



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional**

Departamento de Farmacología

**P-Rex1, un GEF metastásico, como efector y regulador de la
señalización de S1PR1, receptores tipo I para esfingosina-1-
fosfato**

TESIS

Que presenta

Q.F.B. Yazmin Torres Santos

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

En la Especialidad de Farmacología

Director de Tesis

Dr. José Vázquez Prado

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

El desarrollo del presente proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con la beca No. 967572 y por el donativo: 286274 (responsable: Dr. José Vázquez Prado).

Dedicatoria

*El presente trabajo se lo dedico a mi madre, **Palmira Santos Venegas** y mis hermanas, **Cristian Torres Santos** y **Ana Lizbeth Torres Santos**, por ser mi fortaleza y más grande inspiración, con ustedes todo tiene razón de ser.*

Agradecimientos

A mi director de tesis, el **Dr. José Vázquez Prado**, por haberme dado la oportunidad de compartir su filosofía de trabajo y con ello mi crecimiento académico y personal. Por su infinita paciencia y compromiso por enseñar, que en conjunto permitieron enriquecer el presente trabajo.

A la **Dra. Guadalupe Reyes Cruz** por sus valiosas aportaciones a este trabajo, sus consejos y su calidez.

A la **Dr. María del Carmen García García**, por aceptar ser parte de mi comité de evaluación y por sus comentarios tan acertados a este trabajo.

A mi mamá, **Palmira Santos Venegas**, por educarme, cuidarme, y sobre todo por darme la confianza, que en gran medida es lo que me han permitido ser lo que soy, te amo.

A mi papá, **Miguel Ángel Torres González**, por su apoyo y palabras de aliento que me ha brindado a lo largo de la vida.

A **mis hermanas**, ustedes con su amor, su ejemplo y sus consejos, me han enseñado a luchar por mis sueños.

A mis sobrinas; **Elisa Pacheco, Esmeralda Padrón y Emily Pacheco**, por ser luz y alegría desde que llegaron a mi vida, espero ser un buen ejemplo como tía para ustedes.

A mi novio, **Mario Alberto Castilla**, por acompañarme ya desde hace varios años, apoyándome y motivándome a crecer como profesional y ser humano, te amo mucho.

Con especial agradecimiento a **Sendi Adame y Yarely Beltrán**, por su invaluable apoyo y amistad para conmigo en todo momento. Ustedes son personas increíbles y me siento afortunada de haberlos conocido.

A mis compañeros del laboratorio 35 de transducción de señales: **Irving García, Ricardo García, Alejandro Castillo y Daniel Cervantes** por los momentos compartidos que hicieron amena mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros de Biología celular; **Lennis Orduña, Jorge del Río y César Zavala**, por tan agradables momentos en los inicios del trabajo.

A mi amiga, **Ana María López**, sin duda eres una amiga de verdad, te quiero.

A mis compañeros de generación de maestría, **Ariadna Castillo, Omar Zúñiga, Esael González, Alejandro Bibriesca y Wilibaldo Orea** por cada uno de los momentos compartidos dentro y fuera del Cinvestav.

Al personal técnico; **Estanislao Escobar Islas, Omar Hernández García, Jaime Estrada Trejo y Margarita Valadez Sánchez**, por su apoyo en el laboratorio.

Por supuesto, agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** y al **Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional** (Unidad Zacatenco), porque sin su apoyo este trabajo no se hubiese llevado a cabo tan satisfactoriamente.

Índice de figuras

Figura 1. Características del cáncer	1
Figura 2. Microambiente tumoral y la regulación de procesos quimiotácticos	2
Figura 3. La señalización de GPCRs regula el remodelado del citoesqueleto de actina a través de las GTPasas de la familia de Rho	4
Figura 4. Familia de Rho GTPasas humana	4
Figura 5. Célula polarizada en respuesta a un gradiente quimioatractivo	5
Figura 6. Ciclo de regulación de las Rho GTPasas típicas humanas.....	6
Figura 7. Señalización desregulada de las Rho GTPasas en cáncer	7
Figura 8. Producción de S1P a partir de esfingomielina y su transporte al espacio extracelular	9
Figura 9. Múltiples funciones de S1P.....	10
Figura 10. Vías de señalización de los S1PRs a través de S1P en cáncer	11
Figura 11. S1PR1 vía Gi activa a Rac en células endoteliales dependiente de S1P.....	12
Figura 12. La señalización de S1PR1 dependiente de S1P en cáncer de Wilms.....	13
Figura 14. Cinasas que interaccionan con S1PR1	14
Figura 15. Modelo del eje hipotético S1P1→P-Rex1→Rac1 en células endoteliales dentro de un microambiente tumoral estimuladas por S1P	17
Figura 16. Estrategia general para identificación de las proteínas reguladoras del eje S1P1→P-Rex1→Rac1 y validación de la señalización S1PR1	19
Figura 17. Descripción general de la recopilación y procesamiento de datos obtenidos de múltiples plataformas públicas para la creación de la base de datos SPIM-YY	21
Figura 18. Sección 1 de la base de datos SPIM-YY, Proteínas de señalización por estructura y/o función para P-Rex1	32
Figura 19. Interactoma proteína-proteína	33
Figura 20. Sección de marcadores celulares normales y patológicos(cáncer)	34
Figura 21. Alteraciones del gen S1PR1 en cáncer.....	35
Figura 22. Diagrama representativo de los 30 tipos de cáncer obtenidos del análisis de los 39 estudios de cáncer de cBioPortal.....	36
Figura 23. Esquema del análisis del transcriptoma para delimitar el subconjunto de proteínas de particular interés que expresan el S1PR1 en cáncer	37
Figura 24. El enriquecimiento de proteínas de señalización en diversos tipos de cáncer que expresan S1PR1 alterado	38
Figura 25. En cáncer hay un enriquecimiento de proteínas con características de tipo receptor y GEFs	40

Figura 26. El enriquecimiento para tirosina cinasas citosólicas y proteínas con dominios SH2 en cáncer	41
Figura 26. Las proteínas de señalización con dominios PDZ y PH se encuentran enriquecidas en cáncer	42
Figura 26. Expresión de RNAm de S1PR1 en diversos tipos de cáncer a partir del transcriptoma obtenido de cBioPortal	43
Figura 27. Curvas de supervivencia de pacientes con cáncer que tiene una baja o alta expresión de S1PR1	44
Figura 28. Proteínas candidatas en el acompañamiento de la señalización de S1PR1 en BLCA asociadas a un mal pronóstico en la supervivencia de pacientes humanos	45
Figura 29. Curvas de supervivencia de pacientes con carcinoma urotelial de vejiga para 21 genes que se coexpresan altamente con S1PR1.....	46
Figura 30. El LIHC revela un subconjunto de proteínas de señalización que acompañan la señalización de S1PR1	47
Figura 31. Las curvas de supervivencia de proteínas de señalización que acompañan a S1PR1 cuando este se sobreexpresa en el LIHC	48
Figura 32. Curva de activación en células endoteliales con S1P.....	49
Figura 33. Purificación de GST-RacG15A de esferas de glutatión sefarosa.....	50
Figura 34. La actividad de P-Rex1 y de los fosfostratos de pAKT es dependiente de S1P en células endoteliales	51
Figura 35. Dinámica de interacción de S1PR1 con P-Rex1 en respuesta S1P	52

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de cada estudio de transcriptómica de acuerdo con el tipo de cáncer clasificado por cBioPortal	68
Tabla 2. Resumen de los genes esperados y encontrados en el cuartil superior (4to) en los treinta y nueve estudios de cáncer	70
Tabla 3. Resumen del enriquecimiento normalizado para receptores, Y y S/T cinasas, fosfostratos de AKTs y JAKs, así como proteínas con dominios PH, SH2 y PDZ en los treinta y nueve estudios de cáncer obtenidos de cBioPortal.....	73

Índice general

Índice de figuras	v
Índice de tablas	vii
<i>Abstract</i>	xi
Resumen	xii
1. Introducción.....	1
1.1 El cáncer	1
1.2 Microambiente tumoral.....	2
1.3 Angiogénesis.....	3
1.4 Migración celular en cáncer.....	3
1.5 Regulación de GTPasas	4
1.6 La biosíntesis, localización y función general de esfingosina 1-fosfato (S1P).....	8
1.7 Receptores para S1P(S1PRs).....	10
1.8 El papel del S1PR1 en el cáncer	11
1.9 Eje hipotético S1PR1→P-Rex1-Rac1.....	12
1.10 Minería de datos.....	15
2. Justificación	16
3. Hipótesis	17
4. Objetivos.....	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos particulares	18
5. Estrategia experimental	19
5.1 Proteínas amplificadoras y/o reguladoras y tipos de cáncer donde el eje de transducción se expresa.....	19
5.2 S1PR1→P-Rex1→Rac1 activo en respuesta a S1P.....	19
5.3 P-Rex1 recluta proteínas que favorecen la señalización de S1PR1	20
6. Materiales y métodos.....	21
6.1 Base de datos SPIM-YY	21
6.2 Integración de SPIM-YY con estudios de transcriptoma del cáncer	24
6.3 Líneas celulares.....	24
6.4 Plásmidos	25
6.5 Transfección con Lipofectamina-PLUS en células COS-7	25
6.6 Ayuno.....	25

6.7 Estímulos	26
6.8 Lisis.....	26
6.9 <i>Pull down</i>	27
6.10 Western Blot	28
6.11 Anticuerpos.....	28
6.12 Curva activación de vías dependientes de S1P en células PAE	28
6.13 Las células PAE responden a S1P, P-Rex1 es activo y revelan interactores del Rac-GEF.....	29
6.14 P-Rex1 modula la expresión de S1PR1	29
6.15 La interacción de P-Rex1 y S1PR1 en respuesta a S1P.....	29
6.16 Diluciones de anticuerpos.....	30
7. Resultados.....	31
7.1 Base de datos SPIM-YY (Signaling, Protein Interactome and Markers by Yazmin and Yarely)	31
7.2 La SPIM-YY da identidad a las proteínas que se coexpresan con S1PR1 en cáncer .	35
7.3 Análisis de la normalización de estudios de cáncer con alteraciones en el S1PR1	37
7.4 Enriquecimiento de proteínas de señalización de acuerdo con su estructura en decenas tipos de cáncer en los estudios de transcriptoma humano que tienen alteraciones en el S1PR1	38
7.5 La señalización de S1PR1 está enriquecida para receptores, GEFs, tirosina cinasas y proteínas con dominios SH2, PDZ y PH en cáncer	39
7.6 La correlación de una alta expresión de S1PR1 en cáncer revela resultados estadísticos diferenciales en el valor pronóstico de supervivencia en los pacientes	44
7.7 El complejo mTORC2 se activa en células endoteliales dependiente de S1P.....	49
7.8 Purificación de GST-RacG15A por afinidad.....	50
7.9 El RacGEF, P-Rex1 se activa en presencia de S1P en células endoteliales	50
7.10 P-Rex1 como interactores de S1PR1 en respuesta a S1P	52
8. Discusión	53
8.1 La señalización de S1PR1 en cáncer se correlaciona con un mal pronóstico en <i>BLCA</i>	53
8.2 La señalización dual de S1PR1 en LIHC.....	55
8.3 La esfingosina 1 fosfato activa proteínas del mTORC2 en células endoteliales	58
8.3 P-Rex1 como efector de S1PR1 dependiente de S1P.....	58
8.4 El RacGEF P-Rex1 interacciona con AKT y Rictor en respuesta a S1P a través del tiempo	59

8.5 La interacción de S1PR1 con P-Rex1 es dinámica en respuesta a S1P	59
9. Conclusiones.....	60
11. Referencias bibliográficas	61
12. Apéndice.....	68

Abstract

Angiogenesis is a key process in cancer progression as it allows the generation of the new blood vessels to supply nutrients to tumors that favor their growth. Therefore, tumor angiogenesis represents a rational therapeutic objective to prevent and/or inhibit tumor. In this sense, cancer cells in a hypoxic environment secrete angiogenic factors and bioactive lipids that function as chemoattractants. Sphingosine-1-phosphate is a lipid derived from the cell membrane that functions as a type I receptor agonist for sphingosine-1-phosphate (S1PR1). S1PR1 signaling triggers angiogenic pathways, via the activation of Rac1 GTPase downstream of G $\beta\gamma$ and phosphorylation cascades in which AKT1, JAK2, ERK and other kinases play central roles in both cancer cells and stromal cells. In addition, S1PR1 interacts with P-Rex1 in its PDZ domains, such interaction sustains an S1P-dependent migration response. For the above, we hypothesize that the S1P1 \rightarrow P-Rex1 \rightarrow Rac1 signaling axis establishes a positive circuit that favors the activity of the receptors, which in turn are positively regulated by proteins that are associated with P-Rex1 or S1PR1 in cancer.

Through human omics data mining, we analyzed 39 cancer transcriptomes obtained from the cBioPortal public platform. We created the SPIM-YY database, which contains signaling labels, protein-protein interactions, and cell markers. Overall, our analysis revealed potential regulators of S1PR1 signaling in two types of cancer with opposite prognostic values. Associated with a poor prognosis in the survival of urothelial bladder urothelial carcinoma (BLCA), S1PR1 overexpression significantly correlated with receptors such as ADGRL, EphA3 and TIE2. On the other hand, the overexpression of S1PR1 is associated with a good prognosis in the survival of patients with liver hepatocellular carcinoma (LIHC), in this sense, overexpressed S1PR1 is accompanied by TIE1/2 and RasGEF2. Interestingly, in LIHC the axis S1P1 \rightarrow P-Rex1 \rightarrow Rac1 is significantly coexpressed, as it is in effect regulated by phosphosubstrates of AKT1 and JAK2 kinases, among the candidates found is BLT2, this is associated with processes of invasion, metastasis and survival.

In conclusion, we found that the signaling axis S1P1 \rightarrow P-Rex1 \rightarrow Rac1 is active in endothelial cells and according to omics data mining analyzes, overexpression of S1PR1 is associated with a poor prognosis with BLCA and a good prognosis with LIHC.

Resumen

La angiogénesis es un proceso clave en la progresión del cáncer ya que permite la generación de nuevos vasos sanguíneos en dirección a los tumores. Esto genera el intercambio de nutrientes y desechos que favorecen su crecimiento; por lo tanto, la angiogénesis tumoral representa un objetivo terapéutico racional para evitar y/o inhibir el crecimiento de tumores. En este sentido, las células cancerosas en un ambiente hipóxico secretan factores angiogénicos y lípidos bioactivos que funcionan como quimioatrayentes. La esfingosina-1-fosfato es un lípido derivado de la membrana celular que funciona como agonista del receptor tipo I para esfingosina-1-fosfato (S1PR1). La señalización de S1PR1 desencadenan vías relevantes en angiogénesis, mismas que conducen a la activación de la GTPasa Rac1 vía el heterodímero Gβγ y cascadas de fosforilación en las que las participan cinasas como AKT1, JAK2 y ERK. Asimismo, S1PR1 interacciona con P-Rex1 en sus dominios PDZ, dicha interacción sostiene una respuesta migratoria dependiente de S1P. Por lo anterior, nosotros hipotetizamos que el eje de señalización S1P1→P-Rex1→Rac1 establece un circuito positivo que favorece la actividad de los receptores, quienes a su vez son regulados positivamente por proteínas que se asocian a P-Rex1 o a S1PR1 en cáncer. A través de minería de datos ómicos de humanos, integramos el transcriptoma de 39 estudios de diversos tipos de cáncer obtenidos de la plataforma pública cBioPortal con la base de datos SPIM-YY, la cual contiene etiquetas de señalización, interacciones proteína-proteína y marcadores celulares. En conjunto, este análisis nos reveló potenciales reguladores de la señalización de S1PR1 en dos tipos de cáncer mostrando correlaciones con curvas de supervivencia totalmente opuestas; implicando un posible valor pronóstico. En el BLCA, S1PR1 sobreexpresado se asocia a un mal pronóstico y se correlaciona significativamente con receptores como ADGRL, EphA3 y TIE2. Por otro lado, la sobreexpresión de S1PR1 en el LIHC, está acompañada de TIE1/2 y RasGEF2 asociado a un buen pronóstico en la supervivencia de pacientes. De manera interesante en LIHC se coexpresa de manera significativa el eje S1P1→P-Rex1→Rac1, mismo que en efecto está regulado por fosfosustratos de las cinasas AKT1 y JAK2, dentro de los candidatos encontrados está BLT2, el cual se asocia a procesos de invasión, metástasis y supervivencia. En conclusión, encontramos que el eje a señalización S1P1→P-Rex1→Rac1 es activo en células endoteliales y que la sobreexpresión de S1PR1 se asocia a un mal pronóstico con BLCA y a un buen pronóstico con LIHC.

1. Introducción

1.1 El cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades no transmisibles de interés global que a través de los años ha carecido de un tratamiento efectivo, a pesar del compromiso de diversos grupos de investigación alrededor del mundo para contrarrestarlo (Shen, Shi & Wang, 2018). Asimismo, el cáncer adquiere características (Figura 1), como lo son: el mantenimiento de vías de señalización proliferativas, la evasión a los supresores de crecimiento, mecanismos de invasión y metástasis activos, la inmortalidad replicativa, la inducción a la angiogénesis, la resistencia a la muerte celular, la inestabilidad y mutación del genoma, la inflamación promovida por los tumores, la reprogramación del metabolismo energético y la inmunodepresión en el microambiente tumoral (Hanaha & Weinberg, 2011).

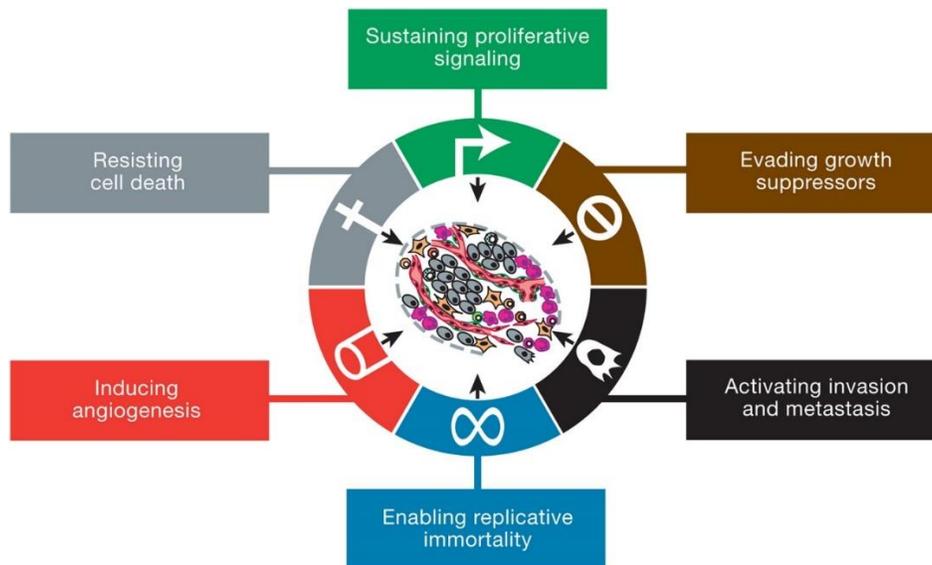


Figura 1. Características del cáncer. Se representan las seis capacidades distintivas propuestas para el cáncer. Obtenido de Hanaha & Weinberg, 2011.

Naturalmente las células de los mamíferos expresan genes supresores de tumores, estos evitan que las células se transformen a cancerosas y su actividad es fundamental en la homeostasis del organismo. En contraste, los oncogenes son responsables de la proliferación incontrolada de las células, mismas que eventualmente dan lugar al cáncer. Las funciones de dichos genes aparentemente dependen del contexto celular, es decir, que dependerá del tipo de célula o tejido dónde se encuentren. Además, se sabe que no solo factores genéticos son causa del cáncer sino también factores ambientales. Estos en conjunto juegan un rol relevante

en el desarrollo y progresión del cáncer (Shen, Shi & Wang, 2018). Propiamente un tumor, tiene la capacidad de interactuar y reclutar subconjuntos de células a través de quimiocinas y receptores para quimiocinas repercutiendo en la inmunidad y la tumorigénesis del cáncer.

1.2 Microambiente tumoral

Diversas fuentes consideran a los tumores como órganos, formados por células cancerosas o transformadas, células inmunes, células estructurales (fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales) y moléculas de la matriz extracelular (MEC), dando lugar al microambiente tumoral. Este nicho tumoral es esencial para la formación, crecimiento y diseminación del tumor, permitiendo así diversos eventos (Figura 2) como lo son el reclutamiento de células, la angiogénesis, la invasión celular y la metástasis (Li, Wu, Fu & Han, 2013; Vázquez-Prado *et al.* 2016).

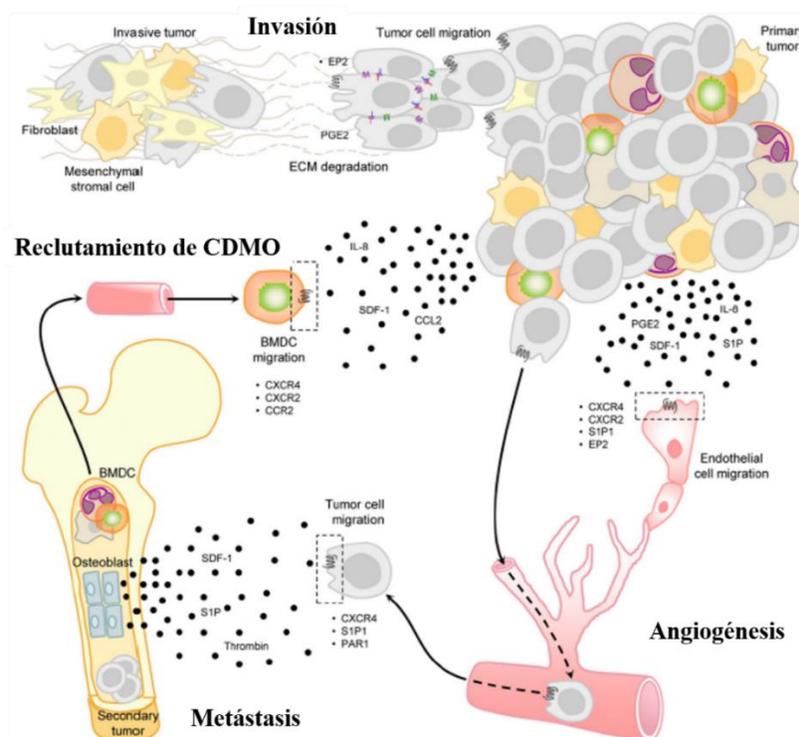


Figura 2. Microambiente tumoral y la regulación de procesos quimiotácticos. La comunicación entre células del nicho neoplásico e incluso con células distantes del microambiente tumoral es fundamental para la progresión del cáncer. Se sabe que las células que integran el tumor secretan factores quimiotácticos proangiogénicos, citocinas y factores de crecimiento, por ejemplo: S1P, Interleucinas (IL-8), prostaglandinas (PGE2), SDF-1, CCL2, trombina. Estas quimiocinas actúan directamente sobre receptores ubicados en la membrana plasmática, activando vías de señalización responsables de procesos fisiológicos del cáncer como angiogénesis, metástasis e invasión. Modificado de Vázquez-Prado *et al.* 2016.

1.3 Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso que induce a la formación de una red de vasos sanguíneos a partir de los existentes tanto en condiciones fisiológicas y patológicas, un ejemplo de este último es el cáncer. Las células que forman el microambiente tumoral secretan quimiocinas para poder reclutar células específicas; por ejemplo, células endoteliales, con la finalidad de generar una prolongación del vaso sanguíneo hacia el tumor (Figura 2) (Chae, Paik, Furneaux & Hla, 2004). En cáncer, este proceso es vital ya que es así como el tumor adquiere nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de desechar productos metabólicos y dióxido de carbono (Vázquez-Prado *et al.* 2016; Hao, Vadgama & Wang, 2020). También se ha descrito que la neovascularización que rodea al tumor es defectuosa, esto por la presencia de vasos sanguíneos inmaduros, deformes, dilatados y por tanto una integridad vascular comprometida. Para una angiogénesis tumoral exitosa se requiere de la migración celular dirigida (Nagarsheth, Wicha & Zou, 2017).

1.4 Migración celular en cáncer

La migración celular es necesaria para el desarrollo de organismos pluricelulares, así como en eventos postnatales como la cicatrización y respuestas inmunitarias. Además, la migración celular contribuye en la progresión de enfermedades cardíacas, inflamatorias y en el cáncer. En particular, la migración celular oncogénica es un proceso orquestado por factores quimiotácticos, receptores (GPCRs), y proteínas citoplasmáticas como factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) y GTPasas pequeñas de la familia de Rho, estas últimas son responsables del rearrreglo de la actina filamentosa (Figura 3) (Tajadura-Ortega *et al.*, 2018).

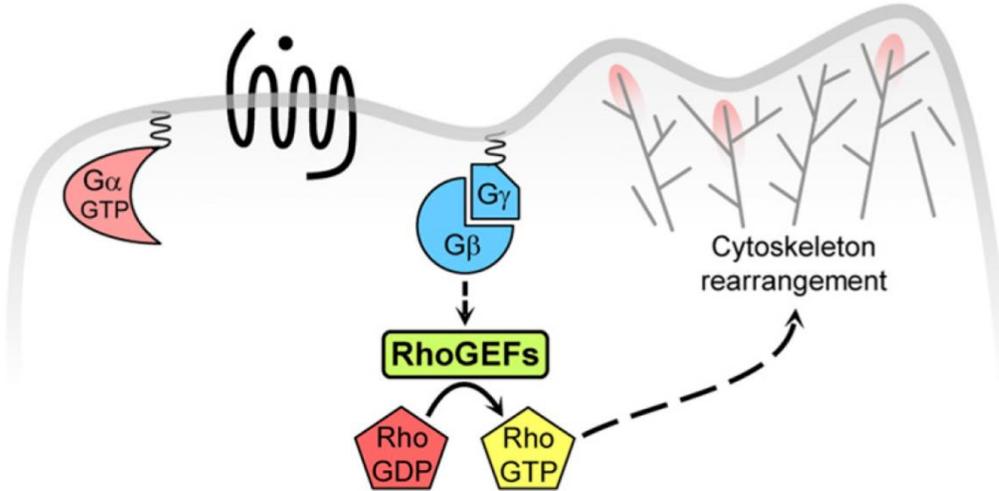


Figura 3. La señalización de GPCRs regula el remodelado del citoesqueleto de actina a través de las GTPasas de la familia de Rho. Las Rho GTPasas típicas son activadas por RhoGEF (Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina de la familia Rho), mismos que son regulados por el heterodímero Gβγ de la proteína G que previamente estuvo en forma de heterotrímero acoplado al receptor de siete hélices transmembranales, en conjunto esta señalización conduce al remodelado del citoesqueleto de actina. Modificado de Vázquez-Prado *et al.* 2016.

1.5 Regulación de GTPasas

En los humanos, la familia de las Rho GTPasas consta de 20 genes, que se agrupan en 8 subfamilias: RhoF/RhoD, Rac/RhoG, Cdc42/RhoQ/RhoJ, Rho, RhoV/RhoU, RhoH, RhoBTB y Rnd (Figura 4).

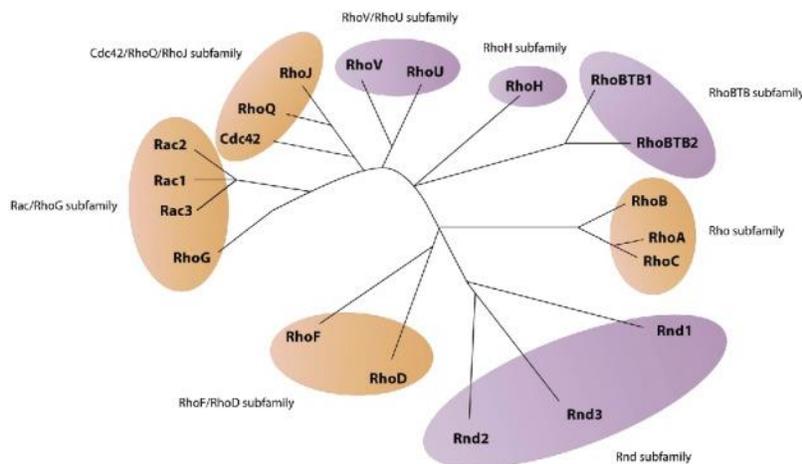


Figura 4. Familia de Rho GTPasas humana. Se muestran las 8 subfamilias codificadas en 20 genes. Las Rho GTPasas se diferencian por su forma de ser reguladas: típicas (óvalos naranja) y atípicas (óvalos lila). Modificado de Haga & Ridley, 2016.

De acuerdo con su regulación, las Rho GTPasas se clasifican en dos grupos: típicas y atípicas. Las típicas están reguladas por el ciclo de GTP/GDP, mientras que las atípicas tienen diferencias de residuos en su estructura con las típicas, lo que induce una actividad distinta y autónoma, en conjunto participan en la progresión del cáncer (Haga & Ridley, 2016).

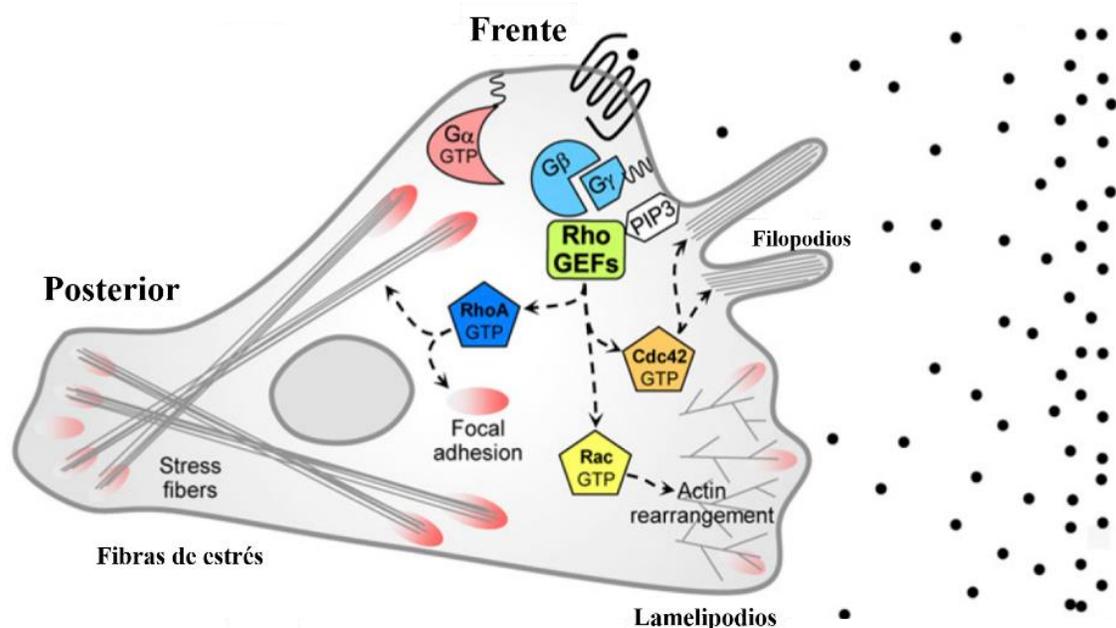


Figura 5. Célula polarizada en respuesta a un gradiente quimioatrayente. En el frente de una célula polarizada normalmente se generan filopodios y lamelipodios dependientes de Cdc42 y Rac, respectivamente. En contraste, en la parte posterior hay actina contráctil mediada por Rho generando fibras de estrés. Modificado de Vázquez-Prado *et al.* 2016.

Se sabe que las GTPasas típicas asociadas a los fenotipos del citoesqueleto de actina (fibras de estrés, lamelipodios y filopodios) característicos de una célula polarizada: RhoA, Rac1 y Cdc42, mismas que tienen un rol esencial en la coordinación de funciones celulares, como la migración, adhesión, motilidad e invasión en condiciones fisiológicas y patológicas. Además, actúan como interruptores moleculares, es decir, activas cuando se encuentran unidas a GTP (trifosfato de guanosina), e inactivas cuando se unen a GDP (difosfato de guanosina) (Figura 6). Dicha afinidad e intercambio de nucleótidos de guanina es regulada por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF), que median el intercambio de GDP por GTP, lo conduce a la activación de la GTPasa, y las proteínas activadoras de la GTPasas (GAP), que promueven la hidrólisis de GTP a GDP, esencialmente apagando a la GTPasa (Figura 6). En condiciones basales, las GTPasas clásicas pueden encontrarse en el citosol en forma de complejo con inhibidores de la disociación de GDP (GDI), impidiendo su

interacción con sus activadores (GEFs) y efectores incluidos los GAPs (Garcia-Mata, Boulter & Burrridge, 2011; De, Aske & Dey, 2019).

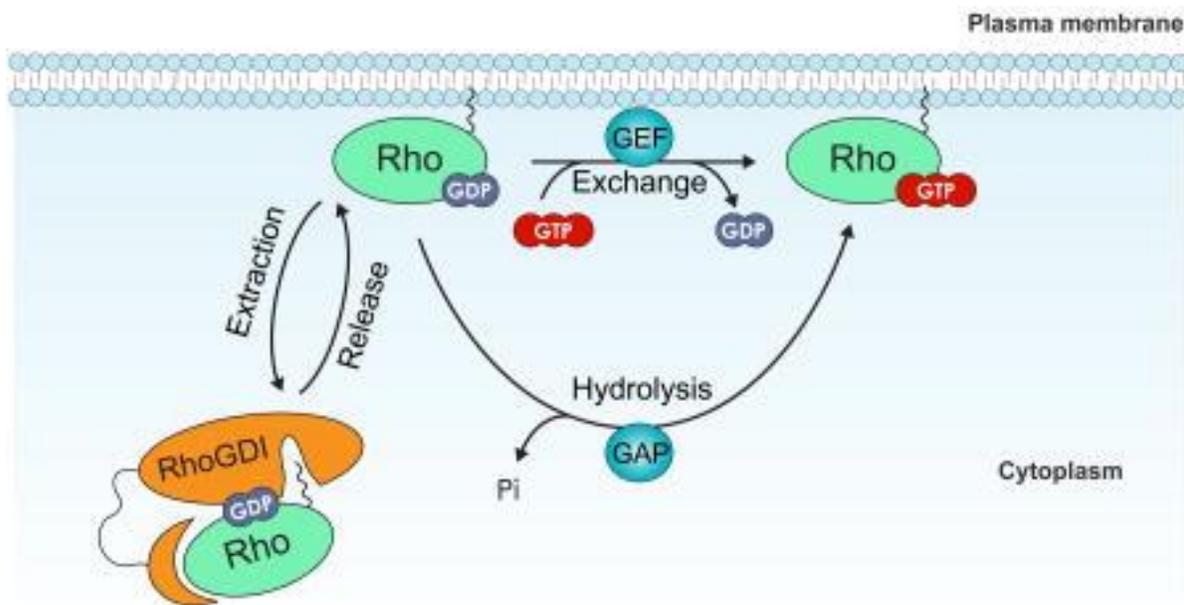


Figura 6. Ciclo de regulación de las Rho GTPasas típicas humanas. Las Rho GTPasas son conmutadores moleculares que pueden estar prendidas cuando esta unidas a GTP o apagadas unidas a GDP, dicha regulación es dada por GEFs y GAPs, respectivamente. Los GDIs son secuestradores de las GTPasas impidiendo la interacción con sus activadores directos. El GTP es necesario para que las proteínas G adquieran una conformación activa. Obtenido de Garcia-Mata, Boulter & Burrridge, 2011.

Propiamente las Rho GTPasas han sido asociadas a funciones fisiológicas esenciales, como el desarrollo embrionario, la diferenciación neuronal, la formación de neuritas y el mantenimiento de células madre en la médula ósea, la piel y el intestino. En condiciones patológicas, las Rho GTPasas se correlacionan con las seis características distintivas del cáncer. A menudo, las Rho GTPasas se encuentran sobreexpresadas en cáncer, y una minoría se encuentran mutadas. En diversos tipos cáncer, incluidos los de mama, colon y pulmón, se reportó una alteración de tipo empalme (Rac1b), de Rac1. En conjunto la señalización de las Rho GTPasas puede considerarse pro-tumorigénica (Figura 7), por lo que se ha considerado emplear los niveles de expresión de las Rho GTPasas clásicas como marcadores pronósticos en la progresión del cáncer. (Orgaz, Herraiz & Sanz-Moreno, 2014; Porter, Papaioannou & Malliri, 2016).

En cuanto a los Rho reguladores, se conocen 145, que modulan la actividad de las Rho GTPasas, siendo 81 RhoGEFs y 66 RhoGAPs, incluidos dos duales: BCR, ABR (Müller *et al.*, 2020). Generalmente en cáncer, los RhoGEFs se encuentran sobreexpresados, por ejemplo, el Rac GEF P-Rex1 eleva su expresión en cáncer de próstata metastásico, así como en cáncer de mama (positivo a receptores de estrógenos) y melanoma. Otro ejemplo es el GEF, TIAM, el cual se ha encontrado sobreexpresado en cáncer de colon, mama, melanoma, renal y próstata (Cook, Rossman & Der, 2014). Por último, los reguladores negativos de la actividad de las Rho GTPasas, como Rho GAP y Rho GDI, actúan como supresores de tumores y se pierden en los cánceres humanos (Porter, Papaioannou & Malliri, 2016).

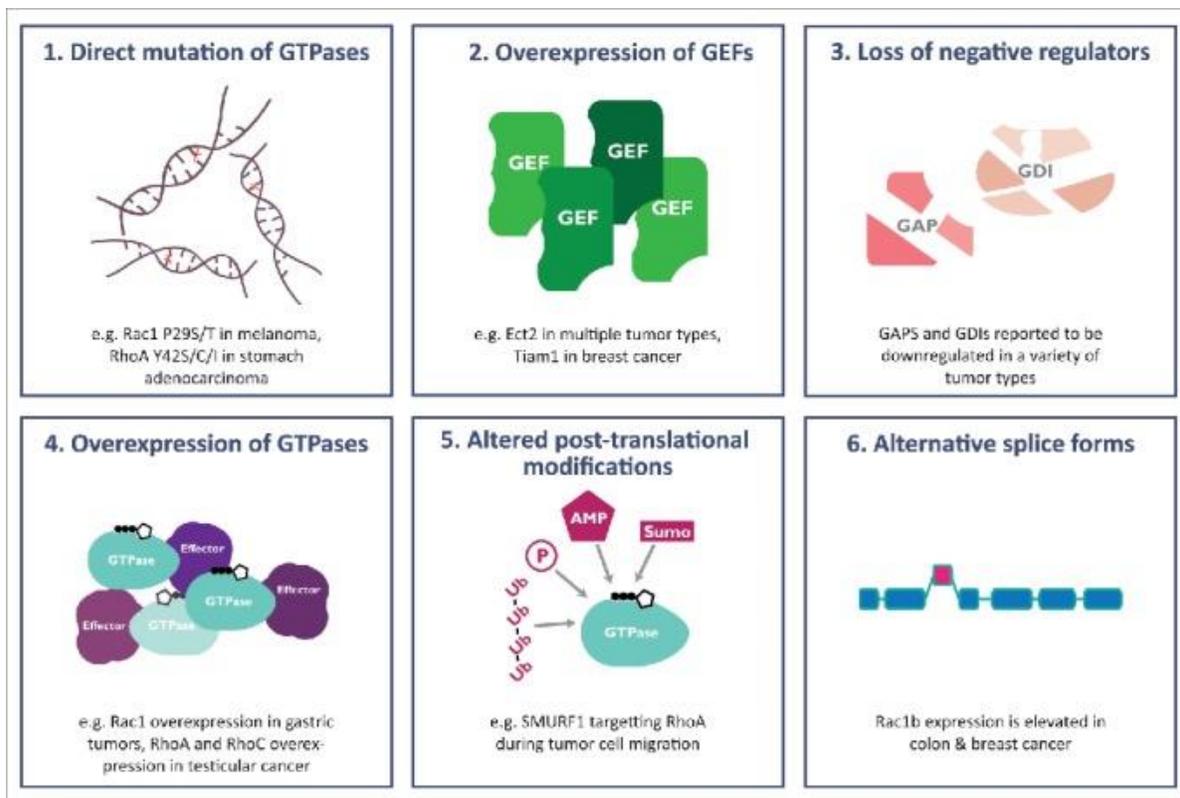


Figura 7. Señalización desregulada de las Rho GTPasas en cáncer. Existen diferentes mecanismos por los cuales la señalización de Rho GTPasas se puede ver comprometida, por ejemplo, mutaciones puntuales (1), sobreexpresión de RhoGEFs (2) y GTPasas (4), pérdida de los RhoGAPs y RhoGDIs (3), alteraciones en las modificaciones postraduccionales de las GTPasas (5) y *splicing* alternativo de las GTPasas (6). Modificado de Porter, Papaioannou & Malliri, 2016.

Las células endoteliales ajustan su fenotipo celular al ser estimuladas con los factores quimiotácticos. Para que esto suceda, es importante el rearrreglo del citoesqueleto de actina. Los fenotipos de células en movimiento están controlados por la señalización de receptores (GPCRs y/o RTKs). En particular, los GPCRs vía $G\beta\gamma$ activan a RhoGEFs y éstos a sus efectores, las Rho GTPasas. La GTPasa Rac1 se ha descrito ampliamente como un regulador clave para promover la reorganización de citoesqueleto de actina y la migración celular río debajo de GPCRs, en respuesta a quimiocinas. La eliminación de Rac1, mediante el tratamiento con ARNip, en células endoteliales vasculares inhibe la formación de tubos en respuesta a VEGF, así como la migración, invasión y proliferación de células endoteliales *in vitro* (Bid, Roberts, Manchanda, & Houghton, 2013). Uno de los agonistas pro-angiogénicos que orquesta la señalización de la Rho GTPasa, Rac1 es esfingosina-1-fosfato.

1.6 La biosíntesis, localización y función general de esfingosina 1-fosfato (S1P)

La S1P es un lípido bioactivo de señalización derivado del metabolismo de la esfingomielina. En su biosíntesis es fosforilado por dos isoenzimas cinasas: la esfingosina cinasa 1 (*SphK1*), y la esfingosina cinasa 2 (*SphK2*). Estas proteínas tienen funciones y localizaciones distintas cuando las células son estimuladas (Figura 8). La S1P, descubierta en la década de 1960 (Stoffel, Sticht, LeKim, 1968), es secretada por células endoteliales, eritrocitos y plaquetas activas. Sus funciones son pleiotrópicas, principalmente en el desarrollo embrionario y de patologías (Sun, K. *et al.*, 2016; Cartier & Hla, 2019). La S1P es transportada hacia el espacio extracelular a través del transportador de superfamilia facilitador principal 2b (*Mfsd2b*) y por transportador de esfingolípidos 2 (*Spns2*) (Jozefczuk, Guzik & Siedlinski, 2020).

La degradación de S1P depende de fosfatasa y liasas, SPP1-2 y LPP1-3, respectivamente (Kumar & Saba, 2015; Schwiebs *et al.*, 2019). La S1P intracelular, específicamente en los núcleos actúa como un inhibidor de histona desacetilasa y regula epigenéticamente la transcripción de genes. En cuanto a la S1P extracelular, ésta funciona con agonista de receptores acoplados a proteínas G (S1PRs) (Figura 8). Este agonista lipídico es abundante en plasma y se considera fisiológicamente relevante en el sistema inmunológico, ya que modula el flujo, la motilidad y morfología celular (Wang *et al.*, 2019).

Existe un gradiente de S1P entre el sistema circulatorio sanguíneo, linfático y los fluidos intersticiales. La S1P no tiene buena solubilidad, por lo tanto, para mejorarla es acompañada de proteínas chaperonas, como lipoproteínas de alta densidad (HDL), albúmina, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Jozefczuk, Guzik & Siedlinski, 2020).

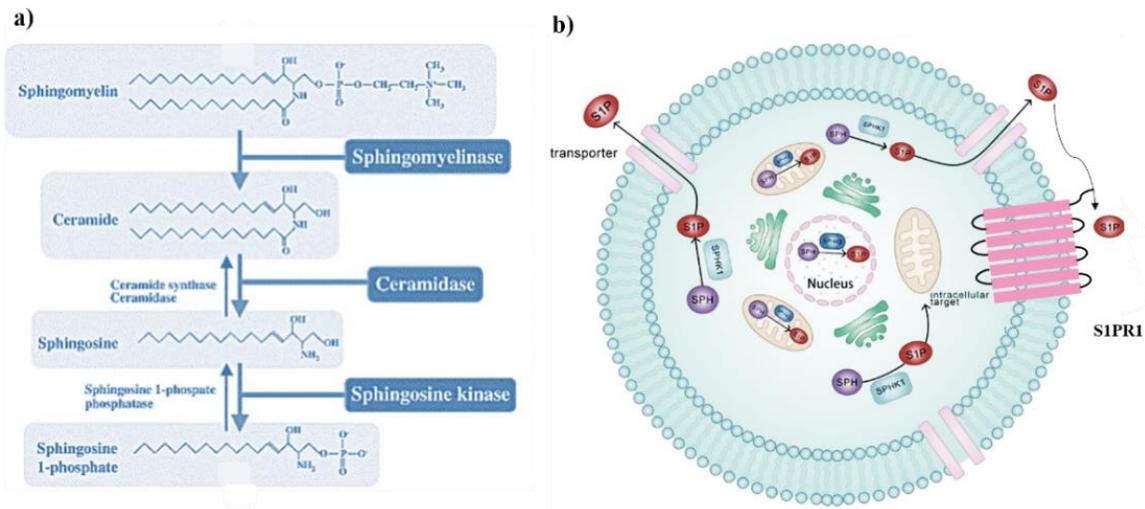


Figura 8. Producción de S1P a partir de esfingomielina y su transporte al espacio extracelular. a) La degradación de la esfingomielina (SM) es una vía involucrada en la producción de mensajeros lipídicos, como la S1P. La SM es metabolizada enzimáticamente a ceramida por una esfingomielinasa, posteriormente una ceramidasa forma la esfingosina (*sph*) y las *sphk* fosforilan a sph, en el citosol, cerca de la membrana plasmática *sphk1* y en el núcleo *sphk2*. b) Una vez formada, la S1P es enviada al espacio extracelular a través de transportadores para poder actuar como agonista de S1PR1. Adaptado de Tani, Ito & Igarashi, 2007 y Wang *et al.*, 2019.

Se ha demostrado que la S1P extracelular está involucrada en diversas actividades fisiológicas y fisiopatológicas (Figura 9), incluido el tráfico de células inmunitarias, el tráfico de células madre hematopoyéticas, la integridad vascular y la proliferación celular. Estos efectos ocurren activando a sus cinco receptores acoplados a proteína G. En 2006, Visentin y colaboradores demostraron que la neutralización de S1P reduce el crecimiento tumoral al inhibir la proliferación, sobrevivencia y potencial metastásico de las células cancerosas, simultáneamente con la reducción de la formación y función de los vasos.

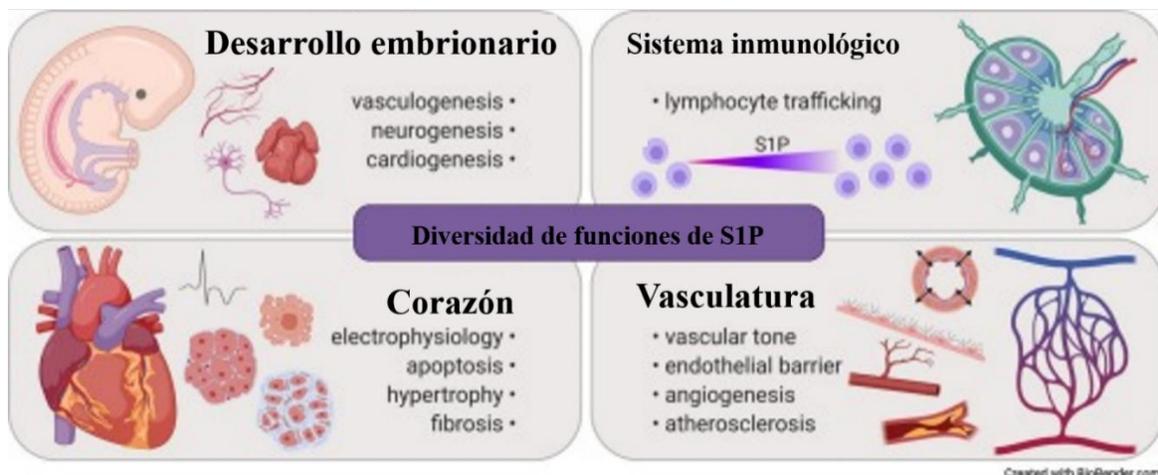


Figura 9. Múltiples funciones de S1P. La S1P tiene funciones principalmente en el desarrollo embrionario, corazón, sistema inmunológico y vasculatura, en condiciones normales y patológicas. Modificado de Jozefczuk, Guzik & Siedlinski, 2020.

1.7 Receptores para S1P(S1PRs)

En vertebrados existen 5 receptores acoplados a proteína G (GPCR) que son sensibles a S1P: S1PR1-5. Todos los S1PR se acoplan a G_i con afinidades distintas. En particular S1PR2 y S1PR3 activan a G_q y a $G_{12/13}$; y S1PR5 se une a $G_{12/13}$ (Figura 10) (Kumar & Saba, 2015). Los S1PRs muestran afinidades diversas por las proteínas G. Además, se expresan en diferentes tejidos; por ejemplo, los tipos 1, 2 y 3 se expresan preferentemente en tejidos cardiovasculares, mientras que S1PR4 es característico del sistema linfático y S1PR5 es característico de los sistemas inmunológico y nervioso (Jozefczuk, Guzik & Siedlinski, 2020). Cuando S1P activa a los S1PRs regula distintos procesos biológicos y patológicos: la adhesión, diferenciación, sobrevivencia y crecimiento celular, la reorganización citoesqueleto de actina, migración, angiogénesis, maduración vascular, inflamación, invasión, metástasis y quimiorresistencia en el cáncer (Igarashi *et al.*, 2003; Kumar & Saba, 2015). Estas son algunas de las razones que dan soporte al uso de los S1PRs como blancos farmacológicos en el tratamiento de enfermedades vasculares, autoinmunes, renales y en el cáncer. (Ledezma *et al* 2010). El receptor tipo I para esfingosina-1fosfato (S1PR1) se une exclusivamente a proteínas heterotriméricas de la familia G_i , inhibiendo a adenilato ciclasa y activando las vías de señalización de fosfatidilinositol 3-cinasa, ERK1/2 y JAK2 (Janus cinasa 2)-STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3), Ras, NLRP3 y PLC (Fosfolipasa C). Biológicamente, S1PR1 es esencial para la vida ya que, por ejemplo, ratones deficientes de este receptor mueren intrauterinamente (entre el día E12.5 y el día E14.5) por

una hemorragia relacionada con la inmadurez de la vasculatura (Liu, *et al.*, 2000; Chae, Paik, Furneaux & Hla, 2004). En los procesos de agregación plaquetaria en respuesta a daño celular endotelial, las plaquetas liberan S1P, misma que favorece la reparación de la lesión vascular (Proia & Hla, 2015).

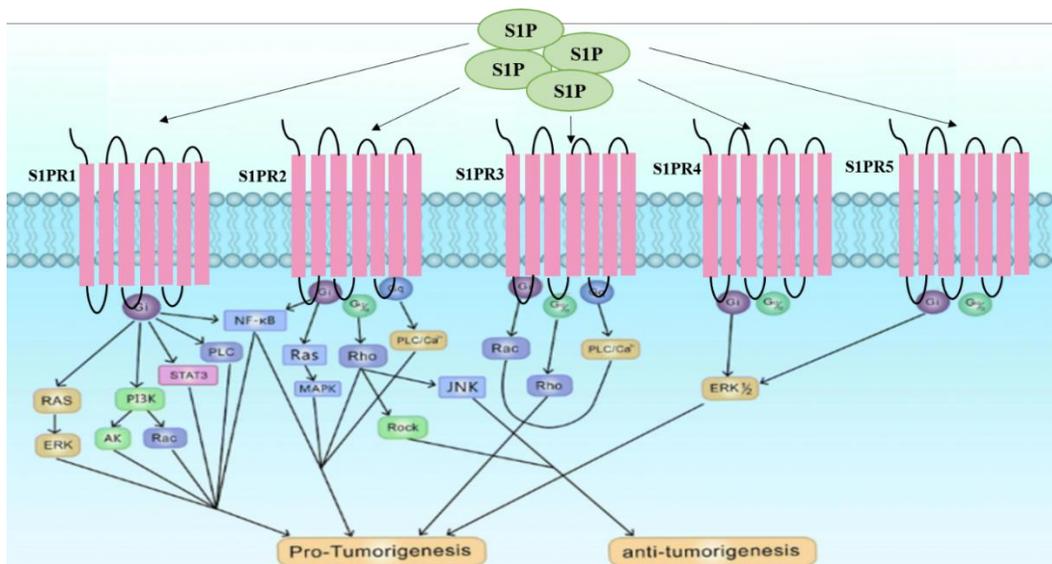


Figura 10. Vías de señalización de los S1PRs a través de S1P en cáncer. Los S1PR1-5 señalizan intracelularmente vía proteínas G, tienen afinidades distintas para Gi, Gq, G_{12/13} y tienen un rol importante en el crecimiento, la proliferación, la migración y la invasión del cáncer. Modificado de Wang *et al.*, 2019.

1.8 El papel del S1PR1 en el cáncer

El S1PR1, como se describió, enciende diversas vías de señalización y éstas se consideran en gran medida un factor protumorigénico, induciendo migración, proliferación, invasión y neovascularización en varios tipos de cáncer. En ratones, el silenciamiento de S1PR1 evidenció a este receptor como un componente crucial de la respuesta angiogénica tumoral (Chae, Paik, Furneaux & Hla, 2004). En ratones, la señalización de S1P-S1PR1 amplifica la vía de transducción de VEGF-VEGFR2 debido a un aumento en la actividad de la tirosina cinasa c-Abl1, ésta fosforila al receptor tipo II para VEGF, provocando una retención de este en la membrana plasmática y favoreciendo la migración de células endoteliales dependiente de Rac (Ragunathrao *et al.*, 2019).

Por otro lado, la expresión de S1PR1 en células del microambiente como los macrófagos se ha relacionado con actividades que van desde promover la supervivencia de las células

tumorales, la resistencia terapéutica y supresión de la inmunidad antitumoral, hasta promover la angiogénesis y la invasión, que convergen en la diseminación metastásica (Weichand *et al.*, 2017). Además, el eje de señalización S1PR1-STAT3 está elevado en órganos distantes previo a la llegada de las células tumorales, lo que permite que las células mieloides invadan, proliferen y resistan la apoptosis en sitios premetastásicos (Deng *et al.*, 2012).

Estos hallazgos, perfilan a que la señalización SIP-S1PR1 sea un potente blanco terapéutico en tratamiento contra el cáncer y otras enfermedades como esclerosis, diabetes, renales y autoinmunes. Existen una serie de compuestos agonistas y antagonistas que afectan la señalización de los S1PRs. Por ejemplo, el antagonista funcional, fingolimod (FTY720; nombre comercial Gilenya), empleado para el tratamiento contra esclerosis múltiple y con poco éxito por sus efectos adversos. En el cáncer, fingolimod ha demostrado inhibir la vascularización y la progresión del cáncer de pulmón, color, hígado, próstata. También existen otros agonistas para los S1PRs: siponimod, SEW2817, AUY954, ponesimod y KRP-203, éstos se dirigen principalmente a S1PR1, aunque sus efectos, seguridad y eficacia aún necesitan más estudios (Wang *et al.*, 2019).

1.9 Eje hipotético S1PR1→P-Rex1-Rac1

La SIP activa a S1PR1, mismo que favorece la migración celular al activar a las proteínas Gi y vía Gβγ inducen la actividad de Rac1 en células endoteliales (Lee *et al.*, 2001; Paik *et al.*, 2001) (Figura 11).

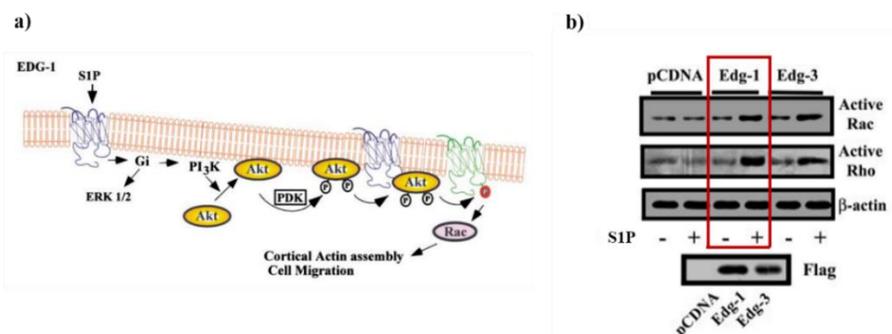


Figura 11. S1PR1 vía Gi activa a Rac en células endoteliales dependiente de SIP. A la izquierda en (a) vemos el modelo propuesto de la activación de Rac en células endoteliales en respuesta a SIP vía S1PR1(EDG-1). A la derecha (b) se muestra el *pull down* de Rac y Rho en células endoteliales estimuladas o no con SIP. Como control de carga, se observa a actina. Adaptado de Lee *et al.*, 2001 y Paik *et al.*, 2001.

En el cáncer, particularmente en el de Wilms, un tipo de cáncer renal en niños, se encontró una alta expresión a nivel de RNAm y de proteína de S1PR1 (Figura 12A-B) y que su señalización es vía Gi activando PI3K y Rac1 en respuesta a S1P (Figura 12C-E) (Li *et al.*, 2009).

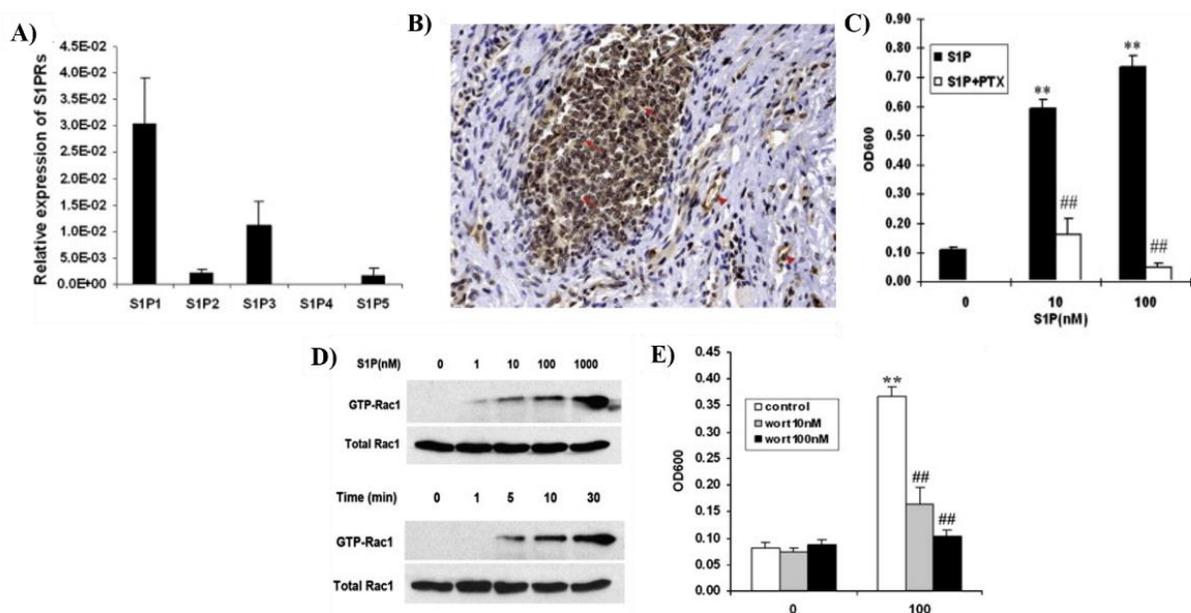


Figura 12. La señalización de S1PR1 dependiente de S1P en cáncer de Wilms. A) Se encontró expresión diversa de los receptores para S1P en líneas celulares de tumores de Wilms, por PCR cuantitativa. B) Imagen representativa de inmunohistoquímica para S1PR1 (Flecha, células blastemales; punta de flecha, células endoteliales vasculares). C) Migración inducida con S1P solo o con PTX (Toxina pertussis). D) Captura de Rac1 activa a concentraciones crecientes de S1P. E) Migración inducida en células pretratadas con Wortmanina (inhibidor de PI3K) en presencia o no de S1P. Modificado de Li *et al.*, 2009.

En el 2010, Ledezma-Sánchez y colaboradores demostraron que el C-terminal de S1PR1 interacciona con P-Rex1, Rac-GEF responsable de la actividad de la GTPasa Rac1. Dicha interacción ocurre con los dominios P-Rex1-PDZ e incrementa la permanencia de S1PR1 en la membrana plasmática, así como una mayor respuesta migratoria dependiente de S1P (Figura 13).

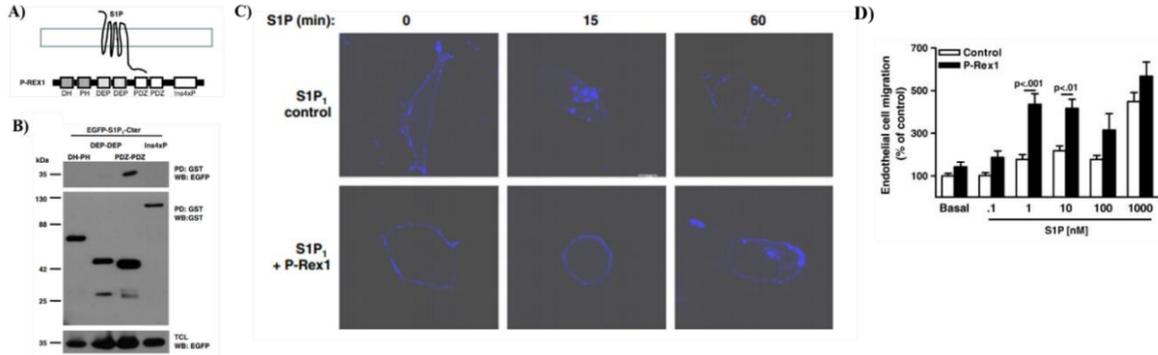


Figura 13. Mapeo de la interacción del C-terminal de S1PR1 con el Rac-GEF P-Rex1 y sus efectos funcionales celulares. A) Modelo de interacción entre el carboxilo terminal del receptor tipo I para S1P y los dominios PDZ de P-Rex1. B) Pull down del mapeo de interacción del C-terminal de S1PR1 con las construcciones: DH-PH, DEP-DEP, PDZ-PDZ y el extremo C-terminal de P-Rex1. C- D) Efectos funcionales de la interacción entre el receptor y el Rac-GEF dependiente de S1P. Modificado de Ledezma-Sánchez *et al.*, 2010.

Por otro lado, la cinasa AKT activa interacciona y fosforila a S1PR1 (Figura 14B-C), dicha fosforilación favorece la quimiotaxis de células endoteliales estimuladas con S1P (Lee *et al.*, 2001). Además, se encontró S1PR1 y la cinasa JAK interaccionan, lo cual contribuye a la activación del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) (Figura 14D-F), mismo que induce la expresión de S1PR1 e IL-6 en células cancerosas, acelerando el crecimiento del tumor y la metástasis dependiente de IL-6 (Lee *et al.*, 2010).

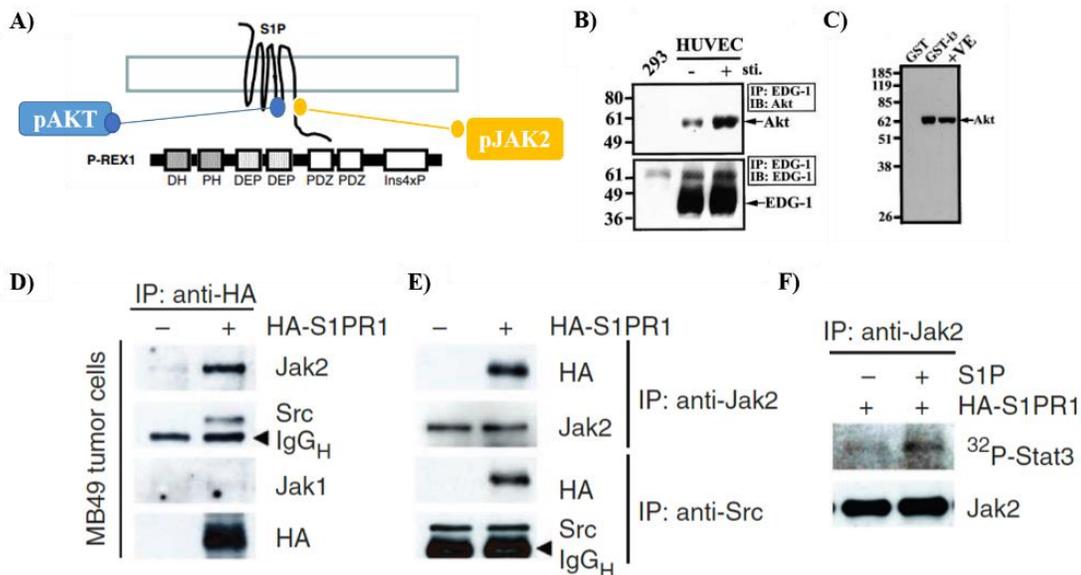


Figura 14. Cinasas que interaccionan con S1PR1. A) Modelo gráfico de cinasas interactuando con S1PR1. B) Co-inmunoprecipitación de S1PR1(EDG-1) en ausencia o presencia de S1P en células endoteliales. C) Fosforilación de la tercera asa intracelular de S1PR1 por la cinasa AKT. D-F) Ensayos de inmunoprecipitación para S1PR1 y JAK2, así como la actividad de STAT3. Modificado de Lee *et al.*, 2001 y Lee *et al.*, 2010.

1.10 Minería de datos

El análisis de minería de datos se define como el proceso donde se selecciona, explora, filtra y extraen patrones implícitos, previamente desconocidos y potencialmente útiles en la investigación científica. Este tipo de estrategias se están convirtiendo cada vez más cotidianas en el área de biología molecular por el manejo de datos ómicos que generalmente son masivos. Particularmente en patologías como el cáncer se han empleado diversos métodos de minería de datos para la detección de biomarcadores o blancos farmacológicos (Liang *et al.*, 2020).

En conjunto, todos los hallazgos encontrados nos hacen considerar la relevancia molecular, celular y clínica del eje S1PR1→P-Rex1→Rac1 en el cáncer, particularmente en las de células inmunes y endoteliales que conforman a los tumores y como los interactores de S1PR1 y P-Rex1 podrían favorecer la migración celular a través de proteínas desconocidas. Para poder identificarlas, realizamos análisis de minería de datos genómicos del cáncer y ensayos bioquímicos que confirmen la existencia de dicho eje de transducción y la dinámica de activación de esta vía de señalización.

2. Justificación

En el cáncer, la migración de células endoteliales tiene un papel importante en el proceso de angiogénesis. Los receptores S1PR1 estimulan la migración celular vía proteínas Gi y GTPasas pequeñas de la familia de Rho, particularmente Rac1, promoviendo la generación de lamelipodios, además, son regulados positivamente por las cinasas: AKT y JAK. Por lo tanto, consideramos que en esta cascada podría intervenir el Rac-GEF P-Rex1, jugando un papel dual, siendo por un lado efector de la vía y por otro lado regulador positivo de la misma, a través de reclutar a reguladores directos de los receptores S1PR1. Asimismo, S1PR1 interacciona con la cinasa JAK activa, quien también podría regular o amplificar el eje de señalización S1P1 → P-Rex1 → Rac1. Puesto que los receptores S1P1 han sido involucrados en circuitos sostenidos de señalización oncogénica, consideramos que el papel central del Rac-GEF P-Rex1, es como un promotor de metastásico. El eje de transducción S1P1 → P-Rex1 → Rac1 y sus proteínas amplificadoras o reguladores podrían expresarse en tipos de cáncer, con la posibilidad de servir como biomarcadores o blancos farmacológicos para el diagnóstico o tratamiento, respectivamente.

3. Hipótesis

La señalización de los receptores S1P1 involucra la intervención del Rac-GEF P-Rex1, mismo que establece un circuito sostenido que favorece la actividad de los receptores, al ser regulados positivamente por proteínas que se asocian a P-Rex1 o a S1PR1, dicha señalización de S1PR1 es relevante en tipos de cáncer específicos (Figura 15).

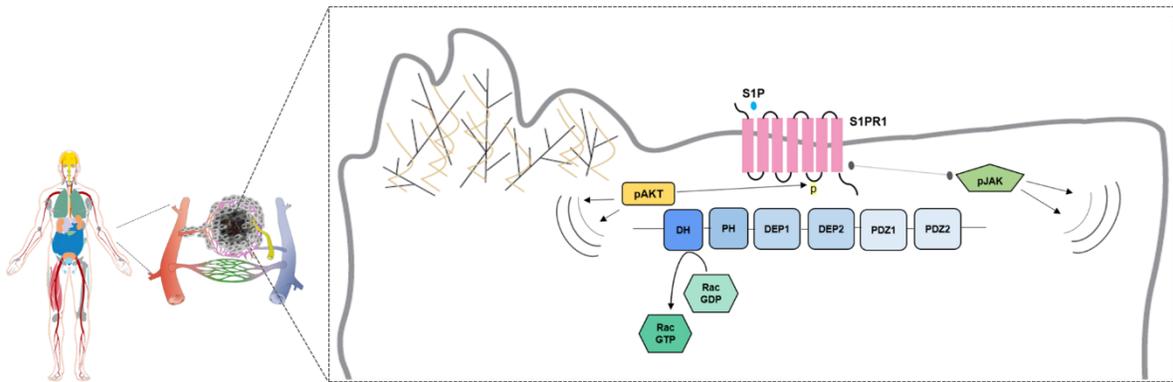


Figura 15. Modelo del eje hipotético S1P1→P-Rex1→Rac1 en células endoteliales dentro de un microambiente tumoral estimuladas por S1P. En el contexto de distintos tipos de cáncer y el microambiente tumoral, S1PR1 favorece el desarrollo del tumor favoreciendo la angiogénesis que permite la progresión del cáncer a través de P-Rex1.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar el circuito que forma P-Rex1 en la vía señalización S1P1→P-Rex1→Rac1 con sus interactores y los cambios relevantes en la migración celular.

4.2 Objetivos particulares

1. Identificar proteínas amplificadoras y/o reguladoras, así como los tipos de cáncer donde el eje de transducción S1PR1→P-Rex1→Rac1 se encuentre expresado y estrechamente relacionado con S1PR1 a partir del transcriptoma de estudios del cáncer.
2. Evaluar la activación del eje de transducción S1P1→P-Rex1→Rac1 en respuesta a esfingosina-1-fosfato.
3. Establecer si P-Rex1 recluta proteínas que favorecen la señalización del receptor S1P1.

5. Estrategia experimental

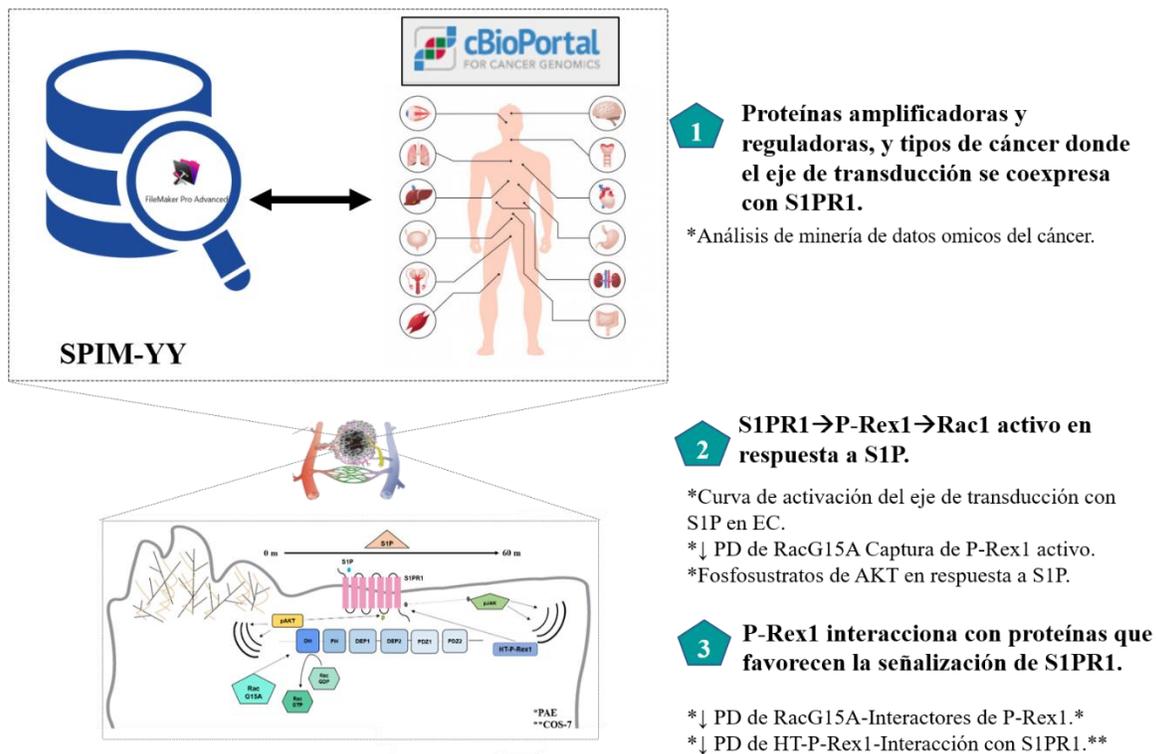


Figura 16. Estrategia general para identificación de proteínas reguladoras del eje S1P1→P-Rex1→Rac1 y validación de la señalización S1PR1. El presente modelo nos indica dos secciones para abordar los 3 objetivos particulares, en la parte superior (1) se hace referencia al análisis de minería de datos ómicos para determinar las identidades de proteínas y tipos de cáncer donde la señalización de S1PR1 esté expresada, la segunda sección se indica en la parte inferior, para el punto 2 y 3, específicamente reflejan las estrategias bioquímicas para validar la existencia del eje de transducción en el laboratorio.

5.1 Proteínas amplificadoras y/o reguladoras y tipos de cáncer donde el eje de transducción se expresa

Para poder identificar en cáncer a proteínas que pudiesen regular el eje de transducción S1P1→P-Rex1→Rac1 se realizó un análisis de minería de datos integrando la base de datos SPIM-YY con estudios de transcriptoma del cáncer obtenidos de *cBioPortal*, permitiéndonos interrogar datos masivos de pacientes para 39 estudios curados y no redundantes.

5.2 S1PR1→P-Rex1→Rac1 activo en respuesta a S1P

Se realizó una curva de activación donde células endoteliales (PAE) fueron estimuladas con S1P y se identificaron las proteínas clave que nos indican la activación del eje S1PR1→P-Rex1→Rac1, como, por ejemplo, proteínas asociadas al complejo mTORC1, mTORC2 y pERK1/2.

Con el uso de pruebas bioquímicas, como *pull down* con la GTPasa libre de nucleótido RacG15A, se logró capturar al Rac GEF P-Rex1 activo. Esto en respuesta al estímulo con S1P en células endoteliales. Además, se determinó la actividad de la cinasa AKT indirectamente por las proteínas que fueron fosforiladas.

5.3 P-Rex1 recluta proteínas que favorecen la señalización de S1PR1

Para caracterizar si P-Rex es capaz de interactuar con otras proteínas y comprender la dinámica con que lo hace se realizaron ensayos de *pull down* con el epítipo HaloTag-P-Rex1 en presencia de S1P. A través del tiempo, la interacción de P-Rex1 con otras proteínas nos indican la complejidad del eje.

6. Materiales y métodos

6.1 Base de datos SPIM-YY

Para generar SPIM-YY se realizó una búsqueda de información en diversas plataformas públicas como: SMART-GENOMES, HGNC (HUGO *Gene Nomenclature Committee*), Uniprot, PhosphoSitePlus, AmiGO, HuRI, *The Bioplex Interactome*, The Rome, Cell Marker, y artículos (recursos y originales), todos los datos fueron procesados e integrados en el software FileMaker Pro 11 versión 11.0v1 (03-16-2010) (Figura 17)

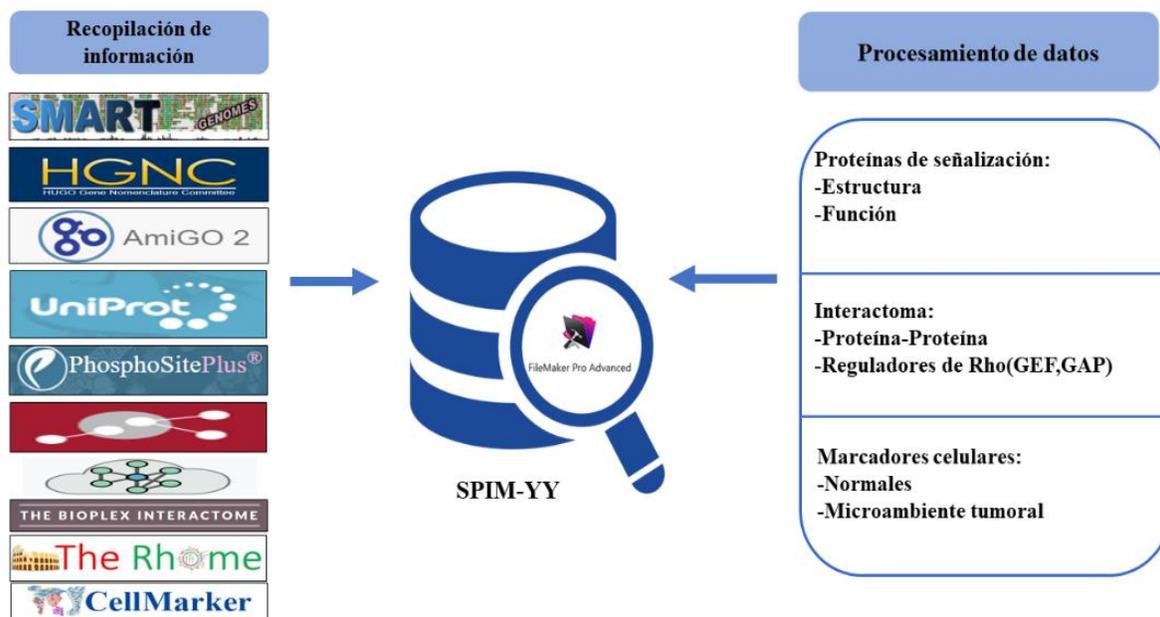


Figura 17. Descripción general de la recopilación y procesamiento de datos obtenidos de múltiples plataformas públicas para la creación de la base de datos SPIM-YY. Izquierda: Se muestran las interfaces consultadas con la finalidad de obtener etiquetas deseables. Derecha: El análisis integrado de la información recabada se presenta en 3 hojas: proteínas de señalización, interactoma y marcadores celulares.

Los criterios de búsqueda fueron los siguientes:

SMART-GENOMES: Ir al sitio Web (<http://smart.embl-heidelberg.de/browse.shtml>) y descargar la información de las proteínas con dominios estructurales de señalización, por ejemplo, para el dominio RhoGEF, seleccionar en evolución; *Homo sapiens*, generar el árbol con formato de Newick basado en la taxonomía de NCBI, junto con el correspondiente conjunto de datos de dominios de proteínas con formato de iTOL y descargar solo el árbol de Newick en texto sin formato, este procedimiento se realiza para los 160 dominios de señalización de humanos.

HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee): Desde la interfaz (www.genenames.org/) buscar la base de datos HGNC por conjunto de genes aplicando los siguientes filtros y atributos: grupo de locus, gen codificador para proteínas; tipo de locus, gen con producto proteico; ID de HGNC, nombre aprobado, estado aprobado, símbolo aprobado, ID del gen Ensembl, ID UniProt.

Uniprot

- **Para nombre de proteína y peso molecular (kDa):** en la página principal de Uniprot, seleccionar la base de datos UniProtKB (Base de conocimientos de UniProt) de proteínas revisadas Swiss-Prot (registros anotados manualmente con información extraída de la literatura y análisis computacional evaluado por el curador) y con las siguientes columnas; nombre de entrada, nombres de genes, nombres de genes (locus ordenado), nombres de genes (ORF), nombres de genes (primarios), nombres de genes (sinónimos), organismo, ID de organismo, nombres de proteínas, longitud, masa, ontología genética (proceso biológico), ontología genética (componente celular), ontología genética (GO), ontología genética (función molecular), ID de ontología genética. El link de acceso a la información anterior es el siguiente www.uniprot.org/uniprot/?query=*&fil=organism%3A%22Homo+sapiens+%28Human%29+%5B9606%5D%22+AND+reviewed%3Ayes.
- **GPCRs:** Para obtener la información de los GPCRs codificados para humanos, se hizo una búsqueda avanzada: GO para actividad de receptor acoplado a proteína G [4930]; organismo, *Homo sapiens* (Human) [9606]; revisados por Swiss-Prot. Para información completa de GPCRs ir a la siguiente liga: [https://www.uniprot.org/uniprot/?query=goa:\(%22G%20protein-coupled%20receptor%20activity%20\[4930\]%22\)&fil=reviewed%3Ayes+AND+organism%3A%22Homo+sapiens+%28Human%29+%5B9606%5D%22&sort=score](https://www.uniprot.org/uniprot/?query=goa:(%22G%20protein-coupled%20receptor%20activity%20[4930]%22)&fil=reviewed%3Ayes+AND+organism%3A%22Homo+sapiens+%28Human%29+%5B9606%5D%22&sort=score)
- **RTKs:** Realizar búsqueda avanzada para goa:("transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity [4714]"), organism:"*Homo sapiens* (Human) [9606]" y revisados por Swiss-Prot. La búsqueda completa se encuentra en el siguiente link: www.uniprot.org/uniprot/?query=goa%3A%28%22transmembrane+receptor+protei

n+tyrosine+kinase+activity+%5B0004714%5D%22%29+organism%3A%22Homo+sapiens+%28Human%29+%5B9606%5D%22&sort=score

- **GEF:** En cuanto a los RhoGEFs se obtuvo de la búsqueda avanzada para goa:("Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity [5089]"), organism:"*Homo sapiens* (Human) [9606]" y revisados por Swiss-Prot. El link de acceso es el siguiente:
[//www.uniprot.org/uniprot/?query=goa%3A%28%22Rho+guanyl-nucleotide+exchange+factor+activity+%5B0005089%5D%22%29+organism%3A%22Homo+sapiens+%28Human%29+%5B9606%5D%22&sort=score](http://www.uniprot.org/uniprot/?query=goa%3A%28%22Rho+guanyl-nucleotide+exchange+factor+activity+%5B0005089%5D%22%29+organism%3A%22Homo+sapiens+%28Human%29+%5B9606%5D%22&sort=score)

PhosphositePlus

Visitar la página Web PhosphositePlus ®(www.phosphosite.org/homeAction.action), buscar por fosfostratos de: AKT1, AKT2, AKT3, JAK1, JAK2, JAK3 y mTOR, y descargar las listas en formato Excel.

AmiGO

Para conocer la función biológica y/o proceso biológico de las proteínas humana se buscó en la interfaz AmiGO (http://amigo.geneontology.org/amigo/dd_browse) dichas características y se descargó la información.

HuRI

El artículo donde se dio a conocer el interactoma de proteína-proteína realizado por la técnica de doble híbrido fue “*A reference map of the human binary protein interactome*” (www.nature.com/articles/s41586-020-2188-x) y la base de datos se obtuvo del siguiente link: www.interactome-atlas.org/.

The Bioplex Interactome

La información donde se explica cómo se obtuvo el interactoma proteína-proteína de Bioplex 3.0 es un preprint, “*Dual Proteome-scale Networks Reveal Cell-specific Remodeling of the Human Interactome*” y la página Web de donde se obtiene la base de datos es <https://bioplex.hms.harvard.edu/>.

The Rome

El recurso “*Systems analysis of RhoGEF and RhoGAP regulatory proteins reveals spatially organized RAC1 signalling from integrin adhesions*” sirvió para identificar a los 145 Rho reguladores y el interactoma de los mismos, esta última información se descargó de <http://therhome.com/>.

Cell Marker

La identidad de los marcadores celulares tanto de células normales como de cáncer se obtuvieron de la plataforma *cell marker* y de artículos originales: *An Integrated Gene Expression Landscape Profiling Approach to Identify Lung Tumor Endothelial Cell Heterogeneity and Angiogenic Candidates* (DOI: 10.1016/j.ccell.2019.12.001), *Cigarette Smoke Exposure and Inflammatory Signaling Increase the Expression of the SARS-CoV-2 Receptor ACE2 in the Respiratory Tract* (DOI: 10.1016/j.devcel.2020.05.012), *SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes* (DOI: 10.1126/science.abc1669).

6.2 Integración de SPIM-YY con estudios de transcriptoma del cáncer

La SPIM-YY fue fusionada con los estudios de transcriptoma del cáncer, dichos estudios fueron obtenidos de la plataforma pública *CbioPortal*, la cual nos permite generar y analizar hipótesis con relevancia clínica a partir de datos transcriptómicos de un número significativo de tumores (Cerami *et al.*, 2014). Dicha integración sirvió para darle identidad a las proteínas candidatas que pudieran regular el eje de transducción $S1PR1 \rightarrow P\text{-Rex1} \rightarrow Rac1$. Las representaciones gráficas de los análisis se hicieron en GraphPad Prism 6.

6.3 Líneas celulares

Se emplearon para análisis bioquímicos células PAE y COS-7. Estas se mantuvieron en cajas p100 a 37°C y 5% CO₂ en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) completo, es decir, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y antibióticos al 1% (Gibco, cat. 15240-062). Las resiembras de las células de mamífero se hicieron 2 veces por semana considerando una confluencia celular del 80 %, se lavaron con 5 ml de PBS 1X estéril posteriormente se aspiró dicha solución y se agregó 1 ml de tripsina EDTA para desprender a las células de la placa. Para esto se incubó durante 10 minutos a 37°C y 5% CO₂. Las células fueron neutralizadas con 9 ml de DMEM completo, obteniendo una suspensión celular 1:10.

De la suspensión celular se tomaron 2 ml y agregaron en 10 ml de DMEM completo previamente depositados en una caja p100 estéril. Esta mezcla se homogenizó durante 30 segundos.

6.4 Plásmidos

PCruz-HA-S1PR1, pHTN-CMV-HA-HaloTag, pCEFL-HA-HaloTag-PRex1.

6.5 Transfección con Lipofectamina-PLUS en células COS-7

Preparación de los complejos: En un tubo se agregan 1250 μ L de DMEM para transfectar (sin SFB, sin antibióticos) más 24 μ l de pCruz-HA-S1PR1 (0.25 λ por condición), mezclar (vortexear) y esperar 1 minuto. De la mezcla anterior, se dividió el volumen a la mitad, es decir, en dos tubos (600 μ l c/u). En el tubo 1, agregar 6 μ l de HA-Halotag (0.5 λ por condición), mezclar (vortexear) y esperar 1 minuto. En el tubo 2, agregar 6 μ l de HA-Halotag-P-Rex1 (0.5 λ por condición), mezclar (vortexear) y esperar 1 minuto. Para llevar a cabo la transfección, agregar* 2 y 10 μ L de Lipofectamina-PLUS (Invitrogen, cat. 10964-021; P/N 50470) para el tubo 1 y 2, respectivamente, y reposar por 15 minutos a TA.

Finalmente, las células COS-7 a transfectar con los complejos (DMEM para transfectar y cDNAs) previamente realizados deben ser preparadas para el experimento. La caja de 6 pocillos se retira de la incubadora y se les aspira por vacío el medio que completo, se lavan con 1 ml de PBS 1X estéril cada pocillo y se retira por vacío. Agregar 1 mL de DMEM para transfectar por pocillo y 200 μ L de complejos (en total son 6 condiciones, 3 en cada tubo). Posteriormente incubar a 37° C, 5% CO₂ durante 5 h y pasado ese tiempo las células se recuperan, es decir, se les cambia el medio de transfección por 1 ml de medio DMEM completo.

*La lipofectamina-PLUS solo debe sacarse de 4°C en el momento preciso de uso e inmediatamente regresar a su lugar de almacenamiento.

6.6 Ayuno

Las cajas con células de mamífero en cultivo se lavaron con PBS 1X estéril (5 ml para p100 y 1 ml para p35). A continuación, se aspiró por vacío* y se agregó medio de ayuno DMEM

(5 ml para p100 y 2 ml para p35), es decir, sin suplementar con SFB y antibióticos. Las células PAE y COS7 se ayunaron de 15-17 h.

*Al retirar el PBS 1X estéril se debe hacer por las orillas.

6.7 Estímulos

La S1P (Sigma, S9666) se preparó a partir de un stock 1000X (1mM) para utilizarlo a 1X (1 μ M), se toma 1 μ l por 1 ml de DMEM ayuno. El HGF (R&D Systems, 294-HGN), se encontraba en un stock de 1000X (10 μ g/ml) y se necesitaba a 1 X (10 ng/ml), por esta razón se tomaron 1 μ l de HGF en 1 ml de DMEM ayuno, obteniendo una solución 1X.

6.8 Lisis

Para lisar las células se utilizó un buffer de lisis, que fue hecho con los siguientes reactivos: TBS-Triton (Tris (pH 7.5) 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X100 1%) con EDTA 5 mM, inhibidores de fosfatasas: NaF 1 mM, Ortovanadato de sodio 1 mM y β -Glicerol fosfato 10 mM; e inhibidores de proteasas: aprotinina 10 μ g/mL, leupeptina 10 μ g/mL y PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 1 mM. Se preparó una solución buffer de lisis sin inhibidores, para 500 ml: 25 mL de Tris-HCl 1M, 5 mL de EDTA 0.5M, 30 mL de NaCl 2.5M, 5 mL de Triton-X100 y 435 ml de H₂O bidestilada. Se almacenó a 4° C hasta su uso.

Según las necesidades en relación con el volumen requerido de buffer de lisis se debe tener en consideración lo siguiente para los inhibidores de fosfatasas y proteasas:

- Fluoruro de Sodio (NaF) 1 mM y Ortovanadato de sodio (Na₃VO₄) 1 mM: 1 μ L por cada mL de buffer de Lisis.
- β -Glicerol fosfato (β -GP) 1M, concentración de trabajo 10 mM: 10 μ L por cada mL de buffer de Lisis.
- Aprotinina 10 μ g/ μ L, Leupeptina 10 μ g/ μ L: 1 μ L por cada mL de buffer de Lisis.
- Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 0.1 M, concentración de trabajo 1 mM: 10 μ L por cada mL de buffer de Lisis.

Las cajas de cultivo con células de mamífero dispuestas a lisar deben ser retiradas de la incubadora (después de los estímulos, si aplica) y ser colocadas sobre hielo, asimismo deben ser lavadas con PBS 1X frío (2-3 ml por caja p100 o 1 ml para p35), aspirar con vacío y

agregar el buffer de lisis (1ml por caja p100 o 600 μ l p35) previamente suplementado* con inhibidores de proteasas y fosfatasas, dejar actuar durante 10 minutos y proceder al raspado. El lisado total debe colocarse en tubos preenfriados para centrifugarse a 13,000 rpm a 4° C durante 10 minutos. Después de la centrifugación se transfiere el sobrenadante (lisado total) a tubos y se ajusta con buffer de Laemmli 4X- β -mercaptoetanol (a 75 μ L de lisado total se le deben agregar 25 μ L de buffer Laemmli 4X- β -mercaptoetanol) se hierven durante 10 minutos y se almacenan a 4 ° C hasta su uso. De este lisado se toma para realizar el *pull down*.

*El buffer de lisis debe suplementarse 15 minutos antes de uso.

6.9 Pull down

○ GST-RacG15A

A 30 μ l de perlas de Glutación-GST-RacG15A, previamente depositadas* en un tubo Eppendorf se le agregan 975 μ l de lisado total, se homogeniza y se incuba durante 1 h a 4°C. Posteriormente las muestras se centrifugan a 3000 rpm durante 1 minuto a 4° C y se procede a lavar 3-4 veces las muestras con Buffer de lisis (1 ml), después de cada lavado se debe centrifugar durante 1 minuto a 3000 rpm a 4° C y aspirar** el sobrenadante para realizar el siguiente lavado. Finalmente, las muestras se diluyen con buffer Laemmli β -mercaptoetanol (25 μ l de buffer Laemmli 4X- β -mercaptoetanol por 75 μ l PD) y hierven a 100 °C durante 5 minutos, seguido de un reposo de 5 minutos se centrifugan a 13 000 rpm durante 5 minutos y se almacenan a -20° C hasta su uso.

*Para agregar las esferas se debe cortar la punta, descargar despacio.

**Al aspirar el sobrenadante se debe tener precaución en no aspirar las esferas (*pellet*).

○ HA-HaloTag-P-Rex1

Se consideraron muestras de 500 μ l y se incubaron con 10 μ l de resina HaloLink durante 45 minutos a 4° C para poder aislar por afinidad a HA-HaloTag-P-Rex1. Posteriormente se procedió a lavar con buffer de lisis (1 ml) 3 veces y a centrifugar a 3000 rpm durante 1 minuto a 4° C antes del primer lavado y después de cada lavado. Aspirar el sobrenadante con el cuidado de no aspirar la resina HaloLink, después de cada lavado. Después de la última

centrifugación se deben agregar 70 μ l de buffer Laemmli 1X- β -mercaptoetanol. Las muestras se almacenan a -20 °C hasta su uso.

6.10 Western Blot

Las muestras se corrieron en geles SDS-PAGE (el porcentaje del gel dependerá del peso de las proteínas, es decir, < 25 kDa (>10-15 %), \geq 100 kDa (6-8%) a 20 mA por 2.5 h*. Las proteínas se transfirieron a membrana Immobilon (Millipore, cat. IPVH00010), previamente hidratada en metanol al 100 %, lavada en agua bidestilada y equilibrada en buffer de transferencia nuevo, a 170 mA o 320 mA por 2.5 h, según se requiera. Posterior a la transferencia la membrana debe ser bloqueada para evitar el pegado inespecífico de proteínas, con leche al 5% en TBS-T por 1 h en el sube y baja a 20 rpm a TA. Lavar (5 minutos) 3 veces con TBS-Tween e incubar con el anticuerpo primario en la dilución sugerida con TBS-Tween 0.05 % toda la noche a 4° C. Al día siguiente se incuban con anticuerpos secundarios (anti-mouse o anti-rabbit, según sea el caso), lavar con agua bidestilada y TBS-Tween, 3 veces cada uno. Revelar con sustrato quimioluminiscente Millipore a una dilución 1/1.

6.11 Anticuerpos

- **Anticuerpos primarios**

Cell Signaling Technology: Fosfostratos de AKT(RXRXXS*/T*), 9614; pAKT (Ser473); p-ERK1/2 (T202/Y204), 9101; pGSK3 β , 9336; p-S6, 2215; p4E-BP1, 2855; 4E-BP1, 9452; P-REX1, 13168S; HA-Tag, 2367.

Sigma: GST, sc-138; ERK2, sc-154; AKT1, P2482.

Bethyl: Rictor, A300-459A.

Santa Cruz Biotechnology: p-AKT1/2/3, sc.514032.

- **Anticuerpos secundarios**

Anti-mouse monoclonal (INVITROGEN: G-21040) y anti-rabbit (IR: 211-032-171).

6.12 Curva activación de vías dependientes de S1P en células PAE

Se sembraron células PAE en cajas de cultivo p100, utilizando un inóculo de 2 ml provenientes de una suspensión celular 1:10, más 10 ml de medio completo DMEM. Se

dejaron incubadas hasta alcanzar una confluencia del 80 %. Posteriormente, las células fueron puestas en ayuno (17 h) y al día siguiente fueron estimuladas a 5, 15, 20 y 60 minutos con S1P 1 μ M por condición, a 15 minutos con 10 ng/ml HGF. Una vez concluidos los estímulos, las células fueron lisadas como se describió previamente. Las muestras quedaron con 200 μ l de lisado total más 67 μ l de buffer de muestra 4X. Se realizaron los WB correspondientes.

6.13 Las células PAE responden a S1P, P-Rex1 es activo y revelan interactores del Rac-GEF

En cajas p100 se sembraron células PAE (a partir de un stock 1:10), se tomaron 2 ml y se homogenizaron con 10 ml de DMEM completo, fueron incubadas hasta alcanzar una confluencia de 80%. Diecisiete horas antes de aplicar los estímulos, las células PAE se pusieron en ayuno. Los estímulos con S1P fueron a 5, 15, 30 y 60 minutos, con HGF a los 15 minutos y como control a tiempo cero se agregó medio DMEM ayuno (5 ml). Se procedió a lisar las células en las distintas condiciones del experimento y se obtuvo lisado total y *pull down* (GST-RacG15A), este último para capturar a P-Rex1 y sus interactores. Finalmente, se corrió el WB y se reveló contra las proteínas de interés correspondientes a este experimento.

6.14 P-Rex1 modula la expresión de S1PR1

Las células COS-7 sembradas en la caja de 6 pocillos se transfectan con HA-S1PR1, HA-Halotag y HA-Halotag-P-Rex1 y se estimularon a 5 y 60 minutos con S1P y HGF. Posteriormente, las células fueron lisadas, obteniendo lisado total (267 μ l) y *pull down*. Realizar los WB establecidos.

6.15 La interacción de P-Rex1 y S1PR1 en respuesta a S1P

Transfectar células COS-7 como en el experimento anterior y estimular con S1P a los 5,15, 30 y 60 minutos, seguido de la lisis para obtener lisado total (134 μ l) y *pull down*. Realizar los WB asignados.

6.16 Diluciones de anticuerpos

Anticuerpo	Dilución
HA	1:5,000
Fosfostratos AKT	1:10,000
pAKT S473	1:4,000
pERK1/2	1:20,000
AKT	1:5,000
ERK2	1:20,000
P-Rex1	1:1,000
pGSK3 β	1:4,000
pS6	1:5,000
p4EBP1	1:4,000
Rictor	1:30,000
S6	1:10,000
4EBP1	1:4,000
Anti-mouse	1:10,000-1:40,000
Anti-rabbit	1:10,000-1:40,000

7. Resultados

Con el propósito de identificar a las proteínas responsables de la regulación del eje S1PR1→P-Rex→Rac1 en diversos tipos cáncer, se generó una base de datos ómicos con etiquetas que nos permitieran revelar las identidades de proteínas, así como sus características estructurales y funcionales. Antes de poder darles identidad a los RNAm altamente coexpresados con S1PR1 en cáncer se generó la base de datos SPIM-YY.

7.1 Base de datos SPIM-YY (Signaling, Protein Interactome and Markers by Yazmin and Yarely)

Tras el procesamiento de datos ómicos a partir de diversas plataformas públicas antes mencionadas, obtuvimos una base de datos con 19219 genes humanos que codifican para proteínas, los cuales se clasificaron en 3 secciones:

1) Proteínas de señalización por estructura y/o función

Esta sección se encuentra basada en dos criterios fundamentales, la primera es de acuerdo con su composición estructural de las proteínas, considerando información de SMART Genomes y Uniprot para conocer sus dominios funcionales, identidades para receptores o Rho reguladores, en conjunto nos permitió etiquetar 4038 proteínas de señalización, la segunda sección engloba funciones moleculares y procesos biológicos obtenidos de la ontológica génica, etiquetando 8863 proteínas, cabe resaltar que dentro de este conjunto de proteínas se incluyen las proteínas de la primera sección (las de estructura).

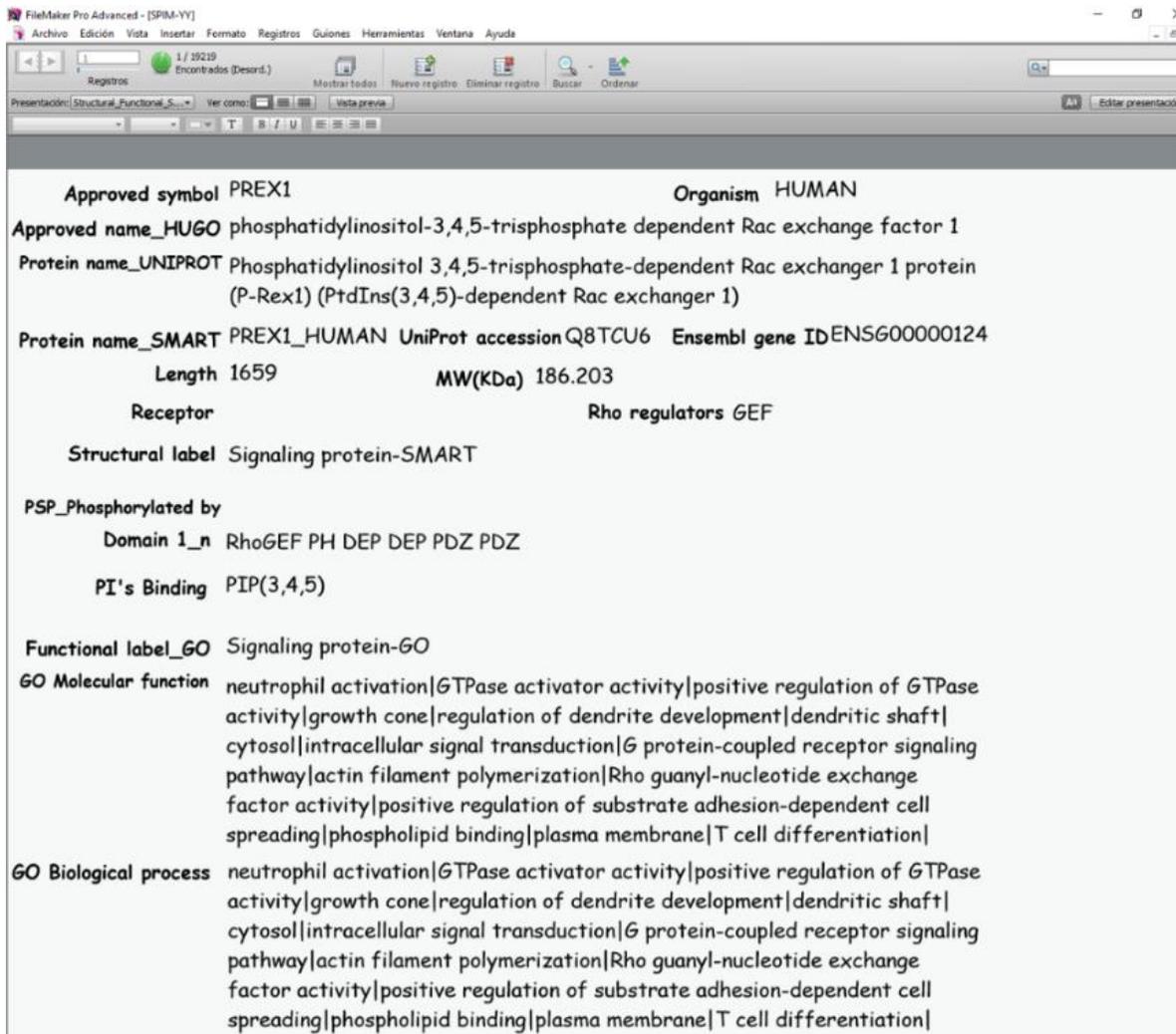
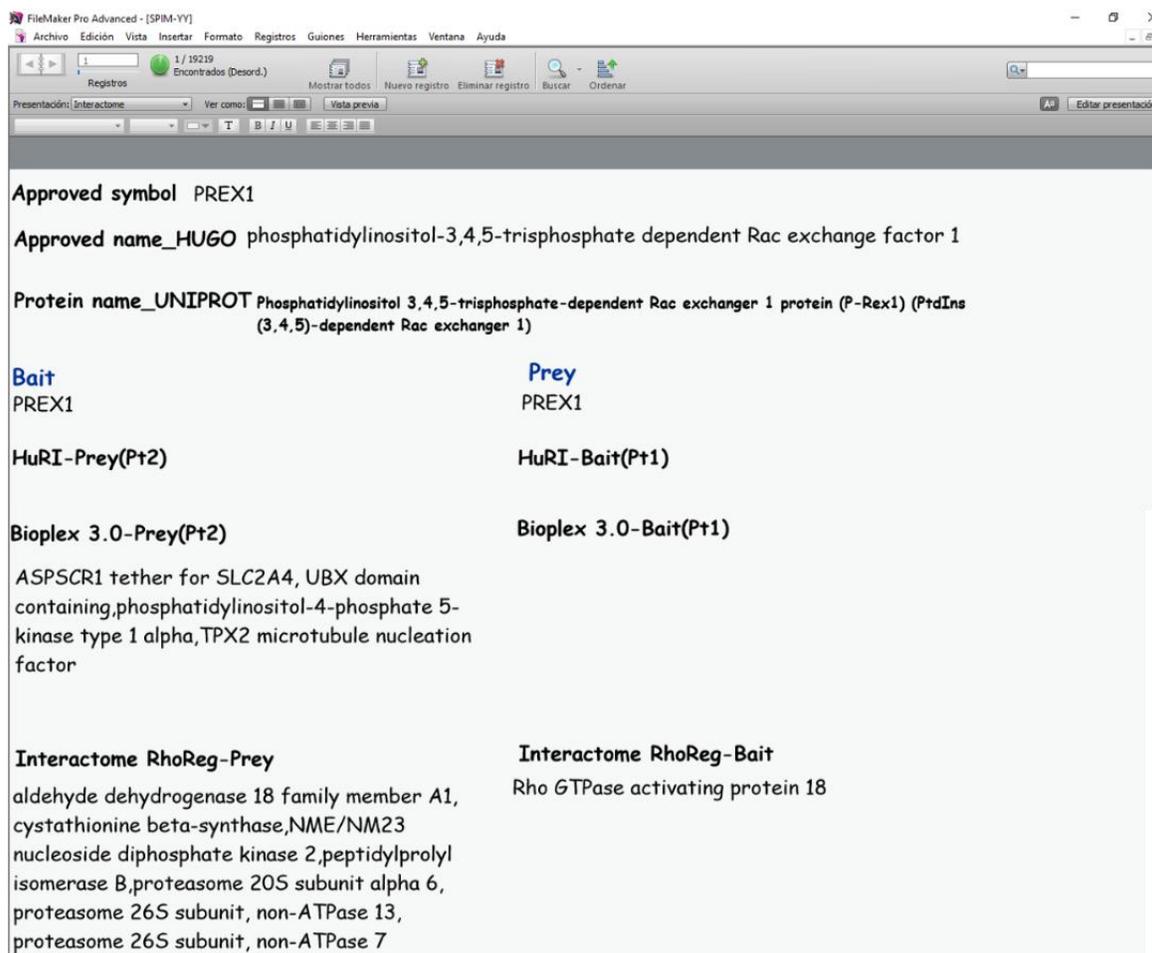


Figura 18. Sección 1 de la base de datos SPIM-YY, Proteínas de señalización por estructura y/o función para P-Rex1. En esta hoja de presentación se pueden encontrar distintas etiquetas como se muestra, para 19219 genes que codifican para proteínas humanas. Aquí se muestra un ejemplo representativo de SPIM-YY, P-Rex1.

Como tal en la base de datos se representa esta información en una hoja de presentación que proporciona la siguiente información: el símbolo aprobado del gen, nombre de proteína por Uniprot o SMART, identificadores, longitud, peso molecular, etiquetas de señalización, dominios funcionales, fosfostratos de las cinasas(AKT1-3, JAK1-3 y mTOR), receptores (si aplica), reguladores de Rho (si aplica), proteínas con unión a fosfoinositidos (si aplica), funciones moleculares y procesos biológicos (Figura 18).

2) Interactoma

Con relación a la etiqueta de interacciones proteína-proteína, se pueden encontrar para tres análisis masivos de proteómica, es decir, HuRI, Bioplex 3.0 y para el interactoma de reguladores de Rho (Figura 19). Los datos integrados para HuRI son un total de 6417 carnadas y 6136 presas, en cuando a Bioplex 3.0 se integraron 9211 carnadas y 7927 presas, finalmente para el interactoma de los Rho reguladores en asignaron 737 carnadas y 128 presas. Cada carnada e interactor fue identificado con su(s) respectivo(s) interactor(es).



Bait	Prey
PREX1	PREX1
HuRI-Prey(Pt2)	HuRI-Bait(Pt1)
Bioplex 3.0-Prey(Pt2)	Bioplex 3.0-Bait(Pt1)
ASPSCR1 tether for SLC2A4, UBX domain containing, phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type 1 alpha, TPX2 microtubule nucleation factor	
Interactome RhoReg-Prey	Interactome RhoReg-Bait
aldehyde dehydrogenase 18 family member A1, cystathionine beta-synthase, NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 2, peptidylprolyl isomerase B, proteasome 20S subunit alpha 6, proteasome 26S subunit, non-ATPase 13, proteasome 26S subunit, non-ATPase 7	Rho GTPase activating protein 18

Figura 19. Interactoma proteína-proteína. Esta sección nos indica las interacciones de la gran mayoría de los genes que codifican para proteínas por técnicas como el doble híbrido o espectrofotometría de masas. Particularmente, se muestra un ejemplo representativo para el Rac-GEF P-Rex1, se encontró que cuando este se utiliza como carnada puede interactuar con el ASPSCR1, la fosfatidilinositol 4-fosfato 5-cinasa tipo 1 alfa, la proteína dirigida a Xklp2, esto de acuerdo con Bioplex 3.0 y respecto al interactoma de los Rho reguladores con la delta-1-pirrolina-5-carboxilato sintasa, la cistationina beta-sintasa, el nucleósido difosfato quinasa B, la peptidil-prolil cis-trans isomerasa B, la subunidad reguladora 7 y 13 no ATPasa del proteasoma 26S. En contraste cuando ARHGAP18 se utiliza como carnada P-Rex1 se encuentra como presa.

3) Marcadores celulares

Simultáneamente, se integró una sección donde los genes se pudieran identificar como marcadores de poblaciones relevantes en el microambiente tumoral, como, células inmunes, endoteliales, epiteliales, fibroblastos e incluso las cancerosas (Figura 20). En este sentido, se agregaron a la base de datos maestra los siguientes marcadores, 2473, 1731, 747, 30 y 1227 para células inmunes, epiteliales, endoteliales, fibroblastos y cancerosas, respectivamente. Para conocer más a detalle el tejido se puede consultar las casillas correspondientes, ya sea en relación con un marcador normal o de cáncer. Asimismo, en esta sección se pueden consultar marcadores específicos para células endoteliales de cáncer de tumor y peritumorales de mismo, catalogadas como normales.

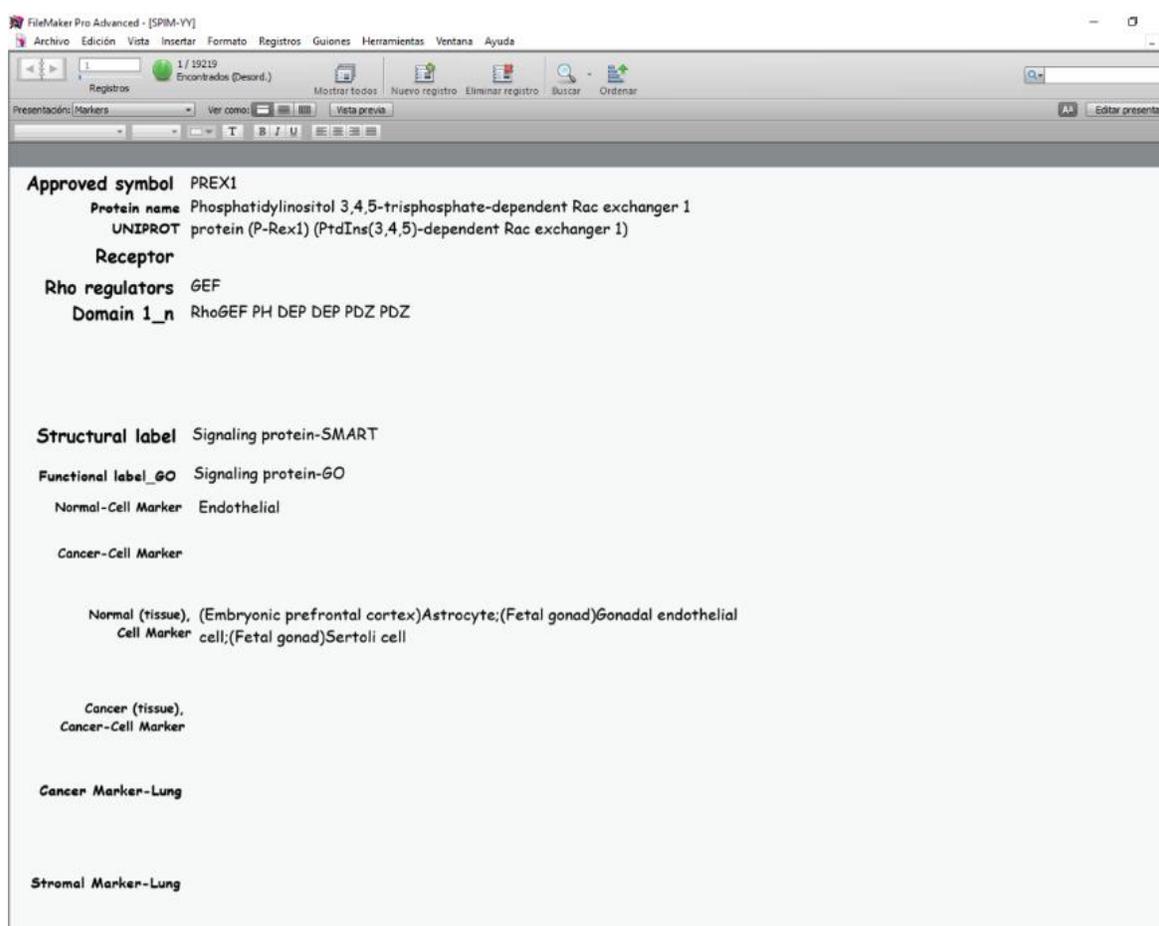


Figura 20. Sección de marcadores celulares normales y patológicos (cáncer). Se muestra un ejemplo representativo de dicha sección, es decir, P-Rex1, que de acuerdo con SPIM-YY este GEF es marcador de células endoteliales de gónadas fetales.

7.2 La SPIM-YY da identidad a las proteínas que se coexpresan con S1PR1 en cáncer

Para conocer a las proteínas que se coexpresan con S1PR1 se consultó la base de datos cBioPortal, obteniendo 16709 pacientes/17385 muestras en 39 estudios curados no redundantes, a partir de 178 estudios de cáncer disponibles en dicha plataforma (Figura 21).

Alteraciones frecuentes de S1PR1 en distintos tipos de cáncer

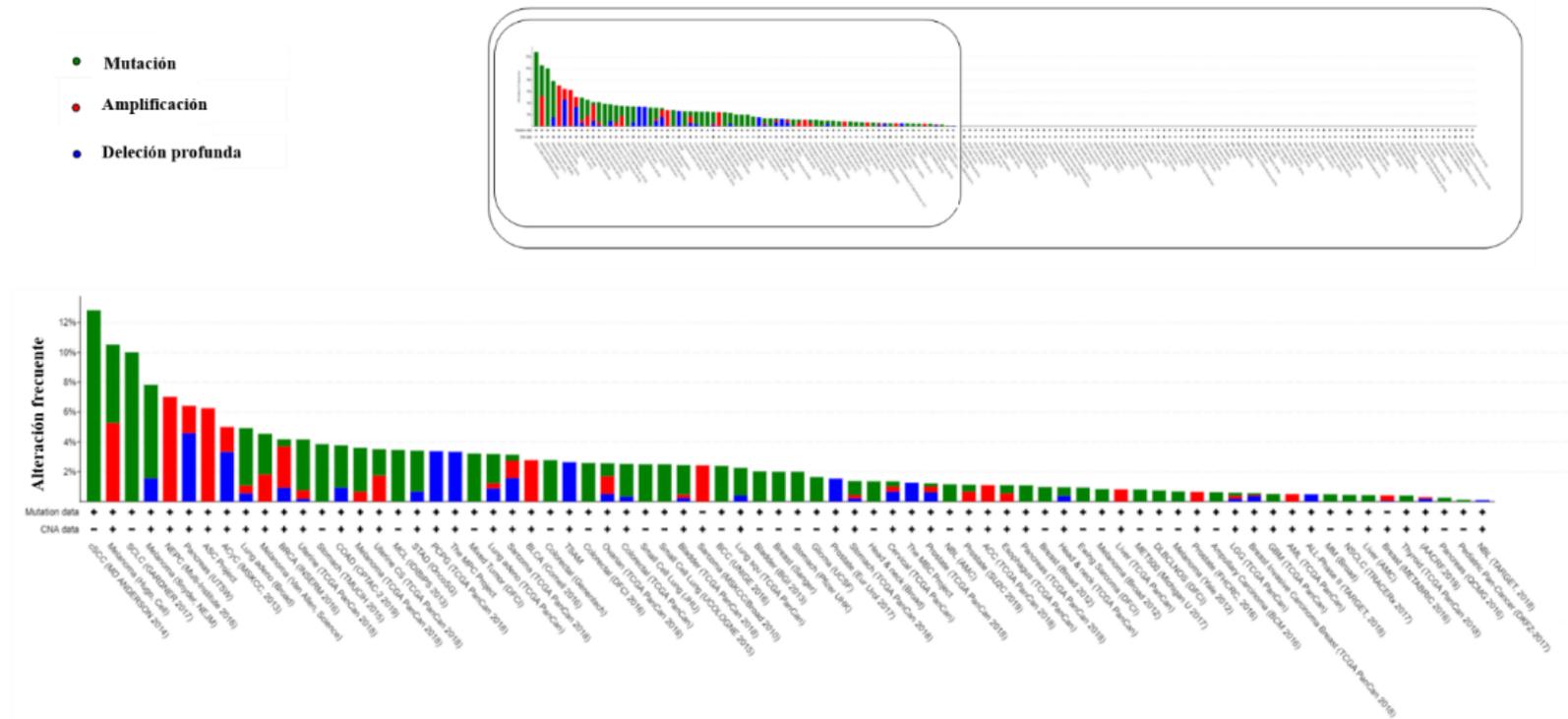


Figura 21. Alteraciones del gen S1PR1 en cáncer. Se muestra la frecuencia de alteración del gen S1PR1 en distintos tipos de cáncer inmersos en 178 estudios independientes obtenidos de cBioPortal (Julio, 2020). En el eje Y se representa la frecuencia de alteración del gen S1PR1 y en el eje X se hace referencia a los diferentes estudios de cáncer. Los colores muestran alteraciones según se indique en la figura. En la parte inferior de la figura se muestra la distribución general de la frecuencia de alteraciones en el gen S1PR1, mientras que la parte encuadrada de la figura se representan todos los estudios de cáncer en los que se produjo la frecuencia de alteraciones.

A continuación, la base de datos generada con los 30 tipos de cáncer (Figura 22) a partir de los 39 estudios, se integró con SPIM-YY, para darle identidad a todas las proteínas de señalización presentes en cada conjunto de datos con la primicia de que nos interesa conocer cómo se regula el eje S1PR1→P-Rex1-Rac1. Al final se acumularon ~790,000 datos de muestras humanas.

30 tipos de cáncer obtenidos de cBioPortal

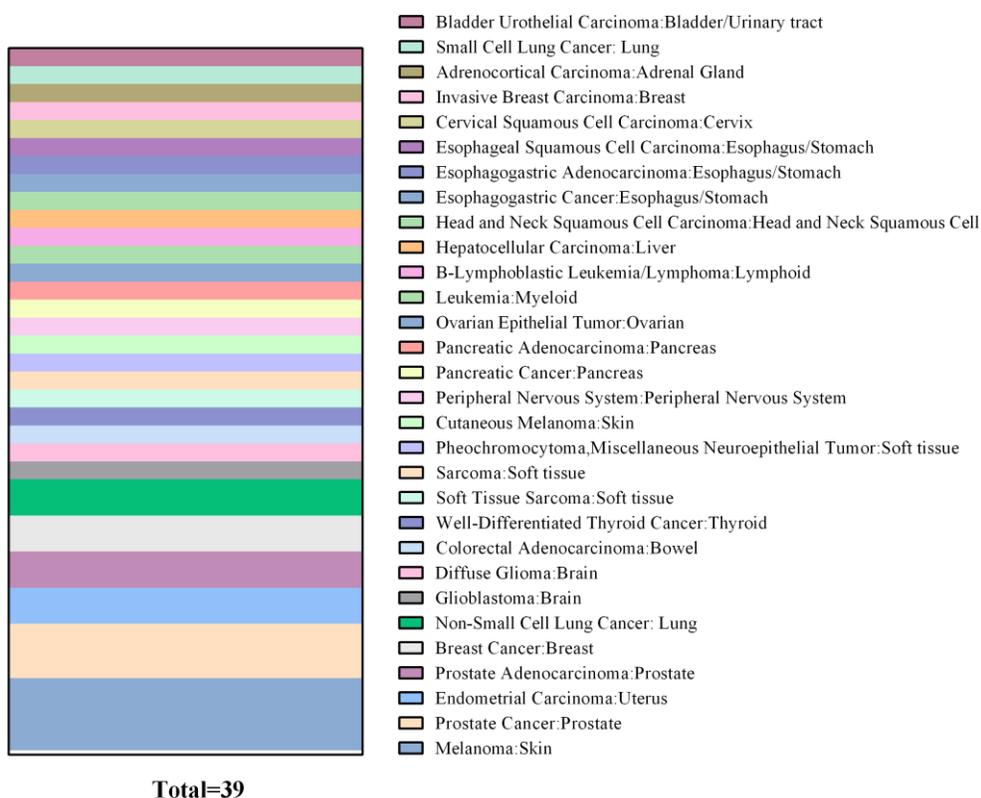


Figura 22. Diagrama representativo de los tipos de cáncer obtenidos del análisis de los treinta y nueve estudios de cáncer de cBioPortal. Se muestran con una serie de colores los diversos tipos de cáncer de acuerdo con la clasificación brindada por cBioPortal. Para más detalle de estos datos de clasificación de acuerdo a CbioPortal, ir a la tabla 1 ubicada en el apéndice.

7.3 Análisis de la normalización de estudios de cáncer con alteraciones en el S1PR1

El transcriptoma de cada estudio de cáncer consta en promedio 20,000 genes, de los cuales no todos corresponden a genes con productos proteicos de señalización por lo tanto nosotros delimitamos dicho conjunto de genes y dentro de este el subconjunto de genes que mejor se coexpresan con S1PR1, asumiendo que estos están en el cuartil superior, es decir, en el cuartil más cercano a +1 de acuerdo con el valor de correlación de Spearman (Figura 23). Considerando que un valor de correlación de Spearman positivo significa una relación estrecha en la regulación y/o acompañamiento con S1PR1 y si fuese más negativo nos indica exclusión. Es subconjunto de genes que se coexpresan altamente con S1PR1 nos ayudaron a identificar las proteínas que regulan el eje S1PR1 → P-Rex1 → Rac1 en cáncer.

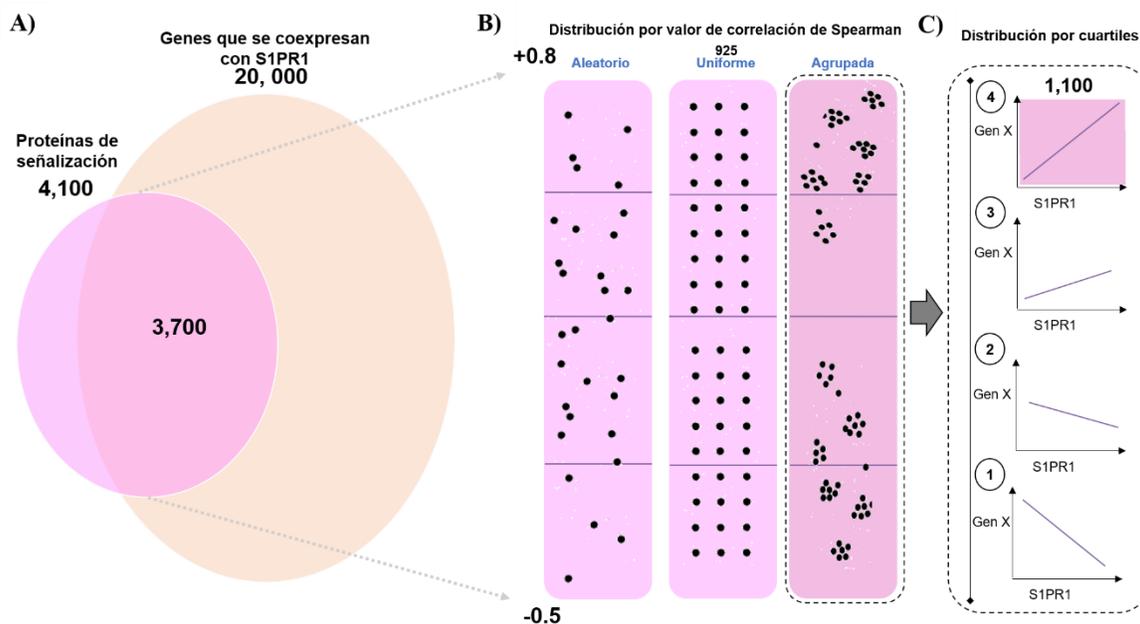


Figura 23. Esquema del análisis del transcriptoma para delimitar el subconjunto de proteínas de particular interés que expresan el S1PR1 en cáncer. A) La representación de genes que coexpresan a S1PR1 en un estudio de cáncer, dentro de cual en promedio 3700 genes codifican para proteínas de señalización, de las 4100 proteínas de señalización de acuerdo con su estructura etiquetadas en la base de datos SPIM-YY. B y C) El subconjunto de genes de interés se ubica en los 3700 genes que codifican para proteínas de señalización, de acuerdo una distribución agrupada en relación a su valor de correlación de Spearman (B) y el cuarto cuartil (C), este subconjunto tiene datos de correlación de Spearman en promedio entre -0.54 a 0.83.

7.4 Enriquecimiento de proteínas de señalización de acuerdo con su estructura en decenas tipos de cáncer en los estudios de transcriptoma humano que tienen alteraciones en el S1PR1

En general, para determinar si las proteínas de señalización se encuentran enriquecidas en el cáncer con S1PR1, aplicamos la siguiente fórmula para cada uno de los 39 estudios:

$$\text{Enriquecimiento de proteínas de señalización} = \frac{\text{Encontrado en 4to cuartil} * 1}{\text{Esperado (distribución uniforme por cuartil)}}$$

Como resultado de esta normalización pudimos encontrar que en los 30 tipos de cáncer hay un enriquecimiento de proteínas de señalización de acuerdo con su estructura (Figura 24). Lo anterior brinda múltiples posibilidades para comprender los mecanismos de señalización que acompañan al cáncer.

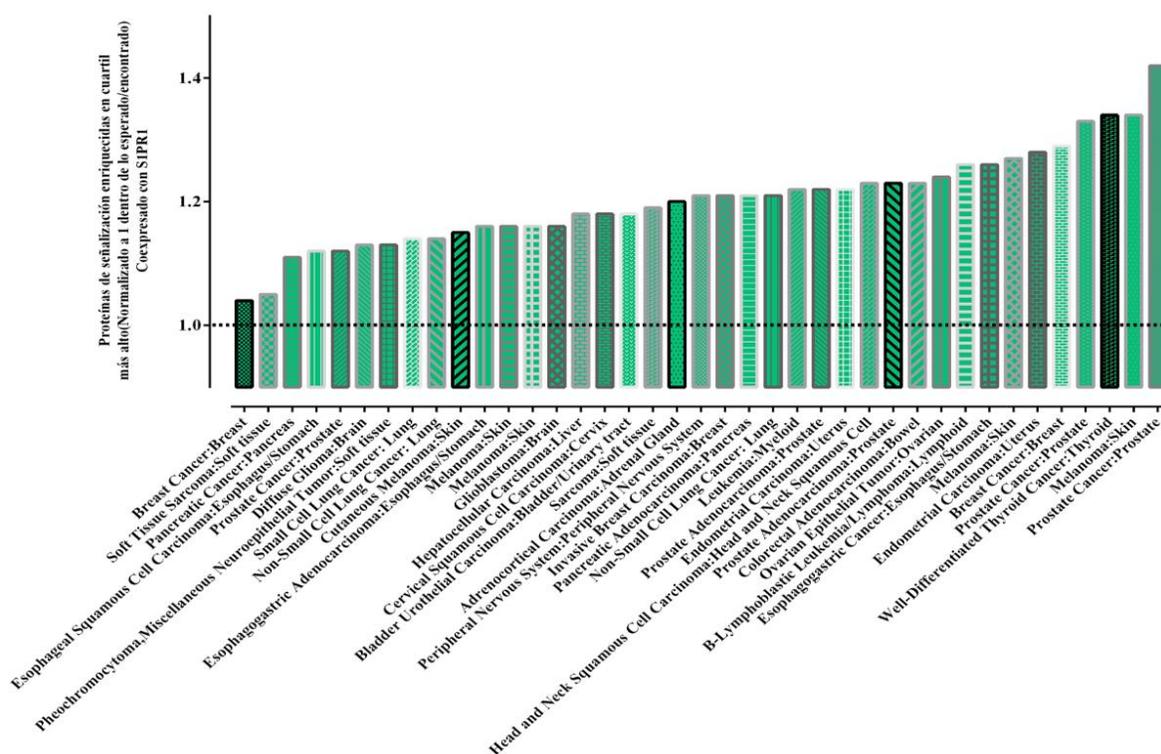


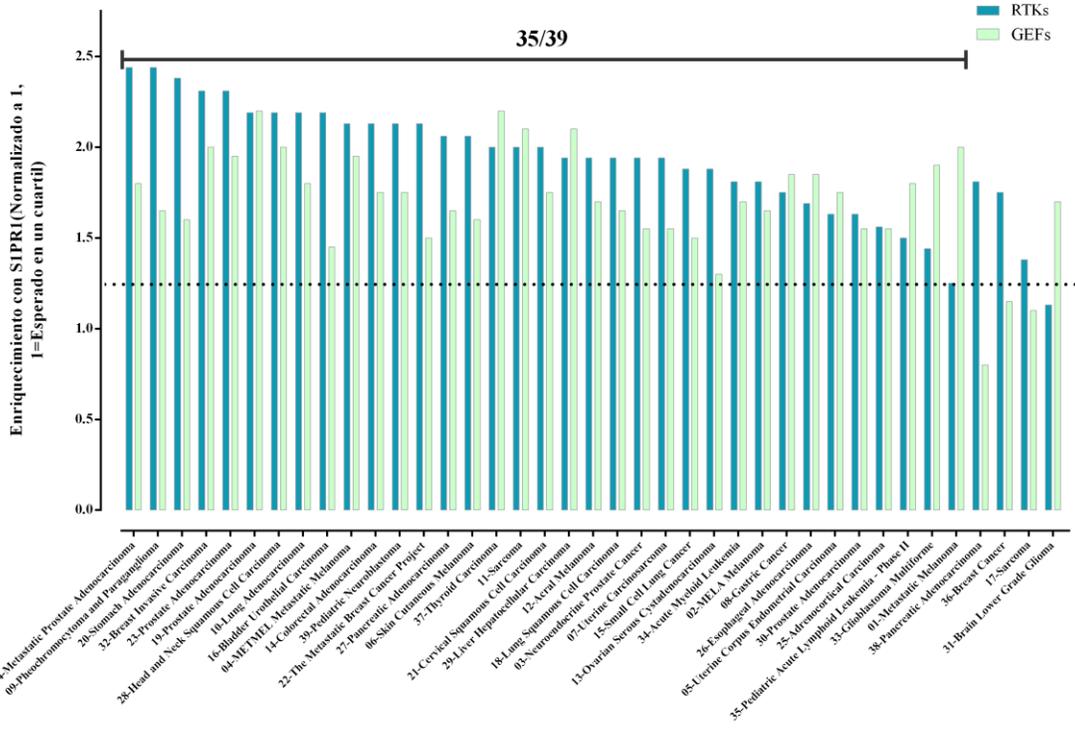
Figura 24. El enriquecimiento de proteínas de señalización en diversos tipos de cáncer que expresan S1PR1 alterado. Se considera enriquecimiento cuando el valor es superior a 1.0, lo cual nos indica una abundancia de proteínas de señalización con los mejores valores de correlación de Spearman en el cuartil superior. En el eje de las ordenadas se indica el enriquecimiento de proteínas de señalización en el 4to cuartil y en las abscisas el nombre de los tipos de cáncer. Para conocer los valores de enriquecimiento a mayor detalle consultar la tabla 2 en apéndice.

7.5 La señalización de S1PR1 está enriquecida para receptores, GEFs, tirosina cinasas y proteínas con dominios SH2, PDZ y PH en cáncer

Posteriormente de identificar el enriquecimiento de proteínas de señalización que coexisten con S1PR1 en diversos tipos de cáncer, optamos por validar por estructura a las proteínas que están altamente coexpresadas con el S1PR1, considerando el cuartil con los valores más cercanos a +1 en los 39 estudios (Tabla 3, apéndice). En este sentido, se aplicaron tres criterios estructurales:

1.- Receptores y GEFs

En un proceso de transducción de señales los primeros en percibir los estímulos son los receptores, además estos pueden tener una regulación y/o comunicación horizontal entre ellos, por esto por lo que consideramos importante conocer si este tipo de proteínas en particular se encontraban enriquecidas en cáncer con S1PR1, siendo que en la gran mayoría de los tipos de cáncer que aquí analizamos encontramos un enriquecimiento de estas proteínas transmembranales (Figura 25). Simultáneamente, analizamos el enriquecimiento de GEFs, proteínas responsables de la activación de los interruptores moleculares, las Rho GTPasas. De forma similar se encontró un enriquecimiento para los GEFs (Figura 25) en los 39 estudios de cáncer aquí analizados.



Estudios de cáncer

Figura 25. En cáncer hay un enriquecimiento de proteínas con características de tipo receptor y GEFs. Podemos observar un enriquecimiento en 35 de 39 estudios de cáncer para receptores tirosina-cinasa (RTKs) y factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (Rho GEF). El enriquecimiento está indicado por la línea punteada que hace referencia a 1.25. La normalización se realizó considerando 1 como el número total de datos esperados en una distribución uniforme tanto para RTKs como para GEFs.

2.- Cinasas con especificidad por tirosina y proteínas con dominios SH2

En relación con el enriquecimiento de cinasas citosólicas con especificidad por tirosina y las proteínas que cuentan con los dominios que reconocen esos fosfositios de tirosina, encontramos que de los 35 estudios de cáncer que están enriquecidos para RTKs y GEFs, filtrados con los criterios, todos a excepción de un estudio cuentan con este filtro (Figura 26).

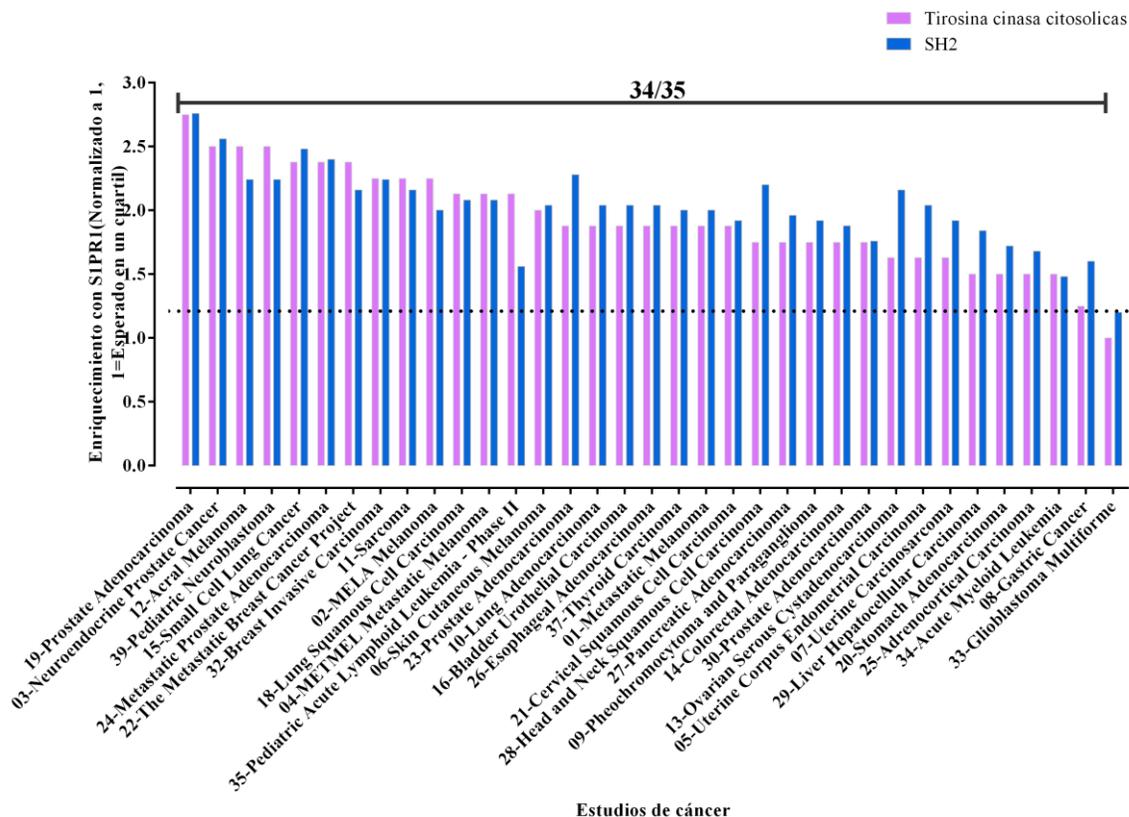


Figura 26. El enriquecimiento para tirosina cinasas citosólicas y proteínas con dominios SH2 en cáncer. De los 35 estudios (Figura 25) previamente filtrados 34 cumplen con el enriquecimiento para tirosina cinasas citosólicas y proteínas con dominios SH2, lo que no orienta a hipotetizar que probablemente la señalización de S1PR1 se encuentra acompañada de señalización mediada principalmente por RTKs.

3.- Proteínas con dominios PDZ y PH

Finalmente, obtuvimos un enriquecimiento para proteínas de señalización que cuentan con dominios PDZ y PH en 26 de los 34 estudios filtrados en el punto 2. Claramente hay una abundancia de proteínas reguladas por fosfoinosítidos ya que los valores de enriquecimiento para todos los estudios de cáncer son superiores a 1.5 (Figura 26). En contraste, la abundancia de proteínas con dominios PDZ fue diferencial, es decir, en los estudios su enriquecimiento fue menor y fue el criterio que sirvió de exclusión de 8 estudios de cáncer.

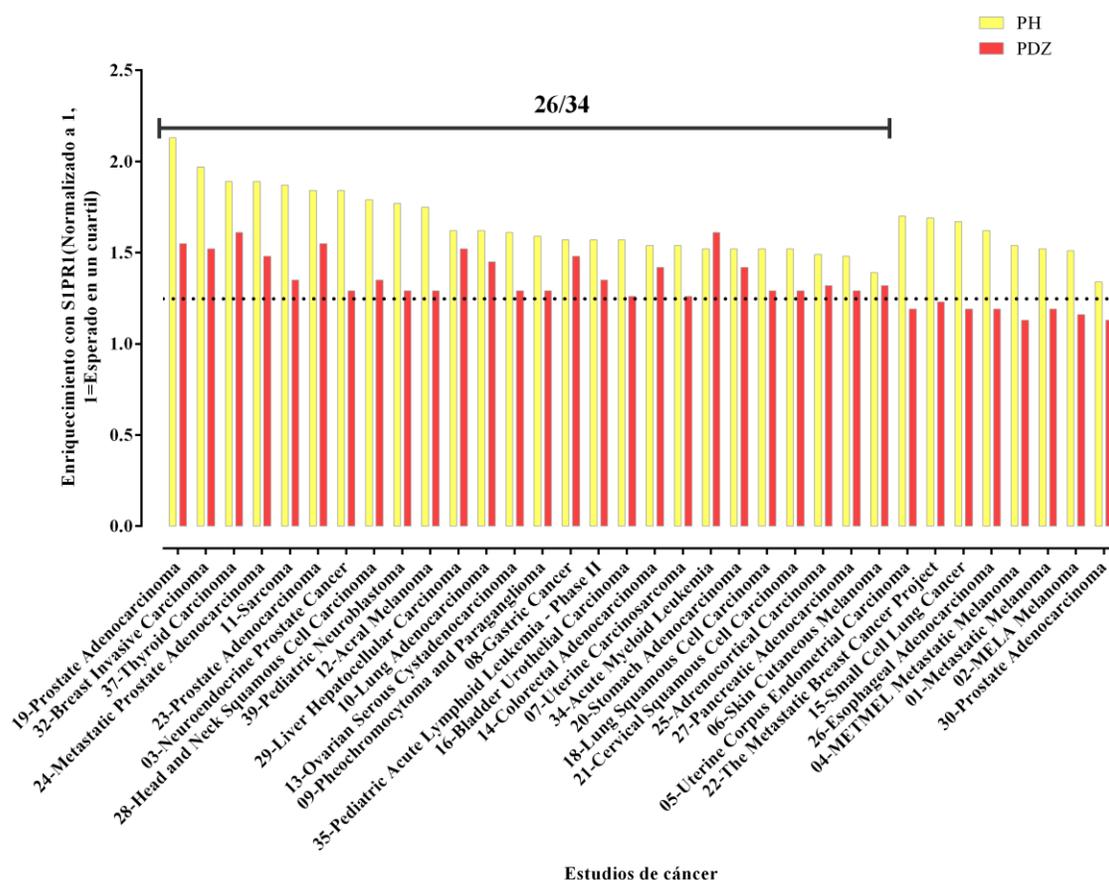


Figura 26. Las proteínas de señalización con dominios PDZ y PH se encuentran enriquecidas en cáncer. El análisis de este tipo de proteínas de señalización filtro 26 de 34 estudios previamente filtrados. En conjunto estos 26 estudios señalados por la barra negra representan los tipos de cáncer donde proteínas de señalización de tipo receptores de membrana, GEFs, cinasas de tirosina y proteínas con dominios SH2, PDZ, y PH están enriquecidas con SIPRI en cáncer.

Los datos transcriptómicos de coexpresión con S1PR1 en los 39 estudios de cáncer obtenidos a través cBioPortal, nos muestran la expresión de S1PR1 en todos los estudios aquí analizados y sus posibles alteraciones a nivel de RNAm (Figura 27) lo cual no necesariamente refleja la expresión de proteína del receptor y su participación en cáncer, es por ello por lo que se realizó un análisis de datos estadísticos de curvas de supervivencia de pacientes con cáncer del TCGA.

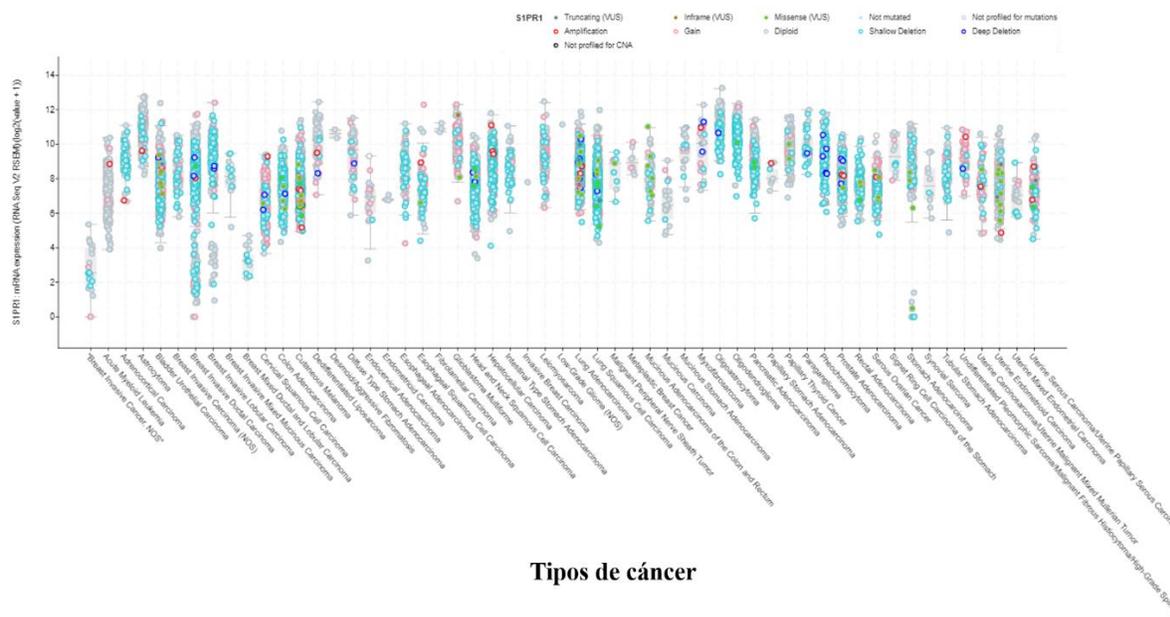


Figura 26. Expresión de RNAm de S1PR1 en diversos tipos de cáncer a partir del transcriptoma obtenido de cBioPortal. En el eje de las ordenadas se muestra escala log2 la expresión del S1PR1y en el eje de las abscisas los tipos de cáncer. Las alteraciones más comunes se indican con los colores descritos en la parte superior de la figura.

7.6 La correlación de una alta expresión de S1PR1 en cáncer revela resultados estadísticos diferenciales en el valor pronóstico de supervivencia en los pacientes

Con el objetivo de conocer la relación de una elevada expresión de S1PR1 en pacientes con cáncer, analizamos las curvas de supervivencia del TCGA y encontramos que dependiendo del tipo de cáncer el impacto de letalidad puede variar, es decir, puede relacionarse estadísticamente a un mal pronóstico (Figura 27A), buen pronóstico (Figura 27B) o no tener una repercusión en la supervivencia de los pacientes con cáncer que sobreexpresan el S1PR1.

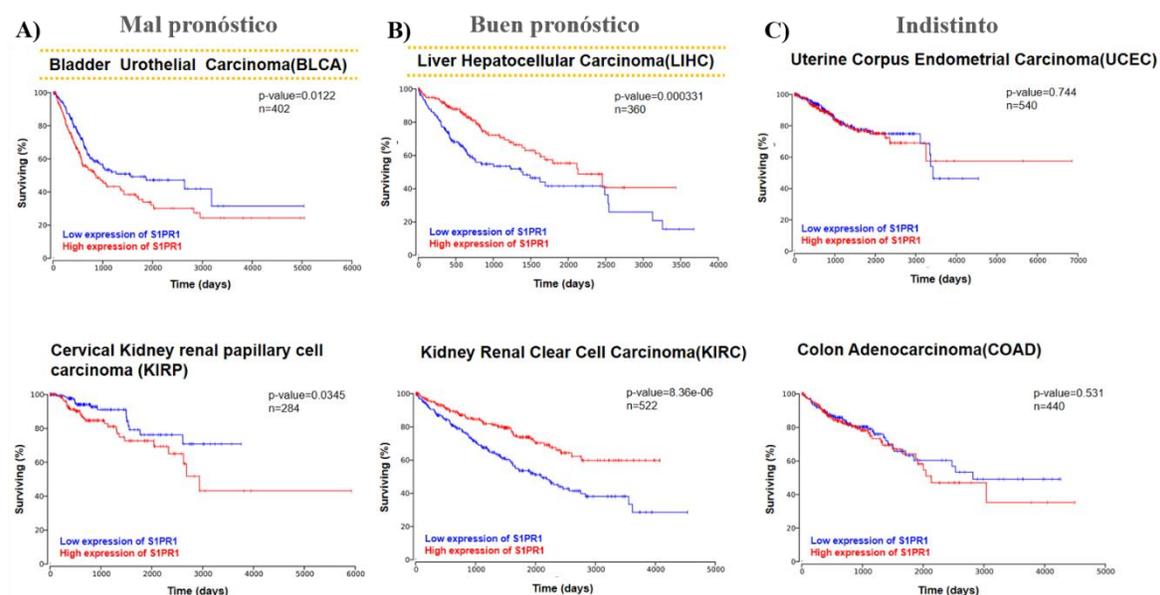


Figura 27. Curvas de supervivencia de pacientes con cáncer que tiene una baja o alta expresión de S1PR1. De acuerdo con los altos niveles de expresión de S1PR1 en distintos tipos de cáncer la relación con la supervivencia de los pacientes puede diferir entre un buen pronóstico (B), mal pronóstico (A) o ser indistinto (C).

Tras el análisis de enriquecimiento de datos transcriptómicos públicos encontramos que dentro de los 39 tipos de cáncer que analizamos hay dos estudios que nos arrojan información sobre el impacto estadístico en la letalidad para el cáncer: el carcinoma urotelial de vejiga asociado a un mal pronóstico (Figura 27A) y el carcinoma hepatocelular de hígado asociado a un buen pronóstico (Figura 27B). Simultáneamente obtuvimos la firma de genes que acompañan la señalización de S1PR1 en las dos situaciones. Particularmente para el carcinoma urotelial de vejiga (*BLCA*) asociado a un mal pronóstico identificamos una serie de proteínas de señalización con valores estadísticos significativos tanto en coexpresión de Spearman con relación a la coexpresión con S1PR1 como el valor p de las curvas de supervivencia del TCGA (Figura 28 A-B).

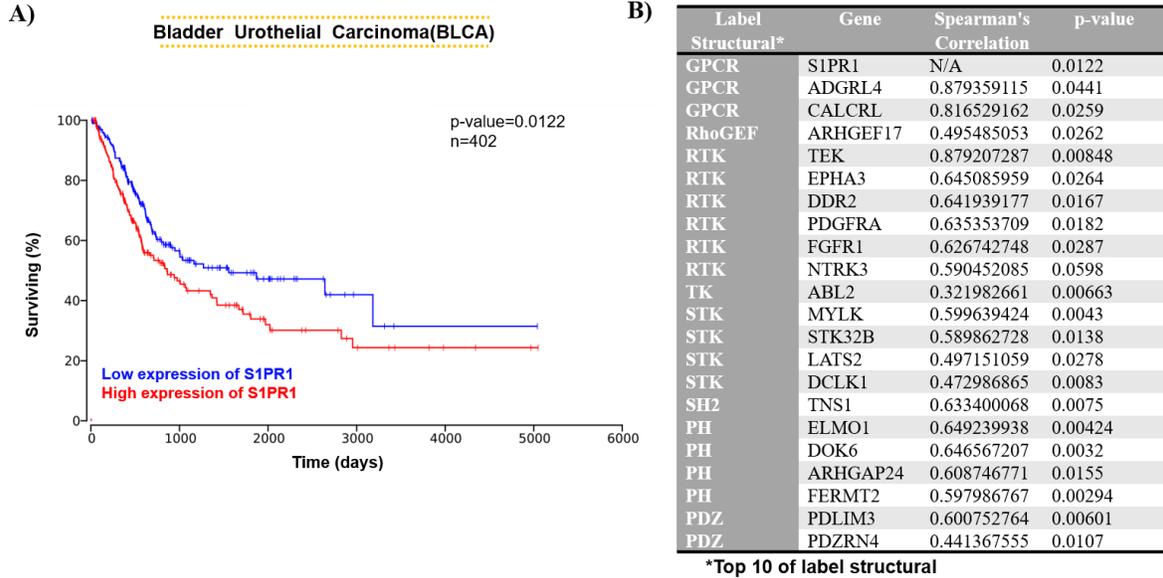


Figura 28. Proteínas candidatas en el acompañamiento de la señalización de S1PR1 en BLCA asociadas a un mal pronóstico en la supervivencia de pacientes humanos. A) Curva de Kaplan-Meier para la supervivencia de 201 pacientes con BLCA que tienen una alta expresión se relaciona estadísticamente con una mala supervivencia y la otra mitad de pacientes se asocian con un efecto protector al tener una baja expresión de S1PR1. B) Los genes filtrados por la etiqueta estructural de la sección 1 proporcionada por SPIM-YY que se coexpresan altamente con S1PR1 en el estudio del transcriptoma para el carcinoma urotelial de vejiga. El análisis para estas 21 proteínas candidatas se obtuvo a partir del top 10 de genes con mejor dato de coexpresión de Spearman con S1PR1 para las etiquetas estructurales: Receptor (GPCR, RTK), Rho Regulador (GEF), Dominio 1-n (Tyrkc, S_Tkc, PDZ, PH, SH2).

Los valores p obtenidos de las curvas de supervivencia de las proteínas de señalización que acompañan a S1PR1 son significativos y con la misma tendencia que la obtenida para S1PR1 sobreexpresado en el carcinoma urotelial de vejiga (Figura 29).

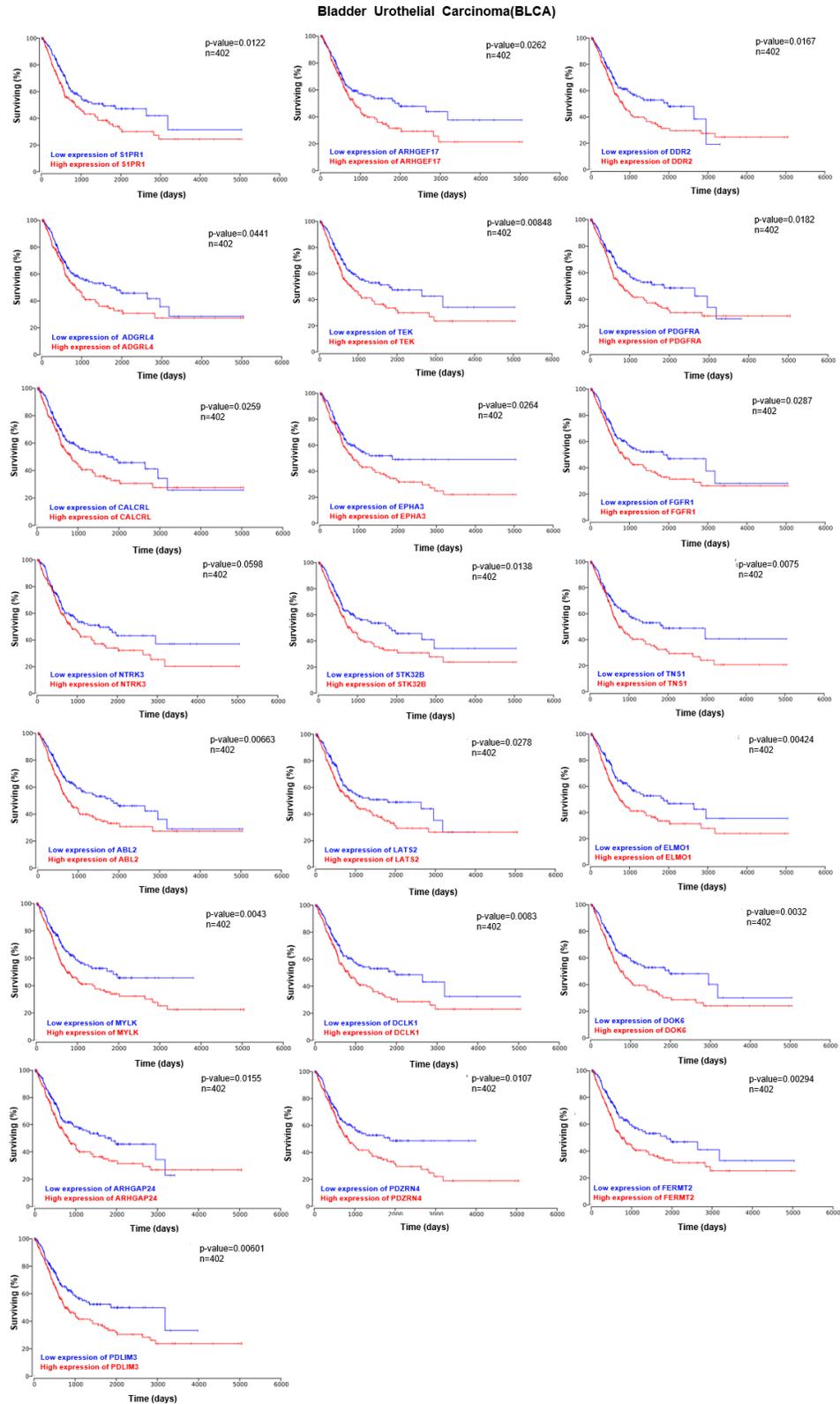
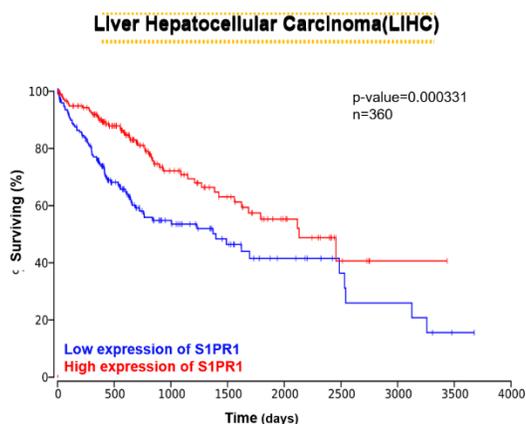


Figura 29. Curvas de supervivencia de pacientes con carcinoma urotelial de vejiga para 21 genes que se coexpresan altamente con S1PR1. Cuando el S1PR1 se sobreexpresa en los pacientes con BLCA se asocian los 21 genes aquí mostrados con un mal pronóstico de vida.

En contraste, el carcinoma hepatocelular de hígado (*LIHC*) el cual estadísticamente se correlaciona con un buen pronóstico para la supervivencia de pacientes cuando sobreexpresan a S1PR1. En *LIHC*, el S1PR1 es acompañado por 19 genes que codifican para proteínas de señalización de acuerdo con su estructura (Figura 30).

A)



B)

Label Structural	Gene	Spearman's Correlation	p-value
GPCR	S1PR1	N/A	0.000331
GPCR	CALCRL	0.62594167	0.0151
GPCR	RAMP3	0.46192721	8.76e-06
GPCR	ADRA2B	0.457372	0.000256
GPCR	DRD1	0.45579553	0.00277
RTK	KDR	0.67956134	0.00899
RTK	TEK	0.63452836	0.00138
RTK	TIE1	0.61585827	0.0191
RTK	FLT4	0.59557595	0.000501
RTK	EPHA4	0.53045181	0.00479
PDZ	SHROOM4	0.62144395	0.00477
PDZ	RAPGEF2	0.46862679	0.000927
PDZ	GIPC3	0.38886034	0.016
TK	BMX	0.5525463	0.0256
TK	FYN	0.44196479	0.000128
TK	PTK2B	0.32176269	0.0109
TK	ITK	0.26822624	0.0113
STK	SIK2	0.41152883	4.66e-05
PH	RASGRF2	0.53591771	0.038
PH	IRS1	0.41388587	0.0419

*Top 10 of label structural

Figura 30. El *LIHC* revela un subconjunto de proteínas de señalización que acompañan la señalización de S1PR1. En la mitad de los pacientes del estudio de *LIHC*, se encuentra sobreexpresado el S1PR1 y se asocia con un buen pronóstico de supervivencia (A). Dicha sobreexpresión de S1PR1 es acompañada por proteínas distintas a cuando la sobreexpresión se asocia a un mal pronóstico con *BLCA*. Las proteínas que se coexpresan altamente cuando S1PR1 está sobreexpresado en *LIHC* son 19 (B), los cuales fueron analizados como se describió para *BLCA*.

El comportamiento de las curvas para estos genes que acompañan la señalización de S1PR1 en *LIHC* son equivalentes a la observada propiamente para S1PR1 y con valores p significativos (Figura 31).

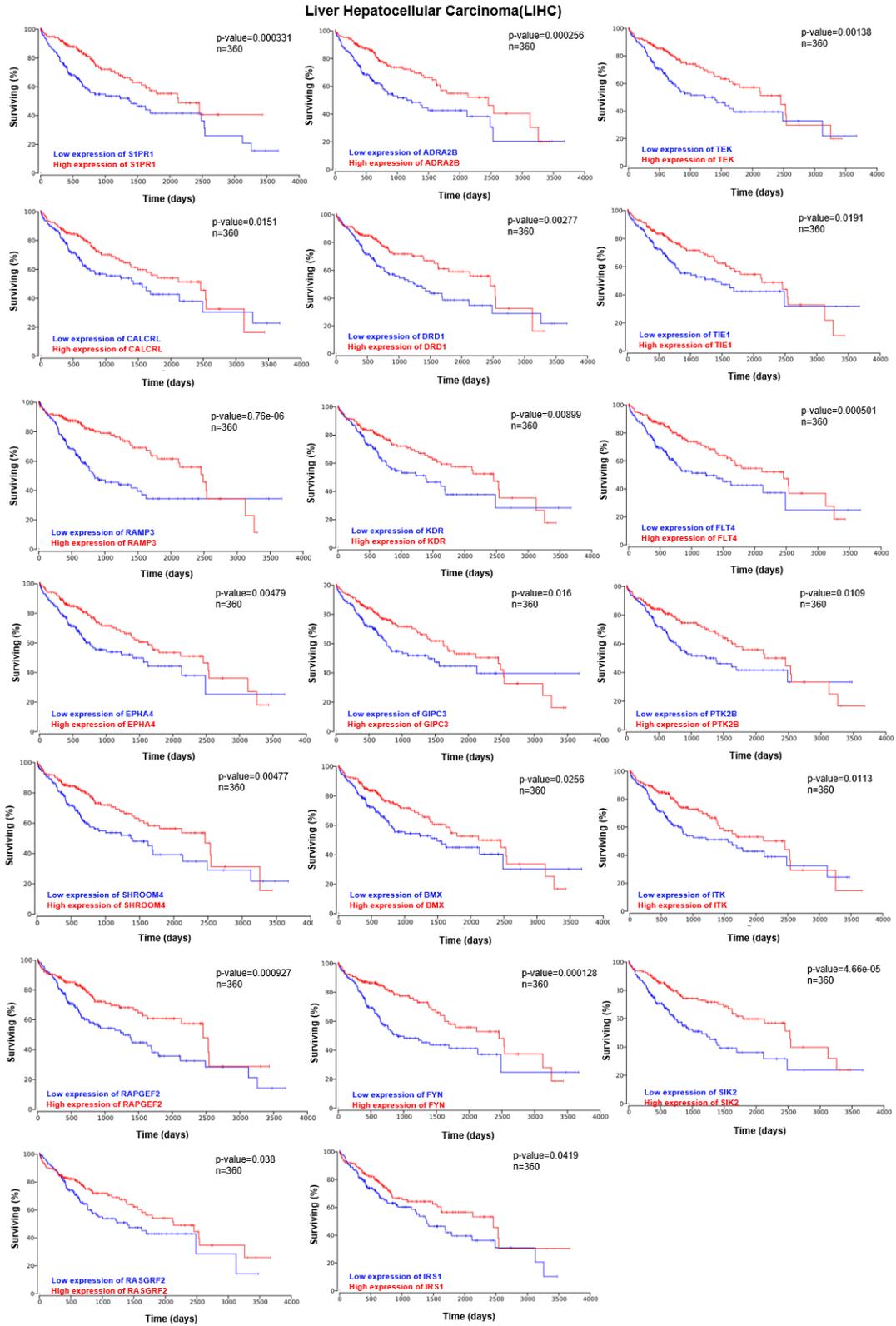


Figura 31. Las curvas de sobrevivencia de proteínas de señalización que acompañan a S1PR1 cuando este se sobreexpresa en el LIHC. Estas gráficas nos muestran en el eje de las ordenadas el porcentaje (%) de sobrevivencia y en las abscisas el tiempo en días para 20 genes.

7.7 El complejo mTORC2 se activa en células endoteliales dependiente de S1P

Con la finalidad de identificar las vías de señalización activadas por S1P se estimularon células endoteliales y se encontró que el mTORC2 es activo y esto dependiente de S1P, esto no ocurre para el complejo 1 de mTOR, simultáneamente se probó HGF en las células endoteliales. De manera comparativa la actividad de ERK1/2 se encontró para ambos estímulos en intensidades diferentes (Figura 32).

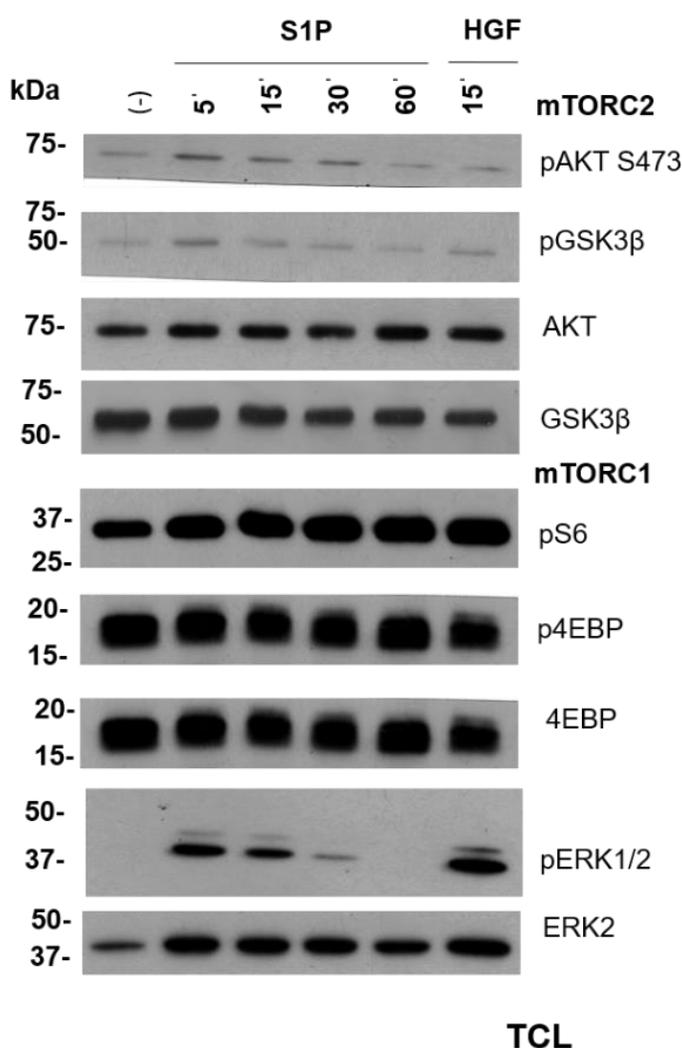


Figura 32. Curva de activación en células endoteliales con S1P. En células PAE, se encontró a tiempo 0, 5, 15, 30 y 60 minutos una dinámica de actividad para la cinasa pAKT y pGSK3β pero no para pS6 y p4EBP1, asumiendo la actividad de mTORC2 y mTORC1, respectivamente. Como control de se probó la actividad de ERK1/2 (MAPKs) con S1P y HGF.

7.8 Purificación de GST-RacG15A por afinidad

Por otro lado, se generó un lote de la GTPasa Rac1 recombinante (GST-RacG15A) con la finalidad de poder capturar a P-Rex1 activo, así como los posibles interactores del GEF. En este sentido, obtuvimos la GST-RacG15A como se muestra a continuación (Figura 33):

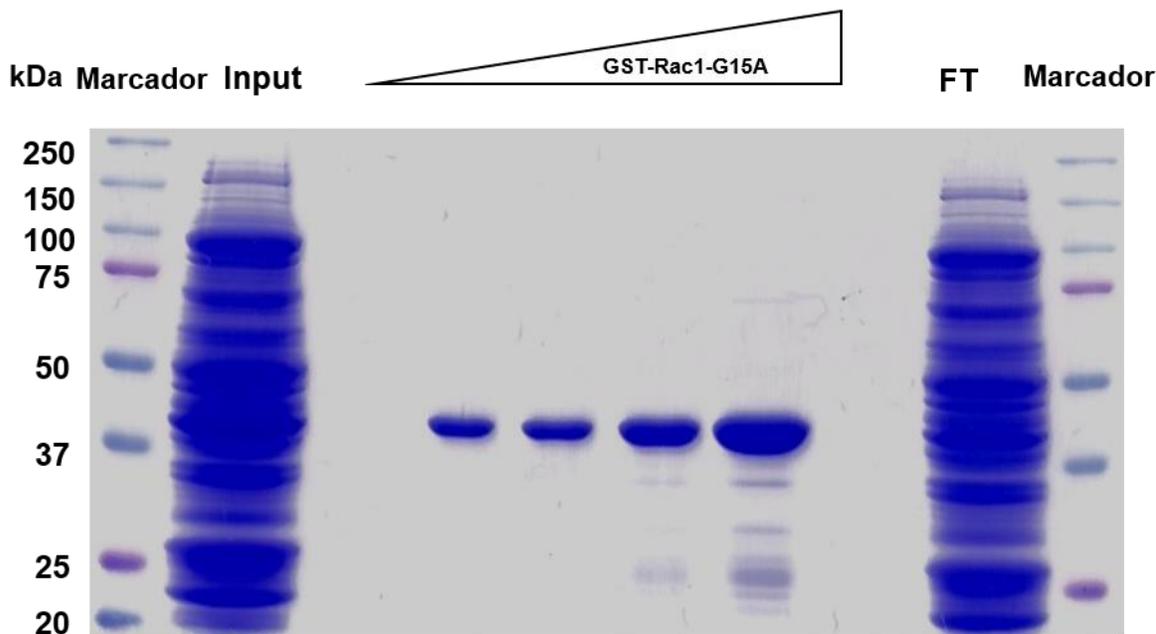


Figura 33. Purificación de GST-RacG15A de esferas de glutatión sefarosa. Se muestra una tinción de Coomasie para las proteínas totales en el carril input seguido de un aislamiento de la GTPasa recombinante en concentraciones crecientes.

7.9 El RacGEF, P-Rex1 se activa en presencia de S1P en células endoteliales

Para validar que P-Rex1 es activo en respuesta a S1P, se realizaron ensayos de *pull down* con RacG15A en células PAE. Esta estrategia nos permitió encontrar al RacGEF activo, su estado es a los 15 minutos y posteriormente su actividad decae (Figura 34A). Asimismo, este análisis nos permitió encontrar al principal interactor del GEF (Figura 34A), es decir, la cinasa AKT y su actividad fue evaluada a través de la actividad de los fosfostratos de AKT (Figura 34B). La interacción de AKT con P-Rex1 activo es compatible con nuestra hipótesis de que en su estado eventualmente activo podría ir e interactuar con S1PR1 por la disponibilidad en la periferia de la membrana plasmática. Otro de los interactores encontrados fue Rictor, este interactor del GEF activo ya ha sido previamente descrito en la literatura (Figura 34A).

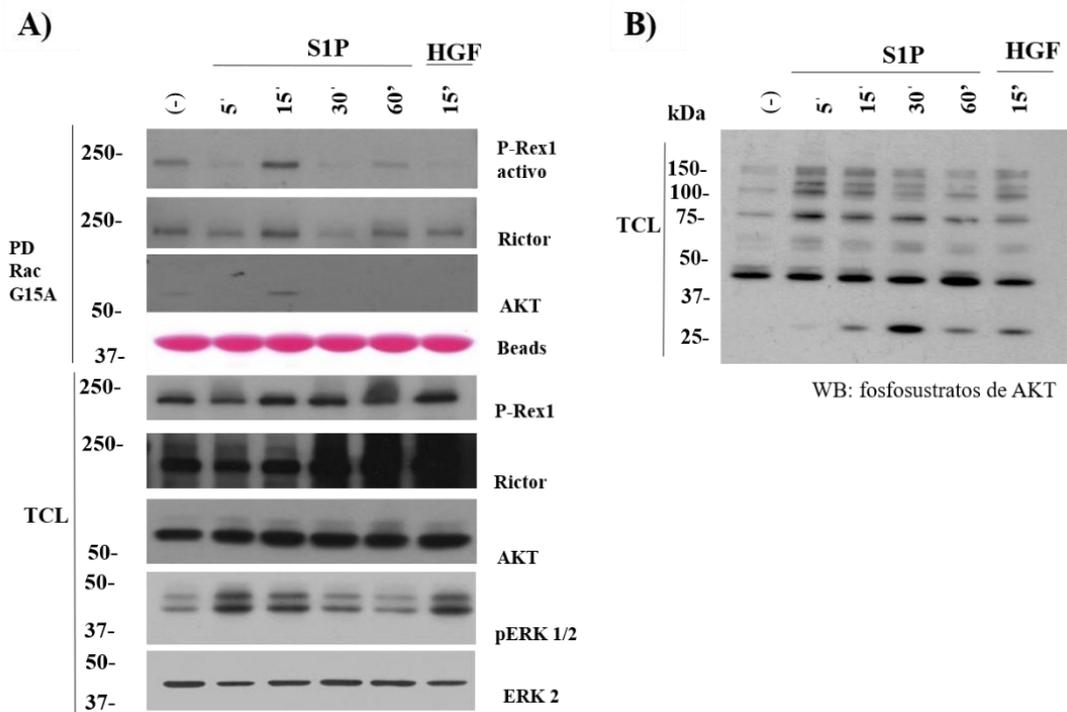


Figura 34. La actividad de P-Rex1 y de los fosfosustratos de pAKT es dependiente de S1P en células endoteliales. A) Dinámica de activación de P-Rex1 e interactores del GEF en respuesta a S1P a los tiempos que se indican en el WB, así como la curva de activación para pERK1/2 dependiente de S1P y a los 15 minutos con HGF. B) Dinámica de fosforilación de proteínas por la cinasa con especificidad serina/treonina, AKT1. Los experimentos se realizaron en células PAE. En el PD las perlas se tiñeron con rojo Ponceau.

7.10 P-Rex1 como interactador de S1PR1 en respuesta a S1P

Finalmente, abordamos la posibilidad de que el S1PR1 interacciona con P-Rex1 de manera dinámica en presencia de S1P a diferentes tiempos, para examinar dicha asociación y comportamiento, realizamos ensayos de *pull down* con HA-HaloTag-P-Rex1 en células COS-7. Encontramos al receptor en el PD de condiciones basales y a los tiempos 5, 15, 30 y 60 minutos, la diferencia es la dinámica en la cantidad de receptor asociado con P-Rex1 (Figura 35A). La expresión de S1PR1 aparentemente es incrementada por el tiempo de exposición con S1P (Figura 35B).

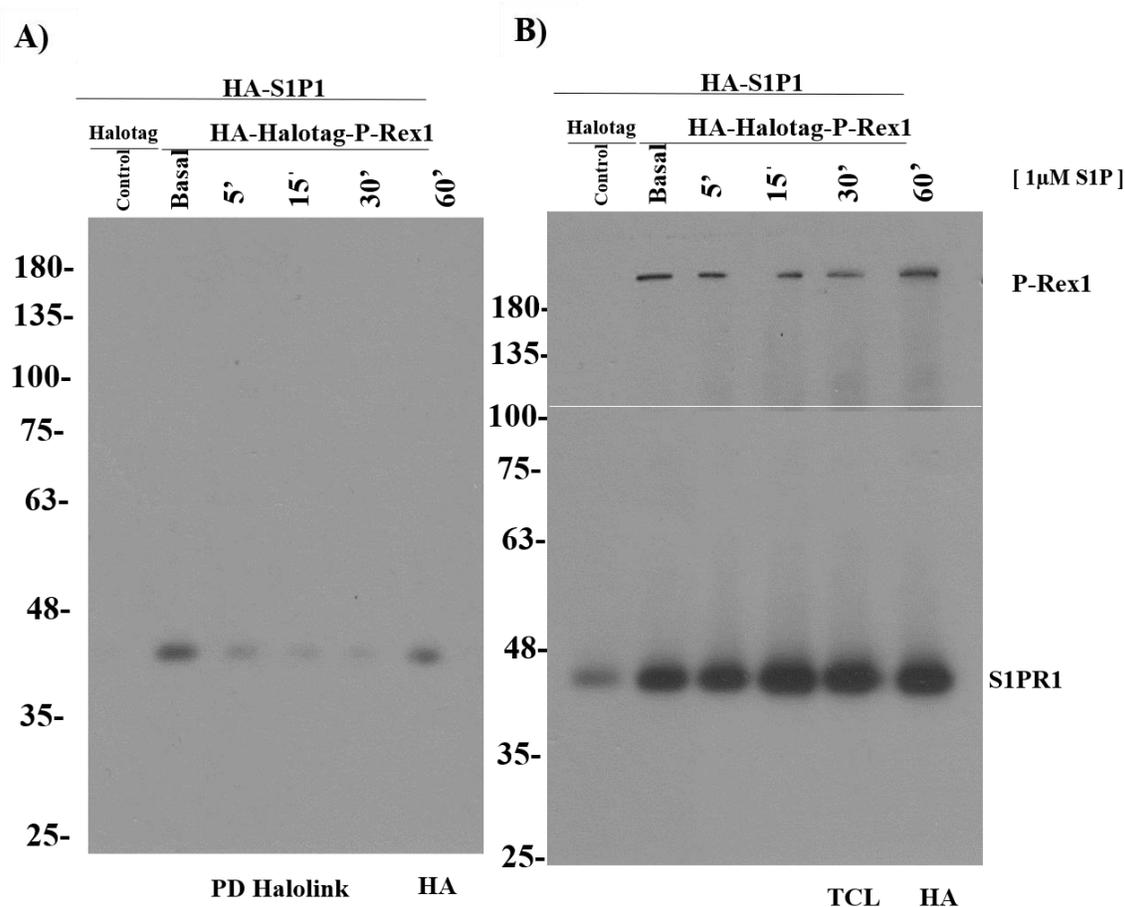


Figura 35. Dinámica de interacción de S1PR1 con P-Rex1 en respuesta S1P. A) *Pull down* HA-HaloTag-P-Rex1 muestra la asociación entre el S1PR1 y P-Rex1 a diferentes tiempos con o sin estímulo. B) WB del lisado total para S1PR1.

8. Discusión

La señalización de S1P-S1PR1 es considerada fundamental en desarrollo y mantenimiento del sistema vascular en condiciones normales y patológicas. De acuerdo con diversos estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha demostrado el rol esencial de dicha señalización en la migración de las células endoteliales, así como en la estabilidad de la vasculatura (Chae, Paik, Furneaux & Hla, 2004). La migración celular en adultos se presenta en diversas enfermedades (vasculares, autoinmunes y en el cáncer). En particular, en el cáncer la migración celular ocurre para favorecer el desarrollo de tumor y metástasis a través de la angiogénesis, por lo tanto, este proceso es un indicador clave de la agresividad del tumor (Ragunathrao *et al.*, 2019). Los beneficios que proporciona la angiogénesis tumoral radican en brindar oxígeno y los nutrientes al tumor a través de capilares (Cho, Jour & Aung, 2019). En conjunto, estos hallazgos nos llevaron a estudiar la señalización de S1PR1 en cáncer a través de estrategias del análisis de minería de datos y pruebas bioquímicas.

8.1 La señalización de S1PR1 en cáncer se correlaciona con un mal pronóstico en BLCA

El transcriptoma de pacientes con carcinoma urotelial de vejiga que sobreexpresan a S1PR1, revela una serie de RNAm altamente coexpresadas con S1PR1, lo que indica una relación funcional elevada.

Los GPCRs pueden oscilar en una baja o alta expresión en los tumores de múltiples tipos de cáncer. La señalización de este tipo de receptores contribuye a la progresión de la enfermedad ya que es responsable de transducir señales que favorecen la invasión y la metástasis a través de la migración y desprendimiento de las células que constituyen al microambiente tumoral, ya sean cancerosas o no, a la par permiten el inicio de la angiogénesis tumoral para nutrir a los tumores (Aust, Zhu, Meir & Xu, 2016). En todos estos pasos mencionados para la evolución del cáncer se encuentra implicada la actividad los GPCRs. Específicamente, la sobreexpresión de S1PR1 en BLCA se asocia con un mal pronóstico en los pacientes y sorprendentemente este se coexpresa muy bien con ADGRL4 (Figura 28), un GPCR huérfano, poco estudiado y relevante en adhesión celular. Se considera a ADGRL4 un regulador de la angiogénesis normal y patológica lo cual contrasta bien con la hipótesis de que S1PR1 acompañado de ADRL4 en BLCA favorecen el crecimiento del tumor. Masiero y colaboradores, 2013, encontraron que al silenciar a ADRL4 en xenoinjertos de carcinoma

humano de ovario y colorrectal implantados en ratones se evitó el crecimiento de tumores respecto a cuando no era silenciado el ADRL4, por otro lado, demostraron *in vitro* que silenciar a ADRL4 disminuye la angiogénesis.

Además, el ADGRL (ELTD1), favorece la señalización de JAK/STAT3 y la expresión de HIF-1 α (Li *et al.*, 2019). El knockout de ADGRL en embriones murinos no es letal ni grave para la integridad de la vasculatura, por lo tanto, no solo puede fungir como biomarcador en BLCA en coexistencia con una elevada expresión de S1PR1 si no también como un objetivo farmacológico, ya que al inhibir la señalización de ADGRL se evitaría la señalización potenciada hacia JAK/STAT3 en conjunto con la señalización de S1PR1. Esto tendría aplicaciones clínicas valiosas puesto que STAT es considerada la proteína estrella en la progresión del cáncer por sus contribuciones a la inmunosupresión tumoral y la metástasis (Favara *et al.*, 2019). Se ha descrito que la expresión de ADGRL estimulada por factores pro-angiogénicos como VEGF y bFGF (Masiero *et al.*, 2013). En este sentido, hay reportes que describen que la señalización de S1PR1 amplifica selectivamente la respuesta angiogénica tumoral de VEGF/VEGFR2 a través una la fosforilación en el VEGFR2 en su residuo Y951 por la c-Abl1, esta fosforilación mantiene al RTK en la membrana plasmática de tal manera que sostiene señales persistentes hacia la actividad de Rac1 (Ragunathrao *et al.*, 2019). Por lo tanto, la señalización de dicho receptor se correlaciona con un mal pronóstico en la sobrevivencia de los pacientes con BLCA, a pesar de que en otros tipos de cáncer se asocia a un buen pronóstico. El ADRL4 se emplea como biomarcador para glioma de alto grado (Aust, Zhu, Meir & Xu, 2016). Finalmente, con nuestros hallazgos se sugiere que también se empleado como kit pronóstico para pacientes que sobreexpresan a S1PR1 en el BLCA.

La actividad de los RTKs tiene un rol importante en el destino celular, la proliferación y la migración. En nuestro análisis encontramos que el EphA3 acompaña la señalización de S1PR1 en BLCA al igual que el ADRL4. Se sabe que EphA3 se encuentra sobreexpresado y/o mutado en diversos tipos tumores y consistentemente con nuestro estudio asociado con un mal pronóstico y en consecuencia una disminución de la sobrevivencia de los pacientes (London & Gallo, 2020). Este RTK controlan las interacciones célula-célula durante el desarrollo normal y oncogénico, por ello es natural pensar que su acompañamiento con el S1PR1 en conjunto con ADRL4 conllevan a la progresión del BLCA.

En un panorama más general con relación a proteínas clásicas en la angiogénesis identificamos a TIE2 (TEK) y a otros no tan asociados a este proceso como, DDR2, PDGFRA, FGFR1, NTRK3, ABL2, MYLK, STK32B, LATS2, DCLK1, TNS1, ELMO1, DOK6, ARHGAP24, FERMT2, PDLIM3, PDZRN4. Este último grupo de genes, abren unas amplias posibilidades para regular la señalización de S1PR1 en BLCA cuando se encuentra sobreexpresado, estos eventos de regulación claramente ocurren entre la comunicación de células del microambiente tumoral, aunque la mayoría descrito para BLCA perfilan a una población de células endoteliales también encontramos pistas de células estromales, como los macrófagos asociados al tumor, estas últimas no serían sorpresa encontrarlas ya que se ha relacionado un proceso inflamatorio con la formación y desarrollo de BLCA (Tian *et al.*, 2015). La pérdida de la señalización de TIE2 es considerada letal en la integridad vascular al igual que la del S1PR1, ambas señalizaciones que están presentes en BLCA podría ser potente blanco farmacológico.

En resumen, nosotros mostramos que la señalización de los GPCRs puede ser acompañada por otras proteínas, entre ellas otros receptores, que clínicamente servirían como biomarcadores o blancos farmacológicos, ya que están disponibles en la superficie de la membrana plasmática.

8.2 La señalización dual de S1PR1 en LIHC

El valor pronóstico para el LIHC en pacientes que sobreexpresan a S1PR1 reveló una disminución en la supervivencia en quienes padecen este tipo de cáncer. En conjunto el S1PR1 se encuentra acompañado por los siguientes genes: CALCRL, RAMP3, ADRA2B, DRD1, KDR, TEK, TIE1, FLT4, EPHA4, SHROOM4, RAPGEF2, GIPC3, BMX, FYN, PTK2B, ITK, SIK2, RASGRF2, IRS1 (Figura 30). Nosotros interpretamos que esta coexistencia de todos los genes mencionados con S1PR1, se justifica funcionalmente, es decir, a través del ensamble de ejes de señalización que permiten una mayor densidad y madurez de los vasos sanguíneos, de tal manera que las terapias sistémicas tengan mayor biodisponibilidad de los antineoplásicos. Sorprendentemente, las proteínas que se correlacionan con el S1PR1 muestran un patrón similar respecto a la supervivencia de los pacientes con cáncer. Dentro de los genes que se consideran como una firma para la angiogénesis, encontramos a TIE1 y TEK, ambos altamente coexpresados con S1PR1. El

S1PR1 por si solo pertenece al mismo grupo de genes principales en la regulación de la angiogénesis. Por otro lado, se identificó al gen codificante para Raf-GRF2, es cual es un GEF para Rac1. Todo lo anterior nos hace pensar en que la expresión de estos genes es en células asociadas al tumor.

En contraste, el eje S1PR1→P-Rex1→Rac1 lo asociamos a procesos pro-angiogénicos tumorales que conducen a la progresión de LIHC, por la intervención de RacGEF, P-Rex1. P-Rex1 se encuentra sobreexpresado en distintos tipos de cáncer y aunque en LIHC su sobreexpresión no esta tan pronunciada, su actividad puede ser sostenida hacia Rac1 por la fosforilación dada por pAKT1, la cual también revela una coexpresión significativa en LIHC. En general, al evaluar la expresión del eje en LIHC, descubrimos su completa expresión, es decir, tanto P-Rex1 como las cinasas AKT1 y JAK2 están significativamente coexpresadas con S1PR1. En este sentido la hipótesis emergente es que los fosfostratos de las cinasas podrían estar ampliando la señalización de S1PR1 en LIHC.

Dentro de los fosfostratos interesantes identificados son Gab2 y STAT1. El transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT1) muestra papel dual en cáncer, este ha sido identificado como promotor y supresor de tumores en diversos tipos de cáncer, sus funciones continúan siendo confusas. En particular, se asocia a un buen pronóstico por si solo en LIHC, esto lo hace más interesante de analizar puesto que dependiendo de sus acompañantes su efecto en la sobrevivencia de paciente puede variar. Estos análisis no nos permiten saber el estado de fosforilación de STAT1, por lo tanto, sería prudente conocer su actividad. Hay estudios que muestran que en LIHC hay ausencia de pSTAT1 y esto se debe a que la actividad de pSTAT1 se asocia a un efecto antitumoral al inhibir el crecimiento de células de LIHC a través del arresto del ciclo celular e inducción de muerte celular (Ma *et al.*, 2019). Estos hallazgos nos hacen pensar que este fosfostrato de JAK2 probablemente no corresponde a células cancerosas sino a células infiltradas en el microambiente tumoral.

Por el contrario, STAT3 se asocia a un mal pronóstico en los pacientes con LIHC por la alta expresión. La señalización aberrante de STAT se ha documentado en una variedad de leucemias: la leucemia mielógena crónica y la leucemia linfoblástica aguda (Wang *et al.*, 2019). STAT3 es activado vía IL-6/JAK2 en tumores, principalmente en células cancerosas, pero dicha actividad es transitoria al compararse con el estímulo de S1P, este último se

sostiene pSTAT3 por horas. Previamente, Lee y colaboradores en el 2010, determinaron experimentalmente que STAT3 es un factor de transcripción directo de S1PR1 en células tumorales, por lo tanto, una expresión mejorada de S1PR1 induce la expresión de IL6 generando así un eje de retroalimentación de la señalización de JAK2/STAT3, e induce el crecimiento del tumor y metástasis. Las células mieloides del microambiente tumoral se encuentran influenciadas al interactuar con células cancerosas con elevada expresión de S1PR1 y una comunicación recíproca entre ambos grupos celulares es necesaria para la progresión del cáncer, en nuestros análisis no determinamos las poblaciones celulares, sin embargo, una de las características de LIHC es el alto grado de infiltración de células inmunes. Por consiguiente, encontrar a S1PR1 significativamente coexpresados con JAK2 e identificado a STAT3 dentro del subgrupo de genes más coexpresados con S1PR1 en LIHC apoya la hipótesis de retroalimentación positiva hacia la señalización de S1PR1.

En relación con el fosfostrato Gab2, este resulta ser fosforilado por AKT1 y JAK2, definitivamente la expresión de este fosfostrato tiene relevancia molecular en la regulación de la señalización de S1PR1. Gab2 participa como una proteína adaptadora, además es reclutada a la membrana por PIP3 y es necesaria para el establecimiento del complejo Gab2/GRB2/EGFR (Ding, Yu, Feng & Luo ,2015). El RTK, EGFR, es promotor de la angiogénesis normal y tumoral. Por ello, resulta lógico que la proteína adaptadora, Gab2 esté presente en conjunto con los genes mencionados, favoreciendo así la señalización de S1PR1. EL RacGEF, TIAM al igual que Gab2 y EGFR se encontraron como proteínas reguladas por fosforilación específicamente para AKT1, en este sentido estas tres proteínas potencian la señalización hacia Rac1 (Zhu *et al.*, 2015).

Finalmente, un GPCR regulado por AKT1 es BLT2, encontrado expresado en tejido de cáncer de ovario, vejiga y mama en estadios avanzados del cáncer, lo que se asocia a un resultado clínico deficiente. Puntualmente, en cáncer de ovario BLT2 regula la actividad de STAT3 vía NOX4-ROS, favoreciendo la expresión de MMP2 (Seo, Park & Kim, 2012).

Estos hallazgos en cáncer nos hacen hipotetizar que en efecto algunos de los fosfostratos de las cinasas que interactúan con la vía de señalización S1PR1→P-Rex1→Rac1 favorecen eventos que permiten la progresión de la enfermedad. Una combinación de todos los genes que muestran patrones similares en las curvas de sobrevivencia y que están

coexpresados significativamente con S1PR1 en LIHC se consideran una valiosa información con capacidad de pronóstica en comparación con un solo gen.

Con base en nuestros resultados sugerimos que los genes que acompañan la señalización de S1PR1 en cáncer son una herramienta clínicamente relevante porque son datos obtenidos por técnicas de alto rendimiento, es decir, a partir de métodos de secuenciación de RNAm de los tumores a diferencia de biomarcadores de obtenidos de proteínas en muestras biológicas como la sangre. El análisis de minería de datos omicos, particularmente los transcriptómicos pueden resultar clínicamente aplicables en el futuro, ya que cada vez el uso de la secuenciación de células individuales se hace más común, por lo tanto, los marcadores basados en RNA o DNA podrían sustituir a los biomarcadores de proteínas (D'Costa *et al.*, 2016).

8.3 La esfingosina 1 fosfato activa proteínas del mTORC2 en células endoteliales

Las células endoteliales expresan el S1PR1, receptores sensibles a S1P, por lo tanto, para validar que estas células responden a S1P en un modelo endógeno, probamos las vías que se activan en respuesta a este ligando lipídico y encontramos que a través del tiempo se activa pAKT y pGSK3 β , estas proteínas reflejan la actividad de mTORC2 y la vía de PI3K-AKT. Además, S1P, activa la vía de señalización de MAPK (ERK1/2) (Figura 32). La señalización de PI3K-AKT y ERK1/2 son activadas por P-Rex1 y clínicamente se consideran una estrategia terapéutica prometedora por sus implicaciones oncogénicas (Dillon *et al.*, 2015). Estos resultados muestran una clara señalización de S1P en células endoteliales a través de S1PR.

Reportes anteriores han demostrado la importancia de señalización de S1PR1 en la angiogénesis tumoral y como las células endoteliales son las principales en responder a quimioatrayentes que favorezcan la angiogénesis, el modelo con células de esta naturaleza es fundamental para comprender estos eventos.

8.3 P-Rex1 como efector de S1PR1 dependiente de S1P

Las células endoteliales expresan endógenamente al RacGEF P-Rex1, una proteína multidominio implicada en la coordinación de las señales de entrada a través de GPCRs y RTKs, y en la migración dirigida de células normales y cancerosas (Chávez-Vargas *et al.*,

2016; Carretero-Ortega *et al.*, 2010). En este sentido, nosotros determinamos si P-Rex1 funciona como efector de la señalización de S1PR1, esto lo pusimos a prueba y encontramos a P-Rex1 activo a los 15 minutos dependiente de S1P y dicha actividad decae tiempo después (Figura 34). La señalización de S1PR1, de acuerdo con Paik y colaboradores activa a Rac1 en células endoteliales. Rac1 es la GTPasa asociada al fenotipo de lamelas en una célula en movimiento y P-Rex1 es uno de los GEF para Rac1. Nosotros encontramos S1P es capaz de activar al RacGEF P-Rex1 al evaluar la curva de activación de proteínas dependientes de estímulo, en conjunto estos hallazgos nos permiten afirmar que en células endoteliales la activación del eje S1P-S1PR1 → P-Rex1 estimula a Rac1.

8.4 El RacGEF P-Rex1 interacciona con AKT y Rictor en respuesta a S1P a través del tiempo

Por otro lado, con la finalidad de identificar a proteínas que puedan regular la señalización de S1PR1 → P-Rex1 → Rac1, consideramos los hallazgos que demuestran que P-Rex1 es una plataforma para mTORC1/2 así como para Gβγ y AKT (Hernández-Negrete *et al.*, 2007). En este sentido, encontramos a P-Rex1 activo interaccionando con AKT (Figura 34). Estudios previos han descrito que la cinasa AKT activa es capaz de interaccionar con S1PR1 y fosforilarlo en su tercera asa intracelular, dicha fosforilación es activante ya que favorece su señalización hacia Rac1 en células endoteliales (Lee *et al.*, 2001). En cuanto a la interacción con mTORC2, se determinó por la presencia de Rictor (Figura 34), componente característico del complejo 2 (Senoo *et al.*, 2019).

8.5 La interacción de S1PR1 con P-Rex1 es dinámica en respuesta a S1P

En 2010, Ledezma-Sánchez y colaboradores, demostraron la interacción entre el carboxilo terminal de S1PR1 y los PDZ de P-Rex1, como efecto celular observaron una mayor respuesta migratoria en respuesta a S1P, por lo tanto, nosotros reproducimos esta interacción y sorprendentemente notamos que esta interacción ocurre dinámicamente, es decir, la cantidad de complejo S1PR1-P-Rex1 varía a través del tiempo en respuesta a S1P (Figura 35). Una explicación molecular a la variación de la interacción es la disposición del receptor en la membrana plasmática, al ser un GPCR este después de un tiempo de ser estimulado es desensibilizado y al no estar disponible la interacción con P-Rex1 no se lleva a cabo. Por otro lado, la expresión de S1PR1 parece ser estimulada por S1P.

9. Conclusiones

- 1.- La señalización de S1PR1 es acompañada de GPCRs y RTKs, y en los pacientes con *BLCA* y *LIHC* que sobreexpresan el S1PR1 se asocian con pronósticos de supervivencia en los pacientes de forma opuesta, es decir, mal y buen pronóstico, respectivamente.
- 2.- Las moléculas que subyacen la señalización de S1PR1 en *BLCA* y *LIHC* son potentes biomarcadores de pronóstico e incluso objetivos farmacológicos.
- 3.- Eje de transducción S1PR1→P-Rex1→Rac1 se expresa y está activo en células endoteliales, y además está regulado positivamente por fosfostratos de AKT1 y JAK2 en *LIHC*.

11. Referencias bibliográficas

Aust, G., Zhu, D., Van Meir, E. G., & Xu, L. (2016). Adhesion GPCRs in Tumorigenesis. *Handbook of experimental pharmacology*, 234, 369–396. DOI: 10.1007/978-3-319-41523-9_17

Bid, H. K., Roberts, R. D., Manchanda, P. K., & Houghton, P. J. (2013). RAC1: an emerging therapeutic option for targeting cancer angiogenesis and metastasis. *Molecular cancer therapeutics*, 12(10), 1925-1934. DOI: 10.1158/1535-7163.

Cartier, A., & Hla, T. (2019). Sphingosine 1-phosphate: Lipid signaling in pathology and therapy. *Science*, 366(6463), eaar5551. DOI: 10.1126/science.aar5551.

Carretero-Ortega, J., Walsh, C. T., Hernández-García, R., Reyes-Cruz, G., Brown, J. H., & Vázquez-Prado, J. (2010). Phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex-1), a guanine nucleotide exchange factor for Rac, mediates angiogenic responses to stromal cell-derived factor-1/chemokine stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL-12) linked to Rac activation, endothelial cell migration, and in vitro angiogenesis. *Molecular pharmacology*, 77(3), 435-442. DOI: 10.1124/mol.109.060400.

Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., & Schultz, N. (2012). The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery*, 2(5), 401–404. DOI:10.1158/2159-8290.CD-12-0095.

Chae, S. S., Paik, J. H., Furneaux, H., & Hla, T. (2004). Requirement for sphingosine 1–phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference. *The Journal of clinical investigation*, 114(8), 1082-1089. DOI: 10.1172/JCI22716.

Chávez-Vargas, L., Adame-García, S. R., Cervantes-Villagrana, R. D., Castillo-Kauil, A., Bruystens, J. G., Fukuhara, S., ... & Vázquez-Prado, J. (2016). Protein Kinase A (PKA) Type I Interacts with P-Rex1, a Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor EFFECT ON PKA LOCALIZATION AND P-Rex1 SIGNALING. *Journal of Biological Chemistry*, 291(12), 6182-6199. DOI:10.1074/jbc.M115.712216.

Cho, W. C., Jour, G., & Aung, P. P. (2019). Role of angiogenesis in melanoma progression: Update on key angiogenic mechanisms and other associated components. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 59, pp. 175-186). Academic Press. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.06.015.

Cook, D. R., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2014). Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene*, 33(31), 4021-4035. DOI: 10.1038/onc.2013.362.

D'Costa, JJ, Goldsmith, JC, Wilson, JS, Bryan, RT y Ward, DG (2016). A Systematic Review of the Diagnostic and Prognostic Value of Urinary Protein Biomarkers in Urothelial Bladder Cance (Amsterdam, Países Bajos), 2 (3), 301–317. DOI: 10.3233/BLC-160054.

De, P., Aske, J. C., & Dey, N. (2019). RAC1 takes the lead in solid tumors. *Cells*, 8(5), 382. DOI: 10.3390/cells8050382.

Deng, J., Liu, Y., Lee, H., Herrmann, A., Zhang, W., Zhang, C., & Raubitschek, A. (2012). S1PR1-STAT3 signaling is crucial for myeloid cell colonization at future metastatic sites. *Cancer cell*, 21(5), 642-654. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.03.039.

Dillon, LM, Bean, JR, Yang, W., Shee, K., Symonds, LK, Balko, JM, McDonald, WH, Liu, S., Gonzalez-Angulo, AM, Mills, GB, Arteaga, CL y Miller, TW (2015). P-REX1 crea un circuito de retroalimentación positiva para activar la señalización del receptor del factor de crecimiento, PI3K / AKT y MEK / ERK en el cáncer de mama. *Oncogene*, 34 (30), 3968–3976. DOI: 10.1038/onc.2014.328.

Ding, C. B., Yu, W. N., Feng, J. H., & Luo, J. M. (2015). Structure and function of Gab2 and its role in cancer (Review). *Molecular medicine reports*, 12(3), 4007–4014. DOI: 10.3892/mmr.2015.3951.

Favara, DM, Banham, AH & Harris, AL. (2019). ADGRL4/ELTD1 is a highly conserved angiogenesis-associated orphan adhesion GPCR that emerged with the first vertebrates and comprises 3 evolutionary variants. *BMC Evol Biol* 19, 143. DOI: 10.1186/s12862-019-1445-9.

- Garcia-Mata, R., Boulter, E., & Burridge, K. (2011). The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(8), 493-504. DOI: 10.1038/nrm3153.
- Hao, Q., Vadgama, J. V., & Wang, P. (2020). CCL2/CCR2 signaling in cancer pathogenesis. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 1-13. DOI: 10.1186/s12964-020-00589-8.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hernández-Negrete I, Carretero-Ortega J, Rosenfeldt H, et al. (2007) P-Rex1 links mammalian target of rapamycin signaling to Rac activation and cell migration. *J Biol Chem.*; 282(32):23708-23715. DOI: 10.1074/jbc.M703771200.
- Igarashi, N., Okada, T., Hayashi, S., Fujita, T., Jahangeer, S., & Nakamura, S. I. (2003). Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46832-46839. DOI: 10.1074/jbc.M306577200.
- Jozefczuk, E., Guzik, T. J., & Siedlinski, M. (2020). Significance of sphingosine-1-phosphate in cardiovascular physiology and pathology. *Pharmacological Research*, 104793. DOI:10.1016/j.phrs.2020.104793.
- Kumar, A., & Saba, J. D. (2015). Regulation of immune cell migration by sphingosine-1-phosphate. *Cellular and molecular biology (OMICS)*, 61(2). DOI: 10.4172/1165-158X.1000121.
- Ledezma-Sánchez, B. A., García-Regalado, A., Guzmán-Hernández, M. L., & Vázquez-Prado, J. (2010). Sphingosine-1-phosphate receptor S1P1 is regulated by direct interactions with P-Rex1, a Rac guanine nucleotide exchange factor. *Biochemical and biophysical research communications*, 391(4), 1647-1652. DOI: 10.1124/mol.116.105338.
- Lee, H., Deng, J., Kujawski, M., Yang, C., Liu, Y., Herrmann, A., & Jove, R. (2010). STAT3-induced S1PR1 expression is crucial for persistent STAT3 activation in tumors. *Nature medicine*, 16(12), 1421. DOI: 10.1038/nm.2250.
- Lee, M. J., Thangada, S., Paik, J. H., Sapkota, G. P., Ancellin, N., Chae, S. S., & Hla, T. (2001). Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required

for endothelial cell chemotaxis. *Molecular cell*, 8(3), 693-704. DOI: 10.1016/s1097-2765(01)00324-0.

Li, M. H., Sanchez, T., Yamase, H., Hla, T., Oo, M. L., Pappalardo, A., & Ferrer, F. (2009). S1P/S1P1 signaling stimulates cell migration and invasion in Wilms tumor. *Cancer letters*, 276(2), 171-179. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.11.025.

Li, X., Wu, Z., Fu, X., & Han, W. (2013). A microRNA component of the neoplastic microenvironment: microregulators with far-reaching impact. *BioMed Research International*, 2013. DOI: 10.1155/2013/762183.

Li, J., Shen, J., Wang, Z. et al. (2019). ELTD1 facilitates glioma proliferation, migration and invasion by activating JAK/STAT3/HIF-1 α signaling axis. *Sci Rep* 9, 13904 (2019). DOI: 10.1038/s41598-019-50375-x.

Liang, H., Yang, L., Tao, L., Shi, L., Yang, W., Bai, J., & Ji, J. (2020). Data mining-based model and risk prediction of colorectal cancer by using secondary health data: A systematic review. *Chinese Journal of Cancer Research*, 32(2), 242. DOI: 10.21147/j.issn.1000-9604.2020.02.11.

Liang, J., Nagahashi, M., Kim, E. Y., Harikumar, K. B., Yamada, A., Huang, W. C., Hait, N. C., Allegood, J. C., Price, M. M., Avni, D., Takabe, K., Kordula, T., Milstien, S., & Spiegel, S. (2013). Sphingosine-1-phosphate links persistent STAT3 activation, chronic intestinal inflammation, and development of colitis-associated cancer. *Cancer cell*, 23(1), 107–120. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.11.013.

Liu, Y., Wada, R., Yamashita, T., Mi, Y., Deng, C. X., Hobson, J. P., & Liu, C. H. (2000). Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *The Journal of clinical investigation*, 106(8), 951-961. DOI: 10.1172/JCI10905.

London, M., & Gallo, E. (2020) Papel crítico de EphA3 en el cáncer y estado actual de la terapéutica farmacológica de EphA3. *Mol Biol Rep* 47, 5523–5533. DOI: 10.1007/s11033-020-05571-8.

Ma, B., Chen, K., Liu, P., Li, M., Liu, J., Sideras, K., Sprengers, D., Biermann, K., Wang, W., IJzermans, J., Cao, W., Kwekkeboom, J., Peppelenbosch, MP y Pan, Q. (2019).

Dichotomous functions of phosphorylated and unphosphorylated STAT1 in hepatocellular, 97 (1), 77–88. DOI: 0.1007/s00109-018-1717-7.

Masiero M, Simoes FC, Han HD, Snell C, Peterkin T, Bridges E, et al. (2013). A core human primary tumor angiogenesis signature identifies the endothelial orphan receptor ELTD1 as a key regulator of angiogenesis. *Cancer Cell.*; 24: 229–241. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.06.004.

Müller, P. M., Rademacher, J., Bagshaw, R. D., Wortmann, C., Barth, C., van Unen, J., & Pascual-Vargas, P. (2020). Systems analysis of RhoGEF and RhoGAP regulatory proteins reveals spatially organized RAC1 signalling from integrin adhesions. *Nature Cell Biology*, 22(4), 498-511. DOI: 10.1038/s41556-020-0488-x.

Nagarsheth, N., Wicha, M. S., & Zou, W. (2017). Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 17(9), 559. DOI: 10.1038/nri.2017.49.

Orgaz, J. L., Herraiz, C., & Sanz-Moreno, V. (2014). Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. *Small GTPases*, 5(4), e983867. DOI: 10.4161/sgtp.29019.

Paik, J. H., Chae, S. S., Lee, M. J., Thangada, S., & Hla, T. (2001). Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of $\alpha\beta 3$ - and $\beta 1$ -containing integrins. *Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 11830-11837. DOI: 10.1074/jbc.M009422200.

Pitson, S. M., Moretti, P. A., Zebol, J. R., Lynn, H. E., Xia, P., Vadas, M. A., & Wattenberg, B. W. (2003). Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. *The EMBO journal*, 22(20), 5491-5500. DOI: 10.1093/emboj/cdg540.

Porter, A. P., Papaioannou, A., & Malliri, A. (2016). Deregulation of Rho GTPases in cancer. *Small GTPases*, 7(3), 123-138. DOI: 10.1080/21541248.2016.1173767.

Proia, R. L., & Hla, T. (2015). Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *The Journal of clinical investigation*, 125(4), 1379-1387. DOI:10.1172/JCI76369.

Ragunathrao, V. A. B., Anwar, M., Akhter, M. Z., Chavez, A., Natarajan, V., Lakshmikanthan, S., & Wary, K. K. (2019). Sphingosine-1-phosphate receptor 1 activity

promotes tumor growth by amplifying VEGF-VEGFR2 angiogenic signaling. *Cell reports*, 29(11), 3472-3487. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.11.036.

Schwiebs A, Herrero San Juan M, Schmidt KG, Wiercinska E, Anlauf M, Ottenlinger F, Thomas D, Elwakeel E, Weigert A, Farin HF, Bonig H, Scholich K, Geisslinger G, Pfeilschifter JM, Radeke HH. (2019). Cancer-induced inflammation and inflammation-induced cancer in colon: a role for S1P lyase. *Oncogene*. Jun; 38(24):4788-4803. DOI:10.1038/s41388-019-0758-x.

Senoo, H., Kamimura, Y., Kimura, R., Nakajima, A., Sawai, S., Sesaki, H. y Iijima, M. (2019). Rho-GDP fosforilado activa directamente la quinasa mTORC2 hacia AKT a través de la dimerización con Ras-GTP para regular la migración celular. *Biología celular de la naturaleza*, 21 (7), 867–878. DOI: 10.1038/s41556-019-0348-8.

Shen, L., Shi, Q., & Wang, W. (2018). Double agents: genes with both oncogenic and tumor-suppressor functions. *Oncogenesis*, 7(3), 1-14. DOI: 10.1038/s41389-018-0034-x.

Stoffel W, Sticht G, LeKim D. (1968). Metabolism of sphingosine bases. IX. Degradation in vitro of dihydrospingosine and dihydrospingosine phosphate to palmitaldehyde and ethanolamine phosphate. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. 349(12):1745-8. DOI:10.1515/bchm2.1968.349.2.1745.

Seo, J. M., Park, S., & Kim, J. H. (2012). Leukotriene B4 receptor-2 promotes invasiveness and metastasis of ovarian cancer cells through signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)-dependent up-regulation of matrix metalloproteinase 2. *Journal of Biological Chemistry*, 287(17), 13840-13849. DOI: 10.1074/jbc.M111.317131.

Sun, K. Yujin Zhang, Angelo D'Alessandro, Travis Nemkov...Yang Xia (2016). Sphingosine-1-phosphate promotes erythrocyte glycolysis and oxygen release for adaptation to high-altitude hypoxia. *Nat. Comun*. 7: 12086 DOI: 10.1038 / ncomms12086.

Tajadura-Ortega, V., Garg, R., Allen, R. et al. (2018). An RNAi screen of Rho signalling networks identifies RhoH as a regulator of Rac1 in prostate cancer cell migration. *BMC Biol* 16, 29 DOI: 10.1186/s12915-018-0489-4.

Tani, M., Ito, M., & Igarashi, Y. (2007). Ceramide/sphingosine/sphingosine 1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space. *Cellular signalling*, 19(2), 229-237. DOI: 10.1016/j.cellsig.2006.07.001.

Tian YF, Tang K, Guan W, Yang T, Xu H, Zhuang QY, Ye ZQ. (2015). OK-432 Suppresses Proliferation and Metastasis by Tumor Associated Macrophages in Bladder Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.*; 16(11):4537-42. Doi: 10.7314/apjcp.2015.16.11.4537. PMID: 26107200.

Vázquez-Prado, J., Bracho-Valdés, I., Cervantes-Villagrana, R. D., & Reyes-Cruz, G. (2016). Gβγ pathways in cell polarity and migration linked to oncogenic GPCR signaling potential relevance in tumor microenvironment. *Molecular pharmacology*, 90(5), 573-586. DOI: 10.1124/mol.116.105338.

Visentin, B., Vekich, J. A., Sibbald, B. J., Cavalli, A. L., Moreno, K. M., Matteo, R. G., & Kundra, V. (2006). Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer cell*, 9(3), 225-238. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.02.023.

Wang, X., Liao, X., Yu, T., Gong, Y., Zhang, L., Huang, J., Yang, C., Han, C., Yu, L., Zhu, G., Qin, W., Liu, Z., Zhou, X., Liu, J., Han, Q., & Peng, T. (2019). Analysis of clinical significance and prospective molecular mechanism of main elements of the JAK/STAT pathway in hepatocellular carcinoma. *International journal of oncology*, 55(4), 805–822. DOI: 10.3892/ijo.2019.4862.

Wang, P., Yuan, Y., Lin, W., Zhong, H., Xu, K., & Qi, X. (2019). Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in cancer. *Cancer Cell International*, 19(1), 295. DOI: 10.1186/s12935-019-1014-8.

Weichand, B., Popp, R., Dziumbila, S., Mora, J., Strack, E., Elwakeel, E., & Olesch, C. (2017). S1PR1 on tumor-associated macrophages promotes lymphangiogenesis and metastasis via NLRP3/IL-1β. *Journal of Experimental Medicine*, 214(9), 2695-2713. DOI: 10.1084/jem.20160392.

Zhu, G., Fan, Z., Ding, M. *et al.* (2015). An EGFR/PI3K/AKT axis promotes accumulation of the Rac1-GEF Tiam1 that is critical in EGFR-driven tumorigenesis. *Oncogene* 34, 5971–5982. DOI: 10.1038/onc.2015.45.

12. Apéndice

Tabla 1. Clasificación de cada estudio de transcriptómica de acuerdo con el tipo de cáncer clasificado por cBioPortal

<i>Estudio curado</i>	<i>Tipo de cáncer(cBioPortal)*</i>
01AA-MMEL Metastatic Melanoma (UCLA, Cell 2016)	Melanoma:Skin
02AA-MELA Melanoma (MSKCC, NEJM 2014)	Melanoma:Skin
03AA-NPC Neuroendocrine Prostate Cancer (Multi-Institute, Nat Med 2016)	Prostate Cancer:Prostate
04AA-METMEL Metastatic Melanoma (DFCI, Science 2015)	Melanoma:Skin
05AA-UCEC Uterine Corpus Endometrial Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Endometrial Carcinoma:Uterus
06AA-SCM Skin Cutaneous Melanoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Cutaneous Melanoma:Skin
07AA-UTECA Uterine Carcinosarcoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Endometrial Carcinoma:Uterus
08AA-GAC Gastric Cancer (OncoSG, 2018)	Esophagogastric Cancer:Esophagus/Stomach
09AA-PAP Pheochromocytoma and Paraganglioma (TCGA, PanCancer Atlas)	Pheochromocytoma,Miscellaneous Neuroepithelial Tumor:Soft tissue
10AA-LA Lung Adenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Non-Small Cell Lung Cancer:Lung
11AA-SARC Sarcoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Sarcoma:Soft tissue
12AA-ACRAL Acral Melanoma (TGEN, Genome Res 2017)	Melanoma:Skin
13AA-OSC Ovarian Serous Cystadenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Ovarian Epithelial Tumor:Ovarian
14AA-CAD Colorectal Adenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Colorectal Adenocarcinoma:Bowel
15AA-SCLC Small Cell Lung Cancer (U Cologne, Nature 2015)	Small Cell Lung Cancer: Lung
16AA-BUC Bladder Urothelial Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Bladder Urothelial Carcinoma:Bladder/Urinary tract
17AA-SA Sarcoma (MSKCCBroad, Nat Genet 2010)	Soft Tissue Sarcoma:Soft tissue
18AA-LSCCAR Lung Squamous Cell Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Non-Small Cell Lung Cancer: Lung
19AA-PADE Prostate Adenocarcinoma (SMMU, Eur Urol 2017)	Prostate Cancer:Prostate
20AA-SADEN Stomach Adenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Esophagogastric Adenocarcinoma:Esophagus/Stomach
21AA-CSCC Cervical Squamous Cell Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Cervical Squamous Cell Carcinoma:Cervix

22AA-TMETBCP The Metastatic Breast Cancer Project (Provisional, February 2020)	Breast Cancer:Breast
23AA-PROSADE Prostate Adenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Prostate Adenocarcinoma:Prostate
24AA-METPROAD Metastatic Prostate Adenocarcinoma (SU2CPCF Dream Team, PNAS 2019)	Prostate Adenocarcinoma:Prostate
25AA-ADRC Adrenocortical Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Adrenocortical Carcinoma:Adrenal Gland
26AA-EADENO Esophageal Adenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Esophageal Squamous Cell Carcinoma:Esophagus/Stomach
27AA-PANADE Pancreatic Adenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Pancreatic Adenocarcinoma:Pancreas
28AA-HANSCC Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma:Head and Neck Squamous Cell
29AA-LIVERHC Liver Hepatocellular Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Hepatocellular Carcinoma:Liver
30AA-PRADC Prostate Adenocarcinoma (Fred Hutchinson CRC, Nat Med 2016)	Prostate Cancer:Prostate
31AA-BLGGL Brain Lower Grade Glioma (TCGA, PanCancer Atlas)	Diffuse Glioma:Brain
32AA-BINCA Breast Invasive Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Invasive Breast Carcinoma:Breast
33AA-GMULT Glioblastoma Multiforme (TCGA, PanCancer Atlas)	Glioblastoma:Brain
34AA-LEUKE Acute Myeloid Leukemia (TCGA, PanCancer Atlas)	Leukemia:Myeloid
35AA-PALEUK Pediatric Acute Lymphoid Leukemia - Phase II (TARGET, 2018)	B-Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma:Lymphoid
36AA-BREAST Breast Cancer (METABRIC, Nature 2012 & Nat Commun 2016)	Breast Cancer:Breast
37AA-THYROID Thyroid Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	Well-Differentiated Thyroid Cancer:Thyroid
38AA-PANCAD Pancreatic Adenocarcinoma (QCMG, Nature 2016)	Pancreatic Cancer:Pancreas
39AA-NEUROB Pediatric Neuroblastoma (TARGET, 2018)	Peripheral Nervous System:Peripheral Nervous System

*La clasificación mostrada está basada en órgano y tipo de cáncer detallado, obtenido para cada estudio.

Tabla 2. Resumen de los genes esperados y encontrados en el cuartil superior (4to) en los treinta y nueve estudios de cáncer

<i>Estudio curado</i>	<i>Genes totales del 4to cuartil</i>	<i>PdE* totales encontrado por estudio</i>	<i>PdE* encontrado (4to cuartil más alto)</i>	<i>Distribución de genes uniforme</i>	<i>Normalización a 1</i>
01AA-MMEL Metastatic Melanoma (UCLA, Cell 2016)	5324	3726	1184	932	1.27
02AA-MELA Melanoma (MSKCC, NEJM 2014)	5236	3642	1060	911	1.16
03AA-NPC Neuroendocrine Prostate Cancer (Multi-Institute, Nat Med 2016)	8186	3985	1410	996	1.42
04AA-METMEL Metastatic Melanoma (DFCI, Science 2015)	5319	3924	1141	981	1.16
05AA-UCEC Uterine Corpus Endometrial Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	5021	3871	1243	968	1.28
06AA-SCM Skin Cutaneous Melanoma (TCGA, PanCancer Atlas)	5041	3904	1127	976	1.15
07AA-UTECA Uterine Carcinosarcoma (TCGA, PanCancer Atlas)	4973	3771	1154	943	1.22
08AA-GAC Gastric Cancer (OncoSG, 2018)	5000	3847	1211	962	1.26
09AA-PAP Pheochromocytoma and Paraganglioma (TCGA, PanCancer Atlas)	4993	3824	1084	956	1.13
10AA-LA Lung Adenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	5032	3875	1177	969	1.21
11AA-SARC Sarcoma (TCGA, PanCancer Atlas)	5039	3896	1158	974	1.19
12AA-ACRAL Acral Melanoma (TGEN, Genome Res 2017)	5795	3498	1170	875	1.34
13AA-OSC Ovarian Serous Cystadenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	4752	3590	1109	898	1.24
14AA-CAD Colorectal Adenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	5005	3826	1176	957	1.23

15AA-SCLC Small Cell Lung Cancer (U Cologne, Nature 2015)	4638	3861	1098	965	1.14
16AA-BUC Bladder Urothelial Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	5045	3903	1153	976	1.18
17AA-SA Sarcoma (MSKCCBroad, Nat Genet 2010)	3118	2632	693	658	1.05
18AA-LSCCAR Lung Squamous Cell Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	5045	3909	1117	977	1.14
19AA-PADE Prostate Adenocarcinoma (SMMU, Eur Urol 2017)	5455	3938	1313	985	1.33
20AA-SADEN Stomach Adenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	4264	3592	1044	898	1.16
21AA-CSCC Cervical Squamous Cell Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	5016	3868	1138	967	1.18
22AA-TMETBCP The Metastatic Breast Cancer Project (Provisional, February 2020)	5624	3921	1268	980	1.29
23AA-PROSADE Prostate Adenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	5035	3897	1197	974	1.23
24AA-METPROAD Metastatic Prostate Adenocarcinoma (SU2CPCF Dream Team, PNAS 2019)	4754	3942	1201	986	1.22
25AA-ADRC Adrenocortical Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	4930	3724	1114	931	1.20
26AA-EADENO Esophageal Adenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	4754	3592	1003	898	1.12
27AA-PANADE Pancreatic Adenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	4991	3811	1157	953	1.21
28AA-HANSCC Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	5050	3912	1199	978	1.23
29AA-LIVERHC Liver Hepatocellular Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	5022	3849	1131	962	1.18

30AA-PRADC Prostate Adenocarcinoma (Fred Hutchinson CRC, Nat Med 2016)	4819	3587	1007	897	1.12
31AA-BLGGL Brain Lower Grade Glioma (TCGA, PanCancer Atlas)	5040	3911	1106	978	1.13
32AA-BINCA Breast Invasive Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	5046	3913	1186	978	1.21
33AA-GMULT Glioblastoma Multiforme (TCGA, PanCancer Atlas)	4983	3782	1101	946	1.16
34AA-LEUKE Acute Myeloid Leukemia (TCGA, PanCancer Atlas)	4178	3213	976	803	1.22
35AA-PALEUK Pediatric Acute Lymphoid Leukemia - Phase II (TARGET, 2018)	6069	3847	1211	962	1.26
36AA-BREAST Breast Cancer (METABRIC, Nature 2012 & Nat Commun 2016)	4568	3688	956	922	1.04
37AA-THYROID Thyroid Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	5024	3889	1298	972	1.34
38AA-PANCAD Pancreatic Adenocarcinoma (QCMG, Nature 2016)	4198	3070	853	768	1.11
39AA-NEUROB Pediatric Neuroblastoma (TARGET, 2018)	5073	3660	1104	915	1.21

*PdE, proteínas de señalización basadas en su estructura de acuerdo con la base de datos SPIM-YY.

Tabla 3. Resumen del enriquecimiento normalizado para receptores, Y y S/T cinasas, fosfosustratos de AKTs y JAKs, así como proteínas con dominios RhoGEF, PH, SH2 y PDZ en los treinta y nueve estudios de cáncer obtenidos de cBioPortal

<i>Study curated</i>	<i>RTKs</i>	<i>GPCRs</i>	<i>RTKs</i>	<i>Y-K</i>	<i>S/T-K</i>	<i>pAKTs</i>	<i>pJAKs</i>	<i>GEF</i>	<i>PH</i>	<i>SH2</i>	<i>PDZ</i>
01AA-MMEL Metastatic Melanoma (UCLA, Cell 2016)	1.25	0.57	1.53	1.88	1.37	0.64	1.38	2.00	1.52	2.00	1.19
02AA-MELA Melanoma (MSKCC, NEJM 2014)	1.81	0.93	2.11	2.25	1.03	0.48	0.88	1.65	1.51	2.00	1.16
03AA-NPC Neuroendocrine Prostate Cancer (Multi-Institute, Nat Med 2016)	1.94	0.89	2.16	2.50	1.53	0.57	1.88	1.55	1.84	2.56	1.29
04AA-METMEL Metastatic Melanoma (DFCI, Science 2015)	2.13	1.23	2.26	2.13	0.88	0.40	1.13	1.95	1.54	2.08	1.13
05AA-UCEC Uterine Corpus Endometrial Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	1.63	0.90	1.84	1.63	1.12	0.57	0.88	1.75	1.70	2.04	1.19
06AA-SCM Skin Cutaneous Melanoma (TCGA, PanCancer Atlas)	2.06	1.08	2.16	2.00	0.95	0.41	1.25	1.60	1.39	2.04	1.32
07AA-UTECA Uterine Carcinosarcoma (TCGA, PanCancer Atlas)	1.94	0.81	1.74	1.63	1.05	0.34	1.13	1.55	1.54	1.92	1.26
08AA-GAC Gastric Cancer (OncoSG, 2018)	1.75	0.94	1.63	1.25	1.27	0.59	1.25	1.85	1.57	1.60	1.48
09AA-PAP Pheochromocytoma and Paraganglioma (TCGA, PanCancer Atlas)	2.44	0.82	2.26	1.75	1.05	0.47	0.88	1.65	1.59	1.92	1.29
10AA-LA Lung Adenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	2.19	0.97	2.21	1.88	1.14	0.43	1.38	1.80	1.62	2.04	1.45

11AA-SARC Sarcoma (TCGA, PanCancer Atlas)	2.00	0.89	2.26	2.25	1.20	0.47	1.38	2.10	1.87	2.16	1.35
12AA-ACRAL Acral Melanoma (TGEN, Genome Res 2017)	1.94	0.75	2.26	2.50	1.25	0.59	1.38	1.70	1.75	2.24	1.29
13AA-OSC Ovarian Serous Cystadenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	1.88	0.82	1.95	1.63	1.08	0.41	1.50	1.30	1.61	2.16	1.29
14AA-CAD Colorectal Adenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	2.13	0.98	2.11	1.75	1.07	0.41	1.13	1.75	1.54	1.88	1.42
15AA-SCLC Small Cell Lung Cancer (U Cologne, Nature 2015)	1.88	0.75	2.26	2.38	1.00	0.47	1.63	1.50	1.67	2.48	1.19
16AA-BUC Bladder Urothelial Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	2.19	0.97	2.26	1.88	1.03	0.29	1.50	1.45	1.57	2.04	1.26
17AA-SA Sarcoma (MSKCCBroad, Nat Genet 2010)	1.38	0.59	1.68	1.75	0.85	0.28	0.75	1.10	0.95	1.32	0.61
18AA-LSCCAR Lung Squamous Cell Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	1.94	0.91	2.16	2.13	1.03	0.38	1.38	1.65	1.52	2.08	1.29
19AA-PADE Prostate Adenocarcinoma (SMMU, Eur Urol 2017)	2.19	0.67	2.58	2.75	1.24	0.59	1.88	2.20	2.13	2.76	1.55
20AA-SADEN Stomach Adenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	2.38	0.89	2.21	1.50	0.98	0.38	0.88	1.60	1.52	1.72	1.42
21AA-CSCC Cervical Squamous Cell Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	2.00	0.86	2.11	1.88	1.08	0.48	1.00	1.75	1.52	1.92	1.29

22AA-TMETBCP The Metastatic Breast Cancer Project (Provisional, February 2020)	2.13	0.98	2.37	2.38	1.37	0.50	1.38	1.50	1.69	2.16	1.23
23AA-PROSADE Prostate Adenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	2.31	0.93	2.26	1.88	1.07	0.47	1.25	1.95	1.84	2.28	1.55
24AA-METPROAD Metastatic Prostate Adenocarcinoma (SU2CPCF Dream Team, PNAS 2019)	2.44	1.10	2.42	2.38	0.83	0.40	1.63	1.80	1.89	2.40	1.48
25AA-ADRC Adrenocortical Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	1.56	0.98	1.74	1.50	0.93	0.45	1.50	1.55	1.49	1.68	1.32
26AA-EADENO Esophageal Adenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	1.69	0.85	2.00	1.88	0.86	0.26	0.75	1.85	1.62	2.04	1.19
27AA-PANADE Pancreatic Adenocarcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	2.06	0.86	2.11	1.75	1.15	0.45	0.38	1.65	1.48	1.96	1.29
28AA-HANSCC Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	2.19	0.86	2.11	1.75	1.25	0.47	1.13	2.00	1.79	2.20	1.35
29AA-LIVERHC Liver Hepatocellular Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	1.94	0.62	1.84	1.50	1.32	0.53	0.88	2.10	1.62	1.84	1.52
30AA-PRADC Prostate Adenocarcinoma (Fred Hutchinson CRC, Nat Med 2016)	1.63	0.44	1.74	1.75	0.98	0.52	1.00	1.55	1.34	1.76	1.13

31AA-BLGGL Brain Lower Grade Glioma (TCGA, PanCancer Atlas)	1.13	0.75	1.16	1.38	1.31	0.40	1.00	1.70	1.44	1.20	1.48
32AA-BINCA Breast Invasive Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	2.31	1.00	2.42	2.25	1.12	0.52	1.13	2.00	1.97	2.24	1.52
33AA-GMULT Glioblastoma Multiforme (TCGA, PanCancer Atlas)	1.44	0.89	1.42	1.00	1.14	0.33	1.13	1.90	1.36	1.20	1.39
34AA-LEUKE Acute Myeloid Leukemia (TCGA, PanCancer Atlas)	1.81	0.61	1.74	1.50	1.14	0.43	1.13	1.70	1.52	1.48	1.61
35AA-PALEUK Pediatric Acute Lymphoid Leukemia - Phase II (TARGET, 2018)	1.50	0.82	1.84	2.13	1.53	0.47	0.50	1.80	1.57	1.56	1.35
36AA-BREAST Breast Cancer (METABRIC, Nature 2012 & Nat Commun 2016)	1.75	0.50	1.84	1.75	0.85	0.43	1.25	1.15	1.38	1.76	0.81
37AA-THYROID Thyroid Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)	2.00	0.87	2.16	1.88	1.46	0.52	1.25	2.20	1.89	2.00	1.61
38AA-PANCAD Pancreatic Adenocarcinoma (QCMG, Nature 2016)	1.81	0.53	1.89	1.38	0.81	0.28	0.50	0.80	1.00	1.68	0.87
39AA-NEUROB Pediatric Neuroblastoma (TARGET, 2018)	2.13	0.83	2.37	2.50	0.92	0.52	1.63	1.75	1.77	2.24	1.29