



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE
TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DEL MARCADOR DE
ENDOTELIO TUMORAL 5 (TEM5/GPR124) EN EL
PROCESO ANGIOGÉNICO**

TESIS QUE PRESENTA

M. en C. MAGDA NOHEMÍ HERNÁNDEZ VÁSQUEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS EN LA
ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

DIRECTOR

Dr. JOSÉ VÁSQUEZ PRADO

Ciudad de México

Junio 2017

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el recurso económico brindado mediante la beca nacional de doctorado con CVU 389556 y beca mixta para la realización de una estancia en el extranjero. Asimismo, por los financiamientos registrados como 152434 (J.V.P.) y 240119 (G.R.C.) y al PNPC en el marco del "Programa de Fortalecimiento Académico del Posgrado de Alta Calidad". Adicionalmente, doy gracias por el apoyo otorgado por el gobierno de Tamaulipas a través del Instituto Tamaulipeco de Becas, Estímulos y Créditos Educativos (ITABEC). Gracias al CINVESTAV, a esta institución que me ha apoyado con recursos financieros para hacer una estancia en el extranjero y realizar de mi proyecto de doctorado. De igual manera, a la Unidad de Microscopía (LanSe) en el CINVESTAV y al apoyo dado por M. en C. Iván J. Galván para el uso del microscopio confocal.

Me gustaría agradecer sinceramente a mi asesor de tesis de doctorado, Dr. José Vázquez Prado, por brindarme la oportunidad de desarrollar el proyecto bajo tu dirección, la cual fue fructífera. Gracias por compartir tus consejos y tu visión, por transmitir tus conocimientos y tu motivación por la ciencia, por tu asesoría y por tu enseñanza para generar estrategias, y por tu paciencia para guiar; elementos que me orientaron durante el periodo del proyecto doctoral y que son herramientas que me ayudarán a construir una carrera digna como investigadora.

Gracias a la Dra. Guadalupe Reyes Cruz por apoyarme académicamente con aportaciones encaminadas a enriquecer al proyecto. Así también, por los recursos otorgados por su laboratorio que fueron destinados para la realización de este trabajo.

Agradezco a la Dra. María del Carmen García García, a la Dra. Claudia Pérez Cruz y al Dr. Luis Enrique Arias Romero, quienes formaron parte de mi comité tutorial, por su asesoría y sus sugerencias durante el desarrollo de la tesis doctoral.

Quiero expresar mi gratitud al Dr. Jean-François Côté por abrirme las puertas de su laboratorio para realizar una estancia en el Instituto de Investigaciones Clínicas de Montreal (IRCM). Así también, a los miembros que integran su grupo: Afnan, Arianne, Halil, Marie-Anne, Noumeira, Stephanie, Vilayphone, Viviane, quienes me apoyaron en todo momento y me brindaron su amistad.

Gracias a las personas que me apoyaron con algunos experimentos claves del proyecto: Sendi Adame (Figura 16), Noumeira Hamoud (Figura 32) y Rony Chidiac (Figura 17B); y por la asistencia técnica otorgada de Estanislao Escobar Islas, David Pérez Rangel, Margarita Valadez Sánchez, Jaime Estrada Trejo para la realización de este trabajo. Además, me gustaría agradecer a mis compañeros que actualmente están en el laboratorio 35 del departamento de Farmacología: Daniel, Sendi, Alejandro, Víctor e Irving por sus ideas aportadas para mejorar el proyecto y por los momentos memorables que pasamos dentro y fuera del laboratorio. Además, me gustaría agradecer a mis excompañeros: Israel, Lydia, Paola, Jorge, Ismael, Evelyn y Ricardo, quienes me ayudaron con sus consejos en la etapa inicial de mi proyecto de doctorado. Así también, a Tania, quien me ha brindado su amistad, y mis demás compañeros del laboratorio 19 del Departamento de Biología Celular por sus contribuciones al proyecto durante los seminarios presentados.

Agradezco a mis compañeras de generación Denisse y Miriam por su apoyo incondicional a nivel personal y profesional, son unas grandes amigas, las quiero mucho.

A mis padres, Benny y Nohemí, les doy las gracias infinitas por siempre estar ahí apoyándome en todo momento con sus consejos sabios, por darme ejemplo de perseverancia y tenacidad para cumplir mis sueños. ¡Los AMO mucho! A mis hermanos, Rubén y Karyme, gracias por su cariño absoluto y su apoyo moral en todo momento. Gracias a toda mi familia y amigos por sus gestos y palabras de apoyo hacia mi persona. Gracias a Dios por ser mi principal guía en mi vida y permitirme culminar satisfactoriamente esta etapa profesional.

“Bienaventurado el hombre que ha hallado sabiduría, dichoso el que adquiere la inteligencia” Proverbios 3:13

ÍNDICE

RESUMEN EN ESPAÑOL	1
RESUMEN EN INGLÉS	2
GLOSARIO	3
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	5
INTRODUCCIÓN	8
1. EL CÁNCER	8
1.1 LA ANGIOGENESIS	10
1.1.1 LA MIGRACIÓN CELULAR	16
1.1.1.1 Las GTPasas de la familia de Rho y GEFs en migración celular	17
1.1.2 LOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRs)	22
1.1.2.1 El Marcador de Endotelio Tumoral 5 (TEM5/GPR124/ADGRA2)	24
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS PARTICULARES	29
2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
2.1 GENERACIÓN DE DIFERENTES CONSTRUCCIONES	32
2.2 ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR	42
2.3 ACTIVACIÓN DE LAS GTPasas Rac1 y Cdc42	47
2.4 INMUNOFLUORESCENCIAS	50
2.5 ENSAYO DE POLARIDAD CELULAR	52

2.6 ENSAYOS DE PRECIPITACIÓN POR AFINIDAD	55
2.7 ENSAYO DE LIGACIÓN POR PROXIMIDAD (PLA) IN SITU	59
RESULTADOS	60
DISCUSIÓN	88
CONCLUSIONES	97
PERSPECTIVAS	98
REFERENCIAS	99

RESUMEN

La angiogénesis tumoral es un evento celular que contribuye a la diseminación de células cancerígenas a órganos distantes. En este contexto, las proteínas expresadas diferencialmente en el endotelio son consideradas potenciales blancos farmacológicos. En el año 2000, TEM5, un receptor huérfano acoplado a proteínas G de la familia de adhesión (ADGRs), fue identificado como un Marcador de Endotelio Tumoral (TEM) expresado en células endoteliales de cáncer colorrectal. Se ha descrito que TEM5 es vital para la estructura y función de la vasculatura cerebral en el desarrollo embrionario, sugiriendo su participación en el rearrreglo del citoesqueleto de actina para fortalecer las adhesiones.

Este proyecto se enfocó en caracterizar la transducción de señales del Marcador de Endotelio Tumoral 5 (TEM5/GPR124), recientemente nombrado ADGRA2, en procesos angiogénicos. Primeramente, encontramos que la expresión de TEM5 incrementó la adhesión celular, la formación de filopodios y la activación de las RhoGTPasas Cdc42 y Rac1. Los mecanismos de la adhesión promovida por TEM5 fueron vinculados a la interacción directa de este receptor con factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) pertenecientes a la familia de Dbl y de Dock: las Intersectinas y Elmo/Dock180, respectivamente; y que además, se asociaron entre sí a través de los dominios ITSN-SH3_{A-C-E} y la región Elmo-PxxP. Adicionalmente, TEM5 interaccionó con IQGAP, una proteína adaptadora que estabiliza el estado activo de Cdc42 y Rac1 así también con el heterodímero Gβ1γ2, que favoreció la interacción entre TEM5 y Elmo. Adicionalmente, las regiones mínimas de interacción de estos GEFs (ITSN, dominio SH3-D; Elmo, dominio ELM) con TEM5 abatieron el efecto de TEM5 en la adhesión, y no con el bloqueó de la proteína Gi. Además, demostramos que la expresión de TEM5 favoreció la fosforilación de Elmo, indicativo de su actividad. Finalmente, encontramos co-localización de TEM5 con Elmo e ITSN1 en protrusiones de células endoteliales sometidas a adhesión. Este novedoso mecanismo de integración de señales sugiere estar vinculado a los procesos angiogénicos dependientes de TEM5.

ABSTRACT

Tumor angiogenesis is an important cellular event that contributes to the spread of cancer cells to distant organs. In this context, proteins differentially expressed in the endothelium are considered pharmacological targets. In 2000, TEM5, an orphan adhesion G protein-coupled receptor (ADGRs), was identified as a Tumor Endothelial Marker (TEM) expressed in endothelial cells of colorectal cancer. TEM5 has been shown to play a vital role in the structure and function of the cerebral vasculature in embryonic development, suggesting its involvement in changes in the actin cytoskeleton for adhesions of the blood-brain barrier.

This project focused on the characterization of the signal transduction of the Tumor Endothelial Marker 5 (TEM5/GPR124), recently named ADGRA2, in angiogenic processes. Firstly, we determined that TEM5 expression increased cell adhesion, filopodia formation, and activation of RhoGTPases Cdc42 and Rac1. Subsequently, we investigated the molecular mechanisms by which TEM5 generated an efficient adhesion. Interestingly, we found that TEM5 associated guanine nucleotide exchange factors (GEFs) belonging to the Dbl family RhoGEFs and Dock: Intersectins and Elmo/Dock180, respectively; and also, they were associated with each other through ITSN-SH3A-C-E domains and Elmo-PxxP region. In addition, TEM5 interacted with IQGAP, a scaffold protein that stabilizes the active state of Cdc42 and Rac1 as well as the heterodimer G β 1 γ 2, that its expression favored the association between TEM5 and Elmo. The minimal interaction regions of these GEFs with TEM5 were mapped to ITSN domains SH3-D and Elmo the central region (ELM domain), and they abrogated the adhesion promoted by TEM5, but did not Pertussis toxin, which blocked the dissociation of the protein Gi. Furthermore, we determined that TEM5 induced Elmo phosphorylation, indicative of its activity. We found colocalization between TEM5, Elmo and Intersectin in endothelial cell protrusions during cell adhesion. This novel signal integration mechanism suggests to be linked to TEM5-dependent angiogenic processes.

GLOSARIO

ADGRs: Es una familia de adhesión de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) que contiene 33 miembros.

Adhesión celular: Es un proceso importante con el que cuentan las células para unirse a elementos extracelulares o a otras células. Este evento está vinculado a patologías como el cáncer.

Angiogénesis: Es un proceso fisiológico que consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los pre-existentes. Este evento participa durante el desarrollo embrionario, la reparación de heridas y en procesos patológicos como el cáncer, en cuyo caso se denomina angiogénesis tumoral.

Cáncer: Es un proceso de proliferación y diseminación descontrolado de células.

Cdc42: Es una GTPasa pequeña de 21 kDa que es miembro de las GTPasas de la familia de Rho. La activación de esta GTPasa promueve la formación de filopodios, promoviendo cambios dinámicos en la morfología celular que pueden contribuir a eventos de migración direccionada (orientación del aparato de Golgi).

Células endoteliales: Es un tipo de célula que recubre la zona interna (endotelio) de los vasos sanguíneos.

Citoesqueleto: Es una estructura dinámica de las células constituida por proteínas que polimerizan en estructuras filamentosas para proveer soporte interno de la célula.

Filopodio: Son extensiones citoplasmáticas delgadas en forma de dedo constituido de actina.

GTPasas: Son enzimas de tipo hidrolasa que catalizan la molécula guanosín trifosfato (GTP). También son conocidas como interruptores moleculares.

Intususcepción: Es un tipo de crecimiento vascular por el cual un nuevo vaso sanguíneo se forma por la división de un vaso existente en dos.

Lamelipodio: Son prolongaciones anchas de la membrana celular constituidas por microfilamentos de actina.

MAPK: La proteína cinasas activadas por mitógenos son enzimas serín treonín cinasas que modulan la expresión de genes relacionados principalmente a la proliferación.

Migración celular: Es un proceso fundamental que consiste en el desplazamiento coordinado de la célula.

Rac: Es una GTPasa de la familia de Rho que une guanosín trifosfato (GTP) para inducir cambios en el citoesqueleto, migración celular, entre otros eventos. Existen 3 isoformas de Rac.

Receptores: Son proteínas que se localizan principalmente en la membrana plasmática aunque se han encontrado alguna de ellas en el citosol o membrana nuclear. Su función es reconocer sustancias extracelulares o intracelulares, conocidas como ligandos. Tras el reconocimiento de su ligando, los receptores sufren cambios conformacionales e inician el proceso llamado transducción de señales.

VEGF: Es el factor de crecimiento endotelial vascular implicado principalmente en la angiogénesis y la permeabilidad vascular.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1. Etapas de intususcepción.
- Figura 2. Esquema de la angiogénesis tumoral.
- Figura 3. Esquema representativo de la activación de las GTPasas de la familia de Rho durante la migración celular.
- Figura 4. Estructura de IQGAP.
- Figura 5. Estructura de Intersectina (ITSN).
- Figura 6. Esquema de la estructura de Elmo.
- Figura 7. Estructura de TEM5.
- Figura 8. Fenotipo letal del silenciamiento del gen de TEM5 en ratones.
- Figura 9. Estrategia experimental para la caracterización de la transducción de señales de TEM5 (GPR124/ADGRA2) en el proceso de adhesión celular.
- Figura 10. Obtención de la construcción pCEFL 3xFlag TEM5 Δ Cter.
- Figura 11. Obtención de la construcción pCEFL GST TEM5 Cter.
- Figura 12. Obtención de ITSN-SH3_{A-E} en pCEFL GST y pCEFL 3xFlag.
- Figura 13. El receptor TEM5 promueve la adhesión celular.
- Figura 14. TEM5 induce la formación de filopodios.
- Figura 15. Perfil de expresión de TEM5 en la adhesión celular.
- Figura 16. TEM5 promueve la activación de las GTPasas Cdc42 y Rac1.
- Figura 17. TEM5 localiza en proyecciones de células adheridas y favorece la polaridad celular en células endoteliales.

- Figura 18. Modelo esquemático que muestra que TEM5 recluta Elmo vía G β γ e interacciones directas entre dichas proteínas.
- Figura 19. La inactivación de la cinasa PKA disminuye la fosforilación de CREB inducida por la expresión de TEM5.
- Figura 20. El C-terminal de TEM5 interactúa con las subunidades G β 1 γ 2.
- Figura 21. Elmo fosforilado localiza con TEM5 en las proyecciones celulares durante la adhesión de las células endoteliales.
- Figura 22. El carboxilo terminal de TEM5 interacciona con Elmo/Dock.
- Figura 23. Mapeo de la interacción entre TEM5 y Elmo.
- Figura 24. Esquema de la posible interacción entre TEM5 e ITSN.
- Figura 25. TEM5 interacciona con ITSN 1 y 2.
- Figura 26. TEM5 completo interactúa con los dominios ITSN 1/2 – SH3A-E en células HEK293T.
- Figura 27. TEM5 interactúa directamente con los cinco dominios SH3 de ITSN1.
- Figura 28. Elmo interactúa con ITSN durante la adhesión celular.
- Figura 29. Mapeo de la interacción entre Elmo e Intersectina1.
- Figura 30. La adhesión celular dependiente de TEM5 es inhibida por el módulo ITSN1-SH3A-E.
- Figura 31. Presencia de TEM5, G β γ , Elmo e ITSN1 en el complejo de adhesión aislado.
- Figura 32. Interacción endógena entre TEM5 y Elmo2, así como TEM5 e Intersectina1 en las células endoteliales.
- Figura 33. TEM5 endógeno se co-localiza con Elmo e ITSN en las protrusiones celulares de las células endoteliales adheridas.
- Figura 34. Interacción entre TEM5 e IQGAP1.

Figura 35. Modelo de señalización de TEM5 en el proceso de adhesión.

Tabla1. Lista de ligandos identificados para algunos AGDRs

Tabla 2. Lista de anticuerpos usados en este proyecto.

INTRODUCCIÓN

1. EL CÁNCER

El cáncer está entre las principales causas de muerte a nivel mundial. En el año 2012, hubo un registro de 8.2 millones de muertes debido a esta enfermedad en el mundo. Según datos de la OMS, se estima que los casos anuales de esta enfermedad incrementarán de 14 millones en el 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas (1). La Secretaria de Salud en México registra 160 mil casos nuevos de cáncer anualmente (2). Los cánceres que ocasionan una mayor mortalidad se citan a continuación en orden decreciente son: el cáncer pulmonar, hepático, gástrico, colorrectal, mamario y esofágico.

Las neoplasias malignas se caracterizan por un crecimiento descontrolado de las células de un individuo. Los factores de riesgo son diversos entre los que destacan son, el consumo de tabaco, el alcohol y el estrés (3). Además, existen factores genéticos que están implicados en el desarrollo y progresión del cáncer. En el año 2013, Vogelstein *et al.*, describieron 138 genes mutados e involucrados en el desarrollo de tumores (4). La mayoría de estos genes participan en las rutas de señalización de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), las Janus cinasas (JAK), NOTCH, y la vía de WNT- β -Catenina para la promoción de la oncogénesis, crecimiento y diferenciación celular (5,6).

Entre los tratamientos contra el cáncer destacan la cirugía acompañada de radioterapia, quimioterapia y, en algunos casos, trasplantes de médula ósea. Desafortunadamente, el tratamiento genera toxicidad y un alto índice de recidiva. Otro problema grave en el tratamiento contra el cáncer es la resistencia a fármacos. Existen seis características de la resistencia a fármacos anti-cancerígenos.

1- Modificación de los blancos farmacológicos. Este punto se refiere a la alteración física y funcional del sitio blanco tras la continua administración del medicamento. Algunos ejemplos en esta categoría son

los eventos relacionados con la regulación de expresión de genes a bajos niveles o promoción de mutaciones en respuesta a algunos fármacos inhibidores de los receptores de tirosina cinasa (7-9).

2- La expresión de transportadores de membrana dependiente de ATP (ABC). Estas proteínas están encargadas de sacar sustancias, entre ellas los fármacos, que se encuentran dentro de la célula para eliminar toxinas. Existen 49 transportadores ABC. La expresión de estos transportadores aumenta en condiciones cancerígenas afectando la concentración del fármaco y su función en el interior de la célula (10-12).

3- Expresión de proteínas involucradas en la depuración del fármaco. La actividad de la enzima glutatión S transferasa está incrementada en algunos cánceres y está relacionada a la resistencia a fármacos (7,13).

4- Reducción de la susceptibilidad celular a la apoptosis y muerte celular. Las células cancerosas generan mecanismos de evasión a la muerte celular. En consecuencia, las células tumorales resisten a los fármacos por medio de vías que involucran a las caspasas, necrosis y autofagia (14).

5- Reparación del daño del material genético. Existe evidencia que en el cáncer existen mutaciones en proteínas involucradas en la vía de reparación del ADN como es el caso de BRCA1/2 y PARP1. La nula expresión de PARP1 en células cancerosas provocan la muerte de estas (15,16). Además, la proteína supresora de tumores p53, también conocida como el guardián del genoma, se encuentra mutada en cáncer por lo que la apoptosis no es llevada a cabo en esas células cancerosas (17).

6- Proliferación sostenida. En cáncer, la proliferación celular se lleva a cabo principalmente por los ejes de cinasas PI3K/ATK/mTOR y Ras-Raf (18,19).

El microambiente tumoral es complejo y particular del tipo de cáncer. Estas condiciones hacen complicada la eficacia de los fármacos o combinaciones de éstos. Sin embargo, el entendimiento de los mecanismos celulares cruciales que

convergen en vías comunes para el desarrollo de tumores sólidos se convierte en estrategia terapéutica viable para combatir el cáncer.

1.1 LA ANGIOGÉNESIS

En la etapa embrionaria, el ensamble de la red vascular primaria es iniciado por la movilización de células endoteliales precursoras (angioblastos) provenientes del mesodermo para diferenciarse en células endoteliales y formar el vaso sanguíneo, a este evento se le denomina vasculogénesis (20).

Las células endoteliales son células especializadas que recubren el interior de un vaso sanguíneo cuyas funciones principales son: regular el flujo de nutrientes, transportar moléculas activas y glóbulos rojos. En el adulto, se estima que $1 - 6 \times 10^{13}$ células endoteliales cubren un área de hasta 7 m^2 con un peso aproximado de 1 kg (21). El endotelio cumple una función importante en el proceso angiogénesis, que consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la red vascular preexistente en favor a un gradiente de factores solubles. Dicho proceso participa tanto en el desarrollo embrionario como en la etapa adulta, por ejemplo, para la reparación de heridas y la restauración del endometrio.

En el proceso angiogénico existen dos tipos de angiogénesis: brotes angiogénicos y la intususpección.

A falta de oxígeno y nutrientes, el endotelio genera brotes angiogénicos para dar inicio a la formación de capilares y así satisfacer las necesidades metabólicas del entorno. Para que se lleve a cabo este proceso es importante que diversos eventos celulares ocurran de forma coordinada, tales como la degradación de la matriz extracelular, la proliferación de las células endoteliales, la migración orientada, la tubulogénesis, la fusión de capilares y la estabilización de pericitos (22).

En la brotación angiogénica pueden ser reconocidos dos tipos de células morfológicamente distintas que coordinan este evento llamadas célula líder y célula tallo.

Las células líderes se caracterizan por un fenotipo migratorio y polarizado gracias a la señalización activa de VEGF en conjunto con su co-receptor Neuropilina 1 (Nrp1), induciendo la formación de filopodios para censar el ambiente (23). Estas células expresan niveles altos del receptor tipo 2 para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-B), el ligando Delta (DLL4) para el receptor Notch1, y una actividad disminuida de la señalización de Notch (24-26). En la retina, la extensión de los filopodios, estructuras características de las células líderes, es variable llegando hasta una longitud $>100 \mu\text{m}$ y un grosor de aproximadamente de 100 nm (24).

Otra característica de las células líderes es la actividad metabólica alta. En este contexto, la expresión de la enzima 6-fosfofructo-2 cinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFB3), la cual genera fructosa-2,6-bisfosfato y actúa como un modulador positivo de la fosfofructocinasa-1 (PFK-1) en vía de la glucólisis, está ligada a la proliferación de células endoteliales, la migración y los brotes angiogénicos (27).

Por otro lado, las propiedades de las células tallo se basan en la tasa alta de proliferación para la formación del lumen. Estas células también tienen activa la vía de la glucólisis ya que necesitan proliferar y elongarse para la tubulogénesis (28).

Las células tallo tienen activa la señalización de Notch, la cual es importante para conservar sus características intrínsecas. La señalización del receptor Notch puede ser activada por sus ligandos Delta 4 (DLL4) o Jagged. Dicha señal es favorecida por la glicosiltransferasa Fringe que O-glicosila en los elementos repetidos EGF del dominio extracelular del receptor Notch. Una vez activado, este receptor sufre un corte en el dominio intracelular (NICD) por acción de la secretasa γ , una enzima perteneciente a la familia de proteasas ADAM. Dicho fragmento (NICD) se transloca al núcleo favoreciendo la expresión del receptor tipo 1 para el

factor de crecimiento endotelial (VEGFR1/Flt-1). La activación de Notch por DLL4 es mayor que Jagged1 y esto limita la formación de protrusiones mientras que Jagged1 tiene el efecto opuesto (29-31). De manera interesante, la delección de un alelo de DLL4 o la nula expresión de Notch1 favorecen que las células endoteliales adquieran fenotipo de células líderes (32,33).

El desplazamiento dirigido de las células endoteliales está a cargo de la señalización cruzada entre receptores como las semaforinas (Sema) que interactúan con los receptores Plexinas. La Sema3E regula la actividad de VEGF y la expresión alta de DLL4 para mantener el fenotipo de las células líderes y las células tallo (34). Por otro lado, Robo4, un receptor de proteínas SLITs expresado en endotelio y en vasculatura tumoral, reduce la angiogénesis tras inhibir la señalización de VEGF por su interacción con Unc5B, un receptor de netrina (35-37). Adicionalmente, el VEGF favorece la actividad transcripcional de HXL, el cual incrementa la expresión de Unc5B, sugiriendo una retroalimentación para controlar el fenotipo de células tallo (38). El receptor tirosina cinasa Ephrin-B2 controla la internalización y el tráfico de los receptores para VEGF (VEGFR2/VEGFR3) y es importante para la formación de filopodios y mantenimiento del fenotipo característico de las células líderes (39,40).

La maduración de los vasos sanguíneos recién formados se basa en el reclutamiento de los pericitos. El factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1) ayuda a la diferenciación a pericitos (41). Las células endoteliales secretan el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que es detectado por su receptor (PDGFR- β) en los pericitos promoviendo la migración de éstos. Además, la angiopoyetina 1 (Ang1) favorece el ensamble de pericitos alrededor de las células endoteliales (42). Las uniones adherentes entre los pericitos y las células endoteliales se fortalecen gracias a la participación de la esfingosina 1 fosfato (S1P) en pericitos promoviendo un aumento en la expresión de N-caderina. En las células tallo hay una disminución de la actividad de la angiopoyetina 2 y una comunicación cruzada negativa del receptor para esfingosina 1 fosfato hacia VEGFR2 permitiendo la estabilización de las VE-cadherinas (43,44).

En la intususcepción, por otro lado, la pared del vaso se extiende hacia el lumen causando que el vaso sanguíneo se divida en dos. Por consiguiente, se forma un tubo capilar de $> 2.5 \mu\text{m}$ de diámetro (45). Este proceso endotelial es rápido y requiere de la reorganización de las células endoteliales sin necesidad de proliferar. Este evento es importante en la etapa embrionaria y en las bifurcaciones de arterias y venas. El estrés mecánico puede iniciar la formación de estas estructuras en las regiones con alto flujo sanguíneo (Figura 1) (46,47).

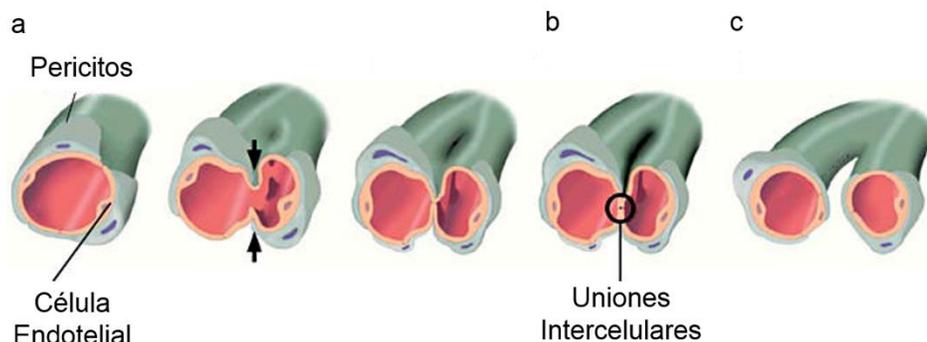


Figura 1. Etapas de intususcepción. El proceso llamado intususcepción incluye los siguientes pasos: a) La formación de un puente interendotelial, es decir, las paredes opuestas del capilar hacen contacto. b) Reorganización de las uniones intercelulares del endotelio para formar un orificio central. c) Formación de un tubo capilar intersticial envuelto por miofibroblastos y pericitos. Finalmente, existe un crecimiento del tubo capilar delgado a un tubo capilar $> 2.5 \mu\text{m}$ de diámetro. Modificado de Ward De Spielgelaere *et al.*, 2012.

En el cáncer, los tumores sólidos generan un ambiente hipóxico cuando las células tumorales están en la fase de proliferación por lo que necesitan de nutrientes que son obtenidos de la red vascular circundante en desarrollo. Para que el tumor pueda sobrevivir al microambiente carente de oxígeno es necesario iniciar los mecanismos de estabilización a través de la secreción del factor inducible de hipoxia (HIF-1 the hipoxia inducible factor) (13). El HIF-1 activa preferencialmente genes involucrados en la angiogénesis, metástasis e invasión tales como el factor de crecimiento de endotelio vascular A (VEGF-A) o el factor de crecimiento transformante (TGF α) en las células endoteliales llamadas falanges (*phalanx cells*,

en inglés). En cáncer, los niveles HIF-1 son altos y esto correlaciona con un pronóstico desfavorable de supervivencia (48). El VEGF-A, a través de activar a su receptor con actividad de tirosina cinasa (VEGR), modula los brotes angiogénicos para el crecimiento de nuevas células endoteliales dirigidas hacia el tumor.

En el microambiente tumoral, existe un desbalance entre los factores inhibitorios de la angiogénesis, anti-angiogénicos, y los que la promueven, pro-angiogénicos, siendo estos últimos los promotores de la angiogénesis tumoral. De tal manera que este evento celular es una etapa crucial para el crecimiento y desarrollo de la masa tumoral y por consiguiente, para la metástasis (Figura 2).

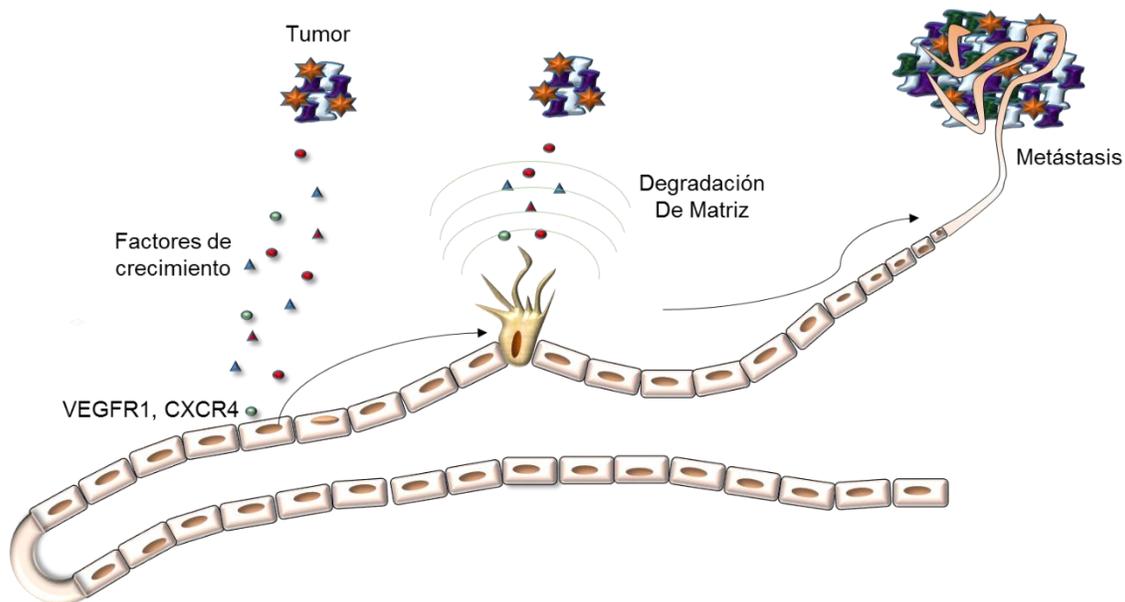


Figura 2. Esquema de la angiogénesis tumoral. Este proceso indispensable para el desarrollo del cáncer se basa en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los pre-existentes en respuesta a factores pro-angiogénicos secretados por las células tumorales dentro del microambiente hipóxico. En este evento se distinguen dos tipos de células endoteliales que participan en la migración dirigida hacia el tumor. Las células líderes están encargadas de guiar la formación de la nueva vasculatura mediante la comunicación con las células vecinas, llamadas células tallo. Dicha red vascular formada presenta huecos debido al revestimiento pobre en pericitos favoreciendo así la metástasis.

Por lo anterior, la angiogénesis es considerada como un proceso celular blanco de la terapia contra el cáncer. En la clínica se emplean fármacos anti-angiogénicos cuya farmacodinamia consiste en frenar la vía de señalización del VEGF para atenuar el crecimiento tumoral. El prototipo para la primera generación de este tipo de fármacos se basa en un anticuerpo monoclonal anti-VEGF llamado bevacizumab (Avastin), que es usado en combinación con quimioterapia contra el cáncer colorrectal, el cáncer de pulmón y el cáncer renal (49-51). La segunda generación de fármacos va dirigida al bloqueo de receptores con actividad tirosina cinasa como EGFR, VEGFRs y PDGFRs, entre los que destacan: erlotinib (Tarceva), sunitinib (Sutent), sorafenib (Nexavar), pazopanib (Votrient) y vandetanib. Algunos de ellos son empleados en el hepatocarcinoma (CHC), en el tumor pancreático y en el cáncer tiroideo (52-54).

En el año 2005, Gasparini *et al.*, describieron tres categorías de fármacos anti-angiogénicos de acuerdo al sitio blanco y mecanismo de acción (55).

1- Fármacos anti-angiogénicos directos. Éstos actúan directamente en células endoteliales interfiriendo con su función de proliferación, angiogénesis y migración. Algunos ejemplos son: angiostatina y endostatina.

2- Fármacos anti-angiogénicos indirectos. Su farmacodinamia estriba en la interferencia en la producción de factores angiogénicos o procesos extracelulares afectando las células tumorales, células del estroma y células del sistema inmunológico. Algunos ejemplos son: cetuximab y gefitinib.

3- Fármacos anti-angiogénicos mixtos. Estos agentes ejercen efectos múltiples entre ellos se encuentra SU11248 (Sunitinib) que suprime el crecimiento tumoral (56). Otro ejemplo es la terapia metronómica consiste en la administración continua de fármacos citotóxicos a dosis bajas con el fin de inhibir la proliferación de los vasos sanguíneos. Los pacientes tratados con la combinación de metotrexato y ciclofosfamida mostraron bajos niveles de VEGF (195 pg/ml) después de 6 meses (57).

Sin embargo, en etapas tardías de diversos cánceres, el bloqueo de VEGF no es suficiente para prevenir la progresión, la resistencia e incluso aumenta la invasión y metástasis (29,58-60). Varios estudios recientes han determinado que el VEGF-A favorece que las células tumorales adquieran un fenotipo más metastásico (61). Además, los agente inhibidores de la angiogénesis están asociados a mayor riesgo de hipertensión, isquemia cardíaca, trombosis arterial (62-64). Es por ello, la necesidad de encontrar nuevos blancos terapéuticos en esta etapa para arrestar el desarrollo tumoral.

La normalización de vasos sanguíneos ha sido postulada como un paso necesario para el éxito terapéutico ya que contribuye a una mejor distribución de los fármacos antioncogénicos. Esta premisa está basada en el hecho de que en el cáncer los vasos sanguíneos se caracterizan por ser tortuosos presentando fugas debido al revestimiento pobre de pericitos, lo que limita la efectividad de los fármacos. Recientemente, Mpekris F *et al.*, demostraron que la quimioterapia metronómica favorece la normalización de los vasos que rodean al tumor, incrementando los niveles de TSP-1 y la apoptosis en células endoteliales (65). Los mecanismos por los cuales ocurre la normalización de vasos sanguíneos aberrantes no están del todo descritos. Por ello, es importante conocer las bases moleculares implicadas en la formación de capilares, así como los eventos funcionales de adhesión y migración celular ligados a este proceso.

1.1.1 MIGRACIÓN CELULAR

La migración celular es un proceso esencial en la angiogénesis. Éste involucra la reorganización del citoesqueleto de actina en respuesta a un estímulo. La actina filamentosa (F) se forma a partir de la nucleación y polimerización de monómeros de actina (G) con ayuda de las proteínas forminas (mDia1/2) y el complejo Arp2/3 (66,67). Algunas proteínas que participan en el ensamble y desensamble de la actina son: .profilina, cofilina y timosina-β4.

Este proceso dinámico permite distinguir en el microfilamento polimerizado dos extremos con polaridad: el extremo barbado (+), donde ocurre la polimerización con monómeros de actina unidos a ATP y el opuesto, el extremo puntiagudo (-).

1.1.1.1 Las GTPasas de la familia de Rho y GEFs en la migración celular

Los cambios morfológicos durante la migración celular son atribuidos a la actividad de las GTPasas de la familia de Rho. Las GTPasas son conocidas como interruptores moleculares debido a que oscilan entre un estado activo, cuando incorporan guanósín trifosfato (GTP), y un estado inactivo, cuando tienen guanósín difosfato (GDP). Existen 20 genes que codifican para GTPasas de esta familia. Entre las más estudiadas están Rac1, Cdc42 y RhoA, cuya activación involucra la formación de lamelipodios, filopodios y fibras de estrés, respectivamente. Aunado a lo anterior, estas GTPasas también son responsables de la polaridad celular. El modelo clásico de señalización de las GTPasas durante el proceso migratorio describe a las GTPasas Rac1 y Cdc42 localizadas preferentemente en la parte del polo de avance, mientras que RhoA activa se ubicada en el polo de retracción favoreciendo el desplazamiento dirigido hacia el estímulo (68). Aunque el estímulo con PDGF induce una actividad mayor de Rac1 en las protrusiones, una actividad baja de RhoA es detectada en las protuberancias periféricas de la membrana plasmática (ruffles) de fibroblastos pero no en las protrusiones al frente de la célula. Por lo tanto la activación de estas GTPasas ocurre de manera regulada espacio-temporalmente durante el proceso de la migración celular (69,70).

El ciclo de activación de las GTPasas es modulado por los factores intercambiadores de nucleótido de guanina (GEFs), los cuales permiten el intercambio de GDP por GTP en la GTPasa favoreciendo el estado activo y el reconocimiento de los efectores de la GTPasa en cuestión. Por el contrario, las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) aumentan la actividad intrínseca de la GTPasa permitiendo la hidrólisis de GTP por GDP para su inactivación. Los

inhibidores de la disociación de guanina (RhoGDIs) actúan secuestrando y manteniendo a la GTPasa inactiva en el citosol (Figura 3) (71).

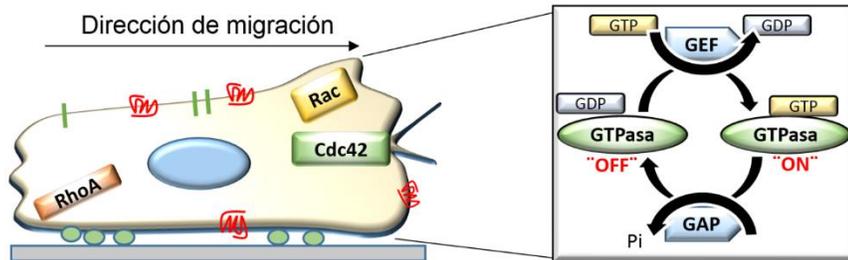


Figura 3. Esquema representativo de la activación de las GTPasa de la familia de Rho durante la migración celular. Las células migratorias tienen polaridad generando un polo de avance (parte delantera) y un polo de retracción (parte trasera). Las GTPasas de la familia de Rho son las encargadas de orquestar el movimiento direccionado debido a su activación espaciotemporal. Las GTPasas Rac y Cdc42 se encuentran en la parte frontal de la célula formando estructuras tipo lamelipodios y filopodios, respectivamente. Mientras que la GTPasa RhoA se localiza en la parte trasera de la célula generando fibras de estrés.

A diferencia del efecto en la actividad de las GTPasas que caracterizan a las proteínas reguladoras GAPs, las IQGAPs son proteínas multidominio de 190kDa que se unen a las GTPasas Cdc42 y Rac para inhibir la tasa intrínseca de hidrólisis de GTP y en consecuencia, estabilizan el estado activo de dichas RhoGTPasas (72-74). Este efecto sobre la actividad de las Rho-GTPasas contrario a lo esperado es debido a que el dominio relacionado a RasGAP (GRD) de las tres variantes de IQGAP carece de la arginina responsable para la actividad de GAP (Figura 4) (75).

La expresión de las IQGAPs no es tejido específico. En fibroblastos y otros tipos celulares, las proteínas IQGAPs se localizan en las protrusiones onduladas de la membrana así como en filopodios (76-78). Estas proteínas están involucradas en diversos procesos celulares como: la adhesión celular, la migración celular, en la adhesión célula-célula, la proliferación celular por activación de las cinasas MAP en

respuesta a EGF, en la promoción de la transcripción por interacción con β -catenina, en la exocitosis, en el proceso de metástasis (79-86).



Figura 4. Estructura de IQGAP. El amino terminal contiene un dominio de unión a calponina (CHD), el cual media uniones con actina y calponina. El dominio WW, llamado así por sus dos triptófanos funcionalmente conservados, provee de interacciones proteína-proteína tras la asociación con regiones de prolina como con la cinasa ERK2. Posteriormente se encuentran los 4 motivos IQ que conforman el dominio IQ. Este dominio une calmodulina así como la cadena ligera esencial de miosina (ELC). El dominio GRD (dominio relacionado a rasGAP) carece de la arginina responsable para la función de GAP, responsable de la estabilización de la actividad de las GTPasas Rac y Cdc42. Finalmente, IQGAP tiene RasGAP c, la cual es una secuencia importante para la unión a Beta-catenina y E-cadherina.

Por otra parte, los GEFs están clasificados en dos familias de acuerdo a su estructura: la familia convencional, DBL, y la familia atípica, DOCK "dedicator of cytokinesis". En términos generales, la familia DBL de GEFs comparte un dominio de homología a DBL (DH), el cual es el sitio catalítico de GEF y el dominio homólogo a pleckstrina (PH) para el anclaje a la membrana. En la mayor parte RhoGEFs de la familia Dbl, estos contienen otros dominios accesorios (87). La familia de Dock, contiene 11 miembros que posee dos dominios conservados: la región 1 de homología a Dock (DHR1), la cual favorece su localización en la membrana gracias a la unión con lípidos y la región 2 de homología a Dock (DHR2), la cual es el dominio catalítico de GEF (88). En este trabajo nos centramos en estudiar dos GEFs: Intersectina y el complejo Elmo/Dock, pertenecientes a la familia clásica y atípica, respectivamente.

Intersectina (ITSN) es un GEF específico para la GTPasa Cdc42. Esta proteína consta de 1270 aminoácidos y cuya estructura está conformada por dos dominios homólogos a Eps15 (EH), un dominio de hélice superenrollado (CC) y

cinco dominios SH3 que reconocen regiones ricas en prolina. En el genoma humano existen dos genes para ITSN, ITSN1 e ITSN2. Debido a un splicing en el transcrito de ITSN, se generan dos formas: la isoforma corta (ITSN-S) y la isoforma larga (ITSN-L). La ITSN-L posee además un dominio de homología a DBL (DH), un dominio de homología a Pleckstrina (PH) y un dominio C2 como se muestra en la figura 5 (89).

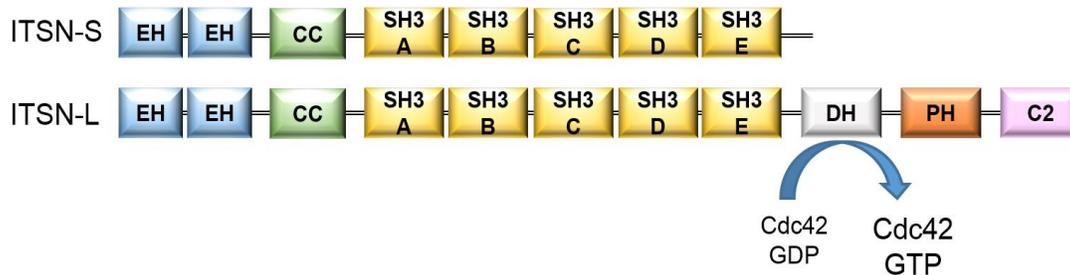


Figura 5. Estructura de Intersectina (ITSN). Las isoformas de ITSN comparten dos dominios homólogos a Eps15 (EH), un dominio de hélice superenrollado (CC) y cinco dominios de homología de Src tipo 3 (SH3) en tándem. Adicionalmente, la isoforma de ITSN-L tiene una extensión del carboxilo terminal que contiene el dominio catalítico de GEF (DH) para activar a Cdc42, el dominio pleckstrina (PH) y el dominio C2.

Las Intersectinas son proteínas de andamiaje que integran señales principalmente las involucradas en el tráfico vesicular debido a interacciones con proteínas relacionadas con la endocitosis como la dinamina y sinaptojanina (90-92). Las ITSNs integran señales de receptores para regular la reorganización del citoesqueleto de actina a través del reclutamiento de Cdc42 y la proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich (N-WASP) (93). Además, la ITSN asocia a la proteína de interacción con WASP (WIP) en las zonas de invadopodia de células de cáncer de mama (94). Wang *et al.*, demostraron que la sobreexpresión de ITSN en fibroblastos promueve una transformación oncogénica sugiriendo que esta proteína de andamiaje multi-dominio regula vías involucradas en la tumorigenesis incluyendo TRKs, Ras, PI3KC2 β (95-97). Aunque se ha descrito que las ITSNs tienen una participación amplia integrando señales de receptores con actividad de tirosin cinasa (RTKs) como el receptor para el factor de crecimiento epidermal (EGFR) o

el receptor 2 tipo B de Eph (EphB2) (98,99), también podrían tener una función relevante en la señalización de GPCRs, la cual fue explorada en este trabajo

Los GEFs pertenecientes a la familia de Dock son activadores de las GTPasas Rac y Cdc42. Estos GEFs se clasifican en 4 subgrupos; A, B, C y D (100). El subgrupo Dock-A está conformado por Dock1, también llamado Dock180, Dock 2 y Dock5; el subgrupo Dock-B contiene a Dock 3 y Dock 4. De manera interesante, estos dos subgrupos conservan un dominio SH3 en su amino terminal que asocia las tres variantes de Elmo, una proteína de motilidad celular, y una región rica en prolinas en el carboxilo terminal que une proteínas Crk (101). La estructura de Elmo se muestra en la figura 6. El subgrupo Dock-C, llamado también la familia Zir, contiene Dock6, Dock7 y Dock8. Por último, el subgrupo Dock-D, llamado también la familia Zizimin, incluye Dock9, Dock10 y Dock11. Los subgrupos Dock-A y Dock-B activan preferencialmente a Rac1, mientras que el subgrupo Dock-D tiene GEFs para Cdc42. El subgrupo Dock-C integra GEFs que pueden activar a ambas GTPasas, Rac1 y Cdc42 (102-107).

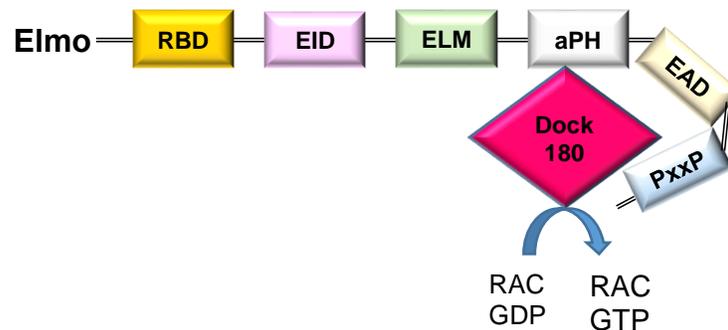


Figura 6. Esquema de la estructura de Elmo. Esta proteína de andamiaje contiene: un dominio de unión a Ras (RBD), un dominio inhibitorio de Elmo compuesto por un dominio Heat y cuatro repetidos armadillos (ARR), un dominio ELM conservado entre las variantes de Elmo, un región PH atípica (aPH), un dominio auto-inhibitorio de Elmo (EAD) y finalmente, una región rica en prolina (PxxP).

Las proteínas Elmo están reguladas por interacciones autoinhibitorias entre el dominio inhibitorio de Elmo (EID) y el dominio autoinhibitorio de Elmo (EAD) (108). Elmo forma un complejo con Dock para activar a la GTPasa Rac en el polo de

avance y así formar lamelipodios y promover la migración celular (109,110). En este contexto, Elmo es importante para la estabilización de las protrusiones debido a la interacción y el reclutamiento de una proteína de unión a microtúbulos llamada ACF7 en la periferia de fibroblastos (111). Estudios recientes han demostrado que la proteína Elmo3 participa en la proliferación, invasión, migración y la polimerización de actina en células de cáncer colorrectal (112). Además, Elmo1 integra señales provenientes de la activación del receptor CXCR4, un receptor acoplado a proteínas G (GPCR) quimiotáctico, mediante la interacción directa con las subunidades G $\beta\gamma$ a través de su amino-terminal para modular la migración en células HeLa (113). No obstante, la estimulación de células de cáncer de mama con el factor 1 derivado de estroma (SDF1) promueve el reclutamiento de Elmo2 a la membrana y promueve la asociación entre la proteína G α i2 y el amino-terminal de Elmo para inducir quimiotaxis e invasión (114). En el 2007, Park *et al.*, determinaron que un receptor GPCR de la familia de adhesión (ADGRs) llamado BAI1 favorece el proceso apoptótico mediante el eje de activación Elmo/Dock180/Rac1 (115). Asimismo, BAI3 recluta a este mismo complejo de GEF para la fusión de mioblastos (116). Estos datos sugieren que los GPCRs pueden llevar a la activación del complejo Elmo/Dock para regular eventos celulares en condiciones fisiológicas así como patológicas.

1.1.2 LOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRs)

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) son receptores con siete hélices transmembranales que transducen sus señales, principalmente, a través de la activación de las proteínas G heterotriméricas. Las proteínas G están constituidas por tres subunidades: alfa (α), beta (β) y gama (γ). Como consecuencia de los cambios conformacionales en el receptor activo, la proteína G α incorpora GTP provocando la disociación del dímero G $\beta\gamma$, que funciona como una unidad funcional para activar a sus efectores.

La superfamilia de GPCRs incluye alrededor de 800 receptores agrupados en cinco familias principales: glutamato (G), rodopsina (R), adhesión (A), frizzled/taste2 (F) y secretina (S) (117). La familia de receptores de adhesión (ADGR) cuenta con 33 miembros que contiene dominios relacionados con la adhesión célula-célula como dominios cadherina, regiones ricas en leucina (LRR), regiones tipo EGF (117-120). La mayoría de los receptores ADGR son huérfanos, es decir, no se ha identificado el ligando endógeno que unen (Tabla 1).

Tabla1. Lista de ligandos identificados para algunos AGDRs (121).

Familia/Receptor	Especie	Ligando	Referencia
Familia I (latrofilina)			
Latrofilina 1	Rata	Teneurina-2	(122)
		FLRT1,3	(123)
		Neurexin-1 α , -1 β , -2 β , -3 β	(124)
Latrofilina 2		FLRT3	(123)
Latrofilina 3		FLRT1, 3	
		Teneurina-3	
Familia II (EGF-TM7)			
CD97	Humano	CD55 (factor de aceleración	(125)
		decaimiento de complemento)	
		Sulfato de condroitina B	
		Integrina $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$	(126)
EMR2	Humano	CD90 (Thy-1)	(127)
			(128)
		Sulfato de condroitina B	(126)
Familia VII (BAIs)			
BAI1	Ratón	Fosfatidilserina	(115)
BAI3	Ratón	Proteínas tipo C1q	(129)
Familia VIII			
GPR56	Humano	Transglutaminasa tisular 2	(130)
		Colágeno III (α -1)	(131)
	Ratón	Colágeno III (α -1)	(132)

Recientemente, los AGDRs han sido asociados a varios procesos fundamentales como en el desarrollo embrionario, en el sistema inmunitario y la progresión tumoral (133). Sin embargo, los mecanismos de transducción de señales por los cuales estos ADGRs inducen eventos celulares no han sido explorados a detalle.

1.1.2.1 El Marcador de Endotelio Tumoral 5 (TEM5/GPR124/ADGRA2)

El marcador de endotelio tumoral 5 (TEM5/GPR124) es un GPCR huérfano, perteneciente a la familia de adhesión, que fue identificado como un transcrito sobreexpresado en el endotelio de cáncer colorrectal y clasificado dentro de un grupo llamado Marcadores de Endotelio Tumoral (TEMs) (134). El receptor TEM5, recientemente nombrado ADGRA2, es una proteína de 1338 aminoácidos con un amino terminal extenso conteniendo diferentes dominios (figura 7).

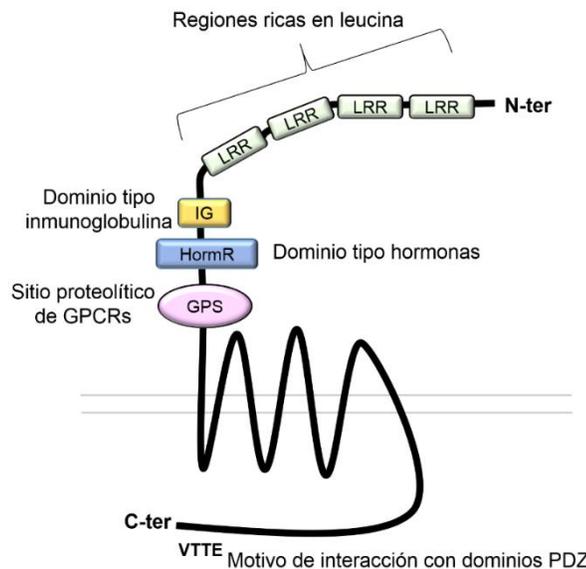


Figura 7. Estructura de TEM5. El receptor TEM5 contiene los siguientes dominios: cuatro repeticiones ricas en leucinas (LRRs), potencialmente involucradas en interacciones con otras proteínas, un dominio tipo inmunoglobulina (HormR) conservado en los receptores para hormonas como calcitonina, corticotropina, secretina, entre otras, y un sitio de corte proteolítico de GPCR (GPS) conservado en la familia de adhesión; el carboxilo terminal contiene un motivo (ETTV) de unión a dominios PDZ.

En el año 2010, grupos de investigación describieron la participación de TEM5 en el desarrollo embrionario como una proteína fundamental para la función de la vasculatura cerebral. Los ratones con el gen de TEM5 deletado exhiben hemorragias en el sistema nervioso central (SNC) originadas en la región ventral del tubo neural, el prosencéfalo y el telencéfalo causando la muerte del embrión en el día E15.5 del desarrollo. Además, los ratones presentan señales de hipoxia en el cerebro debidas a la pobre formación de capilares y encapsulamiento de éstos generando estructuras tipo glomeruloides como se muestra en la figura 8 (135-137). Dichos datos sugieren que TEM5 regula la permeabilidad del endotelio mediante las adhesiones celulares así como la migración de células endoteliales.

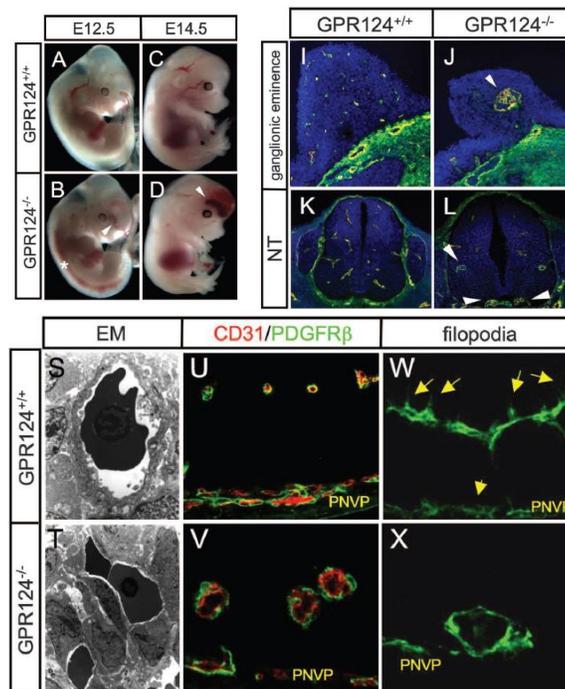


Figura 8. Muerte de ratones deficientes en TEM5. El panel superior izquierdo muestra las características de ratones que expresan o carecen de TEM5 (GPR124 +/+ y -/-, respectivamente). Las flechas en color blanco señalan las hemorragias existentes en esta condición. El panel superior derecho muestra la carencia de capilares y la formación tipo glomeruloides en condiciones de la delección del receptor. En el panel inferior, las flechas amarillas indican la presencia de filopodios en la condición control mientras que en la condición donde hay nula expresión de TEM5 no se observan estas proyecciones finas celulares. Tomado de Frank Kuhnert *et al.*, 2010.

De manera interesante, el silenciamiento de la expresión de Wnt7/ β -catenina presenta defectos en la angiogénesis del SNC y en la expresión del Glut1, un marcador de la función de la barrera hematoencefálica, similares a los encontrados en los ratones carentes de la expresión de TEM5, sugiriendo que estos dos sistemas de señalización de receptores están conectados entre sí para el desarrollo de la angiogénesis en el cerebro (138,139). Estudios recientes demostraron que TEM5 aumenta la señalización de Wnt7a/7b/ β Catenina clasificándolo como co-receptor de esta vía. El macro complejo conformado TEM5, Frizzled 4 (Fz4) y Lrp5/6 es importante para la angiogénesis del SNC en la zona ventral del cerebro (140,141) sugiriendo la existencia de algún mecanismo de interacción directa entre TEM5 y Fz4 o eventos de señalización cruzada por TEM5 hacia la vía de Wnt.

En el año 2014, Wang *et al.*, determinaron que células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVECs) carentes de la expresión de TEM5 co-inoculadas con MDA-MB-231 presentan un menor desarrollo de la masa tumoral y la formación de vasos sanguíneos circundantes al tumor. Asimismo, los eventos de angiogénesis *in vitro*, de invasión y migración celular promovidos por el factor VEGF son reducidos en células con nula expresión del receptor TEM5 (142). Aunque estos datos sugieren que TEM5 controla vías relacionadas a la tumorigénesis, los mecanismos por los cuales este receptor lleva a dichos procesos celulares permanecen sin explorar.

Adicionalmente, los GPCRs modulan procesos de migración celular mediante la activación de GEFs para las Rho-GTPasas en células endoteliales (143,144). En este contexto, el motivo ETTV en el carboxilo terminal de TEM5 interacciona con dominios PDZ de la proteína disco-grande (DLG) para favorecer la polaridad de células de *Drosophila* sugiriendo que de alguna manera este receptor modula la actividad las GTPasas de la familia de Rho para dicho proceso (145). La expresión de TEM5, en células HEK293T que normalmente no lo expresan de manera endógena, promueve la activación de la GTPasa Rac1 y la cinasa AKT, proteínas relevantes para el remodelaje del citoesqueleto de actina y la migración

celular. Adicionalmente, TEM5 fue identificado en las estructuras llamadas filopodios de células endoteliales microvasculares de cerebro humano (HBMEC). Estos datos sugieren que TEM5 promueve la actividad de Cdc42, principal GTPasa responsable de la formación de las proyecciones citoplasmáticas delgadas para censar el microambiente y así favorecer la migración dirigida. Células microvasculares del cerebro de ratón (bEND3) que sobreexpresan a TEM5 muestran una migración orientada en respuesta al medio condicionado de células de la corteza cerebral. En este contexto, la activación de la GTPasa Cdc42 es requerida para la migración promovida por TEM5 en respuesta al medio condicionado (135). Aunado a lo anterior, datos de nuestro laboratorio demuestran que TEM5 incrementa la actividad de las cinasas AKT y GSK3 β y disminuye la señalización de las MAPK de manera temporal en respuesta a medios condicionados de células de cáncer colorrectal (HT-29). Dicho estímulo relocaliza a TEM5 hacia las proyecciones celulares de células HeLa. Sin embargo, la información referente a la señalización detallada de este receptor en procesos celulares es pobre.

Considerando que el receptor TEM5 se encuentra sobreexpresado en el endotelio tumoral, por lo que resulta accesible a las señales extracelulares que pudieran activarlo para transducir su señalización, no sólo vía las proteínas G heterotriméricas si no también mediante interacciones establecidas con su carboxilo terminal, esto lo hace terapéuticamente atractivo para el diseño de fármacos. Por ello, nuestro interés de caracterizar a detalle los mecanismos de transducción de señales por los cuales TEM5 promueve eventos relacionados a la angiogénesis tumoral como la migración y adhesión celular.

JUSTIFICACIÓN

La angiogénesis tumoral es un proceso elemental para la progresión tumoral. No obstante, la administración de medicamentos anti-angiogénicos es insuficiente para erradicar tumores malignos debido a la resistencia farmacológica y que además, produce efectos secundarios graves relacionados con la función del corazón. Una vertiente para el desarrollo de nuevos fármacos es la caracterización de proteínas expresadas diferencialmente en el endotelio tumoral.

Aunado a lo anterior, el Marcador de Endotelio Tumoral 5 (TEM5/GPR124/ADGRA2), que fue identificado por primera vez en el endotelio del cáncer colorrectal, podría ser considerado como un potencial blanco terapéutico para el tratamiento contra el cáncer. Considerando que su expresión en etapas tempranas del desarrollo humano es esencial para la formación de la vasculatura cerebral, sugiriendo su participación en procesos de adhesión y migración endotelial, y que favorece el desarrollo tumoral en ratones, es de gran importancia entender y elucidar los mecanismos moleculares por los cuales TEM5 podría favorecer eventos vinculados a la angiogénesis tumoral como la adhesión y migración celular.

HIPÓTESIS

El receptor TEM5/GPR124 interviene en procesos celulares como migración y adhesión celular a través de la activación de GTPasas de la familia de Rho desencadenado la reorganización del citoesqueleto de actina.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los mecanismos de transducción de señales del Marcador de Endotelio Tumoral 5 (TEM5/GPR124) en eventos celulares como migración y adhesión celular vía la activación de GTPasas de la familia de Rho.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la participación de TEM5 en procesos celulares como migración y adhesión celular.
2. Investigar el papel de TEM5 en la dinámica del citoesqueleto de actina
3. Caracterizar los mecanismos moleculares por los cuales TEM5 regula la migración y adhesión celular a través de la activación de GTPasas de la familia de Rho.

1. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

A continuación se ilustra la estrategia experimental en el esquema de la figura 9.

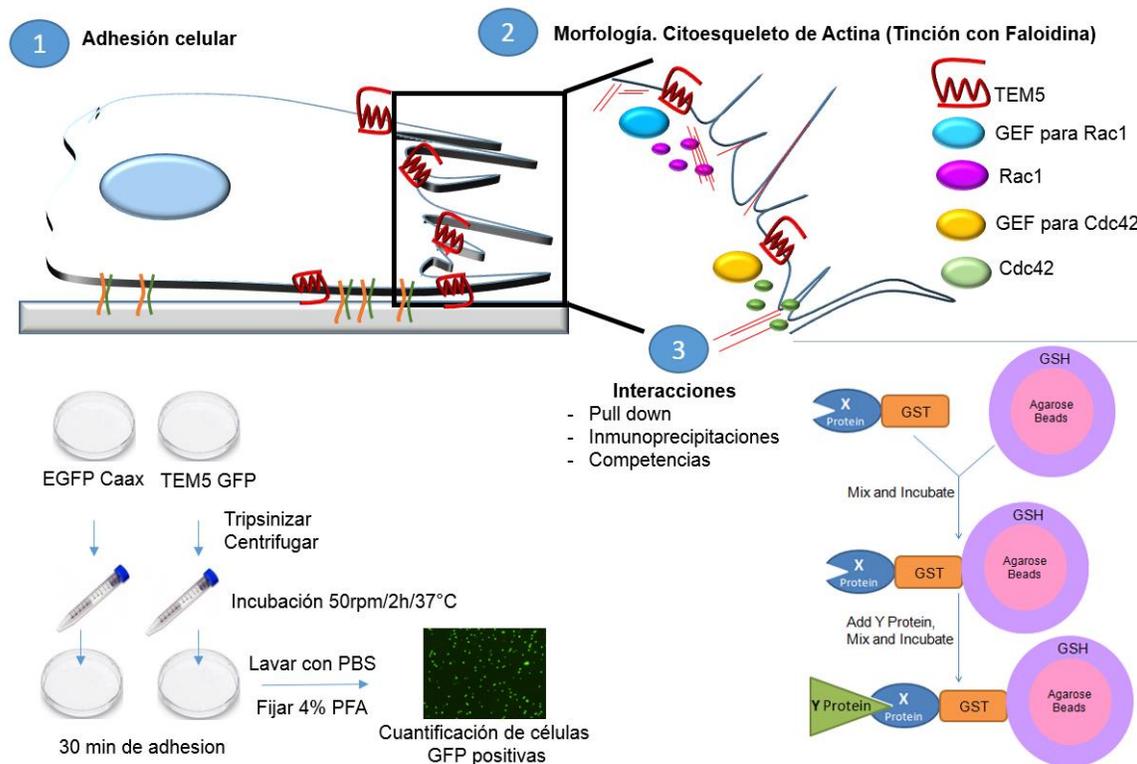


Figura 9. Estrategia experimental para la caracterización de la transducción de señales de TEM5 (GPR124/ADGRA2) en el proceso de adhesión celular y dinámica del citoesqueleto. 1) Para determinar la participación de TEM5 en la adhesión, las células COS-7 son transfectadas con el plásmido que codifica para este receptor fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP). Posteriormente, se realiza el ensayo de adhesión 48 horas post-transfección. Finalmente, se realiza el conteo de células fluorescentes fijadas y se compara con las células control, células COS-7 marcadas sólo con la proteína GFP. Cabe mencionar que las células COS7 no expresan el receptor endógeno. 2) Para la dinámica del citoesqueleto de actina promovida por TEM5, las células modelo son fijadas y teñidas con faloidina. 3) Para investigar posibles interacciones con TEM5, se utilizan técnicas de precipitación por afinidad (pull down) e inmunoprecipitaciones.

2.1 GENERACIÓN DE DIFERENTES CONSTRUCCIONES

A continuación se detalla la metodología para la obtención de pCEFL 3xFlag TEM5 ΔCter, TEM5 Cter en pCEFL GST y pCEFL 3xFlag. Así como los dominios SH3_{A-E} de Intersectina 1/2 en los vectores pCEFL GST y pCEFL 3XFlag.

A) AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE INTERÉS: TEM5 ΔCter, TEM5 Cter y los dominios SH3A-E de Intersectina 1/2

En este paso la región de interés es amplificada con la finalidad de obtener más fragmento de ADN de los mismos para introducirlos en los respectivos vectores.

Nombre	Primers
TEM5 ΔCter 2899pb	TEM5 5´HindIII ATAAAGCTTATGGGCGCCGGGGACGCAGG TEM5dCter3´EcoRI (C1083) ataGAATTCTTAGCAGGCGCGCCACGAGGCTCTCAC
TEM5 Cter 789pb	TEM5 Cter 5´BamHI (R1077) ataGGATCCAGAGCCTCGTGGCGCGCCTGC TEM5 CterNS 3´EcoRI ataGAATTCGACGGTAGTTTCGCTCTTCCAG
Dominios SH3 _{A-E} de Intersectina 1 1413pb	ITSN1L5´V743BamHI_1erSH3 AtaGGATCCGTGTATTACCGGGCACTGTACC ITSN1L3´T1213EcoR1_5oSH3 ataGAATTCTGTGGTCAGCTTCACATAATTGG
Dominios SH3 _{A-E} de Intersectina 2 1278pb	ITSN2L 5´V760 BamHI 1erSH3 AtaGGATCCGTGAATTATAGAGCATTATACC ITSN2L 3´T1185 EcoR1_5oSH3 ataGAATTCTGTCGTCATCTTAACGTAGTTTGAAGG

Condiciones para la PCR

Agregar en el siguiente orden:

1) H ₂ O	37 µl
2) dNTPs (10 mM)	1.0 µl
3) Betaína (5M)	2.5 µl
4) Primer 5´XhoI (10µM)	0.5 µl
5) Primer 3´EcoRI (10µM)	0.5 µl
6) Templado de interés (λ0.1)	0.5 µl
7) DMSO	2.5 µl
8) Buffer de la enzima Expand High Fidelity	5.0 µl
9) Enzima High Fidelity	<u>0.5 µl</u>

Volumen total 50.0 µl

Una vez preparada la solución en los tubos eppendorf perfectamente identificados, se prende el termociclador GeneAmp PCR System 9000, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura adecuada, y se escogen cuatro programas enlazados del software. Primeramente, se programa el No. 5, el cual tiene una temperatura de 94° C por 30 seg. Después se añade el programa No. 140, el cual contiene tres temperaturas de 94° C por 30 seg., 54° C por 30 seg. y 72° C por 1 min. Posteriormente se agrega el programa No. 139 que contiene una temperatura de 72° C por 10 min. y en seguida se adiciona el programa No. 4 que conserva los tubos de reacción añadidos en el termociclador a 4° C. Finalmente, en el termociclador se coloca la cantidad de volumen final (50 µl) y el No. de ciclos (30) de la reacción.

B) ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

La amplificación de TEM5 Δ Cter, del carboxilo terminal de TEM5 y los dominios SH3 de ITSN 1 y 2 se detectan mediante electroforesis. Por tanto, se requiere determinar el tamaño y la concentración del gel de agarosa.

1. La dureza del gel es de 1% de agarosa en Buffer TAE 1X (40mM Tris, 20Mm Acetato y 2Mm EDTA).
2. Pesar la cantidad de agarosa requerida para la electroforesis y disolver en el Buffer TAE 1X con ayuda del microondas (evitar que hierva, sólo unos segundos).
3. Dejar que la solución se enfríe (hasta que deje de eliminar vapor) para agregar el bromuro de etidio (2 μ l por cada 50 ml de solución de agarosa). Posteriormente se vacía en el molde y se deja solidificar con el peine correspondiente.
4. Una vez montada la cámara de electroforesis y solidificado el gel retirar el peine con cuidado y agregar el buffer TAE 1X, que cubra los pozos.
5. Colocar las muestras en los pozos respectivos (8-10 μ l), evitando perforar el fondo del pozo con la punta de la pipeta. Combinar la cantidad de muestra con el buffer de carga Clear Band de MTR Scientific (una parte de buffer 6X por 5 de muestra).
6. Agregar el marcador de número de pares de bases (de Invitrogen) en el primer pozo (3 μ l).
7. Colocar la tapa de la cámara de electroforesis, checando que el cable de la parte superior (donde están los pozos) sea de color negro y el otro extremo rojo. Correr el gel a 70 mA constantes por 20 min.
8. Detener la corriente generada de la fuente de poder y observar el gel en el transiluminador y tomar foto del fragmento en el peso esperado en pares de bases.

C) PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR

La purificación de los fragmentos de ADN obtenidos por PCR se hace mediante el kit QIAquick PCR Purification Kit Protocols QIAQUICK® Spin HandBook con número de catálogo 28104, con el cual se extrae el ADN del gel de agarosa y es útil para fragmentos comprendidos entre 100pb y 10Kb.

1. Cortar la banda del fragmento de ADN de interés en el gel, previamente identificado en el transiluminador. Se utiliza guantes y una navaja sólo utilizada para cortar geles con bromuro de etidio. Una vez cortado el fragmento de gel se procede a colocar en un tubo de polipropileno previamente pesado.
2. Pesar la cantidad de gel recolectado.
3. El gel obtenido es procesado de acuerdo al kit de QIAquick anteriormente mencionado.
4. Primeramente el gel de agarosa se disuelve con 5 volúmenes del Buffer PBI por cada volumen de gel. El buffer PBI permanece de color amarillo y el gel se disuelve en menos de 10min. a 50° C.
5. Para obtener el ADN, colocar la muestra a la columna en tubo de 2ml y centrifugar a 13 000 rpm por 30-60 s.
6. Descartar el sobrenadante y colocar la columna de vuelta al mismo tubo.
7. Para lavar, agregar 0.75ml de Buffer PE a la columna QIAquick con la muestra y centrifugar a 13 000 rpm por 30-60 s.
8. Descartar el sobrenadante y colocar la columna de vuelta al mismo tubo y centrifugar la columna a 13 000 rpm por 1min.
9. Colocar la columna QIAquick con la muestra en un tubo de 1.5ml.
10. Para eluir el ADN, se agrega 40µl de H₂O grado biología molecular en el centro de la columna, dejar que la columna se humedezca por 2min. y centrifugar a 13 000 rpm por 1 min.

11. Para verificar la purificación, correr un gel diagnóstico al 1% de agarosa con bromuro de etidio y agregando 8-10 μl de muestra.

D) DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

El proceso de digestión con enzimas de restricción permite cortar el ADN en regiones específicas, liberando el fragmento de ADN que contiene el inserto de interés.

1. Seleccionar las enzimas de restricción (indicadas en la tabla de primers).
2. Determinar el buffer de digestión que se utilizará en la reacción, ambas enzimas deben coincidir con el empleo del mismo buffer.
3. Para la digestión el volumen final es de 20 μl y homogenizar.
4. Dejar la digestión en la incubadora a 37° C por 12h.

Componente de la digestión	
Buffer H 10x	2 μl
H ₂ O	1 μl
ADN de interés	16 μl
BamHI o HindIII	0.5 μl
EcoRI	0.5 μl
Volumen total	20.0 μl

Los fragmentos de interés son digeridos y se identifican mediante electroforesis por gel al 1% de agarosa, anteriormente descrito en el procedimiento de electroforesis.

E) PURIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DIGERIDOS

La purificación del fragmento digerido con las enzimas respectivas se realiza mediante QIAquick Gel Extraction Kit Protocol QIAQUICK® Spin HandBook con número de catálogo 28104. Este protocolo es diseñado para la extracción de ADN de 70pb a 10kb.

1. Cortar la banda del fragmento de ADN de interés en el gel, previamente identificado en el transiluminador. Se utiliza guantes y una navaja sólo utilizada para cortar el gel con bromuro de etidio. Una vez cortado el fragmento de gel se procede a colocar en un tubo de polipropileno previamente pesado.
2. Pesar la cantidad de gel recolectado.
3. Agregar 3 volúmenes de Buffer QG (color amarillo) por cada volumen de gel.
4. Incubar la muestra con dicho Buffer a 50° C por 10 min. Para ayudar a disolver el gel se puede agitar vigorosamente en el vórtex cada 2min. durante la incubación.
5. Agregar al gel disuelto un volumen de isopropanol a la muestra y mezclar.
6. Colocar la columna QIAquick en un tubo de 2ml.
7. Colocar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar por 1 min.
8. Descartar el sobrenadante y colocar la columna QIAquick (donde está el DNA retenido) de nuevo en el tubo.
9. Para lavar el ADN, agregar 0.75ml de Buffer PE a la columna QIAquick y centrifugar 1 min.
10. Descartar el sobrenadante y centrifugar la columna QIAquick por un 1 min. a 13 000 rpm.
11. Pasar la columna QIAquick a un tubo 1.5ml.
12. Eluir el ADN en 25 µl de H₂O grado biología molecular y centrifugar a 13 000 rpm por 1 min.

Los fragmentos son digeridos, purificados y se identifican mediante electroforesis por gel al 2% de agarosa con 5 µl de muestra de ADN, anteriormente descrito el procedimiento de electroforesis.

F) LIGACIÓN

Los fragmentos de interés cortados con las enzimas de restricción respectivas pueden unirse a otro fragmento, en este caso con un vector que ha sido digerido con las mismas enzimas por lo que contiene extremos complementarios. La ligación se hace con la enzima ADN ligasa (T4 de Roche).

La proporción del fragmento (inserto) que se introduce en el vector correspondiente es mayor, aproximadamente 20:1. Esto depende de la observación de la concentración de ADN en la purificación de los productos de PCR digeridos y del vector digerido y purificado. La reacción de ligación se prepara en frío y se emplean tubos de polipropileno para PCR, puesto que los tubos se colocan en un termociclador.

Componentes de la ligación	
H ₂ O (µl)	9.5
Vector (µl)	0.5
Inserto (µl)	7.5
Buffer para ADN ligasa (µl)	2.0
Enzima Ligasa (µl)	0.5
Volumen total (µl)	20

Una vez preparada la reacción, se prende el termociclador GeneAmp PCR System 9000 y se escoge el programa 1, donde la temperatura se mantiene a 16° C por 12h.

G) TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS DH5 α

El resultado de la ligación se introduce en bacterias altamente competentes con la finalidad de producir mayor cantidad de ADN y evaluar la inserción de los fragmentos de interés en el vector correspondiente. Las bacterias de *E. coli* DH5 α (preparadas en el laboratorio por el método del cloruro de rubidio) tienen una concentración de 10⁹ ufc/ μ g (unidades formadoras de colonia por μ g).

1. Descongelar las bacterias altamente competentes en hielo por 10 min, regularmente se encuentran almacenadas a -198° C.
2. En un tubo de polipropileno, identificado para cada ligación, se agregan 50 μ l de bacterias altamente competentes recién descongeladas.
3. Agregar 5 μ l de la solución de la ligación al tubo con bacterias (50 μ l) e incubar en hielo por un periodo de 20 a 30 min.
4. Realizar un choque térmico de 1min. a 42° C.
5. Inmediatamente terminado el tiempo del choque térmico incubar los tubos durante 10 min. en hielo.
6. Agregar a los tubos 300 μ l de medio S.O.C. (medio LB + glucosa).
7. Incubar los tubos en agitación constante (180-200 rpm) durante 1 hora a 37° C.
8. Centrifugar los tubos a 6 000 rpm por 1min. para concentrar las bacterias.
9. Desechar el sobrenadante y resuspender las bacterias en 50 μ l de medio super broth (LB), el cual es un medio altamente enriquecido para el cultivo de bacterias, con el antibiótico correspondiente.

10. Colocar los 50 μ l de la mezcla de bacterias con el medio sobre la superficie del agar conteniendo el antibiótico correspondiente de acuerdo a la resistencia esperada según el plásmido. Previamente se colocan perlas estériles, las cuales ayudarán a la distribución de la solución sobre la placa de agar.
11. Colocar las cajas con agar en una incubadora a 37° C por 12 horas. Transcurrido ese tiempo, se observarán colonias de bacterias en el agar.
12. Picar una colonia de bacterias con un asa bacteriológica estéril y transportarla a un tubo con medio super broth (LB) con el antibiótico correspondiente y en la concentración adecuada y agitar vigorosamente.
13. Incubar los tubos a 37° C por 12 horas en agitación constante (180-200 rpm).

H) MINIPREP DE DNA

La técnica miniprep permite extraer el ADN de naturaleza plasmídica de un cultivo bacteriano. El rendimiento de ADN en plásmido es de 20-30 μ g con alta pureza. Para el desarrollo de esta técnica se utiliza el kit QIAGEN QIAprep spin Miniprep o el kit Sigma, catálogo No.PLN350-1KT. Los pasos de esta técnica se describen a continuación.

1. Los tubos con las bacterias en medio super broth (para ligación) se centrifugan durante 5 min. a 2 500 rpm para concentrar las bacterias.
2. Retirar el sobrenadante de los tubos y resuspender el concentrado de bacterias con 200 μ l del Buffer P1 (50Mm Tris-HCl, 10 Mm EDTA, 100 μ g/ml RNasas, que contiene RNAasa A y pH 8.0) o Buffer de resuspensión, el cual contiene RNasa A que debe estar a 4° C.
3. Una vez resuspendida la mezcla se coloca en un tubo de 2ml, donde se le agrega 200 μ l del Buffer P2 (200Mm NaOH, 1% SDS) o Buffer de lisis, el cual es el Buffer de lisis y se invierte el tubo suavemente 4-6 veces (no

utilizar el vortex) y se incuba a temperatura ambiente por no más de 5 min.

4. Para neutralizar la acción del Buffer de lisis, se agrega 350 µl de Buffer P3 (3.0 M Acetato de potasio, pH 5.5) o Buffer de Neutralización y se mezcla suavemente invirtiendo el tubo 4-6 veces. Nota: En este paso también se puede mezclar fuertemente sin utilizar vórtex.
5. Centrifugar el tubo 10 min. a 13 000 rpm. en una microcentrífuga. Durante este periodo se preparan las columnas; una para cada colonia, tratándolas 500 µl de Buffer para columna.
6. El sobrenadante resultante de la centrifugación se vierte en la columna y se centrifuga por 1 min. a 13 000 rpm. El filtrado se elimina.
7. El ADN retenido en la columna se lava con 750 µl de Buffer QC (1.0M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol) o Buffer de lavado con etanol y se centrifuga por 1 min. a 13 000 rpm. El filtrado se elimina.
8. Para secar bien la columna se centrifuga por 1 min. a 13 000 rpm.
9. Colocar la columna a un tubo eppendorf y agregar a la columna 40 µl de H₂O estéril (grado biología molecular) y dejar reposar 3 min.
10. Centrifugar la columna por 1 min. a 13 000 rpm.

I) MEDICIÓN DE LA CONCENTRACION DEL ADN

Determinar la concentración de ADN para experimentos posteriores será de utilidad. La concentración de ADN se determina midiendo la absorción de luz ultravioleta (relación 260/280 nm) en un espectrofotómetro Beckman. El factor de pureza es indicativo a la calidad de la preparación. Este factor debe estar lo más cercano a 2.0.

1. Encender el espectrofotómetro y posteriormente prender la lámpara de luz ultravioleta 15 min. antes de empezar a leer las concentraciones.

2. Realizar la dilución de ADN que se medirá (1:50) por lo tanto, se agrega 2 µl de la muestra de ADN y 98 µl de H₂O.
3. En el software del espectrofotómetro se selecciona la opción de DNA oligoquant: en Assay Type se elige ds (Tipo de ensayo, double strand), en Devices se elige single (Dispositivo único) y en la columna de factor de dilución se establece 50.
4. Lavar la celda, donde se leerá la concentración de ADN, varias veces con 100 µl de H₂O grado biología molecular. Posteriormente se lee el blanco, colocando 100 µl de H₂O grado biología molecular y en el software se escoge Blank (ubicado en la parte inferior del menú).
5. Retirar el agua de la celda y se coloca la muestra que se desea leer. Para ello, se selecciona la opción Read Sample (los datos aparecen en la pantalla). Se retira la muestra leída y se coloca la próxima muestra.
6. Una vez terminada la lectura de las muestras, se lava la celda con H₂O grado biología molecular.
7. Al terminar las mediciones, asegurarse de apagar el espectrofotómetro.

J) DIGESTIÓN DE LOS PLÁSMIDOS PRODUCTO DE LA LIGACIÓN

En este paso se obtendrán los fragmentos de ADN que corresponden a los fragmentos liberados del vector en cuestión con el fin de corroborar que el fragmento fue exitosamente insertado en este vector. Para ello, se procede a la digestión del producto de la ligación con la enzima XhoI por 12h a 37° C.

Componente de la digestión	
Buffer H 10x	1.6 µl
DNA	11-15 µl
XhoI	0.5 µl
Volumen total	13.5-17 µl

Posteriormente se realiza electroforesis de las muestras (13.5 - 17 μ l) en gel de agarosa al 1%, como se describe anteriormente.

2.2 ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR

Para determinar la importancia de TEM5 en el proceso de adhesión se transfectan las células COS-7, que normalmente no expresan endógenamente este receptor, con el plásmido que codifica para el receptor TEM5 fusionado a la proteína verde fluorescente y como control se usa el plásmido EGFP-CAAX.

A) MANTENIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR

Las células COS-7 se cultivan en cajas petri de 100 mm de diámetro con medio DMEM (Sigma, No. de catálogo D-7777) con 10% de SFB (suero fetal bovino) y 1% de la solución de antibiótico-antimicótico en una atmosfera de 5% de CO₂ a 37° C.

PROCEDIMIENTO.

1. Retirar el medio DMEM de las células COS-7.
2. Lavar las células con PBS 1X (Buffer salino de fosfatos).
3. Agregar 1ml de tripsina-EDTA 1X (SIGMA, 0.5g de tripsina y 0.2g de EDTA en 100ml).
4. Dejar actuar la tripsina 6 min. en la incubadora a 37° C. Golpear un poco la caja que contiene tripsina para facilitar el despegado de células.
5. Neutralizar la acción de la tripsina, agregando 9 ml de medio DMEM con 10% SFB a las células con tripsina.
6. Resuspender varias veces para separar los agregados celulares.

7. El stock se mantiene resemebrando las células con una dilución 2:10, 3 veces por semana. Para la transfección se utilizan 4ml de la suspensión de células y completar con 6ml de medio DMEM completo en caja p100 y para caja de 6 pozos agregar 1ml de la suspensión de las células y completar con 0.5ml de Medio DMEM completo.

B) TRANSFECCIÓN CON LIPOFECTAMINA-PLUS

Las células deben dividirse un día antes de la transfección y crecerse en las placas Petri p100 o en caja de 6 pozos en caso de analizar la activación de las GTPasas de la familia de Rho durante el proceso de adhesión. Una vez que el crecimiento celular en dichas cajas haya llegado a la confluencia de alrededor del 70-80% se procede a realizar la transfección.

1. Preparar PLUS en un tubo de polipropileno con 0.75ml de medio DMEM sin suero y sin antibiótico más 10 µl PLUS por caja. Si hay algún ADNc común para todas las cajas agregarlo en este punto y agitar.
Nota: En caso de agregar ADNc se debe multiplicar por el número de cajas para obtener la concentración deseada en cada condición.
2. Preparar Lipofectamina en un tubo de polipropileno con 0.75ml de medio DMEM sin suero y sin antibiótico más 12µl lipofectamina por caja. Agitar e incubar 15 min.
3. Alicuotar la mezcla PLUS en medio DMEM. 760 ul por tubo. Marcar tubos. Adicionar el ADNc a cada tubo. Agitar e incubar 15 min.
4. Agregar 762 µl de la solución de lipofectamina a los tubos con PLUS y los ADNc. Agitar e Incubar 15 min.
5. Preparar células. Marcar las cajas en la parte inferior, lavar con 5ml de PBS 1X, retirar y agregar 5ml de DMEM sin suero y sin antibióticos.
6. Agregar la mezcla de ADNc, lipofectamina y PLUS, a cada caja. Incubar a 37°C por un periodo de 4 horas.

- Pasado ese tiempo retirar medio y agregar 10 ml de medio DMEM completo, incubar a 37°C y procesar 48 horas después.

	cDNA Total (µg)	Plus (µl)	DMEM (µl)	Lipofectamina (µl)	DMEM para células (ml)	Volumen final (ml)
6 pozos	1	3	100	3	0.8	1
100mm	4	10	750	12	5	6.5

C) ENSAYO DE ADHESIÓN 48 POST-TRANSFECCIÓN

- Ayunar células con 10ml de medio DMEM sin suero y sin antibióticos toda la noche.
- Al siguiente día antes de empezar el experimento, tomar fotos en campo claro y fluorescencia de cada condición. Se puede lavar las células antes de tomar la foto.
- Lavar células con PBS 1X y colocar 1 ml de tripsina por 6 minutos.
- Añadir 4 ml de medio DMEM ayuno + 15mM de HEPES (homogenizar). Colectar la suspensión de células en tubos previamente etiquetados.
- Centrifugar los tubos a 1200 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Retirar el sobrenadante. Cuidar de no aspirar la pastilla de células.
- Colocar 3 ml de medio DMEM ayuno + 15mM de HEPES por cada condición y homogenizar. (Colocar parafilm alrededor de la tapa)
- Incubar en el shaker a 37° a 50-75 rpm por 2 horas.
- Después de ese tiempo la suspensión de células se coloca en cajas Petri por 30 minutos: 0.5 ml por pocillo de un caja de 12 pozos.
Nota: En el caso de usar matriz extracelular, los pocillos se pre-tratan con los sustratos colágena IV (20µg/ml) o fibronectina (10µg/ml) toda la noche a 4° C y 30min previo al ensayo de adhesión. Para el tratamiento con PTX (200 ng/µl) se coloca 12 horas antes de iniciar y durante el ensayo.

10. Realizar 3 lavados con PBS 1X y fijar con 4% PFA por 20 min. Lavar 3 veces y dejar PBS 1X.
11. Tomar fotografías (5) por cada condición con la cámara DS-Qi1Mc Nikon y procesar las imágenes para la cuantificación de células fluorescentes con el programa NIS ELEMENTS o IMAGE J versión FIJI.

SECCIÓN DEL AISLAMIENTO DEL COMPLEJO DE ADHESIÓN

Una alternativa para la identificación de la interacción entre TEM5 y las proteínas endógenas como G β γ , Elmo e Intersectinas fue el aislamiento del complejo de adhesión en células COS-7. Con la premisa de que la asociación de este macrocomplejo ocurre en las adhesiones, que se supondrían no inmunoprecipitables, se decidió recuperar esta fracción insoluble en el proceso de adhesión promovido por TEM5 y detectar la presencia de nuestras proteínas de interés por la técnica de western-blot.

El procedimiento se describe a continuación:

1. Ayunar células con 10ml de medio DMEM sin suero y sin antibióticos toda la noche.
2. Al siguiente día antes de empezar el experimento, tomar fotos en campo claro y fluorescencia de cada condición. Se puede lavar las células antes de tomar la foto.
3. Lavar células con PBS 1X y colocar 1 ml de tripsina por 6 minutos.
4. Añadir 4 ml de medio DMEM ayuno + 15mM de HEPES (homogenizar).
Colectar la suspensión de células en tubos previamente etiquetados.
5. Centrifugar los tubos a 1200 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Retirar el sobrenadante. Cuidar de no aspirar la pastilla de células.
7. Colocar 1 ml de medio DMEM ayuno + 15mM de HEPES por cada condición y homogenizar. (Colocar parafilm alrededor de la tapa)
8. Incubar en el shaker a 37° a 50-75 rpm por 2 horas.

9. Después de ese tiempo la suspensión de células se coloca en cajas Petri por 30 minutos.
Nota: En el caso de usar matriz extracelular, los pocillos se pre-tratan con los sustratos colágena IV (20µg/ml) o fibronectina (10µg/ml) toda la noche a 4° C y 30min previo al ensayo de adhesión. Para el tratamiento con PTX (200 ng/µl) se coloca 12 horas antes de iniciar y durante el ensayo.
10. Una vez adheridas las células por 30 min se agrega 1ml de buffer de lisis, y sin raspar se recupera el lisado obtenido.
11. Lavar 3 veces con buffer de lisis usando la micropipeta de 1 ml y retirar el lavado.
12. Agregar 0.5 ml de buffer de muestra Laemlii 4X caliente a la caja de Petri, conteniendo el complejo de adhesión.
13. Se procede a raspar y recuperar el complejo de adhesión aislado en tubos eppendorf etiquetados.
14. Ebulir las muestras por 5 min y centrifugarlas 5 min a 13,000 rpm.
15. Correr los geles con los porcentajes de acrilamida correspondientes a los pesos de las proteínas de nuestro interés.

2.3 ACTIVACIÓN DE LAS GTPasas Rac1 y Cdc42

Para determinar que TEM5 favorece la activación de las GTPasas Rac1 y Cdc42 en el proceso de adhesión se emplean células COS-7 que no expresan endógenamente a este receptor. En caja de 6 pozos, las células COS-7 son transfectadas con el plásmido que codifica para el receptor TEM5 y como control se usa el plásmido EGFP-Caax.

A) PROTOCOLO DE TRANSFECCIÓN CON LIPOFECTAMINA 2000

Las células deben dividirse un día antes de la transfección y crecerse en caja de 6 pozos. Una vez que el crecimiento celular haya llegado a la confluencia de alrededor del 70-80% se procede a realizar la transfección.

TUBO A: Colocar 250 µl de Optimem + cDNA en un mismo tubo eppendorf.

TUBO B: Colocar 250 µl de Optimem + Lipofectamina 2000 en un tubo eppendorf.

1. Incubar 5 min los tubos A y B independientes.
2. Mezclar los tubos (del tubo A al tubo B).
3. Incubar 30 min los complejos.

Nota: En este tiempo se lavan las células COS-7 con PBS1X y se coloca 1ml de Optimem en cada pozo.

4. Colocar la mezcla del complejo en las células con una micropipeta. (Volumen final de 1.5ml)
5. Incubar 4 horas.
6. Agregar 2ml de medio DMEM completo.

Nota: Al día siguiente temprano, aspirar todo el medio y añadir 2ml de medio DMEM completo

B) ENSAYO DE ADHESIÓN 48 POST-TRANSFECCIÓN

1. Ayunar células con 1ml de medio DMEM sin suero y sin antibióticos toda la noche.
2. Al siguiente día antes de empezar el experimento, tomar fotos en campo claro y fluorescencia de cada condición. Se puede lavar las células antes de tomar la foto.
3. Lavar células con PBS 1X y colocar 0.2 ml de tripsina por 6 minutos.
4. Añadir 0.8 ml de medio DMEM ayuno + 15mM de HEPES (homogenizar). Colectar la suspensión de células en tubos previamente etiquetados.
5. Centrifugar los tubos a 1200 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Retirar el sobrenadante. Cuidar de no aspirar la pastilla de células.
7. Colocar 1 ml de medio DMEM ayuno + 15mM de HEPES por cada condición y homogenizar. (Colocar parafilm alrededor de la tapa)
8. Incubar en el shaker a 37° a 50-75 rpm por 2 horas.
9. Después de ese tiempo la suspensión de células se coloca en cajas Petri por 30 minutos: 0.7 ml por pocillo de un caja de 6 pozos.
10. Después de ese tiempo se procede a lisar.

C) ENSAYO DE ACTIVACIÓN DE GTPASAS

A continuación se describe el protocolo de la activación de GTPasas.

1. Adicionar 0.5 ml de Buffer de lisis tritón 2X con inhibidores y proceder a raspar los pocillos con un gendarme y transferir los lisados a tubos eppendorf.
2. Centrifugar a 13,000rpm durante 5min a 4°C.
3. Dividir el lisado: 75 µl del sobrenadante en tubos eppendorf (para lisados totales) y el sobrenadante restante a los tubos eppendorff con perlas GST-PAK-N e incubar en hielo durante 45 minutos en agitación.

4. Hervir 5 minutos las muestras que corresponden a lisado total tras adicionar 25 μ l de buffer de muestra 4X con β -mercaptoetanol.
5. Una vez concluido el tiempo de incubación de las muestras con las perlas centrifugar a 5,000 rpm durante 1 min. a 4°C.
6. Retirar el sobrenadante con precaución de no aspirar las perlas. Lavar las perlas 3 veces con 1 ml de buffer de lisis con inhibidores. Utilizar el vórtex brevemente para un lavado eficiente.
7. Retirar el sobrenadante y adicionar 35 μ l de buffer de muestra de Laemmli 1X. con β -mercaptoetanol.
8. Hervir las muestras durante 5 minutos.
9. Centrifugar a 13,000rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
10. Correr gel SDS-PAGE bifásico 6% y 12 %. 35 mA.
11. Transferir el gel a membrana Immobilon PDVF durante 2.5 hrs a 320 mA colocando la cámara en baño de hielo.
12. Para el western-blot, bloquear con leche al 5% en TBS-Tween 0.05% durante 1 hora a temperatura ambiente.
13. Realizar 3 lavados con TBS-T 0.05% por 5 minutos a temperatura ambiente.
14. Adicionar el anticuerpo Rac o Cdc42 y el anticuerpo Flag para la detección de TEM5, a una dilución 1:5,000 en 5% de leche en TBS-T 0.05% toda la noche a 4 °C,
15. Realizar 3 lavados con TBS-T 0.05% por 5 minutos cada uno.
16. Adicionar el segundo anticuerpo 1/10,000 en leche al 5% en TBS-T 0.05% (anti-ratón) durante 1 hora a temperatura ambiente.
17. Realizar 3 lavados con TBS-T 0.05% por 5 minutos cada uno.
18. Revelar la membrana con el sustrato quimioluminiscente Millipore a una dilución 1:1. Exponer la membrana a diferentes tiempos.

2.4 INMUNOFLUORESCENCIAS

Para las inmunofluorescencias de las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) se siembran a una densidad de 75,000 células por condición en el ensayo de adhesión celular. Las células HUVEC se cultivan en medio M199 suplementado con 20% de suero fetal bovino, factores de crecimiento endotelial (0.05 mg/ml) y heparina (0.1 mg/ml) hasta el quinto pase.

1. Agregar gelatina al 0.1% en PBS y filtrar. Colocar gelatina sobre el cubreobjeto por 5-10 min. Posteriormente, retirar la gelatina y no lavar.
2. Las células se cultivan en los cubreobjetos pretratados o bien seguir el protocolo de adhesión.

Nota: Para el proceso de adhesión de células endoteliales, la incubación de células en el shaker a 37° C es por 20 min previo al proceso de adhesión.

3. Las células ayunadas por 3 horas (medio M199 con 2% de SFB) se fijan con PFA al 4% por 20 min y se colocan la caja en la incubadora. Hacer la dilución de PFA en M199 2% SFB
4. Lavar 3 veces con PBS frío.
5. Esperar 5 min. entre cada lavado.
6. Permeabilizar con tritón al 0.1% en PBS por 5 min. (300 ul/pozo)
7. Lavar 3 veces con PBS frío. Esperar 5 minutos entre cada lavado.
8. Bloquear con BSA al 1% en PBS por 1 hora (300 ul/pozo)
9. Agregar anticuerpo primario 1:100 en BSA 1% por 1 hora.
Elmo2 and pY713 Elmo2, GenScript, Piscataway, NJ; Elmo, Novous.
TEM5 producido por el grupo del St. Croix group (NIH, Frederick, MD).
Intersectina, Millipore.
10. Colocar una gota de 40ul al parafilm y colocar el cubreobjetos (células hacia abajo para que toquen la gota) y cubrir las muestras. En caso de tener anticuerpos primarios de diferente origen, se pueden mezclar.
11. Lavar 3 veces con PBS frío. Esperar 5 minutos entre cada lavado

12. Agregar anticuerpo secundario 1:100 en BSA 1% por 1 hora.
13. anti-ratón 488, anti-conejo 568, anti-cabra 688 o faloidina 688 Molecular Probes.
14. Colocar una gota de 40ul al parafilm y colocar el cubreobjetos (células hacia abajo para que toquen la gota) y cubrir las muestras. En caso de tener anticuerpos secundarios obtenidos en diferentes organismos, se pueden mezclar.
15. Lavar 3 veces con PBS frío. Esperar 5 min entre cada
16. Colocar el cubreobjetos en papel filtro por 2-5 min. (Sólo para secar)
17. Colocar 14 ul de DAPI, Fluoromont Aqueous mounting (Sigma-Aldrich) (1:100) en el portaobjetos por 30 min.

Posteriormente, las muestras son analizadas en el microscopio confocal LSM 710 (Carl Zeiss) con el objetivo de aceite de inmersión x63/1.4 NA. Para la co-localización de las proteínas de interés se emplea el programa Image J versión Fiji.

2.5 ENSAYO DE POLARIDAD CELULAR

Para investigar la participación de TEM5 en la polaridad celular en células endoteliales (HUVECs) se emplea una mezcla de siRNAs diseñado para abatir la expresión de este receptor.

A) PROTOCOLO DE TRANSFECCIÓN CON LIPOFECTAMINA 2000

Las células HUVECs deben dividirse un día antes de la transfección y crecerse en caja de 6 pozos. Una vez que el crecimiento celular haya llegado a la confluencia de alrededor del 90% se procede a realizar la transfección.

TUBO A: Colocar 250 μ l de Optimem + siRNA TEM5 o siRNA CTL (50nM) en un mismo tubo eppendorf.

TUBO B: Colocar 250 μ l de Optimem + Lipofectamina 2000 en un tubo eppendorf.

1. Incubar 5 min los tubos A y B independientes.
2. Mezclar los tubos (del tubo A al tubo B).
3. Incubar 30 min los complejos.
4. Nota: En este tiempo se lavan las células HUVEC con PBS1X y se coloca 1ml de Optimem en cada pozo.
5. Colocar la mezcla del complejo en las células con una micropipeta. (Volumen final de 1.5ml)
6. Incubar 4 horas.
7. Agregar 2ml de medio M199 suplementado.
8. Nota: Al día siguiente temprano, aspirar todo el medio y añadir 2ml de medio M199 suplementado.

B) EXTRACCIÓN DE ARN Y PCR

Para confirmar que la expresión de TEM5 está disminuida al emplear la mezcla del siRNA de TEM5 se realiza una PCR cuantitativa.

El ARN total de las células HUVEC se extrae con un kit RNeasy Mini (Qiagen). 1 μ g de ARN es transcrito en ADNc utilizando SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La RT - PCR se realiza usando la enzima ADN polimerasa de Taq. La Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es usada como un gen de referencia. Las secuencias de cebadores son: El cebador directo TEM5 humano es 5'-GGCACTGAGGTGAAGGGATA-3' y su cebador inverso es 5'-AGAAGGTGGAGATCGTGGTG-3'. El cebador directo GAPDH humano es 5'-CCACTCCTCCACCTTTGAC-3' y su cebador inverso es 5'-ACCCTGTTGCTGTAGCCA-3'.

C) ENSAYO DE POLARIDAD CELULAR

Las monocapas de células endoteliales de venas umbilicales humanas confluentes (HUVEC) transfectadas con 50 nM de siRNA contra TEM5 o siRNA control se cultivan en cubreobjetos pre-tratadas con gelatina 0.1%. 48 horas post-transfección, las células se lavan con PBS 1X y se ayunan durante 5 horas en medio M199 con suero fetal bovino al 1% (SFB). A continuación, se realiza una herida utilizando una punta de pipeta de 100 μ l y se agrega el medio M199 completo que contiene SFB al 20% y se incuba durante 30 min. Las células HUVECs se fijan usando paraformaldehído (PFA) al 4% y se permeabilizan en Tritón - X100 al 1%. Después de incubar con BSA al 1% para bloquear la tinción no específica durante 1 h, las células se incuban con el anticuerpo GM130 durante 2 h a temperatura ambiente a las células, este anticuerpo es un marcador de posicionamiento del aparato de Golgi. Después de tres lavados con PBS, las células se incuban durante una hora con anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado Alexa-Fluor568 (Invitrogen)

y Alexa-Fluor488 Faloidina, para la tinción de actina. Las muestras se tiñen con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) para observar los núcleos y analizadas con microscopía confocal Zeiss. La orientación del aparato de Golgi se evalúa como se ha descrito previamente (146,147). Las células en las que la tinción con GM130 no localizan en un ángulo de 120° con respecto al frente de la herida se consideran células no polarizadas. Al menos 100 células cerca del borde de la herida se examinan aleatoriamente y se determina el porcentaje de células polarizadas ($n = 3$). Los datos se representan como media \pm SEM. $P < 0,05$.

2.6 ENSAYOS DE PRECIPITACIÓN POR AFINIDAD

Para determinar interacciones con el receptor TEM5 con proteínas candidato se emplean diferentes estrategias entre ellas ensayos precipitación por afinidad (Pull Down, PD) empleando proteínas recombinantes o fusionadas con GST y transfectadas en células de mamífero e inmunoprecipitaciones.

A) ENSAYO DE PRECIPITACIÓN POR AFINIDAD

1. Lavar las células, ayunadas toda la noche, con 5ml PBS 1X.
2. Lisar con Buffer de lisis con inhibidores (1ml por caja), sobre hielo.
3. Raspar lisados, transferir a Eppendorf, siempre sobre hielo.
4. Centrifugar durante 10 min 13, 000 rpm a 4°C.
5. Transferir sobrenadante a tubos nuevos para pull down.
6. Dividir lisados: transferir 75 µl para lisado total y el sobrenadante restante colocarlo con la resina Glutación-sefarosa (GS) (25 µl por tubo). Resuspender antes de usar la resina.
7. Agitar las muestras con la resina por 30 min a 4°C. En este tiempo, agregar buffer de muestra 4X con β-mercaptoetanol a los tubos de lisado total y hervir durante 5 minutos.
8. Preparar el gel de SDS-PAGE al porcentaje correspondiente.
Las proteínas transfectadas fusionadas a glutatión transferasa (GST) pesan entre 25 y 75 kDa (Vector GST, GST-TEM5-Cter y GST-SH3_{A-E} ITSN 1/2).
9. Centrifugar durante 1min a 5,000 rpm 4°C.
10. Eliminar el sobrenadante, sin retirar las perlas GS.
11. Realizar 3 lavados con 1ml de buffer de lisis, mezclar en el vórtex unos 20 segundos.
12. Centrifugar 1 min 5,000 rpm 4°C.

13. Resuspender pastilla en buffer de muestra 1X con β -mercaptoetanol (35 μ l).
14. Hervir durante 5 minutos.
15. Centrifugar durante 5 minutos a 13,000rpm a temperatura ambiente.
16. Correr 30–35 μ l LT y todo del pull down (aprox 35-50 μ l).
17. Transferir a membrana de Immobilon PVDF.

B) ENSAYO DE PRECIPITACIÓN POR AFINIDAD USANDO PROTEÍNAS RECOMBINANTES (DOMINIOS SH3 INDIVIDUALES DE ITS_{N1})

1. Lavar las células, ayunadas toda la noche, con 5ml PBS 1X.
2. Lisar con buffer de lisis Tritón 1X con inhibidores (1ml por caja), sobre hielo.
3. Raspar lisados, transferir a Eppendorf, siempre sobre hielo.
4. Centrifugar durante 10 min 13, 000 rpm a 4°C.
5. Transferir sobrenadante a tubos nuevos para pull down
6. Dividir lisados: transferir 75 μ l para lisado total y el sobrenadante restante colocarlo con las proteínas recombinantes (15 μ l por tubo). Resuspender antes de usar las perlas.
7. Agitar las muestras con las perlas correspondientes por 2 horas a 4°C. En este tiempo, agregar buffer de muestra 4X con β -mercaptoetanol a los tubos de lisado total y hervir durante 5 minutos. En caso de la detección del receptor, separar lisado total y no hervir.
8. Preparar el gel de SDS-PAGE al porcentaje correspondiente.
9. Centrifugar durante 1min a 5,000 rpm 4°C
10. Eliminar el sobrenadante, sin retirar las perlas.
11. Realizar 3 lavados con 1ml de buffer de lisis, mezclar en el vórtex unos 20 segundos.
12. Centrifugar 1 min 5,000 rpm 4°C
13. Resuspender pastilla en buffer de muestra 1X con β -mercaptoetanol (35 μ l).

14. Hervir durante 5 minutos.
15. Centrifugar durante 5 minutos a 13,000rpm a temperatura ambiente.
16. Correr 30–35 ul LT y todo del pull down (aprox 35-50 ul).
17. Transferir a membrana de Immobilon PVDF

C) INMUNOPRECIPITACION (IP)

1. Lavar las células, ayunadas toda la noche, con PBS 1X (5 ml por caja)
2. Lisar con buffer de lisis Tritón 1x (1ml por caja), sobre hielo. En caso de realizar el ensayo de adhesión se emplea Tritón 2x.
3. Raspar lisados, transferir a tubos eppendorf, siempre sobre hielo.
4. Centrifugar 10min a 13 000 rpm a 4°C.
5. Transferir sobrenadante a tubos nuevos para IP.
6. De ahí transferir 75ul a otra serie de tubos, mantener en hielo para LT (lisado total)
7. Colocar proteína G (15 µl) en el lisado para IP con la finalidad de retirar el pegado inespecífico e Incubar 2 horas a 4°C. (mientras tanto agregar 25ul de buffer de muestra 4X con β- mercaptoetanol a los tubos de lisado total y hervir 5 minutos).
8. Centrifugar las muestras a 5,000 rpm a 4°C por 1 minuto. Recuperar sobrenadante y agregar 5 µl de anticuerpo para inmunoprecipitación (tubos IP) toda la noche a 4°C.
Anticuerpo anti-Elmo Genscript; Anticuerpo anti-Flag, Sigma Aldrich
9. Preparar geles de poliacrilamida según correspondan los pesos de las proteínas de interés.
10. Agregar gamma bind (Proteína G), resuspender muy bien antes de tomarlo (25ul por tubo) (cortar puntas)
11. Agitar por 3 horas a 4°C
12. Centrifugar 1min 5 000 rpm 4°C. Realizar 3 lavados con buffer de lisis tritón 1x que contiene inhibidores.

13. Resuspender la pastilla en buffer de muestra 1X con β -mercaptoetanol (35ul)
14. Hervir 5min.
15. Centrifugar 5 min a 13,000rpm, a temperatura ambiente.
16. Correr 30–35 ul LT y todo de IP (aprox 35-50 ul) a 30 mA.
17. Transferir a membrana de Immobilon PDVF.

Tabla 2. Lista de anticuerpos usados en este proyecto.

Nombre del anticuerpo	Marca
Cdc42	SIGMA
c-Myc (9E10)	SIGMA
Elmo	GenScript, Piscataway, NJ
Elmo pY713	GenScript, Piscataway, NJ
Flag	SIGMA
GFP (B-2)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
TEM5/GPR124	Grupo del St. Croix group(NIH, Frederick, MD)
GST (B-14)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
HA	COVANCE SIGMA
Intersectina (ITSN)	Abcam Millipore
RAC	BD Transduction Laboratories
Anticuerpos secundarios:	Rockland
Anti-ratón monoclonal	Immunochemicals o
Anti-conejo	KPL

2.7 ENSAYO DE LIGACIÓN POR PROXIMIDAD (PLA) IN SITU

Esta técnica novedosa es capaz de detectar las interacciones de proteínas con alta especificidad y sensibilidad. El fundamento de este ensayo se basa en la amplificación fluorescente del producto de la ligación de los oligonucleótidos sintéticos unidos a los anticuerpos secundarios de dos especies diferentes que reconocen a las proteínas de interés mediante los anticuerpos primarios en una distancia menor a 40 nm.

Para la realización de este ensayo se sigue el protocolo establecido en Doulink® In situ de la marca SIGMA ALDRICH.

Las concentraciones de los anticuerpos primarios son los siguientes:
TEM5 1:100, Elmo2 1:50 e Intersectina 1 1:100

RESULTADOS

GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES DE TEM5 Y SH3 DE ITSNS COMO HERRAMIENTAS PARA EXPERIMENTOS DE INTERACCIÓN.

Para determinar interacciones que establece el receptor a través de su carboxilo terminal, generamos una construcción de TEM5 carente de su carboxilo terminal en el plásmido pCEFL 3XFlag. La obtención de la construcción pCEFL 3xFlag TEM5 delta carboxilo terminal fue detectada empleando la enzima de restricción XhoI, la cual digirió parcialmente las clonas 1-3 que correspondieron al fragmento deseado considerando la suma el peso del vector (6101pb) más el fragmento (2899pb). Las clonas con el inserto se marcaron en un recuadro rojo como se observa en el panel izquierdo de la figura 10. Posteriormente, la expresión de pCEFL 3xFlag TEM5 delta carboxilo terminal de las clonas seleccionadas fue detectada en un peso aproximado de 115 kDa en células de mamífero mediante la técnica de western-blot usando el anticuerpo anti-flag que detecta al epítipo en el amino- terminal de TEM5 como se observa en el panel derecho de la figura 10.

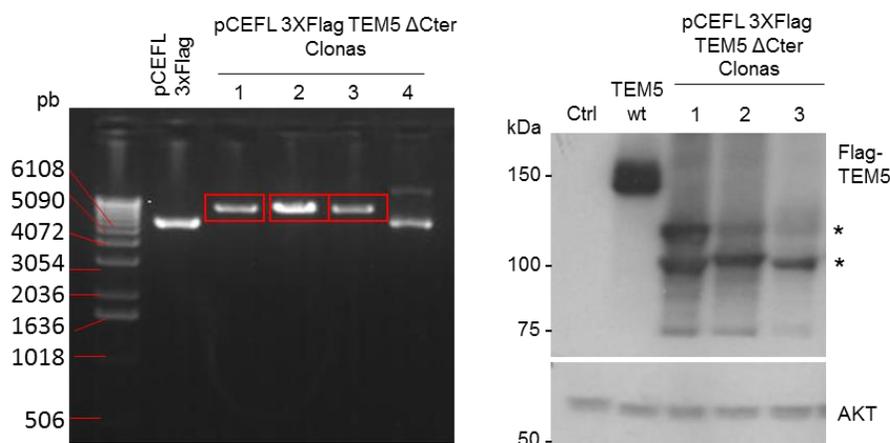


Figura 10. Obtención de la construcción pCEFL 3xFlag TEM5 Δ Cter. En el panel izquierdo se observan las clonas 1-3 que insertaron el fragmento de TEM5 delta carboxilo terminal en el plásmido pCEFL 3xFlag TEM5 Δ Cter. El panel derecho corresponde a la expresión de dicha construcción detectada en un peso aproximado de 115 kDa en células HEK293T.

Con la finalidad de detectar interacciones mediante ensayos de precipitación por afinidad a GST, se obtuvo la construcción pCEFL GST TEM5 Cter. Como se muestra en el panel izquierdo de la figura 11, las clonas 2, 4 y 5 fueron positivas tras insertar favorablemente el carboxilo terminal de TEM5 en dicho plásmido. Después, corroboramos efectivamente la expresión de TEM5 Cter de las tres clonas transfectadas en células de mamífero en un peso aproximado de 52 kDa. Cabe señalar que también se obtuvo una construcción del carboxilo terminal de TEM5 en el plásmido pCEFL 3xFlag como opción alterna a ensayos con GST.

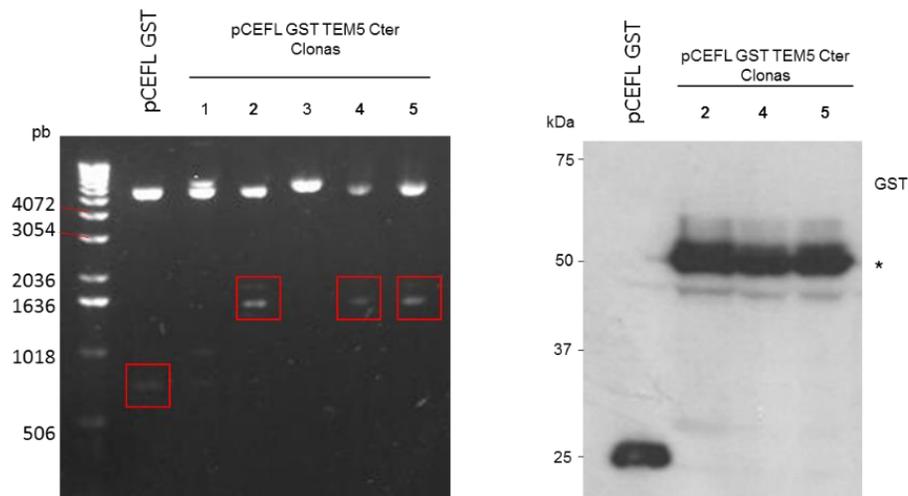


Figura 11. Obtención de la construcción pCEFL GST TEM5 Cter. En el panel izquierdo se muestra la digestión diagnóstica de las clonas, obtenidas de la transformación en bacterias *E. coli*, con la enzima XhoI que tiene dos sitios de restricción (1271 y 2285) en el plásmido pCEFL GST. El control (pCEFL GST) liberó un inserto de aproximadamente 1 kb, mientras que las clonas 2, 4 y 5 fueron positivas tras insertar el carboxilo terminal (789 pb). La banda positiva de inserto se detectó en un peso aproximado de 1785 pb. Este peso corresponde al inserto clonado entre los sitios BamHI (2251) y EcoRI (1611). El panel derecho muestra la expresión favorable de la construcción pCEFL GST TEM5 Cter (52 kDa) de las tres clonas seleccionadas (2,4 y 5) en células HEK293T usando el anticuerpo anti-GST.

Mediante un análisis bioinformático en Scansite se identificó una posible interacción entre los dominios SH3 de Intersectina y TEM5. Con dicha premisa, nosotros generamos dos construcciones: pCEFL GST ITSN-SH3_{A-E} y pCEFL 3xFlag ITSN SH3_{A-E} en sus dos variantes para posteriormente realizar ensayos de precipitación por afinidad. Como se puede observar en el panel superior de la figura 12, se obtuvieron 5 clonas positivas al inserto deseado en el plásmido pCEFL GST. En el western-blot del panel inferior izquierdo se detectó la expresión de ITSN1-SH3_{A-E} con el anticuerpo anti-GST en un peso de 75 kDa. En el panel inferior derecho de la figura 12 se muestra la expresión de ITSN1- SH3_{A-E} en el plásmido pCEFL 3xFlag en un peso aproximado de 50 kDa.

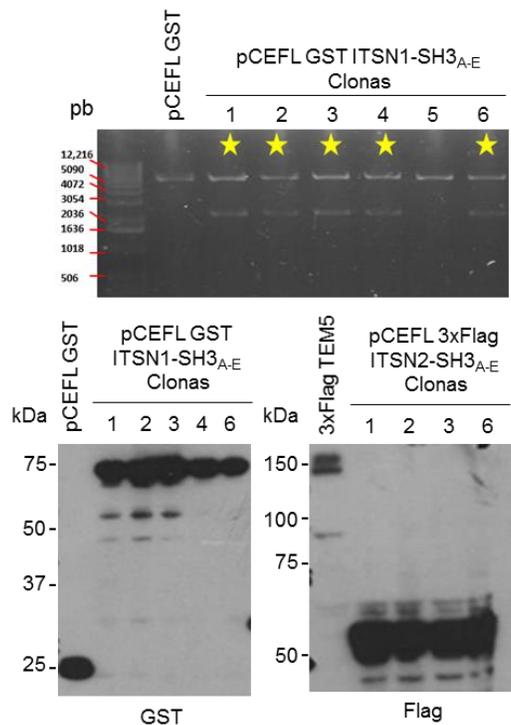


Figura 12. Obtención de ITSN-SH3_{A-E} en pCEFL GST y pCEFL 3xFlag. En el panel superior se muestran las clonas marcadas en amarillo que fueron positivas en la inserción del fragmento de ITSN-SH3_{A-E} (1278 pb) en los sitios BamHI (2251) y EcoRI (1611). El peso esperado fue de 2274 kb tras la digestión con la enzima XhoI (dos sitios, 1271 y 2285). Para detectar la expresión de las clonas seleccionadas, éstas fueron transfectadas en células HEK293T. Como se puede observar en el panel inferior todas las clonas expresan ITSN-SH3 detectada con anticuerpos anti-GST y anti-flag, en los paneles respectivos.

TEM5 (GPR124/ADGRA2) PROMUEVE LA ADHESIÓN CELULAR, LA POLARIDAD, LA FORMACIÓN DE FILOPODIOS Y LA ACTIVACIÓN DE LAS GTPASAS Cdc42 y Rac1

Considerando la importancia de TEM5 en eventos de permeabilidad y migración celular para la formación de capilares durante el desarrollo embrionario así como su participación en la progresión del tumor (135,137,142,148), se sugiere que este receptor perteneciente a la familia de adhesión de GPCRs contribuye a las propiedades adhesivas de las células y al reordenamiento del citoesqueleto de actina modificando la morfología celular.

Primeramente, usamos un modelo de ganancia de función en células COS-7, las cuales carecen de la expresión endógena de este receptor, para evaluar la hipótesis de que TEM5 favorece la adhesión celular. Como se observa en la figura 13A, la expresión ectópica de TEM5 fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) en células COS-7 promovió una mayor adhesión de células en comparación con células control que sólo expresan GFP. Dicha adhesión promovida por TEM5 fue mayor cuando las células se sometieron a adherirse sobre matriz extracelular como la colágena IV y fibronectina como se ilustra en la figura 13B. Elucidando el mecanismo por el cual TEM5 ejerce un efecto positivo en la adhesión celular, empleamos un inhibidor de la disociación de la proteína Gi, la toxina *Pertussis*. Sin embargo, en estas condiciones, las células que expresaban a TEM5 no se vieron afectadas en su capacidad adherente como se observa en la figura 13C, sugiriendo que la proteína Gi no está implicada en los mecanismos río debajo de la señalización de TEM5.

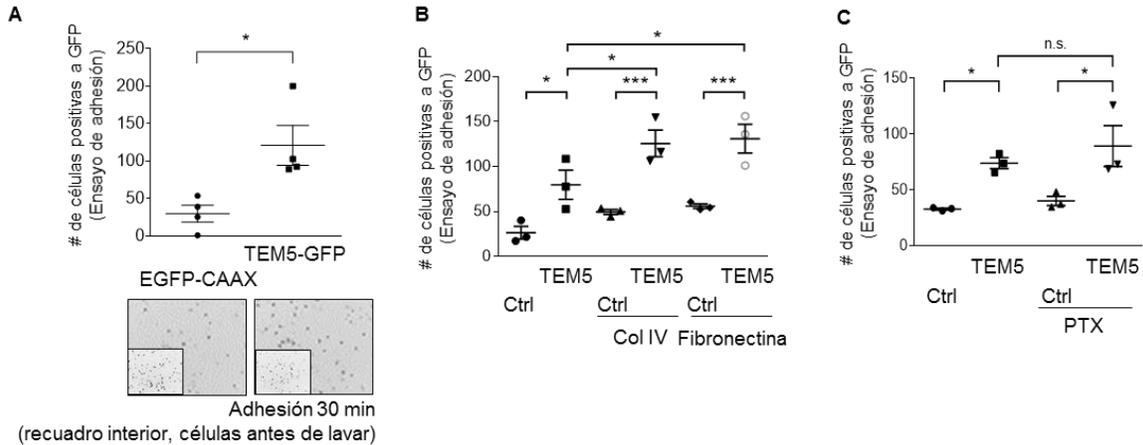


Figura 13. El receptor TEM5 promueve la adhesión celular. A. El receptor TEM5 promueve una eficiente adhesión. Los ensayos de adhesión se realizaron utilizando células COS-7 privadas de suero que expresaban TEM5 marcado con GFP o EGFP-CAAX, utilizado como control. Después de 30 minutos de adhesión, las células se fijaron con PFA al 4% y las imágenes se tomaron con un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti y se analizaron con el software NIS-Elements. La gráfica representa la media \pm SEM de células GFP-positivas adheridas para cada condición. * $p < 0,05$, $n = 4$. En la parte inferior se muestra un campo representativo que muestra las células adheridas. B. TEM5 tiene un efecto aditivo en la adhesión sobre sustrato de colágena IV y de fibronectina. Las células COS-7 fueron transfectadas con el control, EGFP-Caax o TEM5-GFP. Las células se sometieron al proceso de adhesión durante 30 min sobre plástico y matriz extracelular como colágena IV y fibronectina pretratadas por 12 horas a 4° C y 30 min a 37° C, respectivamente. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con PBS y se fijaron con PFA 4%. Las imágenes con fluorescencia fueron tomadas con el microscopio Nikon Eclipse Ti y analizadas en el Image J Fiji. El gráfica representa la media \pm SEM de células adheridas GFP positivas; * $P < 0,05$, *** $p < 0,001$. Los datos estadísticos fueron analizados en el programa graphPad Prism v6 mediante ANOVA seguido de las comparaciones múltiples de Tukey posthoc test $n = 3$. C. La inhibición de las proteínas Gi heterotriméricas no altera la adhesión celular dependiente de TEM5. Las células COS-7 transfectadas con el control, EGFP-CAAX o TEM5-GFP se trataron durante la noche y durante el ensayo de adhesión de 30 min con toxina *Pertussis* (PTX, 200 ng/ μ l). Las células adherentes fijas se analizaron utilizando el programa Image J. La gráfica representa la media \pm SEM de las células adheridas GFP positivas, y se analizó por ANOVA por las comparaciones múltiples de Tukey posthoc test * $p < 0,05$, $n = 3$.

Asimismo, encontramos que la expresión exógena de TEM5 indujo la formación de filopodios, modificando la morfología típica de las células COS-7 en el proceso de adhesión, y que además, TEM5 se localizó en la punta de dichas extensiones (figura 14A). Además, TEM5 localizó en proyecciones positivas a VASP, un marcador de filopodios, así también con actina filamentosa durante el proceso de adhesión.

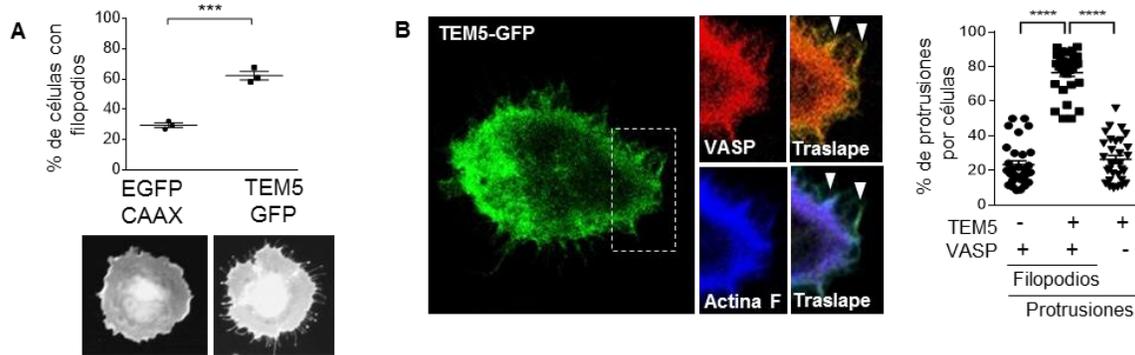


Figura 14. TEM5 induce la formación de filopodios. A. Como se muestra en la gráfica, nosotros encontramos mayor número de células que presentaron extensiones celulares en células que expresaban TEM5. Se observó la morfología de las células COS7 que expresaban TEM5-GFP en células adheridas durante 30 minutos y fueron comparadas con las células COS-7 control que expresaban EGFP-CAAX, Prueba de Student's T-test * $p < 0,05$ $n=3$. Una célula representativa para cada condición se muestra en la parte inferior. B. TEM5 se localiza en los filopodios VASP positivos en las células adheridas. Las células COS-7 transfectadas con TEM5-GFP y mCherry-VASP, un marcador de filopodios, se sometieron al proceso de adhesión por 30 min. Posteriormente, las células fueron fijadas y teñidas para actina-F y analizadas por microscopía confocal. Alrededor del 75% de protrusiones de filopodios VASP positivos por célula también fueron positivas para TEM5-GFP (gráfica en el panel derecho). Una célula representativa se muestra a la izquierda. Las protrusiones celulares positivas para TEM5 y VASP o TEM5 y actina-F están indicadas por puntas de flecha en las imágenes de traslape. Al menos 30 células fueron analizadas por el microscopio confocal Leica TCS SP8 usando un objetivo 100X. La gráfica muestra la media \pm SEM ($n = 3$). Para la estadística se empleó ANOVA unidireccional seguido de múltiples comparaciones Tukey posthoc **** $p < 0,0001$.

De manera interesante, en el proceso de adhesión, detectamos una banda de menor peso molecular que el receptor silvestre mediante el uso del anticuerpo anti-GFP, que reconoce dicho epítipo en el carboxilo terminal de TEM5, por lo que se sugiere que modificaciones postraduccionales en su amino-terminal fueron evidenciados. Como se muestra en la figura 15, dos bandas de alrededor de 67 y 110 kDa sugirieron que TEM5 sufre un corte en el sitio GPS y en el dominio homólogo a inmunoglobulinas, respectivamente. Sin embargo, otras bandas fueron detectadas entre 75 y 100 kDa, marcadas con asterisco, como indicativo de glicosilaciones del receptor con el amino truncado.

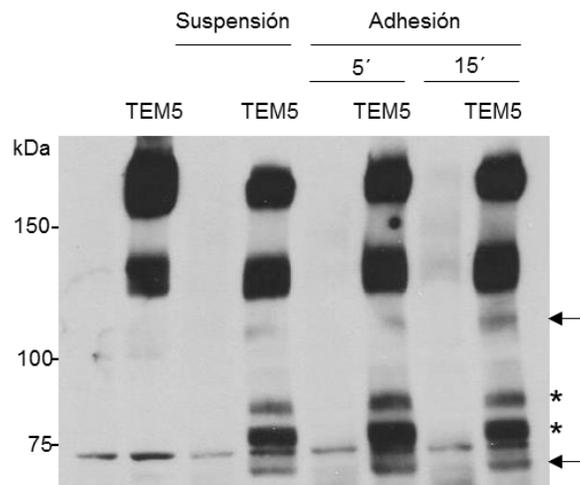


Figura 15. Perfil de expresión de TEM5 en la adhesión celular. Células que expresaban el control, EGFP Caax, o TEM5-GFP fueron sometidas al proceso de adhesión durante 5 y 15 minutos. Mediante la técnica de western-blot, dos bandas de aproximadamente 67 y 110 kDa fueron detectadas, marcadas con flechas negras, indicativo de algún corte proteolítico en el amino-terminal. Por otra parte, dos bandas entre un peso de 75-100 kDa marcados con asteriscos fueron observadas, sugiriendo modificaciones postraduccionales en el amino-terminal de TEM5.

En el proceso de adhesión, las células censan su entorno a través de estas estructuras conformadas por paquetes de actina en forma de dedo llamadas filopodios. Para que esta formación se lleve a cabo se necesita de la activación de la GTPasa Cdc42. Por lo anterior, se sugiere que la formación de filopodios promovida por TEM5 implica la activación de la GTPasa Cdc42. En condiciones de

adhesión por 30 minutos, la activación de Cdc42 fue significativamente mayor en las células que expresaban TEM5 en comparación con las células control. Asimismo, este receptor incrementó la activación de la GTPasa Rac1 discretamente versus el control como se muestra en la figura 16.

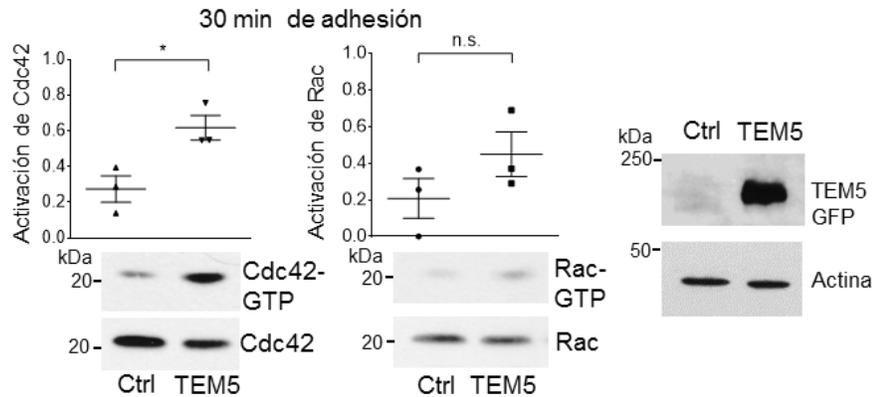


Figura 16. TEM5 promueve la activación de las GTPasas Cdc42 y Rac1. Las células ayunadas que expresaban TEM5 o las células de control se lisaron y se incubaron con perlas de PAK-N para capturar Cdc42 y Rac1 activos. Cdc42-GTP y Rac1-GTP se identificaron por Western blot. La actividad de Cdc42 y Rac1 se encontraron incrementadas en células COS-7 que expresaban a TEM5. La gráfica representa la media \pm SEM de la normalización de la activación Cdc42 y Rac1, t-test * $p < 0,05$, $n = 3$. Este experimento fue realizado por Sendi Rafael Adame García.

Posteriormente, decidimos evaluar la localización endógena de TEM5 en un modelo de células endoteliales (HUVECs) durante el proceso de adhesión. En la figura 17A se ilustra, al receptor endógeno localizado en la zona de protrusiones donde además se encontró actina polimerizada en células adheridas a los 30 minutos. Después, se evaluó la participación de TEM5 en el proceso de polaridad celular mediante un ensayo de cierre de herida. La identificación de células polarizadas se basa en la localización del aparato de Golgi dentro de un ángulo de 120° con respecto a la herida. Los resultados mostraron menos orientación celular en condiciones donde se abatió la expresión de TEM5 (células no polarizadas marcadas con una X) (Figura 17B). Estos hallazgos nos llevaron a investigar los mecanismos moleculares por los cuales TEM5 favorece la adhesión.

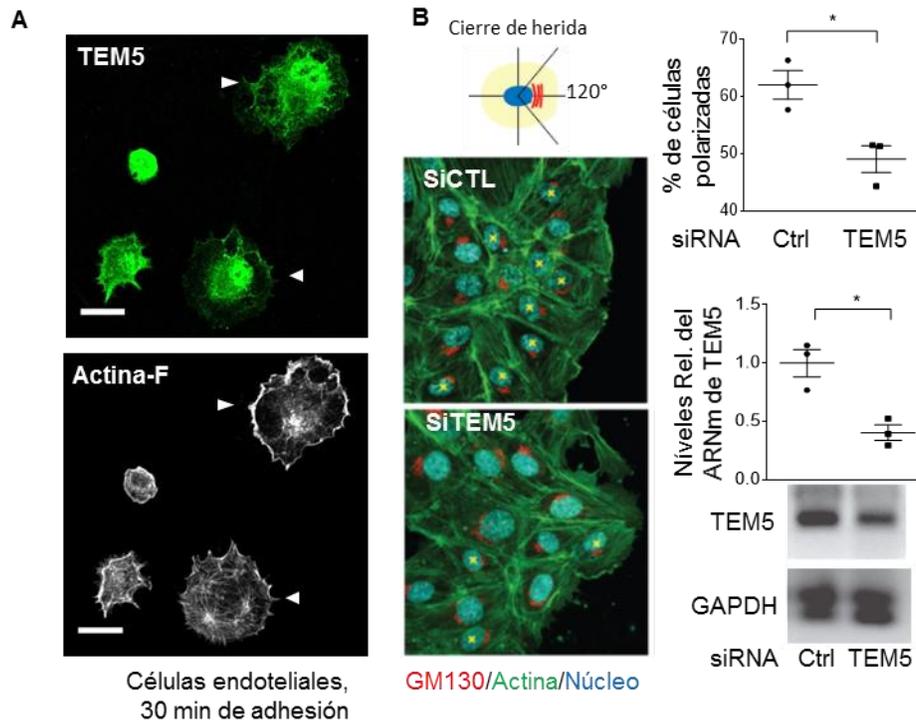


Figura 17. TEM5 localiza en proyecciones de células adheridas y favorece la polaridad celular en células endoteliales. A. TEM5 está localizado en las proyecciones celulares de células endoteliales adheridas. TEM5 endógeno (panel superior) co-localizó con actina filamentosa (panel inferior) en las proyecciones de células HUVEC recién adheridas por 30 minutos (puntas de flecha blancas) (36 de 60 células); Barra 20 μ m. B. TEM5 es requerido para la polarización de células HUVEC. Las células HUVEC con el siRNA contra TEM5 fueron menos polarizadas en el borde de la herida en comparación con las células con el siRNA control (siCTL). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y la actina filamentosa se visualizó con faloidina fluorescente verde. Las células que no tuvieron GM130 (un marcador Golgi, rojo) dentro de un ángulo de 120° con respecto a la herida se consideraron como células no polarizadas. Se examinaron aleatoriamente al menos 100 células cerca del borde de la herida. El porcentaje de células polarizadas se muestra en el gráfico superior, panel derecho. Los datos se representan como media \pm SEM, t-test * $p < 0,05$, (n = 3). La disminución del ARNm de TEM5 por el uso del siRNA fue confirmado por RT-PCR cuantitativa (panel derecho, gráfico inferior). Experimento realizado por Rony Chidiac.

TEM5 INTERACCIONA CON LA PROTEÍNA G $\beta\gamma$

Estudios previos han demostrado que algunos ADGRs promueven la actividad de las GTPasas de la familia de Rho vía el acople a las proteínas G heterotriméricas o a través del carboxilo terminal como en el caso de los receptores BAI1 y BAI3 pertenecientes a esta misma familia, para promover eventos funcionales mediante el complejo Elmo/Dock. Por consiguiente, decidimos investigar a detalle si en la cascada de transducción de señales del receptor TEM5 se reclutaba a las proteínas G y al complejo Elmo/Dock como se muestra en el esquema de la figura 18A. Primeramente, demostramos que el receptor TEM5 se encuentra en el complejo de adhesión aislado junto con la proteína G $\beta\gamma$ y no así la cinasa AKT, como control de que la preparación no se encuentra contaminada con proteínas del citoplasma no involucradas en la adhesión. En este contexto, la inhibición de la proteína Gi, por el empleo de la toxina *Pertussis*, no modificó la presencia de nuestras proteínas de interés como se ilustra en la figura 18B.

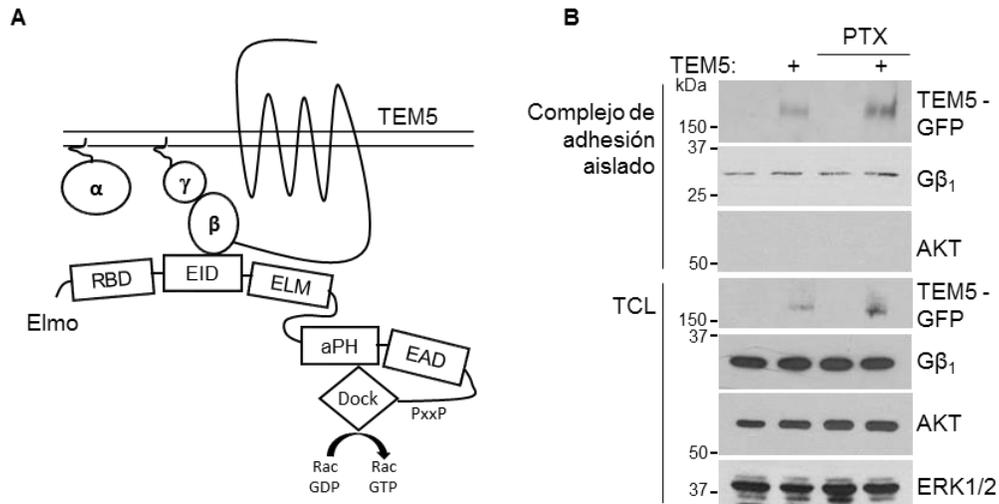


Figura 18. A. Modelo esquemático que muestra que TEM5 recluta Elmo vía Gβγ e interacciones directas entre dichas proteínas. B. Detección de TEM5 y Gβ₁γ₂ en el complejo de adhesión celular aislado. Las células COS-7 que expresaban EGFP Caax, como control, o TEM5-GFP se dejaron adherir durante 30 min. Posteriormente, las células fueron lisadas sin raspar, y las proteínas en los complejos de adhesión que permanecieron unidas a la placa se lavaron y se recuperaron con buffer de muestra Laemmli 4X. Flag-TEM5-GFP y Gβγ se detectaron por Western blot en los complejos de adhesión aislados, así como en los lisados celulares totales (TCL). La cinasa AKT se utilizó como un marcador citosólico (ausente en el complejo de adhesión aislado) y, junto con ERK, sirvieron como controles de carga en TCL.

Posteriormente, decidimos investigar si TEM5 favorecía la actividad de otro tipo de proteína G. Por lo tanto, investigamos la señalización río abajo de la proteína Gs mediante la detección de la fosforilación de la proteína de unión a elemento de respuesta a AMPc (CREB), que actúa como factor de transcripción. Como se observa en el segundo carril de la figura 19, la expresión de TEM5 en células de mamífero incrementó la actividad de CREB. Dicha actividad, detectada por la fosforilación en la serina 133, fue abatida al usar el inhibidor de la cinasa PKA, H-89. La señalización dependiente de EGF incrementó la actividad de este factor transcripcional, la cual también disminuyó con el inhibidor H-89 pero no así la fosforilación en ERK1/2.

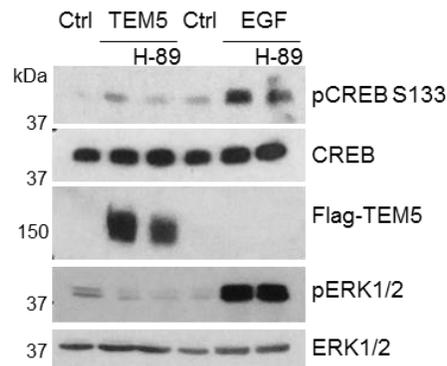


Figura 19. La inactivación de la cinasa PKA disminuye la fosforilación de CREB inducida por la expresión de TEM5. Las células HEK293T fueron transfectadas con el control, pCEFL, o 3xFlag TEM5. Las células ayunadas durante 12 horas fueron preincubadas por una hora con H-89 (10 μ M), un inhibidor de la activación de PKA. La estimulación con el factor de crecimiento epidermal (EGF, 10 ng/ml) fue por 10 min. Como se observa en el segundo carril, la fosforilación de CREB fue promovida por la expresión de TEM5; sin embargo, el inhibidor H-89 disminuye el efecto observado en la actividad de CREB por expresión de TEM5. La señalización del receptor para EGF sirvió como control para confirmar que el inhibidor H-89 funcionó selectivamente, ya que no se observó disminución en la actividad de ERK1/2.

En base los resultados anteriores, evaluamos una posible interacción entre TEM5 y el complejo G β γ ₂, encontrando que efectivamente existe una asociación entre TEM5 y las subunidades G β γ ₂ en condiciones basales de las células HEK293T. Adicionalmente, se encontró que las subunidades G β γ ₂ interaccionaron con la proteína multi-dominio Elmo1. Dicha asociación fue abatida por la expresión de la subunidad Galphai, lo cual sugiere que Elmo es un nuevo efector de G β γ ₂ (figura 20).

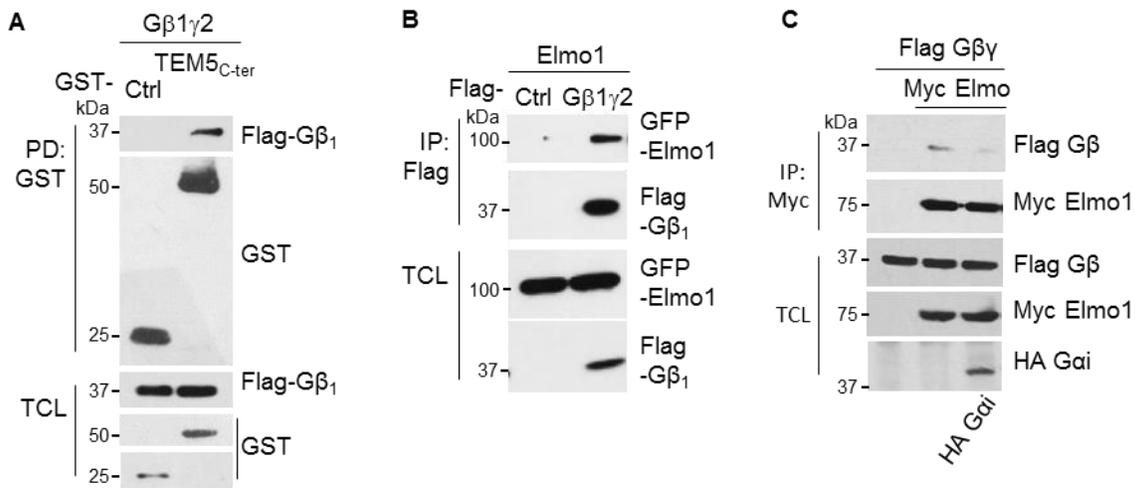


Figura 20. A. El C-terminal de TEM5 interactúa con las subunidades Gβ1γ2. Las células HEK293T fueron co-transfectadas con GST-TEM5 C-terminal y Flag-Gβ1γ2. la interacción entre el carboxilo-terminal de TEM5 y Gβ1γ2 se detectó por ensayos de GST-pulldown. B. Elmo interactúa con Gβ1γ2. Las células HEK293T fueron co-transfectadas con GFP-Elmo y Flag-Gβγ o pCEFL-vector, como control. La interacción entre Elmo y Gβ1γ2 se confirmó por co-inmunoprecipitación. C. La interacción entre Elmo y Gβ1γ2 disminuye por la expresión de la subunidad Galfa. Las células HEK293T fueron co-transfectadas con GFP-Elmo, Flag-G β1γ2 y HA Gαi. La interacción entre Elmo y la subunidad Gβ1γ2 fue menor cuando además se co-expresó Galfai (indicado en el tercer carril).

En el sistema endógeno, usando células HUVECs, encontramos a Elmo fosforilado en la tirosina 713, dicha modificación postraduccional indica un estado activo, co-localizando con TEM5 en las proyecciones celulares durante el proceso de adhesión (figura 21A). Mediante la técnica de western-blot se confirmó que la activación de Elmo fue mayor en células HEK293T que expresaron a TEM5 (figura 21B). Estos resultados apoyan la idea de que TEM5 interacciona directamente con el complejo Elmo/Dock.

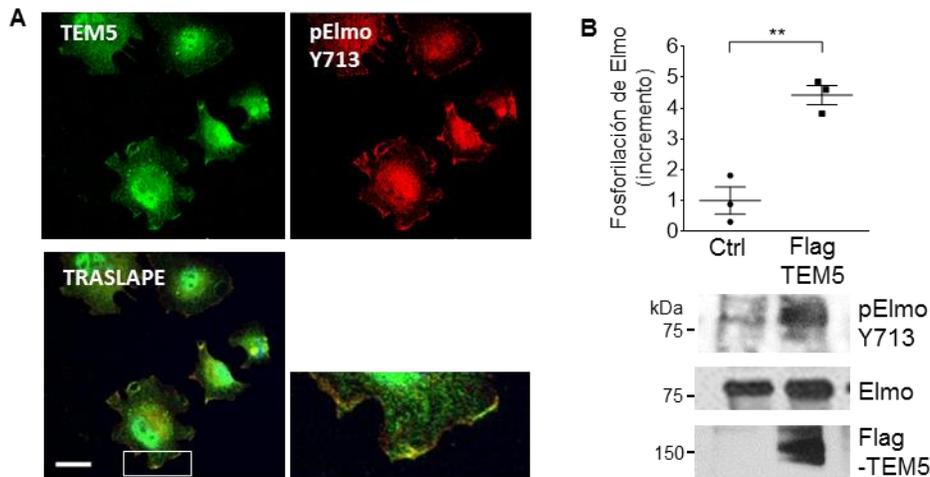


Figura 21. Elmo fosforilado localiza con TEM5 en las proyecciones celulares durante la adhesión de las células endoteliales. A. La localización de fosfo-Elmo y TEM5 se visualizó en células HUVEC adheridas durante 30 min, usando anticuerpos específicos. fosfo-Elmo (Y713) y TEM5 endógeno se enriquecieron en las protuberancias celulares (puntas de flecha blancas) de las células adheridas. Se observaron resultados similares en 95 de 142 células. La co-localización se confirmó mediante la evaluación de tres puntos diferentes en protrusiones celulares, de tres experimentos independientes. La barra de escala representa 20 μm . B. TEM5 promueve la fosforilación de Elmo en Y713. Se encontró Elmo (ElmoY713) activo en las células HEK293T que expresan TEM5 en comparación con las células HEK293T control transfectadas con el vector pCEFL (Ctl). La gráfica representa la media \pm SEM de la fosforilación de Elmo, t-test ** $p < 0,01$, $n = 3$.

EL CARBOXILO TERMINAL DE TEM5 INTERACCIONA CON EL COMPLEJO ELMO/DOCK

Por lo tanto, evaluamos si existía una asociación entre TEM5 y Elmo/Dock. Determinamos, por el ensayo de inmunoprecipitación del epítotope Flag fusionado al amino-terminal de TEM5, que existe una asociación entre TEM5 y Elmo endógeno en condiciones basales así como en el proceso de adhesión de células HEK293T (figura 22A). Adicionalmente, se empleó la construcción con el receptor TEM5 truncado en el carboxilo terminal para determinar si éste es necesario para la interacción con Elmo. Como se observa en la figura 22B el carboxilo terminal de TEM5 es requerido para asociar este complejo Elmo/Dock. La asociación entre el TEM5-Cter y Elmo en condiciones basales es positivamente modulada por las subunidades $G\beta_1\gamma_2$ (figura 22C).

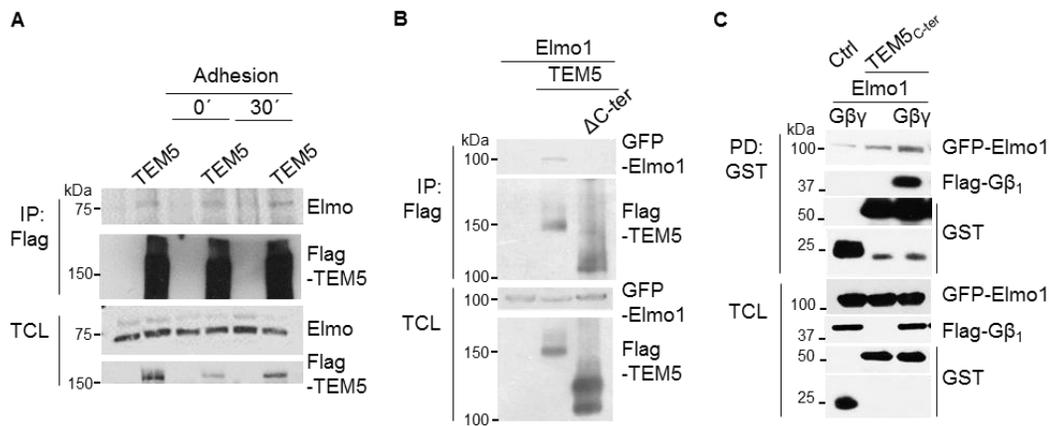


Figura 22. El carboxilo terminal de TEM5 interacciona con Elmo/Dock. A. Interacción entre TEM5 y Elmo endógeno en condiciones basales y durante la adhesión celular. TEM5 expresado con el epítipo Flag se inmunoprecipitó a partir de lisados celulares totales de células HEK293T en condiciones basales y de adhesión celular y Elmo endógeno asociado a TEM5 se detectó mediante Western-blot. B. El carboxilo de TEM5 es requerido para la unión a Elmo. El anticuerpo Flag fue empleado para la inmunoprecipitación de los lisados celulares de células HEK293T que expresaban GFP-Elmo1 y Flag-TEM5 (WT) o Flag-TEM5 que carecían de su extremo carboxilo terminal (Δ Ct). GFP-Elmo1 pudo interactuar con Flag-TEM5 WT pero no con la versión truncada Flag-TEM5 (Δ Ct). C. La asociación entre Elmo y la región C-terminal de TEM5 se incrementa en presencia de $G\beta_1\gamma_2$. Células HEK293T fueron co-transfectadas con la construcción de GST-TEM5 C-terminal (GST-G124Ct) y GFP-Elmo1 en presencia o no de Flag- $G\beta_1\gamma_2$. Se utilizó el vector GST como control. Los ensayos de GST-pulldown se realizaron y el efecto de $G\beta\gamma$ en la interacción entre GFP-Elmo y GST-TEM5 carboxilo-terminal se analizó por Western blot.

Además, TEM5 tuvo la capacidad de asociarse con las tres variantes de Elmo, y Dock180 también se detectó como parte del complejo de interacción como se ilustra en la figura 23A. Las células HEK293T fueron transfectadas con diferentes versiones truncadas de Elmo para determinar la región mínima de interacción con TEM5. Los resultados mostrados en la figura 23B indicaron que los fragmentos Elmo1-495 y Elmo1 315-727 interaccionaron con el carboxilo terminal de TEM5 mientras que Elmo 1-315 no fue capaz de unirse. Estos datos sugirieron que la

región central, conteniendo el dominio ELM, fue requerida para la unión con TEM5. De manera interesante, demostramos que la región mínima (dominio ELM) fue capaz de suprimir la adhesión promovida por TEM5 en células COS-7 como se muestra en la figura 23C.

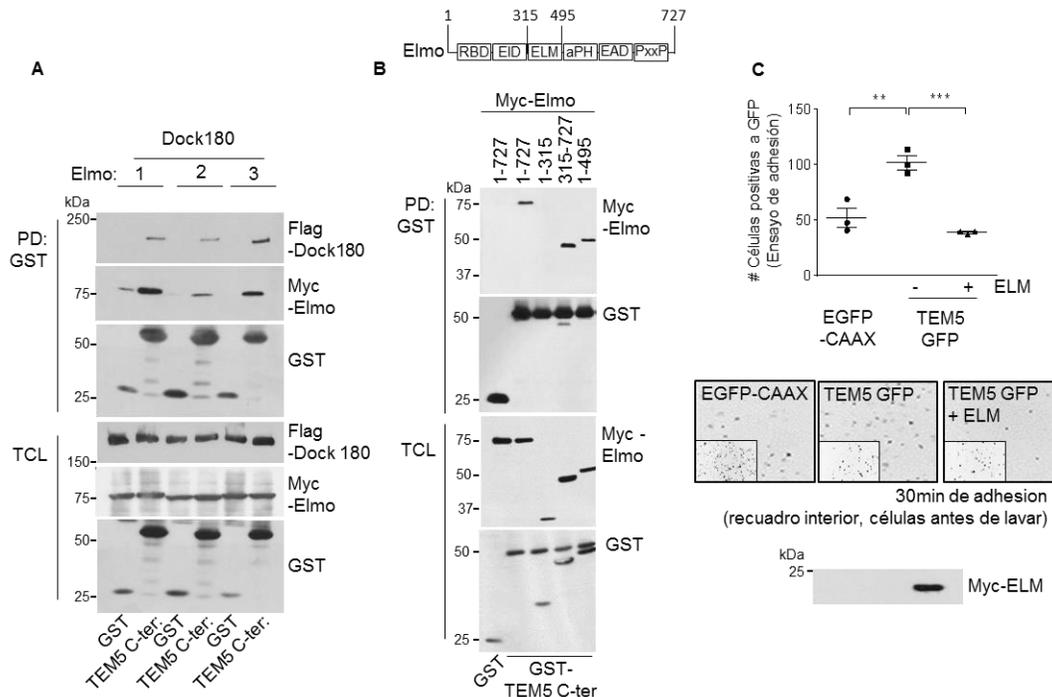


Figura 23. Mapeo de la interacción entre TEM5 y Elmo. A. El carboxilo de TEM5 interaccionó con las tres variantes de Elmo, además se detectó DOCK180 como parte del complejo de interacción. B. TEM5 interacciona con la región central de Elmo. Se co-transfectaron diferentes fragmentos de Elmo marcados con Myc y GST-TEM5 carboxilo-terminal (GST-TEM5 Ct) en células HEK293T. Experimentos de GST-pulldown se realizaron, Myc-Elmo completo y los fragmentos de Myc-Elmo1 que interactúan con GST-TEM5 Ct fueron detectados por western blot (panel superior). Los fragmentos de Elmo1 que contienen el dominio ELM interactuaron con TEM5 carboxilo-terminal mientras que Elmo1 (1-315) no lo hizo. C. El dominio Elmo1-Elm inhibe la adhesión celular promovida por TEM5. La adhesión celular dependiente de TEM5 se redujo en células COS7 que expresaban la región central de Elmo1 (dominio Elm). Los datos se representan como media \pm SEM, ** p < 0,01, *** p < 0,001. N = 3. Las imágenes representativas que muestran las células adheridas se ilustran en la parte inferior.

TEM5 INTERACCIONA CON LOS DOMINIOS SH3_{A-E} DE LAS INTERSECTINAS

Mediante la herramienta bioinformática Scansite 2.0 encontramos una secuencia rica en prolinas (PxxP) en el carboxilo de TEM5 potencialmente reconocida por uno de los dominios SH3 de Intersectina como se ilustra en el esquema de la figura 24A. Por lo tanto, investigamos si TEM5 co-localizaba con ITSN durante el proceso de adhesión en células HUVEC. De tal manera que, durante el proceso de adhesión, dichas proteínas endógenas co-localizan en las extensiones celulares como se observa en la figura 24B.

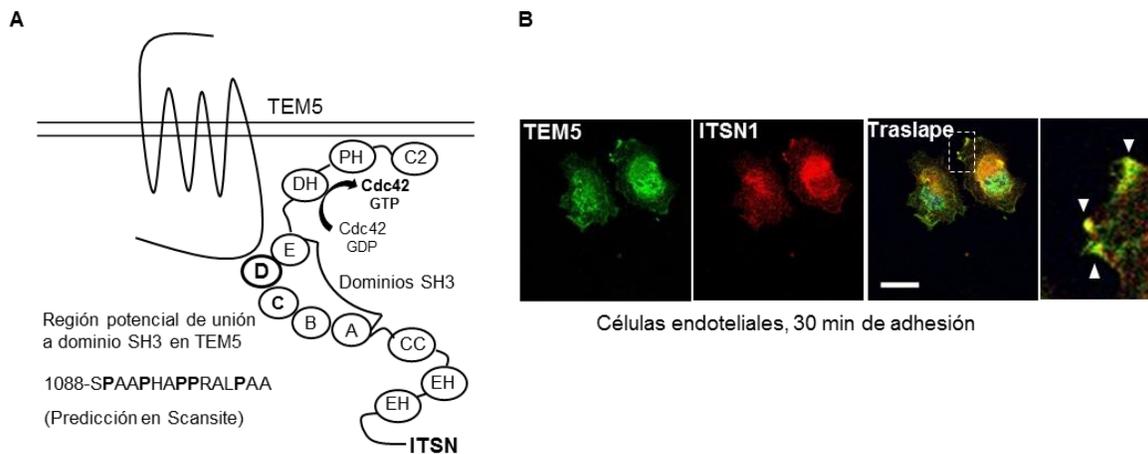


Figura 24. Esquema de la posible interacción entre TEM5 e ITSN. A. Representación esquemática de la interacción entre TEM5 e ITSN predicha por Scansite. B. TEM5 se localiza con ITSN en las proyecciones celulares de las células adherentes. TEM5 endógeno e ITSN se visualizaron por inmunotinción en las células HUVEC durante el proceso de adhesión durante 30 min. TEM5 se localizó con ITSN en las proyecciones de la membrana celular (puntas de flecha blanca). La co-localización se midió mediante la selección de tres áreas diferentes en las protrusiones por célula contando tres experimentos independientes. Se observaron resultados similares en 65 de 124 células. La barra de escala representa 20 μ m.

La figura anterior nos sugirió que estas proteínas interaccionan entre sí. Por esta razón, realizamos ensayos de precipitación por afinidad confirmando que el carboxilo terminal de TEM5 asocia a ambas Intersectinas completas y que además, la región que contiene los SH3 en tándem de ITSN1/2L fue capaz de asociarse con TEM5 Cter figura 25A y 25B.

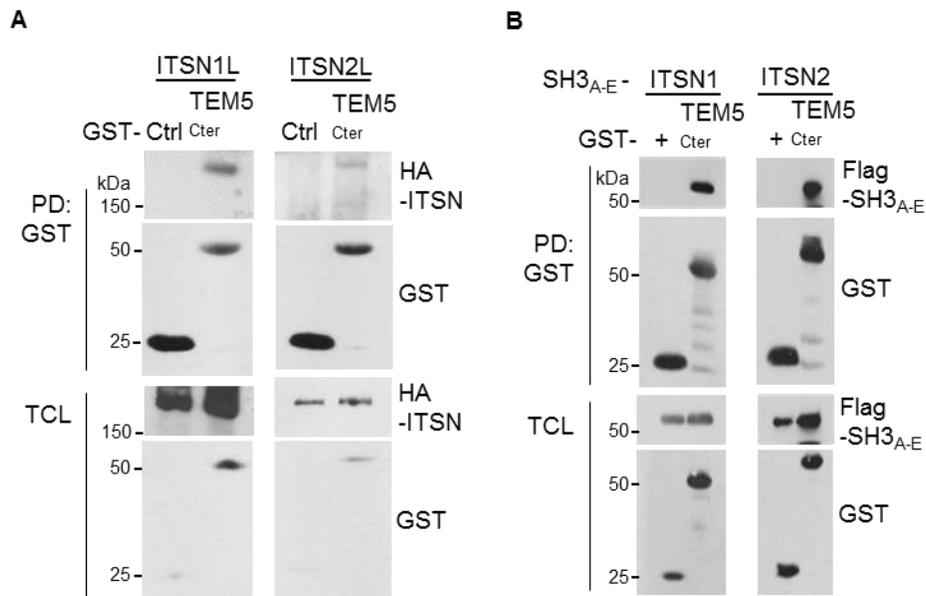


Figura 25. TEM5 interacciona con ITSN 1 y 2. A. Las células HEK293T fueron co-transfectadas con GST-TEM5 carboxilo-terminal (GST-TEM5 Ct) y HA-Intersectina 1 (HA-ITSN1L) o 2 (HA-ITSN2L). Ensayos de GST-pulldown se realizaron y, las ITSN1 y ITSN2 asociadas con TEM5 se revelaron por Western blot y GST se utilizó como control. B. El carboxilo de TEM5 interactúa con dominios SH3 de ITSNs. Células HEK293T fueron co-transfectadas con los dominios SH3A-E de ITSN1 o ITSN2 y GST-TEM5 carboxilo-terminal. Los ensayos de GST-pulldown revelaron que los dominios SH3A-E de ambas ITSNs fueron capaces de asociarse específicamente con TEM5 carboxilo-terminal, GST-vector se utilizó como control.

Aunado a lo anterior, el receptor TEM5 completo fue detectado asociado a la fracción de los módulos SH3 de las Intersectinas figura 26.

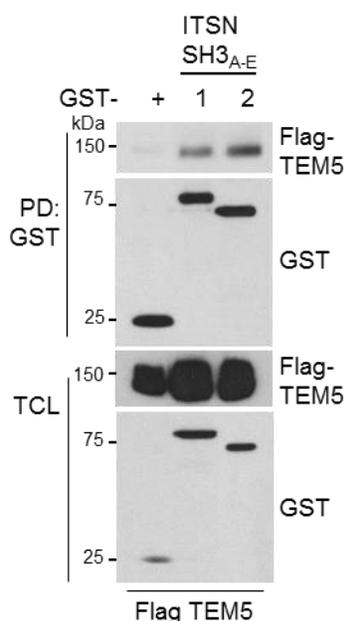


Figura 26. TEM5 completo interactúa con los dominios ITSN1 / 2-SH3A-E en células HEK293T. Las células se transfectaron con TEM5 completo fusionado al epítipo Flag y GST-ITSN1-SH3A-E o GST-ITSN2-SH3A-E. Ensayos de GST pulldown revelaron que TEM5 completo se detectó asociado a los dominios SH3A-E de ambas ITSNs, GST se utilizó como control. La expresión de proteínas transfectadas se confirmó en lisados celulares totales (TCL).

Después, evaluamos la posibilidad de encontrar una asociación preferencial de TEM5 por algún dominio SH3 de Intersectina1. Para ello, utilizamos las proteínas recombinantes de los dominios SH3 individuales de Intersectina1 con lisados de células transfectadas con el carboxilo de TEM5. Como se ilustra en la figura 27A se observó una ligera preferencia por el dominio SH3D, el cual se hizo más evidente cuando usamos lisados provenientes de células que expresaron ectópicamente al receptor completo (figura 27B).

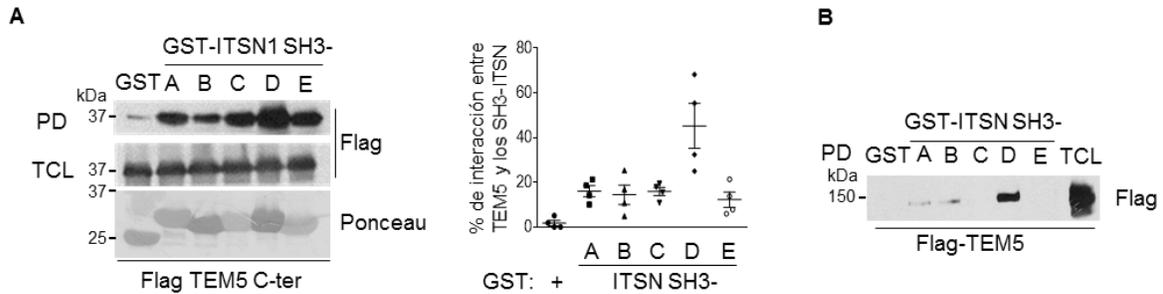


Figura 27. TEM5 interactúa directamente con los cinco dominios SH3 de ITSN1. A. Se transfectaron células HEK293T con el carboxilo de Flag-TEM5. Ensayos de GST pull down se realizaron utilizando GST-recombinante de los dominios SH3 individuales (A a E) de ITSN1 o GST-vector, utilizado como control. Todos los dominios ITSN1-SH3 interactuaron con TEM5 carboxilo-terminal, siendo ITSN1-SH3D dominio un interactor más eficaz. B. TEM5 completo interactúa preferentemente con el dominio ITSN1 - SH3D. Las células se transfectaron con Flag-TEM5 completo. Ensayos de GST pull down utilizando los dominios GST-ITSN1-SH3 (A a E) recombinantes o GST-vector, utilizado como control, mostraron que TEM5 preferentemente interactúa con ITSN1-SH3D.

LA ADHESIÓN DEPENDIENTE DE TEM5 ES MEDIADA POR SU INTERACCIÓN CON ITSN Y ELMO/DOCK180 FORMANDO UN MACROCOMPLEJO QUE LOCALIZA CON TEM5 EN EL PROCESO DE ADHESIÓN

Para este punto, nuestra hipótesis consistió en una posible interacción entre ITSN y Elmo para integrar la señalización de TEM5. Primero, identificamos la asociación entre ITSN transfectada con epítotope HA y Elmo endógeno mediante ensayos de inmunoprecipitación de éste, durante el proceso de adhesión de 30 minutos en células COS-7 (figura 28).

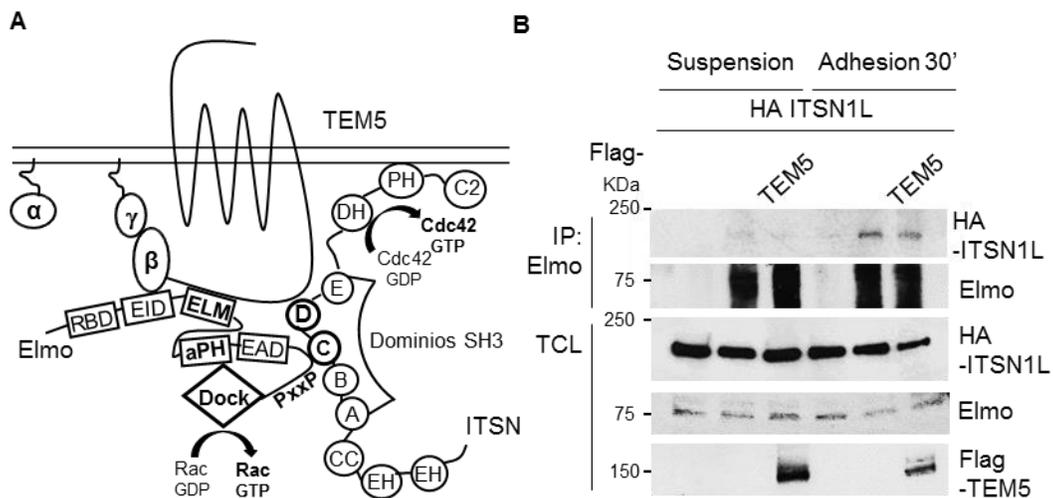


Figura 28. Elmo interactúa con ITSN durante la adhesión celular. A. Esquema de trabajo. TEM5 interactúa con el complejo Gβγ/ELMO/Dock, así como con ITSN1/2. Estos factores de intercambio de nucleótidos de guanina atípicos y convencionales también interactúan directamente entre sí, constituyendo un nuevo complejo de señalización que media la adhesión celular dependiente de TEM5. B. Las células COS7 que expresaban HA-ITSN1 completa y Flag-TEM5 se dejaron en suspensión o se adhirieron durante 30 min. Después se inmunoprecipitó Elmo endógeno y HA-ITSN1 se detectó mediante Western-blot. Se usó IgG de conejo pre-inmune como control negativo para inmunoprecipitación (primer carril para condiciones de suspensión y adherencia).

Después, caracterizamos que esta interacción es a través de la región rica en prolina (PxxP) en el carboxilo terminal de Elmo y los SH3 de ITSN1 figura 29A y 29B.

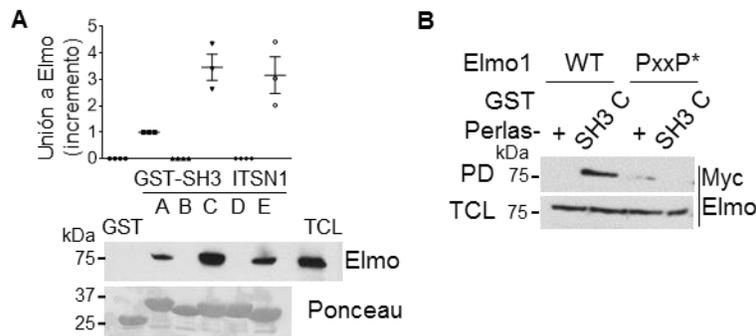


Figura 29. Mapeo de la interacción entre Elmo e Intersectina1. A. Elmo endógeno interactúa directamente con los dominios ITSN1-SH3A, ITSN1-SH3C y ITSN1-SH3E. A. Los lisados de células HEK293T se incubaron durante 3 horas a 4°C con los dominios GST-ITSN1-SH3 recombinantes individuales (A-E). Los ensayos de GST pulldown se realizaron como se describe en los métodos. Elmo endógeno se une específicamente a los dominios SH3A, SH3C y SH3E de ITSN1 (PD, western blot anti Elmo). Los dominios GST-ITSN-SH3 recombinantes se muestran teñidos con Rojo de Ponceau. B. Se requiere del motivo rico en prolina (PxxP) íntegro en Elmo para unirse al dominio ITSN1-SH3C. Los lisados de células de HEK293T que expresan Myc-Elmo de tipo silvestre o Myc-Elmo de PxxP * fueron incubados durante 3 horas a 4°C con el dominio GST-ITSN1-SH3C recombinante y Elmo se reveló mediante Western blot anti Myc (panel superior). La expresión de Elmo en los lisados celulares totales (TCL) se muestra en el panel inferior. Se usó GST como control negativo en los ensayos pulldown. La interacción entre Elmo y el dominio ITSN1-SH3C se perdió usando la mutante en la región rica en prolina de Elmo.

Dada la importancia de los módulos SH3 de Intersectina, decidimos evaluar la relevancia de estos dominios en el modelo de adhesión inducido por TEM5. Como esperábamos, los dominios SH3 en tándem bloquearon la adhesión de células que expresaron a TEM5 como se muestra en la figura 30.

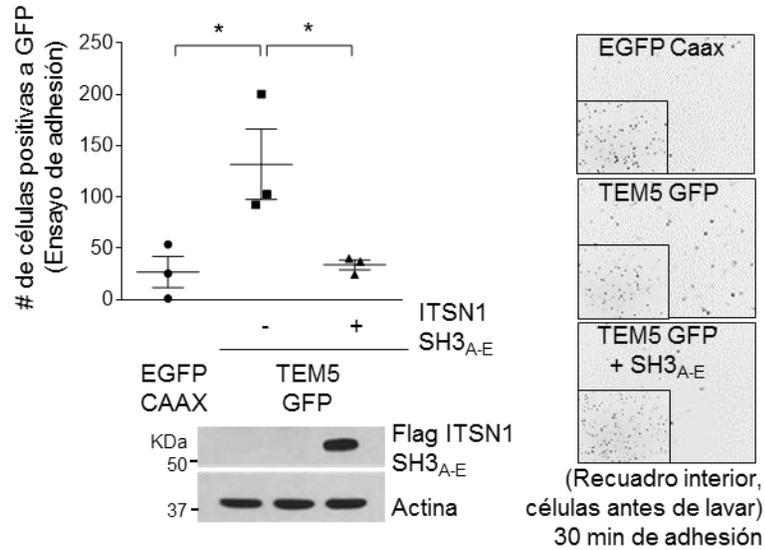


Figura 30. La adhesión celular dependiente de TEM5 es inhibida por el módulo ITSN1-SH3A-E. Las células COS-7 fueron transfectadas con TEM5-GFP con o sin el módulo Flag-ITSN1-SH3A-E. Los ensayos de adhesión celular se realizaron durante 30 minutos. La adhesión celular dependiente de TEM5 se redujo en las células que expresan el módulo Flag-ITSN1-SH3A-E. Se utilizó como referencia la adhesión basal de células que expresan EGFP-CAAX. Las barras representan la media \pm SEM, * $p < 0,05$, $n = 3$. Las imágenes representativas de las células adheridas se muestran debajo del gráfico. El panel inferior muestra la expresión del módulo Flag-ITSN1-SH3A-E en el lisado celular total, se usó actina como control de carga.

Una vez identificados los componentes del macrocomplejo, nos dimos a la tarea de investigar si éstos estaban presentes en el complejo de adhesión aislado usando matriz extracelular como colágena IV y fibronectina. Nuestros resultados indicaron que TEM5 ectópico, G β , Elmo e ITSN1 endógenos se encontraron en esta fracción insoluble, es decir, forman un complejo que permanece asociado al sustrato de difícil co-inmunoprecipitación. Mientras que la cinasa AKT fungió como control negativo como se muestra en la figura 31.

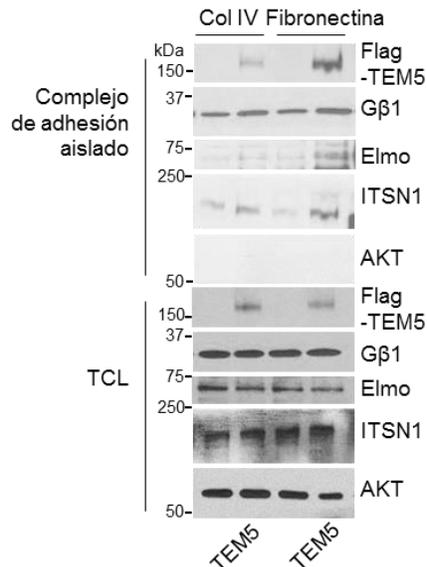


Figura 31. Presencia de TEM5, Gβγ, Elmo e ITSN1 en el complejo de adhesión aislado. Las células COS7 fueron transfectadas con el control, EGFP-Caax, o 3xFlag-TEM5-GFP y se sometieron al proceso de adhesión durante 30 min en placas revestidas con colágena IV o fibronectina. Las células adherentes se lisaron y las proteínas que permanecieron unidas a las placas se lavaron y se recuperaron con buffer de muestra de Laemmli 4X caliente. Las proteínas TEM5, Gβγ, Elmo e ITSN se detectaron por Western blot en el complejo de adhesión aislado, así como en los lisados celulares totales (TCL). Se usó la cinasa AKT para confirmar que los complejos de adhesión aislados no estaban contaminados por proteínas citosólicas no específicamente unidas y como un control de carga en TCL.

Mediante la técnica de ensayo de ligación por proximidad (PLA) se detectaron las interacciones endógenas entre TEM5 y Elmo así como TEM5 e ITSN1 en células endoteliales HUVECs. Los puntos rojos son indicativos de interacción como se muestra en la figura 32.

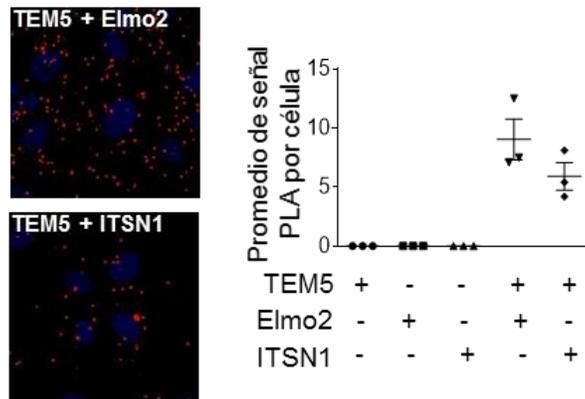


Figura 32. Interacción endógena entre TEM5 y Elmo2, así como TEM5 e Intersectina1 en las células endoteliales. Los Ensayos de Ligación de Proximidad se realizaron en células endoteliales (HUVEC) usando los pares de anticuerpos indicados para detectar TEM5 endógeno asociado con Elmo endógeno o con ITSN1 endógena. Los anticuerpos individuales se usaron solos como control. La señal de PLA por célula se cuantificó mediante el software Image J. Se analizaron al menos 30 células. La gráfica representa tres experimentos independientes, la media \pm SEM, n = 3. Las imágenes representativas de las señales PLA, representadas como puntos rojos, se muestran en los paneles de la izquierda. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI. Este experimento fue realizado por Noumeira Hamoud.

En el modelo endógeno, se observó la co-localización de este macrocomplejo conformado por TEM5, ITSN y Elmo/Dock en las protrusiones de las células endoteliales (HUVECs) tal y como se ilustra en la figura 33.

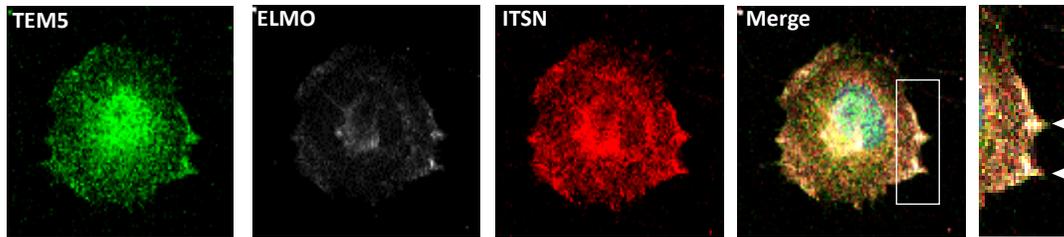


Figura 33. TEM5 endógeno se co-localiza con Elmo e ITSN en las protrusiones celulares de las células endoteliales adheridas. Los ensayos de adhesión celular se realizaron sobre cubreobjetos de vidrio revestidos con gelatina durante 30 minutos, seguido de una inmunotinción para determinar la localización de las proteínas endógenas TEM5, Elmo e ITSN en células HUVEC (flechas blancas). Se muestra una célula representativa. Se observaron resultados similares en 29 de 61 células.

En conjunto, estos resultados son consistentes con la idea de que TEM5 promueve la adhesión celular a través de interacciones directas con un complejo de señalización compuesto por Elmo / Dock y ITSN.

Finalmente, como se muestra en la figura 34, también se encontró una interacción entre TEM5 e IQGAP, una proteína asociada al proceso de adhesión célula-célula y estabilizadora de la actividad de las GTPasas Cdc42 y Rac1, que podría estar o no vinculada al proceso descrito en este trabajo. Por cuestiones de coordinación de experimentos no se profundizó su papel en la señalización de TEM5. Sin embargo, la relevancia de este hallazgo se abordará en futuros proyectos.

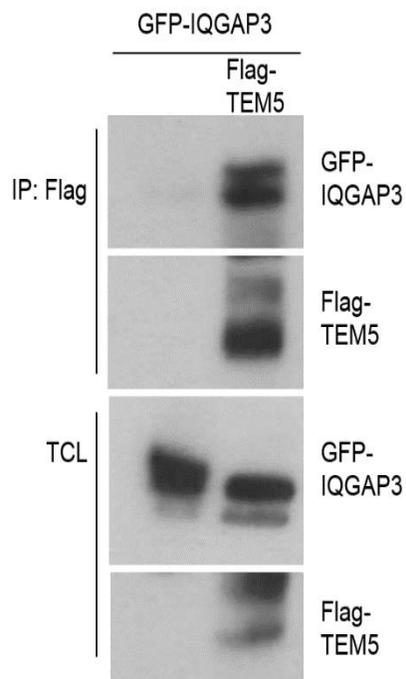


Figura 34. Interacción entre TEM5 e IQGAP3. Células HEK293T fueron transfectadas con vector control, pCEFL o Flag-TEM5. La lisis celular se realizó 48 horas postransfección. Los lisados fueron incubados con anticuerpo anti-Flag toda la noche a 4° C y, posteriormente con proteína G por 3 horas a 4° C. Se detectó con anticuerpo anti-GFP a IQGAP1 en la inmunoprecipitación de TEM5, observado en el segundo carril.

DISCUSIÓN

El receptor de adhesión TEM5/GPR124/ADGRA2 es un elemento clave para el evento de angiogénesis en el cerebro durante el desarrollo embrionario y también, en el establecimiento de las propiedades adhesivas de la barrera hematoencefálica (135,136). Dichos procesos, en parte están mediados por el papel de este ADGR huérfano, el cual fue recientemente identificado como un co-receptor de Frizzled 4 (Fzd 4) en la señalización específica de Wnt7a/b para promover la expresión génica regulada por beta-catenina en el desarrollo vascular cerebral (140,141) y su capacidad para controlar dinámicamente la morfología celular. En embriones nulos para TEM5, la homeostasis vascular cerebral ni las funciones de la barrera hematoencefálica son alteradas. Sin embargo, en el modelo murino de isquemia por oclusión de la arteria cerebral, los ratones carentes de la expresión de TEM5 exhiben una mayor área infartada y una disminución de la supervivencia en comparación de los ratones silvestres. Además, hay defectos en la barrera hematoencefálica favoreciendo hemorragias (148). Estos datos *in vivo* sugieren que TEM5 cumple funciones vitales para mantener la integridad de la barrera vascular cerebral mediante mecanismos no definidos. Por otro lado, estudios *in vitro* han relacionado a TEM5 con la brotación celular, por lo que sugiere que este ADGR recluta RhoGEFs para activar Rac y Cdc42 (71,135). En este proyecto de doctorado exploramos la hipótesis de que TEM5 promueve la adhesión celular a través de interacciones directas con Elmo/Dock180 e ITSNs, RhoGEFs para Rac y Cdc42 GTPasas, respectivamente (88).

Hasta el momento la identidad del agonista de TEM5 no está identificada. Por lo tanto, se emplearon pruebas de ganancia de función mediante la transfección transitoria con el plásmido que codifica a TEM5 para investigar si su expresión en células que normalmente carecen de este ADGR promueve la activación de las RhoGTPasas Cdc42 y Rac para favorecer la adhesión celular a través de interacciones con los GEFs Elmo/Dock e ITSNs. Además, se investigó si estos eventos moleculares correlacionaban con la localización de las proteínas

endógenas TEM5, Elmo e ITSN en las células endoteliales (HUVECs) durante la adhesión.

Considerando que TEM5 pertenece a la familia de GPCRs de adhesión, exploramos su papel en la regulación del proceso de la adhesión celular. En primera instancia, describimos que TEM5 es un promotor de este evento celular, tras incrementar el número de células adheridas comparadas con la situación control. En estas condiciones, la expresión de TEM5 silvestre fue confirmada por la técnica de western-blot pero además, otra banda de menor peso molecular fue detectada a la altura de lo que correspondería a TEM5 con el amino truncado, lo cual indicaría que TEM5 sufre un corte proteolítico en el proceso de adhesión. En la literatura se ha descrito que el amino terminal de TEM5 soluble, que contiene el dominio tipo inmunoglobulina (IG) y repeticiones ricas en leucina (LRR), tiene la facultad de asociarse a moléculas de adhesión celular como los glicosaminoglicanos e integrinas (149). Adicionalmente, TEM5 también favoreció la adhesión celular sobre matriz extracelular como colágeno IV y fibronectina obteniendo un mayor aumento en células adheridas. La fibronectina y el colágeno son proteínas de matriz extracelular esenciales en el desarrollo y el mantenimiento de la integridad de la vasculatura. Los ratones que carecen de fibronectina tienen defectos en el desarrollo de la vasculatura y mueren entre el noveno y décimo día de gestación (150). En el caso de los ratones transgénicos nulos para la expresión de colágeno IV son viables, sin embargo, mueren por fallas renales (151). Del mismo modo, la delección del gen para colágeno I es letal en los embriones de ratones debido a aberraciones de la estructura de los vasos sanguíneos (152,153). Aunado a lo anterior y considerando que un estudio previo demostró que la exposición del motivo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) en el amino-terminal de TEM5 es reconocido por la integrina $\alpha\beta_3$, se sugiere que TEM5 puede mediar la adhesión de células endoteliales mediante el reconocimiento de las integrinas (149).

La matriz extracelular del cerebro desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad de la barrera hematoencefálica. Esta consiste principalmente en proteoglicanos de sulfato de condroitina y proteínas de enlace

(154,155). Además, otros componentes como las lamininas, las trombospondinas y los proteoglicanos heparina-sulfato, las integrinas refuerzan la ECM del cerebro (156,157). Sustratos de las integrinas como la fibronectina y el colágeno IV inducen una unión eficaz de la línea de células endoteliales de cerebro de rata (GPNT) así como el cultivo primario del endotelio de cerebro de rata. De manera interesante, TEM5 regula positivamente la expresión de laminina y colágeno IV así como la señalización de la vía de Wnt en la isquemia cerebral de ratón (148,158). Considerando que la delección del gen para TEM5 tanto en el endotelio de ratones como en el condicionado en el modelo de derrame cerebral causa un fenotipo hemorrágico, se propone que TEM5 es un regulador clave de la integridad de la adhesión de la barrera hematoencefálica.

Por otra parte, las propiedades adhesivas de TEM5 no se observaron alteradas con el tratamiento de toxina *Pertussis* (PTX), lo que sugiere que dicha adhesión es independiente de la señalización de la proteína Gi. De manera interesante, la expresión de las subunidades G $\beta\gamma$ fue detectada en el complejo de adhesión aislado. Este complejo de G $\beta\gamma$ podría liberarse de la proteína heterotrimérica Gs ya que nuestros datos sugieren que TEM5 activa a la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB), proteína activada por la señalización de la proteína Gs. Dicha activación, que es detectada con un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada, es inhibida por el H-89, inhibidor de la cinasa PKA. De manera simultánea, encontramos que TEM5 ectópico promueve la adhesión celular con la activación simultánea de las GTPasas pequeñas Cdc42 y Rac1. Estas GTPasas han sido vinculadas a procesos relacionados con la coordinación de la dinámica de la actina, la velocidad de migración celular y la formación de extensiones de pseudópodos en melanoblastos (159). Cabe mencionar que los ratones carentes del gen para Cdc42 exhiben defectos en la adhesión mostrando una menor área de adhesión así como de los componentes que lo integran como FMNL2, una proteína perteneciente a la familia de las forminas que se relaciona con la migración y las protrusiones celulares (159,160). En el presente trabajo se encontró que TEM5 favorece la generación de filopodios, lo cual sugiere que este receptor regula la dinámica del complejo de adhesión asociado a

la activación de la GTPasas Cdc42 y Rac. Adicionalmente, de acuerdo con un estudio previo en células HEK293T que expresaban a TEM5 con el epítotope Myc, éste provocó un aumento en la formación de filopodios (137). Por otra parte, TEM5 fue localizado en las protrusiones celulares positivas a VASP, un marcador de filopodios que se asocia a actina, evidenciando su papel potencial sobre la regulación del citoesqueleto de actina. Dichas estructuras celulares son derivadas de la actividad de la GTPasa Cdc42 (71).

En células endoteliales adheridas, TEM5 endógeno se co-localiza con actina polimerizada en los bordes de las células, indicativo de la actividad de la GTPasa Rac. Además, la reducción de la expresión de TEM5 disminuyó la polarización de las células endoteliales inducida por el cierre de herida. Estos hallazgos, y el requisito de Cdc42 en el proceso de migración orientada promovida por TEM5 en las células endoteliales bEND3 estimuladas con medio condicionado de células del mesencéfalo (135), nos llevó a abordar directamente la interacción de TEM5 con el complejo Elmo/Dock, conocido por ser transductor de la señalización del grupo BAI perteneciente a los receptores ADGR (115,116); El papel potencial de $G\beta\gamma$, recientemente descrito como un "interactor" de Elmo (113), y un transductor significativo de señalización de GPCR a Rac; Y interacción potencial con ITSNs, RhoGEFs pertenecientes a la familia Dbl específicos para la GTPasa Cdc42, las cuáles se han vinculado al tráfico de vesículas y la polaridad celular (101).

Las Intersectinas (ITSNs) fueron postuladas como potenciales proteínas interactoras con el receptor TEM5, identificadas mediante un análisis bioinformático en Scansite tras la predicción de que los dominios homólogos a la cinasa Src (SH3) de ITSNs interaccionan con el carboxilo terminal de TEM5. De acuerdo a estas posibilidades, encontramos la existencia de un complejo de señalización entre Elmo/Dock180 y las ITSNs que representan un concepto completamente nuevo en términos de integración de señalización en el que dos clases distintas de factores de intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) atípicos y convencionales

específicos para RhoGTPasas, miembros de las familias Dock y Dbl, respectivamente, se integran en un complejo funcional.

La mayoría de los GPCR activan a las proteínas heterotriméricas G como transductores de las vías de señalización relacionadas con la adhesión y la quimiotaxis. Nosotros encontramos que existe una asociación entre TEM5 y las subunidades $G\beta\gamma$ y que además, ambas proteínas son detectadas en complejo de adhesión aislado. Se sabe que las subunidades $G\beta\gamma$ activan la Rac GTPasa a través de su interacción con GEFs de la familia Dbl, contribuyendo a reclutarlos a la membrana celular (161-163). Además, la evidencia reciente indica que Elmo es un efector directo de $G\beta\gamma$ tras la estimulación del receptor quimiotáctico CXCR4 (164). En el presente trabajo, hemos confirmado que $G\beta\gamma$ se asocia con Elmo (164) y también demostramos que el complejo $G\beta\gamma$ interactúa directamente con el carboxilo terminal de TEM5 aumentando la asociación de esta región con Elmo. Adicionalmente, el TEM5 C-terminal interactúa con Elmo1, Elmo2 y Elmo3, en todos los casos en complejo con Dock180, lo que indica una posible redundancia de estos complejos en la adhesión celular dependiente de TEM5. Por lo tanto, se utilizó la región central de Elmo, mapeado como el dominio de interacción mínima, para evaluar su efecto sobre la adhesión celular. Consistente con un papel del sistema Elmo/Dock en la adhesión celular estimulada por la expresión de TEM5, el dominio ELM de Elmo inhibió este efecto, indicando que TEM5 utiliza el sistema $G\beta\gamma$ /Elmo/Dock para promover la adhesión celular. Por otra parte TEM5 co-localiza con Elmo fosforilado, indicativo de su activación, durante la adhesión de las células endoteliales y, además como se observa en las células HEK293T, la expresión de TEM5 promueve la activación de Elmo2 como lo demuestra su fosforilación en tirosina 713 (Y713), sitio equivalente para la tirosina 720 de Elmo1. Esta fosforilación no afecta la formación del complejo Elmo1/Dock180 aunque contribuye de manera sinérgica a la activación de la GTPasa Rac1 (165).

La identidad de la cinasa implicada en la fosforilación de Elmo dependiente de TEM5 queda por aclararse. En este caso, los receptores de tirosina cinasa (TRKs) pueden estar implicados. Las evidencias emergentes que indican un papel

de TEM5 en la migración celular dependiente de VEGF (142) abren la posibilidad de que este receptor tirosina cinasa pueda estar implicado en la regulación de Elmo en la señalización de TEM5 en células endoteliales. En los bordes celulares de *Drosophila*, el complejo Elmo/Dock es un sistema esencial en la señalización en las vías de los receptores con actividad de tirosina cinasa como PDGF y VEGF durante la fase inicial de migración colectiva (166). Además, trabajos previos demostraron que Axl, un receptor tirosina cinasa, conduce a la fosforilación de Elmo, esencial para la activación Rac en células de cáncer de mama (167). En la literatura se ha descrito que la activación de las cinasas de la familia Src tales como Src, Fyn o Yes en la señalización de GPCRs (LPA, α 2A adrenérgico) con acople predominante a la proteína Gi se debe al reclutamiento de las subunidades $G\beta\gamma$, mientras que los GPCRs asociados a la proteína Gq/11 (muscarínico o angiotensina II) activan a estas cinasas por la subunidad $G\alpha$ (168,169). De tal manera que algunas cinasas pertenecientes a la familia de Src podrían estar vinculadas en la señalización cruzada de receptores con actividad intrínseca de tirosina cinasa con TEM5 para llevar a cabo la activación de Elmo.

Independientemente de su interacción con Elmo, TEM5 también interacciona directamente con las Intersectinas, que constituyen un subgrupo de RhoGEF con un dominio DH específico para la GTPasa Cdc42. Se ha reportado que la expresión de la versión completa de Intersectina 1 así como sólo del dominio DH promueven la formación de filopodios en fibroblastos (89). Nosotros encontramos que TEM5 localiza con la Intersectina 1 en las proyecciones celulares de células endoteliales sometidas al proceso de adhesión. Adicionalmente, la versión de Intersectina que conserva los dominios DH y PH localiza particularmente con la actina en las membranas onduladas (170). Por lo que se sugiere es que la Intersectina que co-localiza con TEM5 en las protrusiones de células endoteliales adheridas está activa. Además, confirmamos la interacción entre ambas proteínas mediante el uso de la técnica de "pull down" del carboxilo terminal de TEM5, el cual es capaz de asociarse con los cinco dominios individuales SH3 de ITSN1. Sin embargo, la versión completa de TEM5 interactúa preferentemente con el dominio ITSN1-SH3D. Se ha demostrado que interacciones intramoleculares de la

Intersectina ejercen un efecto autoinhibitorio comprometiendo el reconocimiento de la GTPasa Cdc42 para su activación. Los dominios SH3A, C y D de Intersectina interaccionan con su dominio catalítico DH, con mayor predilección por el dominio SH3D (170). Este dato sugiere que TEM5 abate la autoinhibición de la Intersectina tras su unión al dominio SH3D. Dado que se sabe que la región ITSN1-SH3s interactúa con múltiples proteínas de señalización (89,90), nuestros resultados apuntan a la interesante posibilidad de que TEM5 trae asociado un complejo de señalización macromolecular incluyendo los sistemas $G\beta\gamma$ /Elmo/Dock y las ITSNs, cada uno de estos componentes del macrocomplejo interactúan específicamente con TEM5 a través de dominios particulares y también muestran interacciones directas entre ellos.

En este trabajo demostramos que las versiones completas de las proteínas Elmo e Intersectina interaccionan durante el proceso de adhesión, aun en ausencia de TEM5 en las células modelo, lo que indica que este complejo de señalización podría estar disponible para otras vías de señalización además de la inducida por TEM5. Específicamente, la región rica en prolina en el carboxilo terminal de Elmo interactúa con los dominios SH3A, SH3C y SH3E de ITSN, pero no con el módulo SH3D, el cual es el dominio de unión preferido a TEM5. Estos complejos de señalización median la adhesión celular dependiente de TEM5, como se indica por el efecto inhibitorio de los dominios que interactúan con TEM5 derivados tanto de Elmo como de ITSN. En el caso del aislamiento del complejo de adhesión se logró detectar la expresión ectópica de TEM5 y endógena de las subunidades $G\beta\gamma$ así como Elmo e ITSN1. Sin embargo, no todas las proteínas son susceptibles a la localización en este complejo de adhesión ya que la cinasa AKT no es detectada en esta condición. Dicha fracción aislada, la cual supondría ser insoluble, complica la precipitación de las proteínas de nuestro interés para demostrar la interacción endógena mediante experimentos típicos de inmunoprecipitación. Sin embargo, mediante el ensayo de ligación por proximidad (PLA), la cual consiste en la hibridación de oligonucleótidos acoplados a anticuerpos de diferente origen que se encuentran cercanos entre sí, se logró detectar la interacción endógena entre TEM5 y Elmo así como de TEM5 e Intersectina.

El proceso de adhesión también es importante en la progresión del cáncer. Las células cancerosas forman invadopodia, la cual consiste en protuberancias ricas en actina en la membrana asociada a la degradación de matriz extracelular. En este contexto, la proteína IQGAP es un componente central de los anillos positivos a actina y vinculina en invadopodia. Cabe mencionar que su reclutamiento a estos sitios está limitado tras la inhibición de integrinas y la cinasa ligada a integrina (ILK) (171). Adicionalmente, se ha descrito que la integrina $\alpha\beta3$ interacciona con IQGAP (172), misma molécula de adhesión que se une a la fracción soluble del amino terminal de TEM5. En este trabajo demostramos que TEM5 se asocia con la proteína de andamiaje IQGAP. Esta proteína está relacionada en eventos de regulación del citoesqueleto de actina, proliferación, migración, angiogénesis y metástasis (173-175). No se descarta la posibilidad de que también la proteína IQGAP esté involucrada en procesos de adhesión dependientes de la señalización de TEM5.

Las propiedades de señalización de TEM5 y la mayoría de otros GPCR de adhesión están menos caracterizadas que las de otras familias de GPCR (108,121,176). Aquí, mostramos que TEM5 promueve la adhesión celular a través de interacciones directas con los sistemas $G\beta\gamma$ /Elmo/Dock e ITSNs como se ilustra el modelo en la figura 35. Estos RhoGEFs forman un complejo de señalización previamente no caracterizado que, basado en nuestros hallazgos actuales, podría tener un papel potencialmente amplio en la señalización de los ADGRs.

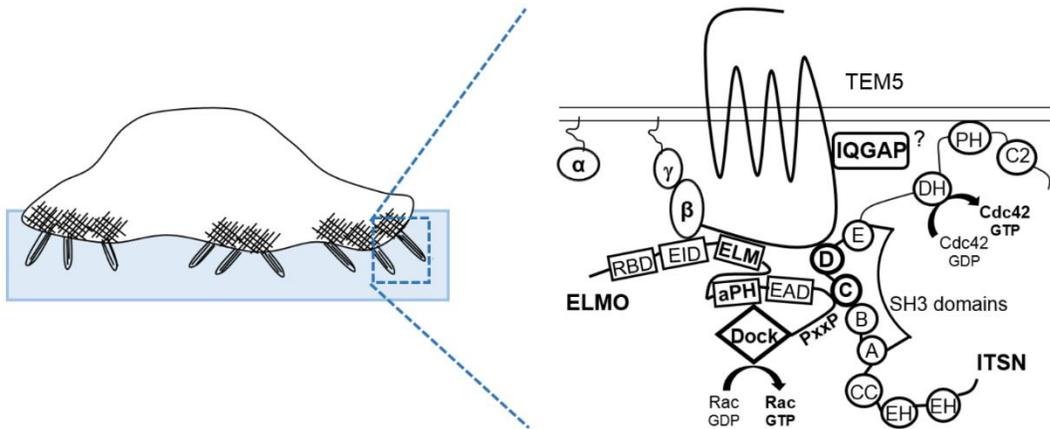


Figura 35. Modelo de señalización de TEM5 en el proceso de adhesión. TEM5 interacciona con el complejo Gβγ/ ELMO/Dock, así como con ITSN1 / 2. Estos factores intercambiadores de nucleótidos de guanina atípicos y convencionales también interactúan directamente entre sí, constituyendo un nuevo complejo de señalización que media la adhesión celular dependiente de TEM5 y, en donde también pudieran estar participando las proteínas IQGAPs.

CONCLUSIONES

1. La presencia de TEM5 promovió una eficiente adhesión, de células que normalmente no lo expresan, ligada a su localización en filopodios y la formación de estos, y a la activación de las GTPasas Cdc42 y Rac. Este evento celular fue favorecido aún más por los sustratos colágena IV y fibronectina. Adicionalmente, logramos identificar la presencia de TEM5, G β 1 γ 2, Elmo e Intersectina1 como componentes del complejo de adhesión aislado.

2. Nosotros demostramos que TEM5 se asoció con proteínas moduladoras positivas de la actividad de Cdc42 y Rac: G β 1 γ 2, Elmo/Dock, Intersectina e IQGAP3. Las regiones mínimas de interacción de TEM5 con Elmo, dominio ELM, e Intersectina, dominios SH3, abatieron la adhesión inducida por TEM5.

De manera interesante, nuestro trabajo describió por primera vez la asociación entre GEFs atípicos y convencionales: ITSN y Elmo; mediante los dominios SH3A, C y E de ITSN1 y la región PxxP de Elmo, y además se observó enriquecida en el proceso de adhesión.

3. La expresión de TEM5 favoreció la actividad de Elmo en células modelo. Aunado a lo anterior, nosotros determinamos la colocalización de TEM5 con Elmo fosforilado en la tirosina 713 así también con Elmo e Intersectina en las protrusiones de células endoteliales adheridas durante 30 minutos.

En resumen, TEM5 favoreció la adhesión celular mediante el reclutamiento de dos sistemas de GEFs: ITSN y Elmo/Dock, promotores de la actividad de Cdc42 y Rac, respectivamente.

PERSPECTIVAS

1. Elucidar el efecto de la interacción entre IQGAP y TEM5 en eventos celulares como adhesión celular, migración y angiogénesis.
2. Investigar los mecanismos moleculares vinculados a la localización de TEM5 en los filopodios, en los que participen proteínas asociadas a filamentos de actina (VASP, MyoX, mDia2 y Espin) durante el proceso de adhesión.
3. De acuerdo a nuestros hallazgos, GEFs pertenecientes a dos distintas familias pueden interactuar. Por lo tanto, es importante determinar si los DBL-RhoGEFs estructuralmente parecidos a Intersectina se asocian con GEFs de la familia de DOCKs para eventos relacionados con adhesión, migración celular y angiogénesis.
4. Caracterizar a detalle los mecanismos moleculares por los cuales TEM5 promueve la fosforilación de Elmo. En este contexto, determinar si hay comunicación cruzada con receptores con actividad de tirosina cinasa.
5. Caracterizar la interacción TEM5 y los RhoGEFs: Intersectinas y el complejo ELMO/DOCK en eventos de angiogénesis tumoral en modelos *in vivo*.
6. Considerando que TEM5 favorece la fosforilación de CREB por actividad de la cinasa PKA, demostrar su implicación transcripcional sobre la regulación de genes relacionados a la adhesión, migración y angiogénesis.

REFERENCIAS

1. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., and Bray, F. (2015) *Int J Cancer* **136**, E359-386
2. Salud, S. d. (2016) Sabías que en México se registran 160 mil nuevos casos de cáncer al año. Gobierno de la Ciudad de Mexico, Ciudad de México
3. (2016) *Lancet* **388**, 1659-1724
4. Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., Jr., and Kinzler, K. W. (2013) *Science* **339**, 1546-1558
5. Pires-daSilva, A., and Sommer, R. J. (2003) *Nat Rev Genet* **4**, 39-49
6. Zehir, A., Benayed, R., Shah, R. H., Syed, A., Middha, S., Kim, H. R., Srinivasan, P., Gao, J., Chakravarty, D., Devlin, S. M., Hellmann, M. D., Barron, D. A., Schram, A. M., Hameed, M., Dogan, S., Ross, D. S., Hechtman, J. F., DeLair, D. F., Yao, J., Mandelker, D. L., Cheng, D. T., Chandramohan, R., Mohanty, A. S., Ptashkin, R. N., Jayakumar, G., Prasad, M., Syed, M. H., Rema, A. B., Liu, Z. Y., Nafa, K., Borsu, L., Sadowska, J., Casanova, J., Bacares, R., Kiecka, I. J., Razumova, A., Son, J. B., Stewart, L., Baldi, T., Mullaney, K. A., Al-Ahmadie, H., Vakiani, E., Abeshouse, A. A., Penson, A. V., Jonsson, P., Camacho, N., Chang, M. T., Won, H. H., Gross, B. E., Kundra, R., Heins, Z. J., Chen, H. W., Phillips, S., Zhang, H., Wang, J., Ochoa, A., Wills, J., Eubank, M., Thomas, S. B., Gardos, S. M., Reales, D. N., Galle, J., Durany, R., Cambria, R., Abida, W., Cercek, A., Feldman, D. R., Gounder, M. M., Hakimi, A. A., Harding, J. J., Iyer, G., Janjigian, Y. Y., Jordan, E. J., Kelly, C. M., Lowery, M. A., Morris, L. G. T., Omuro, A. M., Raj, N., Razavi, P., Shoushtari, A. N., Shukla, N., Soumerai, T. E., Varghese, A. M., Yaeger, R., Coleman, J., Bochner, B., Riely, G. J., Saltz, L. B., Scher, H. I., Sabbatini, P. J., Robson, M. E., Klimstra, D. S., Taylor, B. S., Baselga, J., Schultz, N., Hyman, D. M., Arcila, M. E., Solit, D. B., Ladanyi, M., and Berger, M. F. (2017) *Nat Med*
7. Di Nicolantonio, F., Mercer, S. J., Knight, L. A., Gabriel, F. G., Whitehouse, P. A., Sharma, S., Fernando, A., Glaysher, S., Di Palma, S., Johnson, P., Somers, S. S., Toh, S., Higgins, B., Lamont, A., Gulliford, T., Hurren, J., Yiangou, C., and Cree, I. A. (2005) *BMC Cancer* **5**, 78
8. Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Haserlat, S. M., Supko, J. G., Haluska, F. G., Louis, D. N., Christiani, D. C., Settleman, J., and Haber, D. A. (2004) *N Engl J Med* **350**, 2129-2139
9. Turajlic, S., Furney, S. J., Lambros, M. B., Mitsopoulos, C., Kozarewa, I., Geyer, F. C., Mackay, A., Hakas, J., Zvelebil, M., Lord, C. J., Ashworth, A., Thomas, M., Stamp, G., Larkin, J., Reis-Filho, J. S., and Marais, R. (2012) *Genome Res* **22**, 196-207
10. Colabufo, N. A., Contino, M., Niso, M., Berardi, F., Leopoldo, M., and Perrone, R. (2011) *Front Biosci (Landmark Ed)* **16**, 1811-1823
11. Azzariti, A., Porcelli, L., Simone, G. M., Quatrone, A. E., Colabufo, N. A., Berardi, F., Perrone, R., Zucchetti, M., D'Incalci, M., Xu, J. M., and Paradiso, A. (2010) *Cancer Chemother Pharmacol* **65**, 335-346
12. Abdullah, L. N., and Chow, E. K. (2013) *Clin Transl Med* **2**, 3
13. Satta, T., Isobe, K., Yamauchi, M., Nakashima, I., and Takagi, H. (1992) *Cancer* **69**, 941-946
14. Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., and Yu, Q. (2015) *Mol Cancer* **14**, 48

15. Wesierska-Gadek, J., Mauritz, M., Mitulovic, G., and Cupo, M. (2015) *J Cell Biochem* **116**, 2824-2839
16. Tewari, K. S., Eskander, R. N., and Monk, B. J. (2015) *Clin Cancer Res* **21**, 3829-3835
17. Beckta, J. M., Ahmad, S. F., Yang, H., and Valerie, K. (2014) *Cell Cycle* **13**, 710-713
18. Yu, J. S., and Cui, W. (2016) *Development* **143**, 3050-3060
19. Cicenias, J., Tamosaitis, L., Kvederaviciute, K., Tarvydas, R., Staniute, G., Kalyan, K., Meskinyte-Kausiliene, E., Stankevicius, V., and Valius, M. (2017) *Med Oncol* **34**, 26
20. Carmeliet, P. (2000) *Nat Med* **6**, 389-395
21. Augustin, H. G., Kozian, D. H., and Johnson, R. C. (1994) *Bioessays* **16**, 901-906
22. Stapor, P. C., Sweat, R. S., Dashti, D. C., Betancourt, A. M., and Murfee, W. L. (2014) *J Vasc Res* **51**, 163-174
23. Fantin, A., Vieira, J. M., Plein, A., Denti, L., Fruttiger, M., Pollard, J. W., and Ruhrberg, C. (2013) *Blood* **121**, 2352-2362
24. Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., and Betsholtz, C. (2003) *J Cell Biol* **161**, 1163-1177
25. Siekmann, A. F., and Lawson, N. D. (2007) *Nature* **445**, 781-784
26. Claxton, S., and Fruttiger, M. (2004) *Gene Expr Patterns* **5**, 123-127
27. De Bock, K., Georgiadou, M., Schoors, S., Kuchnio, A., Wong, B. W., Cantelmo, A. R., Quaegebeur, A., Ghesquiere, B., Cauwenberghs, S., Eelen, G., Phng, L. K., Betz, I., Tembuysen, B., Brepoels, K., Welti, J., Geudens, I., Segura, I., Cruys, B., Bifari, F., Decimo, I., Blanco, R., Wyns, S., Vangindertael, J., Rocha, S., Collins, R. T., Munck, S., Daelemans, D., Imamura, H., Devlieger, R., Rider, M., Van Veldhoven, P. P., Schuit, F., Bartrons, R., Hofkens, J., Fraisl, P., Telang, S., Deberardinis, R. J., Schoonjans, L., Vinckier, S., Chesney, J., Gerhardt, H., Dewerchin, M., and Carmeliet, P. (2013) *Cell* **154**, 651-663
28. Vander Heiden, M. G., Lunt, S. Y., Dayton, T. L., Fiske, B. P., Israelsen, W. J., Mattaini, K. R., Vokes, N. I., Stephanopoulos, G., Cantley, L. C., Metallo, C. M., and Locasale, J. W. (2011) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **76**, 325-334
29. Eilken, H. M., and Adams, R. H. (2010) *Curr Opin Cell Biol* **22**, 617-625
30. Moloney, D. J., Panin, V. M., Johnston, S. H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K. D., Haltiwanger, R. S., and Vogt, T. F. (2000) *Nature* **406**, 369-375
31. Benedito, R., Roca, C., Sorensen, I., Adams, S., Gossler, A., Fruttiger, M., and Adams, R. H. (2009) *Cell* **137**, 1124-1135
32. Hellstrom, M., Phng, L. K., Hofmann, J. J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A. K., Karlsson, L., Gaiano, N., Yoon, K., Rossant, J., Iruela-Arispe, M. L., Kalen, M., Gerhardt, H., and Betsholtz, C. (2007) *Nature* **445**, 776-780
33. High, F. A., Lu, M. M., Pear, W. S., Loomes, K. M., Kaestner, K. H., and Epstein, J. A. (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 1955-1959
34. Kim, J., Oh, W. J., Gaiano, N., Yoshida, Y., and Gu, C. (2011) *Genes Dev* **25**, 1399-1411
35. Koch, A. W., Mathivet, T., Larrivee, B., Tong, R. K., Kowalski, J., Pibouin-Fragner, L., Bouvree, K., Stawicki, S., Nicholes, K., Rathore, N., Scales, S. J., Luis, E., del Toro, R., Freitas, C., Breant, C., Michaud, A., Corvol, P., Thomas, J. L., Wu, Y., Peale, F., Watts, R. J., Tessier-Lavigne, M., Bagri, A., and Eichmann, A. (2011) *Dev Cell* **20**, 33-46
36. Huminiecki, L., Gorn, M., Suchting, S., Poulsom, R., and Bicknell, R. (2002) *Genomics* **79**, 547-552

37. Okada, Y., Yano, K., Jin, E., Funahashi, N., Kitayama, M., Doi, T., Spokes, K., Beeler, D. L., Shih, S. C., Okada, H., Danilov, T. A., Maynard, E., Minami, T., Oettgen, P., and Aird, W. C. (2007) *Circ Res* **100**, 1712-1722
38. Testori, J., Schweighofer, B., Helfrich, I., Sturtzel, C., Lipnik, K., Gesierich, S., Nasarre, P., Hofer-Warbinek, R., Bilban, M., Augustin, H. G., and Hofer, E. (2011) *Blood* **117**, 2735-2744
39. Sawamiphak, S., Seidel, S., Essmann, C. L., Wilkinson, G. A., Pitulescu, M. E., Acker, T., and Acker-Palmer, A. (2010) *Nature* **465**, 487-491
40. Wang, Y., Nakayama, M., Pitulescu, M. E., Schmidt, T. S., Bochenek, M. L., Sakakibara, A., Adams, S., Davy, A., Deutsch, U., Luthi, U., Barberis, A., Benjamin, L. E., Makinen, T., Nobes, C. D., and Adams, R. H. (2010) *Nature* **465**, 483-486
41. Murakami, M. (2012) *Int J Vasc Med* **2012**, 293641
42. Saharinen, P., and Alitalo, K. (2011) *J Clin Invest* **121**, 2157-2159
43. Ben Shoham, A., Malkinson, G., Krief, S., Schwartz, Y., Ely, Y., Ferrara, N., Yaniv, K., and Zelzer, E. (2012) *Development* **139**, 3859-3869
44. Gaengel, K., Niaudet, C., Hagikura, K., Lavina, B., Muhl, L., Hofmann, J. J., Ebarasi, L., Nystrom, S., Rymo, S., Chen, L. L., Pang, M. F., Jin, Y., Raschperger, E., Roswall, P., Schulte, D., Benedito, R., Larsson, J., Hellstrom, M., Fuxe, J., Uhlen, P., Adams, R., Jakobsson, L., Majumdar, A., Vestweber, D., Uv, A., and Betsholtz, C. (2012) *Dev Cell* **23**, 587-599
45. Burri, P. H., and Tarek, M. R. (1990) *Anat Rec* **228**, 35-45
46. Kurz, H., Burri, P. H., and Djonov, V. G. (2003) *News Physiol Sci* **18**, 65-70
47. Djonov, V. G., Kurz, H., and Burri, P. H. (2002) *Dev Dyn* **224**, 391-402
48. Semenza, G. L. (2010) *Oncogene* **29**, 625-634
49. Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R., and Kabbinavar, F. (2004) *N Engl J Med* **350**, 2335-2342
50. Sandler, A., Gray, R., Perry, M. C., Brahmer, J., Schiller, J. H., Dowlati, A., Lilienbaum, R., and Johnson, D. H. (2006) *N Engl J Med* **355**, 2542-2550
51. Escudier, B., Bellmunt, J., Negrier, S., Bajetta, E., Melichar, B., Bracarda, S., Ravaud, A., Golding, S., Jethwa, S., and Sneller, V. (2010) *J Clin Oncol* **28**, 2144-2150
52. Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J. F., de Oliveira, A. C., Santoro, A., Raoul, J. L., Forner, A., Schwartz, M., Porta, C., Zeuzem, S., Bolondi, L., Greten, T. F., Galle, P. R., Seitz, J. F., Borbath, I., Haussinger, D., Giannaris, T., Shan, M., Moscovici, M., Voliotis, D., and Bruix, J. (2008) *N Engl J Med* **359**, 378-390
53. Demetri, G. D., van Oosterom, A. T., Garrett, C. R., Blackstein, M. E., Shah, M. H., Verweij, J., McArthur, G., Judson, I. R., Heinrich, M. C., Morgan, J. A., Desai, J., Fletcher, C. D., George, S., Bello, C. L., Huang, X., Baum, C. M., and Casali, P. G. (2006) *Lancet* **368**, 1329-1338
54. Wells, S. A., Jr., Gosnell, J. E., Gagel, R. F., Moley, J., Pfister, D., Sosa, J. A., Skinner, M., Krebs, A., Vasselli, J., and Schlumberger, M. (2010) *J Clin Oncol* **28**, 767-772
55. Gasparini, G., Longo, R., Fanelli, M., and Teicher, B. A. (2005) *J Clin Oncol* **23**, 1295-1311
56. Huynh, H., Ngo, V. C., Choo, S. P., Poon, D., Koong, H. N., Thng, C. H., Toh, H. C., Zheng, L., Ong, L. C., Jin, Y., Song, I. C., Chang, A. P., Ong, H. S., Chung, A. Y., Chow, P. K., and Soo, K. C. (2009) *Curr Cancer Drug Targets* **9**, 738-747

57. Colleoni, M., Rocca, A., Sandri, M. T., Zorzino, L., Masci, G., Nole, F., Peruzzotti, G., Robertson, C., Orlando, L., Cinieri, S., de, B. F., Viale, G., and Goldhirsch, A. (2002) *Ann Oncol* **13**, 73-80
58. Chung, A. S., and Ferrara, N. (2011) *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**, 563-584
59. Saharinen, P., Eklund, L., Pulkki, K., Bono, P., and Alitalo, K. (2011) *Trends Mol Med* **17**, 347-362
60. Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2011) *Nat Rev Drug Discov* **10**, 417-427
61. Ebos, J. M., and Kerbel, R. S. (2011) *Nat Rev Clin Oncol* **8**, 210-221
62. Steingart, R. M., Bakris, G. L., Chen, H. X., Chen, M. H., Force, T., Ivy, S. P., Leier, C. V., Liu, G., Lenihan, D., Lindenfeld, J., Maitland, M. L., Remick, S. C., and Tang, W. H. (2012) *Am Heart J* **163**, 156-163
63. Nazer, B., Humphreys, B. D., and Moslehi, J. (2011) *Circulation* **124**, 1687-1691
64. Dahlberg, S. E., Sandler, A. B., Brahmer, J. R., Schiller, J. H., and Johnson, D. H. (2010) *J Clin Oncol* **28**, 949-954
65. Mpekris, F., Baish, J. W., Stylianopoulos, T., and Jain, R. K. (2017) *Proc Natl Acad Sci U S A*
66. Ridley, A. J. (2011) *Cell* **145**, 1012-1022
67. Insall, R. H., and Machesky, L. M. (2009) *Dev Cell* **17**, 310-322
68. BurrIDGE, K., and Wennerberg, K. (2004) *Cell* **116**, 167-179
69. Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R. L., and Hahn, K. M. (2006) *Nature* **440**, 1069-1072
70. Martin, K., Reimann, A., Fritz, R. D., Ryu, H., Jeon, N. L., and Pertz, O. (2016) *Sci Rep* **6**, 21901
71. Nobes, C. D., and Hall, A. (1995) *Cell* **81**, 53-62
72. Brill, S., Li, S., Lyman, C. W., Church, D. M., Wasmuth, J. J., Weissbach, L., Bernards, A., and Snijders, A. J. (1996) *Mol Cell Biol* **16**, 4869-4878
73. Hart, M. J., Callow, M. G., Souza, B., and Polakis, P. (1996) *Embo J* **15**, 2997-3005
74. Swart-Mataraza, J. M., Li, Z., and Sacks, D. B. (2002) *J Biol Chem* **277**, 24753-24763
75. Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., and Wittinghofer, A. (1998) *Trends Biochem Sci* **23**, 257-262
76. Bashour, A. M., Fullerton, A. T., Hart, M. J., and Bloom, G. S. (1997) *J Cell Biol* **137**, 1555-1566
77. Kuroda, S., Fukata, M., Kobayashi, K., Nakafuku, M., Nomura, N., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1996) *J Biol Chem* **271**, 23363-23367
78. Schmidt, V. A., Scudder, L., Devoe, C. E., Bernards, A., Cupit, L. D., and Bahou, W. F. (2003) *Blood* **101**, 3021-3028
79. Roy, M., Li, Z., and Sacks, D. B. (2005) *Mol Cell Biol* **25**, 7940-7952
80. Roy, M., Li, Z., and Sacks, D. B. (2004) *J Biol Chem* **279**, 17329-17337
81. Ren, J. G., Li, Z., and Sacks, D. B. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10465-10469
82. Yamashiro, S., Abe, H., and Mabuchi, I. (2007) *Dev Biol* **308**, 485-493
83. Briggs, M. W., Li, Z., and Sacks, D. B. (2002) *J Biol Chem* **277**, 7453-7465
84. Wang, Y., Wang, A., Wang, F., Wang, M., Zhu, M., Ma, Y., and Wu, R. (2008) *Exp Mol Pathol* **85**, 122-128
85. Sakurai-Yageta, M., Recchi, C., Le Dez, G., Sibarita, J. B., Daviet, L., Camonis, J., D'Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (2008) *J Cell Biol* **181**, 985-998
86. Noritake, J., Watanabe, T., Sato, K., Wang, S., and Kaibuchi, K. (2005) *J Cell Sci* **118**, 2085-2092
87. Goicoechea, S. M., Awadia, S., and Garcia-Mata, R. (2014) *Cell Adh Migr* **8**, 535-549
88. Laurin, M., and Cote, J. F. (2014) *Genes Dev* **28**, 533-547

89. Hussain, N. K., Jenna, S., Glogauer, M., Quinn, C. C., Wasiak, S., Guipponi, M., Antonarakis, S. E., Kay, B. K., Stossel, T. P., Lamarche-Vane, N., and McPherson, P. S. (2001) *Nat Cell Biol* **3**, 927-932
90. Yamabhai, M., Hoffman, N. G., Hardison, N. L., McPherson, P. S., Castagnoli, L., Cesareni, G., and Kay, B. K. (1998) *J Biol Chem* **273**, 31401-31407
91. Oh, P., McIntosh, D. P., and Schnitzer, J. E. (1998) *J Cell Biol* **141**, 101-114
92. Solomaha, E., Szeto, F. L., Yousef, M. A., and Palfrey, H. C. (2005) *J Biol Chem* **280**, 23147-23156
93. Irie, F., and Yamaguchi, Y. (2002) *Nat Neurosci* **5**, 1117-1118
94. Gryaznova, T., Kropyvko, S., Burdyniuk, M., Gubar, O., Kryklyva, V., Tsyba, L., and Rynditch, A. (2015) *Cell Signal* **27**, 1499-1508
95. Wang, J. B., Wu, W. J., and Cerione, R. A. (2005) *J Biol Chem* **280**, 22883-22891
96. O'Bryan, J. P. (2010) *Sci Signal* **3**, re10
97. Russo, A., Okur, M. N., Bosland, M., and O'Bryan, J. P. (2015) *Cancer Lett* **359**, 262-268
98. Martin, N. P., Mohny, R. P., Dunn, S., Das, M., Scappini, E., and O'Bryan, J. P. (2006) *Mol Pharmacol* **70**, 1643-1653
99. Frosi, Y., Anastasi, S., Ballaro, C., Varsano, G., Castellani, L., Maspero, E., Polo, S., Alema, S., and Segatto, O. (2010) *J Cell Biol* **189**, 557-571
100. Cote, J. F., and Vuori, K. (2002) *J Cell Sci* **115**, 4901-4913
101. Gumienny, T. L., Brugnera, E., Tosello-Trampont, A. C., Kinchen, J. M., Haney, L. B., Nishiwaki, K., Walk, S. F., Nemergut, M. E., Macara, I. G., Francis, R., Schedl, T., Qin, Y., Van Aelst, L., Hengartner, M. O., and Ravichandran, K. S. (2001) *Cell* **107**, 27-41
102. Gadea, G., Sanz-Moreno, V., Self, A., Godi, A., and Marshall, C. J. (2008) *Curr Biol* **18**, 1456-1465
103. Hiramoto, K., Negishi, M., and Katoh, H. (2006) *Exp Cell Res* **312**, 4205-4216
104. Vives, V., Laurin, M., Cres, G., Larrousse, P., Morichaud, Z., Noel, D., Cote, J. F., and Blangy, A. (2011) *J Bone Miner Res* **26**, 1099-1110
105. Xiao, Y., Peng, Y., Wan, J., Tang, G., Chen, Y., Tang, J., Ye, W. C., Ip, N. Y., and Shi, L. (2013) *J Biol Chem* **288**, 20034-20045
106. Harada, Y., Tanaka, Y., Terasawa, M., Pieczyk, M., Habiro, K., Katakai, T., Hanawa-Suetsugu, K., Kukimoto-Niino, M., Nishizaki, T., Shirouzu, M., Duan, X., Uruno, T., Nishikimi, A., Sanematsu, F., Yokoyama, S., Stein, J. V., Kinashi, T., and Fukui, Y. (2012) *Blood* **119**, 4451-4461
107. Kulkarni, K., Yang, J., Zhang, Z., and Barford, D. (2011) *J Biol Chem* **286**, 25341-25351
108. Patel, M., Margaron, Y., Fradet, N., Yang, Q., Wilkes, B., Bouvier, M., Hofmann, K., and Cote, J. F. (2010) *Curr Biol* **20**, 2021-2027
109. Grimsley, C. M., Kinchen, J. M., Tosello-Trampont, A. C., Brugnera, E., Haney, L. B., Lu, M., Chen, Q., Klingele, D., Hengartner, M. O., and Ravichandran, K. S. (2004) *J Biol Chem* **279**, 6087-6097
110. Katoh, H., and Negishi, M. (2003) *Nature* **424**, 461-464
111. Margaron, Y., Fradet, N., and Cote, J. F. (2013) *J Biol Chem* **288**, 1184-1199
112. Peng, H. Y., Yu, Q. F., Shen, W., Guo, C. M., Li, Z., Zhou, X. Y., Zhou, N. J., Min, W. P., and Gao, D. (2016) *Int J Mol Sci* **17**
113. Wang, Y., Xu, X., Pan, M., and Jin, T. (2016) *J Cancer* **7**, 973-983
114. Li, H., Yang, L., Fu, H., Yan, J., Wang, Y., Guo, H., Hao, X., Xu, X., Jin, T., and Zhang, N. (2013) *Nat Commun* **4**, 1706
115. Park, D., Tosello-Trampont, A. C., Elliott, M. R., Lu, M., Haney, L. B., Ma, Z., Klibanov, A. L., Mandell, J. W., and Ravichandran, K. S. (2007) *Nature* **450**, 430-434

116. Hamoud, N., Tran, V., Croteau, L. P., Kania, A., and Cote, J. F. (2014) *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 3745-3750
117. Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G., and Schioth, H. B. (2003) *Mol Pharmacol* **63**, 1256-1272
118. Foord, S. M., Jupe, S., and Holbrook, J. (2002) *Biochem Soc Trans* **30**, 473-479
119. Bjarnadottir, T. K., Fredriksson, R., Hoglund, P. J., Gloriam, D. E., Lagerstrom, M. C., and Schioth, H. B. (2004) *Genomics* **84**, 23-33
120. Harmar, A. J. (2001) *Genome Biol* **2**, REVIEWS3013
121. Langenhan, T., Aust, G., and Hamann, J. (2013) *Sci Signal* **6**, re3
122. Silva, J. P., Lelianova, V. G., Ermolyuk, Y. S., Vysokov, N., Hitchen, P. G., Berninghausen, O., Rahman, M. A., Zangrandi, A., Fidalgo, S., Tonevitsky, A. G., Dell, A., Volynski, K. E., and Ushkaryov, Y. A. (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 12113-12118
123. O'Sullivan, M. L., de Wit, J., Savas, J. N., Comoletti, D., Otto-Hitt, S., Yates, J. R., 3rd, and Ghosh, A. (2012) *Neuron* **73**, 903-910
124. Boucard, A. A., Ko, J., and Sudhof, T. C. (2012) *J Biol Chem* **287**, 9399-9413
125. Hamann, J., Vogel, B., van Schijndel, G. M., and van Lier, R. A. (1996) *J Exp Med* **184**, 1185-1189
126. Stacey, M., Chang, G. W., Davies, J. Q., Kwakkenbos, M. J., Sanderson, R. D., Hamann, J., Gordon, S., and Lin, H. H. (2003) *Blood* **102**, 2916-2924
127. Wang, T., Ward, Y., Tian, L., Lake, R., Guedez, L., Stetler-Stevenson, W. G., and Kelly, K. (2005) *Blood* **105**, 2836-2844
128. Wandel, E., Saalbach, A., Sittig, D., Gebhardt, C., and Aust, G. (2012) *J Immunol* **188**, 1442-1450
129. Bolliger, M. F., Martinelli, D. C., and Sudhof, T. C. (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 2534-2539
130. Xu, L., Begum, S., Hearn, J. D., and Hynes, R. O. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9023-9028
131. Luo, R., Jin, Z., Deng, Y., Strokes, N., and Piao, X. (2012) *PLoS One* **7**, e29818
132. Luo, R., Jeong, S. J., Jin, Z., Strokes, N., Li, S., and Piao, X. (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 12925-12930
133. Hamann, J., Aust, G., Arac, D., Engel, F. B., Formstone, C., Fredriksson, R., Hall, R. A., Harty, B. L., Kirchhoff, C., Knapp, B., Krishnan, A., Liebscher, I., Lin, H. H., Martinelli, D. C., Monk, K. R., Peeters, M. C., Piao, X., Promel, S., Schoneberg, T., Schwartz, T. W., Singer, K., Stacey, M., Ushkaryov, Y. A., Vallon, M., Wolfrum, U., Wright, M. W., Xu, L., Langenhan, T., and Schioth, H. B. (2015) *Pharmacol Rev* **67**, 338-367
134. St Croix, B., Rago, C., Velculescu, V., Traverso, G., Romans, K. E., Montgomery, E., Lal, A., Riggins, G. J., Lengauer, C., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (2000) *Science* **289**, 1197-1202
135. Kuhnert, F., Mancuso, M. R., Shamloo, A., Wang, H. T., Choksi, V., Florek, M., Su, H., Fruttiger, M., Young, W. L., Heilshorn, S. C., and Kuo, C. J. (2010) *Science* **330**, 985-989
136. Anderson, K. D., Pan, L., Yang, X. M., Hughes, V. C., Walls, J. R., Dominguez, M. G., Simmons, M. V., Burfeind, P., Xue, Y., Wei, Y., Macdonald, L. E., Thurston, G., Daly, C., Lin, H. C., Economides, A. N., Valenzuela, D. M., Murphy, A. J., Yancopoulos, G. D., and Gale, N. W. (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 2807-2812
137. Cullen, M., Elzarrad, M. K., Seaman, S., Zudaire, E., Stevens, J., Yang, M. Y., Li, X., Chaudhary, A., Xu, L., Hilton, M. B., Logsdon, D., Hsiao, E., Stein, E. V., Cuttitta, F.,

- Haines, D. C., Nagashima, K., Tessarollo, L., and St Croix, B. (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 5759-5764
138. Stenman, J. M., Rajagopal, J., Carroll, T. J., Ishibashi, M., McMahon, J., and McMahon, A. P. (2008) *Science* **322**, 1247-1250
 139. Daneman, R., Agalliu, D., Zhou, L., Kuhnert, F., Kuo, C. J., and Barres, B. A. (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 641-646
 140. Zhou, Y., and Nathans, J. (2014) *Dev Cell* **31**, 248-256
 141. Posokhova, E., Shukla, A., Seaman, S., Volate, S., Hilton, M. B., Wu, B., Morris, H., Swing, D. A., Zhou, M., Zudaire, E., Rubin, J. S., and St Croix, B. (2015) *Cell Rep* **10**, 123-130
 142. Wang, Y., Cho, S. G., Wu, X., Siwko, S., and Liu, M. (2014) *Curr Mol Med* **14**, 543-554
 143. Carretero-Ortega, J., Walsh, C. T., Hernandez-Garcia, R., Reyes-Cruz, G., Brown, J. H., and Vazquez-Prado, J. (2010) *Mol Pharmacol* **77**, 435-442
 144. Ledezma-Sanchez, B. A., Garcia-Regalado, A., Guzman-Hernandez, M. L., and Vazquez-Prado, J. (2010) *Biochem Biophys Res Commun* **391**, 1647-1652
 145. Yamamoto, Y., Irie, K., Asada, M., Mino, A., Mandai, K., and Takai, Y. (2004) *Oncogene* **23**, 3889-3897
 146. Nobes, C. D., and Hall, A. (1999) *J Cell Biol* **144**, 1235-1244
 147. Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2001) *Cell* **106**, 489-498
 148. Chang, J., Mancuso, M. R., Maier, C., Liang, X., Yuki, K., Yang, L., Kwong, J. W., Wang, J., Rao, V., Vallon, M., Kosinski, C., Zhang, J. J., Mah, A. T., Xu, L., Li, L., Gholamin, S., Reyes, T. F., Li, R., Kuhnert, F., Han, X., Yuan, J., Chiou, S. H., Brettman, A. D., Daly, L., Corney, D. C., Cheshier, S. H., Shortliffe, L. D., Wu, X., Snyder, M., Chan, P., Giffard, R. G., Chang, H. Y., Andreasson, K., and Kuo, C. J. (2017) *Nat Med* **23**, 450-460
 149. Vallon, M., and Essler, M. (2006) *J Biol Chem* **281**, 34179-34188
 150. George, E. L., Georges-Labouesse, E. N., Patel-King, R. S., Rayburn, H., and Hynes, R. O. (1993) *Development* **119**, 1079-1091
 151. Miner, J. H., and Sanes, J. R. (1996) *J Cell Biol* **135**, 1403-1413
 152. Schnieke, A., Harbers, K., and Jaenisch, R. (1983) *Nature* **304**, 315-320
 153. Lohler, J., Timpl, R., and Jaenisch, R. (1984) *Cell* **38**, 597-607
 154. Bandtlow, C. E., and Zimmermann, D. R. (2000) *Physiol Rev* **80**, 1267-1290
 155. Rauch, U. (2004) *Cell Mol Life Sci* **61**, 2031-2045
 156. Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C., Mallowney, C. E., Hell, J. W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D. F., Bornstein, P., and Barres, B. A. (2005) *Cell* **120**, 421-433
 157. Dityatev, A., and Schachner, M. (2003) *Nat Rev Neurosci* **4**, 456-468
 158. Summers, L., Kangwantas, K., Rodriguez-Grande, B., Denes, A., Penny, J., Kielty, C., and Pinteaux, E. (2013) *Mol Cell Neurosci* **57**, 93-103
 159. Woodham, E. F., Paul, N. R., Tyrrell, B., Spence, H. J., Swaminathan, K., Scribner, M. R., Giampazolias, E., Hedley, A., Clark, W., Kage, F., Marston, D. J., Hahn, K. M., Tait, S. W., Larue, L., Brakebusch, C. H., Insall, R. H., and Machesky, L. M. (2017) *Curr Biol* **27**, 624-637
 160. Block, J., Breitsprecher, D., Kuhn, S., Winterhoff, M., Kage, F., Geffers, R., Duwe, P., Rohn, J. L., Baum, B., Brakebusch, C., Geyer, M., Stradal, T. E., Faix, J., and Rottner, K. (2012) *Curr Biol* **22**, 1005-1012
 161. Vazquez-Prado, J., Bracho-Valdes, I., Cervantes-Villagrana, R. D., and Reyes-Cruz, G. (2016) *Mol Pharmacol* **90**, 573-586

162. 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) *Cell* **108**, 809-821
163. Barber, M. A., Donald, S., Thelen, S., Anderson, K. E., Thelen, M., and Welch, H. C. (2007) *J Biol Chem* **282**, 29967-29976
164. Nagae, R., Sato, K., Yasui, Y., Banno, Y., Nagase, T., and Ueda, H. (2011) *Biochem Biophys Res Commun* **415**, 168-173
165. Yokoyama, N., deBakker, C. D., Zappacosta, F., Huddleston, M. J., Annan, R. S., Ravichandran, K. S., and Miller, W. T. (2005) *Biochemistry* **44**, 8841-8849
166. Juvin, V., Malek, M., Anderson, K. E., Dion, C., Chessa, T., Lecureuil, C., Ferguson, G. J., Cosulich, S., Hawkins, P. T., and Stephens, L. R. (2013) *PLoS One* **8**, e75045
167. Abu-Thuraia, A., Gauthier, R., Chidiac, R., Fukui, Y., Screatton, R. A., Gratton, J. P., and Cote, J. F. (2015) *Mol Cell Biol* **35**, 76-87
168. Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1996) *Nature* **379**, 557-560
169. Luttrell, L. M., Ferguson, S. S., Daaka, Y., Miller, W. E., Maudsley, S., Della Rocca, G. J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D. K., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1999) *Science* **283**, 655-661
170. Zamanian, J. L., and Kelly, R. B. (2003) *Mol Biol Cell* **14**, 1624-1637
171. Branch, K. M., Hoshino, D., and Weaver, A. M. (2012) *Biol Open* **1**, 711-722
172. Bhattacharya, M., Su, G., Su, X., Oses-Prieto, J. A., Li, J. T., Huang, X., Hernandez, H., Atakilit, A., Burlingame, A. L., Matthay, M. A., and Sheppard, D. (2012) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **303**, L12-19
173. Diao, B., Liu, Y., Zhang, Y., Yu, J., Xie, J., and Xu, G. Z. (2017) *Mol Med Rep* **15**, 2074-2082
174. Yamaoka-Tojo, M., Ushio-Fukai, M., Hilenski, L., Dikalov, S. I., Chen, Y. E., Tojo, T., Fukai, T., Fujimoto, M., Patrushev, N. A., Wang, N., Kontos, C. D., Bloom, G. S., and Alexander, R. W. (2004) *Circ Res* **95**, 276-283
175. Meyer, R. D., Sacks, D. B., and Rahimi, N. (2008) *PLoS One* **3**, e3848
176. Paavola, K. J., and Hall, R. A. (2012) *Mol Pharmacol* **82**, 777-783