCRs. Como se sabe que diferentes quimiocinas pueden atraer a células protumorales; sus receptores y proteínas de transducción, particularmente los RhoGEFs, resaltan como sujetos interesantes para estudiar y diseñar estrategias para su uso como blancos terapéuticos. Por lo anterior, la demostración de que algunos de ellos se expresan enriquecidos en células protumorales abre oportunidades para su caracterización en proyectos futuros. Dado el papel de  $G_i$  en la migración de las células protumorales, en este trabajo profundizamos en P-Rex1 del cual se obtuvieron resultados relevantes en el estudio de las bases moleculares que subyacen a los tumores.

La migración celular dependiente de GPCRs ocurre principalmente por la activación de proteínas  $G_i$ , éstas promueven la señalización de  $G\beta\gamma$  de manera adecuada. P-Rex1, activado por  $G\beta\gamma$ , es regulado de diversas maneras. Aquí demostramos que únicamente el heterodímero liberado desde proteínas  $G_i$  es capaz de activar a P-Rex1 satisfactoriamente. Descubrimos que esto se debe a propiedades estructurales de las otras subunidades  $G\alpha$  relacionadas con su interacción con  $G\beta\gamma$ . Nuestros datos son compatibles con un modelo en el que el heterodímero  $G\beta\gamma$  es liberado totalmente (de  $G_i$ ) para interactuar y activar a sus efectores, como P-Rex1, llevando a la activación de Rac. En contraste, otros heterotrímeros como Gq y G13, pueden activarse en respuesta a la unión ligando receptor; sin embargo, la señalización de  $G\beta\gamma$  en esos casos es tenue o nula como consecuencia de que se mantienen interacciones parciales con las subunidades  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{13}$ , impidiendo la exposición completa de la cara efectora de  $G\beta\gamma$  que reconoce a P-Rex1. Así pues, sumado a los mecanismos ya descritos, nuestros hallazgos en la regulación de la interacción de  $G\beta\gamma$  sobre P-Rex1, contribuyen a explicar porque los receptores de quimiocinas comúnmente tienen un efecto quimiotáctico dependiente de la activación de  $G_i$ . En concreto, nuestro modelo establece que las subunidades  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{13}$  activas conservan afinidad por el heterodímero  $G\beta\gamma$  evitando que pueda señalizar de manera adecuada sobre sus efectores quimiotácticos como P-Rex1, y probablemente PI3K.

### 11.3 Mecanismos de regulación de P-Rex1 por receptores acoplados a $G_i$ : contribución de $G\beta\gamma$ y de $G\alpha_i$

Los GPCRs acoplados a  $G_i$  pueden llevar a la activación de P-Rex1 de manera eficiente mediante el efecto de  $G\beta\gamma$ , pero también podría contribuir  $G\alpha_i$ . En un sistema quimiogénico, estimulando a GPCRs con acoplamiento específico y que responden a ligandos sintéticos (DREADD), encontramos que  $G_i$  activa a P-Rex1 mientras que Gq no activa. Como se muestra en la Figura 69, la

subunidad  $G\alpha_i$  inhibe al adenilato ciclasa (tipo I, V y VI), evitando la producción de AMPc a partir de ATP. Como consecuencia de la disminución de este segundo mensajero, la PKA se mantiene inactiva sin poder fosforilar a P-Rex1 en la Ser436, lo que previene la formación de interacciones intramoleculares inhibitorias en P-Rex1 que previamente reportamos <sup>121</sup>. Por lo tanto, el efecto de la subunidad  $G\alpha_i$  sería contribuir al impacto positivo de la señalización sobre P-Rex1 controlada por  $G\beta\gamma$ .



**Figura 69. Modelo que representa la activación de P-Rex1 dependiente de un receptor acoplado a Gi.** Al activar la proteína  $G_i$  de manera polarizada, el dímico  $G\beta\gamma$  es liberado e interacciona de manera directa con P-Rex1 para llevar a la activación del GEF. Por otro lado, la subunidad  $G\alpha_i$  puede contribuir en la migración celular al mantener el estado activo de P-Rex1, con nuestros resultados y por un mecanismo de inhibición inducida por fosforilación (dependiente de PKA) que fue descrito previamente <sup>121</sup>, podemos sugerir este mecanismo de activación de P-Rex1 mediado por proteínas  $G_i$ .

Mientras que la fosforilación por la PKA en la Ser436 del dominio DEP1 de P-Rex1 puede favorecer las interacciones intramoleculares para adquirir una conformación auto-inhibida <sup>121</sup>; por otra parte, la subunidad reguladora de la PKA (PRKAR1 $\alpha$  / R1 $\alpha$ ) interacciona con los dominios PDZ de P-Rex1, uno de los sitios en los cuales encontramos que el activador  $G\beta\gamma$  interacciona. Estos hallazgos nos llevan a postular que probablemente la interacción de la subunidad R1 $\alpha$  de la PKA, o bien  $G\beta\gamma$ ,

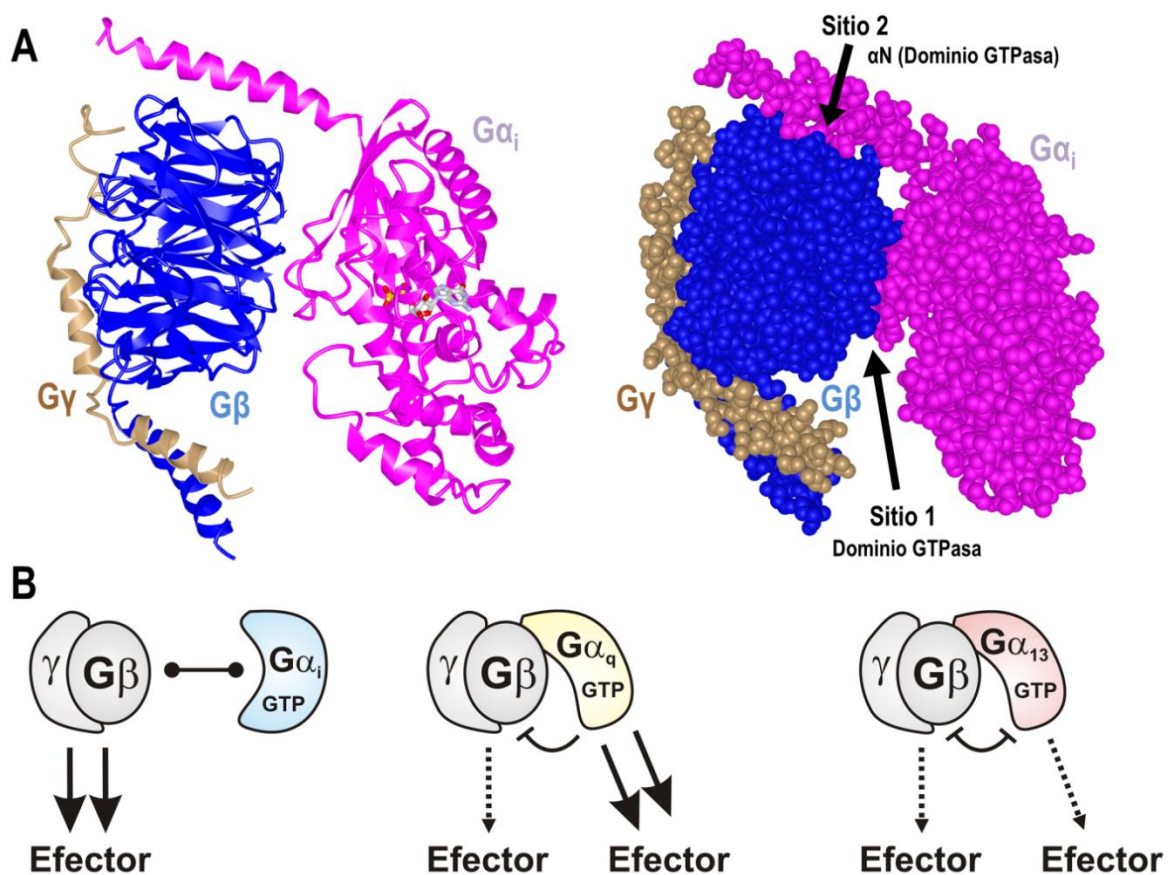
llevan al rompimiento de interacciones auto-inhedoras dentro de la estructura de P-Rex1 que resultan en el desdoblamiento para exponer el dominio catalítico y activar a Rac; a la fecha, en nuestro laboratorio se está demostrando **la activación de P-Rex1 inducida por la interacción directa de la subunidad R1 $\alpha$  de manera dependiente de AMPc y del receptor EP<sub>2</sub> acoplado a G<sub>s</sub>** (datos en proceso de publicación, Adame-García y cols., 2018). Además, una forma truncada de esta subunidad R1 $\alpha$  denominada Acrodysostosis (involucrada en un desorden congénito, una displasia de hueso <sup>151</sup>), también se encuentra en estudio, nuestros datos demuestran que **la mutante Acro interacciona con P-Rex1 (en dominios PDZ-PDZ) varias veces más que la forma silvestre, activando a P-Rex1 de manera independiente de AMPc** (datos en proceso de publicación, Adame-García y cols., 2018). Esta información fortalece nuestra hipótesis de la contribución de los dominios PDZ-PDZ en la activación de P-Rex1 y abre nuevas posibilidades como la máxima activación de P-Rex1 por R1 $\alpha$  unida en los dominios PDZs y G $\beta\gamma$  en el dominio DH simultáneamente.

#### 11.4 La interacción del extremo amino de G $\alpha_q$ - y G $\alpha_{13}$ -QL con G $\beta\gamma$ : regulación negativa sobre los efectores quimiotácticos de G $\beta\gamma$

Los hallazgos de este trabajo son importantes en la transducción de señales, el mantenimiento de la interacción de las subunidades como G $\alpha_q$ QL y G $\alpha_{13}$ QL abren el panorama a las características intrínsecas de cada subunidad G $\alpha$ , el extremo amino ( $\alpha$ N) que incluye una interfase de interacción es responsable de mantener unidas las subunidades mutantes QL, incluso para G $\alpha_q$ QL, formar complejos con proteínas RGS que con fines experimentales se probó para evaluar la posibilidad de que la cara efectora de G $\alpha_q$  señalada en la Figura 70 como el sitio 1, estaría expuesta para interactuar con sus efectores mientras mantiene unida a G $\beta\gamma$  en el sitio 2, inhibiendo su señalización. Esto sugiere que las regiones  $\alpha$ N de G $\alpha_q$  y G $\alpha_{13}$  podrían funcionar como inhibidores de la señalización G $\beta\gamma$  sobre P-Rex1, AKT y la migración celular inducida por receptores acoplados a G<sub>i</sub>; pero es necesario profundizar si la inhibición se debe al impedimento estérico para que accedan sus efectores, o bien, porque estas regiones  $\alpha$ N cubren directamente una cara efectora de G $\beta\gamma$ . Vale la pena profundizar en estos aspectos moleculares como se observó previamente con la proteína similar a fosducina, fragmentos de fosducina inhiben diferencialmente la señalización G $\beta\gamma$  sobre AKT y ERK, incluso la migración celular, al cubrir diferentes caras efectoras de G $\beta\gamma$  <sup>152</sup>.

En términos de la sensibilidad de P-Rex1 a las diferentes subunidades de G $\beta\gamma$ , nuestros hallazgos se limitaron a analizar el dímero G $\beta_1\gamma_2$ , uno de los activadores eficientes de P-Rex1. Las

combinaciones de las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$ , han mostrado efectividad diferencial para llevar a la activación P-Rex1<sup>153</sup>, por ejemplo, los dímeros  $G\beta_1\gamma_2$ ,  $G\beta_2\gamma_2$ ,  $G\beta_3\gamma_2$ , activan o interaccionan muy bien con P-Rex1. También la subunidad  $G\gamma$  influye en la efectividad del dímero sobre P-Rex1:  $G\beta_1\gamma_3$ ,  $G\beta_1\gamma_7$ ,  $G\beta_1\gamma_{12}$  activan; mientras que los dímeros  $G\beta_1\gamma_{13HA}$ ,  $G\beta_1\gamma_3$ ,  $G\beta_1\gamma_{10}$  y  $G\beta_1\gamma_1$ , no interaccionan ni activan a P-Rex1; tampoco los dímeros como  $G\beta_4\gamma_2$  y  $G\beta_5\gamma_2$ . En este contexto de la diversidad de dímeros  $G\beta\gamma$ , será interesante averiguar su homología en las interfases de interacción y su regulación por las subunidades  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{13}$ , hipotéticamente podríamos encontrar diferencias en su capacidad de interacción con las subunidades  $G\alpha_{QL}$  y en correlación con su efecto diferencial sobre P-Rex1.



**Figura 70. Estructura de  $G_i$ , sitios de interacción entre  $G\beta\gamma$  y  $G\alpha_i$ .** **A)** Estructura de  $G_i$ , tiene dos interfases de interacción entre  $G\alpha_i$  y  $G\beta\gamma$ , nuestros resultados sugieren que las mutantes  $G\alpha_qQL$  y  $G\alpha_{13}QL$  mantienen interacción con  $G\beta\gamma$  a través del sitio 2 señalado en la estructura izquierda ( $\alpha N$ ). **B)** Con base en las posibles interacciones de los extremos amino ( $\alpha N$ ) de  $G\alpha_{13}QL$  y  $G\alpha_qQL$  con el dímero  $G\beta\gamma$ , y los resultados obtenidos en la dinámica de las interacciones con proteínas reguladoras de las subunidades  $G\alpha$ , se postula la señalización eficiente de  $G\beta\gamma$  si se libera de  $G\alpha_i$ . Por su parte,  $G_q$  y  $G_{13}$  mantienen interacción con  $G\beta\gamma$  e inhibiendo su señalización, incluso  $G_q$  podría interaccionar simultáneamente con sus efectores; mientras que  $G_{13}$  parece requerir a sus efectores para liberar a  $G\beta\gamma$ .

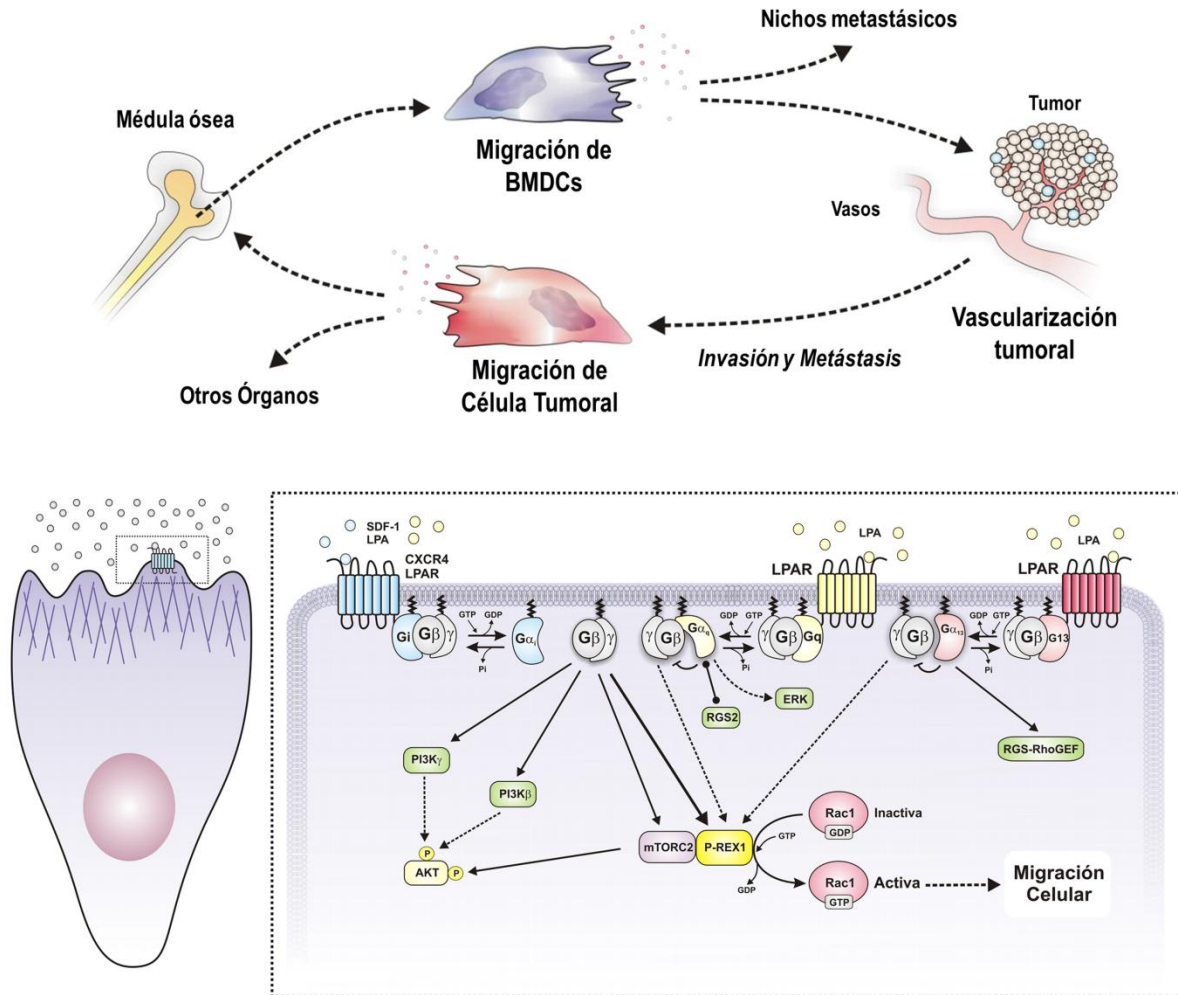
De acuerdo con nuestros resultados, es posible que los aminoácidos de  $G\beta$  que intervienen en la interfase de interacción con la región amino de  $G\alpha$  (particularmente  $G\alpha_{q11}$  y  $G\alpha_{13}$ ), son fundamentales para mantener un control estricto de la actividad de este heterodímero, en este caso, de forma particular por las subunidades  $G\alpha$  señaladas. Se esperaría que mutaciones que rompan la interacción pudieran generar versiones activas de  $G\beta\gamma$ . Esta hipótesis es compatible con los datos presentados por Yoda y colaboradores en 2015, quienes demostraron que mutaciones en  $G\beta$ , particularmente en los aminoácidos que participan en la interfase de interacción con  $G\alpha$ , promueven la transformación maligna y resistencia farmacológica a inhibidores de cinasas <sup>81</sup>. Las mutaciones de  $G\beta\gamma$  que se encuentran en el sitio 2 de interacción representada en la Figura 70A, justo coinciden con la interfase de interacción que postulamos como responsable de mantener los complejos  $G\beta\gamma/G\alpha_{qL}/RGS2$ . En un futuro cercano pretendemos investigar la hipótesis de que las mutantes de  $G\beta\gamma$  activen de forma exacerbada a efectores quimiotácticos como P-Rex1 y PI3K, considerados efectores oncogénicos; pero también determinar si pueden ser reguladas por GPCRs, inhibidores naturales y farmacológicos.

### 11.5 Modelo que integra los mecanismos de señalización quimiotáctica por $G\beta\gamma$ derivada de $G_i$ , pero no de otros heterotrimeros como $G_q$ y $G_{13}$

Nuestro modelo final representa que la migración celular inducida por GPCRs activados por factores liberados desde tumores, por ejemplo, pueden llevar a la dinámica de proteínas G que promuevan una señalización eficiente de  $G\beta\gamma$  para que este dímero estimule directamente a efectores quimiotácticos como PI3K y P-Rex1. En este proceso, la liberación de  $G\beta\gamma$  es esencial y efectiva cuando proviene de  $G_i$ . Sin embargo, otros heterotrimeros muestran una regulación negativa sobre  $G\beta\gamma$  que previene su efecto positivo sobre P-Rex1. En contraste con el modelo clásico, la acción de receptores acoplados a proteínas G sugiere que cualquier heterotrímero llevaría a la liberación de  $G\beta\gamma$  y en consecuencia a su señalización, aquí nosotros demostramos que formas activas de  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{13}$  se mantienen asociadas e inhibiendo a  $G\beta\gamma$ . Específicamente, demostramos que de las dos regiones de interacción que existen entre  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$ , la región que corresponde a la hélice amino terminal de  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{13}$  continúa establemente asociada a  $G\beta\gamma$ , aún cuando tales subunidades  $G\alpha$  sean mutantes constitutivamente activas. Este suceso estaría reduciendo la disponibilidad de  $G\beta\gamma$  y por lo tanto sus acciones sobre efectores quimiotácticos como P-Rex1, explicando por qué los GPCRs de quimiocinas



son naturalmente acoplados a  $G_i$ , e incluso para el caso de GPCRs con acoplamiento múltiple, la migración quimiotáctica es mediada por  $G_i \rightarrow G\beta\gamma$  y no por otros heterotrimeros.



**Figura 71. Modelo final.** Esquema que representa la migración celular de células derivadas de la médula ósea y células tumorales en respuesta a la activación de GPCRs. Particularmente, los receptores acoplados a  $G_i$  son eficientes para llevar a la migración. El panel inferior explica la vía de activación diferencial de P-Rex1 por  $G_i$ , y no por  $G_q$  o  $G_{13}$ . Las subunidades  $G_{\alpha_q}$  y  $G_{\alpha_{13}}$  tienen efectos directos sobre  $G\beta\gamma$  que controlan su disponibilidad como un mediador crucial para la activación de efectores quimiotácticos.





## 12. Conclusiones

- Obtuvimos un cultivo de médula ósea enriquecido de células Tie2+/CD11b+/CD45+ cuyas células contribuyen al crecimiento de tumores en ratones inmuno-competentes, un nuevo modelo de co-inoculación para evaluar la contribución de células de la médula ósea en cáncer.
- Existe una comunicación recíproca entre células derivadas de la médula ósea (BMDCs) y células tumorales. Esta comunicación promueve la migración celular, parcialmente dependiente de GPCRs acoplados a  $G_i$  y de las funciones de  $G\beta\gamma$ , presumiblemente vía PI3K y RhoGEFs.
- El perfil de expresión de RhoGEFs en células de la médula ósea es abundante, los RhoGEFs FARP1, FGD6, FGD2, FGD4, ARHGEF17, PDZ-RhoGEF y Trio son particularmente interesantes considerando las diferencias de expresión entre células cultivadas que favorecen el desarrollo tumoral y células frescas que lo restringen. A nivel de proteína, encontramos expresión alta de RhoGEFs regulados por GPCRs: P-Rex1, PDZ-RhoGEF y LARG en las células pro-tumorales. Además, expresan la GTPasa RhoJ (vinculada a angiogénesis tumoral).
- Los factores secretados por las células tumorales activan a las GTPasas Rac, Cdc42 y Rho; y a los RhoGEFs P-Rex1 y PDZ-RhoGEF en las células derivadas de la médula ósea.
- La migración celular dependiente de GPCRs (como CXCR4 y LPAR), requiere la vía de señalización de  $G_i \rightarrow G\beta\gamma$  sobre sus efectores quimiotácticos como P-Rex1.
- Al activarse la proteína  $G_i$  libera a  $G\beta\gamma$  de manera eficiente para interactuar con sus efectores, en P-Rex1 interactuó con los dominios PDZ-PDZ y DH-PH para activar su función de RacGEF, sugiere que  $G\beta\gamma$  rompe interacciones inhibitoras intermoleculares en P-Rex1.
- Encontramos que las subunidades  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_{13}$  activas mantienen interacciones estables con  $G\beta\gamma$  (evidenciado por mutantes  $G\alpha$ -QL), a través de la  $\alpha$ -hélice del extremo amino ( $\alpha$ N), evitando que  $G\beta\gamma$  interactúe y active efectores como P-Rex1 durante la migración celular.
- La migración celular inducida por GPCRs quimiotácticos, requiere la activación del eje  $G_i \rightarrow G\beta\gamma$ /P-Rex1/Rac para la polarización de las células, mientras que  $G_q$  no libera a  $G\beta\gamma$ .
- La inhibición de  $G_q$  durante la activación de GPCRs acoplados a múltiples proteínas G (como los receptores a LPA), resalta la señalización de  $G_i \rightarrow G\beta\gamma$  para llevar a la activación de P-Rex1.



## 13. Perspectivas Experimentales

- De estos resultados planteamos utilizar las células de médula ósea fresca sin células Tie2-GFP para mezclarlas con células cultivadas (BMDC) y reconstituir ratones irradiados para evaluar su contribución en modelos tumorales, utilizando el irradiador adquirido (Faxitron MultiRad 350).
- Silenciar (knockdown) o deletar (CRISPR/CAS) a los RhoGEFs regulados por GPCRs como P-Rex1, PDZ-RhoGEF, LARG, entre otros, en las células derivadas de la médula ósea y averiguar si bajo estas condiciones se abate su efecto protumoral en ratones con trasplante de médula ósea modificada.
- Evaluar las posibles propiedades pro-tumorales de células derivadas de la médula ósea modificadas para que expresen formas activas de los RhoGEFs (módulos DH-PH anclados a la membrana plasmática).
- Continuar la caracterización de la señalización quimiotáctica de Gβγ inducida por receptores con acoplamiento a múltiples familias de proteínas G, inhibiendo heterotrimeros diferentes a Gi y Gq.
- Investigar el mecanismo de activación de P-Rex1 por Gβγ/PI3K/AKT y por mTOR, evaluando el rompimiento de interacciones auto-inhedoras y la posible homodimerización inter-inhedoras. Además, pretendemos aclarar la totalidad del mecanismo de activación de P-Rex1 por interacción de proteínas con los dominios PDZ-PDZ, por ejemplo, Gβγ, R1α y carboxilos de GPCRs
- Analizar la regulación bidireccional entre las subunidades Gα y Gβγ por las interfases de interacción y la influencia de los efectores tanto de Gα, como de Gβγ en la dinámica de las interacciones; esto para demostrar la liberación total de Gβγ dependiente de efectores de Gα.
- Probar dímeros diferentes a Gβ<sub>1</sub>γ<sub>2</sub> y su interacción con las subunidades Gα mutantes QL evaluadas y otras, considerando que tienen diferentes afinidades por P-Rex1 y probablemente también con las subunidades Gα.
- Evaluar la señalización de Gβ mutantes sobre la activación de los efectores quimiotácticos como los diferentes RhoGEFs dependientes de Gβγ y PI3Kβ/γ, así como la sensibilidad de las mutantes a los inhibidores farmacológicos y péptidos inhibidores de las caras efectoras de Gβγ.



## 14. Referencias

1. Smith, R. A. *et al.* Cancer screening in the United States, 2015: a review of current American cancer society guidelines and current issues in cancer screening. *CA. Cancer J. Clin.* **65**, 30–54 (2017).
2. Torre, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* **65**, 87–108 (2015).
3. Weis, S. M. & Cheresh, D. A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat. Med.* **17**, 1359–70 (2011).
4. Vázquez-Prado, J., Bracho-Valdés, I., Cervantes-Villagrana, R. D. & Reyes-Cruz, G. Gβγ Pathways in Cell Polarity and Migration Linked to Oncogenic GPCR Signaling: Potential Relevance in Tumor Microenvironment. *Mol. Pharmacol.* **90**, 573–586 (2016).
5. De Palma, M. *et al.* Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* **8**, 211–26 (2005).
6. Asahara, T. *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964–7 (1997).
7. Bunt, S. K., Sinha, P., Clements, V. K., Leips, J. & Ostrand-Rosenberg, S. Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *J. Immunol.* **176**, 284–90 (2006).
8. Ostrand-Rosenberg, S. & Sinha, P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J. Immunol.* **182**, 4499–506 (2009).
9. De Sanctis, F., Bronte, V. & Ugel, S. Tumor-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Microbiol. Spectr.* **4**, (2016).
10. He, S. *et al.* GFRα1 released by nerves enhances cancer cell perineural invasion through GDNF-RET signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E2008-17 (2014).
11. Cavel, O. *et al.* Endoneurial Macrophages Induce Perineural Invasion of Pancreatic Cancer Cells by Secretion of GDNF and Activation of RET Tyrosine Kinase Receptor. *Cancer Res.* **72**, 5733–5743 (2012).
12. Zhang, L., Guo, L., Tao, M., Fu, W. & Xiu, D. Parasympathetic neurogenesis is strongly associated with tumor budding and correlates with an adverse prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Chin. J. Cancer Res.* **28**, 180–6 (2016).

13. Ziani, L., Chouaib, S. & Thiery, J. Alteration of the Antitumor Immune Response by Cancer-Associated Fibroblasts. *Front. Immunol.* **9**, 414 (2018).
14. Ohshio, Y. *et al.* Cancer-associated fibroblast-targeted strategy enhances antitumor immune responses in dendritic cell-based vaccine. *Cancer Sci.* **106**, 134–42 (2015).
15. Semenza, G. L. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *J. Cell. Biochem.* **102**, 840–7 (2007).
16. De Palma, M., Venneri, M. A., Roca, C. & Naldini, L. Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* **9**, 789–95 (2003).
17. Davidoff, A. M. *et al.* Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculature and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice. *Clin. Cancer Res.* **7**, 2870–9 (2001).
18. Duda, D. G. *et al.* Evidence for incorporation of bone marrow-derived endothelial cells into perfused blood vessels in tumors. *Blood* **107**, 2774–6 (2006).
19. Viillard, C. & Larrivée, B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis* **20**, 409–426 (2017).
20. Goel, S. *et al.* Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol. Rev.* **91**, 1071–121 (2011).
21. De Bock, K., Cauwenberghs, S. & Carmeliet, P. Vessel abnormalization: another hallmark of cancer? Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 73–9 (2011).
22. Ratajska, A. *et al.* Vasculogenesis and Its Cellular Therapeutic Applications. *Cells. Tissues. Organs* **203**, 141–152 (2017).
23. Caiado, F. & Dias, S. Endothelial progenitor cells and integrins: adhesive needs. *Fibrogenesis Tissue Repair* **5**, 4 (2012).
24. Lu, W. & Li, X. Vascular stem/progenitor cells: functions and signaling pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 859–869 (2018).
25. Li, B. *et al.* VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J.* **20**, 1495–7 (2006).
26. Mierzejewska, K. *et al.* Sphingosine-1-phosphate-mediated mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells during intravascular hemolysis requires attenuation of SDF-1-CXCR4



- retention signaling in bone marrow. *Biomed Res. Int.* **2013**, 814549 (2013).
27. Williams, D. A., Zheng, Y. & Cancelas, J. A. Rho GTPases and regulation of hematopoietic stem cell localization. *Methods Enzymol.* **439**, 365–93 (2008).
  28. Liekens, S., Schols, D. & Hatse, S. CXCL12-CXCR4 axis in angiogenesis, metastasis and stem cell mobilization. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 3903–20 (2010).
  29. Sekiguchi, H. *et al.* Improved culture-based isolation of differentiating endothelial progenitor cells from mouse bone marrow mononuclear cells. *PLoS One* **6**, e28639 (2011).
  30. Fremder, E. *et al.* Tumor-derived microparticles induce bone marrow-derived cell mobilization and tumor homing: a process regulated by osteopontin. *Int. J. cancer* **135**, 270–81 (2014).
  31. Debus, J. & Abdollahi, A. For the next trick: new discoveries in radiobiology applied to glioblastoma. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. book. Am. Soc. Clin. Oncol. Annu. Meet.* e95-9 (2014). doi:10.14694/EdBook\_AM.2014.34.e95
  32. Zoccoli, A. *et al.* Premetastatic niche: ready for new therapeutic interventions? *Expert Opin. Ther. Targets* **16 Suppl 2**, S119-29 (2012).
  33. Gao, D. *et al.* Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science* **319**, 195–8 (2008).
  34. Rafii, S. & Lyden, D. Cancer. A few to flip the angiogenic switch. *Science* **319**, 163–4 (2008).
  35. Frezzetti, D. *et al.* VEGF as a potential target in lung cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* **21**, 959–966 (2017).
  36. Veeravagu, A. *et al.* Vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor inhibitors as anti-angiogenic agents in cancer therapy. *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* **2**, 59–71 (2007).
  37. Shinkaruk, S., Bayle, M., Laín, G. & Déléris, G. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents* **3**, 95–117 (2003).
  38. Deng, L. *et al.* SDF-1 Blockade Enhances Anti-VEGF Therapy of Glioblastoma and Can Be Monitored by MRI. *Neoplasia* **19**, 1–7 (2017).
  39. Hirbe, A. C., Morgan, E. A. & Weilbaecher, K. N. The CXCR4/SDF-1 chemokine axis: a potential therapeutic target for bone metastases? *Curr. Pharm. Des.* **16**, 1284–90 (2010).
  40. Ceradini, D. J. *et al.* Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat. Med.* **10**, 858–64 (2004).

41. Mognetti, B., La Montagna, G., Perrelli, M. G., Pagliaro, P. & Penna, C. Bone marrow mesenchymal stem cells increase motility of prostate cancer cells via production of stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ . *J. Cell. Mol. Med.* **17**, 287–92 (2013).
42. Price, T. T. *et al.* Dormant breast cancer micrometastases reside in specific bone marrow niches that regulate their transit to and from bone. *Sci. Transl. Med.* **8**, 340ra73 (2016).
43. Petit, I., Jin, D. & Rafii, S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol.* **28**, 299–307 (2007).
44. Goffart, N. *et al.* CXCL12 mediates glioblastoma resistance to radiotherapy in the subventricular zone. *Neuro. Oncol.* **19**, 66–77 (2017).
45. Richardson, P. J. CXCR4 and Glioblastoma. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **16**, 59–74 (2016).
46. Kioi, M. *et al.* Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 694–705 (2010).
47. Hiraga, T. Hypoxic Microenvironment and Metastatic Bone Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
48. Kong, D.-H., Kim, Y. K., Kim, M. R., Jang, J. H. & Lee, S. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
49. Jin, H. *et al.* A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature. *J. Clin. Invest.* **116**, 652–62 (2006).
50. Arbab, A. S. Activation of alternative pathways of angiogenesis and involvement of stem cells following anti-angiogenesis treatment in glioma. *Histol. Histopathol.* **27**, 549–57 (2012).
51. Huang, H. *et al.* Specifically targeting angiopoietin-2 inhibits angiogenesis, Tie2-expressing monocyte infiltration, and tumor growth. *Clin. Cancer Res.* **17**, 1001–11 (2011).
52. Castro, B. A. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor downregulation: a novel mechanism of resistance to anti-angiogenic therapy. *Oncogene* **36**, 3749–3759 (2017).
53. Srivastava, K. *et al.* Postsurgical adjuvant tumor therapy by combining anti-angiopoietin-2 and metronomic chemotherapy limits metastatic growth. *Cancer Cell* **26**, 880–895 (2014).
54. Guo, X. *et al.* Single tumor-initiating cells evade immune clearance by recruiting type II macrophages. *Genes Dev.* **31**, 247–259 (2017).
55. Ledezma-Sánchez, B. A., García-Regalado, A., Guzmán-Hernández, M. L. & Vázquez-Prado, J. Sphingosine-1-phosphate receptor S1P1 is regulated by direct interactions with P-Rex1, a Rac guanine nucleotide exchange factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 1647–52

- (2010).
56. Neptune, E. R., Iiri, T. & Bourne, H. R. Gα<sub>12</sub> is not required for chemotaxis mediated by G<sub>i</sub>-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **274**, 2824–8 (1999).
  57. Neptune, E. R. & Bourne, H. R. Receptors induce chemotaxis by releasing the βγ subunit of G<sub>i</sub>, not by activating G<sub>q</sub> or G<sub>s</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 14489–94 (1997).
  58. Raftopoulos, M. & Hall, A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev. Biol.* **265**, 23–32 (2004).
  59. Hall, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509–14 (1998).
  60. Ridley, A. J. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* **16**, 522–9 (2006).
  61. Devreotes, P. & Horwitz, A. R. Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a005959 (2015).
  62. Moon, S. Y. & Zheng, Y. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol.* **13**, 13–22 (2003).
  63. Lappano, R. & Maggiolini, M. G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 47–60 (2011).
  64. Lagerström, M. C. & Schiöth, H. B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 339–57 (2008).
  65. Katritch, V., Cherezov, V. & Stevens, R. C. Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 17–27 (2012).
  66. Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F. & Kobilka, B. K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**, 356–63 (2009).
  67. Campbell, A. P. & Smrcka, A. V. Targeting G protein-coupled receptor signalling by blocking G proteins. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 789–803 (2018).
  68. Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R. & Huang, X.-Y. Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J. Mol. Biol.* **428**, 3850–68 (2016).
  69. Gurevich, V. V. & Gurevich, E. V. Molecular Mechanisms of GPCR Signaling: A Structural Perspective. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 773–81 (2017).
  70. Conklin, B. R. *et al.* Engineering GPCR signaling pathways with RASSLs. *Nat. Methods* **5**, 673–8 (2008).
  71. Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G. & Schiöth, H. B. The G-protein-coupled

- receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **63**, 1256–72 (2003).
72. Siripurapu, P., Kankanamge, D., Ratnayake, K., Senarath, K. & Karunaratne, A. Two independent but synchronized G $\beta\gamma$  subunit-controlled pathways are essential for trailing-edge retraction during macrophage migration. *J. Biol. Chem.* **292**, 17482–17495 (2017).
  73. Ke, W. *et al.* G $\beta$ 1 is required for neutrophil migration in zebrafish. *Dev. Biol.* **428**, 135–147 (2017).
  74. Chen, L. *et al.* CXCR4 gene transfer contributes to in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells. *Cardiovasc. Res.* **88**, 462–70 (2010).
  75. Guleng, B. *et al.* Blockade of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner. *Cancer Res.* **65**, 5864–71 (2005).
  76. Carretero-Ortega J, Walsh CT, Hernández-García R, Reyes-Cruz G, Brown JH, V.-P. J. Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex-1), a guanine nucleotide exchange factor for Rac, mediates angiogenic responses to stromal cell-derived factor-1/chemokine stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL-12) linke. *Mol. Pharmacol. Pharmacol.* **77**, 435–42 (2010).
  77. Bookout, A. L. *et al.* Targeting Gbetagamma signaling to inhibit prostate tumor formation and growth. *J. Biol. Chem.* **278**, 37569–73 (2003).
  78. Leopoldt, D. *et al.* Gbetagamma stimulates phosphoinositide 3-kinase-gamma by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit. *J. Biol. Chem.* **273**, 7024–9 (1998).
  79. Dbouk, H. A. *et al.* G protein-coupled receptor-mediated activation of p110 $\beta$  by G $\beta\gamma$  is required for cellular transformation and invasiveness. *Sci. Signal.* **5**, ra89 (2012).
  80. O'Hayre, M. *et al.* The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 412–24 (2013).
  81. Yoda, A. *et al.* Mutations in G protein  $\beta$  subunits promote transformation and kinase inhibitor resistance. *Nat. Med.* **21**, 71–5 (2015).
  82. Piddock, R. E. *et al.* PI3K $\delta$  and PI3K $\gamma$  isoforms have distinct functions in regulating pro-tumoural signalling in the multiple myeloma microenvironment. *Blood Cancer J.* **7**, e539 (2017).
  83. Schmidt, A. & Hall, A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.* **16**, 1587–609 (2002).

84. Bar-Sagi, D. & Hall, A. Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* **103**, 227–38 (2000).
85. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629–35 (2002).
86. Rossman, K. L., Der, C. J. & Sondek, J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 167–80 (2005).
87. Goicoechea, S. M., Awadia, S. & Garcia-Mata, R. I'm coming to GEF you: Regulation of RhoGEFs during cell migration. *Cell Adh. Migr.* **8**, 535–49 (2014).
88. Aittaleb, M., Boguth, C. A. & Tesmer, J. J. G. Structure and function of heterotrimeric G protein-regulated Rho guanine nucleotide exchange factors. *Mol. Pharmacol.* **77**, 111–25 (2010).
89. Cook, D. R., Rossman, K. L. & Der, C. J. Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene* **33**, 4021–35 (2014).
90. Lawson, C. D. & Ridley, A. J. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J. Cell Biol.* **217**, 447–457 (2018).
91. Laurin, M. & Côté, J.-F. Insights into the biological functions of Dock family guanine nucleotide exchange factors. *Genes Dev.* **28**, 533–47 (2014).
92. Tcherkezian, J. & Lamarche-Vane, N. Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol. cell* **99**, 67–86 (2007).
93. Dovas, A. & Couchman, J. R. RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem. J.* **390**, 1–9 (2005).
94. Scheffzek, K., Stephan, I., Jensen, O. N., Illenberger, D. & Gierschik, P. The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 122–6 (2000).
95. Olofsson, B. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell. Signal.* **11**, 545–54 (1999).
96. Garcia-Mata, R., Boulter, E. & Burridge, K. The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 493–504 (2011).
97. Jaffe, A. B. & Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 247–69 (2005).
98. Kim, C. *et al.* Vascular RhoJ is an effective and selective target for tumor angiogenesis and vascular disruption. *Cancer Cell* **25**, 102–17 (2014).
99. Hernández-García, R., Iruela-Arispe, M. L., Reyes-Cruz, G. & Vázquez-Prado, J. Endothelial RhoGEFs: A systematic analysis of their expression profiles in VEGF-stimulated and tumor

- endothelial cells. *Vascul. Pharmacol.* **74**, 60–72 (2015).
100. Masià-Balagué, M. *et al.* Gastrin-stimulated G $\alpha$ 13 Activation of Rgnef Protein (ArhGEF28) in DLD-1 Colon Carcinoma Cells. *J. Biol. Chem.* **290**, 15197–209 (2015).
  101. Lutz, S. *et al.* The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *J. Biol. Chem.* **280**, 11134–9 (2005).
  102. Rojas, R. J. *et al.* Galphaq directly activates p63RhoGEF and Trio via a conserved extension of the Dbl homology-associated pleckstrin homology domain. *J. Biol. Chem.* **282**, 29201–10 (2007).
  103. Fukuhara, S., Murga, C., Zohar, M., Igishi, T. & Gutkind, J. S. A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J. Biol. Chem.* **274**, 5868–79 (1999).
  104. Fukuhara, S., Chikumi, H. & Gutkind, J. S. Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor (LARG) links heterotrimeric G proteins of the G(12) family to Rho. *FEBS Lett.* **485**, 183–8 (2000).
  105. Hart, M. J. *et al.* Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. *Science* **280**, 2112–4 (1998).
  106. Welch, H. C. E. *et al.* P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell* **108**, 809–21 (2002).
  107. Donald, S. *et al.* P-Rex2, a new guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *FEBS Lett.* **572**, 172–6 (2004).
  108. Fine, B. *et al.* Activation of the PI3K pathway in cancer through inhibition of PTEN by exchange factor P-REX2a. *Science* **325**, 1261–5 (2009).
  109. Hill, K. *et al.* Regulation of P-Rex1 by phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate and Gbetagamma subunits. *J. Biol. Chem.* **280**, 4166–73 (2005).
  110. Robles-Molina, E., Dionisio-Vicuña, M., Guzmán-Hernández, M. L., Reyes-Cruz, G. & Vázquez-Prado, J. G $\beta$  $\gamma$  interacts with mTOR and promotes its activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **444**, 218–23 (2014).
  111. Hernández-Negrete, I. *et al.* P-Rex1 links mammalian target of rapamycin signaling to Rac activation and cell migration. *J. Biol. Chem.* **282**, 23708–15 (2007).
  112. Huang, P., Duda, D. G., Jain, R. K. & Fukumura, D. Histopathologic findings and establishment of novel tumor lines from spontaneous tumors in FVB/N mice. *Comp. Med.* **58**, 253–63 (2008).

113. Guilluy, C., Dubash, A. D. & García-Mata, R. Analysis of RhoA and Rho GEF activity in whole cells and the cell nucleus. *Nat. Protoc.* **6**, 2050–60 (2011).
114. Dumont, D. J., Yamaguchi, T. P., Conlon, R. A., Rossant, J. & Breitman, M. L. tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* **7**, 1471–80 (1992).
115. Sato, T. N., Qin, Y., Kozak, C. A. & Audus, K. L. Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 9355–8 (1993).
116. Shlamkovich, T., Aharon, L., Koslawsky, D., Einav, Y. & Papo, N. Targeting the Tie2- $\alpha\beta$ 3 integrin axis with bi-specific reagents for the inhibition of angiogenesis. *BMC Biol.* **16**, 92 (2018).
117. Venneri, M. A. *et al.* Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood* **109**, 5276–85 (2007).
118. Ohle, S. J., Anandaiah, A., Fabian, A. J., Fine, A. & Kotton, D. N. Maintenance and repair of the lung endothelium does not involve contributions from marrow-derived endothelial precursor cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **47**, 11–9 (2012).
119. St Croix, B. *et al.* Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* **289**, 1197–202 (2000).
120. Kaur, S. *et al.* RhoJ/TCL regulates endothelial motility and tube formation and modulates actomyosin contractility and focal adhesion numbers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 657–64 (2011).
121. Chávez-Vargas, L. *et al.* Protein Kinase A (PKA) Type I Interacts with P-Rex1, a Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor: EFFECT ON PKA LOCALIZATION AND P-Rex1 SIGNALING. *J. Biol. Chem.* **291**, 6182–99 (2016).
122. Yagi, H. *et al.* A synthetic biology approach reveals a CXCR4-G13-Rho signaling axis driving transendothelial migration of metastatic breast cancer cells. *Sci. Signal.* **4**, ra60 (2011).
123. Tan, W., Martin, D. & Gutkind, J. S. The Galpha13-Rho signaling axis is required for SDF-1-induced migration through CXCR4. *J. Biol. Chem.* **281**, 39542–9 (2006).
124. Ngai, J., Inngjerdigen, M., Berge, T. & Taskén, K. Interplay between the heterotrimeric G-protein subunits Galphaq and Galphai2 sets the threshold for chemotaxis and TCR activation. *BMC Immunol.* **10**, 27 (2009).
125. Ando, N. *et al.* Chemosensitivity is differentially regulated by the SDF-1/CXCR4 and SDF-



- 1/CXCR7 axes in acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangements. *Leuk. Res.* **75**, 36–44 (2018).
126. Kalinec, G., Nazarali, A. J., Hermouet, S., Xu, N. & Gutkind, J. S. Mutated alpha subunit of the Gq protein induces malignant transformation in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 4687–93 (1992).
127. Xu, N., Bradley, L., Ambdukar, I. & Gutkind, J. S. A mutant alpha subunit of G12 potentiates the eicosanoid pathway and is highly oncogenic in NIH 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 6741–5 (1993).
128. Onken, M. D. *et al.* Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 5230–4 (2008).
129. Van Raamsdonk, C. D. *et al.* Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N. Engl. J. Med.* **363**, 2191–9 (2010).
130. Shoushtari, A. N. & Carvajal, R. D. GNAQ and GNA11 mutations in uveal melanoma. *Melanoma Res.* **24**, 525–34 (2014).
131. Feng, X. *et al.* Hippo-independent activation of YAP by the GNAQ uveal melanoma oncogene through a trio-regulated rho GTPase signaling circuitry. *Cancer Cell* **25**, 831–45 (2014).
132. Vázquez-Prado, J., Miyazaki, H., Castellone, M. D., Teramoto, H. & Gutkind, J. S. Chimeric G alpha i2/G alpha 13 proteins reveal the structural requirements for the binding and activation of the RGS-like (RGL)-containing Rho guanine nucleotide exchange factors (GEFs) by G alpha 13. *J. Biol. Chem.* **279**, 54283–90 (2004).
133. Wall, M. A. *et al.* The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell* **83**, 1047–58 (1995).
134. Lambright, D. G. *et al.* The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* **379**, 311–9 (1996).
135. Lopez-Haber, C., Barrio-Real, L., Casado-Medrano, V. & Kazanietz, M. G. Heregulin/ErbB3 Signaling Enhances CXCR4-Driven Rac1 Activation and Breast Cancer Cell Motility via Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$ . *Mol. Cell. Biol.* **36**, 2011–26 (2016).
136. Urban, D. J. & Roth, B. L. DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs): chemogenetic tools with therapeutic utility. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **55**, 399–417 (2015).
137. Coward, P. *et al.* Controlling signaling with a specifically designed Gi-coupled receptor. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 352–7 (1998).
138. Schrage, R. *et al.* The experimental power of FR900359 to study Gq-regulated biological processes. *Nat. Commun.* **6**, 10156 (2015).
  139. Choi, J. W. *et al.* LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**, 157–86 (2010).
  140. Kazanietz, M. G., Barrio-Real, L., Casado-Medrano, V., Baker, M. J. & Lopez-Haber, C. The P-Rex1/Rac signaling pathway as a point of convergence for HER/ErbB receptor and GPCR responses. *Small GTPases* **9**, 297–303 (2018).
  141. Sosa, M. S. *et al.* Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an essential mediator of ErbB signaling in breast cancer. *Mol. Cell* **40**, 877–92 (2010).
  142. Barrio-Real, L. *et al.* P-Rex1 is dispensable for Erk activation and mitogenesis in breast cancer. *Oncotarget* **9**, 28612–28624 (2018).
  143. Qin, J. *et al.* Upregulation of PIP3-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex1) promotes prostate cancer metastasis. *Oncogene* **28**, 1853–63 (2009).
  144. Berger, M. F. *et al.* Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature* **485**, 502–6 (2012).
  145. Perrot, V., Vazquez-Prado, J. & Gutkind, J. S. Plexin B regulates Rho through the guanine nucleotide exchange factors leukemia-associated Rho GEF (LARG) and PDZ-RhoGEF. *J. Biol. Chem.* **277**, 43115–20 (2002).
  146. Swiercz, J. M., Kuner, R., Behrens, J. & Offermanns, S. Plexin-B1 directly interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology. *Neuron* **35**, 51–63 (2002).
  147. Chen, L., Zhang, J. J., Rafii, S. & Huang, X.-Y. Suppression of tumor angiogenesis by Galpha(13) haploinsufficiency. *J. Biol. Chem.* **284**, 27409–15 (2009).
  148. Sivaraj, K. K. *et al.* G13 controls angiogenesis through regulation of VEGFR-2 expression. *Dev. Cell* **25**, 427–34 (2013).
  149. Sivaraj, K. K. *et al.* Endothelial Gq/11 is required for VEGF-induced vascular permeability and angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* **108**, 171–80 (2015).
  150. Peinado, H. *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* **18**, 883–91 (2012).
  151. Linglart, A. *et al.* Recurrent PRKAR1A mutation in acrodysostosis with hormone resistance. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2218–26 (2011).

152. Guzmán-Hernández, M. L. *et al.* Differential inhibitor of Gbetagamma signaling to AKT and ERK derived from phosducin-like protein: effect on sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration and in vitro angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **284**, 18334–46 (2009).
153. Mayeenuddin, L. H., McIntire, W. E. & Garrison, J. C. Differential sensitivity of P-Rex1 to isoforms of G protein betagamma dimers. *J. Biol. Chem.* **281**, 1913–20 (2006).

## 15. Publicaciones

### 15.1 Artículo Original: $G\beta\gamma$ signaling to the chemotactic effector P-REX1 and mammalian cell migration is directly regulated by $G\alpha_q$ and $G\alpha_{13}$ proteins (*en prensa*)

#### JBC ARTICLE



## $G\beta\gamma$ signaling to the chemotactic effector P-REX1 and mammalian cell migration is directly regulated by $G\alpha_q$ and $G\alpha_{13}$ proteins

Received for publication, October 15, 2018, and in revised form, November 12, 2018. Published, Papers in Press, November 16, 2018, DOI 10.1074/jbc.RA118.006254

✉ Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana<sup>1</sup>, Sendi Rafael Adame-García<sup>5</sup>, Irving García-Jiménez<sup>5</sup>, Víctor Manuel Color-Aparicio<sup>1</sup>, Yarely Mabel Beltrán-Navarro<sup>2</sup>, Gabriele M. König<sup>4</sup>, Evi Kostenis<sup>4</sup>, Guadalupe Reyes-Cruz<sup>5</sup>, J. Silvio Gutkind<sup>1</sup>, and José Vázquez-Prado<sup>1,1</sup>

From the Departments of <sup>1</sup>Pharmacology and <sup>5</sup>Cell Biology, CINVESTAV-IPN, 14740 Mexico City, Mexico, the <sup>4</sup>University of Bonn, Institute of Pharmaceutical Biology, 53115 Bonn, Germany, and the <sup>2</sup>Moore's Cancer Center and Department of Pharmacology, University of California, San Diego, La Jolla, California 92093

Edited by Henrik G. Dohlman

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

GPCR-dependent<sup>2</sup> chemotactic signaling is a phylogenetically conserved process that plays a central role during development and homeostatic control of multicellular organisms (1, 2). Life-threatening pathologies such as metastatic cancer also involve directional cell migration guided by chemotactic GPCRs (3, 4). Shallow gradients of chemokines elicit a spatiotemporal signaling response that defines cell polarity by generating an asymmetric distribution of actin nucleation sites. The force generated by actin polymerization pushes the cell to move forward. This process is particularly relevant for individual migrating cells (1, 2).

Chemotactic GPCRs, such as CXCR4 and LPA1, are frequently coupled to different families of G proteins, including  $G_p$ ,  $G_{q/11}$ , and  $G_{12/13}$ , but their ability to sustain a migratory response is commonly sensitive to inhibition by pertussis toxin (5–8). This is consistent with the widely accepted idea that signaling-ready  $G\beta\gamma$  complexes, suitable for chemotactic events, preferentially come from  $G_i$  (9–11), which has recently been confirmed by synthetic biology strategies (12). Mechanistically, this process involves  $G_i$ -dependent activation of Rho GTPases, particularly Rac and Cdc42, downstream of a  $G\beta\gamma$ -regulated group of effectors (4). These include phosphoinositide 3-kinases PI3K $\beta$  and PI3K $\gamma$  (13–17) and 3-phosphoinositide-dependent Rac guanine nucleotide exchange factors P-REX1 and P-REX2 (18–20). Interestingly, aberrantly overexpressed chemotactic GPCRs, such as CXCR4, highly abundant in various types of metastatic cancer, abnormally couple to  $G_{13}$  leading to a predominant Rho-dependent migratory pathway (21).

$G\alpha$  subunits (particularly  $G\alpha_{12/13}$  and  $G\alpha_q$ ) activate Rho via direct interaction with RGS-RhoGEFs and p63RhoGEF/TRIO, respectively (22–26). Because Rho and Rac have opposite effects on cell morphology, they are considered contradictory signals that have to be spatiotemporally regulated in migrating

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico) Grants 286274 (to J.V.-P.) and 240119 (to G.R.-C.), by fellowships from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (to R.D.C.-V., S.R.A.-G., I.G.-J., V.M.C.-A., and Y.M.B.-N.), by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant FOR2372 (to E.K. and G.M.K.), and by National Institutes of Health/NCI Grant CA221289 (to J.S.G.). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed: Dept. of Pharmacology, CINVESTAV-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, 14740, CDMX, Mexico. Tel.: 52-55-5747-3380; Fax: 52-55-5747-3394; E-mail: jvazquez@cinvestav.mx.

<sup>2</sup>The abbreviations used are: GPCR, G protein-coupled receptor; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; RhoGEF, Rho guanine nucleotide exchange factor; mTOR, mammalian/mechanistic target of rapamycin; SDF-1, stromal cell-derived factor 1; HGF, hepatocyte growth factor; EGFP, enhanced GFP; DREADD, designer receptor exclusively activated by designer drugs; CNO, clozapine-N-oxide; LPA, lysophosphatidic acid; PTX, pertussis toxin; TCL, total cell lysate; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; ANOVA, analysis of variance.

### $G\alpha_q$ -QL and $G\alpha_{13}$ -QL prevent $G\beta\gamma$ -dependent P-REX1 activation

cells where Rho promotes contraction, whereas Rac stimulates extension (27–29). Therefore, diverse molecular mechanisms are believed to exert a spatiotemporal control of their activity. In the case of  $G_{12/13}$ - and  $G_q$ -coupled receptors, their signals to Rho are prevalent over the potential  $G\beta\gamma$ -dependent mechanisms activating Rac that would be expected to result by the action of  $G\beta\gamma$  subunits from these heterotrimeric G proteins. These observations opened the possibility that  $G\beta\gamma$  signaling by  $G_{12/13}$  and  $G_q$  heterotrimers is directly regulated by the respective  $G\alpha$  subunits. This hypothesis would be supported by the possibility that inhibition of certain  $G\alpha$  subunits, such as  $G\alpha_q$ , might improve  $G\beta\gamma$  signaling. In addition, GTPase-deficient  $G\alpha$  subunits might stably interact with  $G\beta\gamma$  dimers regulating their availability to bind their downstream effectors. Here, we tested these possibilities by analyzing the pathway linking  $G\beta\gamma$  signaling to P-REX1, its chemotactic effector, and the  $G\beta\gamma$ -dependent activation of AKT and cell migration.

#### Results

##### $G_q/G_i$ -coupled LPA receptors exhibit increased signaling to P-REX1 when $G\alpha_q$ is inhibited

$G\beta\gamma$ -dependent pathways promoting chemotactic processes are usually derived from  $G_i$ , considered one of the most abundant heterotrimeric G proteins and characterized by their sensitivity to pertussis toxin (4, 30, 31). We hypothesized that  $G\beta\gamma$  signaling to Rac, via P-REX1, is mainly elicited by  $G_i$  not only because of its high expression but also because other  $G\alpha$  subunits, particularly those that activate Rho, such as  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$ , may prevent  $G\beta\gamma$  availability to interact with P-REX1. Therefore, inhibition of  $G\alpha_q$ , for instance, would lead to higher effect of  $G\beta\gamma$  on P-REX1. As an endogenous system to test this possibility, we used MCF-7 cells to study signaling by  $G_q/G_i$ -coupled LPA receptors (Fig. 1A). We chose MCF-7 cells because they express P-REX1 that is known to be regulated by  $G_i$ -coupled CXCR4 receptors (32). They also express LPA receptors, which are characterized by their ability to couple to  $G_p$ ,  $G_q$ , and  $G_{13}$  families of heterotrimeric G proteins (33). P-REX1 activation was measured by RacG15A pulldown as previously described (34). In these cells, LPA activated ERK via  $G\alpha_q$  (Fig. 1B) but not  $G_i$  (Fig. 1C) and had a limited  $G_i$ -dependent effect on P-REX1, which decreased below its basal activation levels when  $G_i$  was inhibited with pertussis toxin (Fig. 1C). The activation of ERK by LPA was sensitive to FR900359 (FR, iGq), a recently described specific inhibitor of  $G\alpha_q$  (35), and sotrastaurin (iPKC), a PKC inhibitor (Fig. 1B, top and bottom panels, respectively), but insensitive to pertussis toxin (Fig. 1C). In contrast, the small effect on P-REX1 elicited by LPA was inhibited by PTX (Fig. 1C). Because P-REX1 is known to be activated by  $G\beta\gamma$ , the lack of activation of P-REX1 by  $G_q$  expected to release  $G\beta\gamma$ , opens the possibility that  $G\alpha_q$  might inhibit  $G\beta\gamma$  signaling. To test this possibility, we assessed the activation of P-REX1 in cells in which  $G\alpha_q$  was inhibited. Consistent with this idea, P-REX1 reached higher levels of activation by LPA when  $G\alpha_q$  was inhibited with FR (iGq) (Fig. 1D). In these cells, with transfection with RGS2, which blocks  $G\alpha_q$  (36), the basal levels of active P-REX1 were increased, making the effect of LPA hardly evident but still significant compared with

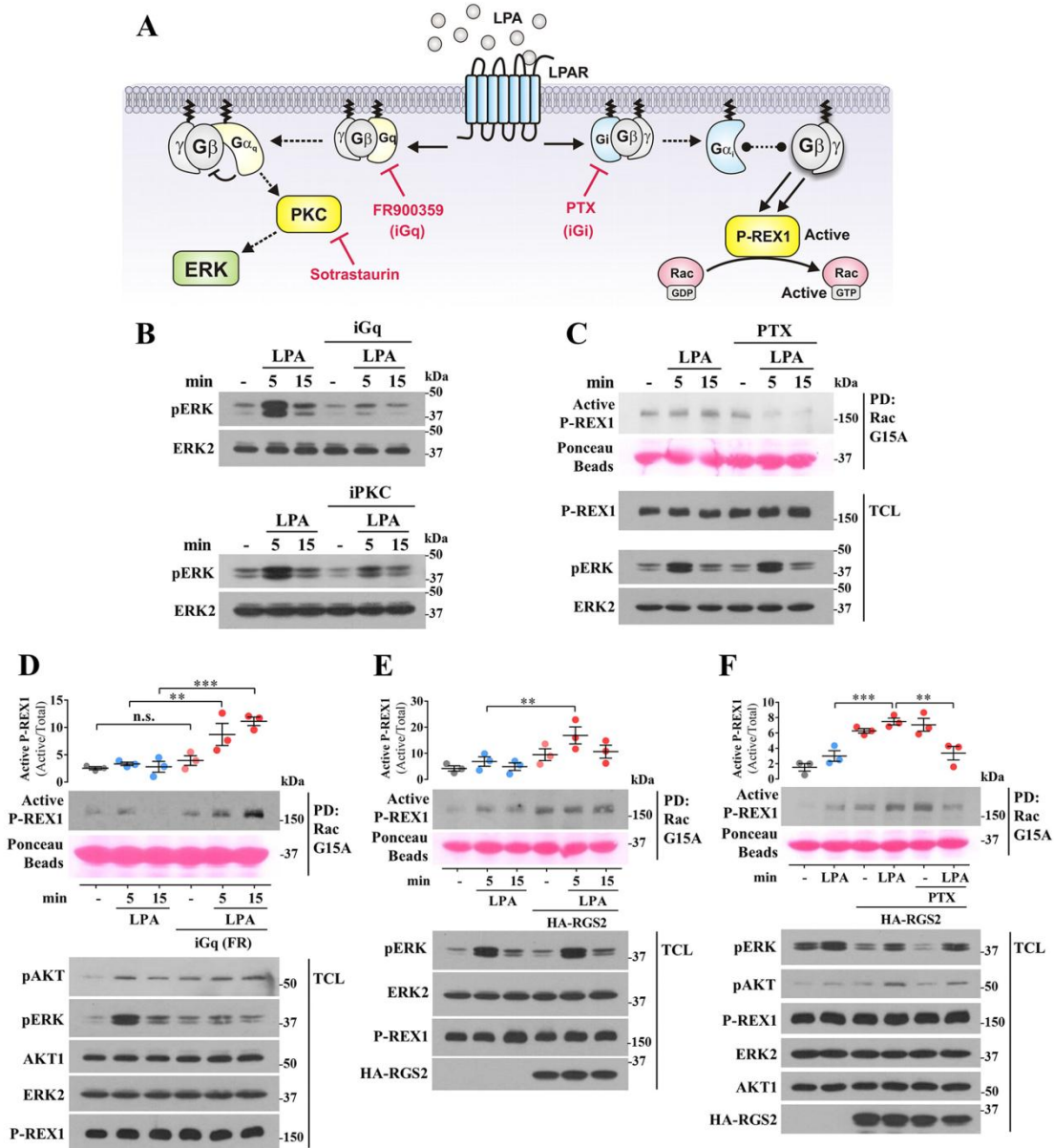
the effect in cells not overexpressing RGS2 (Fig. 1E). A similar effect on AKT activation was observed (Fig. 1F), RGS2 overexpression increased basal pAKT, which in this case was still sensitive to LPA stimulation. The increased activation of P-REX1 by LPA in RGS2-transfected cells was sensitive to pertussis toxin (Fig. 1F), which partially reduced the effect on AKT (Fig. 1F).

##### Chemogenetic evidence showing that $G_i$ -coupled but not $G_q$ -coupled receptors activate P-REX1

To confirm that endogenous  $G_i$  preferentially activates P-REX1, we followed a chemogenetic approach using genetically modified receptors exclusively coupled to  $G_i$  (Fig. 2A,  $G_i$ -DREADD) and compared with others exclusively coupled to  $G_q$  (Fig. 2B,  $G_q$ -DREADD), which according to our previous experiments would not provide enough signaling-ready  $G\beta\gamma$  to activate P-REX1. These receptors are susceptible to be activated solely by clozapine-*N*-oxide (CNO), a synthetic ligand without effects on cells not expressing DREADD (37, 38). First, we assessed the time course, dose response, and specificity of CNO to verify the suitability of the DREADD system to evaluate AKT/ERK and P-REX1 signaling pathways in COS7 cells.  $G_i$ -DREADD transfected COS7 cells were stimulated with 1  $\mu$ M CNO in time-course experiments; in these cells,  $G_i$ -DREADD strongly activated AKT (Fig. 2C, pAKT, top panel and graph) and ERK (Fig. 2D, pERK, top panel and graph) with maximum effects between 5 and 15 min. As expected, phosphorylation of AKT and ERK in  $G_i$ -DREADD transfected cells stimulated with CNO was dose-dependent (Fig. 2, E and F, respectively), with a maximum response reached at 1  $\mu$ M, which was selected for next experiments. Even at maximum concentration, CNO was inactive in control cells not expressing DREADD (Fig. 2, E and F, control, graphs and lower panels), confirming the suitability of the system to characterize specific G protein-dependent signaling pathways. We further confirmed the distinct G protein coupling of  $G_i$ - and  $G_q$ -DREADD using  $G_i$  and  $G_q$  specific inhibitors and evaluated AKT and ERK activation in response to CNO. Consistent with the reported specificity,  $G_i$ -DREADD effects on AKT and ERK were inhibited with pertussis toxin (PTX, a specific  $G_i$  inhibitor) but not by  $G_q$  family specific inhibitor FR900359 (35) (Fig. 2G, upper panels, iGq), whereas the activation of AKT and ERK by  $G_q$ -DREADD was prevented by the  $G_q$  inhibitor FR, but not by PTX (Fig. 2H, upper panels).

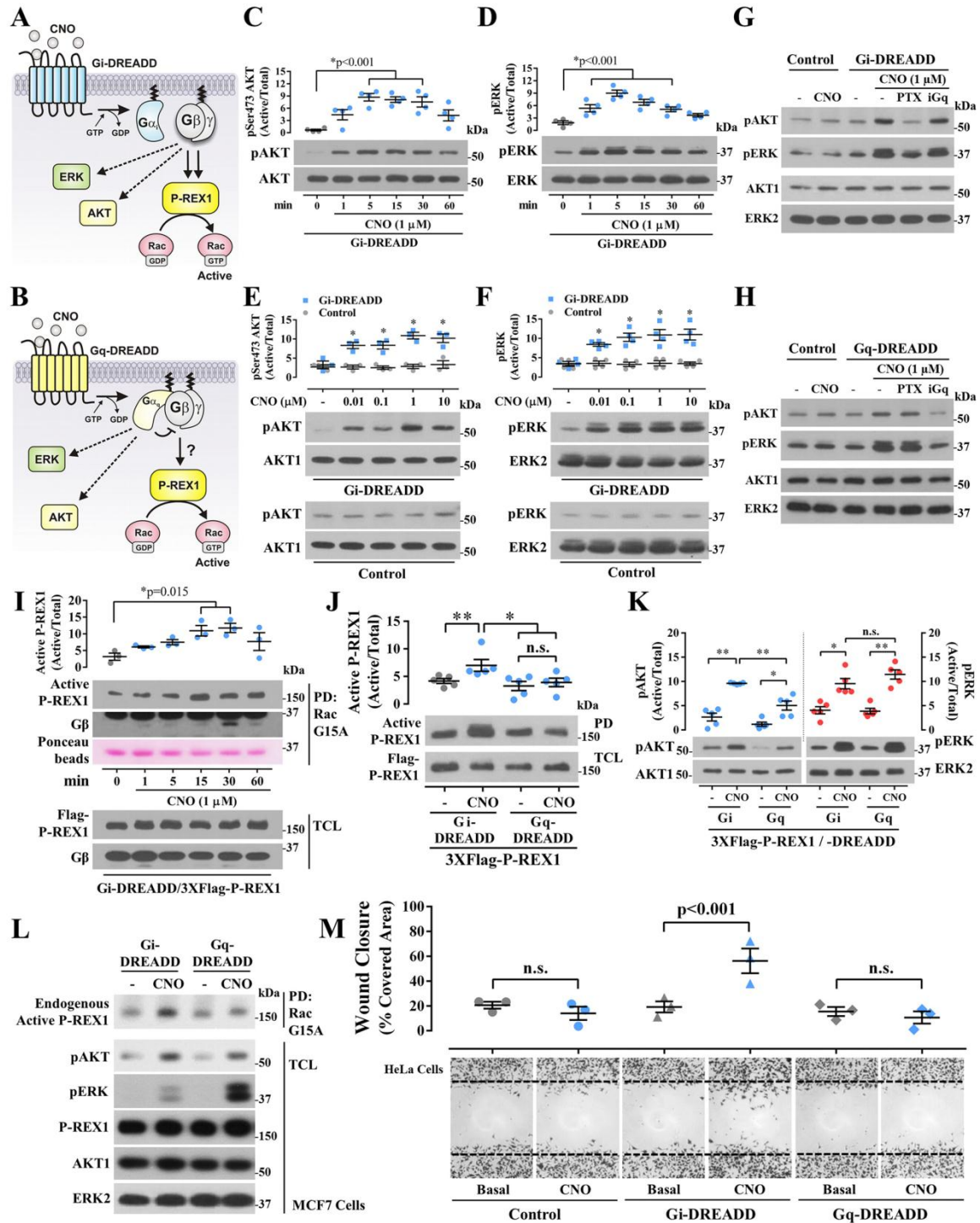
Subsequently, we tested the time course of P-REX1 activation by CNO in  $G_i$ -DREADD transfected COS7 cells. As shown in Fig. 2I, maximal activation of P-REX1 was detected between 15 and 30 min. Consistently,  $G\beta\gamma$  was found associated with active P-REX1 in the RacG15A pulldowns (Fig. 2I,  $G\beta$  in PD). Finally, we compared the activation of P-REX1, AKT, and ERK by  $G_i$ -DREADD versus  $G_q$ -DREADD. Consistent with the differential ability of  $G_i$  versus  $G_q$  to provide signaling-ready  $G\beta\gamma$ ,  $G_i$ -DREADD but not  $G_q$ -DREADD activated P-REX1 (Fig. 2J). In addition,  $G_i$ -DREADD activated AKT more effectively than  $G_q$ -DREADD (Fig. 2K, pAKT, top left panel and graph), whereas both receptors were equally effective activators of ERK (Fig. 2K, pERK, top right panel and graph). In this case, the activation of ERK by  $G_q$ -DREADD occurred via  $G\alpha_q$  (Fig. 2H, pERK, second panel) and was susceptible to PKC inhibition (not



$G\alpha_q$ -QL and  $G\alpha_{13}$ -QL prevent  $G\beta\gamma$ -dependent P-REX1 activation

**Figure 1.**  $G_q/G_{12}$ -coupled LPA receptors exhibit increased signaling to P-REX1 when  $G\alpha_q$  is inhibited. *A*, proposed model of  $G\beta\gamma$  signaling by  $G_q/G_{12}$ -coupled LPA receptors in MCF7 cells. Accordingly,  $G\beta\gamma$  signaling to P-REX1 is elicited by  $G_i$  but not  $G_q$  because of an inhibitory role of  $G\alpha_q$  on  $G\beta\gamma$ . Therefore, inhibition of  $G\alpha_q$  would increase  $G\beta\gamma$ -mediated activation of P-REX1. *B*, LPA activates ERK via  $G_q$  and not  $G_i$ . MCF7 cells were stimulated with 5  $\mu$ M LPA in the absence or presence of either FR900359 (250 nM, iGq), 1  $\mu$ M sotrastaurin (PKC inhibitor), or PTX (100 ng/ml overnight), and ERK activation was assessed by Western blotting against phosphorylated ERK (pERK). *C*, LPA activates P-REX1 via  $G_i$ . MCF7 cells were preincubated or not with PTX (100 ng/ml overnight) and used to detect the effect of 5  $\mu$ M LPA on P-REX1 activation assayed by RacG15A pull-down. *D*, LPA-dependent activation of P-REX1 is increased as a consequence of  $G\alpha_q$  inhibition. The cells were pretreated with FR900359 (iGq) and stimulated with 5  $\mu$ M LPA, and activation of P-REX1 and ERK was tested. The graph represents the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; n.s., no significance (two-way ANOVA followed Tukey). *E*, RGS2 overexpression increases the effect of LPA on P-REX1 activation. MCF7 cells were transfected with EGFP or HA-RGS2 and selected for 4 days with G418 (500  $\mu$ g/ml); then the cells were starved overnight and stimulated with 5  $\mu$ M LPA for 5 and 15 min, and the fraction of active P-REX1 was isolated by pull-down and detected by Western blotting. The graph represents the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \*\*,  $p < 0.01$ , two-way ANOVA followed Tukey. *F*, the combined effect of RGS2 and LPA on P-REX1 activation was mediated by  $G_i$ . MCF7 cells expressing HA-RGS2 were starved, incubated with PTX (100 ng/ml overnight), and then were stimulated with LPA (5  $\mu$ M) for 5 min. Activation of P-REX1 was detected by pull-down. Western blots of the indicated phospho- and total proteins in total cell lysates, shown in the bottom panels, were assayed in the same experiments. The graph represents the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ , two-way ANOVA followed Tukey.

$G\alpha_q$ -QL and  $G\alpha_{13}$ -QL prevent  $G\beta\gamma$ -dependent P-REX1 activation





**$G\alpha_q$ -QL and  $G\alpha_{13}$ -QL prevent  $G\beta\gamma$ -dependent P-REX1 activation**

shown). To further confirm that endogenous P-REX1 is preferentially activated by  $G_i$ , we used MCF7 cells transfected with  $G_i$ -DREADD or  $G_q$ -DREADD. As shown in Fig. 2L, endogenous P-REX1 was indeed preferentially activated by  $G_i$ -DREADD but not by  $G_q$ -DREADD, both effective activators of AKT; the latter was the more effective activator of ERK in this cellular system. Consistent with a previous report (12), chemogenetic activation of  $G_i$ , but not  $G_q$ , promoted cell migration (Fig. 2M).

**GTPase-deficient  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  Q  $\rightarrow$  L mutants form stable complexes with  $G\beta\gamma$ : critical role of  $G\alpha$  N-terminal helix revealed by chimeric  $G\alpha_{13-12}$ QL**

The mechanism by which not all G proteins are good providers of signaling-ready  $G\beta\gamma$  might in part be linked to different dynamics of heterotrimer dissociation. Thus, we hypothesized that GTPase-deficient  $G\alpha$  subunits, particularly Rho-activating  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$ , might directly prevent  $G\beta\gamma$  signaling to Rac by interfering its interaction with P-REX1, a RacGEF known to be directly activated by  $G\beta\gamma$  (18, 39), and  $G_i$ -dependent cell migration (Fig. 3A).

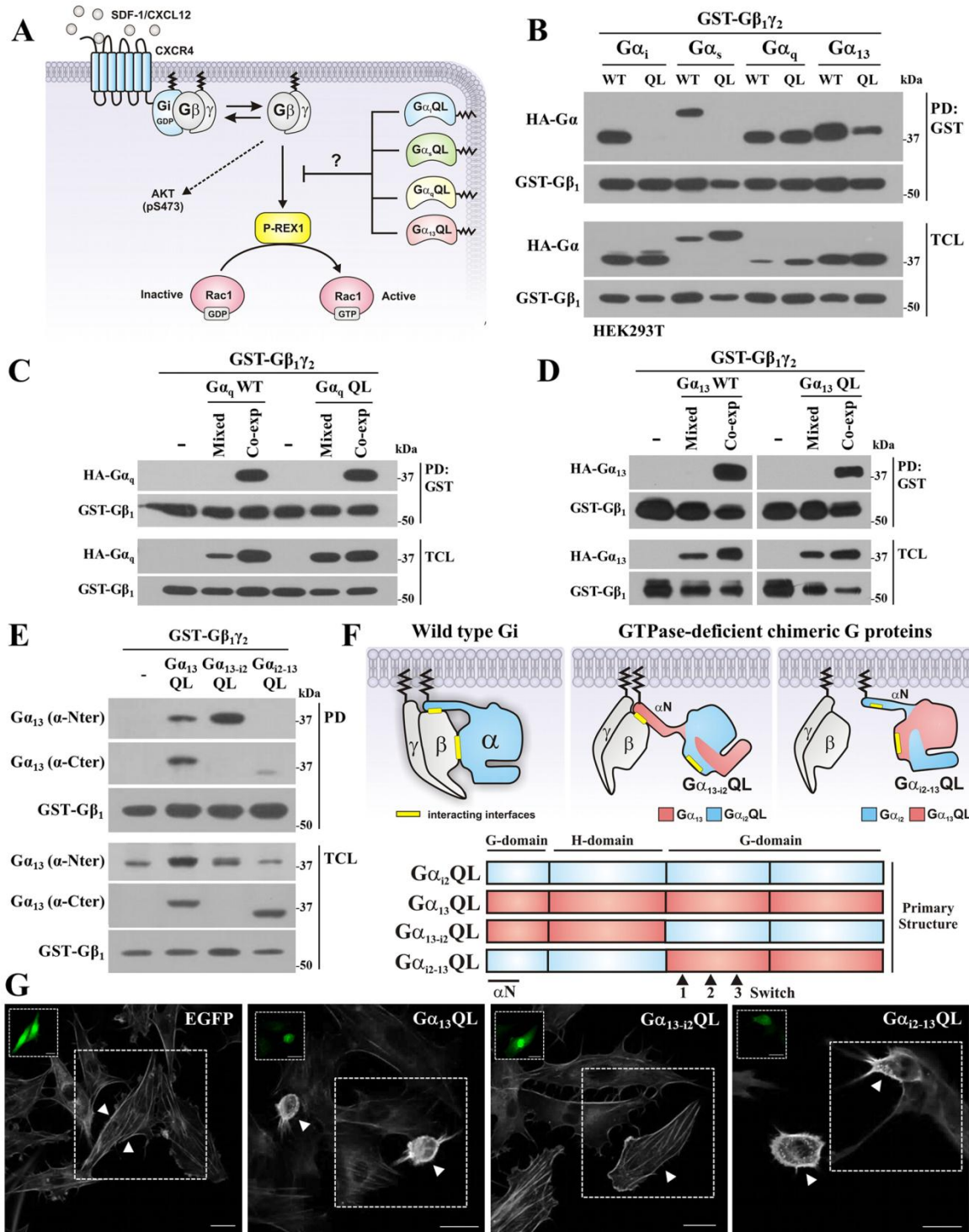
To test the possible interaction between  $G\beta\gamma$  and different GTPase-deficient  $G\alpha$  subunits, HEK293T cells were transfected with GST- $G\beta_1\gamma_2$  and HA-tagged versions of representative WT or Q  $\rightarrow$  L  $G\alpha$  subunits ( $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{13}$ , and  $G\alpha_{13}$  Q  $\rightarrow$  L mutants, but not  $G\alpha_s$  or  $G\alpha_{12}$ ), interacted with  $G\beta\gamma$  (Fig. 3B, upper panel). As expected, all WT  $G\alpha$  subunits did maintain stable interactions with  $G\beta\gamma$  (Fig. 3B, upper panel). To confirm that GTPase-deficient  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  did interact with  $G\beta\gamma$  in live cells and not after cell lysis, we assessed whether co-expression of  $G\beta\gamma$  and either WT or GTPase-deficient  $G\alpha_q$  or  $G\alpha_{13}$  was required for their interaction to occur. Our results showed that  $G\alpha_q$ , as well as  $G\alpha_{13}$ , either WT or QL, had to be co-expressed with  $G\beta\gamma$  to interact (Fig. 3, C and D, respectively). No complexes were detected when lysates from cells independently expressing these proteins were mixed (Fig. 3, C and D, upper panels, Western blotting anti-HA in the GST pulldowns). The expression of transfected proteins was confirmed by Western blotting in total cell lysates.

Structural analysis has revealed that  $G\alpha$  subunits have two independent interfaces of interaction with  $G\beta\gamma$ : one at the N-terminal  $\alpha$ -helix ( $\alpha$ N) and other at switch I and switch II regions (40, 41). The interaction interface at the switch regions

suffers important conformational changes linked to  $G\alpha$  activation as a consequence of GTP binding that have been considered part of the dissociation process (40, 42). To map the region of  $G\alpha_{13}$ QL that maintains interactions with  $G\beta\gamma$ , we then used chimeric  $G\alpha_{13-12}$ QL and  $G\alpha_{12-13}$ QL proteins. The signaling properties of these G protein chimeras have been previously described (43). These chimeras were tested by GST-pulldown analysis for their potential interactions with co-expressed GST- $G\beta\gamma$ . Using antibodies that detected either the N- or the C- regions of  $G\alpha_{13}$  to identify which chimera formed heterotrimers with GST- $G\beta\gamma$ , we revealed that  $G\alpha_{13}$ QL, as well as the chimera containing the N-terminal side of  $G\alpha_{13}$  ( $G\alpha_{13-12}$ QL), including the interaction interface at the  $\alpha$ N helix, maintained stable interactions with  $G\beta\gamma$  (Fig. 3E, PD, upper panel). Diagrammatic representation of a heterotrimeric G protein, based on the structure of  $G_i$  (41), shown in Fig. 3F highlights the two interaction interfaces between  $G\alpha$  and  $G\beta\gamma$ . The G protein constructs have swapped their helical domains (except HF, the last helix in the helical domain) and have chimeric GTPase domains resulting from joining in the tridimensional structure the N regions (HN, S1, H1, and their joining loops) of one  $G\alpha$  subunit with the C regions (S2, S3, H2, S4, H3, S5, HG, H4, S6, H5, and their joining loops) of other  $G\alpha$ , which together compose the GTPase domain (44). In the case of the  $G\alpha_{13-12}$ QL chimera, the peptide regions contributing to the GTPase domain are  $G\alpha_{13}$ M1-D77 and  $G\alpha_{12}$ T178-F355, whereas in the case of  $G\alpha_{12-13}$ QL chimera, they are  $G\alpha_{12}$ M1-S62 and  $G\alpha_{13}$ A199-Q377. Therefore, although these chimeras are QL mutants, their nucleotide binding and release properties likely differ from those of  $G\alpha_{12}$  or  $G\alpha_{13}$ . The primary structure of these constructs is represented in Fig. 3F (bottom panel) ( $G\alpha_{13}(M1-S192)-12(Q172-P366)$ QL and  $G\alpha_{12}(M1-T171)-13(Q193-Q377)$ QL) (43). According to the previous results (Fig. 3E), the N-terminal  $\alpha$ -helix ( $\alpha$ N) contains the interacting interface essential to keep  $G\alpha_{13}$ QL and  $G\alpha_{13-12}$ QL bound to  $G\beta\gamma$ . These interactions are schematically represented in Fig. 3F. The  $G\alpha_{12-13}$ QL chimera, with a GTPase domain containing the second  $G\beta\gamma$ -interacting interface, was unable to maintain stable interactions with  $G\beta\gamma$ . Both  $G\alpha_{13}$ QL and  $G\alpha_{12-13}$ QL promoted strong cytoskeletal reorganization in endothelial cells (Fig. 3G, second and fourth panels, respectively; EGFP cotransfected cells pointed with arrowheads), which is indicative of their ability to activate Rho GTPase-dependent pathways likely through RGS-RhoGEFs (45-47). In contrast, the  $G\alpha_{13-12}$ QL chimera

**Figure 2. Chemogenetic evidence that  $G_i$  but not  $G_q$  efficiently activates P-REX1.**  $G_i$ -DREADD (A), but not  $G_q$ -DREADD (B), is expected to release  $G\beta\gamma$ . Activation of AKT (pAKT, C and E) and ERK (pERK, D and F), by time course (C and D) and concentration response to CNO (E and F, 5 min) was assessed in  $G_i$ -DREADD-expressing COS7 cells. The graphs represent the means  $\pm$  S.E. of four (C and D) or three (E and F) experiments. C and D, one-way ANOVA followed Dunnett's. E and F, two-way ANOVA followed Tukey (control versus  $G_i$ -DREADD). \*,  $p < 0.001$ . G and H, specificity of  $G_i$ - and  $G_q$ -DREADDs was confirmed with PTX (100 ng/ml, G) or FR900359 (500 nM, iGq, H), specific inhibitors of  $G_i$  and  $G_q$ . The cells were stimulated with CNO (5 min). I, time course of P-REX1 activation in  $G_i$ -DREADD-expressing COS7 cells stimulated with CNO (1  $\mu$ M). Active FLAG-P-REX1 was isolated with RacG15A (shown stained with Ponceau). The graph represents the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \*,  $p < 0.015$  (one-way ANOVA followed Dunnett's; all versus basal). J and L,  $G_i$  but not  $G_q$  activates P-REX1 in COS7 cells (J, FLAG-P-REX1) and MCF7 cells (L, endogenous P-REX1) expressing  $G_i$ - or  $G_q$ -DREADD stimulated with CNO (1  $\mu$ M, 15 min). K, comparative effect of  $G_i$  and  $G_q$  signaling on AKT and ERK activation by  $G_i$ -DREADD or  $G_q$ -DREADD in COS7 cells stimulated with CNO (1  $\mu$ M, 15 min). The graph (J and K) represents the means  $\pm$  S.E. of five independent experiments. J, t test and Mann-Whitney. n.s., no significance; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p = 0.008$ . K, one-way ANOVA followed Tukey. n.s., no significance; \*,  $p < 0.01$ ; \*\*,  $p < 0.001$ . C-H, K, and L, phospho- and total AKT and ERK were detected by Western blotting in TCLs. M,  $G_i$ -DREADD induces cell migration but not  $G_q$ -DREADD. Wound-closure experiments were done with HeLa cells that expressed empty vector (control) or  $G_i$ - or  $G_q$ -DREADD and stimulated with CNO (1  $\mu$ M). The graph represents the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \*,  $p < 0.001$ ; n.s., no significance (two-way ANOVA followed Tukey).

$G\alpha_q$ -QL and  $G\alpha_{13}$ -QL prevent  $G\beta\gamma$ -dependent P-REX1 activation





**$G\alpha_q$ -QL and  $G\alpha_{13}$ -QL prevent  $G\beta\gamma$ -dependent P-REX1 activation**

did not promote a contractile morphology on endothelial cells (Fig. 3G, *third panel*).

**Tetrameric complexes composed by  $G\beta\gamma$ - $\alpha_q$ QL/RGS2 and  $G\beta\gamma$ - $G\alpha_{13-12}$ QL/RGS4 reveal a critical role for  $\alpha$ N, the N-terminal  $\alpha$ -helix of  $G\alpha$ , to maintain stable interactions between  $G\beta\gamma$  and either GTPase-deficient  $G\alpha_q$ QL or  $G\alpha_{13}$ QL**

Because RGS proteins are known to interact with active  $G\alpha$  subunits accelerating their GTPase activity, thus contributing to turn them into their inactive conformation, we wanted to discern whether GTPase-deficient  $G\alpha_q$ QL,  $G\alpha_{13}$ QL and the  $G\alpha_{13-12}$ QL chimera, shown in the previous experiments to maintain stable interactions with  $G\beta\gamma$ , expose their GTPase domain to interact with RGS proteins, forming tetrameric complexes including  $G\beta\gamma$ . As shown in Fig. 4, GST- $G\beta\gamma$  pulldown experiments similar to those described in the previous section, but here also including RGS2, RGS4, or RGL domains of RH-RhoGEFs, revealed that tetrameric complexes including  $G\beta\gamma$ - $G\alpha_q$ QL-RGS2 (Fig. 4A) and  $G\beta\gamma$ - $G\alpha_{13-12}$ QL-RGS4 (Fig. 4B) were formed. WT  $G\alpha$  subunits not expected to interact with RGS proteins or conditions where the chimeric constructs were excluded served as controls (Fig. 4, A-C). Consistent with previous experiments, GST- $G\beta\gamma$  pulldowns contained  $G\alpha_q$ WT and  $G\alpha_q$ QL subunits; remarkably, RGS2 interacted with  $G\alpha_q$ QL bound to  $G\beta\gamma$ , but not with  $G\alpha_q$ WT (Fig. 4A). In this situation,  $G\beta\gamma$  remains bound and putatively inactive (Fig. 4A, *bottom panel*, model illustrating nondissociable,  $G_q$ ). Regarding the tetrameric  $G\beta\gamma$ - $G\alpha_{13-12}$ QL-RGS4 complex (Fig. 4B), the model at the *bottom* highlights the role of  $\alpha$ N, the N-terminal  $\alpha$ -helix of  $G\alpha_{13}$ , to maintain stable interactions between  $G\beta\gamma$  and this chimera. In the case of  $G_{13}$ , we detected WT and QL versions of  $G\alpha_{13}$  bound to  $G\beta\gamma$ , but none of the RGL domains of its RhoGEF effectors (PDZ-RhoGEE, p115-RhoGEE, or LARG) were detected as part of the complex (Fig. 4C). In fact, the interaction of  $G\alpha_{13}$ QL with  $G\beta\gamma$  was reduced in cells transfected with a low concentration of PDZ-RhoGEE's RGL domain. This seems to be dynamically linked to a tight control of the G-protein cycle, as indicated by the effect of higher concentrations of this domain, which increased the  $G\beta\gamma$ - $G\alpha_{13}$ QL complex (Fig. 4D, *upper panel*, PD). This result raises the possibility of an effector-dependent mechanism that would contribute to  $G_{13}$  dissociation (Fig. 4E, effector-dependent dissociation of  $G_{13}$ ). After GST pulldown, the interaction of the RGL domain and  $G\alpha_{13}$ QL was confirmed by co-immunoprecipitation (Fig. 4D, *middle panel*, IP). Expression of transfected proteins was confirmed in lysates (total cell lysates (TCLs)). Together, these results are consistent with the idea that by maintaining stable

interactions with  $G\beta\gamma$ ,  $G\alpha_q$ QL and  $G\alpha_{13}$ QL decrease the availability of this signaling heterodimer to interact with P-REX1.

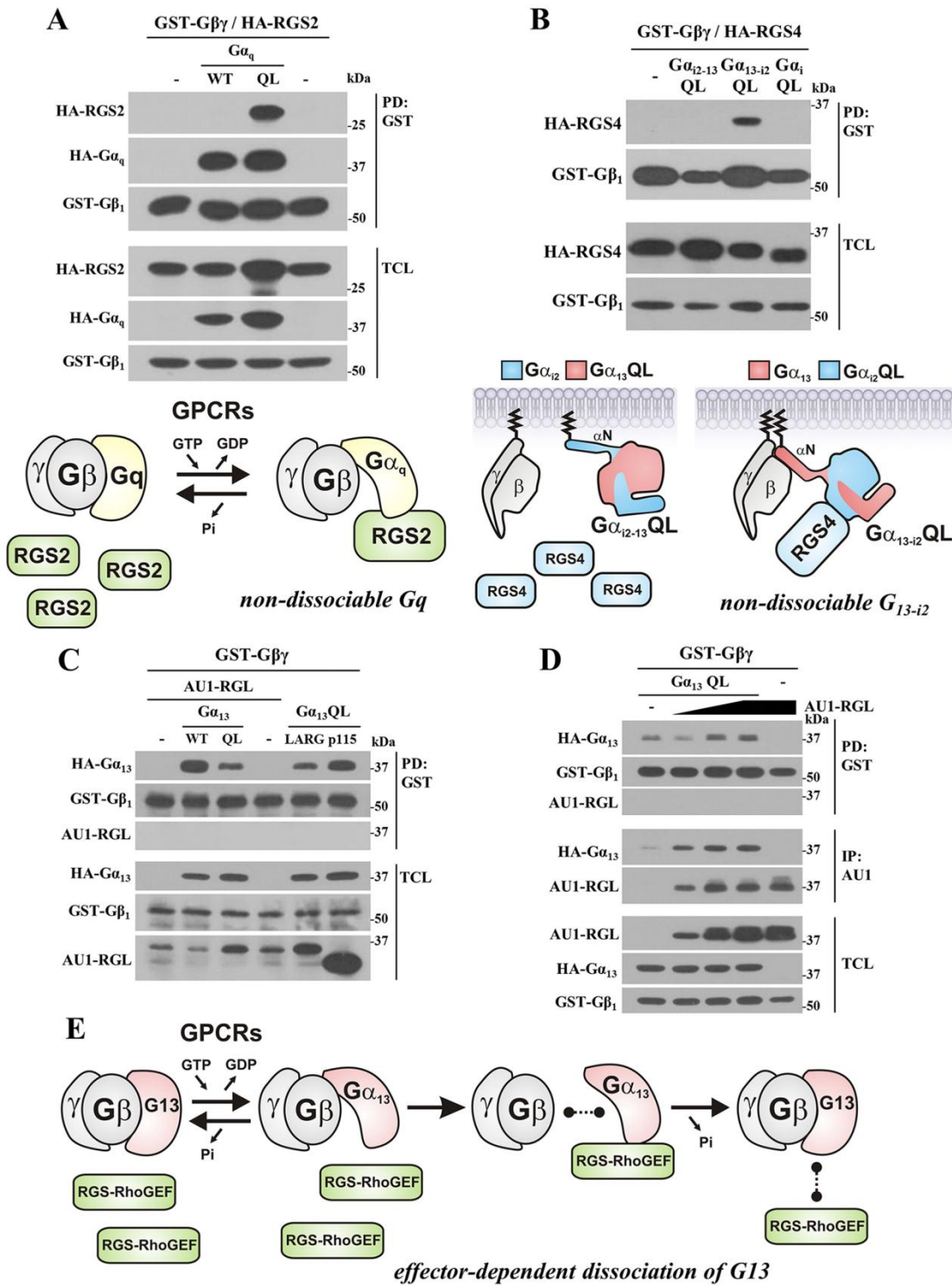
**GTPase-deficient  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  Q  $\rightarrow$  L mutants inhibit  $G\beta\gamma$ -dependent activation of P-REX1 and AKT and CXCR4-dependent cell migration**

Based on the demonstrated stable interactions between  $G\beta\gamma$  and  $G\alpha_q$ QL and  $G\alpha_{13}$ QL mutants, we postulated that these GTPase-deficient  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  mutants could negatively modulate  $G\beta\gamma$ -signaling to Rac by preventing  $G\beta\gamma$  interaction with P-REX1. We first confirmed in COS7 cells that  $G\beta\gamma$  overexpression activates P-REX1 and Rac (Fig. 5A, *first and second panels*, respectively; expression of transfected proteins was demonstrated in TCL). Active P-REX1 was detected by pull-down assays using nucleotide-free GST-RacG15A bound to GSH-Sepharose (34, 48). Then we evaluated the effect of  $G\alpha_q$ QL or  $G\alpha_{13}$ QL on the activation of P-REX1 and AKT by  $G\beta_1\gamma_2$ . As shown in Fig. 5B (*upper panel and graph*), P-REX1 activation elicited by  $G\beta_1\gamma_2$  overexpression in COS7 cells was lost when  $G\alpha_q$ QL or  $G\alpha_{13}$ QL were co-expressed. Interestingly,  $G\beta\gamma$  remained associated with the active fraction of P-REX1 only in the case that  $G\alpha_q$ QL or  $G\alpha_{13}$ QL were absent (Fig. 5B, Western blotting anti- $G\beta$  in PD). Consistent with previous reports (49-51),  $G\beta\gamma$  overexpression activated AKT (Fig. 5B, *lower panel and graph*). This effect was also attenuated by both  $G\alpha_q$ QL and  $G\alpha_{13}$ QL (Fig. 5B). Overexpression of  $G\beta\gamma$  was confirmed in total cell lysates, as well as expression of transfected HA- $G\alpha$  subunits and endogenous total and phosphorylated AKT (Fig. 5B, *TCL, lower panel*). We then tested whether this effect was due to a direct interference on the interaction between  $G\beta\gamma$  and P-REX1. We assessed this possibility in HEK293T cells transfected with GST- $G\beta_1\gamma_2$ , FLAG-P-REX1, and the Q  $\rightarrow$  L versions of  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  subunits. Then GST- $G\beta_1\gamma_2$  pulldown assays were used to detect, using anti-FLAG antibodies, P-REX1 bound to  $G\beta_1\gamma_2$ . As shown in Fig. 5C, GST- $G\beta_1\gamma_2$  interacted with FLAG-P-REX1, and this interaction was significantly lower in cells co-expressing  $G\alpha_q$ QL or  $G\alpha_{13}$ QL.

To test the effects of  $G\alpha_q$ QL and  $G\alpha_{13}$ QL on SDF-1-dependent migratory response, we first confirmed the participation of P-REX1 in CXCR4 signaling (32, 52). Initially, we directly assessed the activation of endogenous P-REX1 in MCF7 cells stimulated at different times with SDF-1 (Fig. 5D). Active P-REX1 was captured by pulldown using RacG15A, and endogenous  $G\beta\gamma$  and AKT, but not ERK, were detected in the pull-downs from SDF-1-stimulated cells. Expression of endogenous

**Figure 3.  $G\alpha_q$ -QL and  $G\alpha_{13}$ -QL but not  $G\alpha_q$ -QL or  $G\alpha_{13}$ -QL form stable complexes with  $G\beta\gamma$ .** A, chemotactic  $G_i$ -coupled receptors such as CXCR4 activate P-REX1 and the PI3K/AKT signaling pathway via  $G\beta\gamma$ . The drawing shows a hypothetical inhibitory effect of GTPase-deficient  $G\alpha$  subunits on  $G\beta\gamma$  signaling to P-REX1 and AKT. B, characterization of  $G\beta\gamma$  interaction with WT and GTPase-deficient  $G\alpha$  subunits in transfected HEK293T analyzed by pulldown of GST- $G\beta\gamma$  (*second panel*) and detection of HA-tagged  $G\alpha$  subunits associated to it (*upper panel*). C, pulldown assays of GST- $G\beta\gamma$  show that GTPase-deficient  $G\alpha_q$  ( $G\alpha_q$ QL, *upper panel*),  $G\alpha_{13}$  ( $G\alpha_{13}$ QL, *upper panel*), as well as WT versions of these GTPases ( $G\alpha_q$  WT and  $G\alpha_{13}$  WT), do interact with  $G\beta\gamma$  only when they are co-expressed (*Co-exp*) but not when lysates of cells independently transfected with these proteins were mixed (*Mixed*). E, the  $\alpha$ N-helix is critical to maintain GTPase-deficient  $G\alpha_{13}$ QL and  $G\alpha_{13-12}$ QL bound to  $G\beta\gamma$ . Pulldown assays of GST- $G\beta\gamma$  were followed by Western blotting to detect  $G\alpha_{13}$ QL and chimeric  $G\alpha_{13-12}$ QL or  $G\alpha_{12-13}$ QL using antibodies recognizing epitopes at the N- or C-regions of  $G\alpha_{13}$ QL. Expression of transfected proteins is confirmed in TCLs (*bottom panels*). F, schematic representation of G protein complexes highlighting the importance of the  $\alpha$ N-helix of  $G\alpha_{13}$  to maintain the interaction of this GTPase and chimeric  $G\alpha_{13-12}$ QL with  $G\beta\gamma$ . G, effects of  $G\alpha_{13}$ QL,  $G\alpha_{13-12}$ QL, or  $G\alpha_{12-13}$ QL on the actin cytoskeleton of endothelial porcine aortic endothelial cells. More than 90% of  $G\alpha_{13}$ QL and  $G\alpha_{12-13}$ QL transfected cells exhibited a contracted phenotype, whereas more than 95% EGFP and  $G\alpha_{13-12}$ QL-transfected cells showed an extended phenotype similar to untransfected cells. Transfected cells were fixed and stained with phalloidin. Arrowheads point to transfected cells in which EGFP (*inset*) was used as a marker. Scale bars, 25  $\mu$ m.

$G\alpha_q$ -QL and  $G\alpha_{13}$ -QL prevent  $G\beta\gamma$ -dependent P-REX1 activation





**$G\alpha_q$ -QL and  $G\alpha_{13}$ -QL prevent  $G\beta\gamma$ -dependent P-REX1 activation**

proteins and phosphorylation of ERK in response to SDF-1 was confirmed in total cell lysates (Fig. 5D, TCL). Then we confirmed the critical role of P-REX1 in Rac activation in the SDF-1–CXCR4 pathway in P-REX1 knockdown MCF7 cells. As shown in Fig. 5E, P-REX1 expression was required for SDF-1-dependent activation of Rac (upper panel and graph) and AKT, but not ERK (lower panel, pAKT and pERK, respectively). In addition, we proved that HGF, a growth factor receptor agonist, activates Rac1 via P-REX1 (Fig. 5E).

We next tested the effect of SDF-1 in wound-healing assays. We first compared the effect of SDF-1 in wound-healing assays in MCF7 and HeLa cells and selected the later because we did not detect a significant migratory response in MCF7 cells. Therefore, in HeLa cells, we initially confirmed that SDF-1 promotes cell migration via CXCR4 receptors in a  $G_i$ -dependent manner, as evidenced by the inhibitory effect of AMD3100 (10  $\mu$ g/ml), a CXCR4 antagonist, and PTX (200 ng/ml), known to inhibit  $G_i$  (Fig. 5F). The  $G_i$ -dependent migratory response of HeLa cells to SDF-1 was indeed inhibited by  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  Q  $\rightarrow$  L mutants (Fig. 5G). Cell confluence before scratch was comparable within migration assays. Furthermore, the inhibitory effect of  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  Q  $\rightarrow$  L mutants or PTX was not observed when cells were stimulated with 10% serum (Fig. 5H); therefore, the anti-migratory effect of  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  Q  $\rightarrow$  L mutants was specific on GPCR/ $G_i$ -dependent migration.

**Discussion**

$G\beta\gamma$  signaling to Rac and chemotactic cell migration is mainly associated to  $G_i$ -linked GPCRs (9, 11, 12), which raises the question of why other heterotrimeric G proteins, also containing  $G\beta\gamma$ , are less efficient to promote cytoskeletal reorganization, cell protrusion, and migration via P-REX1, a RacGEF directly activated by  $G\beta\gamma$  (18). Various mechanisms have been proposed to explain why  $G\beta\gamma$  signaling is more effective when it comes from  $G_i$ . These include the higher availability of  $G\beta\gamma$  caused by abundant expression of  $G_i$  (30, 31), existence of  $G_i$  heterotrimers as preassembled complexes with receptors and effectors (53), more effective dissociation of  $G_i$  compared with other heterotrimers (54), the influence of the subcellular localization (55, 56), and the nature of the  $G\gamma$  subunits (57), among other possibilities. Here, we tested the possibility that  $G\beta\gamma$  signaling to P-REX1, AKT, and cell migration might be directly regulated by Rho-activating  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  subunits, which would establish a signal coordination mechanism to prevent  $G\beta\gamma$ -dependent activation of Rac, known to oppose Rho-dependent cytoskeletal effects (27–29). We speculated that

GTPase-deficient  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  subunits might maintain stable interactions with  $G\beta\gamma$ , directly inhibiting it. Consistent with this possibility, we found that GTPase-deficient  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$ , but not  $G\alpha_i$  or  $G\alpha_s$  mutants, form stable complexes with  $G\beta\gamma$  preventing the activation of P-REX1, AKT, and cell migration by this signaling heterodimer. We propose the existence of direct regulatory interactions by which  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  subunits interfere with the  $G\beta\gamma$ –P-REX1–Rac1 signaling axis (Fig. 6). This model adds family-specific differences among G protein heterotrimers in terms of direct regulatory mechanisms preventing the activation  $G\beta\gamma$ -dependent pathways linked to actin cytoskeleton remodeling during cell extension, hence contributing to explaining the general observation that  $G_i$ -linked GPCRs are more effective in promoting chemotactic migration (12, 29, 58), which has been mainly attributed to the higher abundance of  $G_i$  heterotrimers (30, 31). Although we speculate that the effects of overexpressed  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  mutants on  $G\beta\gamma$  signaling reflect maintained association of active (GTP-bound) heterotrimers (as inferred by the direction of nucleotide exchange indicated in Fig. 6), we cannot rule out the possibility that some of these effects reflect sequestration of  $G\beta\gamma$  subunits by inactive (GDP-bound) QL heterotrimers.

To address the effect of different G proteins on  $G\beta\gamma$  signaling to P-REX1, we studied the regulation of this RacGEF by  $G_i$ / $G_q$ -coupled LPA receptors in MCF7 cells, in which  $G_i$ -dependent activation of P-REX1 has been previously demonstrated (32). We found that LPA receptors fine-tune P-REX1 activity via contrasting  $G_q$ - and  $G_i$ -dependent effects. Through  $G_q$ , LPA slightly activated P-REX1, whereas pharmacological inhibition of  $G_q$  made P-REX1 activation by LPA more efficient. Pertussis toxin not only prevented P-REX1 activation by  $G_i$  but also revealed the inhibitory action of LPA reducing active P-REX1 below its basal levels. Putatively this effect was mediated by  $G\alpha_q$ , whose chronic inhibition by RGS2 overexpression had the opposite effect, increasing the basal levels of active P-REX1.

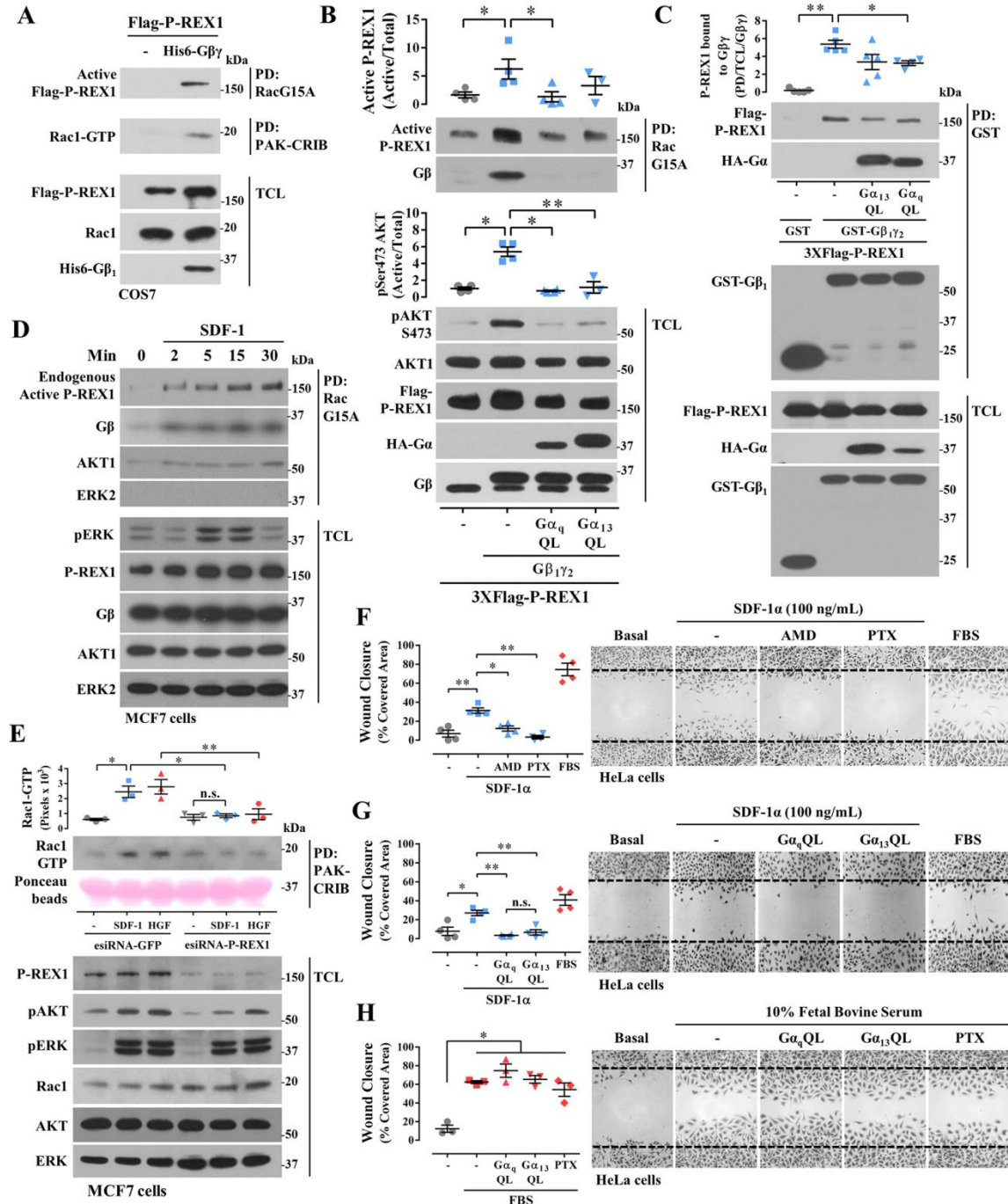
The N-terminal  $\alpha$ -helix of different  $G\alpha$  subunits interacts with  $G\beta\gamma$  (40, 41, 59, 60). Very interestingly, driver oncogenic mutations in  $G\beta$  have been found at the region known to interact with this  $G\alpha$  N-terminal  $\alpha$ -helix, rendering  $G\beta\gamma$  constitutively active because of a lack of interaction with  $G\alpha$  subunits from all families (61). Considering the recently revealed dynamics of  $G\alpha$  helical domain, it seems likely that the  $\alpha$ N helix, relevant to keep GTPase-deficient  $G\alpha$  subunits bound to  $G\beta\gamma$ , serves as a lever that sets the axis for the movement of the  $G\alpha$  helical domain. Molecular dynamics simulations revealed

**Figure 4.  $G\beta\gamma$  forms tetrameric complexes composed by  $G\beta\gamma$ – $G\alpha_q$ –RGS2 and  $G\beta\gamma$ – $G\alpha_{13,12}$ –RGS4, whereas  $G\alpha_{13}$  QL modulates its binding to  $G\beta\gamma$  by interacting with the RGS domain of its RhoGEF effectors.** A,  $G\alpha_q$  QL simultaneously interacts with RGS2 and  $G\beta\gamma$ . HEK293T cells transfected with GST– $G\beta\gamma$ , HA–RGS2, and either HA– $G\alpha_q$  QL or WT HA– $G\alpha_q$  (WT) or empty vector (–) were subjected to GST– $G\beta\gamma$  pulldowns followed by Western blotting that revealed a tetrameric complex composed by  $G\beta\gamma$ – $G\alpha_q$  QL–RGS2. Accordingly, the model at the bottom postulates that  $G_q$  adjusts its conformation to interact with RGS2 without releasing  $G\beta\gamma$ . B, HEK293T cells were transfected with GST– $G\beta\gamma$  and HA–RGS4 and either  $G\alpha_q$  QL, chimeric  $G\alpha_{13,12}$  QL,  $G\alpha_{12-13}$  QL, or empty vector (–) and subjected to GST pulldown analysis that revealed the existence of a tetrameric  $G\beta\gamma$ – $G\alpha_{13,12}$  QL–RGS4 complex illustrated at the bottom panel. C,  $G\alpha_{13}$  QL does not simultaneously interact with  $G\beta\gamma$  and the RGS-like (RGL) domains of PDZ–RhoGEF (RGL), LARG or p115–RhoGEF. GST– $G\beta\gamma$  revealed its interaction with  $G\alpha_{13}$  WT and  $G\alpha_{13}$  QL but not the RGS domain of RhoGEFs known as  $G\alpha_{13}$  effectors. D,  $G\alpha_{13}$  QL interacts with its RGL effector domain (from PDZ–RhoGEF) controlling its binding to  $G\beta\gamma$ . GST– $G\beta\gamma$  pulldown from HEK293T cells transfected with increasing amounts of RGL were used to detect the effect of this  $G\alpha_{13}$  QL effector on the association/dissociation of  $G\alpha_{13}$  QL to  $G\beta\gamma$ . The remaining lysates were used to confirm by immunoprecipitation the interaction between  $G\alpha_{13}$  QL and RGL (IP: AU1).  $G\alpha_{13}$  QL was revealed as part of independent complexes with  $G\beta\gamma$  and RGL in PD: GST and IP: AU1, respectively. In contrast to the finding of a stable complex including  $G\beta\gamma$ – $G\alpha_q$  QL and RGS2, no equivalent complex was detectable with  $G\beta\gamma$ – $G\alpha_{13}$  QL and the RGL (RGS-like) domains of RGS–RhoGEFs. E, model proposing an effector-dependent dissociation of  $G_{13}$ . It also considers a reciprocal regulation by the effector, consistent with the increased interaction between  $G\beta\gamma$  and  $G\alpha_{13}$  QL detected in the presence of increasing amounts of RGL.

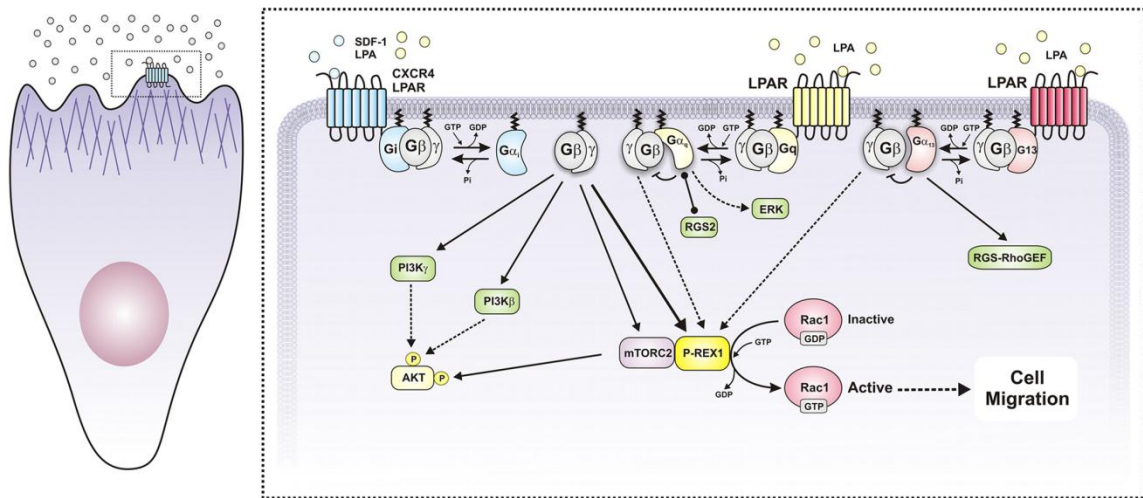
$G\alpha_q$ -QL and  $G\alpha_{13}$ -QL prevent  $G\beta\gamma$ -dependent P-REX1 activation

that  $G\alpha$  domains (helical and Ras homology) are constantly adjusting their distance from each other, reaching an almost open conformation nearly ready to release GDP. GPCRs stabi-

lize this open conformation (62). How does the communication between the helical and Ras-homology domains result in  $G\beta\gamma$  release after nucleotide exchange is currently unknown. An





$G\alpha_q$ -QL and  $G\alpha_{13}$ -QL prevent  $G\beta\gamma$ -dependent P-REX1 activation

**Figure 6. Cell migration elicited by chemotactic GPCRs via the  $G\beta\gamma$ -P-REX1-Rac pathway is mainly mediated by  $G_i$  over  $G_q$  or  $G_{13}$ , because of the tight control that  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  subunits exert on  $G\beta\gamma$ .** Based on our results, the model postulates that at the front of a migrating cell (left panel)  $G_i$ -coupled receptors release  $G\beta\gamma$  to activate P-REX1/Rac and actin polymerization to move the cell forward, whereas Rho activating  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  directly prevent  $G\beta\gamma$ -dependent activation of Rac via P-REX1, contributing to explaining the general observation that chemotactic signaling transduced by GPCRs occurs via  $G_i$ . Because all heterotrimeric G proteins contain  $G\beta\gamma$ , the lack of Rac activation by  $G_q$  and  $G_{13}$  is, according to our model, at least in part because of direct inhibition of  $G\beta\gamma$  signaling by its  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  counterparts. This model contributes to explaining why  $G\beta\gamma$  signaling is preferentially linked to  $G_i$ -coupled receptors, which so far has been mainly attributed to higher abundance of  $G_i$  heterotrimers.

interesting possibility is that in cases where  $G\beta\gamma$  signaling is restricted, effector proteins recognizing GTP-bound  $G\alpha$  subunits might facilitate their full dissociation from  $G\beta\gamma$ . Although  $G\beta\gamma$  would be expected to be excluded from complexes formed by active  $G\alpha$  subunits and RGS proteins (42), our results demonstrating the existence of tetrameric  $G\beta\gamma$ - $G\alpha_q$ -QL-RGS2 and  $G\beta\gamma$ - $G\alpha_{13-12}$ -QL-RGS4 complexes supports an important role for the  $\alpha N$  helix of  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$ , regulating its rate of dissociation from  $G\beta\gamma$ , because a conformational change is implied, based on available structures (63, 64), to explain the existence of these tetramers. Then to release  $G\beta\gamma$ , this interacting interface has to be disrupted. In this sense, it has been observed that RGS3 and RGS4 increase available  $G\beta\gamma$  to regulate inwardly rectifying  $K^+$  channels (65). Furthermore, our findings are consistent with the dynamics of  $G_{13}$  recently reported by Büneemann and co-workers (66), who demonstrated by FRET that upon receptor activation,  $G\alpha_{13}$  is not fully dissociated from  $G\beta\gamma$ . Interestingly, interaction of  $G\alpha_{13}$  with LARG resulted in a

decreased FRET signal between  $G\alpha_{13}$  and  $G\beta\gamma$  (66). These results and our biochemical data and profile of P-REX1 activation by  $G\beta\gamma$  in the presence of GTPase-deficient  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  might be interpreted in terms of the differential ability of these  $G\alpha$  subunits to directly control  $G\beta\gamma$  heterodimers. Thus, in the case of  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$ , we speculate that receptor-promoted nucleotide exchange leads to interaction of effectors with GTP-bound  $G\alpha$ , while keeping  $G\beta\gamma$  dimers inactive or less available to interact with their downstream effectors.

The fact that CXCR4 receptors normally transduce chemotactic signals via  $G\beta\gamma$  released from  $G_i$ , even though they might also be coupled to  $G_q$  and  $G_{12/13}$ , is consistent with our observations that GTPase-deficient  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  directly interact with  $G\beta\gamma$  and inhibit its interaction with P-REX1, which plays a central role in SDF-1 $\alpha$ -CXCR4 chemotactic effect (32, 52). Observations that  $G_q$ -coupled receptors are not chemotactic, whereas  $G_{13}$ -coupled receptors have a chemotactic role linked to their expression levels, as in the case of CXCR4 overex-

**Figure 5. GTPase-deficient  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  (Q  $\rightarrow$  L mutants) inhibit  $G\beta\gamma$ -dependent activation of P-REX1, AKT, and  $G_i$ -dependent cell migration.** A,  $G\beta\gamma$  activates P-REX1 and Rac1. Active P-REX1 and Rac were detected by pull-down in COS7 cells expressing FLAG-P-REX1 and His $_6$ - $G\beta\gamma$ . B, GTPase-deficient  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  inhibit  $G\beta\gamma$ -dependent P-REX1 activation (upper panel) and AKT (lower panel). The graphs represent the means  $\pm$  S.E. densitometric value of three to four independent experiments. \*,  $p < 0.05$ , t test. Lower graph, \*,  $p = 0.029$ ; \*\*,  $p = 0.005$ , Mann-Whitney tests. C, GTPase-deficient  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  inhibit the interaction between  $G\beta\gamma$  and P-REX1. The graph represents the means  $\pm$  S.E. densitometric value of P-REX1 interacting with  $G\beta\gamma$  obtained in four to five independent experiments. \*,  $p = 0.006$ ; \*\*,  $p < 0.001$  (t tests). D, representative time course of P-REX1 activation by SDF-1/CXCL12 in MCF7 cells. Active endogenous P-REX1 was detected by pull-down using RacG15A. Endogenous  $G\beta\gamma$  and AKT interacting with active P-REX1 were revealed in the respective pull-down in which ERK was not detectable. Four independent experiments showed interacting  $G\beta\gamma$  and AKT with the active fraction of P-REX1. E, SDF-1-CXCL12 and HGF activate Rac via P-REX1. MCF7 cells were transfected with esiRNA-P-REX1 (consisting on a mixture of siRNAs) or esiRNA-GFP (as control) and activation of endogenous Rac, AKT, and ERK was detected by PAK-CRIB pull-down (for active Rac) and Western blotting against phosphorylated AKT and ERK in cells stimulated with SDF-1-CXCL12 (50 ng/ml) or HGF (10 ng/ml) for 5 min. The graph represents the mean densitometric values  $\pm$  S.E. of three independent experiments showing the fraction of active Rac. \*,  $p = 0.003$ ; \*\*,  $p < 0.001$ ; n.s., no significance (two-way ANOVA followed Tukey). A-E, expression of transfected and endogenous proteins was detected in TCLs. F, SDF-1/CXCL12 promotes  $G_i$ -dependent cell migration via CXCR4 receptors. Wound-closure experiments were done with HeLa cells stimulated with SDF-1/CXCL12 (100 ng/ml) alone or with AMD3100 (10  $\mu$ g/ml, a CXCR4 antagonist), or PTX (200 ng/ml,  $G_i$  inhibitor), added 1 h before stimulation, or FBS (10%). G, GTPase-deficient  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  Q  $\rightarrow$  L mutants inhibit cell migration induced by SDF-1/CXCL12 (100 ng/ml) ( $G_i$ ), but not by fetal bovine serum (10%) (H). The graphs at the left represent the means  $\pm$  S.E. of four independent experiments. F, \*,  $p = 0.002$ ; \*\*,  $p < 0.001$ . G, n.s., no significance; \*,  $p = 0.013$ ; \*\*,  $p < 0.01$ . H, \*,  $p < 0.001$  one-way ANOVA followed Tukey.



### $G\alpha_q$ -QL and $G\alpha_{13}$ -QL prevent $G\beta\gamma$ -dependent P-REX1 activation

pressed in various metastatic cancers (21), further indicate that  $G\beta\gamma$  signaling might be regulated by  $G\alpha_q$  and  $G\alpha_{13}$  depending on their levels of activity. This is also supported by our experiments showing that pharmacological inhibition of  $G\alpha_q$  enhances P-REX1 signaling upon activation of  $G_q/G_i$ -coupled LPA receptors and by the assays using the DREADD systems. In the latter, we demonstrated that under comparable settings,  $G_i$ -coupled but not  $G_q$ -coupled receptors activate P-REX1. Furthermore, we found that AKT was activated by  $G_i$  as part of an interplay with the active fraction of P-REX1. Indeed, AKT stimulation was reduced in P-REX1 knockdown cells, suggesting that P-REX1 serves as a signaling platform for AKT activation, likely coordinated by distinct domains within this RacGEF. These findings are consistent with previous observations in which the activation of AKT1 by insulin-like growth factor requires P-REX1 (67), which responds to mTORC2 signaling (67, 68).

GTPase-deficient  $G\alpha$  subunits with inactivating mutations that impair GTP hydrolysis have been widely used as constitutively active mutants to reveal fundamental signaling mechanisms by different families of G proteins (69–75). Very recently, this approach successfully revealed a mechanism elicited by  $G\alpha_i$  to inhibit Rap-dependent cell adhesion promoting cell migration (75). In addition, recent deep sequencing analysis of cancer genomes revealed that some GTPase-deficient  $G\alpha$  subunits are driver oncogenes (76–78). Remarkably, oncogenic  $G\beta$  mutants constitutively activate the PI3K/mTOR signaling pathway (61), which is consistent with the recent demonstrated ability of  $G\beta\gamma$  to stimulate AKT and interact with mTOR directly promoting its activation (79).

In conclusion, our results reveal that  $G\alpha_q$ QL and  $G\alpha_{13}$ QL mutants inhibit  $G\beta\gamma$ -dependent P-REX1 and AKT activation and cell migration induced by the SDF-1–CXCR4– $G_i$  axis. In the case of  $G\alpha_{13}$ , the N-terminal  $\alpha$ -helix of this  $G\alpha$  subunit is critical to keep a stable complex with  $G\beta\gamma$ , thus contributing to our understanding of the prominent role of the  $G\beta\gamma$ -interacting site located at this region of  $G\alpha$  to control  $G\beta\gamma$  signaling. Furthermore, the finding that  $G\alpha_q$ QL simultaneously interacts with RGS2 and  $G\beta\gamma$  indicates that this  $G\alpha$  subunit is able to recognize its signaling partners while preventing  $G\beta\gamma$  from doing the same.

#### Experimental procedures

##### Cell culture and transfection

HEK293T, MCF7, COS7, and HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS and antibiotics (Invitrogen, catalog no. 15240112), at 37 °C in a 5%  $CO_2$  atmosphere. In the case of HEK293T cells, 1 day before transfection, they were seeded on poly-D-lysine-coated dishes. HEK293T and COS7 cells were transfected with Lipofectamine Plus (Invitrogen, catalog nos. 18324-20 and 11514-015); MCF7 cells were transfected with TurboFect (Thermo Scientific, catalog no. R0531) according to the manufacturer's instructions. All experiments were done 48 h post-transfection using the indicated previously described plasmids: pCEFL-GST- $G\beta_1$ , pCEFL-3XFLAG- $G\beta_1$ , His<sub>6</sub>- $G\beta_1$ , His<sub>6</sub>- $G\gamma_2$ , pCEFL- $G\gamma_2$ , pCEFL-EGFP, pCEFL-HA- $G\alpha_{12}$ WT, pCEFL-HA- $G\alpha_{12}$ Q205L, pCEFL-HA-

$G\alpha_s$ WT, pCEFL-HA- $G\alpha_s$ Q227L, pCEFL-HA- $G\alpha_q$ WT, pCEFL-HA- $G\alpha_q$ Q209L, pCEFL-HA- $G\alpha_{13}$ WT, pCEFL-HA- $G\alpha_{13}$ Q226L, pCEFL-3XFLAG-P-REX1, pcDNA3.1- $G\alpha_q$ WT, pcDNA3.1- $G\alpha_{13}$ WT, pcDNA3.1- $G\alpha_q$ Q209L, pcDNA3.1- $G\alpha_{13}$ Q226L, pcDNA3.1- $G\alpha_{13}$ SW- $C\alpha_{12}$ Q205L, pcDNA3.1- $G\alpha_{12}$ SW- $C\alpha_{13}$ Q226L, pCEFL-HA-RGS2, AU1-RGL-PDZ-RhoGEF, AU1-RGS-p115RhoGEF, AU1-RGS-LARG, HA- $G_i$ -DREADD, and HA- $G_q$ -DREADD (34, 43, 49, 50, 68, 79, 80).

##### GST pulldown assays and immunoprecipitations

Pulldowns were performed with lysates of HEK293T cells transfected with GST- $G\beta_1/\gamma_2$  using GSH-Sepharose 4B (GE Healthcare, catalog no. 17-0756-05). The cells were starved for 14 h and lysed with 1.0 ml of TBS–Triton (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100) containing 5 mM EDTA, and protease inhibitors: 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, and 10  $\mu$ g/ml aprotinin; and phosphatase inhibitors: 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM NaF, and 1 mM sodium orthovanadate. Lysates were transferred to 1.5-ml tubes and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4 °C. A fraction of lysates was diluted with 4 $\times$  Laemmli buffer containing  $\beta$ -mercaptoethanol, boiled for 5 min, and centrifuged 5 min/13,000 rpm before Western blots. The rest was used for pull-down or immunoprecipitation assays as described.

Lysates in 1.5-ml tubes were incubated with 30  $\mu$ l of GSH-Sepharose beads for 30 min in an ice bath with constant shaking. Then beads were washed three times with lysis buffer, boiled for 5 min in 1 $\times$  Laemmli buffer with  $\beta$ -mercaptoethanol, and centrifuged for 5 min at 13,000 rpm before being subjected to Western blotting analysis.

For immunoprecipitations, cell lysates obtained from HEK293T cells transfected with HA- $G\alpha_{13}$  and AU1-RGL (RGS-like domain from PDZ-RhoGEF) were incubated with anti-AU1 (1:1000) in ice/rocking platform overnight at 4 °C. Next day, 30  $\mu$ l of protein G-Sepharose (Millipore, catalog no. 16-266) were added, and incubation continued for 3 h. The beads were washed three times with lysis buffer and subjected to Western blotting analysis.

##### Western blotting

Cell lysates, immunoprecipitates, and protein pulldowns were loaded and separated on SDS-PAGE gels, transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, catalog no. IPV00010), blocked with 5% milk with 1 $\times$  TBS and 0.05% Tween, and incubated overnight at 4 °C on a shaker, with primary antibodies. Then membranes were washed three times with TBS and 0.05% Tween and incubated with secondary antibodies (anti-mouse or anti-rabbit) in milk with TBS and Tween for 1 h. Finally, the filters were washed with TBS and Tween and revealed using Immobilon Western Chemiluminescent horseradish peroxidase substrate (Millipore, catalog no. WBKLS0500). Antibodies were from the following sources: Covance (HA and AU1); Sigma (His, F3165; FLAG, H-1029; P-REX1, HPA001927; AKT1, P2482); Santa Cruz Biotechnology (GST, catalog no. sc-138; GFP, catalog no. sc-9996,  $G\alpha_{13}$ -N, catalog no. sc-410;  $G\alpha_q$ , catalog no. sc-392;  $G\beta$ , catalog no. sc-261; ERK2, catalog no. sc-154; phospho-AKT1/2/3 Ser473, catalog no. sc-7985-R); serum anti- $G\alpha_{13}$ -C (43), Transduction Laboratories (Rac1, cat-

**$G\alpha_q$ -QL and  $G\alpha_{13}$ -QL prevent  $G\beta\gamma$ -dependent P-REX1 activation**

alog no. 610651), Cell Signaling (P-REX1, catalog no. 13168S; phospho-ERK1/2 T202/Y204, catalog no. 9191), and KPL (anti-mouse, catalog no. 074-1802; anti-rabbit, catalog no. 074-1516).

**P-REX1 knockdown in MCF7 cells**

Reverse transfection of MCF7 cells was performed with Lipofectamine RNAiMAX and 30 pmol of esiRNA-P-REX1 (Sigma-Aldrich, catalog no. EHU136571) or esiRNA-EGFP (Sigma-Aldrich, catalog no. EHUEGFP), as control; siRNA against P-REX1 is in fact a pool including a heterogeneous mixture of siRNAs (esiRNAs are endoribonuclease-prepared siRNAs). Lipofectamine and esiRNA mixes were prepared in OptiMEM, according to the manufacturer's instructions. The cells were trypsinized and suspended in DMEM containing 5% FBS without antibiotics, then Lipofectamine-esiRNA complexes were added, and cells were seeded on p60 dishes and incubated overnight at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Next day, the cells were washed with PBS and cultured with DMEM containing 10% FBS and antibiotics. Experiments with knockdown cells were done 72 h after transfection. The cells were starved in serum-free medium for 18 h before being stimulated for 5 min with CXCL12-SDF-1 $\alpha$  (50 ng/ml, PeproTech, catalog no. 300-28A) or HGF (10 ng/ml hepatocyte growth factor recombinant human; RD Systems, catalog no. 294-HGN), before lysis.

**Chemogenetic strategy with  $G_i$ -DREADD and  $G_q$ -DREADD**

COS7 and MCF7 cells were transfected with empty vector,  $G_i$ -DREADD or  $G_q$ -DREADD specifically coupled to  $G_i$  or  $G_q$ . Then cells were stimulated 48 h after with CNO, a synthetic ligand for DREADD (Tocris, catalog no. 4936) as indicated in Fig. 4. To confirm the signaling specificity of  $G_i$ - and  $G_q$ -DREADD, serum-starved transfected cells were incubated overnight with pertussis toxin (100 ng/ml,  $G_i$  inhibitor), or 2 h with the  $G_q$  inhibitor (FR900359, 500 nM), before stimulation with CNO. In experiments in which PKC was inhibited, 1  $\mu$ M sotrastaurin was preincubated for 2 h before stimulation with 5  $\mu$ M LPA (Biomol, catalog no. LP-100).

**Active Rac-GTP and RhoGEF pulldowns**

The cells transfected with P-REX1,  $G\beta_1\gamma_2$  and  $G\alpha_q$ QL or  $G\alpha_{13}$ QL were starved for 14 h with serum-free DMEM before lysis. Then to capture Rac-GTP, cell lysates were incubated with PAK-PBD-Sepharose beads for 45 min on ice/shaker (68). Active P-REX1 was isolated from cell lysates incubated with RacG15A-Sepharose beads for 1.5 h. The beads were washed three times with lysis buffer and processed for Western blotting analysis (34, 48). For DREADD experiments, when evaluated  $G_i$ -DREADD versus  $G_q$ -DREADD, the cells were stimulated for 15 min with 1  $\mu$ M CNO, before lysis to detect active P-REX1 by pulldown. To address the effect of RGS2 in MCF7 cells, HA-RGS2-transfected cells were selected with 500  $\mu$ g/ml G418 (Sigma, catalog no. A1720) for 4 days before analysis

**Wound-closure assay**

HeLa cells were seeded on 0.02% gelatin in p35 6-well plates and transfected using PolyFect (Qiagen, catalog no. 301105) with empty vector,  $G\alpha$  subunits,  $G_i$ -DREADD, or  $G_q$ -DREADD

as indicated in the respective figures. The cells were starved with serum-free DMEM for 4 h. After 2 h of starvation, mitomycin C was added (12  $\mu$ M, Sigma-Aldrich, catalog no. M0440). Pertussis toxin (200 ng/ml, Calbiochem, catalog no. 516560) or AMD3100 (10  $\mu$ g/ml, Sigma-Aldrich, catalog no. A5602) were used to assess signaling by  $G_i$  and CXCR4, respectively. To initiate the migration assays, cell monolayers were wounded with a pipette tip, washed three times with PBS, and subjected to stimulation with CXCL12-SDF-1 $\alpha$  (100 ng/ml, PeproTech, catalog no. 300-28A) or 10% FBS in 2 ml of DMEM containing the indicated inhibitors. Migration in  $G_i$ - and  $G_q$ -DREADD-transfected cells was assessed with 1  $\mu$ M CNO. After 24 h, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde, stained with crystal violet, washed with PBS, and photographed.

**Fluorescence microscopy**

Porcine aortic endothelial cells seeded on gelatin-coated glass-bottomed dishes were transfected with  $G\alpha_{13}$ QL or the indicated chimeras using Polyfect. pCEFL-EGFP was included as a marker to identify transfected cells. 48 h post-transfection, the cells were starved for 8 h and fixed in 4% paraformaldehyde, washed with PBS, and stained with phalloidin and 4',6'-diamino-2-phenylindole. The cells were photographed in a Nikon Eclipse Ti inverted fluorescence microscope.

**Statistical analysis**

The data are presented as means  $\pm$  S.E. of at least three to five independent experiments. Densitometric quantitation of Western blots and wound-closure assays was done with ImageJ software. Active proteins, phosphorylated proteins, interactions in pulldowns were normalized with total proteins and pulldown efficiency. Test and control samples in the functional assays were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed Tukey tests, and the Western blots were compared with *t* test or Mann-Whitney, one-way and two-way ANOVA followed by Dunnett or Tukey, as indicated in figure legends. Statistical significance was considered for values of *p* < 0.05. Statistical analysis was performed using Sigma Plot 11.0 and graphs using GraphPad Prism software V6.0.

**Data availability statement**

Any reasonable request for materials, data, and associated protocols originally described in this work will be available to readers without undue qualifications in material transfer agreements.

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

**Acknowledgments**—Technical assistance provided by Estanislao Escobar-Islas, Margarita Valadez-Sanchez, David Pérez-Rangel, and Jaime Estrada-Trejo is acknowledged.



$G\alpha_q$ -QL and  $G\alpha_{13}$ -QL prevent  $G\beta\gamma$ -dependent P-REX1 activation

## References

- Devreotes, P., and Horwitz, A. R. (2015) Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a005959 [CrossRef Medline](#)
- Jin, T. (2013) Gradient sensing during chemotaxis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 532–537 [CrossRef Medline](#)
- Kitamura, T., Qian, B. Z., and Pollard, J. W. (2015) Immune cell promotion of metastasis. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 73–86 [CrossRef Medline](#)
- Vázquez-Prado, J., Bracho-Valdés, I., Cervantes-Villagrana, R. D., and 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 [CrossRef Medline](#)
- Dillenburg-Pilla, P., Patel, V., Mikelis, C. M., Zárate-Bladés, C. R., Doçi, C. L., Amornphimoltham, P., Wang, Z., Martin, D., Leelahavanichkul, K., Dorsam, R. T., Masedunskas, A., Weigert, R., Molinolo, A. A., and Gutkind, J. S. (2015) SDF-1/CXCL12 induces directional cell migration and spontaneous metastasis via a CXCR4/ $G\alpha_i$ /mTORC1 axis. *FASEB J.* **29**, 1056–1068 [CrossRef Medline](#)
- Hao, F., Tan, M., Xu, X., Han, J., Miller, D. D., Tigyi, G., and Cui, M. Z. (2007) Lysophosphatidic acid induces prostate cancer PC3 cell migration via activation of LPA(1), p42 and p38 $\alpha$ . *Biochim. Biophys. Acta* **1771**, 883–892 [CrossRef Medline](#)
- Tan, W., Martin, D., and Gutkind, J. S. (2006) The  $G\alpha_{13}$ -Rho signaling axis is required for SDF-1-induced migration through CXCR4. *J. Biol. Chem.* **281**, 39542–39549 [CrossRef Medline](#)
- Sotsios, Y., Whittaker, G. C., Westwick, J., and Ward, S. G. (1999) The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a  $G_i$ -coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes. *J. Immunol.* **163**, 5954–5963 [Medline](#)
- Neptune, E. R., Iiri, T., and Bourne, H. R. (1999)  $G\alpha_i$  is not required for chemotaxis mediated by  $G_i$ -coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **274**, 2824–2828 [CrossRef Medline](#)
- Neptune, E. R., and Bourne, H. R. (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. U.S.A.* **94**, 14489–14494 [CrossRef Medline](#)
- Arai, H., Tsou, C. L., and Charo, I. F. (1997) Chemotaxis in a lymphocyte cell line transfected with C-C chemokine receptor 2B: evidence that directed migration is mediated by  $\beta\gamma$  dimers released by activation of  $G\alpha_i$ -coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 14495–14499 [CrossRef Medline](#)
- Park, J. S., Rhau, B., Hermann, A., McNally, K. A., Zhou, C., Gong, D., Weiner, O. D., Conklin, B. R., Onuffer, J., and Lim, W. A. (2014) Synthetic control of mammalian-cell motility by engineering chemotaxis to an orthogonal bioinert chemical signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 5896–5901 [CrossRef Medline](#)
- Stephens, L. R., Eguinoa, A., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Cooke, F., Coadwell, J., Smrcka, A. S., Thelen, M., Cadwallader, K., Tempst, P., and Hawkins, P. T. (1997) The  $G\beta\gamma$  sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* **89**, 105–114 [CrossRef Medline](#)
- Leopoldt, D., Hanck, T., Exner, T., Maier, U., Wetzker, R., and Nürnberg, B. (1998)  $G\beta\gamma$  stimulates phosphoinositide 3-kinase- $\gamma$  by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit. *J. Biol. Chem.* **273**, 7024–7029 [CrossRef Medline](#)
- Dbouk, H. A., Vadas, O., Shymanets, A., Burke, J. E., Salamon, R. S., Khalil, B. D., Barrett, M. O., Waldo, G. L., Surve, C., Hsueh, C., Perisic, O., Harteneck, C., Shepherd, P. R., Harden, T. K., Smrcka, A. V., et al. (2012) G protein-coupled receptor-mediated activation of p110 $\beta$  by  $G\beta\gamma$  is required for cellular transformation and invasiveness. *Sci. Signal.* **5**, ra89 [Medline](#)
- Li, Z., Hannigan, M., Mo, Z., Liu, B., Lu, W., Wu, Y., Smrcka, A. V., Wu, G., Li, L., Liu, M., Huang, C. K., and Wu, D. (2003) Directional sensing requires  $G\beta\gamma$ -mediated PAK1 and PIX  $\alpha$ -dependent activation of Cdc42. *Cell* **114**, 215–227 [CrossRef Medline](#)
- Houslay, D. M., Anderson, K. E., Chessa, T., Kulkarni, S., Fritsch, R., Downward, J., Backer, J. M., Stephens, L. R., and Hawkins, P. T. (2016) Coincident signals from GPCRs and receptor tyrosine kinases are uniquely transduced by PI3K $\beta$  in myeloid cells. *Sci. Signal.* **9**, ra82 [CrossRef Medline](#)
- Welch, H. C., Coadwell, W. J., Ellson, C. D., Ferguson, G. J., Andrews, S. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hawkins, P. T., and Stephens, L. R. (2002) P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P $_3$ - and  $G\beta\gamma$ -regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell* **108**, 809–821 [CrossRef Medline](#)
- Donald, S., Hill, K., Lecureuil, C., Barnouin, R., Krugmann, S., John Coadwell, W., Andrews, S. R., Walker, S. A., Hawkins, P. T., Stephens, L. R., and Welch, H. C. (2004) P-Rex2, a new guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *FEBS Lett.* **572**, 172–176 [CrossRef Medline](#)
- Rosenfeldt, H., Vázquez-Prado, J., and Gutkind, J. S. (2004) P-REX2, a novel PI-3-kinase sensitive Rac exchange factor. *FEBS Lett.* **572**, 167–171 [CrossRef Medline](#)
- Yagi, H., Tan, W., Dillenburg-Pilla, P., Armando, S., Amornphimoltham, P., Simaan, M., Weigert, R., Molinolo, A. A., Bouvier, M., and Gutkind, J. S. (2011) A synthetic biology approach reveals a CXCR4-G13-Rho signaling axis driving transendothelial migration of metastatic breast cancer cells. *Sci. Signal.* **4**, ra60 [Medline](#)
- Hart, M. J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W. D., Gilman, A. G., Sternweis, P. C., and Bollag, G. (1998) Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by  $G\alpha_{13}$ . *Science* **280**, 2112–2114 [CrossRef Medline](#)
- Fukuhara, S., Chikumi, H., and Gutkind, J. S. (2000) Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor (LARG) links heterotrimeric G proteins of the  $G_{12}$  family to Rho. *FEBS Lett.* **485**, 183–188 [CrossRef Medline](#)
- Fukuhara, S., Murga, C., Zohar, M., Igishi, T., and Gutkind, J. S. (1999) A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J. Biol. Chem.* **274**, 5868–5879 [CrossRef Medline](#)
- Lutz, S., Freichel-Blomquist, A., Yang, Y., Rümennapp, U., Jakobs, K. H., Schmidt, M., and Wieland, T. (2005) The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between  $G_{q/11}$ -coupled receptor signaling and RhoA. *J. Biol. Chem.* **280**, 11134–11139 [CrossRef Medline](#)
- Rojas, R. J., Yohe, M. E., Gershburg, S., Kawano, T., Kozasa, T., and 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 [CrossRef Medline](#)
- Reinhard, N. R., Mastop, M., Yin, T., Wu, Y., Bosma, E. K., Gadella, T. W. J., Jr, Goedhart, J., and Hordijk, P. L. (2017) The balance between  $G\alpha_i$ -Cdc42/Rac and  $G\alpha_{12/13}$ -RhoA pathways determines endothelial barrier regulation by sphingosine-1-phosphate. *Mol. Biol. Cell* **28**, 3371–3382 [CrossRef Medline](#)
- Sugimoto, N., Takuwa, N., Okamoto, H., Sakurada, S., and Takuwa, Y. (2003) Inhibitory and stimulatory regulation of Rac and cell motility by the  $G_{12/13}$ -Rho and  $G_i$  pathways integrated downstream of a single G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor isoform. *Mol. Cell Biol.* **23**, 1534–1545 [CrossRef Medline](#)
- Xu, J., Wang, F., Van Keymeulen, A., Herzmark, P., Straight, A., Kelly, K., Takuwa, Y., Sugimoto, N., Mitchison, T., and Bourne, H. R. (2003) Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell* **114**, 201–214 [CrossRef Medline](#)
- Smrcka, A. V. (2008) G protein  $\beta\gamma$  subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 2191–2214 [CrossRef Medline](#)
- Keohl, J. H. (2016) The impact of RGS and other G-protein regulatory proteins on  $G\alpha_i$ -mediated signaling in immunity. *Biochem. Pharmacol.* **114**, 40–52 [CrossRef Medline](#)
- Sosa, M. S., Lopez-Haber, C., Yang, C., Wang, H., Lemmon, M. A., Busillo, J. M., Luo, J., Benovic, J. L., Klein-Szanto, A., Yagi, H., Gutkind, J. S., Parsons, R. E., and Kazanietz, M. G. (2010) Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an essential mediator of ErbB signaling in breast cancer. *Mol. Cell* **40**, 877–892 [CrossRef Medline](#)
- Moolenaar, W. H., van Meeteren, L. A., and Giepmans, B. N. (2004) The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays* **26**, 870–881 [CrossRef Medline](#)
- Chávez-Vargas, L., Adame-García, S. R., Cervantes-Villagrana, R. D., Castillo-Kaul, A., Bruystens, J. G., Fukuhara, S., Taylor, S. S., Mochizuki, N.,

**$G\alpha_q$ -QL and  $G\alpha_{13}$ -QL prevent  $G\beta\gamma$ -dependent P-REX1 activation**

- Reyes-Cruz, G., and Vázquez-Prado, J. (2016) Protein kinase A (PKA) type I interacts with P-Rex1, a Rac guanine nucleotide exchange factor: effect on PKA localization and P-Rex1 signaling. *J. Biol. Chem.* **291**, 6182–6199 [CrossRef Medline](#)
35. Schrage, R., Schmitz, A. L., Gaffal, E., Annala, S., Kehraus, S., Wenzel, D., Büllsbach, K. M., Bald, T., Inoue, A., Shinjo, Y., Galandrin, S., Shridhar, N., Hesse, M., Grundmann, M., Merten, N., *et al.* (2015) The experimental power of FR900359 to study  $G_q$ -regulated biological processes. *Nat. Commun.* **6**, 10156 [CrossRef Medline](#)
36. Heximer, S. P., Watson, N., Linder, M. E., Blumer, K. J., and Hepler, J. R. (1997) RGS2/GOS8 is a selective inhibitor of  $G_q\alpha$  function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 14389–14393 [CrossRef Medline](#)
37. Coward, P., Wada, H. G., Falk, M. S., Chan, S. D., Meng, F., Akil, H., and Conklin, B. R. (1998) Controlling signaling with a specifically designed  $G_i$ -coupled receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 352–357 [CrossRef Medline](#)
38. Conklin, B. R., Hsiao, E. C., Claeysen, S., Dumuis, A., Srinivasan, S., Forsayeth, J. R., Guettier, J. M., Chang, W. C., Pei, Y., McCarthy, K. D., Nisenson, R. A., Wess, J., Bockaert, J., and Roth, B. L. (2008) Engineering GPCR signaling pathways with RASSLs. *Nat. Methods* **5**, 673–678 [CrossRef Medline](#)
39. Hill, K., Krugmann, S., Andrews, S. R., Coadwell, W. J., Finan, P., Welch, H. C., Hawkins, P. T., and Stephens, L. R. (2005) Regulation of P-Rex1 by phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate and  $G\beta\gamma$  subunits. *J. Biol. Chem.* **280**, 4166–4173 [CrossRef Medline](#)
40. Lambright, D. G., Sondek, J., Böhm, A., Skiba, N. P., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* **379**, 311–319 [CrossRef Medline](#)
41. Wall, M. A., Coleman, D. E., Lee, E., Iniguez-Lluhi, J. A., Posner, B. A., Gilman, A. G., and Sprang, S. R. (1995) The structure of the G protein heterotrimer  $G_{\alpha}\beta\gamma_2$ . *Cell* **83**, 1047–1058 [CrossRef Medline](#)
42. Sprang, S. R. (2016) Activation of G proteins by GTP and the mechanism of  $G\alpha$ -catalyzed GTP hydrolysis. *Biopolymers* **105**, 449–462 [CrossRef Medline](#)
43. Vázquez-Prado, J., Miyazaki, H., Castellone, M. D., Teramoto, H., and Gutkind, J. S. (2004) Chimeric  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$  proteins reveal the structural requirements for the binding and activation of the RGS-like (RGL)-containing Rho guanine nucleotide exchange factors (GEFs) by  $G\alpha_{13}$ . *J. Biol. Chem.* **279**, 54283–54290 [CrossRef Medline](#)
44. Flock, T., Ravarani, C. N. J., Sun, D., Venkatakrisnan, A. J., Kayikci, M., Tate, C. G., Vepritsnev, D. B., and Babu, M. M. (2015) Universal allosteric mechanism for  $G\alpha$  activation by GPCRs. *Nature* **524**, 173–179 [CrossRef Medline](#)
45. Kozasa, T., Hajicek, N., Chow, C. R., and Suzuki, N. (2011) Signaling mechanisms of RhoGTPase regulation by the heterotrimeric G proteins  $G_{12}$  and  $G_{13}$ . *J. Biochem.* **150**, 357–369 [CrossRef Medline](#)
46. Aittaleb, M., Boguth, C. A., and Tesmer, J. J. (2010) Structure and function of heterotrimeric G protein-regulated Rho guanine nucleotide exchange factors. *Mol. Pharmacol.* **77**, 111–125 [CrossRef Medline](#)
47. Fukuhara, S., Chikumi, H., and Gutkind, J. S. (2001) RGS-containing Rho-GEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho? *Oncogene* **20**, 1661–1668 [CrossRef Medline](#)
48. Guilluy, C., Dubash, A. D., and García-Mata, R. (2011) Analysis of RhoA and Rho GEF activity in whole cells and the cell nucleus. *Nat. Protoc.* **6**, 2050–2060 [CrossRef Medline](#)
49. Guzmán-Hernández, M. L., Vázquez-Macías, A., Carretero-Ortega, J., Hernández-García, R., García-Regalado, A., Hernández-Negrete, L., Reyes-Cruz, G., Gutkind, J. S., and Vázquez-Prado, J. (2009) Differential inhibitor of  $G\beta\gamma$  signaling to AKT and ERK derived from phosducin-like protein: effect on sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration and *in vitro* angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **284**, 18334–18346 [CrossRef Medline](#)
50. Murga, C., Laguine, L., Wetzker, R., Cuadrado, A., and Gutkind, J. S. (1998) Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors: a role for  $\alpha$  and  $\beta\gamma$  subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinase  $\gamma$ . *J. Biol. Chem.* **273**, 19080–19085 [CrossRef Medline](#)
51. Murga, C., Fukuhara, S., and Gutkind, J. S. (2000) A novel role for phosphatidylinositol 3-kinase  $\beta$  in signaling from G protein-coupled receptors to Akt. *J. Biol. Chem.* **275**, 12069–12073 [CrossRef Medline](#)
52. Carretero-Ortega, J., Walsh, C. T., Hernández-García, R., Reyes-Cruz, G., Brown, J. H., and Vázquez-Prado, J. (2010) Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex-1), a guanine nucleotide exchange factor for Rac, mediates angiogenic responses to stromal cell-derived factor-1/chemokine stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL-12) linked to Rac activation, endothelial cell migration, and *in vitro* angiogenesis. *Mol. Pharmacol.* **77**, 435–442 [CrossRef Medline](#)
53. Hepler, J. R. (2014) G protein coupled receptor signaling complexes in live cells. *Cell Logist.* **4**, e29392 [CrossRef Medline](#)
54. Lambert, N. A. (2008) Dissociation of heterotrimeric G proteins in cells. *Sci. Signal.* **1**, re5 [Medline](#)
55. Hewavitharana, T., and Wedegaertner, P. B. (2012) Non-canonical signaling and localizations of heterotrimeric G proteins. *Cell Signal.* **24**, 25–34 [CrossRef Medline](#)
56. Khan, S. M., Sung, J. Y., and Hébert, T. E. (2016)  $G\beta\gamma$  subunits: different spaces, different faces. *Pharmacol. Res.* **111**, 434–441 [CrossRef Medline](#)
57. Senarath, K., Payton, J. L., Kankanamge, D., Siripurapu, P., Tennakoon, M., and Karunaratne, A. (2018)  $G\gamma$  identity dictates efficacy of  $G\beta\gamma$  signaling and macrophage migration. *J. Biol. Chem.* **293**, 2974–2989 [CrossRef Medline](#)
58. Brown, S. L., Jala, V. R., Raghuvanshi, S. K., Nasser, M. W., Haribabu, B., and Richardson, R. M. (2006) Activation and regulation of platelet-activating factor receptor: role of  $G_i$  and  $G_q$  in receptor-mediated chemotactic, cytotoxic, and cross-regulatory signals. *J. Immunol.* **177**, 3242–3249 [CrossRef Medline](#)
59. Nishimura, A., Kitano, K., Takasaki, J., Taniguchi, M., Mizuno, N., Tago, K., Hakoshima, T., and Itoh, H. (2010) Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric  $G_q$  protein by a small molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 13666–13671 [CrossRef Medline](#)
60. Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J. M., Shah, S. T., Lyons, J. A., Caffrey, M., Gellman, S. H., *et al.* (2011) Crystal structure of the  $\beta_2$  adrenergic receptor– $G_s$  protein complex. *Nature* **477**, 549–555 [CrossRef Medline](#)
61. Yoda, A., Adelmant, G., Tamburini, J., Chapuy, B., Shindoh, N., Yoda, Y., Weigert, O., Kopp, N., Wu, S. C., Kim, S. S., Liu, H., Tivey, T., Christie, A. L., Elpek, K. G., Card, J., *et al.* (2015) Mutations in G protein  $\beta$  subunits promote transformation and kinase inhibitor resistance. *Nat. Med.* **21**, 71–75 [CrossRef Medline](#)
62. Dror, R. O., Mildorf, T. J., Hilger, D., Manglik, A., Borhani, D. W., Arlow, D. H., Philippsen, A., Villanueva, N., Yang, Z., Lerch, M. T., Hubbell, W. L., Kobilka, B. K., Sunahara, R. K., and Shaw, D. E. (2015) Signal transduction: structural basis for nucleotide exchange in heterotrimeric G proteins. *Science* **348**, 1361–1365 [CrossRef Medline](#)
63. Nance, M. R., Kreutz, B., Tesmer, V. M., Sterne-Marr, R., Kozasa, T., and Tesmer, J. J. (2013) Structural and functional analysis of the regulator of G protein signaling 2– $G\alpha_q$  complex. *Structure* **21**, 438–448 [CrossRef Medline](#)
64. Tesmer, J. J., Berman, D. M., Gilman, A. G., and Sprang, S. R. (1997) Structure of RGS4 bound to  $AlF_4^-$ -activated  $G_{\alpha_1}$ : stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell* **89**, 251–261 [CrossRef Medline](#)
65. Bünemann, M., and Hosey, M. M. (1998) Regulators of G protein signaling (RGS) proteins constitutively activate  $G\beta\gamma$ -gated potassium channels. *J. Biol. Chem.* **273**, 31186–31190 [CrossRef Medline](#)
66. Bodmann, E. L., Krett, A. L., and Bünemann, M. (2017) Potentiation of receptor responses induced by prolonged binding of  $G\alpha_{13}$  and leukemia-associated RhoGEF. *FASEB J.* **31**, 3663–3676 [CrossRef Medline](#)
67. Kim, E. K., Yun, S. J., Ha, J. M., Kim, Y. W., Jin, I. H., Yun, J., Shin, H. K., Song, S. H., Kim, J. H., Lee, J. S., Kim, C. D., and Bae, S. S. (2011) Selective activation of Akt1 by mammalian target of rapamycin complex 2 regulates cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Oncogene* **30**, 2954–2963 [CrossRef Medline](#)
68. Hernández-Negrete, L., Carretero-Ortega, J., Rosenfeldt, H., Hernández-García, R., Calderón-Salinas, J. V., Reyes-Cruz, G., Gutkind, J. S., and Vázquez-Prado, J. (2007) P-Rex1 links mammalian target of rapamycin

**$G\alpha_q$ -QL and  $G\alpha_{13}$ -QL prevent  $G\beta\gamma$ -dependent P-REX1 activation**

- signaling to Rac activation and cell migration. *J. Biol. Chem.* **282**, 23708–23715 CrossRef Medline
69. Kalinec, G., Nazarali, A. J., Hermouet, S., Xu, N., and Gutkind, J. S. (1992) Mutated  $\alpha$  subunit of the  $G_q$  protein induces malignant transformation in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell Biol.* **12**, 4687–4693 CrossRef Medline
70. Xu, N., Bradley, L., Ambduk, I., and Gutkind, J. S. (1993) A mutant  $\alpha$  subunit of  $G_{12}$  potentiates the eicosanoid pathway and is highly oncogenic in NIH 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 6741–6745 CrossRef Medline
71. Katoh, H., Aoki, J., Yamaguchi, Y., Kitano, Y., Ichikawa, A., and Negishi, M. (1998) Constitutively active  $G\alpha_{12}$ ,  $G\alpha_{13}$ , and  $G\alpha_q$  induce Rho-dependent neurite retraction through different signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **273**, 28700–28707 CrossRef Medline
72. Song, X., Zheng, X., Malbon, C. C., and Wang, H. (2001)  $G\alpha_{12}$  enhances *in vivo* activation of and insulin signaling to GLUT4. *J. Biol. Chem.* **276**, 34651–34658 CrossRef Medline
73. Wang, H. Y., Kanungo, J., and Malbon, C. C. (2002) Expression of  $G\alpha_{13}$  (Q226L) induces P19 stem cells to primitive endoderm via MEK1, 2, or 4. *J. Biol. Chem.* **277**, 3530–3536 CrossRef Medline
74. Surve, C. R., To, J. Y., Malik, S., Kim, M., and Smrcka, A. V. (2016) Dynamic regulation of neutrophil polarity and migration by the heterotrimeric G protein subunits  $G\alpha$ -GTP and  $G\beta\gamma$ . *Sci. Signal.* **9**, ra22 CrossRef Medline
75. To, J. Y., and Smrcka, A. V. (2018) Activated heterotrimeric G protein  $\alpha$  subunits inhibit Rap-dependent cell adhesion and promote cell migration. *J. Biol. Chem.* **293**, 1570–1578 CrossRef Medline
76. O'Hayre, M., Vázquez-Prado, J., Kufareva, I., Stawiski, E. W., Handel, T. M., Seshagiri, S., and Gutkind, J. S. (2013) The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 412–424 CrossRef Medline
77. Kan, Z., Jaiswal, B. S., Stinson, J., Janakiraman, V., Bhatt, D., Stern, H. M., Yue, P., Haverty, P. M., Bourgon, R., Zheng, J., Moorhead, M., Chaudhuri, S., Tomsho, L. P., Peters, B. A., Pujara, K., et al. (2010) Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* **466**, 869–873 CrossRef Medline
78. Van Raamsdonk, C. D., Bezrookove, V., Green, G., Bauer, J., Gaugler, L., O'Brien, J. M., Simpson, E. M., Barsh, G. S., and Bastian, B. C. (2009) Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* **457**, 599–602 CrossRef Medline
79. Robles-Molina, E., Dionisio-Vicuña, M., Guzmán-Hernández, M. L., Reyes-Cruz, G., and Vázquez-Prado, J. (2014)  $G\beta\gamma$  interacts with mTOR and promotes its activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **444**, 218–223 CrossRef Medline
80. García-Regalado, A., Guzmán-Hernández, M. L., Ramírez-Rangel, I., Robles-Molina, E., Balla, T., Vázquez-Prado, J., and Reyes-Cruz, G. (2008) G protein-coupled receptor-promoted trafficking of  $G\beta_1\gamma_2$  leads to AKT activation at endosomes via a mechanism mediated by  $G\beta_1\gamma_2$ -Rab11a interaction. *Mol. Biol. Cell* **19**, 4188–4200 CrossRef Medline





**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**

Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana, Sendi Rafael Adame-García, Irving García-Jimenez, Víctor Manuel Color-Aparicio, Yarely Mabell Beltran-Navarro, Gabriele M. König, Evi Kostenis, Guadalupe Reyes-Cruz, J. Silvio Gutkind and José Vázquez-Prado

*J. Biol. Chem.* published online November 16, 2018

---

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.RA118.006254](https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006254)

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts





## 15.2 Artículo Original: Protumoral bone marrow-derived cells migrate via G $\beta$ y and exhibit a complex repertoire of RhoGEFs

Primer autor, artículo aceptado diciembre 2018: *Journal of Cell Communication and Signaling*

Manuscript

[Click here to access/download;Manuscript;Cervantes-Villagrana et al 2018\\_4oct2018\\_JCCS.docx](#)

[Click here to view linked References](#)

### Protumoral bone marrow-derived cells migrate via G $\beta$ y and exhibit a complex repertoire of RhoGEFs

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana<sup>1</sup>, Víctor Manuel Color-Aparicio<sup>1</sup>, Guadalupe Reyes-Cruz<sup>2</sup>, José Vázquez-Prado<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Pharmacology and <sup>2</sup>Cell Biology. CINVESTAV-IPN, Mexico City, MEXICO.

Address correspondence to: José Vázquez-Prado,  
Department of Pharmacology, CINVESTAV-IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508.  
Col. San Pedro Zacatenco, 14740 México, D.F., MEXICO.  
Tel: (52-55) 5747-3380; Fax: (52-55) 5747-3394; E-mail: [jvazquez@cinvestav.mx](mailto:jvazquez@cinvestav.mx)  
ORCID: 0000-0001-5797-6643

Number of figures: 5

Figure 5d is a color picture that might be interesting for the front cover.

**Abstract**

1 Reciprocal communication among cells of the tumor microenvironment contributes to cancer progression.  
2 Here, we show that a protumoral population of cultured bone marrow-derived cells (BMDC) containing  
3 Tie2+/CD45+/CD11b+ cells responded to lung carcinoma cells and reciprocally stimulated them. These  
4 cells migrated via heterotrimeric G protein-dependent signaling pathways and strongly activated the  
5 PI3K/AKT, ERK and mTOR signaling cascades in response to conditioned media and chemotactic  
6 agonists. To get insight into the molecular machinery involved in BMDC migration, we revealed their  
7 repertoire of guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases (RhoGEFs) and G proteins in  
8 comparison with fresh bone marrow cells, proven that these cell populations had contrasting effects on  
9 tumor growth. BMDC exhibited a higher expression of G protein regulated RhoGEFs including P-Rex1,  
10 PDZ-RhoGEF, LARG, Trio and some less well characterized RhoGEFs such as FARP1/2, FGD2/4/6,  
11 ARHGEF5/17 and PLEKHG6. G proteins such as  $G\alpha_{12/13}$ ,  $G\alpha_q$ , and the small GTPase RhoJ were also  
12 highly expressed in BMDC. Our results indicate that Tie2+/CD45+/CD11b+ BMDC express a unique  
13 variety of chemotactic transducers and effectors potentially linked to their protumoral effect, warranting  
14 further studies to their characterization as molecular targets.  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

25 **Keywords:** cell migration, GPCRs, Protumoral bone marrow-derived cells, RhoGEFs, Rho GTPases,  
26 Tie2-monocyte/macrophages,  
27

28 **Abbreviations:** VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor; SDF-1, Stromal Cell-Derived Factor 1;  
29 S1P1R, Sphingosine-1-Phosphate Receptors; S1P, Sphingosine-1-phosphate; IL-8, Interleukin-8;  
30 RhoGEFs, Rho guanine exchange factors; P-Rex1, Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent  
31 Rac exchanger 1 protein; PH, Pleckstrin homology domain; PAE, Porcine Aortic Endothelial; mTOR,  
32 mammalian target of rapamycin; LPA, Lysophosphatidic acid; LLC, Lewis lung carcinoma; HGF,  
33 Hepatocyte Growth Factor; EPC, Endothelial Progenitor Cell; EGF, Epidermal Growth Factor; FGF,  
34 Fibroblast Growth Factor; DH, Dbl-Homology domain; BMDC, Bone Marrow-Derived Cells; BM, Bone  
35 Marrow.  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Introduction

1  
2 The permissive pro-oncogenic role played by the tumor microenvironment is exacerbated by cells  
3 attracted from the bone marrow (Lyden et al., 2001). They contribute to enable the metastatic potential of  
4 cancer cells (Asahara et al., 1997; Shaw et al., 2004). In addition to bone marrow-derived cells (BMDC),  
5 cancer associated fibroblasts, endothelial cells and multiple immune subpopulations are enrolled and their  
6 communication orchestrates a variety of coordinated local and systemic processes including tumor-  
7 induced angiogenesis, local immunosuppression, extracellular matrix remodeling for invasion and  
8 premetastatic niche establishment, which altogether support tumor growth and dissemination (De Palma  
9 et al., 2005; Jahangiri et al., 2018; Kazerounian and Lawler, 2018; Peinado et al., 2012; Smith and Kang,  
10 2013; Vazquez-Prado et al., 2016).

11  
12  
13 Communication among cancer cells and those attracted to the tumor microenvironment include direct  
14 cellular interactions; however, a prominent role has been attributed to tumor secreted factors which  
15 generate complex oncogenic circuits and display systemic effects. Particularly, chemotactic factors and  
16 sophisticated macromolecular complexes released as exosomes promote cell mobilization and flag the site  
17 where cancer cells can find the right conditions to grow, out of the primary tumor (Hoshino et al., 2015;  
18 Kaur et al., 2018; Peinado et al., 2012; Ridge et al., 2018). Cells follow chemotactic gradients as an  
19 integrated response of their signaling effectors being activated by diverse receptor families, mainly  
20 belonging to G protein-coupled receptors (GPCRs) and tyrosine kinase receptors (Kitamura et al., 2015;  
21 Vazquez-Prado et al., 2016). Chemotactic membrane receptors promote cell migration by activating Rho  
22 GTPases via guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs) directly stimulated by signal transducers,  
23 second messengers and posttranslational modifications. In the case of BMDC, chemotactic agonists  
24 recognized by CXCR4 (Madlambayan et al., 2009) and CCR2 (Bonapace et al., 2014), among other  
25 GPCRs, promote cytoskeletal reorganization and assembly of contractile complexes during their journey  
26 towards evolving tumors and putative metastatic niches (Vazquez-Prado et al., 2016). Based on the  
27 fundamental role played by Rho family GTPases on the dynamics of the actin cytoskeleton, RhoGEFs are  
28 obligated participants on cell migration. They are multiple and exhibit complex and diverse multi-domain  
29 architectures, so their potential to integrate an array of signaling inputs widely varies among different cell  
30 populations (Lawson and Ridley, 2018; Vazquez-Prado et al., 2016).

31  
32  
33 We recently demonstrated that P-Rex1, RGS-RhoGEFs and many other activators of Rho GTPases are  
34 expressed in VEGF-stimulated and tumor endothelial cells, suggesting an important participation of these  
35 multidomain proteins in tumor angiogenesis (Hernandez-Garcia et al., 2015). Furthermore, since  
36 inhibitors of the communication among cells of the tumor microenvironment have demonstrated a  
37 beneficial clinical effect, understanding how BMDC respond to tumor-derived factors constitutes a  
38 promising field to eventually develop therapeutic strategies aimed to interfere with BMDC contribution to  
39 tumor progression. Moreover, based on their tropism for tumors and metastatic niches, BMDC have also  
40 been visualized as potential therapeutic vehicles (Gao et al., 2008). With the long-term goal of identifying  
41 molecular targets mechanistically linked to the protumoral effects of BMDC, here we characterized the  
42 reciprocal communication between a protumoral population of BMDC and lung cancer cells and  
43 elucidated the repertoire of RhoGEFs and related signaling proteins expressed in BMDC. We found  
44 several highly expressed RhoGEFs that can be considered potential therapeutic targets.

## Material and methods

### Mouse tumor models

45  
46  
47 FVB/NJ (stock 001800), Tg(TIE2GFP)287Sato/J (stock 003658), and C57/BL6 (stock 000664) mice  
48 were obtained from Jackson Laboratories and maintained according to their instructions. All procedures  
49 were approved by UPEAL-Cinvestav ethical committee (protocols 33-13 and 0205-16). Lung carcinoma  
50 cells (alone or mixed either with cultured BMDC or fresh bone marrow cells) were suspended in 100  $\mu$ L  
51 and inoculated subcutaneously, using 31G needles, in the dorsal region of FVB mice for LAP0297 lung  
52 carcinoma cells, or C57 mice for Lewis lung carcinoma cells (LLC). Tumor size was measured with  
53

caliper and volume was calculated based on the equation:  $width \times length^2 \times \pi / 6$  as reported (Gao et al., 2008).

### Cancer and endothelial cell cultures

Lung carcinoma cells (LAP0297) were kindly donated by Dr. Peigen Huang from the Department of Radiation Oncology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA (Huang et al., 2008). Lewis lung carcinoma cells (LLC-GFP), kindly provided by Dr. Luisa Iruela-Arispe (Hernandez-Garcia et al., 2015), and PAE (porcine aortic endothelial) cells (Guzman-Hernandez et al., 2009) were cultured and maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and antibiotics (Gibco).

### Mouse bone marrow-derived cell (BMDC) cultures

Bone marrow-derived cell cultures enriched for Tie2<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells were prepared based on the protocol described by Asahara and colleagues (Sekiguchi et al., 2011), with minor modifications: the histopaque gradient was omitted and a short incubation with ammonium chloride was included to lyse erythrocytes before seeding the cells. Briefly, dissected femurs and tibias from C57 or FVB mice were flushed with 1X PBS. Extracted bone marrow cells were filtered through a 40 µm pore nylon cell strainer (BD Falcon, Tokyo, Japan; 352340), incubated for 10 min with 1:4 ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl, StemCell Technologies, 07800), washed with 1X PBS and collected by centrifugation at 1,200 rpm. Bone marrow cells were suspended with EGM-2MV (EBM-2 supplemented with factors and 5% fetal bovine serum, FBS) and seeded on 10 µg/mL ProNectin-coated dishes (ProNectin Fibronectin-like Engineered Protein Polymer-Plus Genetically Engineered, Sigma-Aldrich, F8141) during 24 hrs. BMDC cultures were established from non-adherent cells which were transferred to new ProNectin-coated dishes. Four days later, cells were washed and those that remained adherent were cultured for 14 days in EGM-2MV supplemented with 10% FBS (Sekiguchi et al., 2011).

### Conditioned media, agonists and inhibitors

Conditioned media from BMDC and LAP0297/LLC were collected in serum-free media (EBM-2 or DMEM, respectively; 10 mL/p100 dish). Cells were initially washed (washed 5 times with 1X PBS) and media was collected 14 hours later, centrifuged at 3,000 rpm/20 min and stored at -70°C. Agonists were from the following sources and used at the indicated concentrations: Stromal Derived Factor 1α (50 ng/mL, SDF-1α/CXCL12, PeproTech, 300-28A), Sphingosine 1-Phosphate (1 µM, S1P, Sigma, S9666), lysophosphatidic acid (1-5 µM, LPA, Biomol, LP-100), interleukin-8 (3 nM, IL-8, Sigma I1645), vascular endothelial growth factor (100 ng/mL, VEGF 165 human recombinant, Calbiochem, PF074), hepatocyte growth factor (10 ng/mL, HGF, R&D Systems, 294-HGN), epidermal growth factor (10 ng/mL, EGF, Gibco, 13,247-051), basic fibroblast growth factor (25 ng/mL, bFGF, R&D Systems, 234-FSE/CF); platelet derived growth factor (100 ng/mL, PDGF, Sigma, P3326). Antagonists and inhibitors were from the following sources: AMD3100, a CXCR4 antagonist (10 µM, Sigma, A5602); gallein, a Gβγ inhibitor (10 µM, Tocris, 3090); and pertussis toxin, a heterotrimeric Gi inhibitor, (100-200 ng/mL, PTX, Calbiochem, 516560).

### Wound healing assays

Cells were seeded on 0.02% gelatin-coated dishes (6 or 12 wells). Before wound, cells were starved with serum-free media for 6 h (EBM-2 for BMDC) or 14 h (DMEM for LAP0297 and PAE cells). Two hours before stimulation cells were pre-incubated with vehicle, pertussis toxin, gallein or AMD3100. In the case of LAP0297 and PAE cells, 12 µM, mitomycin C was included (Sigma-Aldrich, M0440). Migration assays were initiated by wounding cell monolayers with a pipette tip. Cells were washed three times with PBS and subjected to stimulation with conditioned media or the agonists indicated in figure legends. After 18 hours, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, stained with crystal violet, washed with PBS and photographed.

**Western blot and Rac activation assay**

Activation of Rac was assessed by pull down assays using recombinant GST-PAK-CRIB following the previously described procedure (Chavez-Vargas et al., 2016). BMDC were grown in P60 ProNectin-coated dishes, starved overnight in serum free-media, and stimulated with LAP0297 conditioned media. Protein lysates and pulldowns were separated on SDS-PAGE gels, transferred to Immobilon membranes (Millipore), blocked with 5% non-fat milk/TBS-Tween and incubated overnight at 4°C, on a rocking platform, with the following primary antibodies: RhoJ (ab57584), Abcam; Rac1 (610651), PRKAR1a (610165BD), Transduction Laboratories; CREB (9197S), phospho-p42/44 MAP Kinase (ERK1/2) T202/Y204, (9191), pS6 ribosomal protein phosphoSer240/244 (5364); Vav2 (2848), Cell Signaling Technology; pan-Ras, (OP40), Millipore; Cdc42 (sc-8401), G $\alpha_q$  (sc-392), G $\alpha_{12}$  (sc-409), G $\beta$  (sc-261), ERK-2 (sc-154), phosphoAKT1/2/3 Ser473 (sc-7985-R), LARG/ARHGGEF12 (sc-25638), p115/Lsc RhoGEF/ARHGGEF1 (sc-20804), Rho A (sc-418), S6 (sc-74459), Trio (sc-28564), Santa Cruz Biotechnology; PKB $\alpha$ /AKT1 (P2482), P-Rex1 (HPA001927), PDZ-RhoGEF (HPA011026 and HPA014658), Sigma; and actin (Hernandez-Garcia et al., 2015). Membranes were washed with 1X TBS-Tween and incubated at room temperature for 1h with anti-mouse or rabbit secondary antibodies (KPL, 074-1802 and 074-151) in milk/TBS-T. Again, membranes were washed and revealed using Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore).

**FACS analysis**

Expression of surface markers was assessed in cells incubated for 30 minutes on ice with the following antibodies: anti-mouse Tie2-PE (12-5987), CD45-PE-Cyanine7 (25-0451), CD34-eFluor450 (48-0341), all from Affymetrix (eBioscience); anti-CD11b-FITC (553310) or CD11b-BV605 (563015), from BD Bioscience. Controls included fluorescent isotype antibodies and unstained samples. For analysis, dissected lung and tumors were minced and digested with Collagenase II at 37° C for 45-60 min and filtered through a 40  $\mu$ m strainer to obtain single cell suspensions. Fresh bone marrow cells (BM) were isolated from tibias and depleted from red cells. Cultured BMDC were detached with trypsin. Cells were washed with 5% FBS/1X PBS before immunostaining. Labeled cell populations were analyzed with a BD-Fortessa cytometer or a Coulter-Beckman system (Beckton Dickinson). FACS data were analyzed with Summit software (Beckman Coulter).

**RT-PCR analysis**

Expression of 62 DH-RhoGEFs (total found in the mouse genome) and cell markers was assessed by RT-PCR using total RNA isolated from fresh bone marrow and BMDC cultures using the primers and procedures previously reported (Hernandez-Garcia et al., 2015); those for markers shown in figure II were: CD31 TGCAGGAGTCCTTCTCCACT and ACGGTTTGATTCCACTTTGC; Ang1 AGGCTTGGTTTCTCGTCAGA and TCTGCACAGTCTCGAAATGG; VEGFR2 GGCGGTGGTGACAGTATCTT and GTCACTGACAGAGGCGATGA; VE-cadherin ATTGAGACAGACCCCAAACG and TTCTGGTTTTCTGGCAGCTT; CD133 GAAAAGTTGCTCTGCGAACC and TCTCAAGCTGAAAAGCAGCA; CD34 ACCACAGACTTCCCAACTG and CGGATTCCAGAGCATTGAT; Id1 CCAGTGGGTAGAGGGTTTGA and AGAAATCCGAGAAGCACGAA; c-Kit TTATCCTTTAGGCCGTGTGG and TGTGGCCCCTTAAGTACCTG; CXCR4 TCAGTGGCTGACCTCCTCTT and TTTCAGCCAGCAGTTTCCTT; PDGFR $\beta$  AATTCCTGCGAGTGACAG and ACGTAGCCATTCTCGATCACA; CD45 CCTGCTCCTCAAACCTTCGAC and GACACCTCTGTCGCTTAGC; and  $\beta$ -actin TCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGC and TACTCCTGCTTGCTGATCCACATC.

**Statistical analysis**

Densitometric quantitation and wound closure assays were analyzed with the ImageJ software. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. of at least three independent experiments. Data were analyzed either with

the Student's t test or one-way ANOVA followed by Dunnett or Tukey for multiple comparison test. Comparative analysis of tumor volumes was done by two-way repeated measures ANOVA followed by the Tukey test. Sigma Plot 11.0 software was used for statistical analysis and GraphPad Prism V6.05 software to prepare the graphs. Statistical significance was considered for values of  $p < 0.05$ .

## Results

### **An *in vitro* expanded population of Tie2<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> BMDC contribute to tumor growth**

To initiate the characterization of signaling pathways underlying the reciprocal communication between lung cancer cells and protumoral BMDC and define the molecular profile of RhoGEFs and related signaling proteins in BMDC, we expanded a bone marrow-derived cell population (BMDC) according to a reported protocol based on differential adhesion properties and selective media (Sekiguchi et al., 2011). Since bone marrow-resident endothelial progenitors and Tie2<sup>+</sup> monocytes are known as effective promoters of tumor growth (De Palma et al., 2005; Gao et al., 2008), we aimed to obtain a bone marrow-derived culture enriched with Tie2<sup>+</sup> protumoral cells. The protumoral effect of BMDC was tested in immunocompetent FVB and C57/BL6 mice co-inoculated either with LAP0297 or LLC lung cancer cells, respectively (Fig. 1A). BMDC significantly promoted tumor growth (Fig. 1B and C). In contrast, fresh bone marrow cells (BM) co-inoculated with equal amounts of tumor cells ( $5 \times 10^5$  or  $10^6$  cells/mouse) attenuated tumor growth (Fig. 1B and 1D). Using bone marrow from Tie2-GFP-FVB mice and the protocol described by Asahara and colleagues (Sekiguchi et al., 2011), we expanded a Tie2<sup>+</sup> population (based on GFP fluorescence) from <0.2%, in the fresh bone marrow, to more than 30 % of Tie2<sup>+</sup> in cultured BMDC (Fig. 1E, panel b and Fig. 1F, Tie2<sup>+</sup> shown in red; cells from lungs were almost 10 % GFP<sup>+</sup> endothelial cells, Fig. 1E, panel c (Ohle et al., 2012)). According to FACS analysis for additional markers, protumoral BMDC cultures had abundant Tie2<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> cells. This cell population corresponded to more than 30% of total cultivated cells (Fig. 1G). Cytometry analysis revealed that CD45 and CD11b were well expressed, while CD34 was absent (not shown), indicating the monocytic lineage of these cultured protumoral BMDC (De Palma et al., 2005). To analyze the incorporation of these cells in primary tumors developed in FVB mice, tumors grown for two weeks were excised, disaggregated and analyzed by cytometry. Consistent with the integration of Tie2<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> cells in the tumor stroma, 7% of cells isolated from LAP0297 tumors exhibited the profile of markers characterized in BMDC cultures (Fig. 1H). Comparative analysis of markers detected at the RNA level between protumoral BMDC and fresh bone marrow cells revealed a small difference. PDGFR $\beta$  was increased in BMDC (likely corresponding to Tie2<sup>+</sup> mesenchymal progenitors (De Palma et al., 2005)), while CD31, CD133, CD34 and c-kit were decreased (Fig. 1I). The high expression of CD45 and low expression of CD31, VEGFR2 and progenitor markers (CD133, CD34) indicated that cultured protumoral BMDC mainly contained a hematopoietic population, whereas endothelial progenitor cells were likely absent (De Palma et al., 2005; Kitamura et al., 2015; Rafii and Lyden, 2003).

### **Tumor cells and BMDC reciprocally control their migration activating GPCR-dependent signaling pathways**

Based on our initial results and the reported paracrine effect of BMDC (De Palma et al., 2005), we wanted to characterize how BMDC and LAP0297 cells stimulate each other by their conditioned media (Figs. 2 and 3, respectively). As shown in Figure 2A, BMDC conditioned media (BMDC-CM) stimulated LAP0297 lung cancer cells activating AKT, ERK and mTOR signaling pathways in a time-dependent manner, and induced their migration (Fig. 2B). In contrast, conditioned media from irrelevant cells, such as HEK293T, did not stimulate LAP0297 cell migration (not shown). Then we tested the effect of specific agonists as potential promoters of LAP0297 cell migration, our results showed a significant positive effect of LPA, HGF and, as positive control, fetal bovine serum (FBS) (Fig. 2C). BMDC-derived conditioned media and LPA induced a Gi-dependent (PTX-sensitive) migratory response (Fig. 2D), mediated by G $\beta\gamma$  (Fig. 2E), as indicated by the inhibitory effect of Gallein, a G $\beta\gamma$  inhibitor (Lehmann et al., 2008).



1 In reciprocity, LAP0297-CM effectively stimulated protumoral BMDC which showed a sustained  
2 activation of AKT and mTOR signaling pathways and a strong, but more transient effect, on ERK  
3 signaling (Fig. 3A), and exhibited a significant migratory response (Fig. 3B). PDGF was also an effective  
4 promoter of BMDC migration (Fig. 3B). Stimulated by different GPCR- and TyrK- agonists, BMDC  
5 resulted particularly sensitive to SDF-1, which activated AKT and ERK signaling pathways (Fig 3C,  
6 upper and lower panels, respectively), and promoted Gi-dependent BMDC migration (Fig. 3D) via a  
7 PTX-sensitive mechanism (Fig. 3E). Furthermore, AMD3100, a CXCR4 antagonist, prevented AKT  
8 activation by SDF-1 (not shown). PDGF stimulated ERK and AKT via pertussis toxin-insensitive  
9 pathways (Fig. 3E). In response to LAP0297-CM, BMDC migrated via Gi (Fig. 3D), while the effect on  
10 ERK and AKT was not sensitive to PTX (Fig. 3E).

### 11 **BMDC-derived and lung cancer cell conditioned media promote endothelial cell migration via** 12 **GPCR-dependent signaling pathways**

13 Endothelial cells are critical players within the tumor microenvironment . Thus, we wanted to address  
14 whether cultured protumoral BMDC, as well as lung cancer cells, promoted endothelial cell migration via  
15 GPCR-dependent signaling pathways (Fig. 4A). Wound healing assays revealed that endothelial cells  
16 stimulated with conditioned media obtained from lung cancer cells (Fig. 4B) and BMDC (Fig. 4C)  
17 migrated via G $\beta\gamma$  signaling pathways, as revealed by the inhibitory effect of Gallein. Pertussis toxin did  
18 not interfere with endothelial cell migration indicating that heterotrimeric G proteins, other than Gi, were  
19 the likely source of G $\beta\gamma$  involved in their migratory response to cancer and BMDC-secreted factors. As  
20 a positive control, migration in response to HGF was demonstrated (Fig. 4C).

### 21 **RhoGEFs expressed in BMDC**

22 In order to systematically identify in BMDC the signaling effectors intrinsically linked to the activation of  
23 Rho GTPases, known to be involved in cell migration, we defined their profile of RhoGEFs. We  
24 compared BMDC and fresh bone marrow cells addressing, by RT-PCR, the expression of all murine DH-  
25 RhoGEFs. As in our previous analysis of RhoGEFs in tumor endothelial cells, data were presented  
26 according to their phylogenetic links which, based on the common DH domains, define 4 main  
27 phylogenetic branches (Hernandez-Garcia et al., 2015). As shown in Figure 5A, both cell populations  
28 showed a complex pattern of RhoGEFs. Some of them, such as FARP1, FGD6, FGD2, FGD4,  
29 ARHGEF17, ARHGEF5, PLEKHG6, PDZ-RhoGEF and Trio were significantly more abundant in  
30 BMDC; while others such as Ect2, BCR, C9orf100, AKAP13, ARHGEF37, Tiam1 and Spata13 were  
31 decreased. At the protein level, among the RhoGEFs known as downstream effectors of GPCR-dependent  
32 signaling pathways (Fukuhara et al., 2000; Fukuhara et al., 1999; Hart et al., 1998; Welch et al., 2002), P-  
33 Rex1, PDZ-RhoGEF and LARG were enriched in BMDC compared to fresh bone marrow cells, while  
34 p115-RhoGEF, Tiam1 and Trio showed similar expression levels (Fig. 5B). Among the small GTPases,  
35 RhoJ, a GTPase previously highlighted by its relevance in tumor angiogenesis (Kim et al., 2014), was  
36 highly expressed in BMDC (Fig. 5B, right panel), while other small GTPases as Rac, Rho, Cdc42 and  
37 Ras had similar expression levels between cells evaluated (Fig. 5B). Activation of these pathways in  
38 BMDC stimulated with lung cancer cell conditioned media was demonstrated by pull-down analysis of  
39 active Rac, which was activated in a time-dependent manner in parallel to AKT and ERK (Fig. 5C).

### 40 **Discussion**

41 The intriguing role of cells from the bone marrow that migrate to promote tumor growth and metastasis  
42 has been the focus of intense research leading to the identification of diverse cell populations and their  
43 unequivocal contribution to cancer microenvironment. However, the signaling effectors involved in  
44 protumoral BMDC migration remain elusive. Protumoral cells from the bone marrow include progenitor  
45 cells and immune precursors such as progenitor endothelial cells (EPCs), pro-angiogenic  
46 monocytes/macrophages and suppressor leukocytes (Cooks et al., 2018; De Palma et al., 2005; Gao et al.,  
47 2008; Giannoni et al., 2013). These bone marrow-derived cell populations pave the way to metastatic  
48 niches (Gao et al., 2008), but also provide resistance to therapies as anti-angiogenic drugs. Cells in the  
49

1 tumor microenvironment support cancer progression via non-cell-autonomous mechanisms based on their  
2 ability to secrete chemokines, cytokines, growth factors and proteins of the extracellular matrix (Cooks et  
3 al., 2018; Smith and Kang, 2013; Vincent and Postovit, 2018). Here we investigated the crosstalk  
4 between a cultured population of protumoral BMDC and lung cancer cells which reciprocally promoted  
5 cell migration. Our results show that conditioned media from these cells stimulate cell migration via  
6 GPCR-dependent mechanisms acting through  $G\beta\gamma$ . Furthermore, we showed that both cell populations  
7 promoted endothelial cell migration also via  $G\beta\gamma$ -dependent pathways, as revealed by the inhibitory effect  
8 of Gallein. Importantly, the  $G\beta\gamma/PI3K\beta$  pathway has been targeted in vitro in preclinical models of cancer  
9 cells, demonstrating that its inhibition prevents cell migration and invasive capacity (Dbouk et al., 2012).

10  
11 To start addressing the molecular mechanisms of BMDC migration we wanted to reveal their profile of  
12 RhoGEFs which in general terms are the signaling effectors that activate Rho GTPases, the molecular  
13 switches that specify the spatiotemporal dynamics of the actin cytoskeleton during cell migration  
14 (Lawson and Ridley, 2018; Vazquez-Prado et al., 2016). We cultured a heterogeneous population of  
15 Tie2+/CD45+/CD11b+ BMDC that promoted tumor growth (in contrast to the inhibitory effect of fresh  
16 bone marrow cells). Expression of RhoGEFs demonstrated to be complex. Compared to fresh bone  
17 marrow cells, protumoral BMDC exhibited a higher expression of various, still poorly characterized,  
18 RhoGEFs (Fig 5A). One of them, ARHGEF17 which exhibited a threefold increase, was originally  
19 described as a tumor endothelial marker (TEM4) in colon cancer (St Croix et al., 2000).

20  
21  
22 GPCR-regulated RhoGEFs such as P-Rex1 and RGS-RhoGEFs were enriched, at the protein level, in  
23 protumoral BMDC (Fig. 5B). P-Rex1, a Rac-GEF known as a  $G\beta\gamma$  effector that activates Rac and cell  
24 migration in response to SDF-1 (Carretero-Ortega et al., 2010), has been found overexpressed in breast  
25 cancer and its expression correlated with a bad prognostic (Sosa et al., 2010). PDZ-RhoGEF and LARG,  
26 two of three known RGS-RhoGEFs, are direct effectors of  $G\alpha 13$  (Fukuhara et al., 2001). Interestingly,  
27  $G\alpha 13$ , which is essential for vascular development (Ruppel et al., 2005), plays a positive role in the  
28 contribution of the bone marrow to tumor angiogenesis (Chen et al., 2009). Altogether these findings are  
29 consistent with a potential role of G-protein coupled RhoGEFs in the response of BMDC to agonists of  
30 tumor origin and set the basis to study their contribution to tumor growth. Based on the prominent role of  
31  $G\beta\gamma$  in chemotactic signaling by Gi-coupled GPCRs, the response of BMDC to SDF-1 and the activation  
32 of Rac, AKT, and mTOR by lung cancer cell conditioned media; we postulate that the signaling axis  
33 including Gi→ $G\beta\gamma/PI3K/P-Rex1$  is putatively involved in the response of BMDC to chemotactic factors  
34 secreted by lung cancer cells. Based on our results, we propose a model shown in figure 5D in which  
35 GPCR-regulated RhoGEFs promote BMDC cell migration in response to lung cancer cell-secreted factors  
36 which exacerbate the tumor microenvironment also contributing to stimulate endothelial cells.

37  
38  
39 In conclusion, cultured protumoral Tie2+/CD45+/CD11b+ BMDC and lung cancer cells stimulate each  
40 other to migrate via Gi-coupled receptors acting through  $G\beta\gamma$ . BMDC express a complex profile of  
41 RhoGEFs including those regulated by G proteins such as P-Rex1, PDZ-RhoGEF and LARG, which are  
42 differentially expressed at the protein level respect to fresh bone marrow cells. The signaling properties  
43 and molecular profiling of RhoGEFs in protumoral bone marrow-derived cells set the basis for further  
44 studies addressing these signaling effectors as potential targets to prevent the contribution of BMDC to  
45 cancer progression.

#### 46 Acknowledgments

47  
48  
49 Technical assistance provided by Estanislao Escobar-Islas, Margarita Valadez, David Pérez, and Jaime  
50 Estrada-Trejo is acknowledged. We thank Victor Hugo Rosales-García (Central Laboratories of  
51 Cinvestav) for technical assistance in cytometry; and Ricardo Gaxiola-Centeno and Benjamin Emmanuel  
52 Chavez-Álvarez (UPEAL-Cinvestav) for breeding and maintaining mice colonies. This work was  
53 supported by CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico) Grants 286274 (to J. V.-  
54 P.) and 240119 (to G. R.-C.). R.D.C.-V., and V.M.C.-A were supported by fellowships from CONACyT.

## References

- 1  
2 Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzensbichler B,  
3 Schatteman G and Isner JM (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for  
4 angiogenesis. *Science* **275**(5302): 964-967.
- 5 Bonapace L, Coissieux MM, Wyckoff J, Mertz KD, Varga Z, Junt T and Bentires-Alj M (2014)  
6 Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting  
7 angiogenesis. *Nature* **515**(7525): 130-133.
- 8 Carretero-Ortega J, Walsh CT, Hernandez-Garcia R, Reyes-Cruz G, Brown JH and Vazquez-  
9 Prado J (2010) Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent Rac exchanger 1 (P-  
10 Rex-1), a guanine nucleotide exchange factor for Rac, mediates angiogenic responses to  
11 stromal cell-derived factor-1/chemokine stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL-  
12 12) linked to Rac activation, endothelial cell migration, and in vitro angiogenesis. *Mol*  
13 *Pharmacol* **77**(3): 435-442.
- 14 Chavez-Vargas L, Adame-Garcia SR, Cervantes-Villagrana RD, Castillo-Kauli A, Bruystens  
15 JG, Fukuhara S, Taylor SS, Mochizuki N, Reyes-Cruz G and Vazquez-Prado J (2016)  
16 Protein Kinase A (PKA) Type I Interacts with P-Rex1, a Rac Guanine Nucleotide  
17 Exchange Factor: EFFECT ON PKA LOCALIZATION AND P-Rex1 SIGNALING. *J*  
18 *Biol Chem* **291**(12): 6182-6199.
- 19 Chen L, Zhang JJ, Rafii S and Huang XY (2009) Suppression of tumor angiogenesis by  
20 Galpha(13) haploinsufficiency. *J Biol Chem* **284**(40): 27409-27415.
- 21 Cooks T, Pateras IS, Jenkins LM, Patel KM, Robles AI, Morris J, Forshew T, Appella E,  
22 Gorgoulis VG and Harris CC (2018) Mutant p53 cancers reprogram macrophages to  
23 tumor supporting macrophages via exosomal miR-1246. *Nat Commun* **9**(1): 771.
- 24 Dbouk HA, Vadas O, Shymanets A, Burke JE, Salamon RS, Khalil BD, Barrett MO, Waldo  
25 GL, Surve C, Hsueh C, Perisic O, Harteneck C, Shepherd PR, Harden TK, Smrcka AV,  
26 Taussig R, Bresnick AR, Nurnberg B, Williams RL and Backer JM (2012) G protein-  
27 coupled receptor-mediated activation of p110beta by Gbetagamma is required for  
28 cellular transformation and invasiveness. *Sci Signal* **5**(253): ra89.
- 29 De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi L, Politi LS, Sampaolesi M and Naldini L  
30 (2005) Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for  
31 tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer*  
32 *Cell* **8**(3): 211-226.
- 33 Fukuhara S, Chikumi H and Gutkind JS (2000) Leukemia-associated Rho guanine nucleotide  
34 exchange factor (LARG) links heterotrimeric G proteins of the G(12) family to Rho.  
35 *FEBS Lett* **485**(2-3): 183-188.
- 36 Fukuhara S, Chikumi H and Gutkind JS (2001) RGS-containing RhoGEFs: the missing link  
37 between transforming G proteins and Rho? *Oncogene* **20**(13): 1661-1668.
- 38 Fukuhara S, Murga C, Zohar M, Igishi T and Gutkind JS (1999) A novel PDZ domain  
39 containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J*  
40 *Biol Chem* **274**(9): 5868-5879.
- 41 Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K and Mittal V (2008) Endothelial  
42 progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science*  
43 **319**(5860): 195-198.
- 44 Giannoni E, Taddei ML, Parri M, Bianchini F, Santosuosso M, Grifantini R, Fibbi G, Mazzanti  
45 B, Calorini L and Chiarugi P (2013) EphA2-mediated mesenchymal-amoeboid  
46 transition induced by endothelial progenitor cells enhances metastatic spread due to  
47 cancer-associated fibroblasts. *J Mol Med (Berl)* **91**(1): 103-115.
- 48 Guzman-Hernandez ML, Vazquez-Macias A, Carretero-Ortega J, Hernandez-Garcia R, Garcia-  
49 Regalado A, Hernandez-Negrete I, Reyes-Cruz G, Gutkind JS and Vazquez-Prado J  
50 (2009) Differential inhibitor of Gbetagamma signaling to AKT and ERK derived from  
51 phosducin-like protein: effect on sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell  
52 migration and in vitro angiogenesis. *J Biol Chem* **284**(27): 18334-18346.
- 53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1 Hart MJ, Jiang X, Kozasa T, Roscoe W, Singer WD, Gilman AG, Sternweis PC and Bollag G  
2 (1998) Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF  
3 by Gα13. *Science* **280**(5372): 2112-2114.
- 4 Hernandez-Garcia R, Iruela-Arispe ML, Reyes-Cruz G and Vazquez-Prado J (2015) Endothelial  
5 RhoGEFs: A systematic analysis of their expression profiles in VEGF-stimulated and  
6 tumor endothelial cells. *Vascul Pharmacol* **74**: 60-72.
- 7 Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H,  
8 Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, Singh S, Williams C, Soplop N, Uryu K,  
9 Pharmed L, King T, Bojmar L, Davies AE, Ararso Y, Zhang T, Zhang H, Hernandez J,  
10 Weiss JM, Dumont-Cole VD, Kramer K, Wexler LH, Narendran A, Schwartz GK,  
11 Healey JH, Sandstrom P, Labori KJ, Kure EH, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, de  
12 Sousa M, Kaur S, Jain M, Mallya K, Batra SK, Jarnagin WR, Brady MS, Fodstad O,  
13 Muller V, Pantel K, Minn AJ, Bissell MJ, Garcia BA, Kang Y, Rajasekhar VK, Ghajar  
14 CM, Matei I, Peinado H, Bromberg J and Lyden D (2015) Tumour exosome integrins  
15 determine organotropic metastasis. *Nature* **527**(7578): 329-335.
- 16 Huang P, Duda DG, Jain RK and Fukumura D (2008) Histopathologic findings and  
17 establishment of novel tumor lines from spontaneous tumors in FVB/N mice. *Comp*  
18 *Med* **58**(3): 253-263.
- 19 Jahangiri B, Khalaj-Kondori M, Asadollahi E and Sadeghizadeh M (2018) Cancer-associated  
20 fibroblasts enhance cell proliferation and metastasis of colorectal cancer SW480 cells  
21 by provoking long noncoding RNA UCA1. *J Cell Commun Signal*.
- 22 Kaur S, Elkahoul AG, Singh SP, Arakelyan A and Roberts DD (2018) A function-blocking  
23 CD47 antibody modulates extracellular vesicle-mediated intercellular signaling between  
24 breast carcinoma cells and endothelial cells. *J Cell Commun Signal* **12**(1): 157-170.
- 25 Kazerounian S and Lawler J (2018) Integration of pro- and anti-angiogenic signals by  
26 endothelial cells. *J Cell Commun Signal* **12**(1): 171-179.
- 27 Kim C, Yang H, Fukushima Y, Saw PE, Lee J, Park JS, Park I, Jung J, Kataoka H, Lee D, Heo  
28 WD, Kim I, Jon S, Adams RH, Nishikawa S, Uemura A and Koh GY (2014) Vascular  
29 RhoJ is an effective and selective target for tumor angiogenesis and vascular disruption.  
30 *Cancer Cell* **25**(1): 102-117.
- 31 Kitamura T, Qian BZ and Pollard JW (2015) Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev*  
32 *Immunol* **15**(2): 73-86.
- 33 Lawson CD and Ridley AJ (2018) Rho GTPase signaling complexes in cell migration and  
34 invasion. *J Cell Biol* **217**(2): 447-457.
- 35 Lehmann DM, Seneviratne AM and Smrcka AV (2008) Small molecule disruption of G protein  
36 beta gamma subunit signaling inhibits neutrophil chemotaxis and inflammation. *Mol*  
37 *Pharmacol* **73**(2): 410-418.
- 38 Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W,  
39 Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajar KA,  
40 Manova K, Benezra R and Rafii S (2001) Impaired recruitment of bone-marrow-derived  
41 endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth.  
42 *Nat Med* **7**(11): 1194-1201.
- 43 Madlambayan GJ, Butler JM, Hosaka K, Jorgensen M, Fu D, Guthrie SM, Shenoy AK, Brank  
44 A, Russell KJ, Otero J, Siemann DW, Scott EW and Cogle CR (2009) Bone marrow  
45 stem and progenitor cell contribution to neovasclogenesis is dependent on model  
46 system with SDF-1 as a permissive trigger. *Blood* **114**(19): 4310-4319.
- 47 Ohle SJ, Anandaiah A, Fabian AJ, Fine A and Kotton DN (2012) Maintenance and repair of the  
48 lung endothelium does not involve contributions from marrow-derived endothelial  
49 precursor cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **47**(1): 11-19.
- 50 Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-  
51 Redondo M, Williams C, Garcia-Santos G, Ghajar C, Nitoro-Hoshino A, Hoffman C,  
52 Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady  
53 MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J and Lyden D (2012) Melanoma  
54 exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype  
55 through MET. *Nat Med* **18**(6): 883-891.
- 56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- Raffi S and Lyden D (2003) Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* **9**(6): 702-712.
- Ridge SM, Bhattacharyya D, Dervan E, Naicker SD, Burke AJ, Murphy JM, O'Leary K, Greene J, Ryan AE, Sullivan FJ and Glynn SA (2018) Secreted factors from metastatic prostate cancer cells stimulate mesenchymal stem cell transition to a pro-tumourigenic 'activated' state that enhances prostate cancer cell migration. *International journal of cancer* **142**(10): 2056-2067.
- Ruppel KM, Willison D, Kataoka H, Wang A, Zheng YW, Cornelissen I, Yin L, Xu SM and Coughlin SR (2005) Essential role for Galpha13 in endothelial cells during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**(23): 8281-8286.
- Sekiguchi H, Ii M, Jujo K, Yokoyama A, Hagiwara N and Asahara T (2011) Improved culture-based isolation of differentiating endothelial progenitor cells from mouse bone marrow mononuclear cells. *PLoS One* **6**(12): e28639.
- Shaw JP, Basch R and Shamamian P (2004) Hematopoietic stem cells and endothelial cell precursors express Tie-2, CD31 and CD45. *Blood Cells Mol Dis* **32**(1): 168-175.
- Smith HA and Kang Y (2013) The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. *J Mol Med (Berl)* **91**(4): 411-429.
- Sosa MS, Lopez-Haber C, Yang C, Wang H, Lemmon MA, Busillo JM, Luo J, Benovic JL, Klein-Szanto A, Yagi H, Gutkind JS, Parsons RE and Kazanietz MG (2010) Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an essential mediator of ErbB signaling in breast cancer. *Mol Cell* **40**(6): 877-892.
- St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, Lal A, Riggins GJ, Lengauer C, Vogelstein B and Kinzler KW (2000) Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* **289**(5482): 1197-1202.
- Vazquez-Prado J, Bracho-Valdes I, Cervantes-Villagrana RD and Reyes-Cruz G (2016) Gbetagamma Pathways in Cell Polarity and Migration Linked to Oncogenic GPCR Signaling: Potential Relevance in Tumor Microenvironment. *Mol Pharmacol* **90**(5): 573-586.
- Vincent KM and Postovit LM (2018) Matricellular proteins in cancer: a focus on secreted Frizzled-related proteins. *J Cell Commun Signal* **12**(1): 103-112.
- Welch HC, Coadwell WJ, Ellson CD, Ferguson GJ, Andrews SR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Hawkins PT and Stephens LR (2002) P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell* **108**(6): 809-821.

#### Figure Legends.

**Figure 1. Cultured BMDC enriched with Tie2<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> cells promote tumor growth. A)** Experimental design to evaluate the effect of cultured BMDC and fresh bone marrow cells co-inoculated with lung carcinoma cells on tumor growth in immunocompetent mice. **B)** Cultured BMDC promote LAP0297 tumor growth in FVB mice. Mice were inoculated with cancer cells (0.5X10<sup>6</sup> lung carcinoma LAP0297) alone or either with BMDC (1X10<sup>6</sup> BMDC + 0.5X10<sup>6</sup> LAP0297) or fresh bone marrow cells (1X10<sup>6</sup> BM + 0.5X10<sup>6</sup> LAP0297). Data represent the mean ± SEM; LAP (n=12), LAP+BMDC (n=6) and LAP+BM (n=10); \*p<0.05; \*\*\*p<0.001 (vs LAP); two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey test. **C)** BMDCs promote Lewis lung carcinoma (LLC) tumor growth in C57 mice. LLC cells (10<sup>6</sup>) alone or with BMDC (10<sup>6</sup>) were inoculated into immunocompetent C57 mice and tumors allowed to developed for two weeks. Data represent the mean ± SEM of 6 to 7 animals per group. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; LLC vs (LLC+BMDC) analyzed by two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey test. **D)** Freshly isolated bone marrow cells attenuate LAP0297 tumor growth. FVB mice were inoculated with LAP0297 cells alone or with freshly isolated bone marrow cells and tumors were monitored for two weeks. Data represent the mean ± SEM of 4 to 5 animals per group. \*p<0.05, \*\*\*p<0.001, two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey test. **E)** Rate of green fluorescent cells isolated from Tie2-GFP<sup>+</sup> transgenic mice. Bone marrow cells from wild type and FVB-Tie2-GFP



mice were analyzed by flow cytometry (plots a and b, respectively); plot c shows the rate of fluorescent cells from lungs of FVB-Tie2-GFP transgenic mice. **F**) Cultured BMDC are enriched with Tie2<sup>+</sup> cells. BMDC and freshly isolated bone marrow cells (BM) from wild type FVB mice were stained with anti Tie2 antibodies and subjected to FACS analysis. **G**) Cultured Tie2<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> BMDC express the monocyte marker CD11b. BMDC were stained with antibodies for Tie2 (PE), CD45 (PE-Cy7) and CD11b (FITC) and analyzed by FACS. **H**) Rate of Tie2<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> cells in LAP0297 tumors. FVB mice were inoculated with 10<sup>6</sup> LAP0297 cells and tumors allowed to grow for two weeks. Expression of Tie2 (PE), CD45 (PE-Cy7) and CD11b (BV605) in dissected tumors, analyzed as single cell suspensions, was done by FACS. Background fluorescence was assessed with the FITC channel. **I**) Expression of cell markers in BMDC and freshly isolated bone marrow cells. RT-PCR analysis for the indicated cell markers was performed in fresh bone marrow cells (BM) isolated from FVB mice and in cultured BMDC. Data represent the mean ± SEM of three independent experiments. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; two-way ANOVA followed by the Tukey test.

**Figure 2. Protumoral BMDC-derived conditioned media stimulate lung cancer cell migration and signaling.** **A**) BMDC conditioned media (BMDC-CM) stimulate AKT, ERK and mTOR signaling cascades in lung cancer cells. LAP0297 cells, maintained overnight in serum-free EBM-2 media, were stimulated with BMDC-CM for the indicated times and subjected to western blot analysis to detect the activation of ERK, AKT and mTOR (using pS6, as readout). Data represent the mean ± SEM of three independent experiments. pERK: \*p<0.05, \*\*p<0.01 (all vs basal), one-way ANOVA followed by Dunnett test. pS6: \*p<0.05, \*\*p<0.01 (all vs basal), t-test. **B**) BMDC-CM promotes lung cancer cell migration. Serum starved LAP0297 cells, in six-well plate dishes, were subjected to wound closure assays for 18 hours. Cells were stimulated with BMDC-CM. 10% FBS served as positive control. Data represent the mean ± SEM of four independent experiments. \*p<0.05 (all vs basal), \*\*\*p<0.001, t-test. **C**) LPA and HGF promote LAP0297 cell migration. Wound healing assays were done with cells stimulated with agonists for GPCRs: SDF-1 (50 ng/mL), S1P (1 μM) and LPA (5 μM); or tyrosine-kinase receptors: HGF (10 ng/mL). Graph represents the mean ± SEM of four independent experiments. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (vs. basal); one-way ANOVA followed by Tukey. **D**) Pertussis toxin inhibits LAP0297 cell migration induced by BMDC-CM. Cells were stimulated with LPA (5 μM) or BMDC-CM in the absence or presence of PTX (100 ng/mL) to inhibit heterotrimeric Gi protein. Data represent three independent experiments, \*p<0.05 (-PTX vs +PTX); #p<0.05, ##p<0.01 (vs basal); one-way ANOVA followed by Tukey, \*p<0.05 (CM vs. CM-PTX), t-test. **E**) Inhibition of Gβγ by gallein prevents LAP0297 cell migration induced by BMDC-CM. Cells were stimulated with LPA (5 μM) or BMDC-CM, in the absence or presence of gallein (10 μM). Data represent three independent experiments. \*p<0.05, \*\*p<0.01 (-Gal vs +Gal); #p<0.05, ##p<0.01 (basal vs stimuli); one-way ANOVA followed by Tukey.

**Figure 3. Lung cancer cell conditioned media promote BMDCs migration and signaling.** **A**) Conditioned media collected from LAP0297 lung cancer cells (LAP0297-CM) stimulate AKT, ERK and mTOR signaling cascades in BMDC. Cultured BMDC were starved for 14 h, stimulated with LAP0297-CM and analyzed by western blot to assess the activation of ERK, AKT and mTOR (with pS6 as readout) signaling pathways. Data represent the mean ± SEM of three independent experiments. \*\*\*p<0.001 (all vs basal), one-way ANOVA followed by the Tukey test. **B**) BMDC migration is induced by lung cancer cell conditioned media and PDGF. Serum-starved BMDC cultures were wounded, stimulated with LAP-CM and PDGF (100 ng/mL) and cells allowed to migrate for 18 h. Data represent the mean ± SEM of 3 to 4 independent experiments, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (vs basal); ##p<0.01 (LAP-CM vs PDGF); one-way ANOVA followed by Tukey. **C**) BMDCs activate AKT and ERK signaling pathways in response SDF-1/CXCL12. Serum-starved BMDC were stimulated for 5 min with the indicated agonists and subjected to western blot analysis to assess the activation of AKT and ERK. AKT activation (pAKT Ser473): \*\*\*p<0.001 (vs basal), one-way ANOVA followed by the Tukey test. ERK activation (pERK): \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (vs basal), one-way ANOVA followed by the Tukey test. **D**) LAP0297 lung cancer cell conditioned media (LAP-CM) and SDF-1/CXCL12 promote BMDC migration via heterotrimeric Gi proteins. BMDC cells were incubated with pertussis toxin (100 ng/mL) to address the role of Gi in LAP0297-CM and SDF-1/CXCL12-induced migration. Data represent the mean ± SEM of three



independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (basal vs LAP-CM or SDF-1); ## $p < 0.01$  (-PTX vs +PTX); one-way ANOVA followed by Tukey. **E**) BMDC activate AKT and ERK via Gi-dependent and independent pathways as revealed by the effect of PTX (100 ng/mL). Cells were stimulated by 5 min. Similar results were obtained in 3 independent experiments.

**Figure 4. G $\beta\gamma$ -dependent endothelial cell migration is promoted by conditioned media from lung cancer cells and BMDC.** **A**) Hypothetical axis of communication between lung cancer cells and BMDC with endothelial cells. **B**) G $\beta\gamma$ -dependent endothelial cell migration. Confluent endothelial cell cultures were starved for 14 hours, wounded and stimulated with LAP0297-CM. Cells were allowed to migrate for 18 h. To address the participation of Gi and G $\beta\gamma$ -dependent pathways, cells were treated with PTX (100 ng/mL) and gallein (10  $\mu$ M Gal) for two hours before and throughout the migration period. Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\* $p < 0.01$  (versus Basal); # $p < 0.05$  (LAP-CM versus gallein), n.s. no significance; one-way ANOVA followed by Tukey. **C**) BMDC-conditioned media stimulate endothelial cell migration via G $\beta\gamma$ . Endothelial cell migration induced by BMDC-CM in the absence or presence of PTX and gallein was tested by wound healing assays, HGF (10 ng/mL) served as positive control. Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  (vs basal); # $p < 0.05$  (BMDC-CM versus gallein), n.s. no significance; one-way ANOVA followed by Tukey.

**Figure 5. Expression profile of RhoGEFs and selected signaling proteins in protumoral cultured bone marrow derived cells (BMDC) and freshly isolated bone marrow cells (BM).** **A**) The whole group of DH-RhoGEFs encoded by the mouse genome was considered to analyze, by RT-PCR, their expression in BMDC and BM as previously described (Hernandez-Garcia et al., 2015). RhoGEFs are grouped according to their phylogenetic links (Hernandez-Garcia et al., 2015). Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , two-way ANOVA followed by Tukey test. **B**) Western blot of selected signaling proteins, RhoGEFs and GTPases in cultured BMDC compared to freshly isolated BM cells. Total protein was adjusted to the amount of actin. **C**) GTPase Rac activation in BMDC stimulated lung cancer cell conditioned media (LAP0297-CM). BMDC from FVB-Tie2-GFP mice were incubated overnight in serum free EBM-2 media and stimulated with LAP0297-CM for the indicated times. Rac-GTP pulldown was performed with GST-PAK-CRIB beads. Activation of AKT and ERK was tested in parallel. Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $p < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Dunnett test. **D**) Model highlighting the putative role of GPCR-regulated RhoGEFs in BMDC migration induced by tumor-derived chemotactic factors with a particular contribution of G $\beta\gamma$ -dependent signaling pathway. The overall contribution of this signaling heterodimer in chemotactic cell migration has been previously reviewed (Vazquez-Prado et al., 2016)

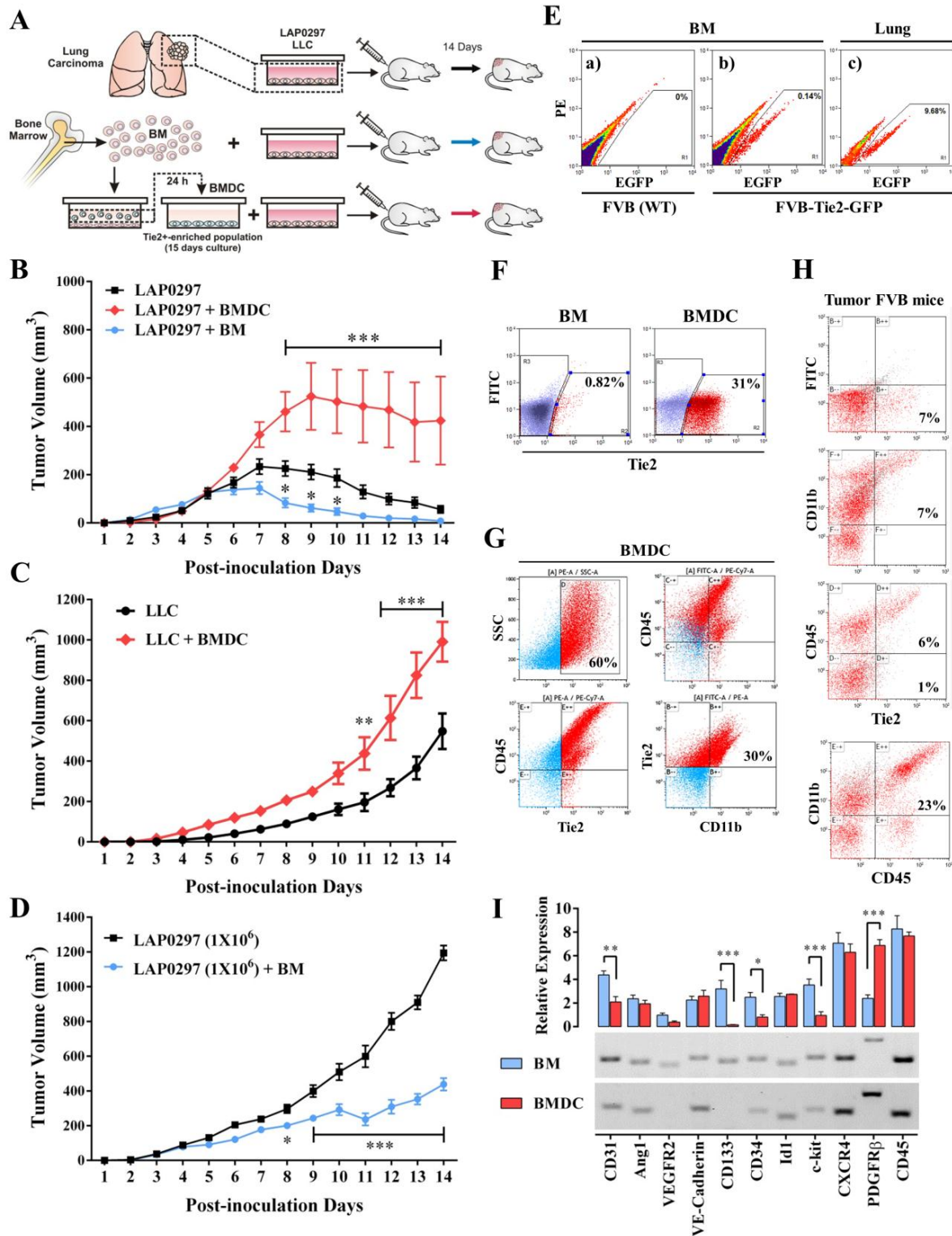
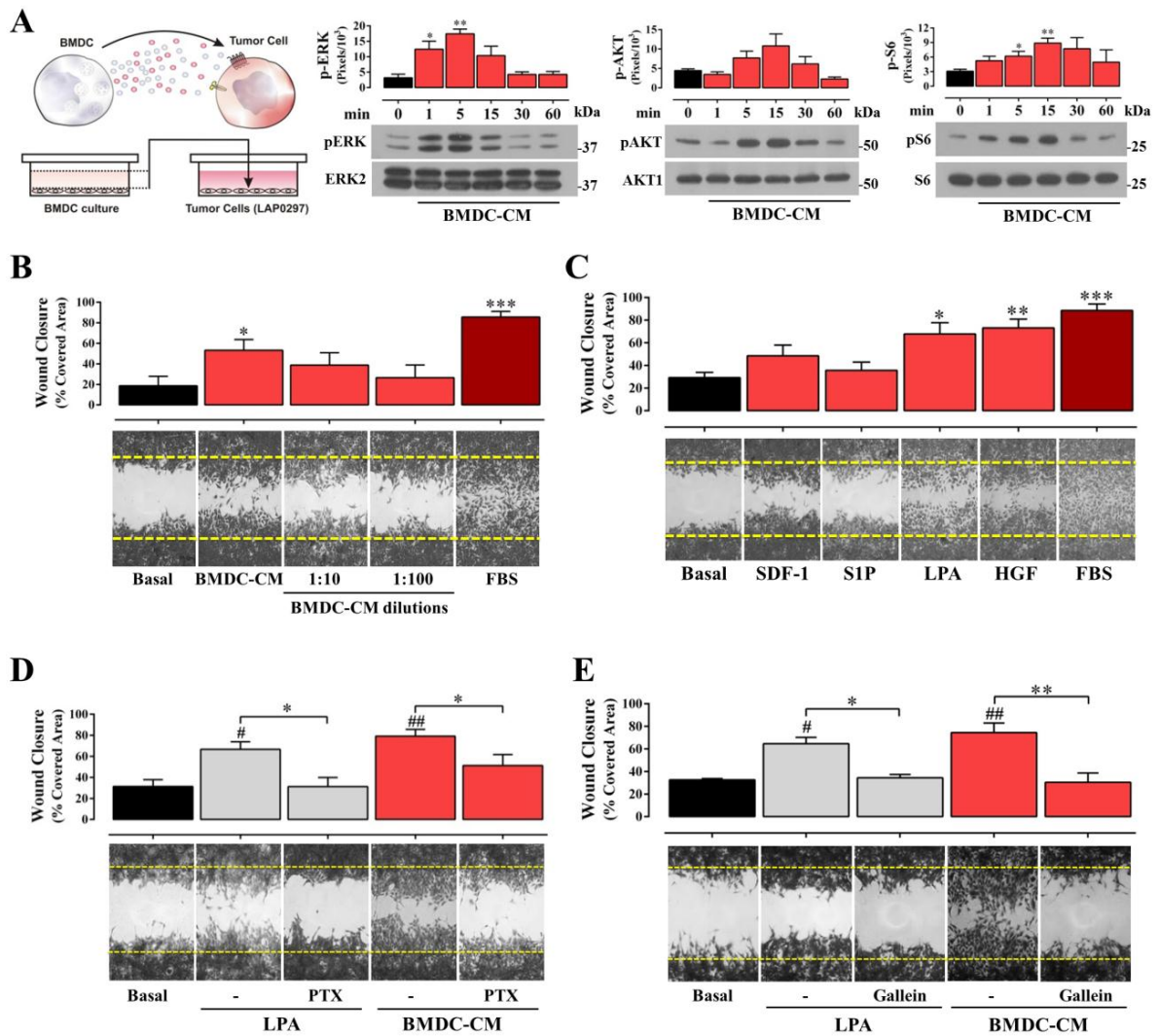


Figure 1. Cultured BMDC enriched with Tie2<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> cells promote tumor growth.



**Figure 2. Protumoral BMDC-derived conditioned media stimulate lung cancer cell migration and signaling.**

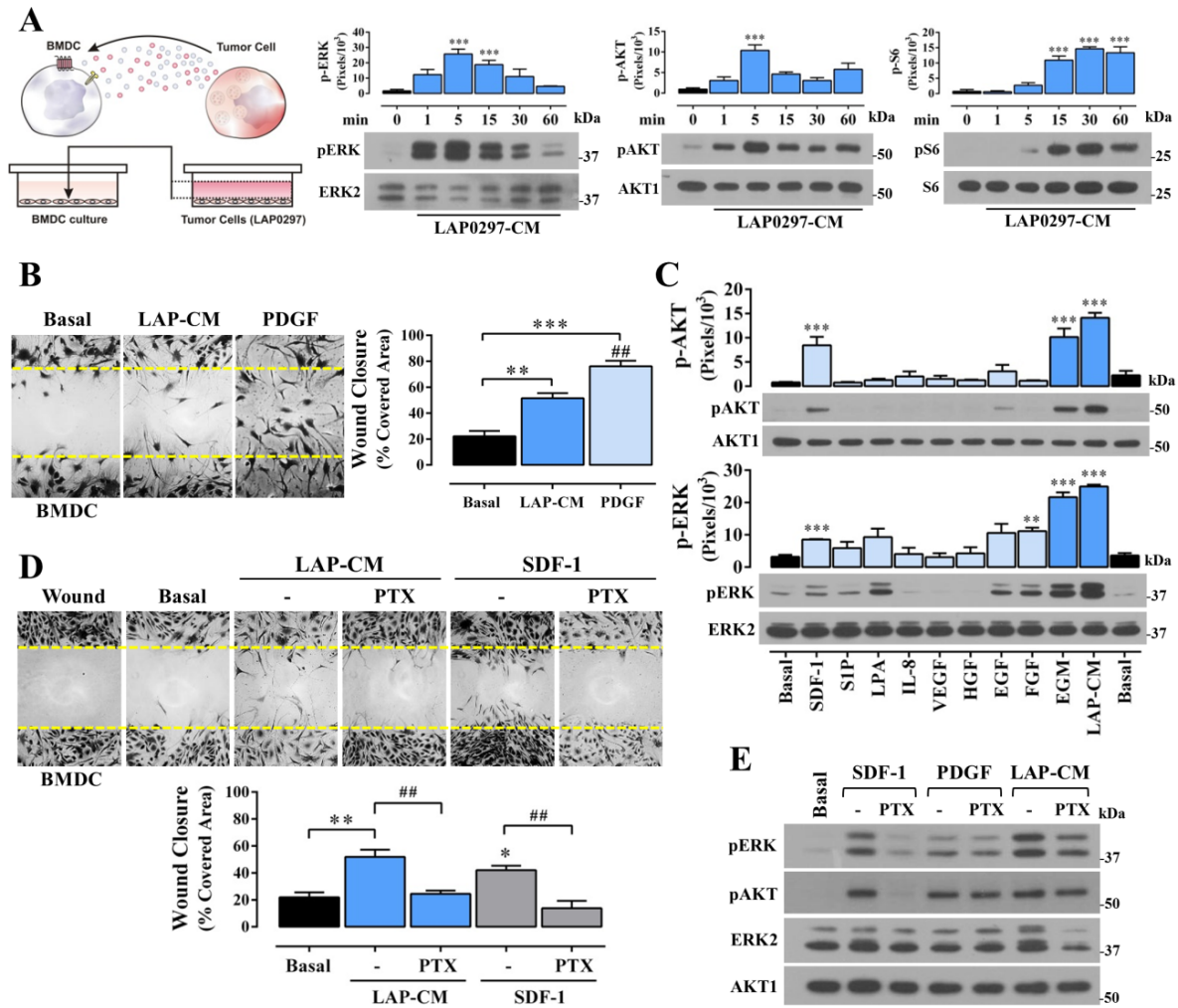


Figure 3. Lung cancer cell conditioned media promote BMDCs migration and signaling.

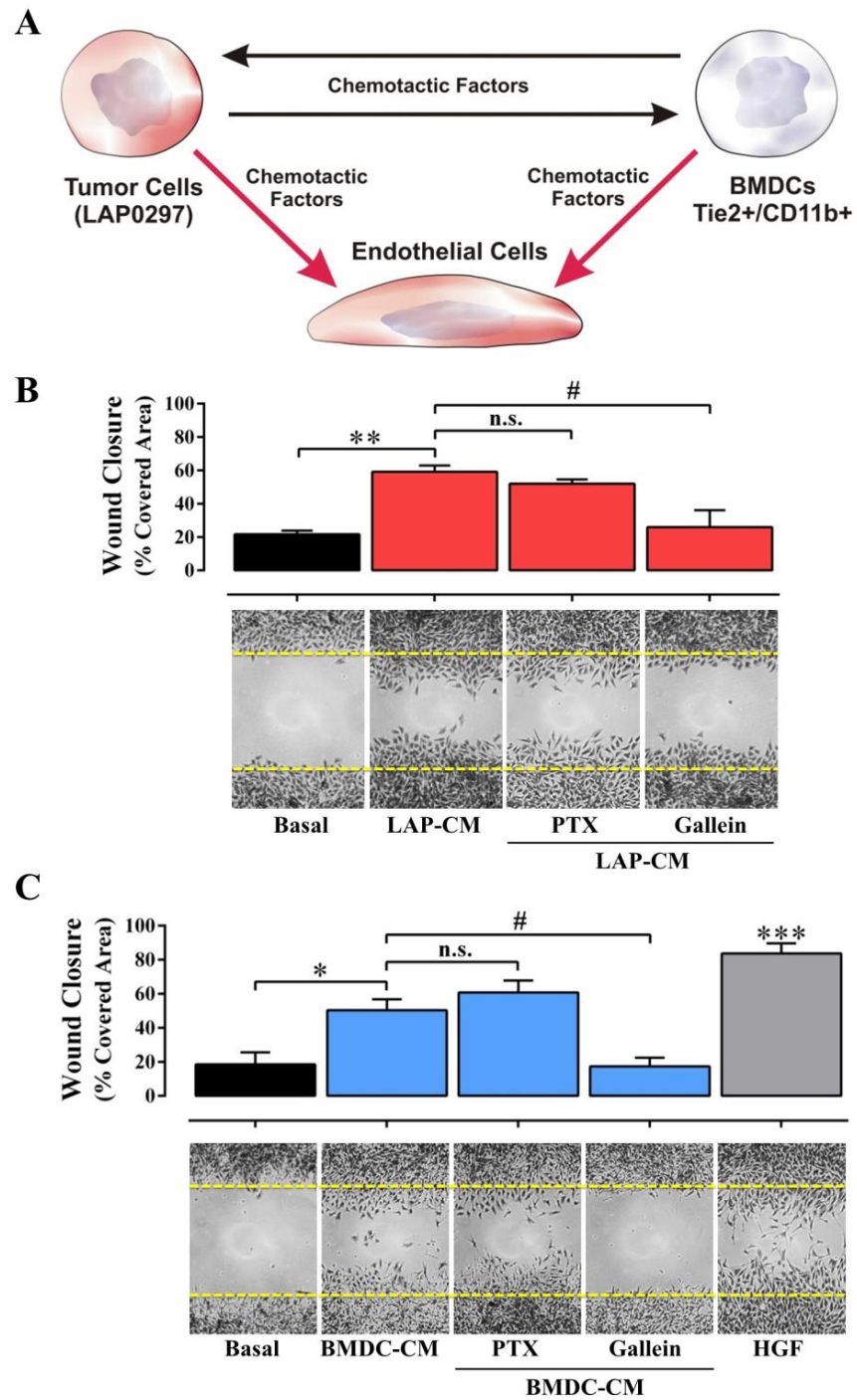


Figure 4.  $G\beta\gamma$ -dependent endothelial cell migration is promoted by conditioned media from lung cancer cells and BMDC.



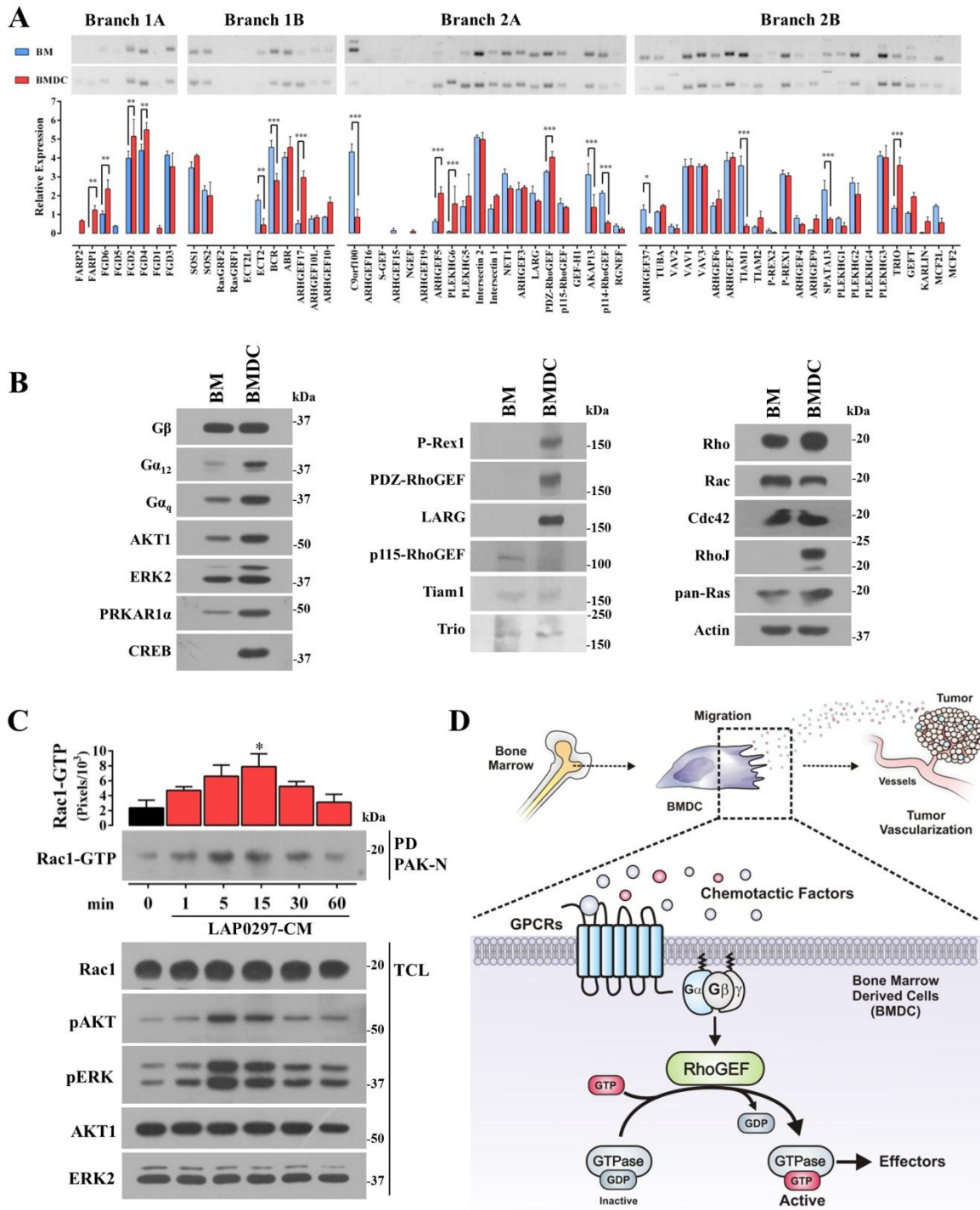


Figure 5. Expression profile of RhoGEFs and selected signaling proteins in protumoral cultured bone marrow derived cells (BMDC) and freshly isolated bone marrow cells (BM).



## 15.3 Artículo de Revisión: $G\beta\gamma$ Pathways in Cell Polarity and Migration Linked to Oncogenic GPCR Signaling: Potential Relevance in Tumor Microenvironment

1521-0111/90/5/573-586\$25.00  
MOLECULAR PHARMACOLOGY  
Copyright © 2016 by The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics

<http://dx.doi.org/10.1124/mol.116.105338>  
Mol Pharmacol 90:573-586, November 2016

MINIREVIEW—A LATIN AMERICAN PERSPECTIVE ON G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS

### $G\beta\gamma$ Pathways in Cell Polarity and Migration Linked to Oncogenic GPCR Signaling: Potential Relevance in Tumor Microenvironment

José Vázquez-Prado, Ismael Bracho-Valdés, Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana, and Guadalupe Reyes-Cruz

Departments of Pharmacology (J.V.-P., R.D.C.-V.) and Cell Biology (G.R.-C.), CINVESTAV-IPN, Mexico City, and Department of Pharmacology (I.B.-V.), School of Medicine, UABC, Mexicali, B.C., Mexico

Received May 25, 2016; accepted September 14, 2016

#### ABSTRACT

Cancer cells and stroma cells in tumors secrete chemotactic agonists that exacerbate invasive behavior, promote tumor-induced angiogenesis, and recruit protumoral bone marrow-derived cells. In response to shallow gradients of chemotactic stimuli recognized by G protein-coupled receptors (GPCRs),  $G\beta\gamma$ -dependent signaling cascades contribute to specifying the spatiotemporal assembly of cytoskeletal structures that can dynamically alter cell morphology. This sophisticated process is intrinsically linked to the activation of Rho GTPases and their cytoskeletal-remodeling effectors. Thus, Rho guanine nucleotide exchange factors, the activators of these molecular switches, and their upstream signaling partners are considered participants of tumor progression. Specifically, phosphoinositide-3 kinases

(class I PI3Ks,  $\beta$  and  $\gamma$ ) and P-Rex1, a Rac-specific guanine nucleotide exchange factor, are fundamental  $G\beta\gamma$  effectors in the pathways controlling directionally persistent motility. In addition, GPCR-dependent chemotactic responses often involve endosomal trafficking of signaling proteins; coincidentally, endosomes serve as signaling platforms for  $G\beta\gamma$ . In preclinical murine models of cancer, inhibition of  $G\beta\gamma$  attenuates tumor growth, whereas in cancer patients, aberrant overexpression of chemotactic  $G\beta\gamma$  effectors and recently identified mutations in  $G\beta$  correlate with poor clinical outcome. Here we discuss emerging paradigms of  $G\beta\gamma$  signaling in cancer, which are essential for chemotactic cell migration and represent novel opportunities to develop pathway-specific pharmacologic treatments.

#### Introduction

In tumor microenvironments, cells adjust their shape and move in response to multiple factors secreted by cancer cells and stromal cells (Friedl and Alexander, 2011; Roussos et al., 2011). Inherent intracellular forces are generated by actin polymerization and ATPase activity of myosin motors, and these mechanical responses are tightly controlled by receptor-dependent signaling mechanisms that define the precise spatiotemporal reorganization of the actin cytoskeleton (Alexander and Friedl, 2012; Devreotes and Horwitz, 2015). In particular, chemotactic G protein-coupled receptors (GPCRs) elicit G protein-dependent signaling pathways linked to metastatic dissemination of cancer cells, formation of

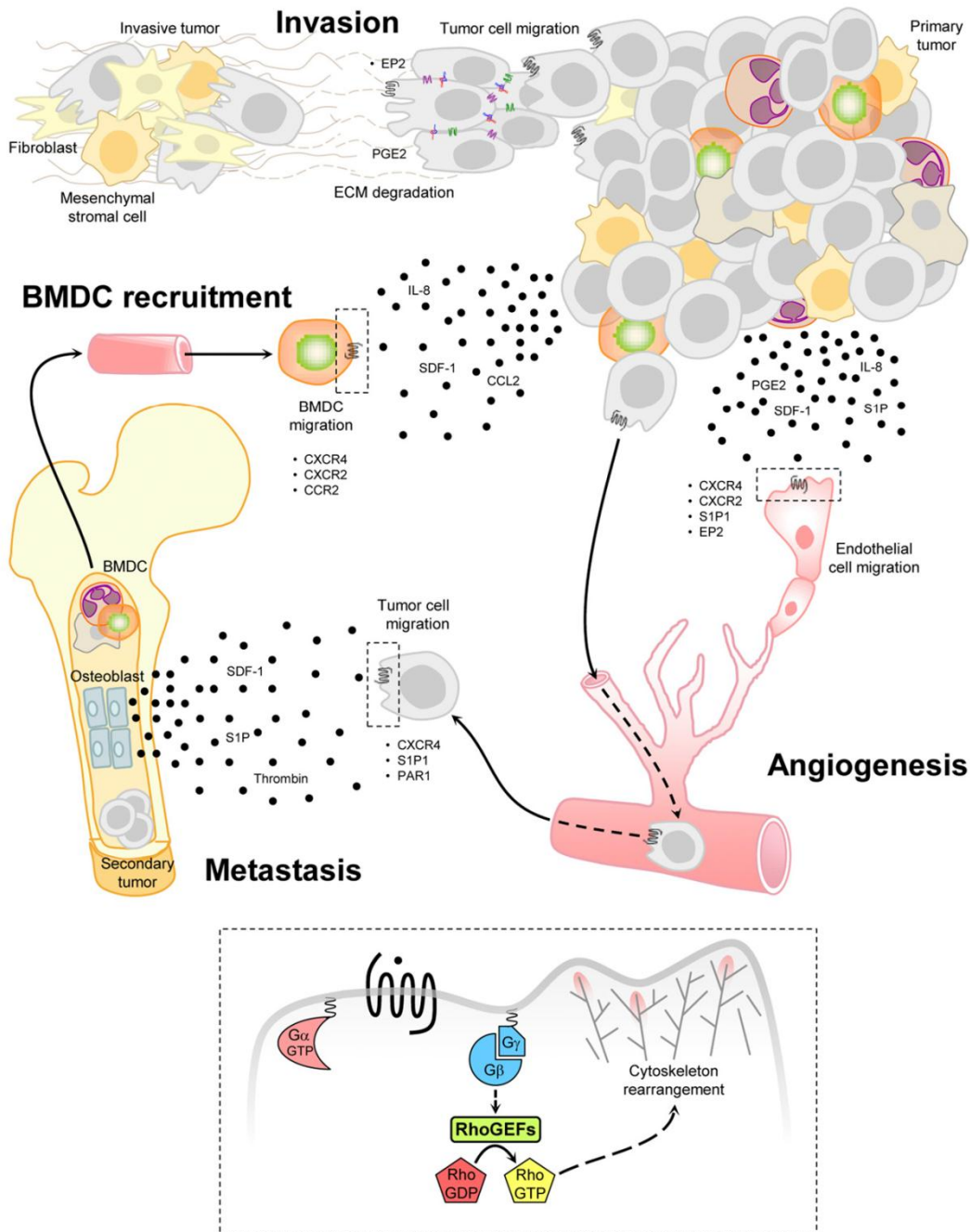
new blood vessels, and recruitment of proangiogenic cells from the bone marrow, all of which are critical to maintaining cancer progression (Fig. 1) (Dorsam and Gutkind, 2007; Lappano and Maggiolini, 2011).

Current models of GPCR-dependent chemotactic cell migration have evolved from studies of fast-moving cells that migrate individually, such as *Dictyostelium* amoebae and neutrophils. These generic pathways mediating migration suggest involvement of  $G\beta\gamma$ -dependent effectors, particularly phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase and phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate-dependent effectors, including guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases. Cytoskeletal reorganization is launched by actin nucleation sites generated by effectors of GTP-bound Rho GTPases; RhoA, Rac1, and Cdc42 are the best characterized members of this family of molecular switches (Fig. 2). These Rho-GTPase-dependent downstream mechanisms will not be discussed here, but readers are encouraged to consult

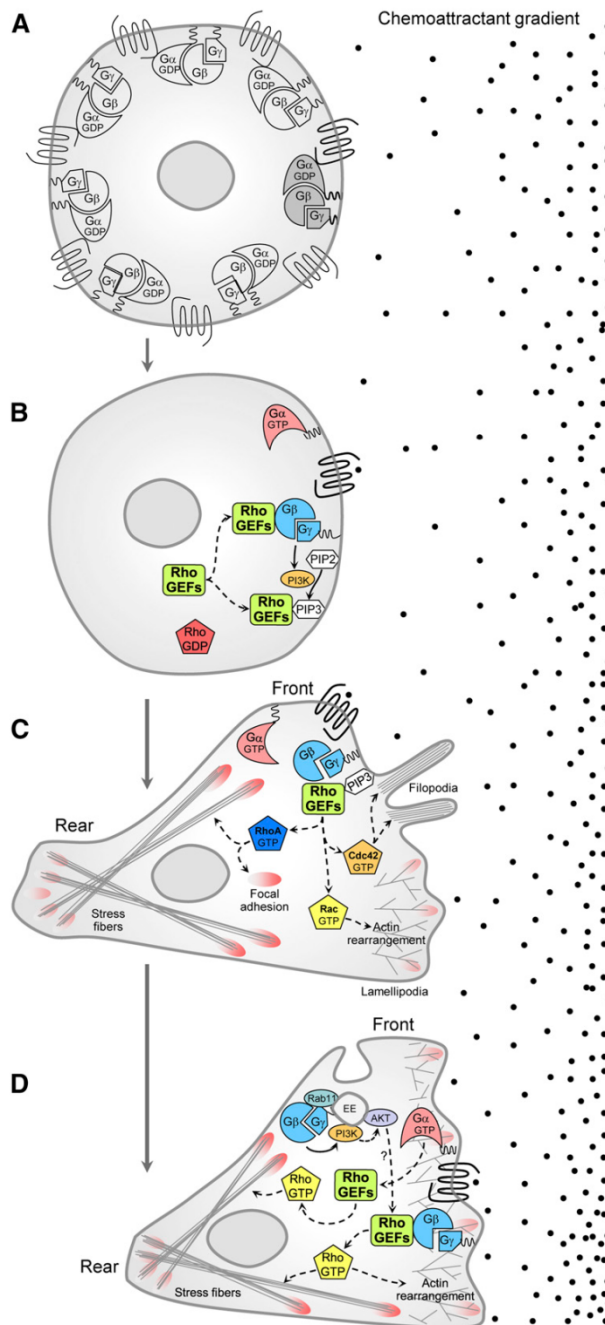
This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) grants [Grant 152434] and [Grant 24011] to JVP and GRC, respectively.  
[dx.doi.org/10.1124/mol.116.105338](http://dx.doi.org/10.1124/mol.116.105338).

**ABBREVIATIONS:** AKT, thymoma viral proto-oncogene; BMDC, bone marrow -derived cell; CaSR, calcium-sensing receptor; ERK, extracellular signal regulated kinase; GEF, guanine nucleotide exchange factor; GPCR, G protein-coupled receptor; GRK, G protein-coupled receptor kinase; mTORC2, mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 2; PI3K, phosphoinositide-3 kinase; PH domain, pleckstrin-homology domain; PKA, protein kinase A; RacGEF, Rac guanine nucleotide exchange factor.

574 Vázquez-Prado et al.



**Fig. 1.** GPCR signaling to Rho GTPases plays a critical role in the tumor microenvironment. Cancer progression relies on the communication among different cell populations recruited into the tumor stroma. These include fibroblasts and endothelial cells from surrounding tissues and bone marrow-derived cells (BMDCs), such as macrophages, leukocytes, monocytes, endothelial progenitor cells, and other myeloid precursors. Chemokines secreted by stromal and cancer cells are key mediators of inflammation, angiogenesis, and immunosuppression, contributing to tumor growth, invasion and metastasis. Among them, several GPCR agonists in the tumor microenvironment activate signaling pathways to Rho GTPases via  $G\alpha$  and  $G\beta\gamma$  subunits and their RhoGEF effectors. The leading edge of migrating cells contributing to tumor progression is amplified in the inset to highlight the role of  $G\beta\gamma$  as an activator of RhoGEFs that regulate actin cytoskeleton dynamics leading chemotactic cell migration.



**Fig. 2.** GPCR-dependent chemotaxis in individual migrating cells. A general model of chemotactic cell migration is based on studies of fast-moving individual cells, such as neutrophils and *Dictyostelium discoideum* amoebas (Devreotes and Horwitz, 2015). Accordingly, a chemotactic gradient is sensed by GPCRs located at the proximity of incoming stimuli (A). Then, Gβγ is locally released, recruiting PI3K and RhoGEFs (B). These effectors of Gβγ promote a spatiotemporal restricted activation of Rho GTPases resulting in polarized morphologic changes based on the dynamics of the actin cytoskeleton (C). In this context, cell migration occurs as an integrated effect of protrusions, adhesion, and contraction at the advancing front, followed by rear-edge retraction. Maintained cell migration involves translocation of signaling proteins (D). The process is positively influenced by vesicle trafficking (Murphy et al., 2009). In this regard, Gβγ trafficking, mediated by its interaction with Rab11, activates a PI3K-AKT signaling axis at early endosomes (EE) (García-Regalado et al., 2008). Whether Gβγ-trafficking leads to endosomal activation of RhoGEFs is currently being investigated.

excellent reviews covering these topics (Rickert et al., 2000; Ridley et al., 2003; Burridge and Wennerberg, 2004; Van Haastert and Devreotes, 2004; Charest and Firtel, 2007; Ridley, 2015). General mechanisms of directional cell migration provide a basis to explore GPCR-dependent cell

migration linked to cancer progression; however, in cancer settings, this process is further complicated by the influence of a plethora of stimuli in the microenvironment. Moreover, oncogenic pathways participating in chemotactic migration are affected by mutational changes, overexpression, and

576 Vázquez-Prado et al.

differential repertoire of signaling systems, which, among many other factors, eventually are integrated to facilitate individual and collective migration of cancer and protumoral cells (Fig. 1).

We focus this review on the role of  $G\beta\gamma$  signaling in cancer. Emphasis is given to upstream effectors leading to the activation of Rho GTPases in the pathways that control chemotactic cell migration. In this window of molecular interactions, the participation of class-I PI3Ks ( $\beta$  and  $\gamma$ ) and P-Rex1, a Rac-specific guanine nucleotide exchange factor, is considered critical. We highlight the properties of P-Rex1, known to be activated in concert by  $G\beta\gamma$  and phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (Welch et al., 2002; Welch, 2015), as a putative scaffold of chemotactic signaling. The proposed role of this multidomain effector is based on its reported interactions with sphingosine-1-phosphate receptors and the serine/threonine kinases mTOR and type I protein kinase A (PKA) (Hernández-Negrete et al., 2007; Ledezma-Sánchez et al., 2010; Chávez-Vargas et al., 2016). Overall, the proven relevance of multiple chemokines in oncogenic settings has pointed to GPCRs and their signaling effectors as possible pharmacologic targets in cancer research.

### Protumoral Chemotactic Agonists

Multiple agonists play a driving role in cancer progression. Oncogenic chemokines attract and consequently diversify the repertoire of cells associated with proliferating tumoral cells. Once incorporated as cellular components of the tumor stroma, fibroblasts, endothelial cells, and immune cells also contribute to increase the variety of secreted chemokines that not only stimulate the surrounding tissues, but they also have a systemic effect: attracting cells from the bone marrow (Fig. 1) (Orimo et al., 2005; Wels et al., 2008; Kojima et al., 2010; Scherz-Shouval et al., 2014). Tumor-associated bone marrow-derived cells (BMDCs) further support cancer progression via their ability to secrete chemokines, cytokines, growth factors, and proteins of the extracellular matrix (Nolan et al., 2007; Gao et al., 2008; Sekiguchi et al., 2011). Among BMDC's protumoral effects, preparing the ground where metastatic niches are eventually established is particularly significant (Lyden et al., 2001; Kaplan et al., 2005; Gao et al., 2008; Psaila and Lyden, 2009; Qian et al., 2011; Peinado et al., 2012).

Examples of protumoral GPCR agonists with chemotactic properties include CCL2/5/22/25, CXCL1/2/5/8 (interleukin-8)/12 (stromal cell-derived factor-1), and CX3CL1 (Roussos et al., 2011; Ugel et al., 2015; Bronte and Bria, 2016). In addition, bioactive lipids such as sphingosine-1-phosphate (Liang et al., 2013) and lysophosphatidic acid (Jonkers and Moolenaar, 2009; Liu et al., 2009) also stimulate pro-oncogenic migratory pathways. CXCL12 and CCL2 attract monocytes that promote tumor-induced angiogenesis and contribute to the maintenance of an immunosuppressive microenvironment, which allows transformed cells to evade antineoplastic immune responses (Qian and Pollard, 2010; Kitamura et al., 2015). Furthermore, CXCL12 recruits endothelial progenitors from the bone marrow (Orimo et al., 2005), promotes angiogenic responses mediated by Rho GTPases (Carretero-Ortega et al., 2010), and plays a positive role in tumor vascularization (Guleng et al., 2005). Multiple cancer cells overexpress CXCR4 receptors, putatively enabling them to metastasize in response to CXCL12. Examples include breast carcinoma

(Müller et al., 2001; Yagi et al., 2011), gastric carcinoma (Yasumoto et al., 2006), pancreatic cancer (Marchesi et al., 2004; Xu et al., 2015), ovarian carcinoma (Barbolina et al., 2010), and oral cancers (Delilbasi et al., 2004; Uchida et al., 2007). Metastatic signaling mechanisms elicited by CXCR4 involve heterotrimeric  $G_i$  and  $G_{13}$  proteins. In these cases, chemotactic GPCRs activate Rho GTPases that control cell migration into the stroma of primary tumors and metastatic tissues. Therefore, signaling pathways leading to the activation of Rho GTPases are considered central players in cancer settings (Tan et al., 2006; Yagi et al., 2011; Dillenburg-Pilla et al., 2015) (Fig. 1). As an indicator of the emerging clinical importance of these pathways, a search for *chemokine and cancer* listed 108 studies in [www.ClinicalTrials.gov](http://www.ClinicalTrials.gov).

**Role of GPCRs, Heterotrimeric G Proteins, and Their Target RhoGEFs in Tumor Growth and Metastasis.** Cancer cells often hijack G protein–signaling pathways, thereby exacerbating the effect of oncogenes. Expressed in cancer and stroma cells in tumors, GPCRs act in concert with the growth factor receptors, extracellular matrix proteins, and diverse agonists at various stages of oncogenic progression (Dorsam and Gutkind, 2007; Roussos et al., 2011) (Fig. 1). Interestingly, these seven-transmembrane receptors further enhance the oncogenic potential of transformed cells by potentiating these cells' paracrine effects. For instance, in highly metastatic breast cancer cells, calcium-sensing receptor (CaSR) promotes secretion of CCL22/MDC among other chemokines and growth factors that, in vitro, activate a chemotactic and angiogenic response. The mechanism involves transactivation of epidermal growth factor receptor and a positive loop based on the constitutive secretion of interleukin-6 (Hernández-Bedolla et al., 2015). This GPCR also attenuates signaling effects of transforming growth factor- $\beta$ , an important tumor suppressor. In particular, CaSR interferes with Smad2 phosphorylation and promotes its degradation. This inhibitory effect involves trafficking of CaSRs in Rab11-positive endosomes (Organista-Juárez et al., 2013).

The oncogenic power of GTPase-deficient mutant  $G\alpha$  proteins, originally reported using transfected cellular models, has been confirmed in various types of human cancer. Examples include mutations in *GNAQ* (encoding  $G_{aq}$ ), detected in almost 50% of ocular melanomas (Van Raamsdonk et al., 2009, 2010), and *GNAS* (encoding  $G_{as}$  protein), initially characterized in pituitary tumors, and also identified in colon, hepatic, and pancreatic cancers (among others) using deep sequencing analysis (Landis et al., 1989; O'Hayre et al., 2013).

To understand the mechanisms by which chemotactic GPCRs elicit local assembly of actin nucleation sites, it is critical to focus on Rho guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs) as effectors of heterotrimeric G proteins. Essentially, a polarized response that marks the origin of cell protrusions to follow a chemotactic gradient is coordinated by Rho GTPases activated downstream of chemotactic GPCRs (Yagi et al., 2011; Vaqué et al., 2013; Goicoechea et al., 2014; Kedziora et al., 2016). In this context, chemotactic stimuli eventually produce cytoskeletal structures as lamellipodia, filopodia, and stress fibers, which are needed for cell protrusion and contraction. These examples of crosslinked fibers of polymerized actin and their interacting regulators are controlled by distinct Rho GTPases, such as Rac1, Cdc42, and RhoA (Fig. 2) (Ridley and Hall, 1992; Ridley et al., 1992;



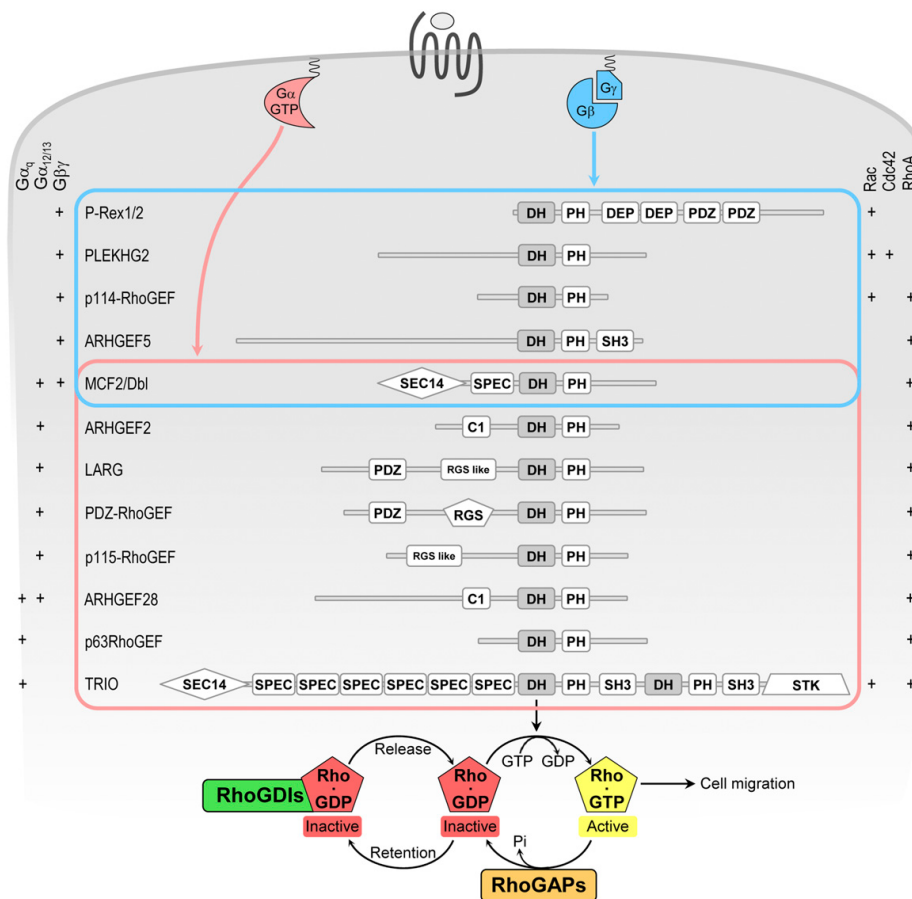
G $\beta\gamma$  Pathways in Oncogenic GPCR Signaling 577

Kozma et al., 1995; Nobes and Hall, 1995). Therefore, an instrumental role is anticipated for GPCR-regulated RhoGEFs, such as RH-RhoGEFs, P-REX1, and their upstream regulators as central controllers of the activation of Rho GTPases via the integration of second messengers, protein interactions, and posttranslational modifications (Hernández-Negrete et al., 2007; Bracho-Valdés et al., 2011; Kim et al., 2011; Cook et al., 2014; Dillon et al., 2015).

Receptors coupled to G $_i$ , G $_{12/13}$  and G $_{q/11}$  activate Rho GTPases, either via G $\beta\gamma$ , in the case of G $_i$ , or GTP-bound G $\alpha$  subunits in the other cases (Fig. 3). A group of RhoGEFs with a domain homologous to RGS, characteristic of proteins known

as regulators of G protein signaling, are directly activated by G $\alpha_{12/13}$  Hart et al., 1998; Fukuhara et al., 1999; Fukuhara et al., 2000, 2001; Aittaleb et al., 2010; Kozasa et al., 2011; Vazquez-Prado and Gutkind, 2011), whereas p63RhoGEF and Trio are activated by G $\alpha_{q/11}$  (Lutz et al., 2005; Rojas et al., 2007). These G protein-regulated RhoGEFs are members of a superfamily of DH-RhoGEFs characterized by a catalytic domain with homology to *Dbl*, which is common among the 70 members of the biggest family of RhoGEFs (Schmidt and Hall, 2002; Rossman et al., 2005; Cook et al., 2014).

The group of RH-RhoGEFs (also named RGS-RhoGEFs or RGL-RhoGEFs) includes p115RhoGEF/ARHGEF1 (Hart



**Fig. 3.** RhoGEFs identified as G $\alpha$  or G $\beta\gamma$  interactors. GPCRs activate Rho GTPases via direct interactions between G $\beta\gamma$ , GTP-bound G $\alpha_{12/13}$ , CaSRs), or G $\alpha_q$  with the indicated RhoGEFs. These RhoGEF have a modular organization characterized by the presence of a catalytic DH (*Dbl*-homology) domain, followed by a Pleckstrin homology (PH) domain predicted with the SMART analysis tool (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). The list of GPCR-regulated RhoGEFs is based on studies showing, at least by coimmunoprecipitation or other equivalent assays, interaction between the indicated G proteins and RhoGEFs. G $\alpha_{12/13}$ -regulated RhoGEFs: p115RhoGEF/ARHGEF1 (Hart et al., 1998), LARG/ARHGEF12 (Fukuhara et al., 2000), PDZ-RhoGEF/ARHGEF11 (Fukuhara et al., 1999), MCF2/Dbl/ARHGEF21 (Jin and Exton, 2000), ARHGEF2/GEF-H1 (Meiri et al., 2014), and ARHGEF28/RGNEF (Masià-Balagué et al., 2015). G $\alpha_q$ -regulated RhoGEFs: p63RhoGEF/ARHGEF25 (Lutz et al., 2005, 2007), TRIO/ARHGEF23 (Rojas et al., 2007; Vaqué et al., 2013), and ARHGEF28/RGNEF (Masià-Balagué et al., 2015). G $\beta\gamma$ -regulated RhoGEFs: P-Rex1 (Welch et al., 2002) and P-Rex2 (Donald et al., 2004), PLEKHG2 (Ueda et al., 2008), p114RhoGEF/ARHGEF18 (Niu et al., 2003), ARHGEF5/TIM (Wang et al., 2009), and MCF2/Dbl/ARHGEF21 (Nishida et al., 1999). As shown at the bottom, the cycle of Rho GTPases is regulated by GEFs, GTPase-activating proteins (GAPs) and guanine-nucleotide dissociation inhibitors (GDIs). G protein-regulated RhoGEFs activate Rho GTPases by promoting exchange of GDP for GTP. GAPs are negative regulators that help the GTPase to hydrolyze GTP to GDP. GDIs inhibit GDP dissociation, keeping the GTPase in an inactive state.

578 Vázquez-Prado et al.

et al., 1998), PDZ-RhoGEF/ARHGEF11 (Fukuhara et al., 1999), and LARG/ARHGEF12 (Fukuhara et al., 2000) (Fig. 3). The interaction between  $G\alpha_{13}$  and the RGS-like domain, involving the switch-regions of  $G\alpha_{13}$  and most of the GTPase domain (Vázquez-Prado et al., 2004), is reminiscent of the interaction between  $G\alpha$  subunits and RGS proteins. Thus, no second messengers are required as intermediates in the activation of RhoA by these G proteins, but membrane localization of  $G\alpha_{13}$  is essential (Vázquez-Prado et al., 2004). The RGS-like domains of PDZ-RhoGEF and p115RhoGEF interacting with  $G\alpha_{13}$  or a chimeric  $G\alpha_{13}$  GTPase, respectively, have been analyzed at the atomic level (Chen et al., 2005, 2008). These structures, together with multiple biochemical assays, support a model implying that  $G\alpha_{13}$  putatively removes inhibitory intramolecular interactions and facilitates the establishment of stimulatory ones critical for exposing the catalytic DH domain. As a consequence, RH-RhoGEFs interact with RhoA, promoting exchange of GDP for GTP in this small GTPase (Aittaleb et al., 2010). In a murine model of breast cancer, an aberrant coupling of  $G_{13}$  to CXCR4 receptors has been linked to metastatic progression of tumors via RhoA-dependent cytoskeletal pathways regulating cell migration (Yagi et al., 2011).

An alternative mechanism of activation of Rho GTPases, relevant to chemotactic and adhesion GPCRs signaling (Park et al., 2007; Hamoud et al., 2014; Stevenson et al., 2014; Watanabe et al., 2014), involves a second phylogenetically conserved family of GEFs. This group of nonconventional GEFs is specific for Rac and Cdc42 GTPases. It is constituted by 11 DOCK proteins, characterized by their catalytic DHR2 domain, and 3 ELMO scaffolds, known as functional interactors of DOCK 1 to 5 proteins (Gadea and Blangy, 2014; Laurin and Côté, 2014). Diverse chemoattractants stimulate ELMO-2 translocation to the plasma membrane. This relocation is mediated by  $G\beta\gamma$ , which directly interacts with the amino-terminal region of ELMO (Wang et al., 2016). In vitro, the CXCL12-dependent chemotactic response of highly metastatic breast cancer cells requires the expression of ELMO-1/2 proteins, which seems to exert a redundant role. Interestingly, in invasive ductal breast carcinoma, ELMO-1 is overexpressed, whereas in a murine model of metastatic breast cancer, ELMO-1 knockdown prevented invasion to the lungs (Li et al., 2013). Moreover, in breast cancer cells, ELMO phosphorylation by Axl resulted in increased invasion (Abu-Thuraia et al., 2015). Consistent with the intervention of Axl in chemotactic GPCR signaling, in colon cancer cells, CXCL12 stimulated Axl expression. Furthermore, the effect of this chemokine on cell invasion is attenuated by Axl knockdown, indicating the existence of an aberrant positive loop that exacerbates the CXCR4-dependent invasive behavior of colon cancer cells (Heckmann et al., 2014).

The mechanisms by which  $G\beta\gamma$  activates Rho GTPases appears to be diverse, and involve  $G\beta\gamma$ -regulated RhoGEFs and other  $G\beta\gamma$  effectors, such as PI3Ks which, through phosphorylated lipid second messengers generated in the surroundings of  $G\beta\gamma$ , activate PIP3-dependent RhoGEFs (Schwindinger and Robishaw, 2001; Welch et al., 2002; Donald et al., 2004; Rosenfeldt et al., 2004; Dupré et al., 2009; Guzmán-Hernández et al., 2009; Dbouk et al., 2012b; Vadas et al., 2013). As shown in Fig. 3, different RhoGEFs interact with  $G\beta\gamma$  and are likely activated by the versatile

heterodimer, but follow up investigations are necessary. Additional assays such as pull-downs of active-RhoGEFs using recombinant nucleotide-free mutant Rho GTPases (García-Mata et al., 2006) might help to discern whether they are *sine qua non*  $G\beta\gamma$ -effectors.

Intervention of various RhoGEFs in chemotactic signaling pathways is likely redundant. This is in part explained by their sensitivity to phosphoinositide-derived second messengers and, for certain groups, to the fact that those with equivalent conserved structures might be co-expressed. For instance, a recent systematic analysis assessing endothelial expression of 81 RhoGEFs (70 homologous to Dbl and 11 of the DOCK family) revealed that more than half, including RH-RhoGEFs and P-Rex1, are abundantly expressed in VEGF-stimulated cells as well as in tumor endothelial cells, supporting their potential participation in tumor angiogenesis (Hernández-García et al., 2015).

### Availability of $G\beta\gamma$ for Chemotactic Signaling

A recent revolution in the field of GPCR structural analysis has consolidated a rather simplistic model to explain how multiple GPCRs transduce their signals through a small group of heterotrimeric G proteins (Tesmer, 2016); agonist-occupied seven transmembrane receptors are visualized as signaling funnels by which hundreds of ligands use common mechanisms of transduction. These receptors expose an intracellular pocket that serves as a docking site occupied by the carboxyl-terminal tail of appropriate  $G\alpha$  subunits in complex with  $G\beta\gamma$ . Following this interaction,  $G\alpha$  releases its bound GDP, incorporates GTP, and dissociates from  $G\beta\gamma$  and the receptor, initiating signaling events at the plasma membrane (Tesmer, 2016). It is well accepted that this model explains multiple complex cellular processes. The emerging concept of biased agonism implicates a previously unnoticed sophisticated level of complexity. Current models of active-receptor conformation go beyond the originally postulated concept that functional receptors only existed as one of two possible conformations: active or inactive. Multiple lines of evidence suggest that various conformations of the receptors are able to promote heterotrimeric G protein-dependent and independent pathways (Liu et al., 2015b; Luttrell et al., 2015; Pupo et al., 2016).

In general terms, the canonical mechanism of heterotrimeric G protein signaling involves redistribution of GTP-bound  $G\alpha$  and  $G\beta\gamma$  at the internal surface of the plasma membrane (Lambert, 2008; Hepler, 2014). There, they interact with their effectors, which are either integral plasma membrane proteins or cytosolic signaling partners recruited via direct interactions. This stage of the process is traditionally limited to the plasma membrane, where the cycle is reinitiated when the actions of both  $G\alpha$  and  $G\beta\gamma$  are turned off.

The role of  $G\beta\gamma$  in the general model of GPCR signal transduction has been established after some initial controversy. Thirty years of signaling history have taken  $G\beta\gamma$  from an innocuous  $G\alpha$ -binding partner to a *bona fide* signal transducer that targets multiple effectors. The report by Eva Neer and David Clapham recognizing  $G\beta\gamma$  as a powerful activator of ion channels (Logothetis et al., 1987) was initially received with some skepticism by the G-protein signaling community since the catalytic  $G\alpha$  subunits were in the spotlight of proposed transducing mechanisms. However, a key role for



heterodimeric Gβγ is now well accepted (see below), in addition to the influence of heterodimeric Gβγ on Gα signaling apparent at various levels. Gβγ serves as a guanine-nucleotide dissociation inhibitor that keeps the switch represented by Gα in the off-conformation. Gβγ is needed to reinitiate a cycle of heterotrimeric G proteins by reconstituting new heterotrimers once GTP has been hydrolyzed by Gα, and it is essential for heterotrimeric G protein coupling to agonist-occupied receptors (Tang et al., 2006).

As transducers, Gβγ heterodimers are among the most ubiquitous signaling proteins; five different Gβ and twelve Gy are encoded in the human genome (Hurowitz et al., 2000). With the exception of Gβ5, which preferentially interacts with RGS 7 and 9 proteins, all Gβ subunits interact with different Gy subunits, although association preferences do exist (Mervine et al., 2006). Thus, multiple possible combinations, mainly limited by their expression in different tissues, exist. Therefore, Gβγ heterodimers exhibit an enormous signaling repertoire, perhaps comparable with that of dynamically modulated signaling lipids such as PIP3, a regular coactivator of Gβγ effectors. The existence of many different Gβγ heterodimers and their redundant biochemical effects are evidence of their important role in eukaryotic evolution (Krishnan et al., 2015).

Although Gβγ signaling is expected to be activated downstream of every heterotrimeric G protein, research indicates that some heterotrimers are better providers of signaling-ready Gβγ heterodimers than others. It is well accepted that GPCR-dependent chemotactic events are mediated by Gβγ released from Gi, but not from Gs or Gq (Neptune et al., 1999). Such singularity in Gβγ signaling might be explained by heterogeneous abundance of different heterotrimers, unique kinetics of GTP hydrolysis by Gα subunits (influenced by different regulatory proteins) followed by recapture of free Gβγ, or even differential degrees of dissociation between GTP-bound Gα and Gβγ (Bondar and Lazar, 2014; Hepler, 2014).

Spatiotemporal asymmetry defined by Gβγ availability sets the basis of chemotactic signaling (Jin et al., 2000). Recent optogenetic and chemical biology approaches confirmed that local availability of Gβγ is sufficient to control polarized cell migration (O'Neill and Gautam, 2014; Surve et al., 2014). Gβγ recruits cytosolic signaling proteins to the plasma membrane as a consequence of its dissociation from Gαi-GTP, which is elicited by chemotactic GPCRs. These include PI3Ks and RhoGEFs (Figs. 2 and 3), the most relevant Gβγ effectors involved in cell migration. Initial translocation of signaling proteins to the plasma membrane is frequently correlated to activation of the signaling proteins. However, it should not be assumed that every signaling protein recruited by Gβγ will be fully activated by this interaction. In some cases, Gβγ might only contribute to the translocation of signaling proteins or it might act as a coactivator in concert with lipid second messengers or additional signaling proteins. For instance, PI3Kβ requires simultaneous input by Gβγ and growth factor receptors (Houslay et al., 2016). This early array of signaling interactions is subjected to regulatory circuits that amplify the initial inputs. In particular, PI3Kβ is sensitive to GTP-bound Rac and Cdc42 GTPases. Thus, PIP3 stimulates Rho GEFs that activate Rac, Cdc42, and, consequently, their downstream effectors. Among them, PI3Kβ putatively closes a circuit that produces more PIP3 (Fritsch et al., 2013). Overall, integration of these signaling inputs is finally manifested by

polarized cytoskeletal arrangements that promote cell propulsion, which sustains directional migration (Fig. 2).

Structural analysis of heterodimeric Gβγ bound to different interactors assists in the understanding of how this non catalytic-signaling complex activates its effectors. For instance, in the case of GRK-2 (G protein-coupled receptor kinase-2), one of the few Gβγ effectors known at the structural level in complex with the heterodimer (Tesmer et al., 2005), GRK-2 is first recruited to the membrane by Gβγ. Then, the spatial orientation of GRK-2 is fine-tuned by lipid second messengers that fix the pleckstrin-homology (PH)-domain in a position that orients the catalytic domain in the proper conformation for access to its substrates and regulators (Yang et al., 2016). This general mechanism may also be effective for other cytosolic Gβγ-effectors that integrate PIP3 and Gβγ signaling, such as P-Rex1. In contrast, the mechanism by which Gβγ activates effectors already positioned in the plasma membrane, such as the GIRK channels, serves as a model for understanding effector activation independent of the cytosol to membrane translocation step, which is common for most Gβγ-effectors. According to the structural analysis of tetrameric GIRK-2 channels, together with four Gβγ heterodimers, the orientation of Gβγ is similar to that observed in the ternary complex of agonist-occupied β2-adrenergic receptors coupled to nucleotide-free Gs (Rasmussen et al., 2011; Whorton and MacKinnon, 2013). In the channel, the intracellular domain of every one of its four subunits interacts with PIP2 and Gβγ, and this interaction fixes a preopen channel conformation (Whorton and MacKinnon, 2013). It is interesting that the intracellular domains of the channel integrate phosphoinositides with Gβγ signaling. Thus, in cellular settings, a common theme in the regulation of Gβγ-effectors appears to be the concerted participation of lipid second messengers.

The number of Gβγ-regulated signaling molecules is still expanding and seems to be related to multiple possible protein-protein interacting motifs at the surface of Gβγ. A diversity of complementary experimental approaches has revealed this broad array of Gβγ-docking sites. Peptides, identified by phage-display as interactors of different regions of Gβγ, interfere with the activation of some Gβγ-effectors, but not others (Scott et al., 2001). Correspondingly, point-mutations at different surface residues of Gβγ affect a divergent pattern of Gβγ-regulated effectors (Ford et al., 1998). Comparison of different structures in which Gβγ is part of a complex with GIRK-2, GRK-2, Gαi1, or Phosducin showed partial overlapping of the Gβγ-interacting surface, but specific differential areas of interaction were also recognized (Whorton and MacKinnon, 2013). Interestingly, a peptide corresponding to phosducin-like protein amino-terminal region competes with PI3Kγ for the interaction with Gβγ and attenuates the recruitment of this lipid kinase to the plasma membrane (Guzmán-Hernández et al., 2009). Moreover, this peptide inhibits thymoma viral proto-oncogene (AKT) activation by sphingosine-1-phosphate in endothelial cells without affecting the simultaneous activation of extracellular signal regulated kinase (ERK) (Guzmán-Hernández et al., 2009). Furthermore, this peptide differentially inhibits chemotactic and angiogenic responses to sphingosine-1-phosphate without interfering with the effect of hepatocyte growth factor (Guzmán-Hernández et al., 2009). Together, these studies support the working hypothesis that differential inhibitors of

580 Vázquez-Prado et al.

$G\beta\gamma$  signaling, interfering with some effectors but not others, might reach clinical development with the final aim of interfering with aberrant  $G\beta\gamma$ -dependent signaling pathways.

**$G\beta\gamma$ -Dependent Activation of PI3K.** The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway plays a central role in cell migration, among other fundamental physiologic processes (Bracho-Valdés et al., 2011). To participate in a chemotactic response, heterodimeric  $G\beta\gamma$  exhibits its signaling interface, covered in the basal non-stimulated condition by  $G\alpha$ , to directly interact with the catalytic subunit of PI3K $\beta$  (via a low affinity site, stabilized with membrane lipids) or with adaptors of PI3K $\gamma$  (Dbouk et al., 2012a; Vadas et al., 2013; Thorpe et al., 2015).

Although molecular structures of  $G\beta\gamma$ /PI3Ks signaling complexes are not yet available, the interaction between  $G\beta\gamma$  and PI3K $\beta$  has been mapped to a non-conserved region, including 24 amino acids between the C2 and helical domains of p110 $\beta$  catalytic subunit (Dbouk et al., 2012a). Knock-in mice in which non- $G\beta\gamma$ -sensitive PI3K $\beta$  was expressed revealed that this lipid kinase integrates signaling inputs by  $G\beta\gamma$  and growth factor receptors (Houslay et al., 2016). The interaction of  $G\beta\gamma$  with p110 $\beta$  is essential for Gi-dependent AKT activation, chemotaxis and in vitro transforming activity (Dbouk et al., 2012a). Interestingly, WDR26, an oncogenic scaffold overexpressed in breast cancer, facilitates PI3K $\beta$  signaling by  $G\beta\gamma$  (Ye et al., 2016).

The interaction between  $G\beta\gamma$  and PI3K $\gamma$  is mediated by the regulatory p101 and p87/p84 subunits, and the interaction supports the association of the lipid kinase to the membrane where  $G\beta\gamma$  then exerts a direct stimulatory effect on the catalytic subunit (Brazzatti et al., 2012; Shymanets et al., 2013).  $G\beta\gamma$  stabilizes the conformation of the catalytic p110 $\gamma$  subunit, specifically the linker region between RBD and C2 exposed by interaction with lipids. The existence of these molecular contacts has been revealed by hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry approaches (Vadas et al., 2013).

In  $G\beta\gamma$ , the interface of interaction with PI3Ks ( $\beta$  and  $\gamma$ ) seems to be partially different for each isoform (Dbouk et al., 2012a). PI3K $\beta$  interacts with  $G\beta\gamma$  in two regions. The first, located at the linker between the amino-terminal  $\alpha$ -helix of  $G\beta$  and its first blade, appears to be exclusive for this lipid kinase. The second region corresponds to an already mapped hotspot in  $G\beta$  important for the interaction with various effectors, including PI3K $\gamma$ , at the second blade (Dbouk et al., 2012a; Shymanets et al., 2012). As formerly demonstrated, inhibition of  $G\beta\gamma$ /PI3K $\gamma$  interactions with a construct corresponding to the amino-terminal region of phosducin-like protein prevents Gi-dependent chemotactic and angiogenic responses elicited by sphingosine-1-receptors (Guzmán-Hernández et al., 2009). These data raise the possibility that the interface between  $G\beta\gamma$  and either PI3K $\beta$  or PI3K $\gamma$  is an attractive target for therapeutics.

### P-Rex1 as a Potential Chemotactic Scaffold

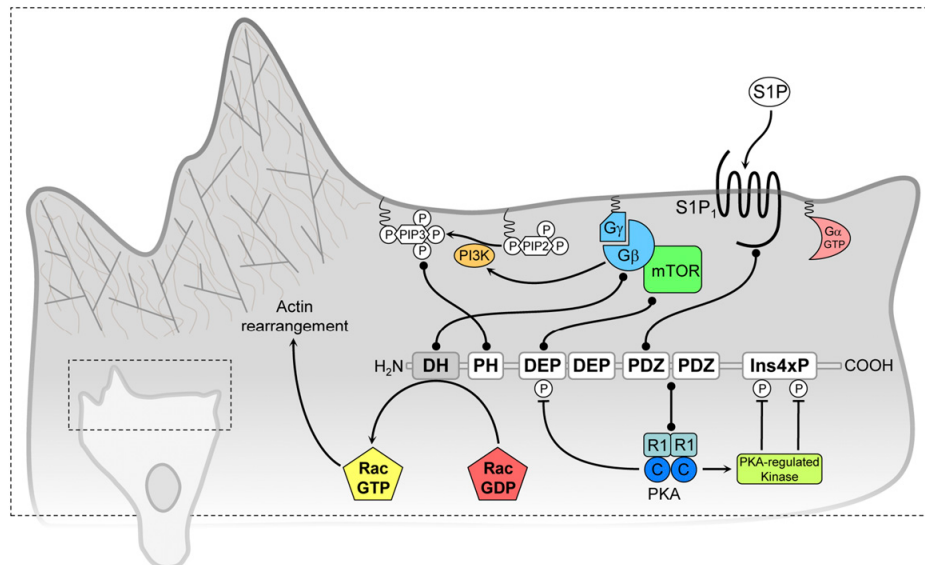
Chemotactic GPCRs stimulate polarized actin polymerization, and effectors of Rho GTPases are essential activators of actin nucleation, implying that GPCRs must activate Rho GTPase regulators at a specific time and location to remodel the cytoskeleton (Hall, 2012). The ability of  $G\beta\gamma$  to activate PI3Ks, which generate PIP3, together with the widely accepted concept that PH domains interact with this lipid second

messenger (Moravcevic et al., 2012), set the basis for a general model of RhoGEF activation. Accordingly, polarized production of PIP3 potentially stimulates multiple RhoGEFs, most of which contain PH domains (Rossmann et al., 2005; Hernández-García et al., 2015). However, other elements that impact the timing and magnitude of RhoGEF activation are likely integrated at the plasma membrane if a mechanism that is able to support persistent directional migration is involved. These include integral plasma membrane proteins, such as activated GPCRs (Ledezma-Sánchez et al., 2010) and free  $G\beta\gamma$  that establish direct interactions with RhoGEFs and may have a role as docking sites and allosteric activators, likely maintaining RhoGEFs recruited at the plasma membrane. Thus, interacting molecules might control the temporal nature and levels of activity of different RhoGEFs.

During cell migration, chemotactic Gi-coupled receptors promote lamellipodial protrusions. These structures, dynamically formed at the leading edge of advancing polarized cells, are formed by effectors of Rac GTPases. Of particular interest, the P-Rex1 family of guanine nucleotide exchange factors, specific for Rac, is synergistically activated by  $G\beta\gamma$  and PIP3 (Welch et al., 2002; Donald et al., 2004; Rosenfeldt et al., 2004; Welch, 2015). Structurally, this group is characterized by a multidomain architecture. This group of GEFs, including P-Rex1 and P-Rex2 (with two isoforms), represents the most common set of effectors by which  $G\beta\gamma$  activates Rho GTPases, particularly Rac; however, other RhoGEFs have been reported as interactors and effectors of  $G\beta\gamma$  (Fig. 3).

The molecular characteristics expected for a chemotactic scaffold are present in the P-Rex family of GEFs. They contain six well defined domains, which in P-Rex1 are known to participate in different interactions with plasma membrane proteins, phosphoinositides, and serine/threonine kinases (Fig. 4). In particular, P-Rex1 interacts with the carboxyl-terminal region of GPCRs such as SIP1 receptors. In endothelial cells expressing P-Rex1 PDZ domains, these receptors exhibit a sustained chemotactic response to sphingosine-1-phosphate. Due to their interaction with these domains, SIP1 receptors maintain their functionality at the plasma membrane, in contrast to those that are internalized in the absence of P-Rex1 PDZ domains (Ledezma-Sánchez et al., 2010). Furthermore, P-Rex1 is recognized and activated by mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 2 (mTORC2) (Hernández-Negrete et al., 2007), a multimeric serine-threonine kinase that can directly be activated by PIP3 (Liu et al., 2015a). Moreover, mTORC2 is also recognized by  $G\beta\gamma$ , which positively regulates its participation in GPCR-dependent activation of AKT (Robles-Molina et al., 2014). Although it is not yet known whether all of the P-Rex1 interactors mentioned above are simultaneous partners of this GEF, these proteins might be part of dynamic signaling complexes, where P-Rex1 is a central platform that putatively maintains directional cell migration.

P-Rex1 is inhibited by PKA (Mayeenuddin and Garrison, 2006; Urano et al., 2008; Chávez-Vargas et al., 2016), and accumulating evidence indicates that regulation of P-Rex1 by PKA occurs via a complex mechanism involving phosphorylation-dependent inhibitory interactions (Chávez-Vargas et al., 2016). Interestingly, the type I PKA regulatory subunit directly interacts with P-Rex1 PDZ domains. In addition, PKA catalytic subunit phosphorylates P-Rex1 at Ser-436 within the first DEP domain (Chávez-Vargas et al., 2016), whereas



**Fig. 4.** P-Rex1 as a putative chemotactic scaffold. Directional cell migration is the most conspicuous consequence of a precise choreography of Rho GTPases activated at the right time and place by chemotactic GPCR-regulated RhoGEFs. This sophisticated process is putatively more efficient with the intervention of multidomain proteins acting as chemotactic scaffolds. Accumulating evidence suggests that P-Rex1, a Rac1-specific GEF, which has been associated with metastatic processes, has the inherent attributes to perform this role. Besides its reported interactions with phosphoinositides and  $G\beta\gamma$  (Welch, 2015), it also interacts with additional signaling proteins having a relevant role in migratory responses. S1P1 receptor carboxyl-terminal tail interacts with P-Rex1-PDZ domains, maintaining a longer chemotactic effect owing to an internalization delay (Ledezma-Sánchez et al., 2010).  $G\beta\gamma$  and P-Rex1 interact with mTORC2, a multimeric serine/threonine kinase involved in AKT activation and cell migration (Hernández-Negrete et al., 2007; Robles-Molina et al., 2014). Finally, type I PKA interacts with P-Rex1-PDZ domains, phosphorylates the GEF at its first DEP domain and exerts an indirect effect on the carboxyl-terminal region (via a putative PKA-regulated kinase), resulting in inhibitory intramolecular interactions (Chávez-Vargas et al., 2016). In conclusion, P-Rex1 is a putative chemotactic scaffold that integrates the actions of diverse signaling proteins, including receptors, G-protein subunits, lipid second messengers, and important serine-threonine kinases such as mechanistic target of rapamycin mTOR and PKA (cAMP-dependent protein kinase).

the carboxyl-terminal region of P-Rex1 is an indirect target of this kinase (Fig. 4). As a consequence, P-Rex1 is inhibited by intramolecular interactions established between the phosphorylated domains and the catalytic DH-PH cassette (Chávez-Vargas et al., 2016).

In support of a spatiotemporal mechanism of reciprocal regulation between PKA and P-Rex1, experiments with fluorescently tagged type I PKA regulatory subunit and P-Rex1 demonstrated that they translocate to the plasma membrane in response to CXCL12 (Chávez-Vargas et al., 2016). These results, together with the inhibitory effect of PKA-dependent P-Rex1 phosphorylation, indicate that type I PKA is a fine-tune control of P-Rex1 ready to modulate this GEF. In addition, the effect of cAMP on PKA dynamics suggests that the regulatory subunits of this kinase might also regulate P-Rex1 activity once the catalytic subunits are dissociated. Current efforts are addressing several intriguing hypothesis based on potential regulatory effects that go beyond P-Rex1 phosphorylation by PKA.

### $G\beta\gamma$ /PI3K/mTORC2/P-Rex1 Axis in Oncogenesis

The fundamental role of  $G\beta\gamma$  in GPCR-dependent chemotactic cell migration suggests that it plays a role in metastatic cancer; this is supported by preclinical evidence and cancer-related mutated mutations in  $G\beta$  (Tang et al., 2011; Dbouk et al., 2012a; Yoda et al., 2015). The mechanism by which oncogenic

activities of  $G\beta\gamma$  are explained involves persistent activation of the PI3K/mTOR signaling pathway (Dbouk et al., 2012a; Khalil et al., 2016). Interestingly,  $G\beta\gamma$  directly interacts with and activates PI3Ks ( $\beta$  and  $\gamma$ ). Moreover, this signaling heterodimer also directly interacts with mTOR, facilitating GPCR signaling to AKT via mTORC2 (Robles-Molina et al., 2014), and it is well recognized that Gi-coupled GPCRs activate the PI3K/AKT/mTOR signaling pathways. Both type-I  $\beta$  and  $\gamma$  PI3Ks are activated by  $G\beta\gamma$ , leading to mTORC1 activation downstream of AKT. Moreover, a prominent role for mTORC2 in GPCR-dependent chemotaxis (Liu et al., 2010) and angiogenesis has been suggested (Dada et al., 2008; Ziegler et al., 2016).

The participation of  $G\beta\gamma$  in tumor growth was initially revealed through the use of a construct that encoded the carboxyl-terminal region of GRK2, a widely used inhibitor of  $G\beta\gamma$  signaling. Expression of this  $G\beta\gamma$  interactor prevented prostate tumor growth in a murine model (Bookout et al., 2003). Similarly, inhibiting  $G\beta\gamma$  signaling in breast cancer cells prevented tumor cell migration and metastatic dissemination in nude mice (Tang et al., 2011). Very recently, oncogenic  $G\beta\gamma$  mutants were identified in a patient with a subtype of acute leukemia infiltrated into the bone marrow (Yoda et al., 2015).

PI3K $\gamma$  plays a relevant role in cancer progression by controlling chemotactic responses of immune cells. In murine models, experimental inhibition of this lipid kinase prevents

582 Vázquez-Prado et al.

tumor growth and metastatic dissemination (Martin et al., 2011; Schmid et al., 2011). Mechanistically, its inhibition reprograms tumor-associated macrophages to activate cytotoxic T cells, which inhibit tumor progression in murine models of pancreatic ductal adenocarcinoma (Kaneda et al., 2016). Moreover, PI3K $\gamma$  plays a demonstrated role in Kaposi Sarcoma herpes virus vGPCR-dependent oncogenesis, in which mTOR plays a central role in the paracrine non-cell autonomous, oncogenic pathway (Martin et al., 2011). In preclinical models, it has been demonstrated that cell transformation is induced by over-expression of PI3K $\gamma$ , whereas its inhibition attenuates oncogenic processes (Brazzatti et al., 2012).

GPCRs activate mTORC2; the macromolecular complex is an important upstream regulator of Rho GTPases and has been involved in GPCR-dependent chemotaxis (Jacinto et al., 2004; Hernández-Negrete et al., 2007; Dada et al., 2008; Liu et al., 2010; Kuehn et al., 2011; He et al., 2013; Liu et al., 2014). Interestingly, mTORC2, the rapamycin-insensitive complex of mTOR, is known as the kinase that phosphorylates AKT at Ser-473, a critical residue whose phosphorylation is required to achieve the maximum activity of AKT (Sarbasov et al., 2005). Driving mutations and overexpression of type-I PI3Ks, as well as AKT, are frequently present in metastatic cancers with resistance to targeted therapies when the resistance occurs by a selection of clones in which mutation and aberrant expression of these proteins are linked to cancer dissemination (Juric et al., 2015).

Current findings implicate mTORC2 as a direct activator of Rac guanine nucleotide exchange factors, particularly P-Rex1, in response to GPCR activation acting through G $\beta\gamma$ . G $\beta\gamma$  interacts with mTORC2, putatively serving as a docking site to recruit it to the plasma membrane (Robles-Molina et al., 2014). As an interactor of mTOR, P-Rex1 was the first multidomain protein with DEP domains known to be modulated by this multifunctional serine/threonine kinase (Hernández-Negrete et al., 2007). Interestingly, an additional mTOR interactor containing DEP domains, named DEPTOR, behaves as an mTOR inhibitor whose expression is frequently reduced in multiple cancers (Peterson et al., 2009). Altogether, these findings suggest that P-Rex1 is a Rac guanine nucleotide exchange factor (RacGEF) that integrates PI3K and mTORC2 signaling outputs. Hypothetically, this might constitute a critical axis used by cells when recruited into the tumor stroma where they exert a paracrine effect stimulating tumor progression.

In this regard, P-Rex1 participates in the signaling cascade of CXCL12, which leads to Rac activation, cell migration, and an in vitro angiogenic effect (Carretero-Ortega et al., 2010). Moreover, the recently demonstrated participation of mTORC2 in the angiogenic effect of CXCL12 (Ziegler et al., 2016), together with the known interaction between P-Rex1 and this multimeric serine/threonine kinase (Hernández-García et al., 2007), further support the relevance of the G $\beta\gamma$ /PI3K/mTORC2/P-Rex1 pathway in angiogenesis. Current efforts are oriented to directly assess the activation of these signaling pathways in BMDC responding to chemotactic agonists present in the tumor microenvironment and how these pathways contribute to the protumoral properties of BMDC.

In this context, it is interesting that the CXCL12/CXCR4 pathway activates PI3K $\gamma$  and promotes chemotaxis of cells

from the bone marrow (Chavakis et al., 2008). P-Rex1 is activated by G $\beta\gamma$  and PIP3 downstream of G protein coupled receptors (Welch, 2015), in addition to activation by growth factor receptors (Sosa et al., 2010; Montero et al., 2011) and a direct interaction with mTORC2 (Hernández-Negrete et al., 2007). These interactions hypothetically integrate a critical signaling pathway involved in cell migration to the recruitment of different cell populations to the tumor stroma.

The family of P-Rex1 and P-Rex2 RacGEFs has been implicated in cancer progression (Fine et al., 2009; Qin et al., 2009; Sosa et al., 2010; Lindsay et al., 2011; Montero et al., 2011; Berger et al., 2012; Pandiella and Montero, 2013; Waddell et al., 2015; Goel et al., 2016; Lissanu Deribe et al., 2016). P-Rex1 is overexpressed in several types of cancer and thus has been considered a prognostic marker of poor patient survival in human breast carcinoma (Sosa et al., 2010). In murine models, this RacGEF contributes to metastasis in prostate cancer (Qin et al., 2009) and melanoma (Lindsay et al., 2011), and has been linked to anti-angiogenic therapy resistance in prostate cancer (Goel et al., 2016).

In the case of P-Rex2, this GEF mutation has been found in melanoma (Berger et al., 2012), and ectopic expression of the mutants accelerated oncogenesis of immortalized melanocytes in mice (Berger et al., 2012; Lissanu Deribe et al., 2016). An alternative mechanism by which this mutant RacGEF contributes to cancer is based on its resistance to regulation by PTEN, a tumor suppressor sensitive to inhibition by wild-type P-Rex2 (Mense et al., 2015). An active area of research is how these observations can be translated into pharmacological strategies to inhibit G $\beta\gamma$ -dependent pathways in pathologic settings such as cancer progression.

### Endosomes as Platforms of G $\beta\gamma$ Signaling

Agonist-bound receptors activate GDP-bound heterotrimeric G proteins. As a consequence, signaling-ready G $\beta\gamma$  is released. The effects of time and space are now appreciated as critical factors defining new levels of complexity to GPCR signaling (Lohse and Hofmann, 2015). At the plasma membrane, different agonist-stabilized conformations can bias the activated pathways. Initial responses elicited at the plasma membrane are followed by a second wave of signaling by GPCR interactors such as arrestins. Independent trafficking routes for receptors and activated G proteins eventually lead to what has been considered a third wave of signaling at endosomal compartments, where novel effector systems may be locally activated (Murphy et al., 2009). The cell specific context of these waves of signaling elicits specific integrated actions. Various examples highlight the importance of endosomal trafficking, broadening possibilities of heterotrimeric G protein signaling in time and space. G $\beta\gamma$ , in particular, follows internalization routes that define the activation of signaling complexes at endosomal compartments (García-Regalado et al., 2008), or alternatively, G $\beta\gamma$  can follow translocation routes independent of endosomal trafficking (Saini et al., 2007). lysophosphatidic acid receptors promote G $\beta\gamma$  trafficking to endosomes where it assembles a PI3K/AKT signaling complex (García-Regalado et al., 2008). This is a Gi-dependent process that involves G $\beta\gamma$  interaction with Rab11. Whether G $\beta\gamma$  signaling from endosomes contributes to chemotactic cell migration is currently unknown.



### Gβγ Activates ERK-Signaling Cascades

Multiple studies have revealed the diverse signaling pathways linking GPCR signaling to ERK activation. Rather unexpectedly, Gβγ activates ERK through Ras (Crespo et al., 1994), providing the first demonstration that GPCRs promote Gβγ-dependent proliferation involving protein interactions instead of diffusible second messengers.

In addition, activation of PI3Kγ via Gβγ has been linked to the proliferative effect of GPCRs (Lopez-Illasaca et al., 1997). In oncogenic settings, the GPCR signaling specificity of this lipid kinase has provided a rational basis for the treatment of Kaposi Sarcoma in preclinical models (Martin et al., 2011). In this case, a virally encoded GPCR that selectively activates PI3Kγ stimulates AKT and mTOR, generating a paracrine circuit directly linked to the carcinogenic effect. Intriguingly, in breast cancer cells P-Rex1 integrates PI3K signaling to ERK via a Rac/PAK/Raf/MEK pathway. This involves activating mutations of the catalytic subunit of PI3Kα and overexpression of HER2 growth factor receptors (Ebi et al., 2013).

### Inhibition of Gβγ Signaling Offers Pharmacologic Potential in Cancer Treatment

Aberrant chemotactic cell migration in cancer not only involves transformed cells but also multiple other types that constitute the stroma and those that enhance metastatic behavior. Since cancer cell dissemination is the most life threatening stage of cancer progression, pharmacological prevention of this aberrant process represents one of the most challenging yet beneficial interventions to mechanistically fight cancer progression. GPCRs are essential in the normal and aberrant dissemination of multiple cells throughout the organism. Since Gβγ is a common actor of the chemotactic signaling pathways frequently altered in cancer, its ability to recognize multiple effectors via distinct interacting motifs may be pharmacologically targeted to prevent aberrant cell migration. Thus, characterization of chemotactic Gβγ-dependent signaling pathways offers unique opportunities to investigate promising pharmacological strategies with the ultimate goal to develop inhibitors that differentially block aberrant Gβγ-effectors. Keeping active those relevant to the physiologic effects of this fundamental multitasking heterodimer, the aim is to inhibit those linked to cancer progression, related to inflammation, and involved in the recruitment of proangiogenic mediators that contribute to tumor angiogenesis and metastatic dissemination of tumor cells (Smrcka, 2013). Experimental evidence already shows that specific interactions between Gβγ and its effectors, along with the corresponding functional effects, can be blocked with small molecules selected by virtual docking (Bonacci et al., 2006). Moreover, inhibiting some of these specific interactions prevents invasive behavior of cancer cells (Tang et al., 2011). Therefore, further understanding of Gβγ-dependent signaling networks offers a growing potential for pharmacological intervention that aims to inhibit aberrant cell migration in cancer settings.

#### Acknowledgments

Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana is a graduate student supported by a fellowship from CONACYT.

#### Authorship Contributions

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Vázquez-Prado, Bracho-Valdés, Cervantes-Villagrana, Reyes-Cruz.

#### References

- Abu-Thuraia A, Gauthier R, Chidiac R, Fukui Y, Screaton RA, Gratton JP, and Côté JF (2015) AxL phosphorylates Elmo scaffold proteins to promote Rac activation and cell invasion. *Mol Cell Biol* 35:76–87.
- Aittaleb M, Boguth CA, and Tesmer JJ (2010) Structure and function of heterotrimeric G protein-regulated Rho guanine nucleotide exchange factors. *Mol Pharmacol* 77:111–125.
- Alexander S and Friedl P (2012) Cancer invasion and resistance: interconnected processes of disease progression and therapy failure. *Trends Mol Med* 18:13–26.
- Barbolina MV, Kim M, Liu Y, Shepard J, Belmadani A, Miller RJ, Shea LD, and Stack MS (2010) Microenvironmental regulation of chemokine (C-X-C-motif) receptor 4 in ovarian carcinoma. *Mol Cancer Res* 8:653–664.
- Berger MF, Hodis E, Heffernan TP, Deribe YL, Lawrence MS, Protogeropoulos A, Ivanova E, Watson IR, Nickerson E, Ghosh P, et al. (2012) Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature* 485:502–506.
- Bonacci TM, Mathews JL, Yuan C, Lehmann DM, Malik S, Wu D, Font JL, Bidlack JM, and Smrcka AV (2006) Differential targeting of Gbetagamma-subunit signaling with small molecules. *Science* 312:443–446.
- Bondar A and Lazar J (2014) Dissociated GαGTP and Gβγ protein subunits are the major activated form of heterotrimeric Gβγ proteins. *J Biol Chem* 289:12711–12811.
- Bookout AL, Finnerty AE, Guo R, Peppel K, Koch WJ, and Daaka Y (2003) Targeting Gbetagamma signaling to inhibit prostate tumor formation and growth. *J Biol Chem* 278:37569–37573.
- Bracho-Valdés I, Moreno-Alvarez P, Valencia-Martínez I, Robles-Molina E, Chávez-Vargas L, and Vázquez-Prado J (2011) mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused. *JUBMB Life* 63:896–914.
- Brazzatti JA, Klingler-Hoffmann M, Haylock-Jacobs S, Harata-Lee Y, Niu M, Higgins MD, Kochetkova M, Hoffmann P, and McColl SR (2012) Differential roles for the p101 and p84 regulatory subunits of PI3Kγ in tumor growth and metastasis. *Oncogene* 31:2350–2361.
- Bronte V and Bria E (2016) Interfering with CCL5/CCR5 at the tumor-stroma interface. *Cancer Cell* 29:437–439.
- Burridge K and Wennerberg K (2004) Rho and Rac take center stage. *Cell* 116:167–179.
- Carrtero-Ortega J, Walsh CT, Hernández-García R, Reyes-Cruz G, Brown JH, and Vázquez-Prado J (2010) Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex-1), a guanine nucleotide exchange factor for Rac, mediates angiogenic responses to stromal cell-derived factor-1/chemokine stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) linked to Rac activation, endothelial cell migration, and in vitro angiogenesis. *Mol Pharmacol* 77:435–442.
- Charest PG and Firtel RA (2007) Big roles for small GTPases in the control of directed cell movement. *Biochem J* 401:377–390.
- Chavakis E, Carmona G, Urilich C, Göttig S, Henschler R, Penninger JM, Zeiher AM, Chavakis T, and Dimmeler S (2008) Phosphatidylinositol-3-kinase-gamma is integral to homing functions of progenitor cells. *Circ Res* 102:942–949.
- Chávez-Vargas L, Adame-García SR, Cervantes-Villagrana RD, Castillo-Kaul A, Bruystens JG, Fukuhara S, Taylor SS, Mochizuki N, Reyes-Cruz G, and Vázquez-Prado J (2016) Protein kinase A (PKA) type I interacts with P-Rex1, a Rac guanine nucleotide exchange factor: effect on PKA localization and P-Rex1 signaling. *J Biol Chem* 291:6182–6199.
- Chen Z, Singer WD, Danesh SM, Sternweis PC, and Sprang SR (2008) Recognition of the activated states of Gα13 by the rgRGS domain of PDZrhoGEF. *Structure* 16:1532–1543.
- Chen Z, Singer WD, Sternweis PC, and Sprang SR (2005) Structure of the p115rhoGEF rgRGS domain-Gα13/1 chimera complex suggests convergent evolution of a GTPase activator. *Nat Struct Mol Biol* 12:191–197.
- Cook DR, Rossman KL, and Der CJ (2014) Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene* 33:4021–4035.
- Crespo P, Xu N, Simonds WF, and Gutkind JS (1994) Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 369:418–420.
- Dada S, Demartines N, and Dormond O (2008) mTORC2 regulates PGE2-mediated endothelial cell survival and migration. *Biochem Biophys Res Commun* 372:875–879.
- Dhouk HA, Vadas O, Shymanets A, Burke JE, Salamon RS, Khalil BD, Barrett MO, Waldo GL, Surve C, Hsueh C, et al. (2012a) G protein-coupled receptor-mediated activation of p110β by Gβγ is required for cellular transformation and invasiveness. *Sci Signal* 5:ra89.
- Dhouk HA, Vadas O, Williams RL, and Backer JM (2012b) PI3Kβ downstream of GPCRs - crucial partners in oncogenesis. *Oncotarget* 3:1485–1486.
- Delibiasi CB, Okura M, Iida S, and Kogo M (2004) Investigation of CXCR4 in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Oncol* 40:154–157.
- Devreates P and Horwitz AR (2015) Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a005959.
- Dillenburger-Filla P, Patel V, Mikelis CM, Zarate-Bladés CR, Doçi CL, Amornphimoltham P, Wang Z, Martín D, Leelahavanichkul K, Dorsam RT, et al. (2015) SDF-1/CXCL12 induces directional cell migration and spontaneous metastasis via a CXCR4/Gαi/mTORC1 axis. *FASEB J* 29:1056–1068.
- Dillon LM, Bean JR, Yang W, Shee K, Symonds LK, Balko JM, McDonald WH, Liu S, Gonzalez-Angulo AM, Mills GB, et al. (2015) P-REX1 creates a positive feedback loop to activate growth factor receptor, PI3K/AKT and MEK/ERK signaling in breast cancer. *Oncogene* 34:3968–3976.
- Donald S, Hill K, Lecureuil C, Barnoun R, Krugmann S, John Coadwell W, Andrews SR, Walker SA, Hawkins PT, Stephens LR, et al. (2004) P-Rex2, a new guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *FEBS Lett* 572:172–176.

## 584 Vázquez-Prado et al.

- Dorsam RT and Gutkind JS (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 7:79–94.
- Dupré DJ, Robitaille M, Rebois RV, and Hébert TE (2009) The role of Gbetagamma subunits in the organization, assembly, and function of GPCR signaling complexes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49:31–56.
- Eli H, Costa C, Faber AC, Nishitani M, Kotani H, Juric D, Della Pelle P, Song Y, Yano S, Mino-Kenudson M, et al. (2013) PI3K regulates MEK/ERK signaling in breast cancer via the Rac-GEF, P-Rex1. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:21124–21129.
- Fine B, Hodakoski C, Koujak S, Su T, Saal LH, Maurer M, Hopkins B, Keniry M, Sulis ML, Mense S, et al. (2009) Activation of the PI3K pathway in cancer through inhibition of PTEN by exchange factor P-REX2a. *Science* 325:1261–1265.
- Ford CE, Skiba NP, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter LR, Rosal R, Weng G, Yang CS, Iyengar R, et al. (1998) Molecular basis for interactions of G protein beta-gamma subunits with effectors. *Science* 280:1271–1274.
- Friedl P and Alexander S (2011) Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* 147:992–1009.
- Fritsch R, de Krüger I, Fritsch K, George R, Reason B, Kumar MS, Diefenbacher M, Stamp G, and Downward J (2013) RAS and RHO families of GTPases directly regulate distinct phosphoinositide 3-kinase isoforms. *Cell* 153:1050–1063.
- Fukuhara S, Chikumi H, and Gutkind JS (2000) Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor (LARG) links heterotrimeric G proteins of the G12 family to Rho. *FEBS Lett* 485:183–188.
- Fukuhara S, Chikumi H, and Gutkind JS (2001) RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho? *Oncogene* 20:1661–1668.
- Fukuhara S, Murga C, Zohar M, Igishi T, and Gutkind JS (1999) A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J Biol Chem* 274:5868–5879.
- Gadea G and Blangy A (2014) Dock-family exchange factors in cell migration and disease. *Eur J Cell Biol* 93:466–477.
- Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, and Mittal V (2008) Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science* 319:195–198.
- García-Mata R, Wennerberg K, Arthur WT, Noren NK, Ellerbroek SM, and Burridge K (2006) Analysis of activated GAPs and GEFs in cell lysates. *Methods Enzymol* 406:425–437.
- García-Regalado A, Guzmán-Hernández ML, Ramírez-Rangel I, Robles-Molina E, Balla T, Vázquez-Prado J, and Reyes-Cruz G (2008) G protein-coupled receptor-promoted trafficking of Gbetagamma2 leads to AKT activation at endosomes via a mechanism mediated by Gbetalgamma2-Rab11a interaction. *Mol Biol Cell* 19:4188–4200.
- Goel HL, Pursell B, Shultz LD, Greiner DL, Brekken RA, Vander Kooi CW, and Mercurio AM (2016) P-Rex1 promotes resistance to VEGF/VEGFR-targeted therapy in prostate cancer. *Cell Reports* 14:2193–2208.
- Goicoechea SM, Awadiah S, and García-Mata R (2014) I'm coming to GEF you: regulation of RhoGEFs during cell migration. *Cell Adhes Migr* 8:535–549.
- Guleng B, Tateishi K, Ohta M, Kanai F, Jazag A, Ijichi H, Tanaka Y, Washida M, Morikane K, Fukushima Y, et al. (2005) Blockade of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner. *Cancer Res* 65:5864–5871.
- Guzmán-Hernández ML, Vázquez-Macías A, Carretero-Ortega J, Hernández-García R, García-Regalado A, Hernández-Negrete I, Reyes-Cruz G, Gutkind JS, and Vázquez-Prado J (2009) Differential inhibitor of Gbetagamma signaling to AKT and ERK derived from phosphocin-like protein: effect on sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration and in vitro angiogenesis. *J Biol Chem* 284:18334–18346.
- Hall A (2012) Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans* 40:1378–1382.
- Hamoud N, Tran V, Croteau LP, Kania A, and Côté JF (2014) G-protein coupled receptor BA3 promotes myoblast fusion in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:3745–3750.
- Hart MJ, Jiang X, Kozasa T, Roscoe W, Singer WD, Gilman AG, Sternweis PC, and Bollag G (1998) Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. *Science* 280:2112–2114.
- He Y, Li D, Cook SL, Yoon MS, Kapoor A, Rao CV, Kenis PJ, Chen J, and Wang F (2013) Mammalian target of rapamycin and Rictor control neutrophil chemotaxis by regulating Rac/Cdc42 activity and the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 24:3369–3380.
- Heckmann D, Maier P, Laufs S, Li L, Sleeman JP, Trunk MJ, Leupold JH, Wenz F, Zeller WJ, Fruehauf S, et al. (2014) The disparate twins: a comparative study of CXCR4 and CXCR7 in SDF1- $\alpha$ -induced gene expression, invasion and chemosensitivity of colon cancer. *Clin Cancer Res* 20:604–616.
- Hepler JR (2014) G protein coupled receptor signaling complexes in live cells. *Cell Logist* 4:e29392.
- Hernández-Bedolla MA, Carretero-Ortega J, Valadez-Sánchez M, Vázquez-Prado J, and Reyes-Cruz G (2015) Chemotactic and proangiogenic role of calcium sensing receptor is linked to secretion of multiple cytokines and growth factors in breast cancer MDA-MB-231 cells. *Biochim Biophys Acta* 1853:166–182.
- Hernández-García R, Iruela-Arispe ML, Reyes-Cruz G, and Vázquez-Prado J (2015) Endothelial RhoGEFs: A systematic analysis of their expression profiles in VEGF-stimulated and tumor endothelial cells. *Vascu Pharmacol* 74:60–72.
- Hernández-Negrete I, Carretero-Ortega J, Rosenfeldt H, Hernández-García R, Calderón-Salinas JV, Reyes-Cruz G, Gutkind JS, and Vázquez-Prado J (2007) P-Rex1 links mammalian target of rapamycin signaling to Rac activation and cell migration. *J Biol Chem* 282:23708–23715.
- Houslay DM, Anderson KE, Chessa T, Kulkarni S, Fritsch R, Downward J, Backer JM, Stephens LR, and Hawkins PT (2016) Coincident signals from GPCRs and receptor tyrosine kinases are uniquely transduced by PI3K $\beta$  in myeloid cells. *Sci Signal* 9:ra82.
- Hurovitz EH, Melnyk JM, Chen YJ, Kourou-Mehr H, Simon MI, and Shizuya H (2000) Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes. *DNA Res* 7:111–120.
- Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, and Hall MN (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 6:1122–1128.
- Jin S and Exton JH (2000) Activation of RhoA by association of Galpha13 with Dbl. *Biochem Biophys Res Commun* 277:718–721.
- Jin T, Zhang N, Long Y, Parent CA, and Devreotes PN (2000) Localization of the G protein betagamma complex in living cells during chemotaxis. *Science* 287:1034–1036.
- Jonkers J and Moolenaar WH (2009) Mammary tumorigenesis through LPA receptor signaling. *Cancer Cell* 15:457–459.
- Juric D, Castel P, Griffith M, Griffith OL, Won HH, Ellis H, Ebbesen SH, Ainscough BJ, Ramu A, Iyer G, et al. (2015) Convergent loss of PTEN leads to clinical resistance to a PI3K $\alpha$  inhibitor. *Nature* 518:240–244.
- Kaneda MM, Cappello P, Nguyen AV, Ralsinirina N, Hardamon CR, Foubert P, Schmid MC, Sun P, Mose E, Bouvet M, et al. (2016) Macrophage PI3Kgamma drives pancreatic ductal adenocarcinoma progression. *Cancer Discov* 6:870–885.
- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, et al. (2005) VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438:820–827.
- Kedziora KM, Leyton-Puig D, Argenzio E, Boumeester AJ, van Batselaar B, Yin T, Wu YI, van Leeuwen FN, Innocenti M, Jalink K, et al. (2016) Rapid Remodeling of invasomes by G-coupled Receptors: dissecting the role of Rho GTPases. *J Biol Chem* 291:4323–4333.
- Khalil BD, Hsueh C, Cao Y, Abi Saab WF, Wang Y, Condeelis JS, Bresnick AR, and Backer JM (2016) GPCR Signaling Mediates Tumor Metastasis via PI3K $\beta$ . *Cancer Res* 76:2944–2953.
- Kim EK, Yun SJ, Ha JM, Kim YW, Jin IH, Yun J, Shin HK, Song SH, Kim JH, Lee JS, et al. (2011) Selective activation of Akt1 by mammalian target of rapamycin complex 2 regulates cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Oncogene* 30:2954–2963.
- Kitamura T, Qian BZ, and Pollard JD (2015) Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol* 15:73–86.
- Kojima Y, Acar A, Eaton EN, Mellody KT, Scheel C, Ben-Porath I, Onder TT, Wang ZC, Richardson AL, Weinberg RA, et al. (2010) Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:20009–20014.
- Kozasa T, Hajicek N, Chow CR, and Suzuki N (2011) Signalling mechanisms of RhoGTPase regulation by the heterotrimeric G proteins G12 and G13. *J Biochem* 150:357–369.
- Kozma R, Ahmed S, Best A, and Lim L (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 15:1942–1952.
- Krishnan A, Mustafa A, Almén MS, Fredriksson R, Williams MJ, and Schiöth HB (2015) Evolutionary hierarchy of vertebrate-like heterotrimeric G protein families. *Mol Phylogenet Evol* 91:27–40.
- Kuehn HS, Jung MY, Beaven MA, Metcalfe DD, and Gilliland AM (2011) Prostaglandin E2 activates and utilizes mTORC2 as a central signaling locus for the regulation of mast cell chemotaxis and mediator release. *J Biol Chem* 286:391–402.
- Lambert NA (2008) Dissociation of heterotrimeric G proteins in cells. *Sci Signal* 1:re5.
- Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, and Vallar L (1989) GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature* 340:692–696.
- Lappano R and Maggiolini M (2011) G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 10:47–60.
- Laurin M and Côté JF (2014) Insights into the functional functions of Dock family guanine nucleotide exchange factors. *Genes Dev* 28:533–547.
- Ledezma-Sánchez BA, García-Regalado A, Guzmán-Hernández ML, and Vázquez-Prado J (2010) Sphingosine-1-phosphate receptor S1P1 is regulated by direct interactions with P-Rex1, a Rac guanine nucleotide exchange factor. *Biochem Biophys Res Commun* 391:1647–1652.
- Li H, Yang L, Fu H, Yan J, Wang Y, Guo H, Hao X, Xu X, Jin T, and Zhang N (2013) Association between Gai2 and ELMOL/Dock180 connects chemokine signalling with Rac activation and metastasis. *Nat Commun* 4:1706.
- Liang J, Nagahashi M, Kim EY, Harikumar KB, Yamada A, Huang WC, Hait NC, Allegood JC, Price MM, Avni D, et al. (2013) Sphingosine-1-phosphate links persistent STAT3 activation, chronic intestinal inflammation, and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 23:107–120.
- Lindsay CR, Lawn S, Campbell AD, Faller WJ, Rombow F, Mort RL, Timpson P, Li A, Cammereri P, Rüdger RA, et al. (2011) P-Rex1 is required for efficient melanoblast migration and melanoma metastasis. *Nat Commun* 2:555.
- Lissanou Deribe Y, Shi Y, Rai K, Nezi L, Amin SB, Wu CC, Akdemir KC, Mahdavi M, Peng Q, Chang QE, et al. (2016) Truncating PREX2 mutations activate its GEF activity and alter gene expression regulation in NRAS-mutant melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:E1296–E1305.
- Liu L, Das S, Losert W, and Parent CA (2010) mTORC2 regulates neutrophil chemotaxis in a cAMP- and RhoA-dependent fashion. *Dev Cell* 19:845–857.
- Liu L, Gritz D, and Parent CA (2014) PKC $\beta$ II acts downstream of chemoattractant receptors and mTORC2 to regulate cAMP production and myosin II activity in neutrophils. *Mol Biol Cell* 25:1446–1457.
- Liu P, Gan W, Chin YR, Ogura K, Guo J, Zhang J, Wang B, Blenis J, Cantley LC, Toker A, et al. (2015a) PtdIns(3,4,5)P3-dependent activation of the mTORC2 kinase complex. *Cancer Discov* 5:1194–1209.
- Liu S, Umez-Goto M, Murph M, Lu Y, Liu W, Zhang F, Yu S, Stephens LC, Cui X, Morrow G, et al. (2009) Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. *Cancer Cell* 15:539–550.
- Liu Y, Yang Y, Ward R, An S, Guo XX, Li W, and Xu TR (2015b) Biased signalling: the instinctive skill of the cell in the selection of appropriate signalling pathways. *Biochem J* 470:155–167.
- Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, and Clapham DE (1987) The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart. *Nature* 325:321–326.



- Lohse MJ and Hofmann KP (2015) Spatial and temporal aspects of signaling by G-protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* **88**:572–578.
- Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS, and Wetzker R (1997) Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* **275**:394–397.
- Luttrell LM, Maudsley S, and Bohn LM (2015) Fulfilling the promise of “biased” G protein-coupled receptor agonism. *Mol Pharmacol* **88**:579–588.
- Lutz S, Freichel-Blomquist A, Yang Y, Rümmerapp U, Jakobs KH, Schmidt M, and Wieland T (2005) The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *J Biol Chem* **280**:11134–11139.
- Lutz S, Shankaranarayanan A, Coco C, Ridilla M, Nance MR, Vettel C, Baltus D, Evelyn CR, Neubig RR, Wieland T, et al. (2007) Structure of Galphag-p63RhoGEF-RhoA complex reveals a pathway for the activation of RhoA by GPCRs. *Science* **318**:1923–1927.
- Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, et al. (2001) Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* **7**:1194–1201.
- Marchesi F, Monti P, Leone BE, Zerbi A, Vecchi A, Piemonti L, Mantovani A, and Allavena P (2004) Increased survival, proliferation, and migration in metastatic human pancreatic tumor cells expressing functional CXCR4. *Cancer Res* **64**:8420–8427.
- Martin D, Galisteo R, Molinolo AA, Wetzker R, Hirsch E, and Gutkind JS (2011) PI3Kγ mediates Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus vGPCR-induced sarcomagenesis. *Cancer Cell* **19**:805–813.
- Masiá-Balagué M, Izquierdo I, Garrido G, Cordero A, Pérez-Benito L, Miller NL, Schlaepfer DD, Gigoux V, and Aragay AM (2015) Gastrin-stimulated Ga13 activation of Rgef protein (ArhGEF28) in DLD-1 colon carcinoma cells. *J Biol Chem* **290**:15197–15209.
- Mayeenuddin LH and Garrison JC (2006) Phosphorylation of P-Rex1 by the cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits the phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate and Gbetagamma-mediated regulation of its activity. *J Biol Chem* **281**:1921–1928.
- Meiri D, Marshall CB, Mokady D, LaRose J, Mullin M, Gingras AC, Ikura M, and Rottapel R (2014) Mechanistic insight into GPCR-mediated activation of the microtubule-associated RhoA exchange factor GEF-H1. *Nat Commun* **5**:4857.
- Mense SM, Barrows D, Hodakowski C, Steinbach N, Schoenfeld D, Su W, Hopkins BD, Su T, Fine B, Hilsbosch H, et al. (2015) PTEN inhibits PREX2-catalyzed activation of RAC1 to restrain tumor cell invasion. *Sci Signal* **8**:ra32.
- Mervine SM, Yost EA, Sabo JL, Hynes TR, and Berlot CH (2006) Analysis of G protein betagamma dimer formation in live cells using multicolor bimolecular fluorescence complementation demonstrates preferences of beta1 for particular gamma subunits. *Mol Pharmacol* **70**:194–205.
- Montero JC, Seoane S, Oceana A, and Pandiella A (2011) P-Rex1 participates in Neuregulin-ErbB signal transduction and its expression correlates with patient outcome in breast cancer. *Oncogene* **30**:1059–1071.
- Moravecic K, Oxley CL, and Lemmon MA (2012) Conditional peripheral membrane proteins: facing up to limited specificity. *Structure* **20**:15–27.
- Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, et al. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**:50–56.
- Murphy JE, Padilla BE, Hasdemir B, Cottrell GS, and Bunnett NW (2009) Endosomes: a legitimate platform for the signaling train. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:17615–17622.
- Neptune ER, Iiri T, and Bourne HR (1999) Galphai is not required for chemotaxis mediated by Gi-coupled receptors. *J Biol Chem* **274**:2824–2828.
- Nishida K, Kaziro Y, and Satoh T (1999) Association of the proto-oncogene product dbl with G protein betagamma subunits. *FEBS Lett* **459**:186–190.
- Niu J, Proffrovic J, Pan H, Vaiskunaite R, and Voyno-Yasenetskaya T (2003) G Protein betagamma subunits stimulate p114RhoGEF, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and Rac1: regulation of cell shape and reactive oxygen species production. *Circ Res* **93**:848–856.
- Nobes CD and Hall A (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**:53–62.
- Nolan DJ, Ciarcocchi A, Mellick AS, Jaggi JS, Bambino K, Gupta S, Heikamp E, McDevitt MR, Scheinberg DA, Benezra R, et al. (2007) Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev* **21**:1546–1558.
- O'Hayre M, Vázquez-Prado J, Kufareva I, Stawiski EW, Handel TM, Seshagiri S, and Gutkind JS (2013) The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer. *Nat Rev Cancer* **13**:412–424.
- O'Neill PR and Gautam N (2014) Subcellular optogenetic inhibition of G proteins generates signaling gradients and cell migration. *Mol Biol Cell* **25**:2305–2314.
- Organista-Juárez D, Carretero-Ortega J, Vicente-Fermin O, Vázquez-Victorio G, Sosa-Garrocho M, Vázquez-Prado J, Macías-Silva M, and Reyes-Cruz G (2013) Calcium-sensing receptor inhibits TGF-β-signaling by decreasing Smad2 phosphorylation. *IUBMB Life* **65**:1035–1042.
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naem R, Carey VJ, Richardson AL, and Weinberg RA (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* **121**:335–348.
- Pandiella A and Montero JC (2013) Molecular pathways: P-Rex in cancer. *Clin Cancer Res* **19**:4564–4569.
- Park D, Tosello-Trampont AC, Elliott MR, Lu M, Haney LB, Ma Z, Klibanov AL, Mandell JW, and Ravichandran KS (2007) BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* **450**:430–434.
- Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, Garcia-Santos G, Ghajar C, et al. (2012) Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* **18**:883–891.
- Peterson TR, Laplante M, Thorsen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, and Sabatini DM (2009) DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* **137**:873–886.
- Psaila B and Lyden D (2009) The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* **9**:285–293.
- Pupo AS, Duarte DA, Lima V, Teixeira LB, Parreiras-E-Silva LT, and Costa-Neto CM (2016) Recent updates on GPCR biased agonism. *Pharmacol Res* **104**:6618(16)00034-7 10.1016/j.phrs.2016.01.031, in press.
- Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, Kaiser EA, Snyder LA, and Pollard JW (2011) CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* **475**:222–225.
- Qian BZ and Pollard JW (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**:39–51.
- Qin J, Xie Y, Wang B, Hoshino M, Wolff DW, Zhao J, Scofield MA, Dowd FJ, Lin MF, and Tu Y (2009) Upregulation of PIP3-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex1) promotes prostate cancer metastasis. *Oncogene* **28**:1853–1863.
- Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Cahinski D, et al. (2011) Crystal structure of the β2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**:549–555.
- Rickert P, Weiner OD, Wang F, Bourne HR, and Servant G (2000) Leukocytes navigate by compass: roles of PI3Kgamma and its lipid products. *Trends Cell Biol* **10**:466–473.
- Ridley AJ (2015) Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* **36**:103–112.
- Ridley AJ and Hall A (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**:389–399.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, and Hall A (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**:401–410.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, and Horwitz AR (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**:1704–1709.
- Robles-Molina E, Dionisio-Vicuña M, Guzmán-Hernández ML, Reyes-Cruz G, and Vázquez-Prado J (2014) Gβγ interacts with mTOR and promotes its activation. *Biochem Biophys Res Commun* **444**:218–223.
- Rojas RJ, Yohe ME, Gershburg S, Kawano T, Kozaes T, and Sondek J (2007) Galphai directly activates p63RhoGEF and Trio via a conserved extension of the Dbl homology-associated pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* **282**:29201–29210.
- Rosenfeldt H, Vázquez-Prado J, and Gutkind JS (2004) P-REX2, a novel PI-3-kinase sensitive Rac exchange factor. *FEBS Lett* **572**:167–171.
- Rossman KL, Der CJ, and Sondek J (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:167–180.
- Roussos ET, Condeelis JS, and Patsialou A (2011) Chemotaxis in cancer. *Nat Rev Cancer* **11**:573–587.
- Saini DK, Kalyanaraman V, Chisari M, and Gautam N (2007) A family of G protein βγ subunits translocate reversibly from the plasma membrane to endomembranes on receptor activation. *J Biol Chem* **282**:24099–24108.
- Sarbasov DD, Guertin DA, Ali SM, and Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**:1098–1101.
- Scherz-Shouval R, Santagata S, Mendillo ML, Sholl LM, Ben-Aharon I, Beck AH, Dias-Santagata D, Koeva M, Stemmer SM, Whitesell L, et al. (2014) The reprogramming of tumor stroma by HSF1 is a potent enabler of malignancy. *Cell* **158**:564–578.
- Schmid MC, Avraamides CJ, Dippold HC, Franco I, Foubert P, Ellies LG, Acevedo LM, Manghietto JR, Song X, Wrasidlo W, et al. (2011) Receptor tyrosine kinases and TLR/IL1Rs unexpectedly activate myeloid cell PI3Kγ, a single convergent point promoting tumor inflammation and progression. *Cancer Cell* **19**:715–727.
- Schmidt A and Hall A (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* **16**:1587–1609.
- Schwindinger WF and Robishaw JD (2001) Heterotrimeric G-protein betagamma dimers in growth and differentiation. *Oncogene* **20**:1653–1660.
- Scott JK, Huang SF, Gangadhar BP, Samariski GM, Clapp P, Gross RA, Taussig R, and Smrcka AV (2001) Evidence that a protein-protein interaction ‘hot spot’ on heterotrimeric G protein betagamma subunits is used for recognition of a subclass of effectors. *EMBO J* **20**:767–776.
- Sekiguchi H, Ii M, Jujo K, Yokoyama A, Hagiwara N, and Asahara T (2011) Improved culture-based isolation of differentiating endothelial progenitor cells from mouse bone marrow mononuclear cells. *PLoS One* **6**:e28639.
- Shymanets A, Ahmadian MK, Kössmeier KT, Wetzker R, Harteneck C, and Nurnberg B (2012) The p101 subunit of PI3Kγ restores activation by Gβ mutants deficient in stimulating p110γ. *Biochem J* **441**:851–858.
- Shymanets A, Prajwal, Bucher K, Beer-Hammer S, Harteneck C and Nurnberg B (2013) p87 and p101 subunits are distinct regulators determining class IB phosphoinositide 3-kinase (PI3K) specificity. *J Biol Chem* **288**: 31059–31068.
- Smrcka AV (2013) Molecular targeting of Ga and Gβγ subunits: a potential approach for cancer therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* **34**:290–298.
- Sosa MS, Lopez-Haber C, Yang C, Wang H, Lemmon MA, Busillo JM, Luo J, Benovic JL, Klein-Szanto A, Yagi H, et al. (2010) Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an essential mediator of ErbB signaling in breast cancer. *Mol Cell* **40**:877–892.
- Stevenson C, de la Rosa G, Anderson CS, Murphy PS, Capece T, Kim M, and Elliott MR (2014) Essential role of Elmo1 in Dock2-dependent lymphocyte migration. *J Immunol* **192**:6062–6070.
- Surve CR, Lehmann D, and Smrcka AV (2014) A chemical biology approach demonstrates G protein βγ subunits are sufficient to mediate directional neutrophil chemotaxis. *J Biol Chem* **289**:17791–17801.
- Tan W, Martin D, and Gutkind JS (2006) The Galphai3-Rho signaling axis is required for SDF-1-induced migration through CXCR4. *J Biol Chem* **281**:39542–39549.

## 586 Vázquez-Prado et al.

- Tang W, Tu Y, Nayak SK, Woodson J, Jehl M, and Ross EM (2006) Gbetagamma inhibits Galpha GTPase-activating proteins by inhibition of Galpha-GTP binding during stimulation by receptor. *J Biol Chem* **281**:4746–4753.
- Tang X, Sun Z, Runne C, Madsen J, Domann F, Henry M, Lin F, and Chen S (2011) A critical role of Gbetagamma in tumorigenesis and metastasis of breast cancer. *J Biol Chem* **286**:13244–13254.
- Tesmer JJ (2016) Hitchhiking on the heptahelical highway: structure and function of 7TM receptor complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**:439–450.
- Tesmer VM, Kawano T, Shankaranarayanan A, Kozasa T, and Tesmer JJ (2005) Snapshot of activated G proteins at the membrane: the Galpha-GRK2-Gbetagamma complex. *Science* **310**:1686–1690.
- Thorpe LM, Yuzugullu H, and Zhao JJ (2015) PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer* **15**:7–24.
- Uchida D, Onoue T, Tomizuka Y, Begum NM, Miwa Y, Yoshida H, and Sato M (2007) Involvement of an autocrine stromal cell derived factor-1/CXCR4 system on the distant metastasis of human oral squamous cell carcinoma. *Mol Cancer Res* **5**:685–694.
- Ueda H, Nagae R, Kozawa M, Morishita R, Kimura S, Nagase T, Ohara O, Yoshida S, and Asano T (2008) Heterotrimeric G protein betagamma subunits stimulate FLJ00018, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem* **283**:1946–1953.
- Ugel S, De Sanctis F, Mandruzzato S, and Bronte V (2015) Tumor-induced myeloid deviation: when myeloid-derived suppressor cells meet tumor-associated macrophages. *J Clin Invest* **125**:3365–3376.
- Urano D, Nakata A, Mizuno N, Tago K, and Itoh H (2008) Domain-domain interaction of P-Rex1 is essential for the activation and inhibition by G protein betagamma subunits and PKA. *Cell Signal* **20**:1545–1554.
- Vadas O, Dhokak HA, Shymanets A, Perisic O, Burke JE, Abi Saab WF, Khalil BD, Harteneck C, Bresnick AR, Nürnberg B, et al. (2013) Molecular determinants of PI3K $\gamma$ -mediated activation downstream of G-protein-coupled receptors (GPCRs). *Proc Natl Acad Sci USA* **110**:18862–18867.
- Van Haastert PJ and Devreotes PN (2004) Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:626–634.
- Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, Simpson EM, Barsh GS, and Bastian BC (2009) Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* **457**:599–602.
- Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, Garrido MC, Vemula S, Wiesner T, Obenaus AC, Wackernagel W, Green G, Bouvier N, et al. (2010) Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med* **363**:2191–2199.
- Vaque JP, Dorsam RT, Feng X, Iglesias-Bartolome R, Forsthoefel DJ, Chen Q, Debant A, Seeger MA, Ksander BR, Teramoto H, et al. (2013) A genome-wide RNAi screen reveals a Trio-regulated Rho GTPase circuitry transducing mitogenic signals initiated by G protein-coupled receptors. *Mol Cell* **49**:94–108.
- Vázquez-Prado J and Gutkind JS (2011) RGS-RhoGEFs and other RGS multidomain proteins as effector molecules in GPCR-dependent and GPCR-independent cell signaling. In *G Protein-Coupled Receptors Structure, Signaling and Physiology* (Siehler S and Milligan G, eds) pp 159–188. Cambridge University Press, New York.
- Vázquez-Prado J, Miyazaki H, Castellone MD, Teramoto H, and Gutkind JS (2004) Chimeric G alpha $\beta$ /G alpha $\gamma$  proteins reveal the structural requirements for the binding and activation of the RGS-like (RGL)-containing Rho guanine nucleotide exchange factors (GEFs) by G alpha $\beta$ . *J Biol Chem* **279**:54283–54290.
- Waddell N, Pajic M, Patch AM, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, Johns AL, Miller D, Nones K, Quek K, et al.; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative (2015) Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* **518**:495–501.
- Wang Y, Xu X, Pan M, and Jin T (2016) ELMO1 directly interacts with G $\beta\gamma$  subunit to transduce GPCR signaling to Rac1 activation in chemotaxis. *J Cancer* **7**: 973–983.
- Wang Z, Kumamoto Y, Wang P, Gan X, Lehmann D, Smrcka AV, Cohn L, Iwasaki A, Li L, and Wu D (2009) Regulation of immature dendritic cell migration by RhoA guanine nucleotide exchange factor Arhgef5. *J Biol Chem* **284**:28599–28606.
- Watanabe M, Terasawa M, Miyano K, Yanagihara T, Urano T, Sanematsu F, Nishikimi A, Côté JF, Sumimoto H, and Fukui Y (2014) DOCK2 and DOCK5 act additively in neutrophils to regulate chemotaxis, superoxide production, and extracellular trap formation. *J Immunol* **193**:5660–5667.
- Welch HC (2015) Regulation and function of P-Rex family Rac-GEFs. *Small GTPases* **6**:49–70.
- Welch HC, Coadwell WJ, Ellson CD, Ferguson GJ, Andrews SR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Hawkins PT, and Stephens LR (2002) P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P $_3$ - and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell* **108**: 809–821.
- Wells J, Kaplan RN, Rafii S, and Lyden D (2008) Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes Dev* **22**:559–574.
- Whorton MR and MacKinnon R (2013) X-ray structure of the mammalian GIRK2- $\beta\gamma$ -G-protein complex. *Nature* **498**:190–197.
- Xu Q, Wang Z, Chen X, Duan W, Lei J, Zong L, Li X, Sheng L, Ma J, Han L, et al. (2015) Stromal-derived factor-1 $\alpha$ /CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway promotes perineural invasion in pancreatic cancer. *Oncotarget* **6**:4717–4732.
- Yagi H, Tan W, Dillenburg-Pilla P, Armando S, Amornphimoltham P, Simaan M, Weigert R, Molinolo AA, Bouvier M, and Gutkind JS (2011) A synthetic biology approach reveals a CXCR4-G13-Rho signaling axis driving transendothelial migration of metastatic breast cancer cells. *Sci Signal* **4**:ra60.
- Yang P, Homan KT, Li Y, Cruz-Rodríguez O, Tesmer JJ, and Chen Z (2016) Effect of lipid composition on the membrane orientation of the G protein-coupled receptor kinase 2-G $\beta\gamma$ 2 complex. *Biochemistry* **55**:2841–2848.
- Yasumoto K, Koizumi K, Kawashima A, Satoh Y, Arita Y, Shinohara K, Minami T, Nakayama T, Sakurai H, Takahashi Y, et al. (2006) Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. *Cancer Res* **66**:2181–2187.
- Ye Y, Tang X, Sun Z, and Chen S (2016) Upregulated WDR26 serves as a scaffold to coordinate PI3K/AKT pathway-driven breast cancer cell growth, migration, and invasion. *Oncotarget* **7**:17854–17869.
- Yoda A, Adelmant G, Tamburini J, Chapuy B, Shindoh N, Yoda Y, Weigert O, Kopp N, Wu SC, Kim SS, et al. (2015) Mutations in G protein  $\beta$  subunits promote transformation and kinase inhibitor resistance. *Nat Med* **21**:71–75.
- Ziegler ME, Hatch MM, Wu N, Muawad SA, and Hughes CC (2016) mTORC2 mediates CXCL12-induced angiogenesis. *Angiogenesis* DOI:10.1007/s10456-016-9509-6.

**Address correspondence to:** José Vázquez-Prado, Department of Pharmacology, CINVESTAV-IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508.Col. San Pedro Zacatenco, 14740 México, D.F., Mexico. E-mail: [jvazquez@cinvestav.mx](mailto:jvazquez@cinvestav.mx) or Guadalupe Reyes-Cruz, Department of Cell Biology, CINVESTAV-IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508.Col. San Pedro Zacatenco, 14740 México, D.F., Mexico. E-mail: [greyes@cinvestav.mx](mailto:greyes@cinvestav.mx)

## 15.4 Artículo Original: Protein Kinase A (PKA) Type I Interacts with P-Rex1, a Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor EFFECT ON PKA LOCALIZATION AND P-Rex1 SIGNALING



THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 291, NO. 12, PP. 6182–6199, MARCH 18, 2016  
© 2016 BY THE AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC. PUBLISHED IN THE U.S.A.

### Protein Kinase A (PKA) Type I Interacts with P-Rex1, a Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor

#### EFFECT ON PKA LOCALIZATION AND P-Rex1 SIGNALING\*

Received for publication, December 22, 2015. Published, JBC Papers in Press, January 21, 2016. DOI 10.1074/jbc.M115.712216

Lydia Chávez-Vargas<sup>†1,2</sup>, Sendi Rafael Adame-García<sup>§1,2</sup>, Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana<sup>‡2</sup>, Alejandro Castillo-Kauil<sup>§2</sup>, Jessica G. H. Bruystens<sup>¶</sup>, Shigetomo Fukuhara<sup>||</sup>, Susan S. Taylor<sup>¶¶</sup>, Naoki Mochizuki<sup>||</sup>, Guadalupe Reyes-Cruz<sup>§</sup>, and José Vázquez-Prado<sup>‡3</sup>

From the Departments of <sup>†</sup>Pharmacology and <sup>§</sup>Cell Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Mexico City, 07360 Mexico, <sup>||</sup>Department of Cell Biology, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute (NCVC), Osaka, 565-8565 Japan, and Departments of <sup>¶</sup>Chemistry and Biochemistry and <sup>¶¶</sup>Pharmacology, University of California San Diego, La Jolla, California 92093

Morphology of migrating cells is regulated by Rho GTPases and fine-tuned by protein interactions and phosphorylation. PKA affects cell migration potentially through spatiotemporal interactions with regulators of Rho GTPases. Here we show that the endogenous regulatory (R) subunit of type I PKA interacts with P-Rex1, a Rac guanine nucleotide exchange factor that integrates chemotactic signals. Type I PKA holoenzyme interacts with P-Rex1 PDZ domains via the CNB B domain of R1 $\alpha$ , which when expressed by itself facilitates endothelial cell migration. P-Rex1 activation localizes PKA to the cell periphery, whereas stimulation of PKA phosphorylates P-Rex1 and prevents its activation in cells responding to SDF-1 (stromal cell-derived factor 1). The P-Rex1 DEP<sub>1</sub> domain is phosphorylated at Ser-436, which inhibits the DH-PH catalytic cassette by direct interaction. In addition, the P-Rex1 C terminus is indirectly targeted by PKA, promoting inhibitory interactions independently of the DEP<sub>1</sub>-PDZ<sub>2</sub> region. A P-Rex1 S436A mutant construct shows increased RacGEF activity and prevents the inhibitory effect of forskolin on sphingosine 1-phosphate-dependent endothelial cell migration. Altogether, these results support the idea that P-Rex1 contributes to the spatiotemporal localization of type I PKA, which tightly regulates this guanine exchange factor by a multistep mechanism, initiated by interaction with the PDZ domains of P-Rex1 followed by direct phosphorylation at the first DEP domain and putatively indirect regulation of the C terminus, thus promoting inhibitory intramolecular interactions. This reciprocal regulation between PKA and P-Rex1 might represent a key node of integration by which chemotactic signaling is fine-tuned by PKA.

Rho guanine exchange factors (RhoGEFs)<sup>4</sup> are mechanistically linked to fundamental cellular processes, such as migra-

tion, adhesion, and morphogenesis. Based on their ability to integrate signaling inputs that result in the activation of Rho GTPases, RhoGEFs indirectly contribute to establish nucleation sites for actin polymerization, thus exerting a tight control on cytoskeleton dynamics (1, 2). RhoGEFs can also play a role as scaffolds of different signaling cascades, thus representing regulatory nodes for spatial and temporal control of signaling (3). These fundamental processes are fine-tuned by phosphorylation of RhoGEFs. However, the complex interplay between RhoGEFs and kinases is not completely understood; relevant examples include RhoGEFs known to be activated or inhibited by phosphorylation, some of them by PKA (4, 5).

The ability of PKA to modulate the activity of RhoGEFs might be further facilitated by direct interactions that would also influence the subcellular localization of PKA and its accessibility to specific substrates. The paradigmatic example of this situation is AKAP-Lbc, which is a RhoGEF activated by G<sub>12</sub>-coupled receptors that promotes polymerization of actin filaments downstream of Rho and also interacts with multiple kinases regulating mitogenic inputs (6, 7). AKAP-Lbc interacts with KSR-1, a scaffold of the ERK1/2 signaling cascade, allowing PKA bound to AKAP-Lbc to enhance control of this mitogenic pathway in response to cyclic AMP (8, 9). Although type II PKA translocates to the leading edge of migrating fibroblasts (10), the binding partners that restrict the kinase to this location are currently undefined. Moreover, whether type I PKA regulates RhoGEFs through direct interactions during a chemotactic response is currently unknown, although this possibility might help to explain the apparent paradox according to which PKA either activates (11–14) or inhibits (15–19) cell migration, depending on the chemoattractant and cell type.

P-Rex1 is a multidomain Rac guanine nucleotide exchange factor involved in chemotactic migration of normal and meta-

\* This work was supported by CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico) Grants 152434 (to J. V.-P.) and 240119 (to G. R.-C.).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Supported by fellowships from CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico).

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed: Dept. of Pharmacology, CINVESTAV-IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508. Col. San Pedro Zacatenco, 07360 México, D.F., Mexico. Tel.: 52-55-5747-3380; Fax: 52-55-5747-3394; E-mail: jvazquez@cinvestav.mx.

<sup>4</sup> The abbreviations used are: RhoGEF, Rho guanine exchange factor; GEF, guanine nucleotide exchange factor; P-Rex1, phosphatidylinositol 3,4,5-

trisphosphate-dependent Rac exchanger 1 protein; PRKAR1 $\alpha$ , cAMP-dependent protein kinase type I- $\alpha$  regulatory subunit; PRKACA, cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit  $\alpha$ ; AKAP, A-kinase anchoring protein; PKAS, PKA substrate; (p)CREB, (phospho)-cAMP response element binding; S1P, sphingosine 1-phosphate; DEP, Dishevelled; Egl-10, and Pleckstrin; PDZ domains, mTOR, mammalian target of rapamycin; SDF-1, stromal cell-derived factor 1; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; PAE, porcine aortic endothelial; DH, homology domain; PH, pleckstrin homology; IBMX, isobutylmethylxanthine; EGFP, enhanced GFP; CNB B, cyclic nucleotide-binding domain B.

## PKA and P-Rex1 Interact and Are Reciprocally Regulated

static cancer cells (20–27). This RacGEF is activated by  $G\beta\gamma$  and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (28–32), by growth factor receptors, and regulators of neuronal morphology (33–36) as well as by direct interaction with mTORC2, a fundamental multimeric kinase with affinity for P-Rex1 DEP domains (20, 37) and by protein phosphatase 1 $\alpha$ , which dephosphorylates P-Rex1 at Ser-1165 (38). In endothelial cells, in which this guanine nucleotide exchange factor (GEF) is among the most highly expressed RhoGEFs (39), it influences changes in cell morphology in response to PDGF (28, 38) and participates in the chemotactic response to sphingosine 1-phosphate and SDF-1 (23, 27). P-Rex1 structure is constituted by a DH-PH cassette characteristic of the family of RhoGEFs with homology to Dbl (homology (DH) domain and a pleckstrin homology (PH) domain) followed by two DEP domains in tandem, two PDZ domains, and a long C terminus with homology to inositol polyphosphate-4-phosphatase (28). Phosphorylation of P-Rex1 exerts a positive or negative role on its activity, putatively depending on the kinase involved and the phosphorylation site (38, 40). PKA, in particular, phosphorylates and prevents P-Rex1 from being activated by  $G\beta\gamma$  and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (41, 42). Although the precise mechanisms of this regulation remain unknown, these findings open the interesting possibility that PKA might maintain interactions with P-Rex1 and also might be regulated by this RacGEF. Here we identified type I PKA as a novel P-Rex1 interactor and study the molecular aspects and functional consequences of this interaction on P-Rex1 regulation and PKA localization.

## Experimental Procedures

**Endothelial cDNA Library Generation and Yeast Two-hybrid Screening**—An endothelial cDNA library from human microvascular endothelial cells (HMEC-1) was generated according to the Matchmaker™ yeast two hybrid library construction and screening kit user manual (Clontech) and used to screen P-Rex1-PDZ-PDZ as bait according to protocols previously described in detail (43). In brief, total RNA extracted from human microvascular endothelial cells was retro-transcribed using the Clontech SMART system containing Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase and amplified using long distance PCR. Then endothelial cDNA was purified with Chroma spin™ TE400 columns and cloned into SmaI-linearized pGADT7-Rec vector by homologous recombination in AH109 yeast reporter strain transformed with the linearized vector and the amplified endothelial cDNA. The vector, pGADT7-Rec, contains the GAL4 activation domain, a yeast selection marker for growth in medium lacking leucine and a bacterial selection marker for ampicillin. The bait, pGB3-P-Rex1-PDZ-PDZ, contained the GAL4 DNA binding domain, a yeast selection marker for growth in the absence of tryptophan and a bacterial selection marker for kanamycin. pGB3-P-Rex1-PDZ-PDZ was transformed into Y187 yeast strain and used to mate with AH109 yeast containing the human endothelial cDNA library. Putative interacting clones were selected on high stringency media consisting of DOBA (Clontech) agar lacking adenine, histidine, leucine, and tryptophan (DO/-AHLT). Clones were subjected to three passages in liquid restrictive media then plated on DOBA agar restrictive media containing

X- $\alpha$ -Gal ( $\alpha$ -galactosidase reporter, indicative of positive interactions). Plasmids containing putative interacting prey clones were isolated with Zymoprep™ yeast plasmid miniprep kit (Zymo research) and used to transform *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  strain. To confirm specific interactions, yeast were cotransformed with P-Rex1-PDZ-PDZ and the different prey plasmids and plated on DOBA/-AHLT (selecting for interactions) or DOBA/-LT (selecting only for the plasmids). PTD1/p53 plasmids were used as controls as indicated by the Matchmaker III system. Specific P-Rex1-PDZ-PDZ-interacting clones were sequenced and identified by BLAST at the NCBI web page.

**Constructs and Plasmids**—Z6 prey, coding for the C-terminal region of type I $\alpha$  PKA regulatory subunit (including CNB B, the second cAMP binding domain), identified as a P-Rex1-PDZ-PDZ-interacting clone, was subcloned into the mammalian expression vector pCEFL-EGFP-3XFLAG. pEGFP-C1-PRKAR1a and pCDNA3.1-HA-PRKAR1a plasmids were kindly donated by Dr. Manos Mavrikakis from the NICHD, National Institutes of Health, Bethesda, MD. PRKAR1a from pEGFP-C1-PRKAR1a was subcloned into pmCherry-C1 vector using BglII/NheI restriction sites. P-Rex1 from pCEFL-EGFP-P-Rex1 was cloned into pEGFP-C1-P-Rex1 in two parts, and pCEFL-EGFP-P-Rex1 was digested with BamHI and EcoRI enzymes releasing two fragments of P-Rex1, one comprising the first 3626 bp of P-Rex1 (fragment 1, BamHI/BamHI) and the second fragment of 1377 bp corresponding to the last part of P-Rex1 (BamHI/XbaI). Fragment 1 was introduced into pEGFP-C1 vector linearized with BglII and BamHI, enzymes with compatible cohesive ends, and then the new vector containing the first fragment of P-Rex1 was digested again with BamHI and XbaI to introduce the second fragment of P-Rex1 to finally obtain pEGFP-C1-P-Rex1 full-length. pCEFL-GST-P-Rex1-Nter (DH-PDZ<sub>2</sub>, M1-I788) was prepared from pCEFL-EGFP-P-Rex1 by PCR using 5'-Nter-P-Rex1 BamHI ataGGATCCatgaggcgccagcggcgcgc and 3'-Nter-P-Rex1 EcoRI ataGAATTCcagatccagctcaggtacagggccag primers. P-Rex1 DEP1 and DEP2 and P-Rex1 PDZ1 and PDZ2 domains were amplified by PCR and cloned as 5'-BamHI/3'-EcoRI into pCEFL-GST mammalian expression vector. P-Rex1-DEP1 primers were ataGGATCCAGAAAGGTGAACCTCATCAAG and ataGAATTCcaGTA-GCGGAAGCGATACATCAC, P-Rex1-DEP2 primers were ataGGATCCCTCTACACCCCGGTGATCAAAGACC and ataGAATTCcaAGCATGAAAGCGGAAGTACTG. P-Rex1-PDZ1 primers were ataGGATCCGAGGACTATGGCTTTG-ACATCG and ataGAATTCcaGGCCTTCGTGGCCACCA-GGAG and P-Rex1-PDZ2 primers were 5'-ataGGATCCGAC-ACACTGTGCTTCCAGATTCG and ataGAATTCcaGAT-CCACTGGTACAGGCCAG primers. P-Rex1 N-terminal S436A and S436D mutant constructs were prepared using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene #200518) and pCEFL-GST-P-Rex1-N terminus as template. The plasmid was amplified using the following primers: 5'-GGACCGCCGGAGAAAGCTGgcACTGTCCCCAAGTGC-TTTC-3' and 3'-GAAAGCACTTGGGGACAGTggcCAGCT-TTCTCCGGCGGTCC-5' for the S436A mutant and 5'-GGA-CCGCGGAGAAAGCTGgcACTGTCCCCAAGTGC-TTTC-3' and 3'-GAAAGCACTTGGGGACAGTgtcCAGCTT-TCTCCGGCGGTCC-5' for the S436D mutant. The point



### PKA and P-Rex1 Interact and Are Reciprocally Regulated

mutations were confirmed by sequencing using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit. Other constructs have been previously described (20). The EGFP-P-Rex1-CAAX constructs were generated by amplifying the P-Rex1 regions of interest, omitting a stop codon in the reverse primers, and cloning the fragments into pCEFL-EGFP-CAAX using 5'-Bam-HI/3'-EcoRI restriction sites (located between the EGFP and CAAX coding sequences). DH-PH primers were atGGATCCATGGAGGCGCCAGCGGCAGC and atGAATTCGCGCTGCTCCCGCTCGCGGAT, DH-DEP2 primers were atGGATCCATGGAGGCGCCAGCGGCAGC and atGAATTCAGCATGAAAGCGGAAGTACTG, and DH-PDZ2 primers were atGGATCCATGGAGGCGCCAGCGGCAGC and atGAATTCGATCCACTGGTACAGGCCAG, respectively.

**Cell Culture, Transfection, and Stimulation**—HEK-293T, COS-7, and porcine aortic endothelial (PAE) cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) supplemented with 10% bovine fetal serum. Cells were either transfected using Lipofectamine plus reagent (Invitrogen) (HEK-293T and COS-7) or PolyFECT (Qiagen) PAE, according to the manufacturer's protocol. Experiments were done 48 h after transfection. When indicated, cells were starved for 16 h with serum-free DMEM before stimulation. HUVEC cells were used before passage 8 and maintained in HuMedia-EG2 medium (Kurabo). Transfection was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and Plus reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol, removing complexes 40 min after transfection. Transfection efficiency of PAE cells used for chemotaxis experiments was between 29 and 35%. Stimulation of cells was done with SDF-1/CXCL12 (Pepro-Tech, catalog #300-28A) or sphingosine 1-phosphate (S1P, Sigma, catalog #S9666) as indicated in figure legends (Figs. 3 and 5). The effect of PKA on S1P-dependent PAE cell migration was assessed with 10  $\mu$ M forskolin (Sigma, catalog #F6886) and 100  $\mu$ M 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (Sigma catalog #I5879) in the absence of presence of 10  $\mu$ M H89 (Sigma, catalog #B1427) as indicated.

**Pulldown and Immunoprecipitation**—Cells grown in 10-cm dishes were washed with phosphate-buffered saline (PBS), lysed in 1 ml of ice cold lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5, containing 1% Triton X-100, 5 mM EDTA), protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, and 10  $\mu$ g/ml aprotinin), and phosphatase inhibitors (1 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, and 1 mM  $\beta$ -glycerol-phosphate), and incubated for 10 min on ice. Cell lysates were centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4 °C. Supernatants were incubated with the indicated antibodies (1–10  $\mu$ l, as required) for immunoprecipitation and incubated overnight at 4 °C on a rocking platform, then 35  $\mu$ l of protein G-agarose beads (Millipore) were added and incubated for 3 h. Samples were centrifuged at 13,000 rpm for 2 min at 4 °C, the supernatant was discarded, and beads were washed 3 times with lysis buffer. Finally, beads were resuspended in 1 $\times$  Laemmli sample buffer containing mercaptoethanol and boiled for 5 min. For pulldown assays of GST-tagged proteins, cell lysates were incubated with 25  $\mu$ l of glutathione-Sepharose beads (catalog #17-5279-01, GE Healthcare) for 30–45 min and processed as described for immunoprecipitations.

**Immunoblotting**—Cell lysates, Pulldown, and immunoprecipitation samples were resolved in SDS-PAGE and transferred to Immobilon membrane (Millipore). Proteins were detected by Western blot using antibodies with the following specificity: HA (Covance), FLAG (Sigma), P-Rex1 (catalog #HPA001927, Sigma), PKA (R1 $\alpha$ ) (catalog #610165, BD Transduction Laboratories), Rac1 (BD Transduction Laboratories), GST (B-14, Santa Cruz Biotechnology), GFP (B-2, Santa Cruz Biotechnology), ERK-2 (C-14, Santa Cruz Biotechnology), phospho-p42/44 MAP kinase Thr-202/Tyr-204 (Cell Signaling), phospho-Akt1/2/3 Ser-473 (Santa Cruz, sc-7985), Akt1 (Sigma catalog #P2482), phospho-CREB Ser-133 (Cell Signaling #9191), and phospho-(Ser/Thr) PKA substrate (catalog #9621, Cell Signaling). Secondary antibodies were goat anti mouse monoclonal (Zymed Laboratories Inc., Invitrogen or KPL) or goat anti-rabbit (Rockland Immunochemicals or KPL).

**Activation of P-Rex1**—Activation of P-Rex1 was assessed by detecting its interaction with nucleotide-free G15-Rac using a pulldown strategy with nucleotide-free G15-Rac fused to GST essentially as described for Net1 by García-Mata and co-workers (44).

**Rac1 Activation Assay**—Activation of Rac1 was assessed by detecting its interaction with the CRIB domain of PAK fused to GST using a pulldown strategy. HEK293T cells grown in 10-cm Petri dishes and transfected with EGFP-P-Rex1-CAAX constructs and other constructs (as indicated in the figure legends (Figs. 6 and 7)) were washed with PBS containing 10 mM MgCl<sub>2</sub> and lysed with 1 ml of ice-cold lysis buffer containing 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Cell lysates were incubated with 30  $\mu$ l of GST-PAK CRIB beads on ice for 30 min on a shaker. Beads were then centrifuged at 5000 rpm for 1 min and washed 3 times with lysis buffer. Beads were then resuspended in 50  $\mu$ l of 1 $\times$  Laemmli buffer, boiled for 5 min, centrifuged at 13,000 rpm for 1 min. Beads were then resolved in a 12% acrylamide, transferred to PVDF membranes, and immunoblotted using anti-Rac1 monoclonal antibodies. As controls, total cell lysates were analyzed in parallel.

**Fluorescence Microscopy**—Cells were seeded at low density on gelatin-coated glass-bottom dishes and transfected with pEGFP-C1-P-Rex1 or pmCherry-PRKAR1a or both plasmids. Experiments were carried out 24–48 h later. COS-7 cells were starved for 16 h and HUVEC cells for 2 h with M199 medium (Gibco) plus 0.5% BSA. Then cells were stimulated with CXCL12/SDF-1 for 5 min. Subsequently, cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min and then washed twice with PBS. Cell images were visualized in a Nikon Eclipse Ti inverted fluorescence microscope using a Plan Apo VC 1.4 oil immersion objective and captured with a Digital sight DS-Qi1Mc Nikon camera. Images for PRKAR1a and P-Rex1 were obtained with Texas Red and GFP filters, respectively, and analyzed with NIS-Elements software from Nikon.

**Chemotaxis Assays**—The effect of sphingosine 1-phosphate on PAE endothelial cells chemotaxis was assessed in Boyden chambers essentially as previously described (45) with minor modifications. 48-well chambers were used with gelatin-coated filters having 8- $\mu$ m pores. Cells were transiently transfected with EGFP-CAAX, EGFP-Z6, EGFP-P-Rex1-DH-PDZ2-CAAX, or EGFP-P-Rex1-DH-PDZ2-S436A-CAAX, as described in the

**PKA and P-Rex1 Interact and Are Reciprocally Regulated**

figure legends (Figs. 3 and 5) using Polyfect (Qiagen). 36 h after transfection cells that were starved of serum for 14 h were washed with PBS, gently trypsinized, washed, and resuspended at 100,000 cells per 100  $\mu$ l of serum free-DMEM. Chemotaxis assays were done with 50,000 cells per well leaving cells to migrate for 6 h at 37 °C. Then cells were fixed with methanol, and their nuclei were stained with DAPI. Cells on the top side of the filter were removed with a cotton swab, and those at the bottom of the filter were observed under a 20 $\times$  objective. At least three different areas per well were photographed. The level of migration was determined by counting the nuclei of migrating cells using ImageJ software.

**PRKAR1a Peptide Arrays**—Arrays spotted with peptides of 15 amino acids corresponding to the C-terminal region of PRKAR1a, including the CNB B domain, were prepared on cellulose filters as previously described (46). The potential interaction of these peptides with recombinant P-Rex1 PDZ1 domain was analyzed as previously described for peptide arrays of D-AKAP2 used to characterize its interaction with PRKAR1a (46).

**Statistical Analysis**—Data are presented as the means  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments as indicated in figure legends (Figs. 1–7). Densitometric quantitation was performed with ImageJ software. Test and control samples in the functional assays were compared for statistical significance by using one-tailed Student's *t* test for paired data. Time course experiments done to assess the effect of SDF-1 on P-Rex1 activation and interaction with R1 $\alpha$  were analyzed by one-way analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test. The chemotaxis experiments comparing the effect of S1P doses in Z6- versus GFP-CAAX-transfected PAE cells were analyzed by two-way analysis of variance followed by Tukey's test. Statistical significance was considered for values of *p* < 0.05. Statistical analysis was performed using Prism software V6.0 and Sigma Plot 11.0.

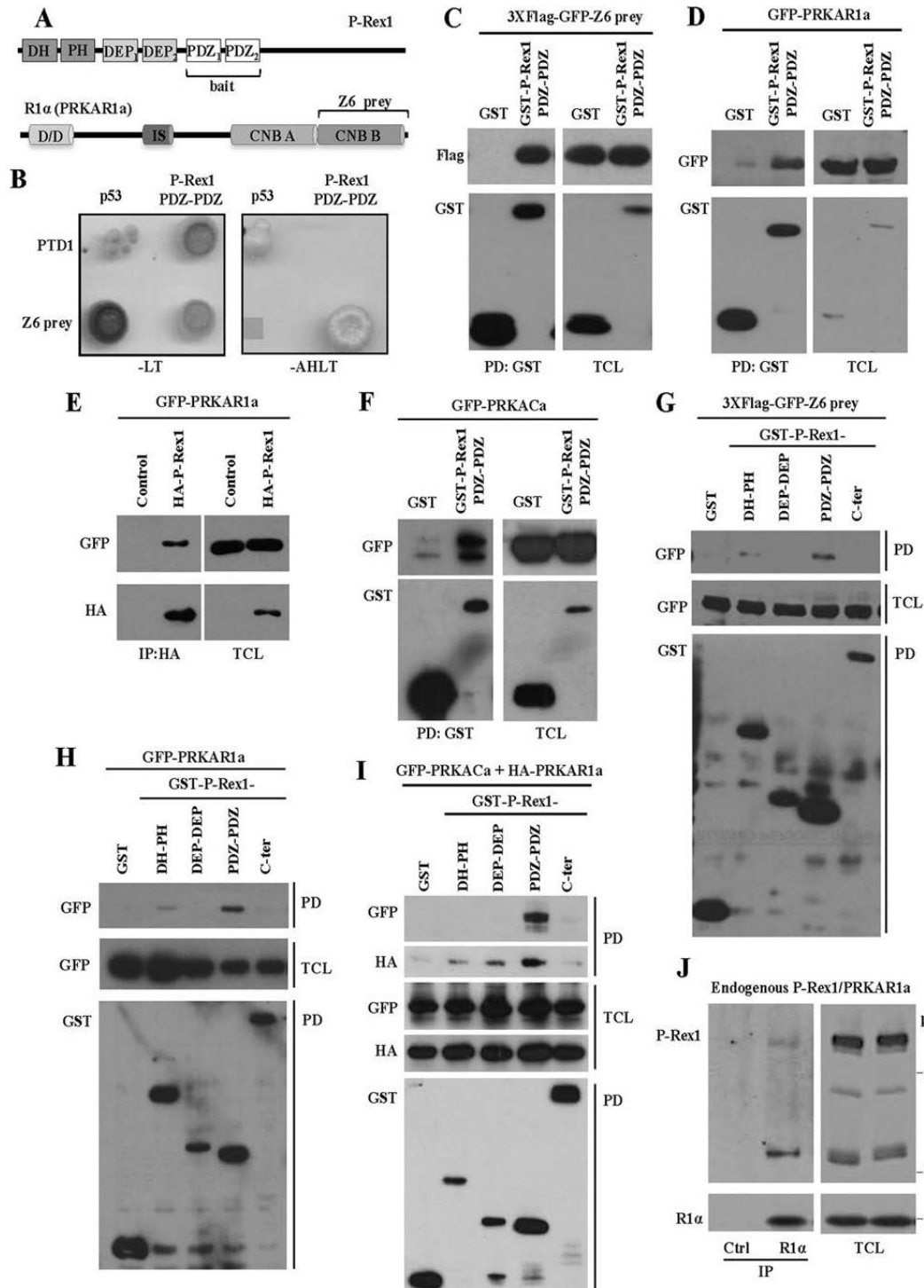
**Results**

**PKA Interacts with P-Rex1**—To identify proteins with affinity for P-Rex1, a G $\beta\gamma$ - and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent RacGEF involved in cell migration (28), we used P-Rex1-PDZ-PDZ domains as bait in a yeast two-hybrid screen with a human endothelial cDNA library. We found that in yeast P-Rex1-PDZ-PDZ interacted with the C-terminal region of type I- $\alpha$  PKA regulatory subunit (PRKAR1a), including CNB B, the second cAMP binding domain. We designated this yeast two-hybrid prey as the Z6 clone (Fig. 1A). This clone was obtained only once in the screening. The interaction was specific, as confirmed by the growth in high stringency media lacking adenine, histidine, leucine, and tryptophan (–AHLT) of yeast transformed with the combination of P-Rex1-PDZ-PDZ and Z6 or with the positive control of the system composed of p53 and PTD1 (Fig. 1B, right panel). As control of transformation, the growth of yeast was confirmed in medium lacking leucine and tryptophan (–LT), indicating that each plasmid was effectively transformed (Fig. 1B, left panel). These results demonstrated a direct interaction in yeast between the C-terminal region of type I PKA regulatory subunit (including CNB B), represented by Z6, and the tandem PDZ domains of

P-Rex1. Different complementary approaches were then used to assess the interaction between type I PKA and P-Rex1 in mammalian cells. Initially, we tested the interaction between PKA R1 $\alpha$  prey and P-Rex1-PDZ-PDZ bait, both subcloned into mammalian expression vectors. HEK-293T cells were transfected with Z6, as a FLAG-EGFP-tagged protein, and P-Rex1-PDZ-PDZ fused to GST. Two days after transfection, cell lysates were subjected to pulldown assays with glutathione-Sepharose beads. As shown in Fig. 1C, left panel, Z6 prey interacted with P-Rex1-PDZ-PDZ domains (PDZ: GST), and this interaction was specific as Z6 did not interact with GST, used as negative control. The expression of the constructs was confirmed in total cell lysates (Fig. 1C, right panel, TCL). Similarly, full-length PRKAR1a (tagged with EGFP) interacted with P-Rex1-PDZ-PDZ domains (Fig. 1D). Next, we tested the interaction between both full-length proteins in HEK-293T cells transfected with EGFP-PRKAR1a and HA-P-Rex1. In this case P-Rex1 was immunoprecipitated with HA antibodies, and interacting PRKAR1a was revealed by Western blot using antibodies against-GFP (Fig. 1E, left panel), showing that, indeed, full-length PRKAR1a interacted with full-length P-Rex1. Furthermore, we also wanted to know whether the catalytic subunit of type I PKA could interact with P-Rex1. To test this possibility, EGFP-tagged catalytic PKA  $\alpha$  subunit (PRKACa) and GST-P-Rex1-PDZ-PDZ were co-transfected into HEK-293T cells. As shown in Fig. 1F, left panel, we detected a specific interaction between type I PKA catalytic subunit and P-Rex1-PDZ-PDZ domains as revealed by the abundant presence of EGFP-PRKACa, detected with GFP antibodies in the pulldown of GST-P-Rex1-PDZ-PDZ compared with the GST pulldown used as negative control. Next, to define whether other domains of P-Rex1 were able to participate in the interaction with PKA, different constructs of P-Rex1 (DH-PH, DEP-DEP, PDZ-PDZ, and C terminus, all of them fused to GST) were obtained. These constructs were transfected into HEK-293T cells together with either Z6 (Fig. 1G), full-length PRKAR1a (Fig. 1H), or both type I PKA catalytic and regulatory subunits (Fig. 1I). The interacting PKA constructs were revealed by Western blot in the P-Rex1 pulldown assays; our results showed that all type I PKA constructs, either the C-terminal region containing the second cAMP binding domain, represented by Z6 (3XFLAG-EGFP-Z6), the full-length PRKAR1a (EGFP-PRKAR1a), or the full type I PKA holoenzyme (EGFP-PRKACa+HA-PRKAR1a) mainly interacted with the PDZ-PDZ domains of P-Rex1 (Fig. 1, G, H, and I, respectively). All together these results demonstrate that P-Rex1 specifically interacts with PKA throughout its PDZ-PDZ domains. Likewise, we analyzed the endogenous interaction between these proteins. The interaction of endogenous type I PKA regulatory subunit (PRKAR1a, R1 $\alpha$ ) and endogenous P-Rex1 was assessed by immunoprecipitating PRKAR1a and detecting P-Rex1. As shown in Fig. 1J, endogenous P-Rex1 co-immunoprecipitated with endogenous PKA R1  $\alpha$  subunit but not with a control negative antibody. Anti-P-Rex1 antibody detected two main bands in the total cell lysate. The upper band (above the 150-kDa marker) corresponds to full-length P-Rex1, and the lower molecular mass band (above 100 kDa) might correspond to a splice variant or might represent a degradation product of full-length P-Rex1. According to



## PKA and P-Rex1 Interact and Are Reciprocally Regulated



## PKA and P-Rex1 Interact and Are Reciprocally Regulated

Nexprot beta database, P-Rex1 isoform 2 starts at the second PDZ domain and has a predicted molecular mass of 106 kDa (nextprot). The P-Rex1 antibody used for these Western blots was generated using a peptide corresponding to P-Rex1 C570-P700, which in P-Rex1 isoform 2 corresponds to Cys-43–Pro-173.

**PRKAR1a CNB B Preferentially Interacts with P-Rex1-PDZ1**—We explored a possible preferential interaction between endogenous PRKAR1a and either one of the two PDZ domains of P-Rex1. First, individual P-Rex1 PDZ domains fused to GST were isolated from transfected COS7 cells, and endogenous PRKAR1a bound to them was revealed by Western blot. As shown in Fig. 2A, PRKAR1a interacted with P-Rex1 PDZ1 at comparable levels as it did with the P-Rex1-PDZ1-PDZ2 tandem cassette. In comparison, the interaction of PRKAR1a with P-Rex1-PDZ2 was significantly lower. Additionally, to know the minimal structural requirements on PRKAR1a to interact with P-Rex1-PDZ1, to address the question of whether the C-terminal region of this PKA regulatory subunit is required, and to confirm that the interaction between these regions was direct, we used a peptide array strategy using overlapping peptides (15-mers) representing different regions of PRKAR1a schematically shown in Fig. 2B. Interestingly, a series of seven overlapping peptides whose sequence corresponds to a region of human PRKAR1a, extending from Gly-346 to Ser-378, interacted directly with the P-Rex1-PDZ1 recombinant domain. The interacting peptides did not include the last three amino acids of PRKAR1a, suggesting a non-canonical mechanism of interaction between the CNB B cAMP binding domain of PRKAR1a and P-Rex1 PDZ1.

**SDF-1 Promotes P-Rex1 Activation and Mobilization to the Cell Membrane Together with PRKAR1a**—To determine the effect of P-Rex1 activation on its interaction with PRKAR1a and the localization of PRKAR1a-P-Rex1 complex, we first analyzed the kinetics of P-Rex1 activation detected by its interaction with nucleotide-free Rac (GST-RacG15A) (44, 47) by pull-down. As shown in Fig. 3A, in COS-7 cells, the maximum activation of P-Rex1 was detected at 30 min of SDF-1 stimulation. Time course of interaction between endogenous type I PKA and P-Rex1 in response to SDF-1 was assessed in cells transfected

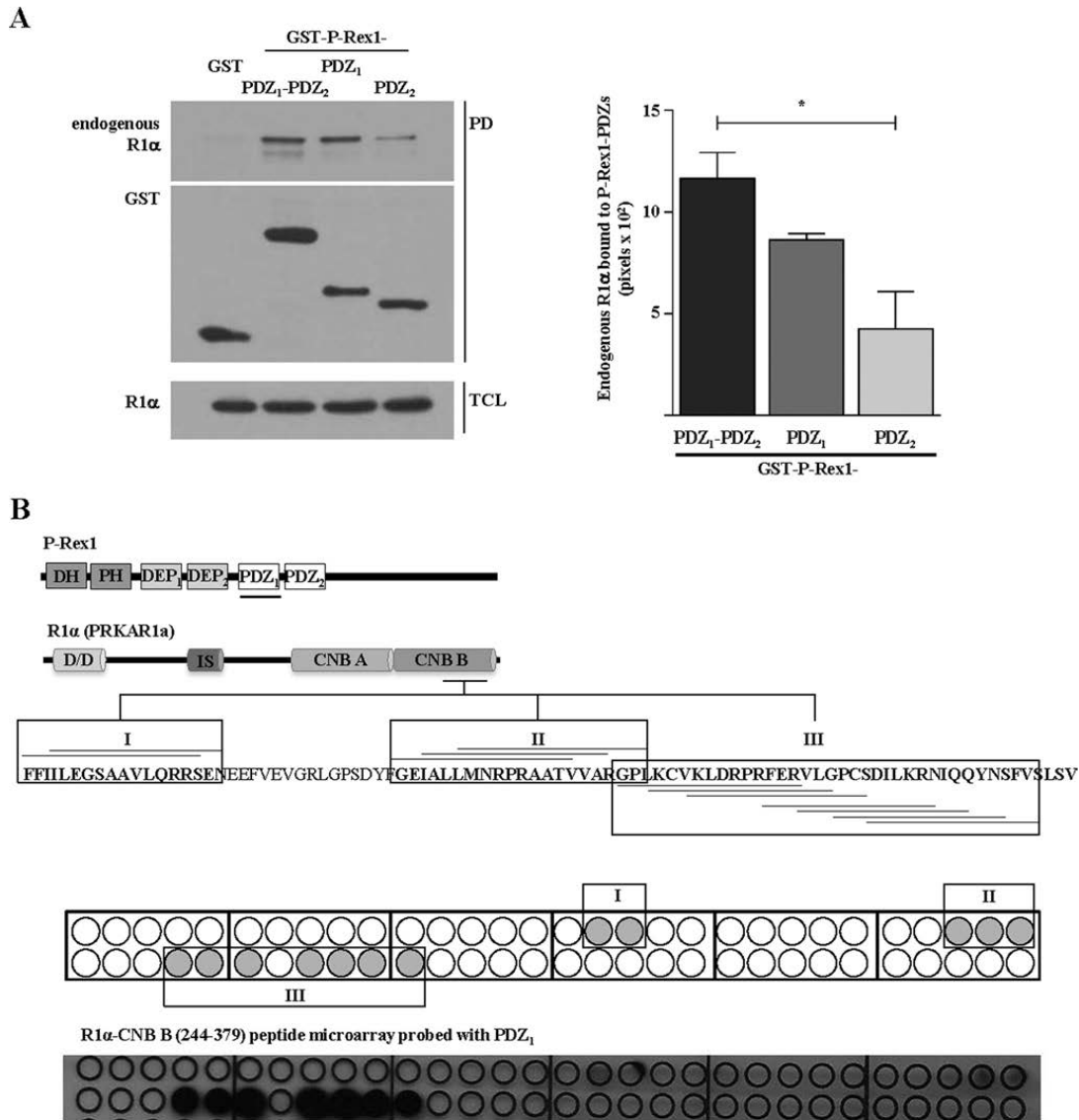
with GST-P-Rex1-DH-PDZ2 (including DH-PH-DEP1-DEP2-PDZ1-PDZ2 domains, as represented in Fig. 3B). We detected that the interaction between endogenous PRKAR1a and the indicated GST-P-Rex1 construct increased with time in cells stimulated with SDF-1 (Fig. 3B, *graph* and *upper panel*).

The mobilization of P-Rex1 to the cell membrane and its potential effect on PKA R1 $\alpha$  localization was studied in COS-7 and HUVEC cells stimulated with SDF-1. As shown in Fig. 3C, EGFP-P-Rex1 (*panels a* and *e*) and mCherry-PRKAR1a (*panels b* and *f*) showed a cytosolic distribution in serum-starved control cells. As expected, P-Rex1 translocated to the membrane upon SDF-1 stimulation (*panels c, g, and k*), whereas PRKAR1a depended on P-Rex1 co-expression to translocate to the membrane, remaining cytosolic in cells not transfected with P-Rex1 but localized to membranes together with P-Rex1 in cells transfected with both PRKAR1a and P-Rex1 (Fig. 3C, compare *panel d* with *panels h* and *l*). In this case mCherry-PRKAR1a co-localized with P-Rex1 at the cell membrane of SDF-1-stimulated cells (*panels i* and *j* and *panels m* and *n* for overlap and amplification in Cos-7 and HUVEC cells, respectively). Thus, PRKAR1a mobilization to the cell membrane upon SDF-1 stimulation likely depends on its interaction with P-Rex1. Interestingly, endothelial cells expressing Z6 (the domain of R1 $\alpha$  initially identified as a P-Rex1 PDZ-PDZ interactor in the yeast two hybrid assay) showed a higher chemotactic response to lower doses of sphingosine 1-phosphate (Fig. 3D), suggesting that PKA exerts a tonic inhibitory control over chemotactic migration in which P-Rex1 is involved.

**PKA Phosphorylates P-Rex1-DEP1 Domain at Ser-436 and Modulates P-Rex1 Activity**—The characterization of type I PKA as a novel P-Rex1 interacting protein together with previous reports showing that P-Rex1 is desensitized by PKA (41) led us to characterize the potential phosphorylation of P-Rex1 by type I PKA and whether this potential phosphorylation correlates with the kinetics of activation of this GEF in response to SDF-1 and the potential effect of the interaction between PKA and P-Rex1 on the regulation of this GEF. First, we searched for potential PKA-dependent phosphorylation sites of P-Rex1 using ScanSite. This algorithm predicted the existence of four possible sites on P-Rex1 (Fig. 4A): one located at the PH domain

**FIGURE 1. PKA interacts with P-Rex1.** *A*, schematic representation of the domains of P-Rex1 depicting the bait used in the yeast two-hybrid screen and the domains of PRKAR1a depicting the prey that was obtained. *B*, the specificity of the interaction between Z6 prey and PDZ-PDZ domains of P-Rex1 was tested in yeast using p53 as negative control. All yeast grew in media lacking leucine and tryptophan (–LT) which selects for the presence of Z6 prey, P-Rex1 bait, p53 and PTD1 plasmids (*right panel*). Only those displaying interaction were able to grow under high stringency conditions (media lacking adenine, histidine, leucine, and tryptophan, –AHLT). The interaction between p53 and PTD1 was used as a positive control. *C–I*, characterization of PKA and P-Rex1 interaction in transfected HEK-293T cells. Pull-down assays and immunoprecipitation experiments were resolved on SDS-polyacrylamide gels and analyzed by immunoblotting using the indicated antibodies. *C*, P-Rex1-PDZ-PDZ domains interact with Z6 prey. Cell lysates containing Z6 prey (tagged with 3XFLAG and EGFP) and P-Rex1-PDZ-PDZ as GST-fusion protein (GST-P-Rex1-PDZ-PDZ) were incubated with glutathione beads, and both total cell lysates (TCL; *right panel*) and pull-down assays (PD; GST, *left panel*) were analyzed using the indicated antibodies. *D*, P-Rex1-PDZ-PDZ domains interact with full-length PRKAR1a. Immunoblots show GST-P-Rex1-PDZ-PDZ and EGFP-PRKAR1a in total cell lysates (*right panel*) and pull-down assays (PD; GST, *left panel*). *E*, full-length P-Rex1 interacts with full-length PRKAR1a. HA-P-Rex1 was immunoprecipitated using HA antibody (IP: HA), and PRKAR1a association was detected with GFP antibody in immunoprecipitated fractions (IP: HA, *left panel*) and total cell lysates (*right panel*). *F*, GST-P-Rex1-PDZ-PDZ interacts with PRKACa subunit. Pull-down assays from cells expressing EGFP-PRKACa and either GST or GST-P-Rex1-PDZ-PDZ were immunoblotted using anti-GFP and GST antibodies. *G*, Z6 prey mainly interacts with P-Rex1-PDZ-PDZ domains. Pull-down assays from cells transfected with 3XFLAG-EGFP-Z6 prey and GST alone or fused to the indicated domains of P-Rex1 were immunoblotted with anti-GFP and GST antibodies. *H*, full-length PRKAR1a mainly interacts with P-Rex1-PDZ-PDZ domains. Pull-down assays from cells transfected with EGFP-PRKAR1a and GST alone or fused to the indicated domains of P-Rex1 were immunoblotted using anti-GFP or GST antibodies as indicated. *I*, PKA holoenzyme mainly interacts with P-Rex1-PDZ-PDZ domains. Pull-down assays from cells transfected with EGFP-PRKACa (catalytic domain) and HA-PRKAR1a (regulatory subunit) and GST alone or fused to the indicated domains of P-Rex1 were analyzed by immunoblotting using the indicated antibodies. *J*, endogenous P-Rex1 interacts with endogenous PRKAR1a. The interaction between endogenous P-Rex1 and PRKAR1a was assessed by immunoprecipitation, IP: R1 $\alpha$  (PRKAR1a), followed by Western blotting (P-Rex1) using total cell lysates from Cos7 cells. The specificity of the assay was determined by using a mouse antibody as negative control (Ctrl). Results shown are representative of at least three independent experiments.

## PKA and P-Rex1 Interact and Are Reciprocally Regulated



**FIGURE 2. PRKAR1α CNB B interacts directly and preferentially with P-Rex1-PDZ1.** *A*, endogenous R1α preferentially interacts with P-Rex1-PDZ1 compared with P-Rex1-PDZ2. Cos7 cells were transfected with GST alone or fused to PDZ1-PDZ2, PDZ1, or PDZ2 domains of P-Rex1. Two days post-transfection, cell lysates were obtained and subjected to GST pull-down assays (PD) with glutathione beads. Endogenous R1α associated to GST-PDZs (*upper panel*) or expressed in total cell lysates (TCL; *bottom panel*) was revealed by a Western blot as well as the isolated GST-fusion proteins immunoblotted using anti-GST antibodies (*middle panel*). The graph at the right represents the mean densitometric values of endogenous R1α associated to PDZs obtained in three independent experiments. \*,  $p < 0.05$ . *B*, *upper panel*, diagram depicting the structures of P-Rex1 and R1α indicating, with horizontal lines below them, the regions assayed for interactions on peptide arrays using the indicating peptides representing different regions of R1α CNB B. The *lower panel* shows that P-Rex1-PDZ1 directly interacts with peptides corresponding to R1α CNB B region III, which do not include the last three C-terminal amino acids of R1α. Similar results were obtained with an array in which PDZ1-PDZ2 domains of P-Rex1 were used.

(Ser-305), one located at the DEP1 domain (Ser-436), and two located at the C terminus (Ser-1001 and Ser-1272). To map the precise domain of P-Rex1 to be phosphorylated by PKA, we transfected HEK-293T cells with different constructs of this GEF together with type I PKA. We first compared the potential phosphorylation sites of P-Rex1 in the N terminus *versus* the

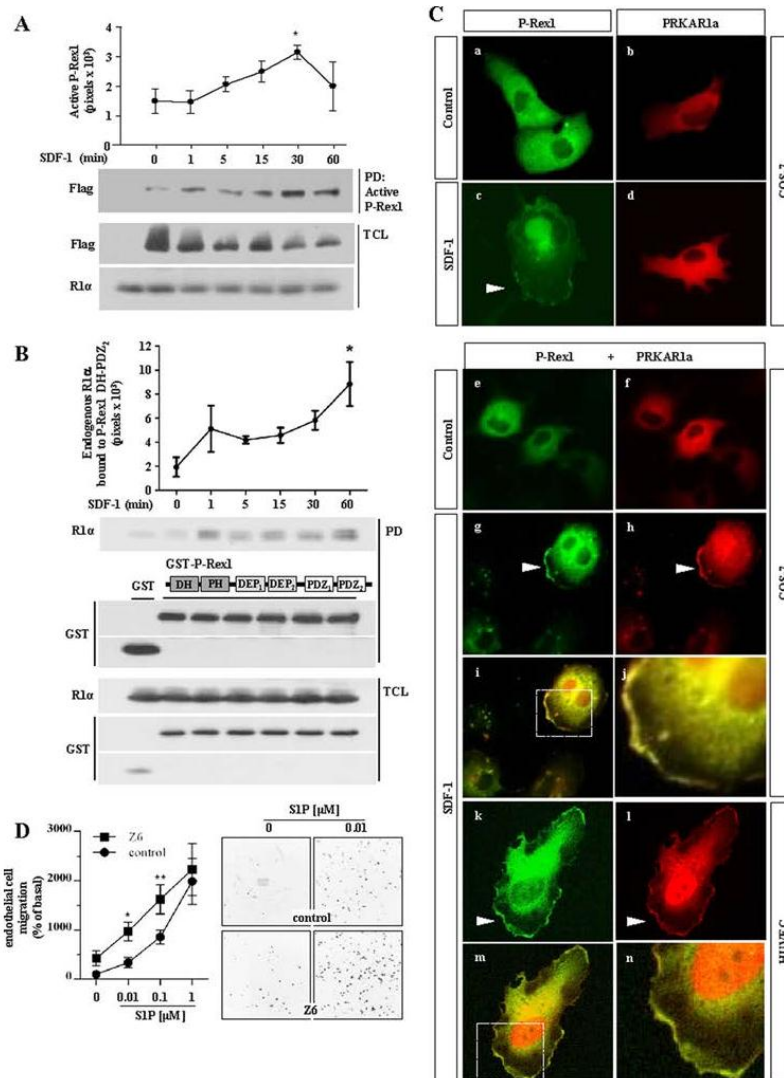
P-Rex1 C terminus. The phosphorylation, detected with antibodies recognizing PKA substrates (PKAS), was associated with the P-Rex1 N terminus, which includes the DH, PH, two DEP, and two PDZ domains (Fig. 4B, *left panel*). We then compared the potential phosphorylation site in P-Rex1 constructs containing the DH and PH domains and constructs containing

## PKA and P-Rex1 Interact and Are Reciprocally Regulated

both DEP and both PDZ domains. In this case the phosphorylation of P-Rex1 was detected in the construct comprising from the first DEP domain until the second PDZ domain (Fig. 4B, right panel). Finally, we assessed the potential phosphorylation of PKA at the DEP1, DEP2, PDZ1, and PDZ2 domains of P-Rex1, all expressed as individual constructs. With this approach, we detected the phosphorylation of P-Rex1 by PKA at the first DEP domain, GST-DEP1 (Fig. 4C), where a predicted consensus PKA phosphorylation site at Ser-436 was identified (Fig. 4A). With the aim of directly assessing whether P-Rex1 is phosphorylated by PKA at Ser-436, we engineered a GST-DEP1 S436A mutant and tested its potential phosphorylation by PKA. As shown in Fig. 4D, this mutant is not phosphorylated by PKA, as indicated by the lack of signal in the Western blot using

antibodies recognizing PKA substrates that, in parallel, gave a positive signal with the P-Rex1-DEP1 domain. Altogether our results demonstrate that P-Rex1 is a novel PKA interactor that contributes to the mobilization of PKA R1 $\alpha$  to the plasma membrane, indicating a potential reciprocal regulation, as P-Rex1 is also phosphorylated by PKA at Ser-436 at its DEP1 domain.

To examine the functional effect of P-Rex1 phosphorylation at Ser-436 by PKA, we assessed the effect of forskolin on SDF-1-dependent P-Rex1 activation and phosphorylation. As shown in Fig. 5A, SDF-1-dependent P-Rex1 activation and phosphorylation was inhibited by forskolin, coincident with an increase of P-Rex1 phosphorylation detected with antibodies recognizing PKAs (Fig. 5A, second panel). As positive controls of the effect of SDF-1 signaling





### PKA and P-Rex1 Interact and Are Reciprocally Regulated

and forskolin-dependent increase of cAMP, we demonstrated the phosphorylation of Akt and CREB, respectively (Fig. 5A, *pCREB* and *pAkt*; *TCL*). To address whether this inhibition of P-Rex1 by PKA correlated with a potential inhibitory effect of PKA on sphingosine 1-phosphate-elicited endothelial chemotaxis, we initially explored the effect of forskolin/IBMX and H89 on this process. As shown in Fig. 5B, sphingosine 1-phosphate promoted endothelial cell chemotaxis in a dose-response manner that was partially inhibited by PKA (as demonstrated by the inhibitory effect of forskolin/IBMX, reversed by H89, a widely used PKA inhibitor). To address the hypothesis that desensitization of P-Rex1 and inhibition of chemotactic migration by PKA in endothelial cells responding to sphingosine 1-phosphate were linked to phosphorylation of P-Rex1 at Ser-436, we analyzed the activity of non-phosphorylatable P-Rex1-N-term-S436A mutant compared with wild-type P-Rex1-N-term and the effect of these constructs on endothelial chemotaxis elicited by sphingosine 1-phosphate either in the absence or presence of forskolin/IBMX. Consistent with a regulatory role of PKA-dependent phosphorylation of P-Rex1 at Ser-436, the non-phosphorylatable P-Rex1 DH-PDZ2-S436A mutant showed increased activity, detected by higher interaction with nucleotide-free Rac in the pulldown assay (Fig. 5C) and prevented the inhibitory effect of FSK/IBMX in chemotactic cells stimulated with 100 nM sphingosine 1-phosphate (Fig. 5D). Altogether, our results indicate that P-Rex1 phosphorylation at Ser-436 by PKA inhibited its GEF function.

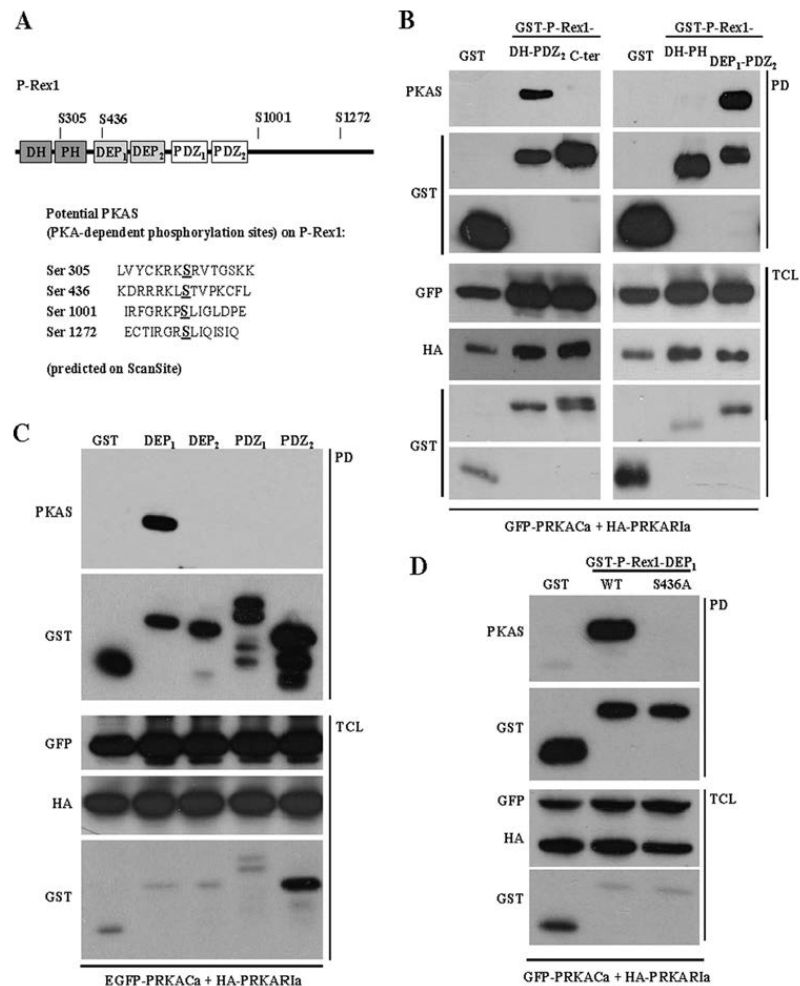
**P-Rex1 DH-PH Catalytic Module Is Inhibited by Intramolecular Interactions within the N-terminal Region Facilitated by Phosphorylation of DEP1 Domain by PKA**—Our experiments showing that PKA inhibited P-Rex1 by phosphorylating it at Ser-436 within the DEP1 domain and the lack of detectable phosphorylation within the catalytic DH-PH module (regardless of the existence of a predicted phosphorylation site at Thr-305, which might not have been detectable by the PKAS antibodies due to the absence of an arginine in the  $-3$  position) raised questions about the mechanism of inhibition. Also, considering that other potential phosphorylation sites might not

have been recognized by the PKAS antibodies, we followed an alternative, direct approach, to test the effect of PKA on P-Rex1 catalytic activity. We hypothesized that PKA-dependent phosphorylation of P-Rex1 at Ser-436 might promote inhibitory intramolecular interactions between the DEP1 domain and the DH-PH catalytic module that might also affect P-Rex1 interactions with its upstream activators; this was consistent with previous reports which postulated that intramolecular interactions modulate P-Rex1 activity (29, 38, 42). To assess these possibilities, we used transiently transfected HEK293T cells to test the activity of different P-Rex1 constructs that included the DH-PH catalytic module followed by a C-terminal CAAX to anchor them to the plasma membrane (as depicted in Fig. 6A). Furthermore, we assessed the effect of PKA on the membrane-anchored P-Rex1-DH-PH catalytic module either acting directly on it or through the DEP1 or C-terminal domains (as indicated in Figs. 6, D and G, and 7A). Our rationale was that these constructs would directly activate Rac and might serve as readouts of the effect of direct modulators of the P-Rex1-DH-PH catalytic module. Thus, we cloned the DH-PH region fused to EGFP at the N terminus and a C-terminal isoprenylation box. To test potential intramolecular interactions within the N-terminal region of P-Rex1 (including DH-PH-DEP1-DEP2-PDZ1-PDZ2) affecting the DH-PH catalytic module, we tested the activity of constructs containing only these two domains or extended up to the second DEP or the second PDZ, as depicted in Fig. 6A. With pull-down experiments, we compared their affinity for RacG15A (considered as readout of RacGEF activity) and their effect on Rac activation. As expected, P-Rex1-DH-PH-CAAX protein showed constitutive activity, whereas the constructs that included the DEP1-DEP2 or DEP1-PDZ2 cassettes had marginal activity (Fig. 6, B and C), indicating an inhibitory role for the DEP and PDZ domains on the P-Rex1 DH-PH catalytic cassette.

Although our phosphorylation mapping approach on P-Rex1 using PKAS antibodies did not reveal phosphorylation at the PH domain (regardless of the existence of a putative phosphorylation site for PKA at Ser-305), it was still possible that PKA might have a direct effect on the catalytic module that was not

**FIGURE 3. SDF-1 promotes P-Rex1 activation, interaction with PKA, and mobilization of them to the plasma membrane.** A, SDF-1 promotes P-Rex1 activation. Cos7 cells were transfected with FLAG-tagged P-Rex1; 2 days post-transfection, cells were starved and stimulated with SDF-1 (50 ng/ml) for the indicated times. The fraction of active P-Rex1 was isolated by pull-down (PD) with nucleotide-free Rac-G15A fused to GST. The expression of transfected P-Rex1 (FLAG) and endogenous PRKAR1a (*R1 $\alpha$* ) in total cell lysates (*TCL*) is shown as the control. The graph represents the mean densitometric values of active P-Rex1 obtained in four independent experiments. \*,  $p < 0.05$ . B, effect of SDF-1 on P-Rex1 interaction with endogenous R1 $\alpha$ . Serum-starved Cos7 cells expressing GST-P-Rex1-DH-PDZ2 (comprising the indicated domains, or GST, as control) were stimulated with SDF-1 (50 ng/ml) for 1–60 min. Endogenous PRKAR1a (*R1 $\alpha$* ) interacting with P-Rex1 was revealed by Western blot in GST pull-down assays, and its expression was confirmed in total cell lysates (*TCL*). Expression and pull-down of P-Rex1 constructs and control GST were revealed by Western blot using anti-GST antibodies. The graph represents the mean densitometric values of endogenous R1 $\alpha$  bound to P-Rex1 obtained in three independent experiments. \*,  $p < 0.05$ . C, cellular distribution of P-Rex1 and PRKAR1a in Cos-7 and HUVEC cells stimulated, as indicated, with SDF-1. Cells were transfected with pEGFP-C1-P-Rex1 either in the absence or presence of pmCherry-PRKAR1a. Cos-7 cells were starved for 16 h and HUVEC cells for 2 h with M199 medium (Gibco) plus 0.5% BSA. Then cells were stimulated with SDF-1 for 5 min, fixed, and analyzed with Nikon Eclipse Ti inverted fluorescence microscope. GFP-P-Rex1 in the absence (a and c) and in the presence (e and g) of pmCherry-PRKAR1a in control (basal, a and e) conditions and upon SDF-1 stimulation (c, g, and k panels). P-Rex1 was relocated to cell membrane upon SDF-1 in 15 of 46 cells (transfected only with EGFP-P-Rex1), b, pmCherry-PRKAR1a transfected alone (b and d) or with P-Rex1 (f, h, and j) was visualized under control (basal, b and f) conditions and upon SDF-1 stimulation (d, h, and j). In cells transfected only with PRKAR1a, this type I PKA regulatory subunit remained cytosolic in SDF-1-stimulated cells, whereas in cells co-transfected with PRKAR1a and P-Rex1, both proteins colocalized at the cell membrane in SDF-1-stimulated cells (16 from 36 cells). Representative images are shown in panels g and h and panels k and l. Merged images (i and m) and magnified images (j and n) showing GFP-P-Rex1 and pmCherry-PRKAR1a colocalization. D, Z6 (corresponding to the P-Rex1-interacting region in R1 $\alpha$ , comprising the CNB B domain) had a positive effect on S1P-dependent cell chemotaxis. PAE cells were transfected either with Z6 or EGFP-CAAX (control) and subjected to chemotaxis assays in Boyden chambers as described under "Experimental Procedures." The right panel shows representative areas where the nuclei of cells that migrated for 6 h under basal or stimulated conditions (0.01  $\mu$ M S1P) were observed under a 20 $\times$  objective. Cell migration was determined by counting the nuclei of migrating cells using ImageJ software. The graph at the left shows the average and S.E. values for the effect of increasing doses of S1P of three independent experiments normalized to the number of cells that migrated under non-stimulated conditions, considered as 100%. Statistical significance was analyzed by two way analysis of variance followed by Tukey's test. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

## PKA and P-Rex1 Interact and Are Reciprocally Regulated



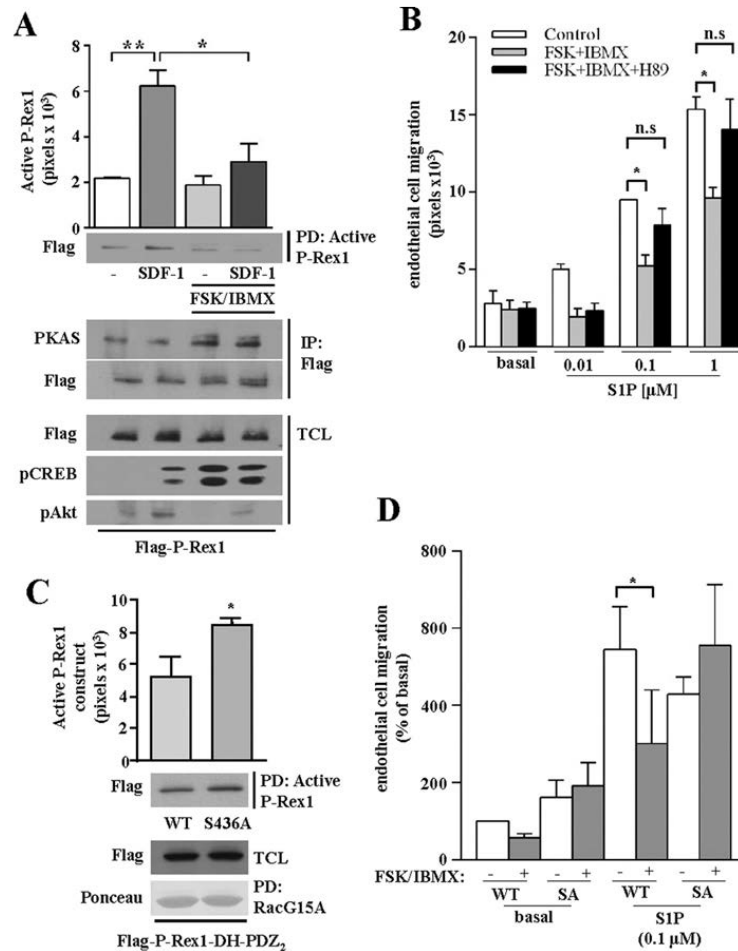
**FIGURE 4. PKA phosphorylates P-Rex1 at Ser-436 of DEP1 domain.** *A*, motif scan site analysis showing putative PKA-dependent phosphorylation sites within P-Rex1 protein (under medium stringency). *B*, PKA phosphorylates P-Rex1 at the N-terminal region. HEK-293T cells were co-transfected with EGFP-PRKACa and HA-PRKAR1a and either the N-terminal (DH-PDZ<sub>2</sub>), C-terminal, DH-PH, or DEP1-PDZ<sub>2</sub> regions of P-Rex1 fused to GST. GST pull-down (PD) assays were performed, and PKA-dependent phosphorylation was detected in pull-down assays (GST:PD) using PKAS antibody. P-Rex1 was phosphorylated by PKA at the N-terminal but not at C-terminal region (*left panel*). Phosphorylation was found within the DEP1 to PDZ<sub>2</sub> region of P-Rex1, excluding DH-PH domains (*right panel*). *TCL*, total cell lysates. *TCLC*, PKA phosphorylates P-Rex1 at DEP1 domain. Cells were co-transfected with EGFP-PRKACa and HA-PRKAR1a and single domains of P-Rex1 as GST fusion proteins (DEP1, DEP2, PDZ1, or PDZ2). GST was used as the negative control. PKA-dependent phosphorylation at the DEP1 domain of P-Rex1 was detected using PKAS antibody. *D*, PKA phosphorylates P-Rex1 at Serine 436 of DEP1 domain. Phosphorylation of P-Rex1-DEP1-Ser-436 was confirmed by using P-Rex1-DEP1-S436A mutant. Pull-down assays were performed with cells lysates from HEK-293T cells co-transfected with EGFP-PRKACa and HA-PRKAR1a and either wild type P-Rex1-DEP1 or P-Rex1-DEP1-S436A mutant. PKA-dependent phosphorylation at the DEP1 domain of P-Rex1 was detected using PKAS antibody. Expression of transfected proteins is shown in total cell lysates, and isolated GST fusion proteins were detected with GST antibodies in the pull-down assays as indicated. Results shown are representative of at least three independent experiments.

revealed with the antibodies. Thus, we tested this possibility using the constitutively active P-Rex1-DH-PH-CAAX construct co-transfected with PRKACA, the catalytic subunit of PKA (Fig. 6D). We found that PKA did not have a significant effect on the activation of Rac by the constitutively active P-Rex1-DH-PH-CAAX construct (Fig. 6, E and F). These results are consistent with the idea that the inhibitory effect of PKA on P-Rex1 does not involve a direct effect on the DH-PH catalytic module.

Because the P-Rex1-DH-PH-DEP1-DEP2-CAAX construct was less active than P-Rex1-DH-PH-CAAX and because P-Rex1 phosphorylation by PKA mapped at DEP1-Ser-436, resulting in inhibition of P-Rex1 activity, we postulated that the P-Rex1-DH-PH catalytic cassette might be inhibited by the phosphorylated DEP1 domain via direct interactions. We tested this possibility by assessing the effect of DEP1 on the activation of Rac by P-Rex1-DH-PH-CAAX in the absence or presence of the PKA catalytic subunit (Fig. 6G). We found that FLAG-DEP1



## PKA and P-Rex1 Interact and Are Reciprocally Regulated



**FIGURE 5. P-Rex1 phosphorylation by PKA inhibits its GEF activity and decreases sphingosine 1-phosphate-dependent chemotactic response in endothelial cells.** *A*, PKA activation inhibits P-Rex1 GEF activity. Nucleotide-free GST-Rac-G15A pull-down (PD) assays were performed with cell lysates from Cos7 cells transfected with FLAG-tagged P-Rex1 and treated either with SDF-1, forskolin/IBMX, or both (upper panel, PD: active P-Rex1). PKA-dependent P-Rex1 phosphorylation was tested in parallel by immunoprecipitating P-Rex1 with FLAG antibodies (IP: FLAG) and detecting phosphorylated P-Rex1 with PKAS antibody. As a positive control of SDF-1 signaling and PKA activation, phosphorylation of AKT and CREB was demonstrated in total cell lysates (TCL; pCREB, pAkt; bottom panels). The graph represents the mean densitometric values of active P-Rex1 obtained in three independent experiments. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ . *B*, S1P-dependent PAE endothelial cell chemo taxis is partially sensitive to PKA. Serum-starved PAE cells were subjected to chemotaxis assays in Boyden chambers using the indicated concentrations of S1P at the bottom wells. The effect of PKA was tested by the inhibitory effect of forskolin/IBMX either in the absence or presence of H89, preincubated with cells for 30 and 60 min, respectively, and throughout the 6 h of migration. Bars represent average values and S.E. of three independent experiments; statistical significance was evaluated with *t* test; \*,  $p < 0.05$ ; ns, nonsignificant differences. *C*, non-PKA-phosphorylatable P-Rex1-N-term-(DH-PDZ2)S436A mutant shows increased interaction with nucleotide-free Rac. HEK-293 cells were either transfected with wild type (WT) FLAG-tagged P-Rex1-DH-PDZ2 or FLAG-tagged P-Rex1-DH-PDZ2-S436A mutant. Nucleotide-free GST-Rac-G15A pull-down assays were performed to analyze P-Rex1 GEF activity. The graph represents the mean densitometric values of active P-Rex1 obtained in three independent experiments. \*,  $p < 0.05$ . *D*, P-Rex1-S436A decreased the inhibitory effect of PKA on S1P-dependent PAE endothelial cell chemotaxis. P-Rex1-N-term-(DH-PDZ2)S436A-CAAX mutant or the wild-type version was transfected into PAE cells that were subjected to chemotaxis in Boyden chambers, as described under "Experimental Procedures," containing 0.1  $\mu$ M S1P at the bottom wells. The effect of forskolin/IBMX was assessed as described in *B*. The bars represent average values and S.E. of three independent experiments. Statistical significance was evaluated by *t* test. \*,  $p < 0.05$ .

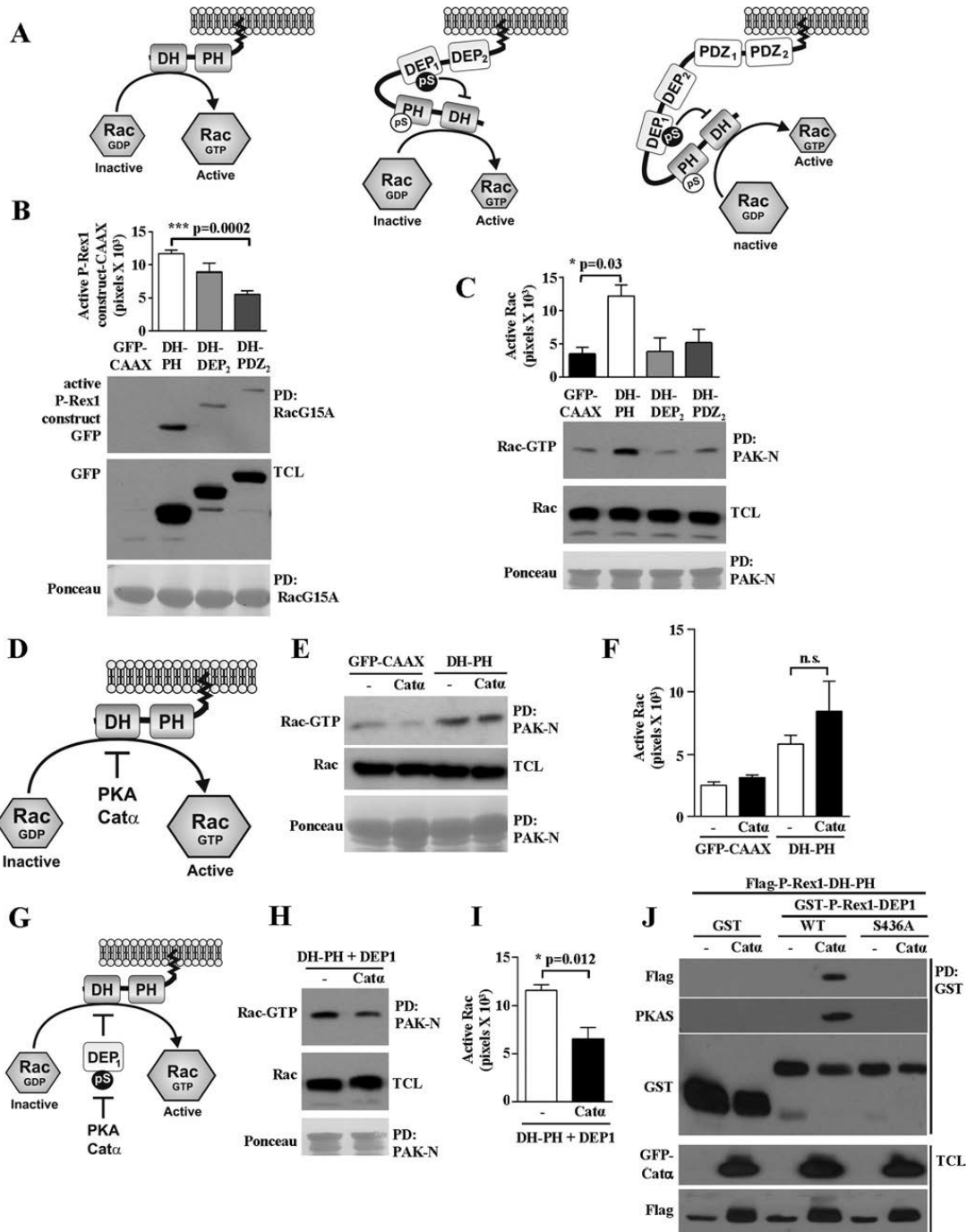
inhibited the activation of Rac induced by P-Rex1-DH-PH-CAAX only when it was co-expressed with PRKACA (Fig. 6, *H* and *I*). Therefore, we investigated whether P-Rex1 DEP1 interacted with the DH-PH module in a manner affected by its phosphorylation at Ser-436. We assessed this hypothesis by a GST pull-down assay measuring the binding of P-Rex1-DH-PH (fused to FLAG) with P-Rex1-DEP1, either WT or S436A (fused

to GST), in the absence or presence of PKA catalytic subunit (Cat $\alpha$ ). We found that phosphorylation of DEP1 at Ser-436 (demonstrated by Western blot with PKAS antibodies; Fig. 6*f*) promoted its interaction with the DH-PH module, whereas the S436A mutant was unable to interact with the DH-PH construct even in presence of PKA (Fig. 6*f*). As controls, the expression of PKA, P-Rex1-DH-PH, and the effectiveness of the GST

*PKA and P-Rex1 Interact and Are Reciprocally Regulated*

pulldown was demonstrated by Western blot using anti-GFP, FLAG, and GST antibodies, respectively. These results are consistent with the hypothesis that PKA inhibits P-Rex1 by pro-

moting interactions between the phosphorylated DEP1 domain and the DH-PH catalytic module, potentially interfering with the access of Rac1 to the nucleotide exchanger groove.



### PKA and P-Rex1 Interact and Are Reciprocally Regulated

*P-Rex1 DH-PH Catalytic Module Is Also Inhibited by the C-terminal Region via Interactions Facilitated by a PKA-dependent Mechanism without the Participation of the DEPI-PDZ2 Region*—P-Rex1 maintains intramolecular interactions involving its N- and C-terminal regions (42). Interestingly, phosphorylation of Ser-1169 is required for P-Rex1 activation in response to neuregulin and insulin-like growth factor (40, 48), whereas dephosphorylation of its neighbor Ser-1165, both located in the P-Rex1 C-terminal region, is required to activate P-Rex1 with the involvement of protein phosphatase 1 $\alpha$  (38). However, none of these sites is within the consensus sequence recognized by PKA; thus it remains to be defined whether PKA exerts a regulatory role on the P-Rex1 C-terminal region. As shown in Fig. 4A, Ser-1001 and Ser-1272 within the P-Rex1 C-terminal region correspond to PKA-phosphorylation consensus sites; however, the PKAS antibodies did not detect their phosphorylation in conditions in which phosphorylation of Ser-436 at P-Rex1 DEPI was revealed (Fig. 4B). However, it was still possible that PKA-exerted a regulatory role on this region by the phosphorylation of residues that were not detected by the PKAS antibodies, possibly through a PKA-dependent indirect mechanism. Accordingly, a change in the electrophoretic mobility referred to as an electrophoretic delay and revealed as a doublet, occurred in a P-Rex1 C-terminal region construct co-transfected with PKA (Fig. 4B, left panel, C-ter, TCL/GST blot). This was consistent with the initial report of P-Rex1 regulation by PKA by Mayeenuddin *et al.* (41) who observed that this kinase caused an electrophoretic delay on P-Rex1. Thus, to assess a potential direct role of P-Rex1 C-terminal region on the activity of the DH-PH catalytic module, we assayed by pull-down the activity of the DH-PH-CAAX construct and assessed its effect on Rac activation in the presence of P-Rex1 C-terminal region and the PKA catalytic subunit, as represented in Fig. 7A. Consistent with a direct regulatory role of P-Rex1 C-terminal region on the DH-PH catalytic module, the single co-expression of the P-Rex1 C-terminal region was enough to attenuate the activity of the DH-PH construct (Fig. 7B) and the consequent activation of Rac (Fig. 7C). This inhibitory effect was

strongly reinforced by simultaneous expression of the catalytic subunit of PKA (Fig. 7, B and C), which also promoted the interaction between P-Rex1 N- and C-terminal regions, in particular when Ser-436 was substituted by Ala. These findings further support the idea that phosphorylation at Ser-436 regulates interdomain interactions within the N-terminal region and between this and the C-terminal region (Fig. 7E). To explore if this effect was related to intramolecular interactions that might affect the association between P-Rex1 and its activators ( $G\beta\gamma$  and mTOR) (Fig. 7D), we assessed the association between the P-Rex1 N-terminal region (DH-PDZ2) either WT or S436A and the P-Rex1 C-terminal region either in the presence or absence of PRKACA. We found, consistent with previous reports, that the P-Rex1 N-terminal and C-terminal regions did interact (42). Interestingly, this interaction was increased by the presence of PKA and was more effective in cells in which Ser-436 was substituted by Ala. Intriguingly, PKA-dependent changes on the interaction between P-Rex1 amino and C-terminal regions did not affect the interaction between the P-Rex1 amino and  $G\beta\gamma$  heterodimer (Fig. 7E). Because phosphorylated DEPI or the C-terminal region of P-Rex1 was directly inhibitory of the catalytic DH-PH region, the fact that P-Rex1 and  $G\beta\gamma$  interaction was not decreased by PKA was consistent with the recently proposed model in which  $G\beta\gamma$  recognizes a region of the P-Rex1-DH-PH module located at the opposite side of the catalytic interface (49). Previously, we demonstrated that P-Rex1 DEP-DEP domains interact with the mTOR C-terminal region, resulting in activation of P-Rex1 (20); here, we tested whether this interaction was affected by modifications at Ser-436, the site at P-Rex1 DEPI that is phosphorylated by PKA. We used constructs corresponding to the P-Rex1 N-terminal region (DH-PDZ2) in which Ser-436 was substituted by Ala or Asp (S436A or S436D). They were transfected into HEK293T cells to test their ability to interact with mTOR C-terminal region (mTOR prey). We found that both P-Rex1 constructs interacted similarly with mTOR prey (Fig. 7F), suggesting that phosphorylation of P-Rex1 at Ser-436 does not affect the interaction between P-Rex1 and mTOR.

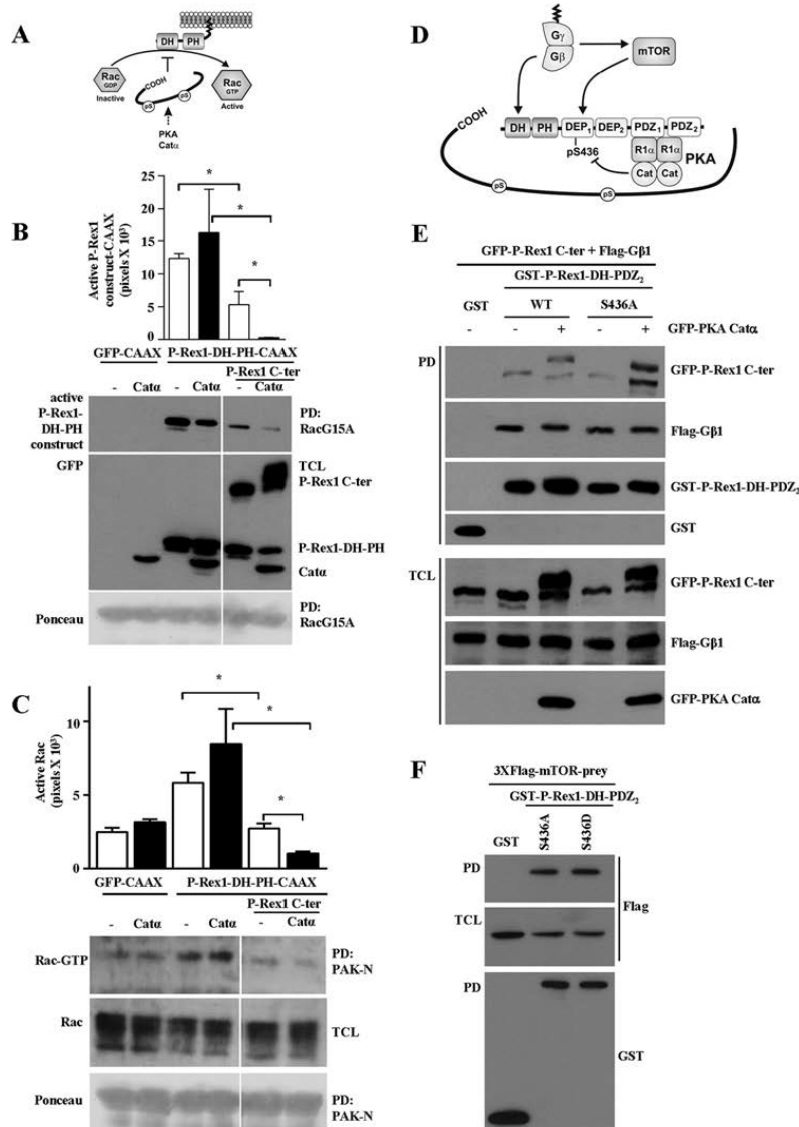
**FIGURE 6. P-Rex1 DH-PH catalytic module is inhibited by intramolecular interactions within the N-terminal region facilitated by phosphorylation of DEPI domain by PKA.** A, the left drawing shows the hypothetical constitutive activity of a P-Rex1 construct consisting of the DH-PH catalytic module anchored to the plasma membrane by isoprenylation and tagged with EGFP at the N-terminus. Drawings at the center and right depict potential inhibitory intramolecular interactions within P-Rex1 N-terminal region involving the DEP and PDZ domains. Functional assays comparing the activity of these constructs are shown in B and C. B, RacGEF activity of isoprenylated P-Rex1 constructs containing the indicated domains. HEK293T cells transfected with EGFP-CAAX empty vector or including P-Rex1-DH-PH, P-Rex1-DH-DEP2, or P-Rex1-DH-PDZ2 were starved of serum for 16 h and used for pull-down (PD) assays with GST-RacG15A beads. The amount of each RacGEF active construct was revealed by immunoblot against the EGFP tag. The graph represents the mean densitometry values of active EGFP-P-Rex1-CAAX constructs obtained in three independent experiments. Statistical analysis was done by *t* test, obtaining the value of *p* shown at the graph. A representative result is shown below the graph. TCL, total cell lysates. C, effect of isoprenylated P-Rex1 constructs as activators of Rac in serum-starved cells. Rac activation was assessed by GST-PAK-N pull-down assays done in parallel with GST-RacG15A using the same constructs and lysates described in B. The graph represents the mean and S.E. of densitometry values of active Rac obtained in three independent experiments. Statistical significance was analyzed by *t* test; the value of *p* is shown at the graph. A representative blot showing the fraction of active Rac and that in total cell lysates is shown below the graph. D, hypothetical model showing the potential effect of PKA on the activity of the catalytic DH-PH module of P-Rex1, which was tested in E and F. E, PKA does not have a direct inhibitory effect on the activity of the catalytic DH-PH module of P-Rex1. A representative blot shows the activation of Rac in serum-starved HEK293T cells transfected with EGFP-CAAX or EGFP-DH-PH-CAAX together or not with EGFP-PRKACA. Rac activity was determined by GST-PAKN pull-down and revealed by immunoblot against Rac as well as its presence in total cell lysates. F, the graph represents the results of experiments done to test the effect of PKA on the activation of Rac by isoprenylated P-Rex1-DH-PH construct. Bars represent the average and S.E. of three independent tests as the one shown in E. Statistical analysis was done by *t* test; ns, stands for nonsignificant difference. G, hypothetical model showing the potential effect phospho-Ser-436-DEPI, phosphorylated by PKA, on the activity of the catalytic DH-PH module of P-Rex1, which was tested in H and I. H, phospho-DEPI inhibits the DH-PH module of P-Rex1 as revealed by a lower level of active Rac detected in serum-starved HEK293T cells cotransfected with EGFP-DH-PH-CAAX and FLAG-DEPI together or not with EGFP-PRKACA. I, the graph represents the mean densitometry values and S.E. of active Rac as detected in three independent experiments as the one shown in H. Statistical analysis was done by *t* test; the value of *p* is indicated. J, phospho-DEPI interacts with the catalytic DH-PH module. Pull-down assays done with lysates from serum-starved HEK293T cells cotransfected with GST-P-Rex1-DEPI-WT or S436A and FLAG-DH-PH together or not with EGFP-PRKACA were analyzed by Western blot using antibodies against FLAG, PKAS, and GST as indicated. The expression of transfected constructs was confirmed in total cell lysates. The results are representative of three independent experiments.

PKA and P-Rex1 Interact and Are Reciprocally Regulated

Discussion

P-Rex1 is a multidomain GEF that couples G-protein-coupled receptor signaling to Rac activation through its binding to Gβγ and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (28, 50). In the current study we demonstrate that the type I PKA regulatory subunit α (PRKAR1a) interacts with P-Rex1 and translocates with it to the cell membrane upon SDF-1 stimulation. Moreover, we demonstrate that PKA phosphorylates P-Rex1 at Ser-436 promoting intramolecular inhibitory interactions. Thus we reveal that PKA and P-Rex1 are reciprocally regulated. We previously showed that interaction of the oligomeric kinase mTORC2 with P-Rex1 DEP domains leads to Rac activation

and cell migration (20). Indeed, mTOR was the first kinase identified as a direct interactor of P-Rex1 (20). Subsequent studies demonstrate that AKT1 interacts with P-Rex1 and phosphorylation of this kinase by mTORC2 is facilitated by its interaction with P-Rex1 (34). Thus, in addition to the role attributed to P-Rex1 as an integrator of G-protein-coupled receptor and growth factor receptor signaling leading to Rac activation and cell migration, we show here that this RacGEF is mechanistically regulated by PKA via a multistep mechanism involving direct interactions and phosphorylation-dependent intramolecular inhibitory interactions that interfere with the catalytic DH-PH cassette of P-Rex1, whereas activation of this RacGEF brings PKA to the





### PKA and P-Rex1 Interact and Are Reciprocally Regulated

plasma membrane, revealing a novel scenario of reciprocal regulation between these important signaling proteins.

We also show here that PKAR1a is recruited to P-Rex1 by a non-canonical mechanism that involves interaction with the P-Rex1 PDZ domains with the CNB-B domain of PKAR1a. Although the C terminus of PKAR1A contains a class II PDZ motif that we initially considered as the canonical motif for interaction with P-Rex1 PDZ domains, arrays using various peptides representing different regions of R1 $\alpha$  revealed that CNB B, the second cAMP binding domain of R1 $\alpha$ , preferentially interacts with P-Rex1-PDZ1. This interaction was effective even in the absence of the last three amino acids of R1 $\alpha$ . There is a clear contrast between this novel interaction described for P-Rex1 and PKA and the classical mechanism of interaction of PKA with AKAPs, which regularly occurs through the N terminus of types I and II regulatory subunits (51). Detailed biochemical, cellular, and structural studies have revealed a plethora of AKAPs that interact with the N terminus of PKA regulatory subunits and provide a mechanistic basis by which type II holoenzymes, in particular, are localized to different subcellular compartments (52–55). Less information is available for type I PKA, although some AKAPs are dual specific and bind to both RI and RII subunits, whereas a few such as sphingosine kinase-interacting protein (SKIP) and the recently discovered small myristoylated and palmitoylated AKAP are RI-specific (56–58). Sphingosine kinase interacting protein (SKIP) was also reported to be an RI-specific AKAP (56, 57). Another small myristoylated and palmitoylated AKAP was also shown to be RI-specific and is recruited to the plasma membrane (58). R1 $\alpha$  was also shown to be important for cell migration in response to  $\alpha$ 4 integrin, and recruitment of PKAR1a also did not involve a canonical AKAP mechanism (59–61). The non-canonical interaction that type I PKA establishes with P-Rex1 is the first in which CNB B, the second cAMP binding domain of this regulatory subunit, is recognized as the interacting interface with a protein other than the catalytic subunit of the kinase. Whether this represents the initial example of a common mechanism by which PDZ-containing proteins might control type I PKA subcellular dynamics and localization, equivalent to the role played by AKAPs for type II PKA, or might lead to the identification of additional cAMP-dependent R1 $\alpha$ -regulated targets emerge as interesting possibilities that

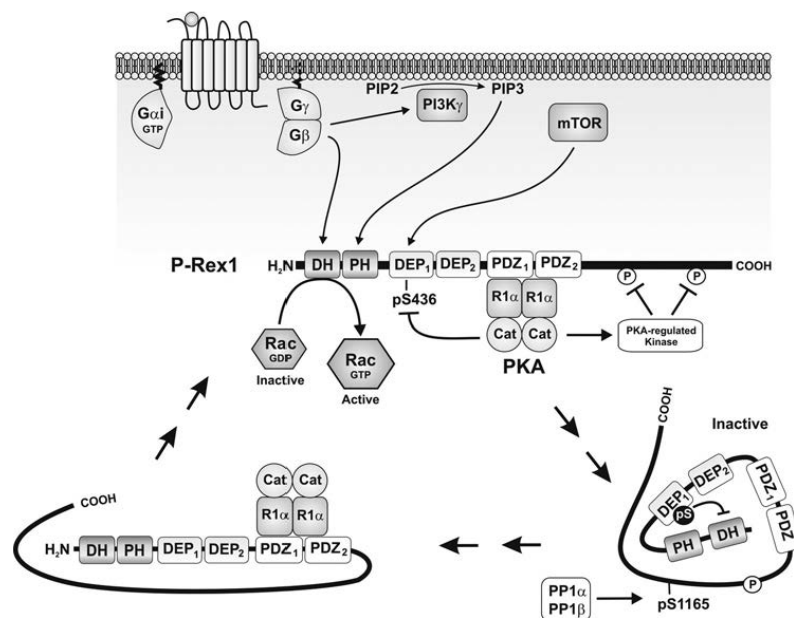
will be the focus of future studies. Interestingly, cAMP-bound RII binds to G $\alpha_i$  and sensitizes  $\delta$ -opioid G $_i$ -coupled receptors signaling to ERK activation (62).

Understanding the particular intricacies by which PKA regulates Rho GTPases and cytoskeleton dynamics depends on the identification of specific targets and interacting partners that provide specificity for the effects of this serine/threonine kinase. These elements would help to explain the apparently conflicting results showing that PKA either promotes (11–14) or interferes (15–19, 28) with cell migration. Clearly such regulation is likely to be cell-specific. Although the PKA consensus phosphorylation sequence is present in thousands of potential protein substrates, its exquisite specificity is in part achieved through tight control of its subcellular distribution, and this is mediated in large part by its regulatory subunits that interact with a variety of targeting proteins. Here we identify a new class of PKA targeting protein that functions not only to target but also to bring a set of signaling domains to the membrane in response to G-protein-coupled receptor activation. Furthermore, we found that interaction of type I PKA with P-Rex1 PDZ-domains facilitates the phosphorylation of this GEF and its desensitization. Whether this interaction also facilitates the ability of type I PKA to recognize other substrates emerges as an interesting open question. Considering the mobilization of type I PKA to the cell membrane together with P-Rex1, upon stimulation of cells with SDF-1, it will be interesting to explore whether this interaction facilitates the potential regulation by PKA of plasma membrane proteins involved in chemotactic responses. Thus, it is likely that RI subunits play a far more important role at the plasma membrane than was previously appreciated.

Bachmann *et al.* (63) recently described the formation of a transient complex between Rac1 and PKA through the PKA RII $\beta$  regulatory subunit, and this interaction depends on the AKAP-like behavior of Rac1. Such an interaction would provide reciprocal regulation for signaling cascades of both components; particularly, Rac1-GTP stabilizes type II PKA holoenzyme (63). Here, we describe a new function for P-Rex1 interacting with PKA holoenzyme through the regulatory subunit I $\alpha$ . This represents an alternative way of assembling a PKA signaling complex that is different from the traditional AKAP-mediated mechanism.

**FIGURE 7. P-Rex1 DH-PH catalytic module is also inhibited by the C-terminal region via interactions facilitated by a PKA-dependent mechanism without the participation of the DEP1-PDZ2 region.** *A*, hypothetical model showing the possible inhibitory effect of PKA contributing to the potential inhibitory action of P-Rex1 C-terminal region over the catalytic DH-PH module. Experiments assessing this possibility are shown in *B* and *C*. *B*, PKA enhances the inhibitory potential of P-Rex1 C-terminal region over the DH-PH module. Serum-starved HEK293T cells transfected with EGFP-DH-PH-CAAX and co-transfected together or not with EGFP-P-Rex1-Cter and EGFP-PRKACA were used for GST-RacG15A pulldown (PD) assays to isolate the active fraction of the DH-PH-CAAX construct revealed by immunoblot against the EGFP tag. The graph represents the average fraction of active P-Rex1-DH-PH-CAAX construct obtained in three independent experiments. Statistical significance was analyzed by *t* test. \*, *p* < 0.05. A representative blot below the graph shows the fraction of active P-Rex1-DH-PH-CAAX, confirms the expression of transfected constructs in total cell lysates (TCL) and shows the recombinant GST-RacG15A used in the pulldown assays. *C*, PKA enhances the inhibitory effect of P-Rex1 C-terminal region over the DH-PH module as revealed by the fraction of active Rac detected in serum-starved HEK293T cells cotransfected with EGFP-DH-PH-CAAX and EGFP-P-Rex1-Cter together or not with EGFP-PRKACA. Rac activation was assessed by GST-PAK-N pulldown assays done in parallel with GST-RacG15A using the same constructs and lysates described in *B*. The graph represents the mean values of active Rac obtained in three independent experiments. Statistical significance was analyzed by *t* test. \*, *p* < 0.05. A representative blot showing the fraction of active Rac and that in total cell lysates is shown below the graph. *D*, hypothetical model showing the potential effect of P-Rex1 phosphorylation at Ser-436 by PKA on the interactions between the N- and C-terminal regions of P-Rex1 and with its upstream activators G $\beta\gamma$  and mTOR. Experiments addressing this model are shown in *E* and *F*. *E*, pull-down experiments assessing the effect of PKA on the interaction between P-Rex1 N- and C-terminal regions and with G $\beta\gamma$ , comparing the effect of wild type P-Rex1-DH-PDZ2 versus S436A non-phosphorylatable mutant. The presence of interacting proteins in the pull-down assays and their expression in total cell lysates of HEK293T cells transfected with the indicated constructs was detected by Western blot using anti-GFP, -GST, and -FLAG antibodies. *F*, pull-down experiments comparing the interaction between non-phosphorylatable and phosphomimetic P-Rex1-DH-PDZ2, mutated at Ser-436, with mTOR-prey expressed as a 3XFLAG-tagged protein (corresponds to the P-Rex1-interacting region within the C-terminal region of mTOR originally identified as a P-Rex1 interactor (20)). Results shown in *E* and *F* are representative of three independent experiments.

## PKA and P-Rex1 Interact and Are Reciprocally Regulated



**FIGURE 8. Working model to explain the reciprocal regulation between PKA and P-Rex1 during a chemotactic response.** P-Rex1 is an effector of G $\beta$  and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP<sub>3</sub>)-activated downstream of chemotactic G protein-coupled receptors (27, 28, 50). P-Rex1 activates Rac, and it is inactivated by PKA (41). In response to agonists such as SDF-1, P-Rex1 translocates to the plasma membrane to where it carries type I PKA, which interacts with P-Rex1 PDZ domains (preferentially PDZ1) via the CNB B domain of its regulatory subunit. Mechanistically, PKA promotes intramolecular inhibitory interactions within the N-terminal region occurring between DEP1, phosphorylated by PKA at Ser-476, and the DH-PH module. In addition, PKA enhances the inhibitory potential of P-Rex1-C-terminal region, putatively via an unidentified PKA-regulated kinase. Phosphorylated P-Rex1 is kept in this inactive conformation that maintains the DH-PH module inaccessible to Rac. Dephosphorylation of P-Rex1 at Ser(P)-1165 by protein phosphatase 1 $\alpha$  has been reported as a mechanism for activation of this RacGEF (38). Additional inhibitory and stimulatory phosphorylation sites on P-Rex1 by unidentified kinases have been described (48). PIP<sub>2</sub>, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate.

Our results confirm the previously reported ability of PKA to inhibit P-Rex1 signaling (41, 42). Furthermore, we extend these findings revealing a specific interaction of type I PKA CNB B preferentially with P-Rex1 PDZ1, the precise identification of the phosphorylation site located at Ser-436 at the first DEP domain of this GEF, and the mechanism of inhibition regulated by intramolecular interactions promoted by phosphorylation. Based on these findings and the influence of P-Rex1 on the localization of PKA, we propose a working model of P-Rex1 regulation by PKA (Fig. 8). Accordingly, P-Rex1 carries type I PKA as its own regulator. Thus, during a chemotactic response, the activity of P-Rex1 is fine-tuned by PKA, which accompanies the GEF when it goes to the membrane. Mechanistically, PKA attenuates P-Rex1 activity via two alternative inhibitory intramolecular interactions acting directly on the DH-PH module; one involving the phosphorylation of Ser-436 at DEP1 domain and the second the C-terminal region in which the action of PKA is likely indirect. According to our model, PKA switches the interactions between P-Rex1 N- and C-terminal regions, needed to keep the GEF sensitive to its activators (38, 42) toward inhibitory interactions within the N-terminal domains that depend on the phosphorylation of Ser-436. In summary, evidence shown here contributes to understanding how temporal regulation of P-Rex1 by PKA occurs. The fact that P-Rex1 is physically associated with PKA could partly explain how this GEF is tightly controlled during a chemotactic event, contrib-

uting to define a mechanism by which spatial organization of chemotactic signaling is achieved.

**Author Contributions**—L. C.-V. performed the two-hybrid screening and designed, performed, and analyzed most of the experiments in Figs. 1, 3C, 6G, and 7E. S. R. A.-G. designed, performed, and analyzed the experiments shown in Figs. 1, F and I, 3B (some repetitions), 4, 5C, and most of the experiments in Fig. 6 and Fig. 7, B, C, and F. R. D. C.-V. designed, performed, and analyzed the experiments shown in Figs. 1J, 2A, 3A, 3B (some repetitions), and 5A. A. C.-K. designed, performed, and analyzed the experiments shown in Figs. 3D, 5B, and 5D. J. G. H. B. designed, performed, and analyzed the experiments shown in Fig. 2B. S. F. and N. M. provided technical assistance and contributed with the overall design, execution, and analysis of the experiments shown in Fig. 3C and contributed to the analysis and interpretation of data. S. S. T. contributed with the overall design and analysis of the experiments shown in Fig. 2B and contributed to the analysis and interpretation of data and edited the final version of the manuscript. G. R.-C. provided technical assistance and contributed to design, analysis, and interpretation of data. J. V. P. conceived and coordinated the study and wrote the paper together with L. C.-V. and S. R. A.-G. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

**Acknowledgments**—Technical assistance provided by Estanislao Escobar Islas, Margarita Valadez, David Pérez, and Jaime Estrada Trejo is acknowledged.



## PKA and P-Rex1 Interact and Are Reciprocally Regulated

## References

- Goicoechea, S. M., Awadia, S., and García-Mata, R. (2014) I'm coming to GEF you: regulation of RhoGEFs during cell migration. *Cell Adh. Migr.* **8**, 535–549
- van Buul, J. D., Geerts, D., and Huveners, S. (2014) Rho GAPs and GEFs: controlling switches in endothelial cell adhesion. *Cell Adh. Migr.* **8**, 108–124
- Cook, D. R., Rossman, K. L., and Der, C. J. (2014) Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene* **33**, 4021–4035
- Meiri, D., Marshall, C. B., Greeve, M. A., Kim, B., Balan, M., Suarez, F., Bakal, C., Wu, C., Larose, J., Fine, N., Ikura, M., and Rottapel, R. (2012) Mechanistic insight into the microtubule and actin cytoskeleton coupling through dynein-dependent RhoGEF inhibition. *Mol. Cell* **45**, 642–655
- Meiri, D., Greeve, M. A., Brunet, A., Finan, D., Wells, C. D., LaRose, J., and Rottapel, R. (2009) Modulation of Rho guanine exchange factor Lfc activity by protein kinase A-mediated phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* **29**, 5963–5973
- Diviani, D., Soderling, J., and Scott, J. D. (2001) AKAP-Lbc anchors protein kinase A and nucleates  $G\alpha_{12}$ -selective Rho-mediated stress fiber formation. *J. Biol. Chem.* **276**, 44247–44257
- Diviani, D., Baisamy, L., and Appert-Collin, A. (2006) AKAP-Lbc: a molecular scaffold for the integration of cyclic AMP and Rho transduction pathways. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 603–610
- Smith, F. D., Langeberg, L. K., Cellurale, C., Pawson, T., Morrison, D. K., Davis, R. J., and Scott, J. D. (2010) AKAP-Lbc enhances cyclic AMP control of the ERK1/2 cascade. *Nat. Cell Biol.* **12**, 1242–1249
- Smith, F. D., Langeberg, L. K., and Scott, J. D. (2011) Plugging PKA into ERK scaffolds. *Cell Cycle* **10**, 731–732
- Rivard, R. L., Birger, M., Gaston, K. J., and Howe, A. K. (2009) AKAP-independent localization of type-II protein kinase A to dynamic actin microspikes. *Cell Motil. Cytoskeleton* **66**, 693–709
- Feng, H., Hu, B., Vuori, K., Sarkaria, J. N., Furnari, F. B., Cavenee, W. K., and Cheng, S. Y. (2014) EGFRvIII stimulates glioma growth and invasion through PKA-dependent serine phosphorylation of Dock180. *Oncogene* **33**, 2504–2512
- Takahashi, M., Dillon, T. J., Liu, C., Kariya, Y., Wang, Z., and Stork, P. J. (2013) Protein kinase A-dependent phosphorylation of Rap1 regulates its membrane localization and cell migration. *J. Biol. Chem.* **288**, 27712–27723
- Di Zazzo, E., Feola, A., Zuchegna, C., Romano, A., Donini, C. F., Bartolino, S., Costagliola, C., Frunzio, R., Laccetti, P., Di Domenico, M., and Porcellini, A. (2014) The p85 regulatory subunit of PI3K mediates cAMP-PKA and insulin biological effects on MCF-7 cell growth and motility. *ScientificWorldJournal* **2014**, 565839
- Zimmerman, N. P., Roy, I., Hauser, A. D., Wilson, J. M., Williams, C. L., and Dwinell, M. B. (2015) Cyclic AMP regulates the migration and invasion potential of human pancreatic cancer cells. *Mol. Carcinog.* **54**, 203–215
- Burdyga, A., Conant, A., Haynes, L., Zhang, J., Jalink, K., Sutton, R., Neoptolemos, J., Costello, E., and Tepikin, A. (2013) cAMP inhibits migration, ruffling, and paxillin accumulation in focal adhesions of pancreatic ductal adenocarcinoma cells: effects of PKA and EPAC. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 2664–2672
- Lu, Q., Tong, B., Luo, Y., Sha, L., Chou, G., Wang, Z., Xia, Y., and Dai, Y. (2013) Norisoboldine suppresses VEGF-induced endothelial cell migration via the cAMP-PKA-NF- $\kappa$ B/Notch1 pathway. *PLoS ONE* **8**, e81220
- Mizuno, R., Kamioka, Y., Kabashima, K., Imajo, M., Suniyama, K., Nakasho, E., Ito, T., Hamazaki, Y., Okuchi, Y., Sakai, Y., Kiyokawa, E., and Matsuda, M. (2014) *In vivo* imaging reveals PKA regulation of ERK activity during neutrophil recruitment to inflamed intestines. *J. Exp. Med.* **211**, 1123–1136
- Lee, J. W., Lee, J., and Moon, E. Y. (2014) HeLa human cervical cancer cell migration is inhibited by treatment with dibutyl- $\alpha$ -CAMP. *Anticancer Res.* **34**, 3447–3455
- O'Leary, A. P., Fox, J. M., and Pullar, C. E. (2015)  $\beta$ -Adrenoceptor activation reduces both dermal microvascular endothelial cell migration via a cAMP-dependent mechanism and wound angiogenesis. *J. Cell. Physiol.* **230**, 356–365
- Hernández-Negrete, I., Carretero-Ortega, J., Rosenfeldt, H., Hernández-García, R., Calderón-Salinas, J. V., Reyes-Cruz, G., Gutkind, J. S., and Vázquez-Prado, J. (2007) P-Rex1 links mammalian target of rapamycin signaling to Rac activation and cell migration. *J. Biol. Chem.* **282**, 23708–23715
- Kim, E. K., Yun, S. J., Ha, J. M., Kim, Y. W., Jin, I. H., Woo, D. H., Lee, H. S., Ha, H. K., and Bae, S. S. (2012) Synergistic induction of cancer cell migration regulated by  $G\beta\gamma$  and phosphatidylinositol 3-kinase. *Exp. Mol. Med.* **44**, 483–491
- Damoulakis, G., Gambardella, L., Rossman, K. L., Lawson, C. D., Anderson, K. E., Fukui, Y., Welch, H. C., Der, C. J., Stephens, L. R., and Hawkins, P. T. (2014) P-Rex1 directly activates RhoG to regulate GPCR-driven Rac signalling and actin polarity in neutrophils. *J. Cell Sci.* **127**, 2589–2600
- Ledezma-Sánchez, B. A., García-Regalado, A., Guzmán-Hernández, M. L., and Vázquez-Prado, J. (2010) Sphingosine-1-phosphate receptor S1P1 is regulated by direct interactions with P-Rex1, a Rac guanine nucleotide exchange factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 1647–1652
- Qin, J., Xie, Y., Wang, B., Hoshino, M., Wolff, D. W., Zhao, J., Scofield, M. A., Dowd, F. J., Lin, M. F., and Tu, Y. (2009) Up-regulation of PIP<sub>3</sub>-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex1) promotes prostate cancer metastasis. *Oncogene* **28**, 1853–1863
- Lindsay, C. R., Lawn, S., Campbell, A. D., Faller, W. J., Rambow, F., Mort, R. L., Timpson, P., Li, A., Cammareri, P., Ridgway, R. A., Morton, J. P., Doyle, B., Hegarty, S., Rafferty, M., Murphy, I. G., et al. (2011) P-Rex1 is required for efficient melanoblast migration and melanoma metastasis. *Nat. Commun.* **2**, 555
- Campbell, A. D., Lawn, S., McGarry, L. C., Welch, H. C., Ozanne, B. W., and Norman, J. C. (2013) P-Rex1 cooperates with PDGFR $\beta$  to drive cellular migration in 3D microenvironments. *PLoS ONE* **8**, e53982
- Carretero-Ortega, J., Walsh, C. T., Hernández-García, R., Reyes-Cruz, G., Brown, J. H., and Vázquez-Prado, J. (2010) Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex-1), a guanine nucleotide exchange factor for Rac, mediates angiogenic responses to stromal cell-derived factor-1/chemokine stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) linked to Rac activation, endothelial cell migration, and *in vitro* angiogenesis. *Mol. Pharmacol.* **77**, 435–442
- Welch, H. C., Coadwell, W. J., Ellison, C. D., Ferguson, G. J., Andrews, S. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hawkins, P. T., and Stephens, L. R. (2002) P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>- and  $G\beta\gamma$ -regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell* **108**, 809–821
- Hill, K., Krugmann, S., Andrews, S. R., Coadwell, W. J., Finan, P., Welch, H. C., Hawkins, P. T., and Stephens, L. R. (2005) Regulation of P-Rex1 by phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate and  $G\beta\gamma$  subunits. *J. Biol. Chem.* **280**, 4166–4173
- Mayeenuddin, L. H., McIntire, W. E., and Garrison, J. C. (2006) Differential sensitivity of P-Rex1 to isoforms of G protein  $\beta\gamma$  dimers. *J. Biol. Chem.* **281**, 1913–1920
- Hill, K., and Welch, H. C. (2006) Purification of P-Rex1 from neutrophils and nucleotide exchange assay. *Methods Enzymol.* **406**, 26–41
- Barber, M. A., Donald, S., Thelen, S., Anderson, K. E., Thelen, M., and Welch, H. C. (2007) Membrane translocation of P-Rex1 is mediated by G protein  $\beta\gamma$  subunits and phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **282**, 29967–29976
- Sosa, M. S., Lopez-Haber, C., Yang, C., Wang, H., Lemmon, M. A., Busillo, J. M., Luo, J., Benovic, J. L., Klein-Szanto, A., Yagi, H., Gutkind, J. S., Parsons, R. E., and Kazanietz, M. G. (2010) Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an essential mediator of ErbB signaling in breast cancer. *Mol. Cell* **40**, 877–892
- Kim, E. K., Yun, S. J., Ha, J. M., Kim, Y. W., Jin, I. H., Yun, J., Shin, H. K., Song, S. H., Kim, J. H., Lee, J. S., Kim, C. D., and Bae, S. S. (2011) Selective activation of Akt1 by mammalian target of rapamycin complex 2 regulates cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Oncogene* **30**, 2954–2963
- Yoshizawa, M., Kawauchi, T., Sone, M., Nishimura, Y. V., Terao, M., Chihama, K., Nabeshima, Y., and Hoshino, M. (2005) Involvement of a Rac activator, P-Rex1, in neurotrophin-derived signaling and neuronal migration. *J. Neurosci.* **25**, 4406–4419

## PKA and P-Rex1 Interact and Are Reciprocally Regulated

36. Waters, J. E., Astle, M. V., Ooms, L. M., Balamatsias, D., Gurung, R., and Mitchell, C. A. (2008) P-Rex1: a multidomain protein that regulates neurite differentiation. *J. Cell Sci.* **121**, 2892–2903
37. Bracho-Valdés, I., Moreno-Alvarez, P., Valencia-Martínez, I., Robles-Molina, E., Chávez-Vargas, L., and Vázquez-Prado, J. (2011) mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused. *IUBMB Life* **63**, 896–914
38. Barber, M. A., Hendrickx, A., Beullens, M., Ceulemans, H., Oxley, D., Thelen, S., Thelen, M., Bollen, M., and Welch, H. C. (2012) The guanine-nucleotide-exchange factor P-Rex1 is activated by protein phosphatase 1 $\alpha$ . *Biochem. J.* **443**, 173–183
39. Hernández-García, R., Iruela-Arispe, M. L., Reyes-Cruz, G., and Vázquez-Prado, J. (2015) Endothelial RhoGEFs: A systematic analysis of their expression profiles in VEGF-stimulated and tumor endothelial cells. *Vascul Pharmacol.* **74**, 60–72
40. Montero, J. C., Seoane, S., and Pandiella, A. (2013) Phosphorylation of P-Rex1 at serine 1169 participates in IGF-1R signaling in breast cancer cells. *Cell. Signal.* **25**, 2281–2289
41. Mayenuddin, L. H., and Garrison, J. C. (2006) Phosphorylation of P-Rex1 by the cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits the phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate and G $\beta\gamma$ -mediated regulation of its activity. *J. Biol. Chem.* **281**, 1921–1928
42. Urano, D., Nakata, A., Mizuno, N., Tago, K., and Itoh, H. (2008) Domain-domain interaction of P-Rex1 is essential for the activation and inhibition by G protein  $\beta\gamma$  subunits and PKA. *Cell. Signal.* **20**, 1545–1554
43. Vázquez-Prado, J., Basile, J., and Gutkind, J. S. (2004) Modular architecture and novel protein-protein interactions regulating the RGS-containing Rho guanine nucleotide exchange factors. *Methods Enzymol.* **390**, 259–285
44. Guilluy, C., Dubash, A. D., and García-Mata, R. (2011) Analysis of RhoA and Rho GEF activity in whole cells and the cell nucleus. *Nat. Protoc.* **6**, 2050–2060
45. Guzmán-Hernández, M. L., Vázquez-Macías, A., Carretero-Ortega, J., Hernández-García, R., García-Regalado, A., Hernández-Negrete, I., Reyes-Cruz, G., Gutkind, J. S., and Vázquez-Prado, J. (2009) Differential inhibitor of G $\beta\gamma$  signaling to AKT and ERK derived from phosphoinositide-3-kinase: effect on sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration and *in vitro* angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **284**, 18334–18346
46. Burns-Hamuro, L. L., Ma, Y., Kammerer, S., Reineke, U., Self, C., Cook, C., Olson, G. L., Cantor, C. R., Braun, A., and Taylor, S. S. (2003) Designing isoform-specific peptide disruptors of protein kinase A localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 4072–4077
47. García-Mata, R., Wennerberg, K., Arthur, W. T., Noren, N. K., Ellerbroek, S. M., and Burridge, K. (2006) Analysis of activated GAPs and GEFs in cell lysates. *Methods Enzymol.* **406**, 425–437
48. Montero, J. C., Seoane, S., Ocaña, A., and Pandiella, A. (2011) P-Rex1 participates in Neuregulin-ErbB signal transduction and its expression correlates with patient outcome in breast cancer. *Oncogene* **30**, 1059–1071
49. Lucato, C. M., Halls, M. L., Ooms, L. M., Liu, H. J., Mitchell, C. A., Whistock, J. C., and Ellisdon, A. M. (2015) The Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1/Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (P-Rex1/Rac1) complex reveals the basis of Rac1 activation in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **290**, 20827–20840
50. Welch, H. C. (2015) Regulation and function of P-Rex family Rac-GEFs. *Small GTPases* **6**, 49–70
51. Huang, L. J., Durick, K., Weiner, J. A., Chun, J., and Taylor, S. S. (1997) Identification of a novel protein kinase A anchoring protein that binds both type I and type II regulatory subunits. *J. Biol. Chem.* **272**, 8057–8064
52. Lissandron, V., and Zaccolo, M. (2006) Compartmentalized cAMP/PKA signalling regulates cardiac excitation-contraction coupling. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **27**, 399–403
53. Johnson, K. R., Nicodemus-Johnson, J., Carnegie, G. K., and Danziger, R. S. (2012) Molecular evolution of A-kinase anchoring protein (AKAP)-7: implications in comparative PKA compartmentalization. *BMCEvol Biol.* **12**, 125
54. Scott, J. D., Dessauer, C. W., and Taskén, K. (2013) Creating order from chaos: cellular regulation by kinase anchoring. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **53**, 187–210
55. Dessauer, C. W. (2009) Adenylyl cyclase: A-kinase anchoring protein complexes: the next dimension in cAMP signaling. *Mol. Pharmacol.* **76**, 935–941
56. Means, C. K., Lygren, B., Langeberg, L. K., Jain, A., Dixon, R. E., Vega, A. L., Gold, M. G., Petrosyan, S., Taylor, S. S., Murphy, A. N., Ha, T., Santana, L. F., Tasken, K., and Scott, J. D. (2011) An entirely specific type IA-kinase anchoring protein that can sequester two molecules of protein kinase A at mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, E1227–E1235
57. Kovanich, D., van der Heyden, M. A., Aye, T. T., van Veen, T. A., Heck, A. J., and Scholten, A. (2010) Sphingosine kinase interacting protein is an A-kinase anchoring protein specific for type I cAMP-dependent protein kinase. *Chembiochem* **11**, 963–971
58. Burgers, P. P., Ma, Y., Margarucci, L., Mackey, M., van der Heyden, M. A., Ellisman, M., Scholten, A., Taylor, S. S., and Heck, A. J. (2012) A small novel A-kinase anchoring protein (AKAP) that localizes specifically protein kinase A-regulatory subunit I (PKA-RI) to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **287**, 43789–43797
59. Tkachenko, E., Sabouri-Ghomi, M., Pertz, O., Kim, C., Gutierrez, E., Machacek, M., Groisman, A., Danuser, G., and Ginsberg, M. H. (2011) Protein kinase A governs a RhoA-RhoGDI protrusion-retraction pace-maker in migrating cells. *Nat. Cell Biol.* **13**, 660–667
60. Lim, C. J., Kain, K. H., Tkachenko, E., Goldfinger, L. E., Gutierrez, E., Allen, M. D., Groisman, A., Zhang, J., and Ginsberg, M. H. (2008) Integrin-mediated protein kinase A activation at the leading edge of migrating cells. *Mol. Biol. Cell* **19**, 4930–4941
61. Lim, C. J., Han, J., Yousefi, N., Ma, Y., Amieux, P. S., McKnight, G. S., Taylor, S. S., and Ginsberg, M. H. (2007)  $\alpha 4$  integrins are type I cAMP-dependent protein kinase-anchoring proteins. *Nat. Cell Biol.* **9**, 415–421
62. Stefan, E., Malleshaiah, M. K., Breton, B., Ear, P. H., Bachmann, V., Beyermann, M., Bouvier, M., and Michnick, S. W. (2011) PKA regulatory subunits mediate synergy among conserved G-protein-coupled receptor cascades. *Nat. Commun.* **2**, 598
63. Bachmann, V. A., Riml, A., Huber, R. G., Baillie, G. S., Liedl, K. R., Valovka, T., and Stefan, E. (2013) Reciprocal regulation of PKA and Rac signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 8531–8536

**Protein Kinase A (PKA) Type I Interacts with P-Rex1, a Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor: EFFECT ON PKA LOCALIZATION AND P-Rex1 SIGNALING**

Lydia Chávez-Vargas, Sendi Rafael Adame-García, Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana, Alejandro Castillo-Kauil, Jessica G. H. Bruystens, Shigetomo Fukuhara, Susan S. Taylor, Naoki Mochizuki, Guadalupe Reyes-Cruz and José Vázquez-Prado

*J. Biol. Chem.* 2016, 291:6182-6199.

doi: 10.1074/jbc.M115.712216 originally published online January 21, 2016

---

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M115.712216](https://doi.org/10.1074/jbc.M115.712216)

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 63 references, 24 of which can be accessed free at <http://www.jbc.org/content/291/12/6182.full.html#ref-list-1>



## 15.5 Artículo Original: cAMP-dependent activation of the Rac guanine exchange factor P-REX1 by type I protein kinase A (PKA) regulatory subunits

Coautoría, aceptado diciembre 2018: *Journal of Biological Chemistry*

### cAMP-dependent activation of the Rac guanine exchange factor P-REX1 by type I protein kinase A (PKA) regulatory subunits

Sendi Rafael Adame-García<sup>1</sup>, Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana<sup>2</sup>, Lennis Beatriz Orduña-Castillo<sup>1</sup>, Jason C. del Rio<sup>4</sup>, J. Silvio Gutkind<sup>3,4</sup>, Guadalupe Reyes-Cruz<sup>1</sup>, Susan S. Taylor<sup>4,5</sup> and José Vázquez-Prado<sup>2\*</sup>

Departments of <sup>1</sup>Cell Biology and <sup>2</sup>Pharmacology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), Mexico City, MEXICO.

<sup>3</sup>Moore's Cancer Center and Departments of <sup>4</sup>Pharmacology, <sup>5</sup>Chemistry and <sup>5</sup>Biochemistry, University of California San Diego, La Jolla, CA, USA

Running title: cAMP activates P-REX1 via type I PKA regulatory subunits

\*Address correspondence to: José Vázquez-Prado,  
Department of Pharmacology, CINVESTAV-IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508.  
Col. San Pedro Zacatenco, 07360. Mexico City, MEXICO.  
Tel: (52-55) 5747-3380; Fax: (52-55) 5747-3394; E-mail: [jvazquez@cinvestav.mx](mailto:jvazquez@cinvestav.mx)

**Keywords:** cAMP-dependent protein kinase (PKA), regulatory subunit alpha (RI $\alpha$ ), G-protein coupled receptor (GPCR), Rho guanine nucleotide exchange factor (RhoGEF), P-REX1, endothelial cells, cell migration, cell signaling, chemotaxis, wound healing.

#### Abstract

Regulatory subunits of protein kinase A (PKA) inhibit its kinase subunits. Intriguingly, their potential as cAMP-dependent signal transducers remains uncharacterized. We recently reported that type I PKA regulatory subunits (RI $\alpha$ ) interact with phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 1 (P-REX1), a chemotactic Rac guanine exchange factor (RacGEF). Since P-REX1 is known to be phosphorylated and inhibited by PKA, its interaction with RI $\alpha$  suggests that PKA regulatory and catalytic subunits may fine-tune P-REX1 activity or those of its target pools. Here, we tested whether RI $\alpha$  acts as a cAMP-dependent factor promoting P-REX1-mediated Rac activation and cell migration. We observed that Gs-coupled EP2 receptors indeed promote endothelial cell migration via RI $\alpha$ -activated P-REX1. Expression of the P-REX1-PDZ1 domain prevented RI $\alpha$ /P-REX1 interaction, P-REX1

activation, and EP2-dependent cell migration, and P-REX1 silencing abrogated RI $\alpha$ -dependent Rac activation. RI $\alpha$ -specific cAMP analogs activated P-REX1, but lost this activity in RI $\alpha$ -knockdown cells, and cAMP pulldown assays revealed that P-REX1 preferentially interacts with free RI $\alpha$ . Moreover, purified RI $\alpha$  directly activated P-REX1 in vitro. We also found that the RI $\alpha$  CNB-B domain is critical for the interaction with P-REX1, which was increased in RI $\alpha$  mutants, such as the acrodysostosis-associated mutant, that activate P-REX1 at basal cAMP levels. RI $\alpha$  and Ca PKA subunits targeted distinct P-REX1 molecules, indicated by an absence of phosphorylation in the active fraction of P-REX1. This was in contrast to the inactive fraction in which phosphorylated P-REX1 was present, suggesting co-existence of dual stimulatory and inhibitory effects. We conclude that PKA's regulatory subunits are cAMP-dependent signal transducers.





## 15.6 Artículo Original: Direct targeting of GNAQ and GNA11 oncogenes in cancer cells

Coautoría, respuesta en revisión: Science Signaling

### Direct targeting of GNAQ and GNA11 oncogenes in cancer cells

Suvi Annala<sup>1</sup>, Xiadong Feng<sup>2</sup>, Naveen Shridhar<sup>3</sup>, Funda Eryilmaz<sup>1</sup>, Julian Patt<sup>1</sup>, JuHee Yang<sup>4</sup>, Eva M. Pfeil<sup>1</sup>, Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana<sup>5</sup>, Asuka Inoue<sup>6</sup>, Tanja Slodczyk<sup>3</sup>, Raphael Reher<sup>7</sup>, Stefan Kehraus<sup>7</sup>, Stefania Monteleone<sup>8</sup>, Ramona Schrage<sup>1</sup>, Nina Heycke<sup>1</sup>, Ulrike Rick<sup>1</sup>, Sandra Engel<sup>9</sup>, Alexander Pfeifer<sup>4</sup>, Peter Kolb<sup>8</sup>, Gabriele König<sup>7</sup>, Moritz Bünemann<sup>9</sup>, Thomas Tüting<sup>3</sup>, José Vázquez-Prado<sup>5</sup>, Silvio Gutkind<sup>2</sup>, Evelyn Gaffal<sup>3\*</sup> & Evi Kostenis<sup>1\*</sup>

#### Affiliations:

<sup>1</sup>Molecular, Cellular and Pharmacobiology Section, Institute for Pharmaceutical Biology, University of Bonn, Nussallee 6, 53115 Bonn, Germany

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, UCSD, University of California San Diego, La Jolla San Diego, California 92093, USA

<sup>3</sup>Laboratory for Experimental Dermatology, University Hospital Magdeburg, Leipziger Straße 44, 39120 Magdeburg, Germany

<sup>4</sup>Institute of Pharmacology and Toxicology, University Hospital Bonn, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany

<sup>5</sup>Department of Pharmacology, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (Cinvestav-IPN), Apartado Postal 14-740, CDMX 07360, Mexico

<sup>6</sup>Graduate School of Pharmaceutical Science, Tohoku University, Sendai 980-8578, Japan

<sup>7</sup>Institute for Pharmaceutical Biology, University of Bonn, Nussallee 6, 53115 Bonn, Germany

<sup>8</sup>Pharmaceutical Chemistry, Philipps-University Marburg, Marbacher Weg 6, 35032 Marburg, Germany

<sup>9</sup>Institute of Pharmacology and Clinical Pharmacy, University of Marburg, 35043 Marburg, Germany

\*Corresponding senior authors. Send communication to [evelyn.gaffal@med.ovgu.de](mailto:evelyn.gaffal@med.ovgu.de) and [kostenis@uni-bonn.de](mailto:kostenis@uni-bonn.de)



## 16. Anexos

### 16.1 Primers utilizados para determinar la expresión de los RhoGEFs

#	NOMBRE	PESO (pb)	SECUENCIA
1	mFARP2	188	>mFARP2-fwRT-PCR-FW-1361-CDS CAATTGAAGGACAGCAGCA >mFARP2-revRT-PCR-REW-1549-CDS GAGGGAGAAGGCTGAGGACT
2	mFARP1	158	>mFARP1-fwRT-PCR-FW-448-CDS TTGGAACGAGGACAGAAACC >mFARP1-revRT-PCR-REW- 606-CDS CTCCACAAGGTTGAGGTGGT
3	mFGD6	207	>mFGD6-fwRT-PCR-FW-3954-CDS CCAAGCTTGCTCATCAAACA >mFGD6-revRT-PCR-REW-4161-CDS GGGGATTTTCTTCTGCTTCC
4	mFGD5	170	>mFGD5-fwRT-PCR-FW-2292-CDS GTGGACATGAGCAGCTTCAA >mFGD5-revRT-PCR-REW-2462-CDS TGAAGCACTGTCTCTCTCT
5	mFGD2	207	>mFGD2-fwRT-PCR-FW- 998-CDS CCAGAGAGCACTGGACATGA >mFGD2-revRT-PCR-REW-1205-CDS AACCAGGTAGCGTTCATTG
6	mFGD4	174	>mFGD4-fwRT-PCR-FW-379-CDS GAGTCTAATCCGGCCCTAC >mFGD4-revRT-PCR-REW--553-CDS AGGAGGTTAACCAGGCTGT
7	mFGD1	172	>mFGD1-fwRT-PCR-FW-1108-CDS TGTGATTGTTGCCTGGATA >mFGD1-revRT-PCR—REW-1280-CDS TAGGCACCTTCTCACCATTCC
8	mFGD3	218	>mFGD3-fwRT-PCR-FW-433CDS ATCCCAACAGAGACAGTGG >mFGD3-revRT-PCR- REW-651-CDS AGGCCTAAACAGGGTGACCT
9	mSOS1	158	>mSOS-1-fwRT-PCR-FW- 2235-CDS CTGCCCACTGCTGAAGTGTA >mSOS-1-revRT-PCR-REW 2393-CDS TGGATCTGCGTACATGTGGT
10	mSOS2	174	>mSOS2-fwRT-PCR-FW-3431-CDS TCAATGGCGTGTGGAGATA >mSOS2-revRT-PCR-REW-3605-CDS CAAGGCGGATTGATTGACTT
11	mRASGRF2	154	>mRASGRF2-fwRT-PCR-FW-600-CDS GGAGGAGGATCCAGACATCA >mRASGRF2-revRT-PCR-REW-754-CDS CCATCGTGAACAGAATCTGG
12	mRASGRF1	184	>mRASGRF1-fwRT-PCR-FW- 787-CDS TGATCGTATCCAATCCAGCA >mRASGRF1-revRT-PCR-REW- 971-CDS ACACCACCTGGTTCCTCTTG
13	mECTL	190	>mECT2L-RT-FW-2374-CDS CTGATTCCGACCCAAGATGT >mECT2L-RT-REW-2564-CDS GATGCGGTGAAGTGGTAGGT
14	mECT2	158	>mECT2-fwRT-PCR-FW-2126-CDS GGCACAAGGTTATTGGCACT >mECT2-revRT-PCR-REW-2284-CDS GCCTTACAAGCAAGGCAAAAG
15	mBCR	175	>mBCR-fwRT-PCR-FW-2691-CDS CCGAGTGGAGAGAAAGCATC >mBCR-revRT-PCR-REW-2866-CDS CAGGAAGCCGTAGAGTCCAG
16	mABR	157	>mActive BCR-related gene-fwRT-PCR-FW-1291-CDS GACCTCAGCAGGAAAGCATC >mActive BCR-related gene-revRT-PCR-REW-1448-CDS TGAGGGCAGAGATCTTCGTT
17	mARHGEF17	151	>mARHGEF17-fwRT-PCR-FW- 2710-CDS CAGTGACCCAGCTATGGAT >mARHGEF17-revRT-PCR-REW- 2861-CDS GCCAGCAATCTGTCTTCTC
18	mARHGEF10L	192	>mARHGEF10L-fwRT-PCR-FW- 3272-CDS ACTCTGGAGCACCTTCAGGA >mARHGEF10L-revRT-PCR-REW- 3464-CDS CATGCCTTTCCTGTGATCT
19	mARHGEF10	200	>mARHGEF10-fwRT-PCR-FW-2972-CDS TCACGCATCTGTGTATGGT >mARHGEF10-revRT-PCR-REW-3172-CDS CCGTGCATAGAAGTGCTGAA
20	mC9ORF100	204	>mVav like C9orf100-fwRT-PCR-FW-178-CDS CCTGAAAGCCAAAGGAACAC >mVav like C9orf100-revRT-PCR-REW- 382-CDS CGCCTGAAGGGTAGTCTGAG
21	mARHGEF16	247	>mARHGEF16-fwRT-PCR-FW-822-CDS CAGCTTCTCGTTGGATGACA >mARHGEF16-revRT-PCR-REW-1069-CDS CTTTGAAGAGCCCTTGTGC
22	mSGEF	153	>mSGEF-fwRT-PCR-FW-2433-CDS UniGene Mm.479530 TTTTCTCATTCTCCCCATGC >mSGEF-revRT-PCR-FW-2586-CDS TGCTCCTTCATTGCACAGTC
23	mARHGEF15	210	>mARHGEF15-fwRT-PCR-FW 2290-CDS CTGTTCCCGAGACACCATCT >mARHGEF15-revRT-PCR-REW- 2500-CDS CCTCCTCTCGTGTCTCTCTG
24	mNGEF	242	>mNGEF-fwRT-PCR-FW-1312-CDS TCGGTACCCATCATCTCACA >mNGEF-revRT-PCR-REW-1554-CDS CAGTGTTTGACCCTGGTCTCT

#	NOMBRE	PESO (pb)	SECUENCIA
25	mARHGEF19	162	>mARHGEF19-fwRT-PCR-FW-2033-CDS GATCCATTTTGAGGGCAAGA >mARHGEF19-revRT-PCR-REW- 2195-REW-CDS CAGCAGGCAGTCATTGAAGA
26	mARHGEF5	166	>mARHGEF5-fwRT-PCR-FW- 3687-CDS GGCTTTTCAAGACGTTGCTC >mARHGEF5-revRT-PCR-REW- 3853-CDS GAAGAGACCAGTGCCTTTCCG
27	mPLEKHG6	249	>mPLEKHG6-fwRT-PCR-FW-1285-CDS AGACACGAACCCACTGTTCC >mPLEKHG6-revRT-PCR-REW-1534-CDS CTCCTGCTCTTACCCCTGTGTC
28	mPLEKHG5	171	>mPLEKHG5-fwRT-PCR-FW- 512-CDS AATTGCACCTGAACGTGGAC >mPLEKHG5-revRT-PCR-REW-683-CDS CTGTAGGCCTCGAAGGTGAG
29	mITSN2	175	>mINTERSECTIN2-fwRT-PCR-FW-1514-CDS GCAGCTGGAGTTGGAGAAAC >mINTERSECTIN2-revRT-PCR-REW-1689-CDS CCCTGGTCTTCTGACTGAGC
30	mITSN1	211	>mINTERSECTIN1-fwRT-PCR-FW- 2557-CDS ATGGTGGATGAAAGCCAGAC >mINTERSECTIN1-revRT-PCR-REW-2768-CDS GGCTCAGAAGAGGCTCACTGG
31	mNET1	193	>mNET1-fwRT-PCR-FW-708-CDS GGGGAACAGGACTTGATTGA >mNET1-revRT-PCR-REW- 901-CDCS ATCTGCTCCACAGTCCCATC
32	mARHGEF3	218	>mARHGEF3-fwRT-PCR-FW-1001-CDS GAATCGGAATGCCGCTATTA >mARHGEF3-revRT-PCR-REW-1219-CDS GATGGGCTGTCGGTACAACCT
33	mARHGEF12 LARG	167	>mARHGEF12-fwRT-PCR-FW-2225-CDS ATCGGCTTCTTCCAAAGAT >mARHGEF12-rev2392-REW- CDS GGGTGGCGTGACTTCTGTAT
34	mARHGEF11 PDZ-RhoGEF	193	>mARHGEF11-fwRT-PCR-FW-4217-CDS CCAGCAGAACCCTCTGGACTC >mARHGEF11-revRT-PCR-REW-4410-CDS TGAAGCTTGACGGTCAGTTG
35	mARHGEF1 p115-RhoGEF	200	>mARHGEF1-fwRT-PCR-FW-816-CDS TCTTCCGGAAAAAGCTGATG >mARHGEF1-revRT-PCR-REW-1016-CDS TGTCCCGAGAAGCATACCC
36	mARHGEF2 GEF-H1	196	>mARHGEF2-fwRT-PCR-FW-1992-CDS CTAAAGGCTGGCTTCGTTG >mARHGEF2-revRT-PCR-REW-2188-CDS AGTCCAAGGGTAAGGCTGGT
37	mAKAP13	186	>mAKAP13-fwRT-PCR-FW-4774-CDS TCCCTGGATCGACATTCCTC >mAKAP13-revRT-PCR-REW- 4960-CDS TGCTGTCCATCTCCTCTCT
38	mARHGEF18 p114-RhoGEF	172	>mARHGEF18-fwRT-PCR-FW-2822-CDS GCAAGGATGAGAGTGCATCA >mARHGEF18-revRT-PCR-REW-2993-CDS GGGGAGACAGGTGGTAGTGA
39	mRGNEF	214	>mRGNEF-fwRT-PCR-FW-2608-CDS CCTTTTGCAGTAGGCAGGAG >mRGNEF-revRT-PCR-REW-2822-CDS GAAGAAGAAGTGCCCGGTGAG
40	mARHGEF37	180	>mARHGEF37-RT-FW-1180-cds GAATACCAGGCGCTCAACTC >mARHGEF37-RT-REW-1360-cds GCTCTGAGACGTGGTGATGA
41	mTUBA	171	>mTuba-fwRT-PCR-FW-2166-CDS GCTGTTGGAGGAAAAGCAAG >mTuba-revRT-PCR-REW-2337-CDS AGTGGACACAGACCCAAAGG
42	mVAV2	177	>mVAV2-fwRT-PCR- FW-2583-CDS GGAAAGCTTCAAGCAGTTGG >mVAV2-revRT-PCR-REW- 2759-CDS ACTGACCAGAAGGGAGCAGA
43	mVAV1	182	>mVAV1-fwRT-PCR-FW-1047-CDS CTACGGGATCTGCTGATGGT >mVAV1-revRT-PCR-REW- 1229-CDS CTGCCGTAGGGTTTCATTGT
44	mVAV3	221	>mVAV3-fwRT-PCR-FW-1712-CDS AGCCAACAACCCTACCACTG >mVAV3-revRT-PCR-REW- 1933-CDS GATGTCAACCGAGTGAAGGT
45	mARHGEF6	199	>mARHGEF6-fwRT-PCR-FW-2087-CDS GAGCCCCAAAACAATGAAGA >mARHGEF6-revRT-PCR-REW-2286-CDS CGGGGAGTAGAACTTGTGGA
46	mARHGEF7	246	>mARHGEF7-fwRT-PCR-FW-1167-CDS TATGACGGCCTTCAAAAACC >mARHGEF7-revRT-PCR-REW-1413CDS ACCACTCATCTGGGACTTG
47	mTIAM1	210	>mTIAM1-fwRT-PCR-FW-4510-CDS CTACCGAAGCTTTGCAGGTC >mTIAM1-revRT-PCR-FW-4720-CDS TCCGTTTTGAGGAGCTGTCT
48	mTIAM2	188	>mTIAM2-fwRT-PCR-FW-2926-CDS GTCTTCAGCTCCGAAAGGTG >mTIAM2-revRT-PCR-REW-3114-CDS GGTGTTTCGTCCCACTACT
49	mPREX2	239	>mPREX-2-fwRT-PCR-FW-1988-CDS GCACAAAGCCAAGAGAGACC >mPREX-2-revRT-PCR-REW-2227-CDS GCTTCATTGGCCGTTTGTAT
50	mPREX1	196	>mPREX-1-fwRT-PCR- FW-483-CDS GCACGAACTTGGGAATGTTT >mPREX-1-revRT-PCR- REW-679-CDS ACAGCAGGTAGCCTTCCAGA

#	NOMBRE	PESO (pb)	SECUENCIA
51	mARHGEF4	198	>mARHGEF4-fwRT-PCR-FW-756-CDS TGGAGCAGAAGTTCAACACG >mARHGEF4-revRT-PCR-REW-954-CDS TCAATCATCCTTTGCAGCAG
52	mARHGEF9	232	>mARHGEF9-fwRT-PCR-FW-1189-CDS TTGGCCGAGCTCCTAAAGTA >mARHGEF9-revRT-PCR-REW-1421CDS TGGTAGATCCAGGCCATCTC
53	mSPATA13	230	>mSPATA 13-fwRT-PCR-FW- 1766-CDS CTCAGCCACTGGGAAATGAT >mSPATA 13-revRT-PCR-REW- 1996-CDS CTGAACTGAGGGACAGCACACA
54	mPLEKHG1	246	>mPLEKHG1-fwRT-PCR-FW- 2561-CDS AGCCTCCAGTTCAGTGAGGA >mPLEKHG1-revRT-PCR-REW- 2807-CDS TCTCTGGTGCATCGTCTTTG
55	mPLEKHG2	216	>mPLEKHG2-fwRT-PCR-FW-1878-CDS CACCTACAAGGGCCACATCT >mPLEKHG2-revRT-PCR-REW-2094-CDS GAGAACTTGCTTTGCCTTGG
56	mPLEKHG4	160	>mPLEKHG4-fwRT-PCR-FW-354-CDS CCTGACACAGGGTGACAATG >mPLEKHG4-revRT-PCR-REW-514-CDS GACAGTCAGCAGGCTTAGGG
57	mPLEKHG3	211	>mPLEKHG3-fwRT-PCR- FW-3493-CDS ACTCCTGACCAAGAGGAGCA >mPLEKHG3-revRT-PCR-REW-3704-CDS CTTGGGCTAACAGCAGAAGG
58	mTRIO	207	>mTRIO-fwRT-PCR-FW-1041-CDS GCTGTACGGCTAGAGGAAC >mTRIO-revRT-PCR-FW-1248-CDS CGAGCCTGAGTTCTTTTTGG
59	mGEFT	167	>mGEFT-fwRT-PCR-FW-627-CDS GCAGAAGAAGATGGCTCTGG >mGEFT-revRT-PCR-REW-794-CDS CCAAACACAATCCTGTCACG
60	mKarlín	177	>mKALIRIN-fwRT-PCR-FW- 943-CDS GACAACACCTGCACCAAATG >mKALIRIN-revRT-PCR-REW-1120-CDS TGGAGGTCTAGTGCATGCTG
61	mMCF2L	165	>mMCF2l-fwRT-PCR-FW- 1160-CDS TGTCACTGGAAGGTCAGCAG >mMCF2l-revRT-PCR-REW- 1325-CDS GTCTCCAGGAGGCTATGCAG
62	mMCF2	223	>mMCF2-fwRT-PCR-FW-1940-CDS TGCCTTTTTCCAGGAATGTC >mMCF2-revRT-PCR-REW- 2163-CDS CCATTGATGGCAGTCTGATG

## 16.2 Primers utilizados para determinar la expresión de marcadores celulares

#	NOMBRE	PESO (pb)	SECUENCIA
1	TIE2	238	FW AAGCATGCCCATCTGGTTAC RW GTAGGTAGTGGCCACCCAGA
2	CD31 (PECAM-1)	245	FW TGCAGGAGTCCTTCTCCACT RW ACGGTTTGATTCCACTTTGC
3	Ang1	204	FW AGGCTTGGTTTCTCGTCAGA RW TCTGCACAGTCTCGAAATGG
4	VEGFR2	161	FW GGCGGTGGTGACAGTATCTT RW GTCAGTGCAGAGGCGATGA
5	VE-Caderina	239	FW ATTGAGACAGACCCCAAACG RW TTCTGGTTTTCTGGCAGCTT
6	CD133	196	FW GAAAAGTTGCTCTGCGAACC RW TCTCAAGCTGAAAAGCAGCA
7	CD34	216	FW ACCACAGACTTCCCAACTG RW CGGATTCCAGAGCATTGAT
8	Id1	159	FW CCAGTGGGTAGAGGGTTTGA RW AGAAATCCGAGAAGCACGAA
9	c-Kit	230	FW TTATCCTTTAGGCCGTGTGG RW TGTGGCCCCTTAAGTACCTG
10	CXCR4	220	FW TCAGTGGCTGACCTCCTTT RW TTTCAGCCAGCAGTTTCCTT
11	PDGFRb	510	FW AATTCCGTGCCGAGTGACAG RW ACGTAGCCATTCTCGATCACA
12	CD45	194	FW CCTGCTCCTCAAACCTCGAC RW GACACCTCTGTCGCCTTAGC
13	Actina	100	FW TCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGC RW TACTCCTGCTTGCTGATCCACATC



### 16.3 Premio Cinvestesis 180



  
 Dr. René Asomoza Palácio  
 Director General



#### El Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

otorga el

## Primer Lugar

a:

### Rodolfo Daniel Cervantes Villagrana

en el primer concurso

**Cinvestesis 180**

con la presentación del trabajo

Contrarrestar la complicitad de células de la médula ósea en el cáncer. una estrategia terapéutica posible

Celebrado el 3 y 4 de septiembre de 2014  
en el Auditorio Arturo Rosenblueth del Cinvestav

Por el Comité Organizador



M. en C. Daniela Reyes-Gasperini



IQI. Lillian Domínguez Montero

El Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

otorga el presente

## Reconocimiento

a:

Cervantes Villagrana Rodolfo Daniel

por su participación en el primer concurso  
**Cinvestesis 180**

con la presentación del trabajo

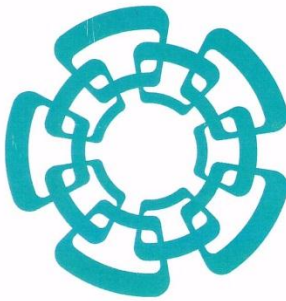
Contrarrestar la complicitad de células de la médula ósea  
en el cáncer, una estrategia terapéutica posible

Celebrado el 3 y 4 de septiembre de 2014  
en el Auditorio Arturo Rosenblueth del Cinvestav

Por el Comité Organizador



M. en C. Daniela Reyes-Gasperini      IQI. Lilian E. Domínguez Montero



**Cinvestav**



Dr. René Asomoza Palacio  
Director General

