



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**

**“Potencial angiogénico de RhoGEFs
constitutivamente activos, diseñados a partir
de la estructura del grupo que incluye a RGS-
RhoGEFs e Intersectinas”**

Tesis que presenta

M. en C. ALEJANDRO CASTILLO KAUIL

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR**

Directores de la tesis:
**Dra. Guadalupe Reyes Cruz
Dr. José Vázquez Prado**

Ciudad de México, México

Octubre, 2020

La presente tesis fue desarrollada en el laboratorio 35 del departamento de Farmacología y laboratorio 19 del departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Reyes Cruz y el Dr. José Vázquez Prado.

Agradezco a CONACyT el otorgamiento de la beca **378381**, con la cual pude llevar a cabo el presente trabajo.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el apoyo con clave **286274** otorgado al Dr. José Vázquez Prado y el apoyo con clave **240119** otorgado a la Dra. Guadalupe Reyes Cruz.

“Los avances en la ciencia dependen de nuevas técnicas, nuevos descubrimientos y nuevas ideas, probablemente en este orden.”

“Creo en el derecho inalienable de todos los científicos adultos a hacer el mayor ridículo en privado.”

SYDNEY BRENNER

“Entonces concóctete a ti mismo, no imagines un Dios al que investigar; el estudio más propio de la humanidad es el del hombre mismo.”

ALEXANDER POPE, *Essay on Man*

Dedicado a mi madre Nidia Inelda Kauil y Mukul, siempre serás mi ejemplo de fortaleza, lucha, persistencia y amor.

A mi hermano Henry y su familia, así como a mi hermano Samuel.

A mi hermoso Yucatán.

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos al Dr. José Vázquez Prado y a la Dra. Guadalupe Reyes Cruz, por depositar su confianza en mí para la realización del presente proyecto de tesis y todo el apoyo recibido durante estos años. Al Dr. José Vázquez prado le externo mi gratitud por el tiempo dedicado a la discusión y análisis de las estrategias y los resultados; así como cada oportunidad en la que me compartió su experiencia, visión y consejos que han sido determinantes para mi formación académica, pero que también han tenido un importante impacto personal. Gracias José por tu paciencia.

A Jaime Estrada Trejo y Margarita Raquel Valadez Sánchez del laboratorio 19 de Biología Celular; así como a David Pérez Rangel, Omar Hernández García y Estanislao Escobar Islas del laboratorio 35 de Farmacología, les agradezco todo el apoyo técnico brindado, el cual fue importante para la realización de la parte experimental de la presente tesis. A Jaime también le externo un sincero agradecimiento por su amistad a lo largo de estos años.

Gracias a Irving García Jiménez por ayudarme a obtener las construcciones de PRG que permitieron mapear los sitios de interacción con $G\alpha_s$. Irving también me ayudó a obtener los incisos D de la figura 14, así como los incisos B y C de la figura 17. Gracias Irving por brindarme una amistad sincera y muchas veces ser la primera persona con quien compartí emocionantes resultados de este proyecto.

A Daniel Cervantes Villagrana agradezco el apoyo en la obtención de los resultados de los incisos B, C, D y E de la figura 20. Además de todos los consejos e ideas para algunos experimentos.

Gracias Sendi Adame García, por los experimentos de los incisos B y C de la figura 19. Apreció mucho estos años de amistad, acompañados de buenos momentos y consejos científicos. Ha sido un verdadero placer ser compañeros de generación y te deseo todo el éxito posible.

También externo mi agradecimiento a Yarely Beltrán Navarro por apoyar a Daniel en la obtención de los incisos D y E de la figura 20. Eres un verdadero ejemplo de organización y dedicación.

Gracias a Jaime Escobar Herrera, encargado del microscopio confocal de biología celular, por el apoyo durante mis sesiones para obtener esas hermosas imágenes del confocal. Agradezco el apoyo brindado por Clara Hernández con todas las cuestiones administrativas del departamento.

Expreso mi gratitud a la Dra. Heidi Welch del Instituto Babraham de Cambridge, Reino Unido, por darme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio. A ella y a todos los miembros de su laboratorio muchas gracias por hacerme sentir muy a gusto durante mi estancia.

Gracias a todos mis compañeros y amigos del laboratorio 35 de Farmacología, así como del laboratorio 19 de Biología Celular.

A la Dra. Guadalupe Mireya de la Garza Amaya y al Dr. Guillermo Elizondo Azuela del Departamento de Biología Celular; al Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda del Departamento de Biomedicina Molecular y al Dr. Eduardo Castañeda Saucedo de la Universidad de Autónoma de Guerrero. Muchas gracias por sus valiosos comentarios, sugerencias y críticas al proyecto.

Agradezco a mi familia, en especial a mi madre Nidia Inelda Kauil y Mukul, por apoyarme, aceptarme y amarme como soy.

Agradezco a Tonatiuh Molina Villa por enseñarme esa humildad y verdadero entusiasmo por la labor científica, y por darme mis primeras clases del microscopio confocal. Muchas gracias por ser quien eres. Las promesas que no podré cumplir, recuérdalas. Las hice cuando me sentía tan poderoso contigo que no recordaba que los finales existen.

ÍNDICE

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
ABREVIATURAS	10
1) INTRODUCCIÓN	12
1.1 Angiogénesis.....	12
1.2 Citoesqueleto de actina.....	14
1.3 GTPasas de la familia de Rho: Rac, RhoA y Cdc42.....	15
1.4 Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina de Rho (RhoGEFs).....	17
1.5 RGS-RhoGEFs: p115-RhoGEF, PRG y LARG.....	20
2) JUSTIFICACIÓN	23
3) HIPÓTESIS	24
4) OBJETIVO GENERAL	24
4.1 Objetivos particulares.....	24
5) ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
5.1 Generación de construcciones.....	25
5.1.1 Amplificación de las secuencias.....	26
5.1.2 Purificación, digestión y ligación.....	28
5.1.3 Digestión de los insertos y del vector pCEFL-EGFP-CAAX.....	29
5.1.4 Purificación de los insertos y vector digeridos.....	31
5.1.5 Ligación.....	32
5.1.6 Transformación de bacterias DH5 α ultracompetentes y obtención de ADN plasmídico	32
5.1.7 Digestión diagnóstica de las construcciones.....	34
5.2 Estudio de aspectos morfológicos y colocalización por microscopía.....	35
5.2.1 Cultivo celular.....	36
5.2.2 Transfección de las células.....	36
5.2.3 Siembra de las células sobre un cubreobjeto, tinción con faloidina y montaje de la muestra.....	37
5.2.4 Visualización de las muestras.....	39
5.3 Ensayos de pull-down (activación de GTPasas de Rho, GEF activo y pull-down de	

GST)	39
5.3.1 Cultivo celular.....	39
5.3.2 Transfección celular.....	40
5.3.3 Ensayos de pull-down de GTPasa activa y GEF activo.....	42
5.3.4 Western blot.....	44
5.3.5 Revelado.....	46
5.4 Ensayo de aislamiento de membranas.....	46
5.5 Cuantificación de bandas y análisis estadístico.....	48
6) RESULTADOS.....	49
6.1 Aspectos morfológicos de EGFP-RhoGEFs-DH/PH-CAAX expresados en células PAE	50
6.2 Ensayos bioquímicos de captura de GTPasas activas (Cdc42, RhoA y Rac1) y de GEF activo en células HEK293T expresando los EGFP-RGS-RhoGEFs-DH/PH-CAAX.....	55
6.3 Análisis de la regulación del tándem DH/PH de PRG por sub-unidades Ga de las proteínas G heterotriméricas.....	58
6.4 Mapeo de la región de interacción de Gas Q227L con PRG-DH/PH.....	64
6.5 Estimulación de receptores endógenos acoplados a Gs para evaluar el reclutamiento a la membrana de PRG endógeno.....	68
6.6 Uso de herramientas quimiogénicas para evaluar la especificidad de Gas como activador de PRG.....	69
7) DISCUSIÓN.....	72
8) CONCLUSIONES.....	81
9) PERSPECTIVAS.....	82
10) BIBLIOGRAFÍA.....	83
11) PUBLICACIONES.....	90

RESUMEN

Los RhoGEFs con homología a Dbl son un grupo de más de 70 proteínas reguladoras de la activación de las GTPasas de la familia de Rho que regulan el citoesqueleto de actina. El control espacio-temporal de las GTPasas es un factor determinante para la remodelación del citoesqueleto de actina, los cambios en la forma de la célula, la polaridad y la migración celular. La naturaleza multidominio de una gran mayoría de RhoGEFs ha permitido dar cuenta de su importancia sobre el control de la actividad de las GTPasas y su contribución en eventos de carácter fisiológico y patológico. Sin embargo, queda mucho por comprender sobre los mecanismos de regulación de los RhoGEFs y su participación en la dinámica del citoesqueleto de actina.

Realizamos un tamizaje con el uso de versiones constitutivamente activas de un subgrupo de RhoGEFs, a fin de identificar RhoGEFs-DH/PH capaces de promover cambios morfológicos afines a un fenotipo pro-angiogénico; resultado de la activación de Cdc42, Rac y RhoA. De manera precisa reportamos que la expresión del tándem DH/PH de PRG (ARHGEF11), un GEF reportado como específico de RhoA, fue eficaz para generar estructuras similares a filopodios, lo cual fue atribuido a la activación de Cdc42. Por medio de técnicas bioquímicas confirmamos que PRG es capaz de interactuar y activar a Cdc42. Además, encontramos que el DH/PH de PRG incrementa su afinidad hacia Cdc42 como resultado de interactuar con la subunidad $G\alpha_s$. Del mapeo de los sitios de interacción entre $G\alpha_s$ y PRG, se generó una construcción basada en la región mínima de la interacción $G\alpha_s$:PRG, con lo que fue posible bloquear la interacción, además de inhibir la señalización de $G\alpha_s$. En este trabajo reportamos una novedosa vía $G\alpha_s$ >PRG>Cdc42, que permitiría comprender cómo las GTPasas pueden ser reguladas de manera espacio-temporal por un mismo RhoGEF, en función de la subunidad $G\alpha$ que lleva a su activación.

ABSTRACT

RhoGEFs with homology to Dbl are a group of more than 70 proteins that regulate the activation of the Rho family of GTPases which regulate the actin cytoskeleton. Spatio-temporal control of GTPases is a determining factor for the remodeling of the actin cytoskeleton, changes in cell shape, polarity and cell migration. The multidomain nature of the great majority of RhoGEFs has made it possible to account for their importance on the control of GTPase activity and their contribution in physiological and pathological events. However, much remains to be understood about the regulatory mechanisms of RhoGEFs and their participation in the actin cytoskeletal dynamics.

We screened using constitutively active versions of a subgroup of RhoGEFs, in order to identify RhoGEFs-DH/PH capable of promoting morphological changes related to a pro-angiogenic phenotype; resulting from the activation of Cdc42, Rac and RhoA. We precisely report that the expression of the DH/PH tandem of PRG (ARHGEF11), a GEF reported as specific for RhoA, was effective in generating structures similar to filopodia, attributed to the activation of Cdc42. Using biochemical techniques, we confirmed that PRG is able to interact and activate Cdc42. Furthermore, we found that the PRG-DH/PH increases its affinity towards Cdc42 as a result of interacting with the $G\alpha_s$ subunit. From the mapping of the interaction sites between $G\alpha_s$ and PRG, we generated a construct based on the minimum region of the $G\alpha_s$:PRG interaction; with this construct it was possible to block the interaction, in addition to inhibiting $G\alpha_s$ signaling. In this thesis, we report a novel pathway $G\alpha_s$ >PRG>Cdc42, which would allow us to understand how GTPases can be regulated in a space-time manner by the same RhoGEF depending on the $G\alpha$ subunit that leads to its activation.

ABREVIATURAS

VEGF: Vascular endothelial growth factor

PDGF-B: Platelet-derived growth factor subunit B

Ang1: Angiopoietin 1

PEDF: Pigment epithelium-derived factor

WASP: Wiskott–Aldrich Syndrome protein

Ena/VASP: Enabled Sol/Vasodilator-stimulated phosphoprotein

FMNL2/3: Formin-like protein 2/3

RAS: Rat sarcoma

PAK: p21-activated kinases

ROCK: Rho-associated protein kinase

GEF: Guanine nucleotide exchange factors

GAP: GTPase-activating proteins o GTPase-accelerating proteins

GDI: Guanosine nucleotide dissociation inhibitor

DH: Dbl homogy

DHR: DOCK- homology region

RGS: Regulation of G-protein signaling domain

GPCR: G protein-coupled receptors

ITSN: Intersectin

Cdc42: Cell Division Cycle 42

Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

PRG: PDZ RhoGEF

LARG: Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor

EGFP: Enhanced green fluorescent protein

GST: Glutathione S-transferase

DREADD: Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs

CNO: Clozapine-N-oxide

HA: Human influenza hemagglutinin

PKAS: Phospho-PKA Substrate

GLUT1: Glucose transporter 1

CREB: cAMP response element-binding protein

PAE: Porcine Aortic Endothelial Cells

HEK293T: Human embryonic kidney 293 contains the SV40 T-antigen cells

HT29: Human colon adenocarcinoma cell line

AKT1: Protein kinase B

FSK: Forskolin

IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine

1) INTRODUCCIÓN

1.1 Angiogénesis.

La angiogénesis se define como la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes. Este es un proceso fundamental que inicia desde etapas tempranas del organismo, permitiendo la formación de tejidos y órganos durante el desarrollo y crecimiento. Sin embargo, en etapas adultas el proceso angiogénico es más esporádico, puesto que los vasos sanguíneos permanecen quiescentes y únicamente entran en actividad proliferativa en situaciones como la reparación de alguna herida producto de un traumatismo (Figura 1)(1).

La angiogénesis involucra una serie de pasos que inician con la estimulación del endotelio existente. El vaso sanguíneo comienza a perder estabilidad en respuesta a factores pro-angiogénicos, dando como resultado un incremento de la movilidad y posterior capacidad invasiva de las células endoteliales. Las células murales (pericitos) también responden a la estimulación del endotelio y la matriz extracelular es degradada por la liberación de agentes proteolíticos. En respuesta a factores como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y vías de señalización como Notch, las células endoteliales adquieren dos fenotipos principales, el de célula líder (*tip cell*) o de célula tallo (*stalk cell*). Las células líderes se caracterizan por migrar y ser responsables de guiar a las demás células endoteliales. Esto a través de la generación de estructuras de actina denominadas filopodios, las cuales actúan como sensores detectando el origen de las señales angiogénicas. Las células tallo, por su parte, se caracterizan por su alta tasa de proliferación que permite satisfacer el requerimiento de células endoteliales que constituirán el nuevo vaso sanguíneo. Además, células murales son atraídas por factores como PDGF-B y Ang1 con lo cual darán soporte a la monocapa de células endoteliales, para finalmente volver a un estado quiescente una vez que el estímulo pro-angiogénico desaparece (1-4).

Aunque la angiogénesis es controlada por un balance entre factores pro-angiogénicos como VEGF e hipoxia, y factores anti-angiogénicos como PEDF o la endostatina (1,2). Existen situaciones donde este balance se pierde y comienza una estimulación constante del endotelio por parte de agentes pro-angiogénicos.

Por ejemplo, las células malignas de un tumor sufren de hipoxia cuando su tamaño supera el umbral que le permitía obtener oxígeno y nutrientes, esta condición lleva a la liberación de factores pro-angiogénicos que promueven una angiogénesis desregulada y posteriormente la progresión del cáncer a través de las metástasis (2,3,4).

Lo anterior ha favorecido un impulso importante de la investigación de los aspectos moleculares y celulares del proceso angiogénico, a fin de desarrollar terapias que permitan una intervención eficiente de aquellas condiciones donde la angiogénesis son parte de un problema de salud (3).

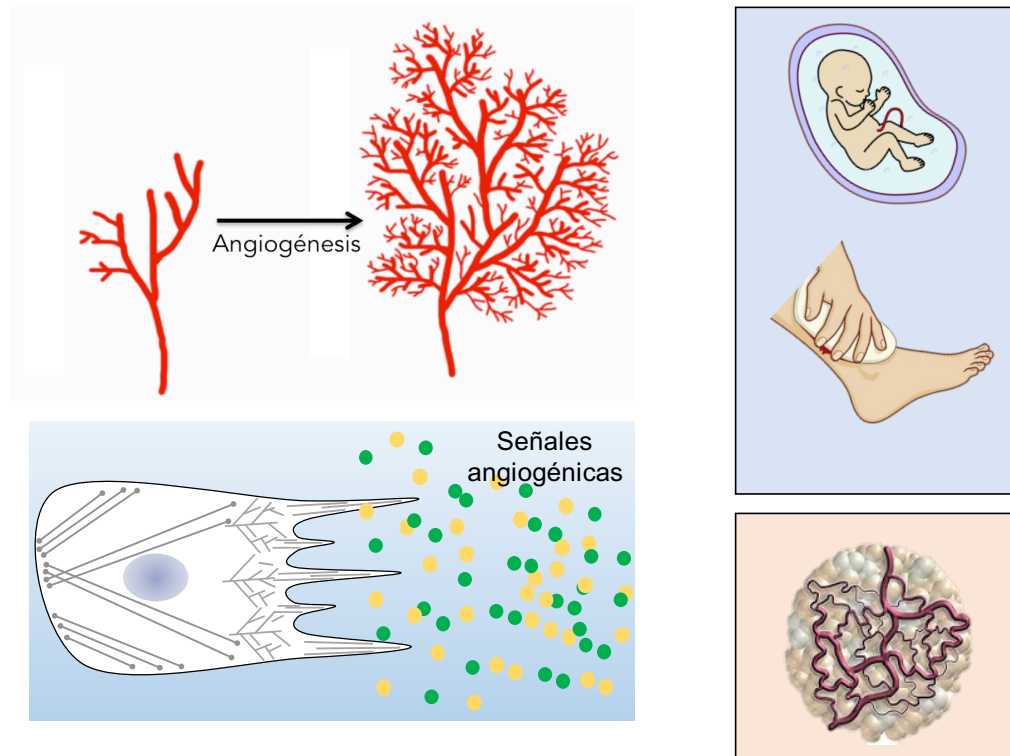


Figura 1. El proceso angiogénico. La angiogénesis es definida como la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los existentes. En respuesta a señales promotoras de angiogénesis de diversa naturaleza se favorece la migración y división de células endoteliales para formar un nuevo endotelio donde se originó la señal proangiogénica. La angiogénesis es un evento normal y fundamental para el desarrollo de un organismo, así como para mantener un estado saludable durante la edad adulta, sin embargo, existen eventos de carácter patológico como el cáncer que pueden promover un proceso angiogénico que puede favorecer la progresión de la enfermedad como ocurre en la metástasis.

1.2 Citoesqueleto de actina.

El cambio en la forma de la célula y la migración de la misma son dos eventos particularmente relevantes durante la angiogénesis, siendo indispensable la regulación de los filamentos de actina del citoesqueleto. La polimerización y cambios del citoesqueleto de actina en respuesta a una cascada de señalización; promueve eventos celulares como movilidad, diferenciación, endocitosis, polarización y división celular (5,6). La amplia gama de eventos relacionados con el citoesqueleto es resultado de la diversidad de estructuras que resultan de la polimerización de actina G (globular) a actina F (filamentosa). Las tres principales estructuras que han sido objeto de estudio son: lamelipodios, filopodios y fibras de estrés (figura 2).

El lamelipodio es una estructura laminar ancha y bidimensional, siendo el complejo Arp2/3 el encargado de la formación de redes ramificadas de actina, pero también contribuyen WASP, Ena/VASP y la familia de forminas. Esta estructura es fundamental para la extensión y el avance de la célula en eventos como la migración (6-9).

El filopodio, a diferencia del lamelipodio, muestra una organización de la actina a manera de filamentos paralelos y en forma de ramillete; proteínas como mDia2 y forminas como FMNL2/3 son relevantes para la nucleación de los filamentos del filopodio; mientras que fascin y Damm-1 son importantes para enlazar y mantener la densidad entre los filamentos que componen el filopodio. Mucho se ha discutido la relevancia del filopodio, pero destaca su papel como sensor del ambiente donde se desplaza la célula (8,9).

Las fibras contráctiles, que se encuentran en regiones ajenas a la presencia de lamelipodios y filopodios, pueden clasificarse en 4 subtipos: fibras de estrés dorsales, fibras de estrés ventrales, arcos transversales y capucha de actina perinuclear; sin embargo, las más ampliamente estudiadas son las fibras de estrés ventrales (9,10). Las fibras de estrés ventrales están compuestas de filamentos de actina no ramificados, son de polaridad mixta y se encuentran unidas a las adhesiones focales que tienen contacto con la matriz extracelular a

través de las integrinas; las fibras ventrales destacan por su papel en eventos contráctiles a través de proteínas motoras como miosina II (8-10).

Lamelipodios, filopodios y fibras de estrés, pese a sus diferencias en su ensamble y organización, todas ellas requieren del papel de un grupo de proteínas denominadas GTPasas de la familia de Rho y que se describirán a continuación (9).

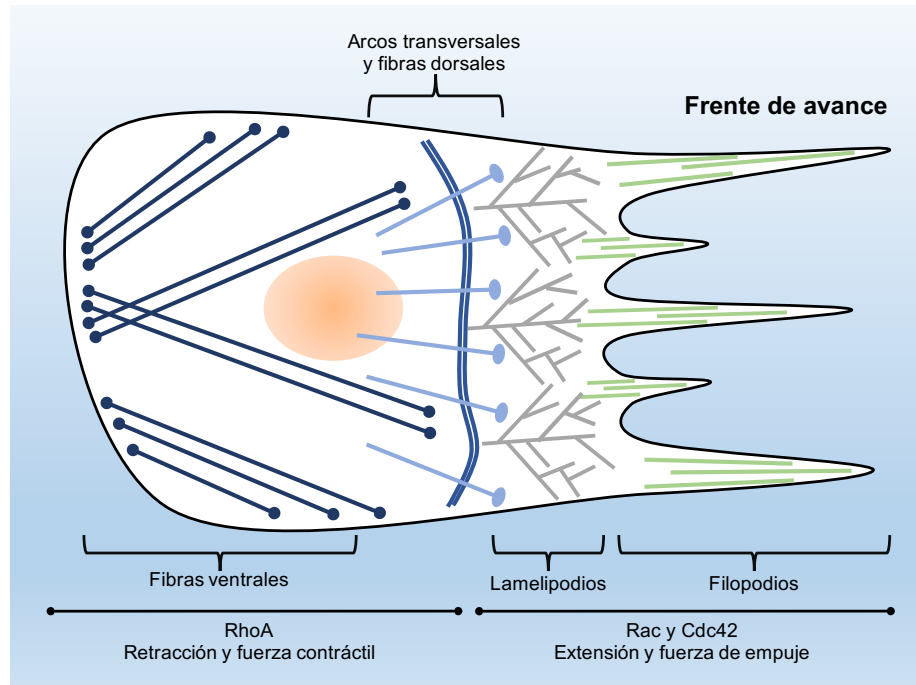


Figura 2. Diversidad estructural del citoesqueleto de actina. El citoesqueleto de actina está compuesto de todas aquellas estructuras que resultan de la polimerización de la actina. Las más importantes y estudiadas en migración celular son los lamelipodios y los filopodios que se generan al frente de avance favoreciendo la extensión y avance por medio de fuerza de empuje, mientras que en la parte posterior de la célula predomina fibras de estrés ventrales asociadas a adhesiones focales que contribuyen con fuerzas contráctiles.

1.3 GTPasas de la familia de Rho: Rac, RhoA y Cdc42.

Las GTPasas de la familia de Rho son un subgrupo perteneciente a la superfamilia de RAS, también conocidas como GTPasas de bajo peso o GTPasas pequeñas, nombre dado por su peso molecular de 21 kDa. Esta familia está compuesta de 22 miembros que se caracterizan por ser claves en la regulación

del citoesqueleto de actina, como reportaron Ridley y Hall en 1992, cuyo trabajo describe el papel de Rac y RhoA en la formación y regulación de lamelipodios, fibras de estrés y adhesiones focales en fibroblastos, así como su activación dependiente de receptores para factores de crecimiento (11-13). Aunque el papel sobre el citoesqueleto de actina es el aspecto más y mejor estudiado, la señalización resultante de la actividad de las GTPasas de Rho influye en una amplia gama de eventos relevantes para las células como son polaridad, expresión de genes, diferenciación, migración, transporte vesicular y división celular (14,15).

Las GTPasas de Rho representan a la perfección el concepto de interruptor molecular, ya que pueden encontrarse en un estado inactivo asociado a GDP o activo asociado a GTP. El paso de una GTPasa de un estado inactivo a uno activo involucra la participación de tres grupos de proteínas reguladoras: GEFs, GAPs y GDIs (figura 3).

Las GTPasas inactivas carecen de localización en la membrana celular y se encuentran retenidas en el citoplasma, resultado de su interacción con los inhibidores de la disociación del nucleótido de guanina (GDIs). En respuesta a señales externas, las GTPasas son liberadas y localizadas en la membrana celular a través de sus modificaciones lipídicas postraduccionales. Las GTPasas localizadas en la membrana son activadas por un segundo grupo de proteínas denominadas factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs). Los GEFs interacciona con la GTPasa y generan un cambio conformacional que facilita la salida del GDP y entrada de GTP con lo que las GTPasas se encuentran en un estado activo. En un estado activo las GTPasas pueden asociarse a sus múltiples efectores, como son las cinasas activadas por p21 (PAKs) para el caso de Rac y Cdc42, o cinasas de proteína asociadas a Rho (ROCKs) como efectores de RhoA activo (15). Aunque las GTPasas poseen una actividad intrínseca de hidrólisis del GTP, esto ocurre muy lento por lo que un tercer grupo de proteínas llamadas proteínas activadores de GTPasa (GAPs) son las que aceleran este proceso por el cual la GTPasa retorna a un estado de asociación a GDP y puede ser nuevamente secuestrada por el GDI hacia el citoplasma (15, 16).

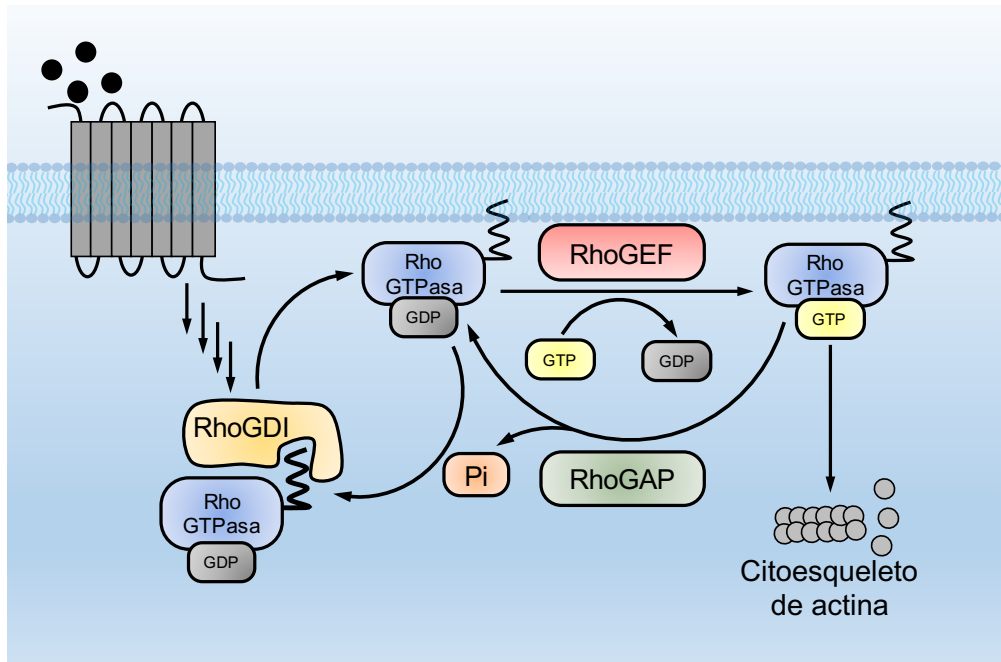


Figura 3. Ciclo de activación de las GTPasas de Rho. Los RhoGDIs mantienen a la GTPasa secuestrada en el citoplasma al cubrir la modificación lipídica que permite su asociación a la membrana celular. En respuesta a un estímulo externo, la GTPasa es liberada y anclada a la membrana, donde los RhoGEFs favorecen el intercambio de GDP (estado inactivo) por GTP (estado activo) por lo que interactúa con sus efectores y promueve cambios sobre el citoesqueleto de actina. Los RhoGAPs promueven la hidrólisis de GTP con lo que la GTPasa nuevamente se encuentra asociada a GDP (estado inactivo) y es nuevamente secuestrada hacia el citoplasma.

1.4 Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina de Rho (RhoGEFs).

Los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina para las GTPasas de Rho (RhoGEFs) son catalogados en dos familias de acuerdo a la homología del dominio catalítico. La principal familia agrupa a más de 70 miembros y corresponde a los GEFs que poseen un dominio de homología a Dbl (DH). El segundo grupo cuenta con solo 11 miembros que se caracterizan por un dominio denominado región de homología a Dock (DHR) (16).

Los GEFs con dominio DH actúan como activadores de Cdc42, Rac y RhoA, así como de varias de las otras 22 GTPasas de la familia de Rho, mientras que los GEFs con dominio DHR se consideran activadores específicos de Cdc42 y Rac

(16,17). Resulta interesante que el número de activadores (RhoGEFs) supere por mucho al número de GTPasas, condición que ha sido interpretada como indicativo del alto grado de control sobre la activación de las GTPasas de Rho. Esta situación es entendible si recordamos que la señalización de las Rho GTPasas influye sobre una amplia gama de eventos celulares. Adicional a lo anterior, un gran número de RhoGEFs son multidominio, lo cual es relevante para la integración de las vías de señalización (figura 4). Los dominios adicionales al DH favorecen interacciones con otras proteínas o lípidos, por lo que pueden servir como señales de localización o permitir la formación de complejos proteicos que favorezcan la señalización. Los RhoGEFs con homología a Dbl también se caracterizan por poseer un dominio de homología a pleckstrina (PH), inmediata e invariablemente al dominio DH. El dominio PH de los DH RhoGEFs ha sido motivo de estudio más allá de su habilidad para asociarse a fosfoinosítidos de la membrana como una forma de localización, por lo que su participación ha sido extrapolada a favorecer la interacción con la GTPasas, definir la especificidad de un RhoGEF por ciertas GTPasas y como una región de regulación del mismo RhoGEF (16-18).

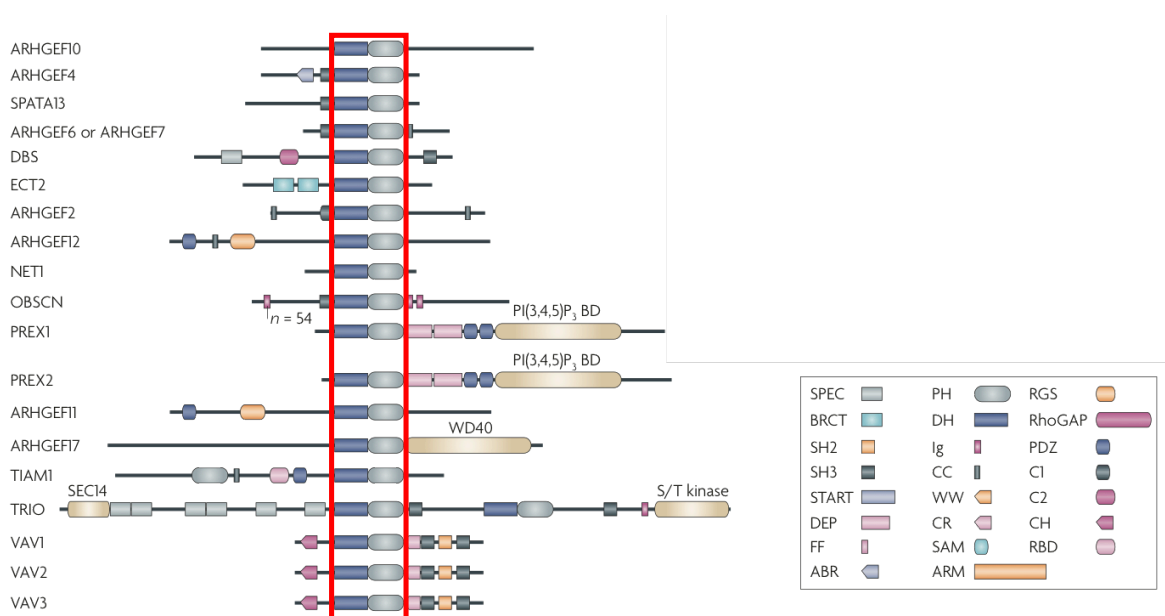


Figura 4. RhoGEFs como proteínas multidominio. Los RhoGEFs con homología a Dbl se caracterizan por poseer un tándem compuesto por los dominios DH y PH (remarcado en el

rectángulo rojo). Adicional al tándem DH/PH, estos poseen una amplia diversidad de dominios adicionales muchos de ellos capaces de interactuar con lípidos y proteínas por lo cual pueden favorecer la localización, activación y formación de complejos de señalización conformados por diversas proteínas (modificado de Vigil, Dominico *et al.* (2010): 842-57).

Como se muestra en la figura 4, los diversos dominios adicionales al tándem DH/PH, tanto en los extremos N- y C-terminal, dan pistas de que cumplen con funciones de regulación. Un buen ejemplo son las intersectinas, GEFs para Cdc42, que poseen varios dominios SH3 en su extremo N-terminal. Los dominios SH3 poseen afinidad por regiones ricas en prolina, como ocurre en el extremo C-terminal del receptor GPR124, lo cual permite interacción entre intersectina y GPR124 con la consecuente activación del GEF (19).

Existen GEFs cuyos dominios adicionales o el mismo dominio PH, contribuyen a una autoinhibición del GEF por medio de interacciones intramoleculares. p63RhoGEF ejemplifica una de estas situaciones, ya que su PH obstruye el acceso de RhoA hacia el dominio DH. La activación ocurre cuando $G\alpha_q$ produce el desplazamiento del dominio PH, mediante un efecto alostérico, y los puntos de interacción del dominio DH con RhoA, se hacen accesibles para hacer contacto (20,21). Otro buen ejemplo de un GEF regulado por autoinhibición es el caso de Vav, un RacGEF que es autoinhibido a diferentes niveles de complejidad, por lo que requiere de una serie de fosforilaciones de diversas tirosinas, con lo que las múltiples interacciones intramoleculares entre los dominios del GEF se van liberando y el dominio catalítico queda accesible (16, 23).

A diferencia de GEFs para las GTPasas de Ras, los RhoGEFs no tienen documentado un número significativo de mutaciones activantes; por lo que el papel oncogénico de algunos RhoGEFs se explica por la actividad de los receptores que los regulan, por una condición de sobreexpresión, por la participación de múltiples RhoGEFs en comportamientos aberrantes de las GTPasas, e incluso por un deficiente papel de los RhoGAPs (18).

Descrita la importancia de los RhoGEFs como reguladores de la señalización de las GTPasas, comprendemos porque múltiples grupos se han dado a la tarea de entender mejor cómo estas proteínas son reguladas y cuál es su contribución en

eventos fisiológicos y patológicos, con la finalidad de conocer su potencial como blancos farmacológicos que permitan el desarrollo de nuevas terapias (18). Queda claro que todavía existe un amplio campo de exploración de los mecanismos de regulación de los RhoGEFs, desde identificar los estímulos externos y sus receptores que regulan su actividad, así como comprender a más profundidad su papel en la señalización de las Rho GTPasas, junto con sus implicaciones fisiológicas y patológicas.

Nuestro grupo de trabajo ha hecho un esfuerzo por entender parte de la complejidad de los mecanismos de regulación de los RhoGEFs, así como de los perfiles de expresión endotelial de cada uno de los RhoGEFs identificados. El trabajo de Hernández-García *et al.* (2015), arroja información sobre cuáles de los RhoGEFs tiene una expresión relevante en endotelio; RhoGEFs como Tuba, FGD5, Farp1, ARHGEF17, TRIO, P-Rex1, ARHGEF15, ARHGEF11, ABR, Farp2, ARHGEF40, ALS, DOCK1, DOCK7 y DOCK6 resultan los más abundantes en células endoteliales. Además, la expresión de estos RhoGEFs poco se ve afectada por VEGF, pero la expresión de todos los RhoGEFs si resulta afectada en respuesta al complejo ambiente de un endotelio tumoral (24).

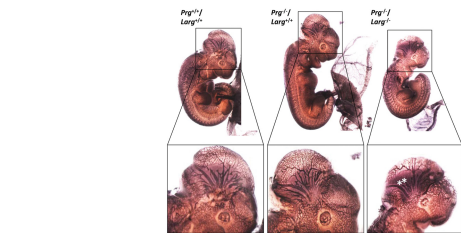
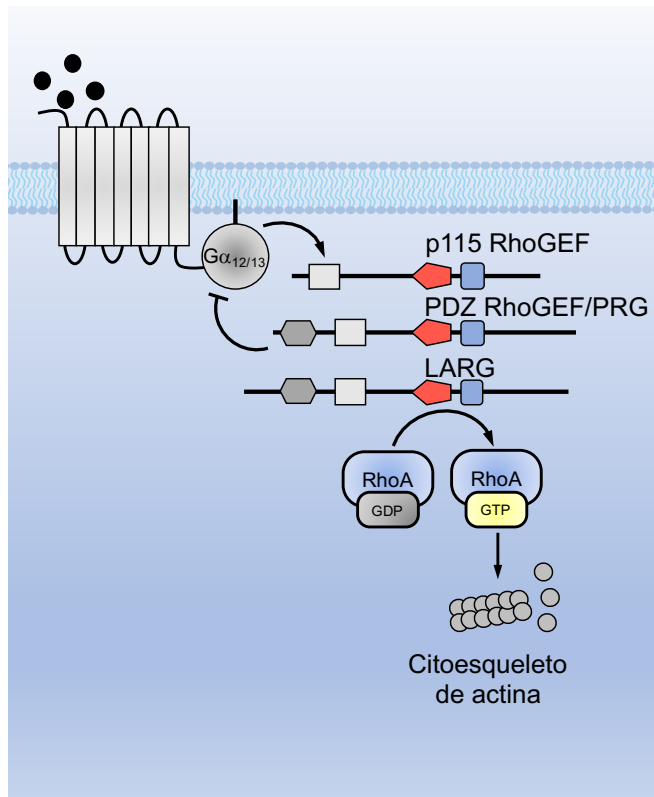
1.5 RGS-RhoGEFs: p115-RhoGEF, PRG y LARG.

Las cuatro familias de proteínas G heterotriméricas (Gi, Gs, Gq y G12) pueden activar a las GTPasas de Rho aunque por diferentes vías, como es la generación de segundos mensajeros (AMP cíclico o Ca^{2+}), la alteración de componentes de lípidos en la membrana (PIP3), por interacción de RhoGEFs con las subunidades $G\alpha$, $\beta\gamma$ e incluso por interacción directa con los receptores (GPCRs) (25,26).

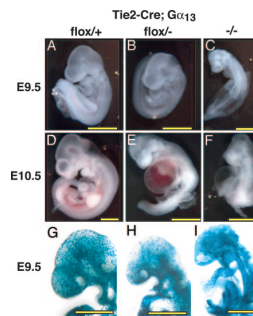
La familia G12, pese a ser la más reciente en ser identificada, ha demostrado poseer un importante papel en el desarrollo tumoral. La subunidad $G\alpha_{12}$ fue el primer miembro de la familia G12 que demostró capacidad transformante en cultivo celular (28). Posteriormente, el uso de versiones deficientes de la actividad de GTPasa de $G\alpha_{13}$ también dieron paso a su reconocimiento como oncogén (29, 30). Además de su demostrada capacidad transformante, la familia G12 está

relacionada con proliferación celular, generación de fibras de estrés, regulación de adhesiones focales relacionadas con RhoA y cambios de la forma celular (31).

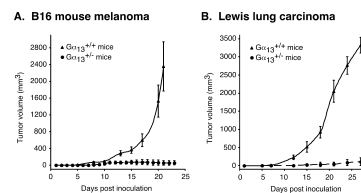
El potencial papel tumoral de la familia G12, dio paso a un creciente interés por conocer quienes eran los efectores que podían explicar los efectos observados. Esto llevó a la identificación de PDZ-RhoGEF (PRG, ARHGEF11), un RhoGEF que interacciona a través de su dominio RGS con $G\alpha_{13}$, dando como resultado el incremento de la actividad de RhoA (32). De la misma manera, p115-RhoGEF y LARG también fueron caracterizados como efectores directos de $G\alpha_{12}$ y $G\alpha_{13}$, compartiendo el mismo mecanismo de activación de PRG (31,33). Este grupo de GEFs es denominado como RGS-RhoGEFs, ya que comparten el mecanismo de activación a través del dominio RGS, lo que permite una regulación recíproca a través de interacciones directas con los miembros de la familia G12 de las proteínas G (figura 5).



Mikelis, et al. (2013) *J Biol Chem.* **288**, 12232-12243



Ruppel, et al. (2005) *PNAS.* **102**, 8281-8286



Chen, et al. (2009) *J Biol Chem.* **284**(40), 27409-27415

Figura 5. Los RGS-RhoGEFs como efectores de la familia G12. p115-RhoGEF, PDZ-RhoGEF (PRG) y LARG son efectores directos de la subunidad $G\alpha_{12}$ y $G\alpha_{13}$ de las proteínas G. La

interacción ocurre a través del dominio RGS que permite la activación de estos GEFs, pero que también actúa como un GAP que atenúa la señalización de la subunidad $G\alpha$. El trabajo de Mikelis (2013) demostró que la ausencia de PRG y LARG generan un fenotipo letal en ratones que se atribuye a defectos en la vasculatura. Ruppel (2005) por su parte demostró un fenotipo similar, pero como resultado de la ausencia de $G\alpha_{13}$. También en el trabajo descrito de Chen (2009), la pérdida de una de las copias de $G\alpha_{13}$ genera un menor crecimiento tumoral, lo cual conecta con el perfil oncogénico de la familia G12 y los RGS-RhoGEFs.

Similar a lo que ocurre con las subunidades $G\alpha_{12}$ y $G\alpha_{13}$, los RGS-RhoGEFs también poseen potencial transformante relacionado con su capacidad de activar RhoA (34). Adicionalmente, ratones modificados genéticamente evidencian la importancia de este grupo de RhoGEFs en diversos procesos. Por ejemplo, ratones deficientes en p115-RhoGEF (ARHGEF1) muestran defectos en la respuesta inmune y la motilidad de linfocitos, así como disfunción motora del tracto gastrointestinal (35). La deficiencia de PRG (ARHGEF11) aunque no tiene efectos relevantes sobre vías de RhoA en cultivo celular de fibroblastos, ratones deficientes de PRG presentan disminución en el desarrollo de tejido adiposo, así como resistencia al desarrollo de obesidad y diabetes tipo 2 como resultado de la dieta (36). La deficiencia de LARG (ARHGEF12) confiere resistencia a la hipertensión inducida por la sal (37). El silenciamiento conjunto de PRG y LARG provoca la muerte en etapas tempranas del desarrollo embrionario, muy probablemente por los defectos importantes en la vasculatura que se observan (38). Los antecedentes presentados sustentan la participación de los RhoGEFs en múltiples eventos celulares que afectan procesos angiogénicos, por tanto, es necesario comprender con mayor detalle su expresión, regulación y el papel que desempeñan como parte de las complejas vías y redes de señalización que son relevantes para el control del citoesqueleto de actina y las consecuencias funcionales.

2) JUSTIFICACIÓN

La angiogénesis es un proceso importante para el desarrollo y mantenimiento de un estado de salud óptimo. Sin embargo, existen condiciones de naturaleza patológica como el cáncer, donde la angiogénesis juega un papel fundamental que contribuye a su progresión, favoreciendo el crecimiento tumoral y la metástasis.

Las GTPasas de Rho juegan un papel importante para el desarrollo de la angiogénesis, promoviendo cambios del citoesqueleto de actina, migración y proliferación; sin embargo, estas proteínas no parecen presentar una actividad aberrante por sí solas, por lo que nuestro interés se enfoca en el estudio de las proteínas que regulan la actividad de las GTPasas.

Los RhoGEFs son los activadores directos de estas GTPasas, además su número mucho mayor comparado con las GTPasa que regulan, supone que su papel es fundamental en el control de la señalización de las GTPasas de Rho. Nuestro grupo reporta la expresión endotelial de 52 de 70 RhoGEFs con homología a Dbl, expresión que se ve alterada en ambientes tumorales. Es relevante identificar y estudiar con mayor profundidad RhoGEFs que muestran fenotipos compatibles con un potencial angiogénico. Comprender su contribución en eventos moleculares y celulares indispensables para la progresión de la angiogénesis.

Comprender mejor el conjunto de eventos moleculares y celulares involucrados durante el proceso angiogénico, así como el papel de las vías de señalización y las proteínas participantes; permitirá el desarrollo de mejores estrategias terapéuticas para el tratamiento de aquellas condiciones donde existe una desregulación de la angiogénesis. Se espera que la información generada contribuya a entender mejor el papel de los RhoGEFs, y ser considerados como atractivos blancos farmacológicos que permitan abordajes más eficaces y con el mínimo de efectos adversos.

3) HIPÓTESIS

La generación de versiones constitutivamente activas de un subgrupo de RhoGEFs, es una herramienta útil para identificar características novedosas sobre la regulación de las Rho GTPasas; así como para definir su participación y relevancia en eventos de naturaleza molecular y celular compatibles con migración y angiogénesis.

4) OBJETIVO GENERAL

Identificar, mediante una estrategia de ganancia de función, RhoGEFs capaces de proporcionar a una célula endotelial características moleculares y celulares compatibles con un potencial angiogénico, enfocando el análisis sobre un grupo de 20 RhoGEFs constitutivamente activos, diseñados a partir de la estructura de los RGS-RhoGEFs e intersectinas

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Generar y evaluar versiones constitutivamente activas de 20 RhoGEFs.
- b) Determinar su capacidad de originar eventos celulares y moleculares de naturaleza pro-angiogénica.
- c) Realizar un tamizaje y selección de los RhoGEFs que demuestren cambios morfológicos dependientes de estructuras de actina, los cuales puedan favorecer eventos angiogénicos.
- d) Identificar eventos moleculares diferenciales que puedan explicar el potencial angiogénico de los RhoGEFs que resulten los mejores candidatos respecto al resto de los miembros del grupo 2A.

5) ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

A continuación, se ilustra la estrategia experimental diseñada para alcanzar los objetivos y validar la hipótesis planteada para este proyecto doctoral.

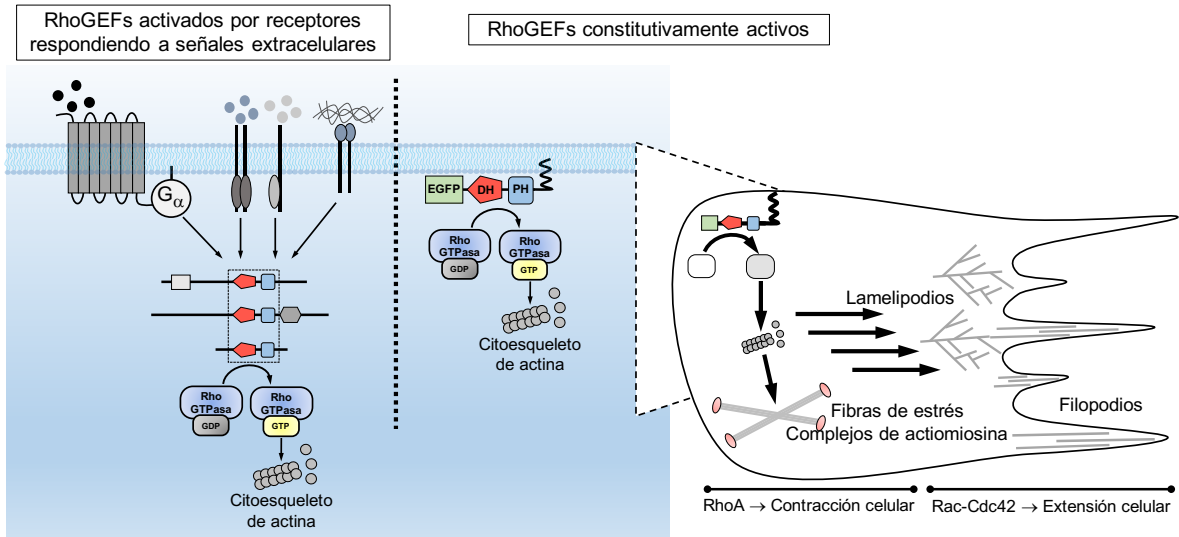


Figura 6. La estrategia experimental para abordar la hipótesis consistió en generar variantes constitutivamente activas de un grupo de RhoGEFs. A través de técnicas de biología molecular se realizó la clonación a un vector de expresión de la secuencia codificante del tándem DH/PH del RhoGEF en cuestión, además de una secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (EGFP). El plásmido generado fue transfectado a células de mamífero para estudiar por microscopía epifluorescente y confocal los efectos morfológicos generados en células endoteliales. Para determinar los efectos sobre la activación de GTPasas y otras vías de señalización, se recurrió a estrategias bioquímicas como la precipitación por afinidad mediante el uso de proteínas recombinantes, así como estrategias farmacológicas que se describen a continuación.

5.1 GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES

Un paso necesario desde el inicio y a lo largo del proyecto, fue la generación de diversas construcciones como herramientas imprescindibles para abordar muchas de las preguntas durante el desarrollo del trabajo. Algunas construcciones de los RhoGEFs constitutivamente activos habían sido previamente generadas y probadas como parte de mi tesis de maestría, otras durante el período del doctorado. En la tabla 1 se reportan las construcciones generadas y la secuencia de los primers utilizados para la amplificación de la secuencia de interés que posteriormente fue insertada en el vector de expresión.

Las secuencias codificantes para cada RhoGEFs fueron obtenidas y descargadas de las bases de datos públicas <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> y <http://smart.embl-heidelberg.de/>. La información fue utilizada para definir nuestras regiones de interés. El diseño de los primers (iniciadores) fue realizado con el programa BioEdit diseñado por Tom Hall de Ibis Bioscience y sintetizados por la compañía Sigma-Aldrich.

Construcción	Primers
EGFP-ARHGEF12-DH/PH	ataGGATCCTGTGAAATCAAAGACAGGAA ataCATATGCTTTGTGGATTGCTCCTTCAC
EGFP-ITSN1-DH/PH	ataGCTAGCACTGAAAGAAAGCGACAAGGA ataGAATTCTTTCAACTCGATGCCTTCAAC
EGFP-PLEKHG6-DH/PH	ataGGATCCGGGACAAGGAGATGAGCCAG ataCATATGGGACTCCCTGTCCTGGTCCCG
GST-ARHGEF11-DH/linker	ataGGATCCGATGCCCAAATTGGCAGCAT ataGAATTCTCATTTTCTGGTTGTAAGATCCAGGC
GST-ARHGEF11-Linker/PH	ataGGATCCGCGGTAAAACAAACAGAGAACCG ataGAATTCGTGCCTGGTGGCATTCCGCAC
GST-ARHGEF11-DH	ataGGATCCGATGCCCAAATTGGCAGCAT ataGAATTCTCATTACATTCACATACTTGAGAAT
GST-ARHGEF11-Linker	ataGGATCCGCGGTAAAACAAACAGAGAACCG ataGAATTCTCATTTTCTGGTTGTAAGATCCAGGC
GST-ARHGEF11-PH	ataGGATCCATGATCCATGAGGGACCCCTG ataGAATTCGTGCCTGGTGGCATTCCGCAC

Tabla 1. Primers diseñados para la amplificación de las regiones de interés de las construcciones generadas y utilizadas en este trabajo.

5.1.1 Amplificación de las secuencias

Las secuencias fueron amplificadas mediante la técnica de PCR. En la tabla 2 se indican los componentes y volúmenes utilizado para la mezcla de reacción

Componente	Volumen (μ l)
Cloruro de Magnesio (25 mM MgCl ₂) (Invitrogen)	4
Buffer 10X (Roche)	5
Dimetil sulfóxido (DMSO)	2.5

(Sigma)	
Betaina (Sigma)	2.5
dNTPs Mix (10 mM) (Invitrogen)	1
Primer 5' (10 μ M)	2.5
Primer 3' (10 μ M)	2.5
Oligo templado (10 ng/ μ l)	1
Enzima taq polimerasa (3.5 U/ μ l) (Roche)	0.5
Agua Inyectable (Pisa)	28.5

Tabla 2. Componentes y volúmenes utilizados para la reacción de PCR para amplificar la región de interés para las construcciones utilizadas.

Los componentes fueron colocados en tubos de PCR y estos introducidos en el termociclador previamente encendido (GeneAmp PCR System 9000 ((Applied Biosystems)) o Mastercycler Nexus GSX1 (Eppendorf)). Las condiciones de la PCR fueron las siguiente: 1) un ciclo de 30 s a 94 °C, 2) 25 ciclos de 94 °C por 30 s, 54 °C por 30 s y 75 °C por 90 s, 3) un ciclo de 75 °C por 5 minutos y finalizando con una temperatura de 4 °C hasta retirar los tubos del termociclador. Para verificar que el fragmento fue amplificado correctamente, los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa como se describe a continuación:

- 1) Para generar un gel con dureza de 1%, pesar 0.5 g de agarosa y agregar 50 ml de Buffer TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM Acetato y 2 mM EDTA). La agarosa se disuelve en el buffer con ayuda del horno de microondas.
- 2) Una vez que disuelta la agarosa, la mezcla se deja enfriar hasta que no genere vapores, en ese punto agregar 2 μ l de bromuro de etidio, mezclar hasta incorporar por completo el bromuro de etidio. Vaciar el contenido en un molde adecuado para la cámara de electroforesis y colocar el peine.
- 3) Cuando la agarosa gelifique por completo, retirar el peine y montar el gel con el molde en la cámara de electroforesis y agregar Buffer TAE 1X hasta cubrir por completo el gel.

- 4) Con una micropipeta tomar 5 μ l del producto de PCR, mezclar con 1 μ l de buffer de carga Clear Band (MTR Scientific) y colocar el volumen total en el pozo.
- 5) Después de cargar la última muestra, tomar 3 μ l de marcador GeneRuler 100 pb plus (Thermo Scientific) y cargar el primer pozo del gel.
- 6) Colocar la tapa de la cámara de electroforesis, conectar los cables correspondientes a la fuente de poder y encender para correr el gel a 70 mA por aproximadamente 30 minutos o hasta alcanzar la resolución deseada.
- 7) Finalizado el tiempo, apagar la fuente de poder, retirar el gel de la cámara de electroforesis y colocarlo en el sistema de documentación de geles (UVP). Ajustar las condiciones de visualización, encender la luz UV y capturar una fotografía para realizar el análisis de los productos de PCR.
- 8) Al finalizar, retirar el gel y depositarlo en los contenedores de desechos de bromuro de etidio, limpiar el equipo con alcohol al 70% y verificar su apagado.

5.1.2 Purificación, digestión y ligación

Una vez verificada la amplificación y el peso de la banda de acuerdo a la secuencia de interés, lo siguiente fue purificar el producto de PCR. Para lo cual se preparó un nuevo gel de agarosa al 1%, pero con un pozo de mayor tamaño que pueda contener los aproximadamente 45 μ l restantes de la reacción de PCR. Una vez corrido el gel y con la separación deseada se procedió a los siguiente:

- 1) Cortar la banda del fragmento de interés, visualizar con ayuda del transiluminador de UV e intentar eliminar la mayor cantidad posible de gel (cubrir la superficie del transiluminador con película de plástico para evitar rayones de la navaja, usar guantes y navaja exclusivos para geles con bromuro de etidio, exponer el menor tiempo posible a la UV el gel y limpiar con etanol al 70% el transiluminador y la navaja si se purifican fragmentos diferentes, para evitar alguna contaminación). Depositar el fragmento de gel resultante en un tubo eppendorf de 1.5 ml (pesar previamente el tubo).

- 2) Determinar el peso del fragmento de gel, por lo que al peso total del tubo con el fragmento de gel se le resta el peso del tubo.
- 3) Procesar el fragmento de gel de acuerdo al protocolo de extracción de gel (QIAquick Gel Extraction Kit Protocol) contenido en el manual adjunto del kit (Qiagen), por lo que se agregan 3 volúmenes de Buffer QG por cada volumen de gel.
- 4) Incubar el gel con el buffer a 50 °C por 10 minutos, haciendo uso cada 2 a 3 minutos durante la incubación, del agitador tipo vórtex para mezclar el contenido del tubo y facilitar la disolución del gel.
- 5) Una vez disuelto el gel en su totalidad, comprobar que el color de la mezcla sea amarillo, similar a la del Buffer QG. Si el color es amarillo, agregar un volumen de isopropanol por volumen de gel y mezclar.
- 6) Tomar una columna con tubo incluido en el kit y colocar en su totalidad la mezcla, centrifugar a 13 000 rpm por 1 minuto.
- 7) Eliminar el sobrenadante y agregar a la columna 0.5 ml de Buffer QG, centrifugar por un minuto a 13 000 rpm.
- 8) Descartar el sobrenadante y para lavar se agregan 0.75 ml de Buffer PE a la columna, centrifugar a 13 000 rpm por un minuto.
- 9) Eliminar nuevamente el sobrenadante y centrifugar un minuto adicional a 13 000 rpm.
- 10) Tomar un tubo eppendorf limpio donde se coloca la columna, se agregan 50 µl de agua estéril para eluir el ADN, dejar reposar por 5 minutos y centrifugar a 13 000 rpm por un minuto.
- 11) Por último, correr un gel de agarosa al 1% con los productos purificados para comprobar la correcta recuperación.

5.1.3 Digestión de los insertos y del vector pCEFL-EGFP-CAAX

Posterior a la purificación del producto de PCR y comprobada la recuperación del ADN que comprenden a las secuencias de nuestro interés, lo siguiente fue realizar la digestión de los insertos y del vector correspondiente, para lo cual se hizo uso de diferentes enzimas de restricción que permitieron cortar el ADN en

regiones específicas y así generar extremos complementarios que permitieron la ligación del inserto con el vector. La tabla 3 indica las diferentes enzimas de restricción (Roche) empleadas.

Una vez seleccionadas las enzimas de restricción para la digestión de cada fragmento dependiendo del RhoGEF, se procedió a elegir el buffer de digestión compatible con ambas enzimas. En caso de no ser compatibles ambas enzimas con alguno de los buffers, se realizó una digestión secuencial. Primero se digirió con una de las enzimas, posteriormente se realizó una purificación por columna y a continuación se llevó a cabo la segunda digestión. En un tubo eppendorf de 1.5 ml se mezclaron los componentes con los volúmenes indicados en la tabla 4. El tubo con los componentes mezclados fue incubado a 37 °C por 12-16 horas.

RhoGEF	Enzimas de restricción
p115-RhoGEF	5' NheI 3' EcoRI
PRG	5' BamHI 3' EcoRI
LARG	5' BamHI 3' NdeI
PLEKHG5	5' BamHI 3' EcoRI
PLEKHG6	5' BamHI 3' NdeI
ITSN1	5' NheI 3' EcoRI
ITSN2	5' NheI 3' EcoRI

Tabla 3. Enzimas de restricción empleadas para digerir los productos de PCR obtenidos y purificados correspondientes a la secuencia que codifica para la región de interés de cada una de las construcciones; esto con la finalidad de generar extremos complementarios entre vector y cada uno de los fragmentos a insertar, permitiendo con esto la ligación de ambos. BamHI (Roche, N°

Catálogo 13467124), EcoRI (Roche, N° Catálogo 13467720), NheI (Roche, N° Catálogo 11126023) y NdeI (Roche, N° Catálogo 11315721).

Componente	Volumen (μl)
Buffer Digestión 10 X	2
Agua estéril	1
Producto PCR o vector de expresión	16
Enzima restricción 5' (10 U/μl)	0.5
Enzima restricción 3' (10 U/μl)	0.5
Volumen total	20

Tabla 4. Lista y volúmenes de los componentes para la digestión de los insertos y vectores requeridos para las construcciones.

5.1.4 Purificación de los insertos y vector digeridos

Para la purificación de los insertos y vectores digeridos se recurrió al kit QIAquick PCR Purification (Qiagen), siguiendo el protocolo de purificación de productos de PCR descrito en el manual adjunto del kit, el cual permite la purificación de ADN de 70 pb a 10 kb. Los pasos fueron los siguientes:

- 1) Una vez concluido el tiempo de incubación de la digestión, adicionar 5 volúmenes de Buffer PB por volumen de mezcla de digestión y mezclar por pipeteo.
- 2) Tomar una columna del kit QIAquick junto con el tubo incluido y colocar el volumen total de la muestra, para luego centrifugar a 13 000 rpm por un minuto.
- 3) Eliminar el sobrenadante y adicionar a la columna 0.75 ml de buffer PE, centrifugar a 13 000 rpm por un minuto.
- 4) Decantar el sobrenadante y centrifugar nuevamente a 13 000 rpm por un minuto.

- 5) Tomar la columna y colocarla en un tubo eppendorf de 1.5 ml previamente marcado. Adicionar a la columna 50 μ l de agua estéril (agua inyectable PISA), dejar reposar 5 minutos y centrifugar a 13 000 rpm por un minuto.
- 6) Por último, correr un gel de agarosa al 1% con los productos purificados para comprobar su correcta recuperación tras el proceso de purificación.

5.1.5 Ligación

Una vez realizada la purificación de los insertos y vectores digeridos, lo siguiente fue generar la unión del inserto con el vector, a través de la reacción catalizada por la enzima ligasa que permite la formación de un enlace fosfodiéster. Para la ligación se mezclaron en un tubo de 0.2 ml los componentes indicados en la tabla 5. Se consideró de manera importante mantener una proporción mayor del inserto con respecto al vector (diluyendo aproximadamente 1:20 usando agua estéril).

Después de mezclar todos los componentes, se procedió a colocar los mismos en el termociclador GeneAmp PCR System 9000 (Applied Biosystems) o Mastercycler Nexus GSX1 (Eppendorf), manteniendo la temperatura a 16 ° C por 12 h, condiciones que favorecen la reacción de ligación.

Componente	Volumen (μ l)
Inserto	16
Vector digerido y diluido (1:20)	1
Buffer de ligación 10X	2
ADN ligasa (T4 (Roche))	1
Volumen total	20

Tabla 5. Componentes de la mezcla para la ligación

5.1.6 Transformación de bacterias DH5 α ultracompetentes y obtención de ADN plasmídico.

Concluido el tiempo de incubación de la reacción de ligación, el siguiente paso fue la transformación de bacterias ultra competentes *E. coli* DH5 α . Estas bacterias

permiten obtener nuestra construcción cuando la ligación ocurre, así como una mayor cantidad de ADN plasmídico que permite evaluar si el inserto fue ligado exitosamente al vector. Para este procedimiento se usan bacterias con una eficiencia de transformación de 10^8 ufc/ μ g (unidades formadoras de colonias por μ g). El proceso de transformación de las bacterias fue el siguiente:

- 1) Descongelar en hielo un vial de bacterias DH5 α que hayan demostrado ser ultra competentes (almacenadas en nitrógeno líquido), el vial toma aproximadamente 10-15 minutos en descongelarse.
- 2) Adicionar al vial 60 μ l de buffer TB por cada 200 μ l de bacterias, mezclar e incubar por 10 minutos; el buffer TB aumenta aún más la eficiencia de transformación.
- 3) En tubos eppendorf de 1.5 ml, previamente marcados para cada ligación, alicuotar 50 μ l de bacterias.
- 4) Adicionar 2 μ l de ligación al tubo con bacterias correspondiente, pipetear con suavidad para mezclar e incubar en hielo por 20 minutos.
- 5) Dar un choque térmico a 42 °C por un minuto.
- 6) Inmediato al choque térmico, incubar nuevamente en hielo por 10 minutos.
- 7) Al finalizar el tiempo de incubación en hielo, agregar 300 μ l de medio S.O.C. (medio LB + glucosa) e incubar los tubos en agitación constante (200 rpm) a 37 °C por una hora.
- 8) Centrifugar a 3 000 rpm por un minuto los tubos una vez concluido el tiempo de incubación.
- 9) Decantar el sobrenadante y resuspender las bacterias con 50 μ l de medio líquido súper broth con ampicilina (100 μ g/mL).
- 10) Tomar el volumen total contenido en el tubo y depositar sobre la superficie de placas de agar con ampicilina, distribuir homogéneamente las bacterias sobre toda la superficie del agar.
- 11) Incubar las placas de cultivo a 37 °C toda la noche (aproximadamente 18 horas).
- 12) A la mañana siguiente, revisar las placas en busca de colonias de bacterias; si no se encuentran colonias o éstas son muy pequeñas,

mantener las placas en la incubadora hasta la tarde, pero si las colonias ya tienen buen tamaño sacarlas de la incubadora y mantenerlas en la campana de bacterias si se pican ese mismo día, en otro caso guardarlas a 4 °C.

- 13) Seleccionar y picar las colonias con ayuda de asas bacteriológicas estériles y sembrar cada colonia en medio líquido super broth con ampicilina contenido en tubos estériles de 15 ml.
- 14) Incubar los tubos con agitación constante (200 rpm) a 37 °C por toda la noche, aproximadamente 16 horas.
- 15) Centrifugar los tubos a 2 500 rpm por 5 minutos, posteriormente decantar el sobrenadante.
- 16) Usar el kit QIAGEN QIAprep spin Miniprep (Sigma) para la extracción de ADN de naturaleza plasmídica del cultivo bacteriano (seguir instructivo anexo de la caja).
- 17) Una vez obtenido el ADN plasmídico es necesario determinar la concentración y calidad del mismo, por lo cual se requiere realizar una dilución 1:50 (4 µl de la muestra y 196 µl de agua estéril), y con el espectrofotómetro Biomate 3S (Thermo Scientific) medir la absorbancia de luz ultravioleta (260/280 nm). Se considera que un plásmido tiene una buena calidad cuando su cociente 260/280 es superior a 1.7 y se recomienda ajustar la concentración a volúmenes que sean cómodos de medir con micropipeta (evitar pipetear valores de 0.5 µl, por ejemplo)

5.1.7 Digestión diagnóstica de las construcciones

Tras obtener el ADN plasmídico de los cultivos de bacterias y para corroborar que el inserto tuvo una correcta ligación con el vector, fue necesario realizar una digestión diagnóstica, para lo cual un volumen del plásmido obtenido por miniprep fue digerido con una enzima o con alguna combinación de enzimas que tengan sitios de corte en el vector y flanqueen el inserto. La idea es visualizar por medio de un gel de agarosa, un fragmento que corresponde al inserto liberado por el

corte de las enzimas, en casos donde se encuentre vector vacío (sin inserto) la digestión no generaría dicho fragmento.

Para la digestión diagnóstica en un tubo eppendorf de 0.6 ml mezclamos los componentes indicados en la tabla 6, incubamos a 37 °C de 4 a 12 horas, aunque preferentemente toda la noche. Concluido el tiempo de incubación, el producto de digestión fue cargado en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, visualizamos el gel con el transiluminador para conocer si los fragmentos liberados corresponden con la banda esperadas de una ligación del inserto y el vector. Se recomienda en un carril del mismo gel cargar un volumen del vector digerido que hubiese restado del que fue preparado para la ligación con el inserto, esto como control y referencia al visualizar el gel.

Componente	Volumen (μl)
Buffer Digestión 10 X	1.5
ADN plasmídico (100-500 ng/ μ l)	13
Enzima(s) de restricción (10 U/ μ l)	0.5 c/u
Volumen total	15

Tabla 6. Lista y volúmenes de cada componente de la digestión diagnóstica del ADN plasmídico para validar si la ligación de vector e inserto ocurrió correctamente.

5.2 ESTUDIO DE ASPECTOS MORFOLÓGICOS Y COLOCALIZACIÓN POR MICROSCOPIA

Como se mencionó en la hipótesis y objetivos, mediante una estrategia de ganancia de función, buscamos identificar RhoGEFs que confieran características con potencial angiogénico, requiriendo de la participación de GTPasas de bajo peso molecular de la familia de Rho. Las Rho GTPasas como Cdc42, Rac1 y RhoA, generan estructuras de actina muy particulares que pueden ser visualizadas a través del marcaje con moléculas fluorescentes con afinidad por actina polimerizada y ayuda de un microscopio equipado con fluorescencia. Por

tanto, el primer acercamiento para evaluar el efecto de la expresión de las construcciones de RhoGEFs constitutivamente activos, fue a través del uso de técnicas de fluorescencia y microscopía que se detallan a continuación.

5.2.1 Cultivo celular

Para la microscopía recurrimos al uso de células endoteliales de aorta de porcino (PAE) y fibroblastos derivados de riñón de mono (COS-7). Estas líneas celulares fueron cultivadas en cajas Petri de 100 mm de diámetro con medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), mantenidas en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Las líneas celulares fueron resemebradas cada segundo o tercer día, evitando que lleguen a confluencia. El proceso de resiembra es el siguiente:

- 1) Retirar el medio DMEM del cultivo celular.
- 2) Lavar la caja con PBS 1X (Buffer salino de fosfatos).
- 3) Agregar 1 ml de tripsina-EDTA 1X (Sigma-Aldrich, 0.5 g de tripsina y 0.2 g de EDTA en 100 ml) y dejar actuar de 5 a 7 minutos en la incubadora.
- 4) Verificar al microscopio de que las células se han despegado de la caja y neutralizar la tripsina con 9 ml de medio DMEM suplementado con 10% de SFB, resuspender hasta separar y homogenizar las células.
- 5) Para experimentos de microscopía hicimos uso de cajas de 6 pozos donde se pipetea 1.5 ml de medio con suero y se inocula 250 µl de la suspensión celular.
- 6) Un stock de células de cada línea es mantenido en una caja de 100 mm con un volumen de 8.5 ml de medio con suero y 1.5 ml de la suspensión de células.

5.2.2 Transfección de las células

Las células PAE y/o COS7 fueron transfectadas por el método de Turbofect (Termo Fisher Scientific, R0532), el protocolo de transfección es el siguiente:

- 1) Revisar las células y que estas estén por debajo del 50% de confluencia.

- 2) Preparar y marcar tubos eppendorf de 1.5 ml estériles, adicionar el volumen de DMEM sin suplementar y sin antibióticos o antimicóticos, por cada pozo de la caja de 6 pozos o su equivalente caja p35, se requiere un volumen de 200 μ l de DMEM.
- 3) Agregar los plásmidos correspondientes y mezclar por vortex.
- 4) Adicionar el turbofect a la mezcla DMEM/plásmido, se requiere 3 μ l de reactivo turbofect por cada pozo de una caja de 6 pozos o su equivalente caja p35; mezclar por vortex e incubar por 15 minutos.
- 5) Durante el tiempo de incubación, retirar el DMEM de las células, lavar con 1 ml PBS 1X y adicionar 1.5 ml DMEM suplementado y con antibióticos y antimicóticos.
- 6) Concluido los 15 minutos de incubación, adicionar la mezcla gentilmente por pipeteo la mezcla de transfección al pozo correspondiente, homogenizar e incubar en una atmósfera de 5% CO₂ a 37 °C hasta la mañana siguiente.

5.2.3 Siembra de las células sobre un cubreobjeto, tinción con faloidina y montaje de la muestra

Al día siguiente de la transfección de las células PAE o COS7, están se despegan y resiembran sobre cubreobjetos como se describe a continuación:

- 1) Colocar cubreobjetos limpios en una caja de 6 pozos, cubrir por completo el cubreobjeto con alcohol al 70% y exponer a la luz UV por 15 minutos. Retirar el alcohol y hacer tres lavados con PBS 1X.
- 2) Cubrir cada cubreobjeto con gelatina estéril al 0.2% e incubar por 30 minutos, mantener en la incubadora.
- 3) Retirar la gelatina, hacer dos lavados con PBS 1X y adicionar 2 ml de medio DMEM.
- 4) Retirar el medio DMEM de las células transfectadas, hacer un lavado con PBS1X, adicionar 500 μ l de tripsina-EDTA 1X e incubar por 5-7 minutos.

- 5) Adicionar 1 ml de DMEM con SFB, homogenizar por pipeteo y sembrar sobre el cubreobjeto 200 ml de la suspensión de células. Homogenizar por movimientos suaves e incubar en una atmósfera de 5% CO₂ a 37 °C hasta la mañana siguiente.
- 6) Temprano por la mañana retirar el DMEM de las células, lavar 3 veces con PBS 1X e incubar con DMEM sin SFB o antibióticos.
- 7) Después de 12 horas de ayuno, retirar el DMEM, realizar 2 lavados con PBS 1X y agregar paraformaldehído al 4% (600 µl aproximadamente, asegurar que el cubreobjetos este completamente cubierto); incubar por 20 minutos.
- 8) Retirar el paraformaldehído y realizar 2 lavados con PBS 1X.
- 9) Permeabilizar con PBS-Tritón 0.5% e incubar 10 minutos.
- 10) Lavar 3 veces con PBS-Tritón 0.1% (cada lavado con duración de 1 minuto).
- 11) Teñir con faloidina (5 µl stock/200 µl PBS 1X) e incubar 20 minutos (mantener las cajas cubiertas con papel aluminio y trabajar con la menor cantidad de luz posible).
- 12) Lavar 3 veces con PBS-Tritón 0.1%.
- 13) Teñir con DAPI (diluido 1 µl/300 µl PBS 1X) e incubar un minuto.
- 14) Lavar 3 veces con PBS-Tritón 0.1%.
- 15) Limpiar portaobjetos con alcohol al 70%, marcar de acuerdo a las muestras a montar y colocar 10 µl de solución de montaje Vectashield (H-1000-10) en el centro donde se dejará caer el cubreobjetos; evitar mover el cubreobjetos una vez que entre en contacto con la solución de montaje.
- 16) Por último, sellar con esmalte de uñas transparente los bordes del cubreobjetos para evitar que se mueva y para preservar la muestra. Las laminillas se mantienen a 4 °C hasta su visualización en el microscopio.

5.2.4 Visualización de las muestras

La visualización y captura de imágenes de las muestras se hizo uso de un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse Ti-E con cámara DS-Qi1MC Nikon, capturando imágenes con el objetivo de aceite de inmersión 60X. Para la cuantificación de estructuras similares a filopodios y determinar colocación de proteínas fluorescente, recurrimos al microscopio confocal Leica TCS SP8 usando el objetivo de aceite de inmersión 63x1.4. Las imágenes fueron procesadas y analizadas con ayuda del software Fiji-ImageJ y el plugin Coloc2 para el análisis de colocación.

5.3 ENSAYOS DE PULL-DOWN (ACTIVACIÓN DE GTPASAS DE RHO, GEF ACTIVO Y PULL-DOWN DE GST)

La activación de GTPasas resultado de la expresión de los RhoGEFs constitutivamente activos, fue evaluado por medio de ensayos de purificación por afinidad (ensayos de pull-down), por lo que se generaron y usaron perlas de sefarosa asociadas a proteínas recombinantes, GST-Rhotekin para aislar la fracción de RhoA activo; GST-PAK-N para aislar la fracción de Rac1 y Cdc42 activos. Además, para validar la actividad de las construcciones de los RhoGEFs y confirmar su especificidad, se efectuaron ensayos de purificación por afinidad con el uso de Rho GTPasas libres de nucleótido Cdc42 (G15A), RhoA (G17A) y Rac1 (G15A) (39).

Otra variante del ensayo de pull-down que se realizó, fue el de GST que a diferencia de lo descrito en el párrafo anterior, las perlas de sefarosa usadas no tienen previamente asociada una proteína recombinante. En este ensayo, la proteína con el epítipo de GST es transfectada a las células por lo que el lisado es incubado con las perlas de glutatión-sefarosa, asociándose al momento de la incubación.

5.3.1 Cultivo celular

Para los ensayos de pull-down se recurrió a una línea celular de epitelio de riñón humano (HEK293T). Esta línea celular fue cultivada en cajas Petri de 100 mm de

diámetro, medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Las células HEK293T fueron sembradas cada segundo o tercer día, sin llegar a confluencia, el proceso de resiembra fue el siguiente:

- 1) Retirar el medio DMEM del cultivo celular.
- 2) Lavar la caja con PBS 1X (buffer salino de fosfatos).
- 3) Agregar 1 ml de tripsina-EDTA 1X y dejar actuar por 5 minutos en la incubadora.
- 4) Verificar al microscopio de que las células se han despegado de la caja y neutralizar la tripsina con 9 ml de medio DMEM suplementado con 10% de SFB, resuspender hasta separar y homogenizar las células.
- 5) Para experimentos de pull-down de GTPasa activa y GEF activo se hace uso de cajas de 100 mm donde se pipetea 8 ml de DMEM con SFB y se inocula 2.5 ml de la suspensión de células. Para los experimentos de pull-down de GST se hace uso de cajas de 6 pozos (o su equivalente p35) donde se agrega un volumen de 2 ml de DMEM con SFB y un inóculo de 350 µl de la suspensión de células.
- 6) Se siembra una caja de 100 mm con un volumen de 10 ml de medio con suero y 1.5 ml de la suspensión de células para mantener un stock de células de la línea HEK293T.

5.3.2 Transfección celular

Las células HEK293T son transfectadas por el método de Lipofectamina-PLUS (Invitrogen, 18324010 y 11514015) o Turbofect (Termo Fisher Scientific, R0532). El protocolo de transfección con Lipofectamina-PLUS para cajas de 100 mm es el siguiente:

- 1) Preparar reactivo PLUS en un tubo de polipropileno dependiendo del número de cajas. Tomando 0.75 ml de medio DMEM sin suero más 10 µl de PLUS por caja. Si hay algún ADN común para todas las cajas agregarlo en este punto. Agitar e incubar 15 minutos.

- 2) Preparar el reactivo lipofectamina en un tubo de polipropileno dependiendo del número de cajas. Mezclar 0.75 ml de medio DMEM sin suero más 12 μ l lipofectamina por caja. Agitar e incubar 15 minutos.
- 3) Alicuotar el medio que contiene PLUS, 760 μ l por tubo. Adicionar un máximo de 4 μ g de plásmido por tubo. Agitar e incubar 15 minutos.
- 4) Agregar 762 μ l de la solución de lipofectamina a los tubos con PLUS y plásmido. Agitar e incubar 15 minutos.
- 5) Preparar células. Marcar las cajas en la parte inferior, lavar con 3 ml de PBS 1X, retirar y agregar 5 ml de medio DMEM sin suero y sin antibióticos.
- 6) Agregar por decantación la mezcla de plásmido, lipofectamina y PLUS a cada caja. Incubar con 5% CO₂ a 37 °C por 5 horas.
- 7) Pasado ese tiempo, retirar la mezcla de transfección y agregar 10 ml de medio DMEM suplementado con 10% de SFB, incubar en una atmósfera de 5% CO₂ a 37 °C. Las células son procesadas 48 horas después de la transfección.

El protocolo de transfección con Turbofect para cajas de 6 pozos es el siguiente:

- 1) Revisar las células, que estas no tengan más del 70% de confluencia.
- 2) Preparar y marcar tubos eppendorf de 1.5 ml estériles, adicionar el volumen de DMEM sin suplementar y sin antibióticos o antimicóticos, por cada pozo de una caja de 6 pozos o su equivalente caja p35 se requiere un volumen de 200 μ l de DMEM.
- 3) Agregar los plásmidos correspondientes y mezclar por vortex.
- 4) Adicionar el turbofect a la mezcla DMEM/plásmidos, se requiere 3 μ l de reactivo turbofect por cada pozo de una caja de 6 pozos o su equivalente caja p35, mezclar por vortex e incubar por 15 minutos.
- 5) Durante el tiempo de incubación, retirar el DMEM de las células, lavar con 2 ml PBS 1X, retirar y adicionar 1.5 ml DMEM suplementado con antibióticos y antimicóticos.

- 6) Concluido el tiempo de 15 minutos de incubación, adicionar gentilmente por pipeteo la mezcla de transfección al pozo correspondiente, homogenizar e incubar en una atmósfera de 5% CO₂ a 37 °C hasta la mañana siguiente para cambiar el medio si es necesario.

5.3.3 Ensayos de pull-down de GTPasa activa y GEF activo

El protocolo seguido para el procesamiento y purificación de la fracción activa de las GTPasa de Rho y del GEF activo fue el siguiente:

- 1) La noche previa al procesamiento de las células transfectadas, ayunar las células, primero realizar 3 lavados con PBS 1X, después adicionar 10 ml de DMEM libre de SFB. Planear un ayuno de 16 horas para que al momento de lisar las células se hayan cumplido 48 horas de su transfección.
- 2) A la mañana siguiente, alistar los tubos eppendorf de 1.5 ml. Encender la centrifuga refrigerada y esperar que llegue a 4 °C antes de lisar las células. Enfriar PBS 1X y buffer de lisis de tritón X-100 1X. El buffer de lisis debe de contener inhibidores de proteasas y fosfatasas (aprotinina 10 µg/mL, leupeptina 10 µg/mL, PMSF 1 µM, β-glicerolfosfato 1 mM, NaF 1 mM y ortovanadato de sodio 1 mM), así como MgCl₂ (10 mM) que es importante para el pull-down de GTPasas activas, no es requerido para el de captura de GEF activo. Sacar del congelador las perlas para que se vayan descongelando. Mantener todo en hielo.
- 3) Preparar una bandeja o hielera con espacio suficiente para las cajas que serán lisadas, colocar las cajas sobre hielo, retirar el medio y lavar con 2 ml de PBS 1X frío.
- 4) Agregar 1 ml de buffer de lisis frío con inhibidores, asegurar de cubrir toda la superficie de la caja y esperar 5 minutos.
- 5) Con un gendarme raspar la superficie de las cajas, resuspender el lisado con ayuda de la micropipeta y transferir a los tubos eppendorf de 1.5 ml; centrifugar a 13 000 rpm a 4 °C por 10 minutos.

- 6) Mientras las muestras se centrifugan, colocar en hielo los tubos eppendorf marcados para el pull-down y adicionar 30 μ l de las perlas de GST-PAK-N o GST-Rothekin, según sea el caso.
- 7) De las muestras centrifugadas, tomar 75 μ l y transferir a un tubo marcados como LT (lisado total), mezclar con 25 μ l de buffer de muestra Laemmli 4X con β -mercaptoetanol.
- 8) El resto de la muestra centrifugada se divide en 3 volúmenes iguales y se pipetea cada uno de los volúmenes al tubo que corresponde, dos tubos con perlas de GST-PAK-N y un tubo con perlas de GST-Rothekin. Adicionar 250 μ l de buffer de lisis a cada tubo, esto para tener un volumen adecuado que permita una mejor incubación con las perlas. Acomodar los tubos en un flotador y colocar el flotador en hielo de manera que los tubos queden en posición horizontal; incubar por 45 minutos en agitación constante y vigorosa.
- 9) Unos minutos antes de concluir el tiempo de incubación, preparar los tubos para el pull-down de GEF activo y colocar en cada tubo correspondiente un volumen de 30 μ l de perlas de GST-Cdc42 G15A, GST-Rac1 G15A ó GST-RhoA G17A según sea el caso.
- 10) Al finalizar el tiempo de incubación, centrifugar los tubos a 6 000 rpm a 4 °C por 1 minuto, recuperar el sobrenadante sin tomar las perlas, mezclar el sobrenadante de los tres tubos y dividir éste en 3 volúmenes iguales para ser pipeteado en cada uno de los tubos para el pull-down de GEF activo. Incubar estos tubos de la misma manera que se describió previamente.
- 11) Mientras el ensayo de GEF activo se incuba, realizar el lavado de las perlas del pull-down de GTPasa activa, pipetear 1 ml de buffer de lisis con inhibidores y $MgCl_2$, mezclar por vortex, centrifugar a 6 000 rpm a 4 °C por 1 minuto, retirar el sobrenadante sin llevarse las perlas. Repetir el lavado dos veces más. Después del último lavado, adicionar a las perlas 30 μ l de buffer de muestra 1X (diluir el buffer de muestra Laemmli 4X con β -mercaptoetanol con agua inyectable Pisa).

- 12) Cuando acaba el tiempo de incubación del pull-down de GEF activo, centrifugar los tubos a 6 000 rpm a 4 °C por 1 minuto, desechar el sobrenadante y lavar como se señala en el paso 11.
- 13) Mezclar con vortex los tubos que contienen muestras, centrifugar brevemente y hervir las muestras por 5 minutos, cuidar que los tubos no se destapen. Por último, centrifugar los tubos a 13 000 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos. Las muestras pueden ser cargadas en geles de acrilamida ese mismo día, pero en caso de analizar las muestras en otra fecha, congelarlas a -20 °C hasta su uso.

Para los ensayos de pull-down de GST se siguió el protocolo descrito anteriormente. Los únicos cambios son que el buffer de lisis no necesita de $MgCl_2$ y las perlas de glutatión-sefarosa no contienen proteína recombinante previamente cargada, el volumen de sefarosa usado por tubo fue de 25 μ l y el tiempo de incubación fue de 1 hora.

5.3.4 Western Blot

Las muestras del pull-down de GTPasa activa y de GEF activo, fueron analizadas por medio de western blot. Lo cual involucra la separación de las proteínas por electroforesis de SDS-PAGE, transferencia a una membrana PVDF, incubación con anticuerpos y revelado en placa por quimioluminiscencia. El protocolo seguido es el siguiente:

- 1) Preparar y correr geles de poliacrilamida al 12% para el pull-down de GTPasa activa y al 10% para el pull-down de GEF activo, cargar las muestras en los pozos y realizar la electroforesis a 100-120 mV.
- 2) Una vez obtenida la separación deseada de los marcadores de peso molecular y muestras, realizar la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (Millipore, IPVH00010). Las condiciones de la transferencia son 2.5 horas a 320 mA.
- 3) Al finalizar la transferencia, recuperar la membrana de PVDF, hacer un lavado con agua bidestilada, un lavado con TBS-tween 0.05% e incubar 1

hora en leche sin grasa al 5% usando TBS-Tween 0.05%, mantener en agitación constante.

- 4) Concluida la hora, desechar la leche, enjuagar con TBS-tween 0.05% para eliminar los residuos de leche y realizar tres lavados de 5 minutos con TBS-tween 0.05% usando agitación constante.
- 5) Diluir en TBS-tween 0.05% el anticuerpo primario a la dilución recomendada, alguna veces la dilución se debe ajustar debendiendo de la señal obtenida (tabla 7).
- 6) Adicionar a cada membrana el anticuerpo diluido que corresponda e incubar a 4 °C con agitación constante durante toda la noche.
- 7) A la mañana siguiente recuperar y guardar a -20 °C el anticuerpo usado en cada membrana, enjuagar una vez con TBS-tween 0.05% para eliminar el exceso de anticuerpo y realizar tres lavados con TBS-Tween 0.05% por 5 minutos y agitación constante.
- 8) Diluir el anticuerpo secundario (anti-ratón o anti-conejo) en leche libre de grasa al 5% usando TBS-tween 0.05% e incubar con agitación durante 1 hora. Ver dilución recomendada de acuerdo al anticuerpo primario (tabla 7).
- 9) Terminada la hora, retirar el anticuerpo secundario, enjuagar rápidamente con TBS-Tween 0.05% y realizar 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-tween 0.05%. Mantener las membranas en TBS 1X sin tween si el revelado no se realiza al momento.

Anticuerpo Primario	Compañía y # Catálogo	Dilución	Secundario y dilución
Cdc42	Santa Cruz, SC-87	1:5000	Ratón 1:10000
Rac1	Santa Cruz, SC-217	1:20000	Ratón 1:20000
RhoA	Santa Cruz, SC-418	1:10000	Ratón 1:10000
GFP	Santa Cruz, SC-9996	1:20000	Ratón 1:20000
GST	Santa Cruz, SC-138	1:10000	Ratón 1:15000
HA	Covance, MMS-101R	1:10000	Ratón 1:15000
ARHGEF11 (PRG)	Atlas Antibodies,	1:50000	Conejo 1:10000

	HPA014658		
PKAS	CST, #9624	1:5000	Conejo 1:10000
CREB	CST, #9197	1:5000	Conejo 1:10000
pCREB	CST, #9198	1:5000	Conejo 1:10000

Tabla 7. Información de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para western blot.

5.3.5 Revelado

Las membranas fueron reveladas usando el sustrato quimioluminiscente HRP (Millipore, P36599) y posterior exposición a una placa radiográfica. El proceso seguido es el siguiente:

- 1) Realizar una mezcla 1:1 (vol/vol) de sustrato luminol y solución de peróxido de kit Immobilon Western (Millipore) y bañar la membrana durante 1 minuto.
- 2) Eliminar el exceso de mezcla de la membrana con ayuda de un papel absorbente, cubrir la membrana con película plástica y colocar en un cassette para radiografía.
- 3) Dirigirse al cuarto oscuro, tomar una placa para rayos X (Agfa-Gevaert), cortar la placa si es necesario y exponer a diferentes tiempos dependiendo de la intensidad de la luminiscencia, se recomienda una primera exposición de contacto (colocar y retirar inmediatamente la placa), posterior a eso 5 s, 15 s, 30 s, 1 minuto y 2 minutos. Dependiendo de la señal, se pueden requerir de exposiciones más cortas o largas.
- 4) Revelar la placa usando por medio del uso del revelador y el fijador.
- 5) Dejar secar las placas reveladas y marcar los pesos de acuerdo al marcador de peso en kDa.
- 6) Pegar las placas en una hoja de papel y marcar los datos de cada carril, así como registrar las condiciones de incubación de anticuerpos y revelado.

5.4 ENSAYO DE AISLAMIENTO DE MEMBRANAS

El aislamiento de las membranas de células PAE y HT29 se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

- 1) Ayunar durante 16 horas las células PAE o HT-29 confluentes que fueron sembradas en cajas de 100 mm; realizar tres lavados con PBS 1X y adicionar 10 ml de DMEM sin SFB.
- 2) A la mañana siguiente, preparar todos los reactivos necesarios y estimular las células PAE con Prostaglandina E2 1 μ M o para el caso de las HT29 con Butaprost 1 μ M.
- 3) Después de la estimulación, lavar las células con PBS 1X frío y adicionar 1 ml de PBS 1X que contenga inhibidores de proteasas y fosfatasa (usar la concentración previamente señalada) .
- 4) Resuspender las células y realizar tres ciclos de congelamiento/descongelamiento usando nitrógeno líquido y agua a 37 °C.
- 5) Centrifugar a 1,400 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
- 6) Recuperar inmediatamente el sobrenadante y centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
- 7) Recuperar el sobrenadante que contiene la fracción citosólica y adicionar buffer de muestra laemmli 4X.
- 8) Lavar una vez con PBS 1X frío el botón que contiene la fracción de membranas y centrifugar a 13,000 rpm por 10 minutos a 4 °C.
- 9) Eliminar el PBS 1X, al botón de la fracción de membranas adicionar 250 μ l de buffer de lisis que contenga 1% de Tritón-X100, incubar en hielo por 20 minutos y centrifugar a 13,000 rpm por 10 minutos a 4 °C.
- 10) Recuperar el sobrenadante con las membranas solubilizadas y adicionar buffer de muestra laemmli 4X.
- 11) Mezclar con vortex todos los tubos que contienen muestras, centrifugar brevemente y hervir las muestras por 5 minutos cuidando que no se destapen los tubos. Por último, centrifugar los tubos a 13 000 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos. En este punto, las muestras pueden ser cargadas en geles de acrilamida ese mismo día. En caso de analizar las muestras en otra fecha, éstas deben de ser congeladas hasta su uso. El protocolo de wester blot es el mismo previamente descrito.

5.5 CUANTIFICACIÓN DE BANDAS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las placas de western blot fueron escaneadas al menos con 300 dpi y cuantificadas por medio del software ImageJ. Los datos fueron copiados y normalizados en el programa Microsoft Excel. El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con ayuda del programa GraphPad Prism8. Los detalles del análisis estadístico aplicado a los experimentos se describen en los pies de cada figura.

El análisis de las imágenes del confocal fue hecho con el software Fiji y el análisis de colocalización por medio del plugin Coloc2.

6) RESULTADOS

El primer paso para identificar y estudiar el papel de un grupo de 20 RhoGEFs, donde encontramos GEFs para Cdc42 como son las intersectinas (ITSNs) y otros específicos de RhoA como los RGS-RhoGEFs, fue obtener versiones constitutivamente activas de cada uno de los 20 candidatos e ir evaluando su capacidad de activar GTPasas de la familia de Rho. En la figura 7 se indican algunos candidatos seleccionados, que fueron evaluados con estrategias de microscopía y bioquímicas; lo cual permitió un primer tamizaje que sirvió para seleccionar RhoGEFs interesantes. Aquellos seleccionados fueron estudiados con mayor profundidad y detalle como se describe a continuación.

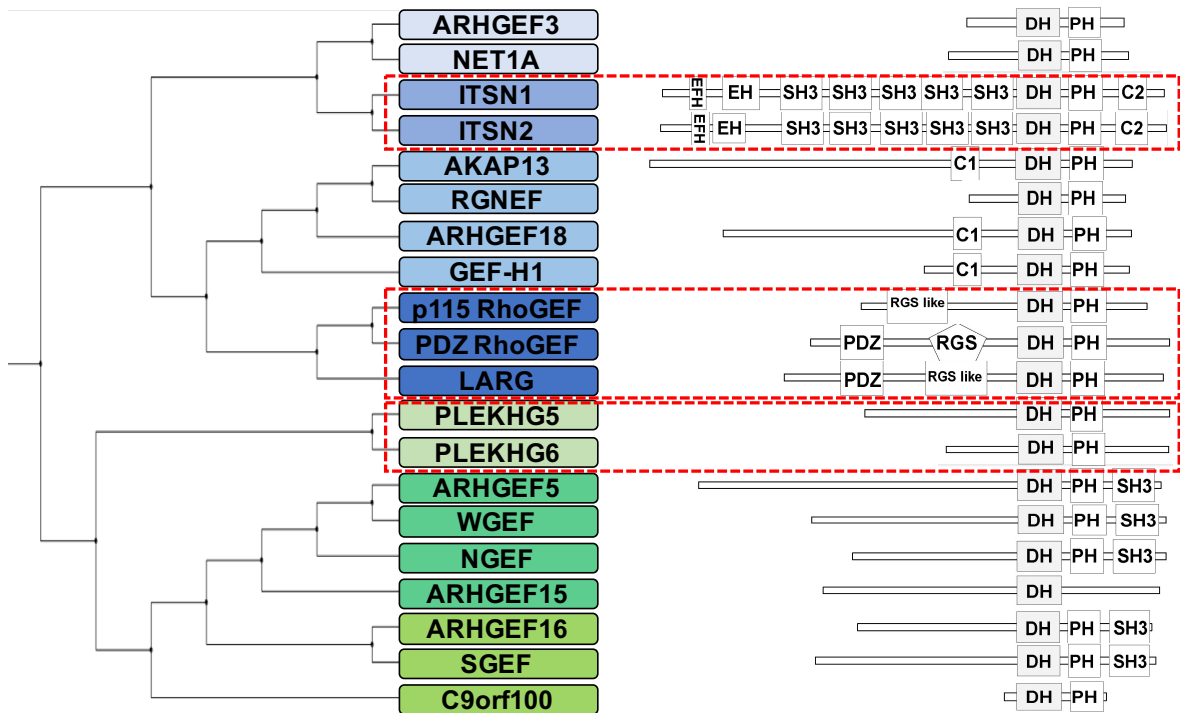


Figura 7. Representación de la cercanía filogenética basada en el dominio de homología a *Dbl*. Se muestra la estructura de cada uno de los 20 RhoGEFs seleccionados inicialmente, estos fueron candidatos a estudiar como posibles promotores de eventos proangiogénicos, resultado de su capacidad de activar GTPasas de la familia de Rho. En un recuadro rojo se señalan los RhoGEFs que de acuerdo a datos prelimiares mostraron una buena expresión en células HEK293T; además, con base en datos reportados previamente, estos miembros resultaron de particular interés por la especificidad por ciertas GTPasas de la familia de Rho.

6.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE EGFP-RHOGEFs-DH/PH-CAAX EXPRESADOS EN CÉLULAS PAE.

Como se ha mencionado anteriormente, se espera que los RhoGEFs en una versión constitutivamente activa sean capaces de generar estructuras dependientes de la polimerización de actina (fibras de estrés, lamelipodios y/o filopodios) y que estos cambios sean compatibles con un fenotipo proangiogénico. Por lo anterior, el primer aspecto que se consideró fue demostrar que las construcciones DH/PH de los RhoGEFs alteran la morfología celular. Por lo que en células de aorta porcina (PAE) expresamos por transfección a las construcciones obtenidas. Con ayuda de la proteína EGFP fusionada a las construcciones y la tinción de la actina polimerizada, observamos y analizamos los cambios morfológicos promovidos por estas construcciones constitutivamente activas.

En la figura 8 las imágenes superiores muestran la expresión en células PAE de las construcciones EGFP-ITSN1-DH/PH-CAAX y EGFP-ITSN2-DH/PH-CAAX comparadas con células control expresando EGFP-CAAX. En las imágenes inferiores se tiene una ampliación de la región marcada donde se observan con detalles las diferencias entre células control y células expresando las construcciones. Destaca el hecho de que la expresión de ITSN1-DH/PH e ITSN2-DH/PH generó la aparición de delgadas proyecciones de la membrana plasmática positivas a actina polimerizada, concordando con la descripción de filopodios, lo cual no es observable con las células EGFP-CAAX.

Los filopodios son estructuras dependientes de la GTPasa Cdc42, por lo que era esperable que construcciones constitutivamente activas de las intersectinas (RhoGEFs para Cdc42) dieran lugar a filopodios (9).

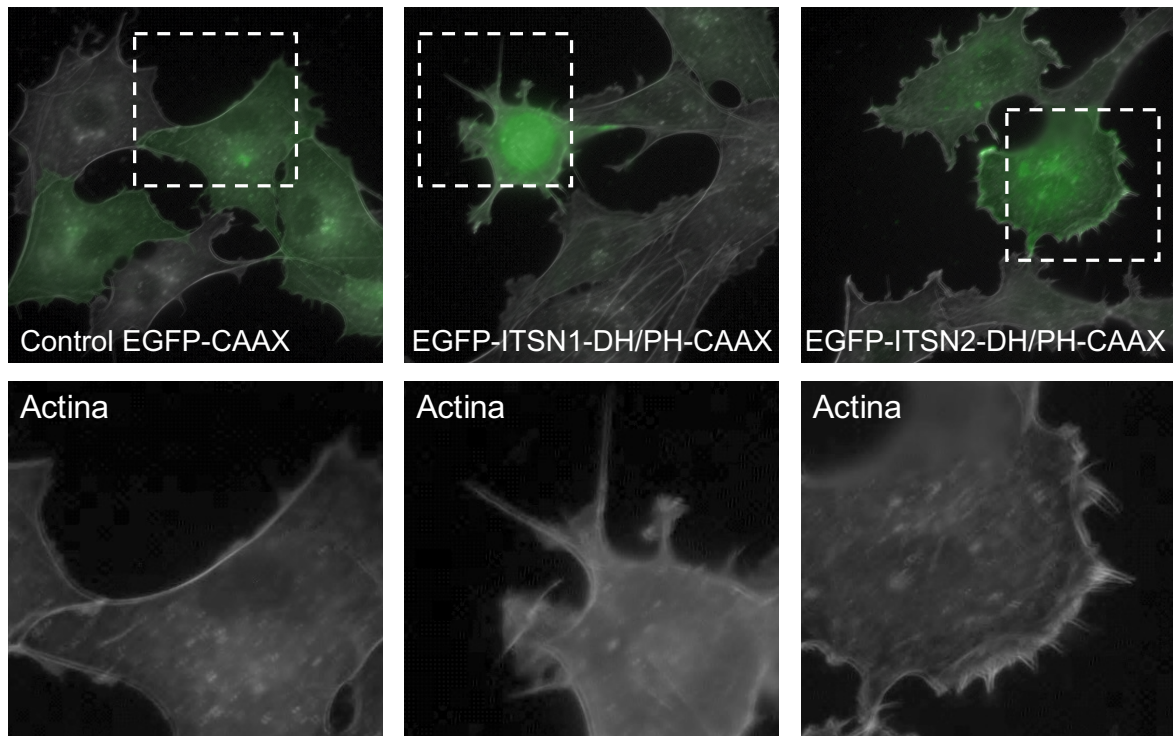


Figura 8. Expresión de las construcciones DH/PH de las intersectinas. En la imagen superior izquierda se muestra células PAE expresando la proteína verde fluorescente prenilada (células verdes), lo cual no alteró la morfología celular, puesto que células vecinas no verdes lucen similares. Las imágenes superior del centro y la derecha muestran células que expresaron las construcciones constitutivamente activas de ITSN1 e ITSN2, en ambos casos fue posible documentar la presencia de delgadas proyecciones de la membrana plásmatica que contienen actina polimerizada, fenotipo asociado a la activación de la GTPasa Cdc42.

EGFP-PLEKHG5-DH/PH-CAAX y EGFP-PLEKHG6-DH/PH-CAAX fueron otras dos construcciones que fueron expresadas y analizadas. Estos GEFs son reportados como activadores de la GTPasa RhoA, pero también se tiene algunos reportes de la participación de PLEKHG5 en la regulación de Rab26, GTPasa ligada al tráfico vesicular; mientras que PLEKHG6 es ligado a la activación de RhoG (16). Las células transfectadas con el DH/PH de PLEKHG5 o de PLEKHG6, mostraron protuberancias ondulares a lo largo de la periferia celular, similares a lamelipodios; por lo que nos hizo pensar en una posible activación de Rac1, GTPasa responsable de este tipo de estructuras de actina. Las células EGFP-CAAX control no mostraron cambios en su morfología (figura 9).

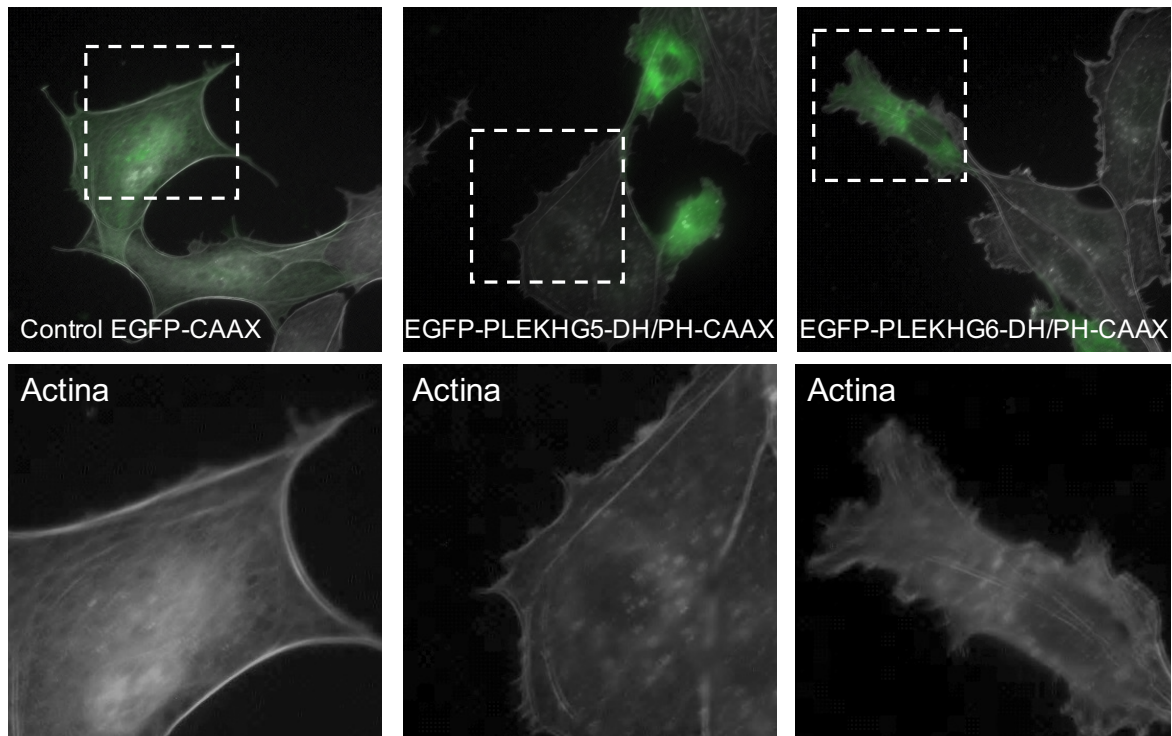


Figura 9. Expresión de las construcciones DH/PH de los PLEKHG. En la imagen superior izquierda se muestran células PAE control que expresan la proteína verde fluorescente prenilada, las cuales no sufrieron cambios morfológicos. Las imágenes superior del centro y de la derecha, muestran una periferia celular muy diferente al de células control, observamos protuberancias de la membrana de aspecto ondulado, probablemente relacionado a la activación la GTPasa Rac.

Resultado de la expresión de las construcciones DH/PH de los RGS-RhoGEFs (p115, PRG y LARG), encontramos la formación de fibras de estrés, las cuales se generan como resultado de RhoA activo; a su vez, estas fibras de estrés favorecieron eventos contráctiles de las células, con la consecuente disminución del área y redondeo de la célula (figura 10).

Aunque las tres construcciones generaron fibras de estrés, observamos un menor efecto de EGFP-p115-DH/PH-CAAX; puesto que la cantidad de fibras de estrés que mostraron las células transfectadas con EGFP-PRG-DH/PH-CAAX y EGFP-LARG-DH/PH-CAAX fue mucho mayor, por lo que las células casi adquirieron una forma circular; sin embargo, algo que resultó muy llamativo e inesperado, fue la presencia de estructuras similares a filopodios en un alto número de células que expresaron la construcción DH/PH de PRG (figura 10). Conociendo las limitaciones de la microscopía epifluorescente y para confirmar las

estructuras observadas, con particular interés en PRG, se recurrió a un microscopio confocal para obtener imágenes más nítidas que permitieron confirmar lo observado, como a continuación se describe (figura 11).

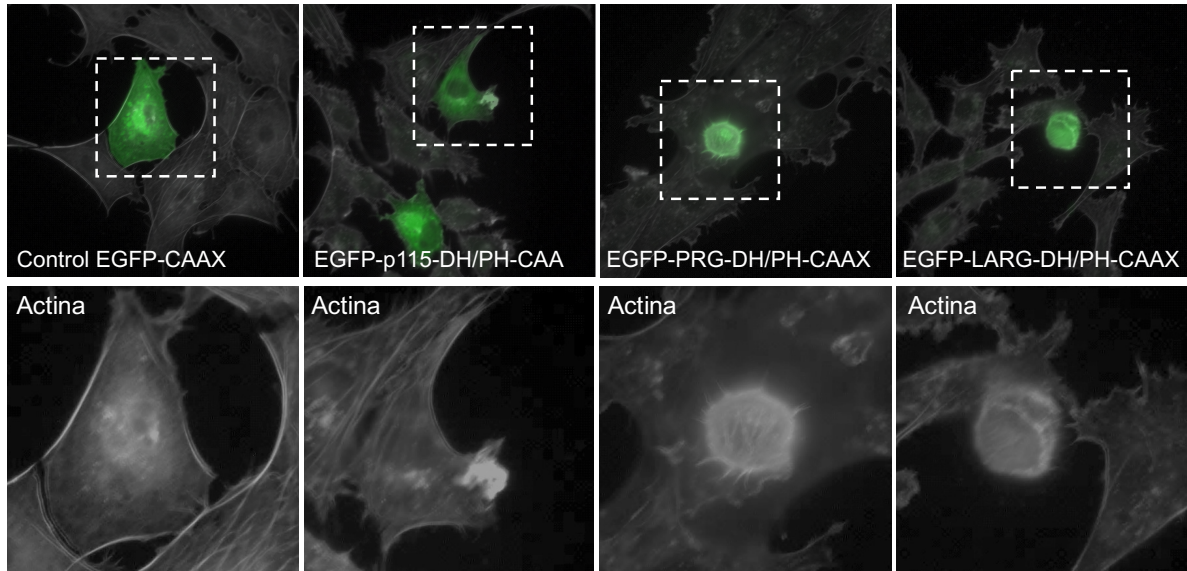


Figura 10. Expresión de las construcciones DH/PH de los RGS-RhoGEFs. La imagen superior izquierda muestra una célula PAE control con EGFP-CAAX, la cual no sufrió cambios en su morfología. El resto de las imágenes superiores corresponden a células transfectadas con las versiones activas de p115, PRG y LARG. Los efectos de PRG y LARG fueron más pronunciados al generar una cantidad de fibras de estrés que llevaron a un redondeo de las células. Pero lo que verdaderamente resultó interesante, fue el hecho de que PRG DH/PH también generó estructuras similares a filopodios en un alto número de las células positivas a EGFP.

El análisis por microscopía confocal de células PAE expresando los DH/PH de los RGS-RhoGEFs se muestra en la figura 11A. La expresión del plásmido control no produjo alteraciones en las células transfectadas. Las células expresando la construcción EGFP-p115-DH/PH-CAAX tuvieron un incremento en el número y grosor de las fibras de estrés, además de una marcada presencia de estructuras de actina compatibles con lamelipodios, algo que concuerda con un reporte de que este RhoGEF puede activar a la GTPasa Rac (40). EGFP-PRG-DH/PH-CAAX, así como EGFP-LARG-DH/PH-CAAX provocaron un efecto contráctil suficiente para disminuir de forma notable el área de las células y darle una forma redonda a un alto porcentaje de las células.

La expresión del DH/PH de LARG también incremento de manera destacable la presencia de protuberancias redondas de la membrana celular similares a burbujas, denominadas *blebs*, las cuales son resultado de una marcado efecto de la contracción de las células y que es caracterizado como un mecanismo de invasión (41).

Sin embargo, lo más interesante fue que EGFP-PRG-DH/PH-CAAX produjo estructuras de actina similares a filopodios en aproximadamente el 50% de las células positiva a EGFP (figura 11B). Estos resultados coinciden con lo descrito previamente en la figura 10, por lo que se consideró la posibilidad de que PRG no solo estaba activando a RhoA, sino que también podría estar activando a Cdc42 y eso explicará las estructuras observadas cuando PRG-DH/PH fue expresado.

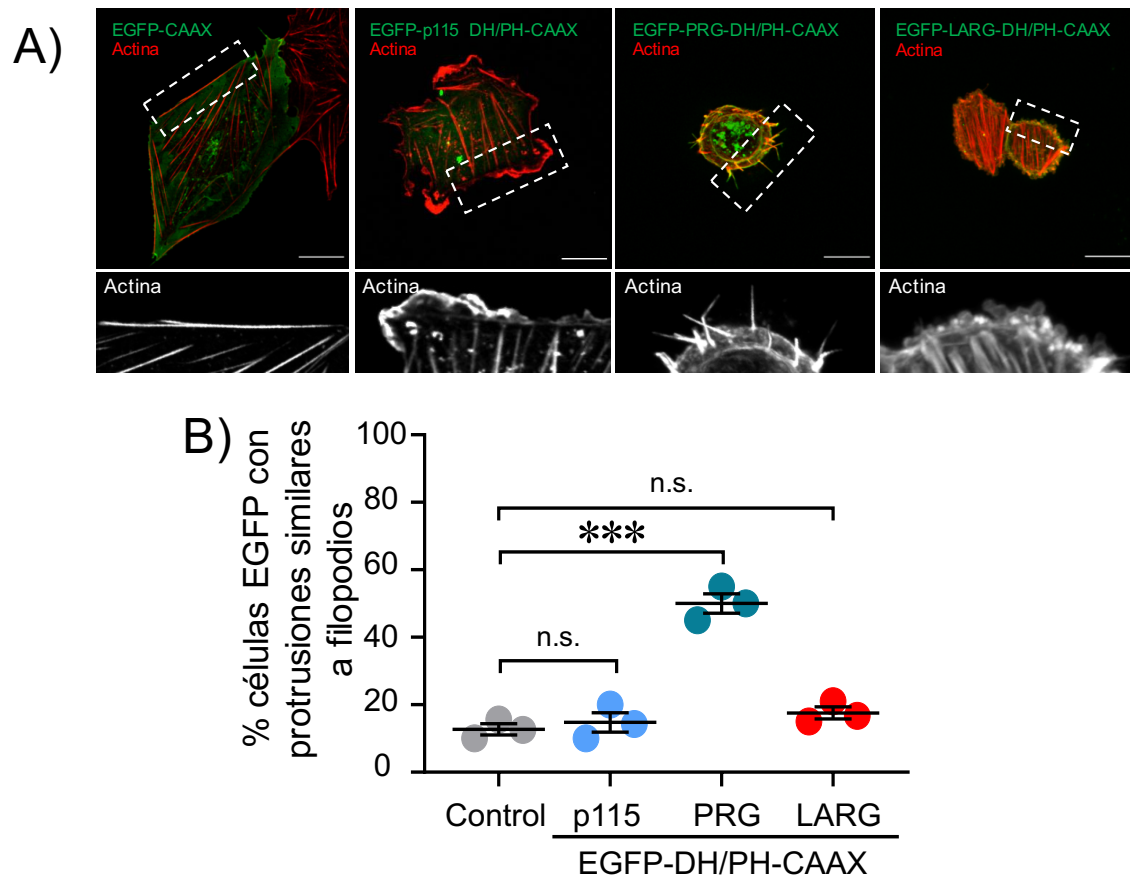


Figura 11. PRG DH/PH genera estructuras similares a filopodios en células PAE. A) Las imágenes superiores corresponden a células PAE expresando la proteína EGFP localizada en la membrana celular o alguna de las construcciones de los RGS-RhoGEFs fusionados con la proteína EGFP y localizados en la membrana celular. Las células control con EGFP-CAAX no

sufrieron cambios en la organización del citoesqueleto de actina. EGFP-p115-DH/PH-CAAX por el contrario generó un incremento en las fibras de estrés y en el grosor de las mismas, así como estructuras compatibles con lamelipodios. EGFP-PRG-DH/PH-CAAX y EGFP-LARG-DH/PH-CAAX produjeron una contracción de la célula como resultado del alto número de fibras de estrés, que para el caso de LARG provoca la aparición de *blebs*. Sin embargo, lo más destacable fue la presencia de estructuras cuya apariencia es similar a la de filopodios, esto cuando el tándem DH/PH de PRG está presente en la célula, lo que planteó la posibilidad de detectar Cdc42 activo en esas células. **B)** Gráfico donde se confirma que un aproximado de 50% de las células que expresaron el EGFP-PRG-DH/PH-CAAX mostraron al menos nueve estructuras que coinciden con la descripción de filopodios. Cada punto de la gráfica representa un experimento independiente donde se realizó un conteo mínimo de 30 células positivas a EGFP, se obtuvo el promedio de células que presentaron como mínimo 9 extensiones de la membrana celular positivas a actina y similares a filopodios, *** $p < 0.001$, n.s.=no significativo, prueba Anova de una vía seguida de prueba de Tukey.

6.2 ENSAYOS BIOQUÍMICOS DE CAPTURA DE GTPASAS ACTIVAS (CDC42, RHOA Y RAC1) Y DE GEF ACTIVO EN CÉLULAS HEK293T EXPRESANDO LOS EGFP-RGS-RHOGEFs-DH/PH-CAAX.

Derivado de las morfologías en células PAE transfectadas con las construcciones DH/PH de los RGS-RhoGEFs, decidimos corroborar si las construcciones de estos RhoGEFs estaban regulando directa o indirectamente la activación de GTPasas como Rac y Cdc42, además de RhoA (figura 12A).

Para aislar la fracción activa de estas GTPasas a partir de lisado celular, realizamos ensayos de pull-down usando dominios efectores de Rhotekin (proteína efectora de RhoA) y PAK-N (una proteína efectora de Cdc42 como Rac1). Estos ensayos confirmaron que EGFP-PRG-DH/PH-CAAX incrementó la cantidad de Cdc42 activo; las construcciones p115 y LARG no mostraron el mismo efecto, a pesar de si poder incrementar la activación de RhoA (figura 12B y 12C). Ninguna de las construcciones influyó sobre la activación de Rac1 (figura 12D).

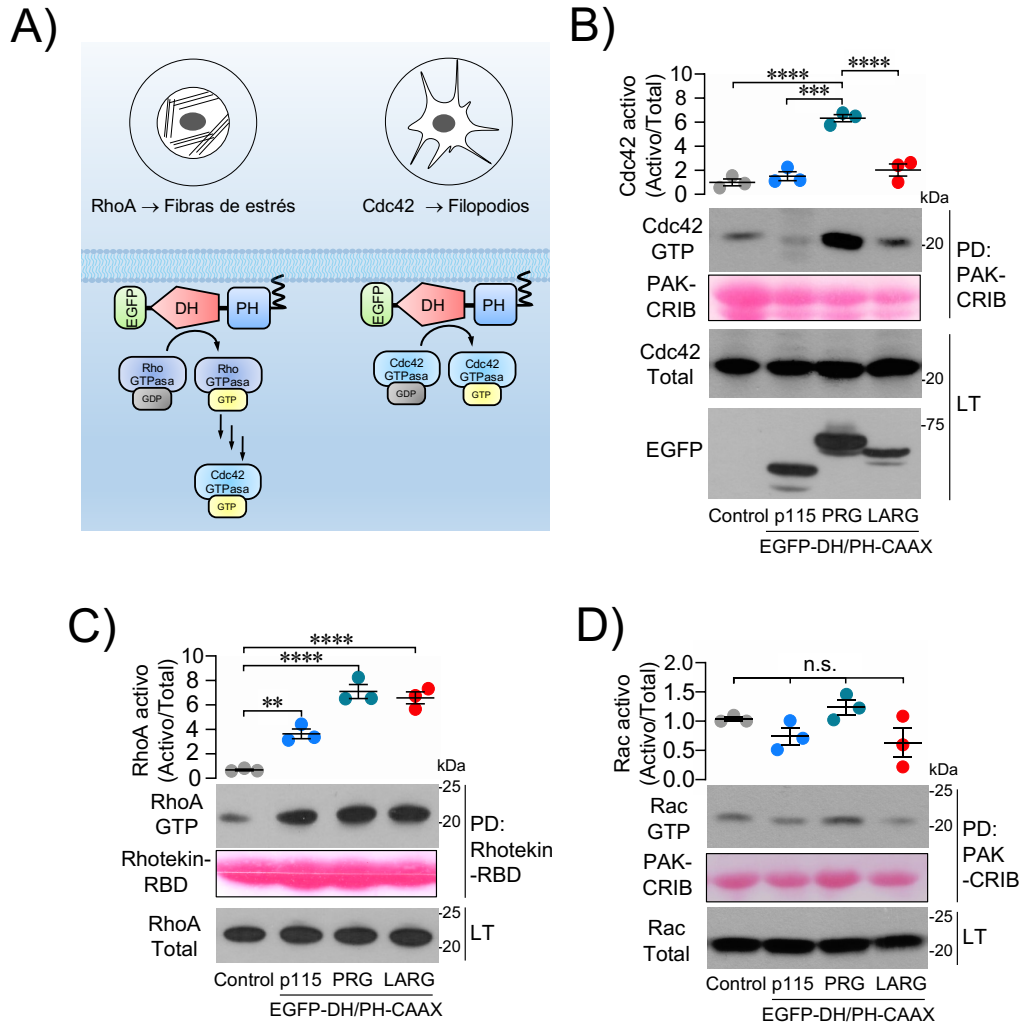


Figura 12. Los RGS-RhoGEFs DH/PH incrementan la activación de RhoA, pero solo PRG-DH/PH incrementa la activación de Cdc42. **A)** Modelo hipotético representando dos alternativas de la activación de Cdc42 por parte de PRG, una de ellas vía la activación de un GEF para Cdc42 como resultado de la señalización de RhoA. La otra posibilidad es una capacidad de PRG de activar directamente tanto a RhoA como a Cdc42. **B)** EGFP-PRG-DH/PH-CAAX produjo un incremento significativo de la fracción activa de Cdc42 cuando fue expresado en células HEK293T, pero ni EGFP-p115-DH/PH-CAAX o EGFP-LARG-DH/PH-CAAX mostraron el mismo efecto. Sin embargo, los tres RGS-RhoGEFs-DH/PH generaron un aumento de RhoA activo (**C**) y ninguno afectó la activación de Rac1 (**D**). Las gráficas representan el promedio \pm S.E. de las bandas de los blots del pull-down/total de la proteína cuantificados por densitometría (n=3), **p=0.005, ***p<0.001, ****p<0.0001, prueba Anova de una vía seguida de prueba de Tukey.

EGFP-PRG-DH/PH-CAAX incrementó la fracción activa de Cdc42, pero todavía no era posible atribuir el efecto a una interacción directa entre la construcción y

Cdc42; ya que otra posibilidad era que un GEF de Cdc42 fuese activado por la señalización de RhoA (figura 12A). Para elucidar cuál de las dos posibilidades explicaba el incremento de Cdc42 activo por parte de EGFP-PRG-DH/PH-CAAX, realizamos ensayos de captura de GEF activo; auxiliándonos de versiones mutantes de Cdc42 (G15A) y RhoA (G17A) incapaces de incorporar algún nucleótido de guanina (GDP o GTP), es posible capturar GEFs activos debido al alto grado de afinidad de las GTPasas mutantes por interaccionar con estos (39).

La figura 13A muestra que Cdc42 G15A capturó una importante fracción de EGFP-PRG-DH/PH-CAAX presente en el lisado celular, mientras que con menor eficacia fue capturada una pequeña fracción de EGFP-p115-DH/PH-CAAX y nada de EGFP-LARG-DH/PH-CAAX. Sin embargo, RhoA G17A capturó eficientemente las tres construcciones RGS-RhoGEFs (figura 13A).

Para tener una completa confirmación de que PRG-DH/PH asociaba a la GTPasa Cdc42; realizamos ensayos de pull-down usando una construcción GST-PRG-DH/PH cotransfectada con una versión dominante negativa de Cdc42 (T17N). La expresión de GST-PRG-DH/PH permitió detectar a Cdc42 T17N en el pull-down, mientras que el control de GST no precipitó a Cdc42 (figura 13B). El resultado anterior confirmó que el DH/PH de PRG interacciona con Cdc42.

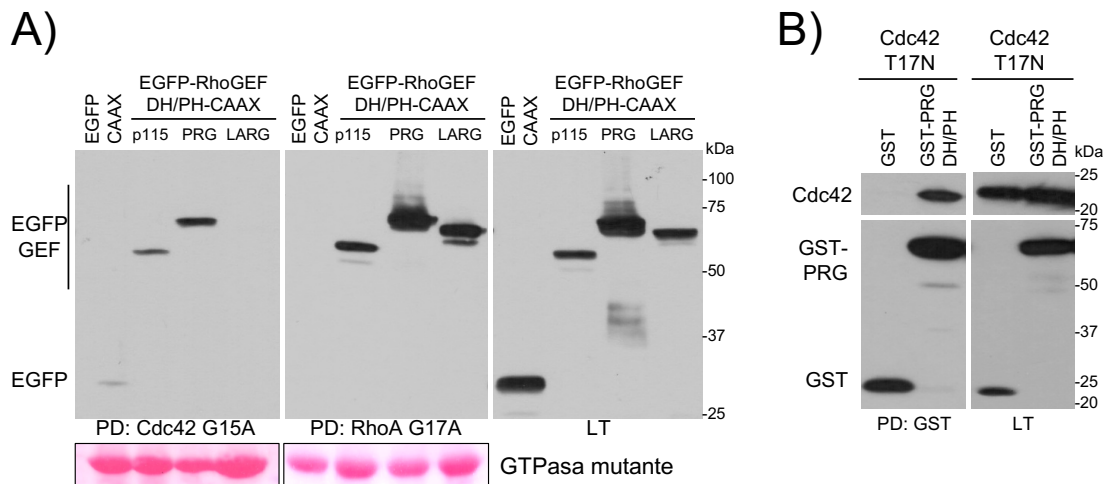


Figura 13. Evidencia de la interacción de PRG-DH/PH con Cdc42. A) PRG-DH/PH es capturado con Cdc42 G15A; p115-DH/PH muestra una mínima captura y LARG-DH/PH no es capturado con Cdc42 G15A. Las tres construcciones RGS-RhoGEFs son capturadas con RhoA

G17A. **B)** GST-PRG-DH/PH asocia a Cdc42 dominante negativa (T17N), por lo que la GTPasa es detectada en el pull-down donde está presente el tándem DH/PH de PRG, pero no en la condición de solo GST. Las imágenes corresponden a blots representativos de 3 experimentos independientes para cada inciso.

6.3 ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN DEL TÁNDEM DH/PH DE PRG POR SUB-UNIDADES $G\alpha$ DE LAS PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS.

Los RGS-RhoGEFs son activados a través de la interacción de su dominio de homología a RGS con subunidades $G\alpha$ de las proteínas heterotriméricas de la familia G12. La interacción de ambas proteínas provoca la activación del GEF y la inhibición de $G\alpha_{12/13}$, debido a la hidrólisis del GTP promovida por el dominio RGS que actúa como un GAP (16).

Sin embargo, también existen ejemplos de mecanismos de regulación de RhoGEFs a través de interacción con subunidades $G\alpha$, que ocurre en dominios diferentes al RGS. p63RhoGEF y TRIO son ejemplos de GEFs regulados por interacción directa con la subunidad $G\alpha$. En ambos casos, el dominio PH obstruye el acceso al dominio DH, pero la interacción con $G\alpha_q$ produce un desplazamiento del dominio PH como resultado de un efecto alostérico (20,21). PLEKHG2 es un GEF que interacciona con $G\alpha_s$, pero esta interacción tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de GEF (23).

Estos antecedentes sirvieron de inspiración para estudiar una posible regulación del tándem DH/PH de PRG por subunidades $G\alpha$. PRG-DH/PH fue coexpresado junto con versiones constitutivamente activas de cuatro diferentes subunidad $G\alpha$ ($G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{12/13}$). Para conocer los efectos sobre la afinidad hacia Cdc42, realizamos ensayos de pull-down con las GTPasas libres de nucleótido Cdc42 G15A (figura 14A).

La coexpresión de EGFP-PRG-DH/PH-CAAX con $G\alpha_s$ Q227L resultó en un aumento de la afinidad hacia Cdc42 G15A, cuantificado por el incremento de la fracción capturada de PRG-DH/PH (figura 14B). El pull-down de captura con RhoA G17A (figura 14C) no mostró variación con ninguna subunidad $G\alpha$.

Adicional al hecho de que $G\alpha_s$ mejoraba la afinidad de PRG por Cdc42. Otro hallazgo interesante fue la detección de $G\alpha_s$ Q227L en el pull-down (figura 14B). La presencia de $G\alpha_s$ Q227L fue interpretado como resultado de la asociación con PRG, aunque no era descartable la posible interacción con otra proteína que fuera capturada con Cdc42 G15A, e incluso una interacción directa de $G\alpha_s$ Q227L con Cdc42 G15A.

Sin embargo, la figura 14D confirmó que EGFP-PRG-DH/PH-CAAX es indispensable para que $G\alpha_s$ Q227L sea detectado en el pull-down con Cdc42 G15A. También encontramos que la expresión conjunta $G\alpha_s$ QL:PRG-DH/PH incrementan la fracción activa de Cdc42 (figura 14E). Cuando GST-PRG-DH/PH fue expresado junto con las demás subunidades $G\alpha$, únicamente detectamos interacción con $G\alpha_s$ QL y $G\alpha_q$ (figura 14F). Pese a que $G\alpha_q$ QL fue detectado en asociación con GST-PRG-DH/PH, el significado de esta interacción no es relevante para la activación de Cdc42 (figura 14B). Finalmente, con la versión dominante negativa de Cdc42 T17N, detectamos un posible complejo ternario compuesto por $G\alpha_s$ Q227L:PRG-DH/PH:Cdc42 T17N, ya que las tres proteínas fueron precipitadas en el pull-down de GST-PRG-DH/PH (figura 14G).

PRG, p115 y LARG comparten un alto grado de homología, por lo que evaluamos si también las construcciones GST de p115 y LARG interaccionaban con $G\alpha_s$. En la figura 14H mostramos que las construcciones GST de los tres RGS-RhoGEFs interaccionaron con $G\alpha_s$ Q227L, lo que abre la posibilidad de que p115 y LARG puedan adquirir habilidad para activar a Cdc42 via $G\alpha_s$.

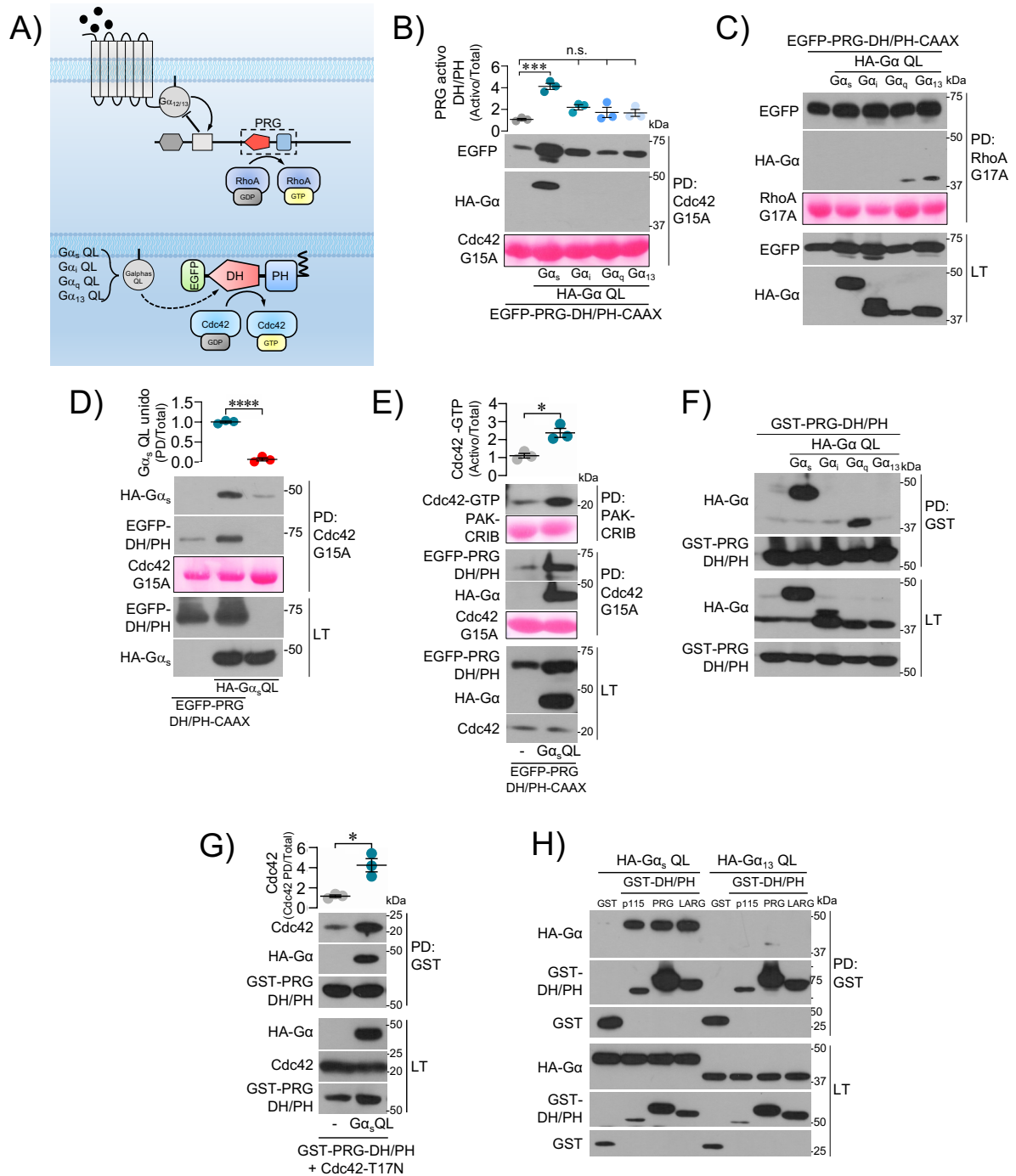


Figura 14. $G\alpha_s$ Q227L interacciona con PRG-DH/PH lo que mejora su afinidad y activación hacia Cdc42. **A)** Modelo donde se describe la vía de activación de PRG a través de la $G\alpha_{12/13}$, así como la estrategia para evaluar si el tándem DH/PH de PRG es sensible a ser regulado por versiones activas de otras subunidades $G\alpha$. **B)** PRG DH/PH fue expresado solo o junto con alguna $G\alpha$, esto para conocer sus efectos sobre la afinidad hacia Cdc42 G15A. La coexpresión con $G\alpha_s$ Q227L incrementó hasta 3 veces la cantidad de EGFP-PRG-DH/PH-CAAX capturado, además fue

posible detectar la presencia de $G\alpha_s$ Q227L en el pull-down. La gráfica representa el promedio \pm S.E. de las bandas de los blots del pull-down/total de la proteína que fueron cuantificados por densitometría (n=3), ***p<0.001, n.s.=no significativo, prueba Anova de una vía seguida de prueba de Tukey. **C)** Sin embargo, $G\alpha_s$ Q227L no tuvo el mismo efecto sobre la captura de PRG-DH/PH con RhoA G17A, y tampoco alguna de las otras $G\alpha$ evidenciaron un cambio sobre la afinidad hacia RhoA G17A. **D)** Pull-down usando perlas con GST-Cdc42 G15A para evidenciar que la asociación de $G\alpha_s$ Q227L ocurre a través de EGFP-PRG-DH/PH-CAAX y no por interacción directa con Cdc42 G17A. La gráfica representa el promedio \pm S.E. de las bandas de los blots del pull-down/total de la proteína que fueron cuantificados por densitometría (n=3), ****p<0.0001, prueba *t* de student. **E)** Para evaluar un incremento de la activación de Cdc42 endógeno, realizamos ensayos de pull-down con perlas de GST-PAK-CRIB con las que aislamos la fracción activa de Cdc42 en lisados celulares de HEK293T transfectadas con las condiciones señaladas en el blot. La expresión conjunta de $G\alpha_s$ Q227L y EGFP-PRG-DH/PH-CAAX resultó en un incremento de la activación de Cdc42 en comparación con la activación resultante de EGFP-PRG-DH/PH-CAAX sin $G\alpha_s$ Q227L. La gráfica representa el promedio \pm S.E. de las bandas de los blots del pull-down/total de la proteína que fueron cuantificados por densitometría (n=3), *p=0.01, prueba *t* de student. **F)** Para descartar el requerimiento de Cdc42 para la interacción entre PRG-DH/PH y $G\alpha_s$ Q227L, realizamos ensayos de pull-down de GST, coexpresando GST-PRG-DH/PH junto con las diferentes $G\alpha$. $G\alpha_s$ Q227L y $G\alpha_q$ QL fueron la únicas detectadas junto con GST-PRG-DH/PH. **G)** La formación de un complejo ternario $G\alpha_s$:PRG-DH/PH:Cdc42 fue demostrada a través de pull-down de GST-PRG-DH/PH y Cdc42 T17N (dominante negativa). $G\alpha_s$ Q227L fue detectado en el pull-down junto con un incremento en la afinidad de PRG-DH/PH hacia Cdc42 T17N. La gráfica representa el promedio \pm S.E. de Cdc42 unido a GST-PRG-DH/PH que fue cuantificado por densitometría (n=3), *p=0.01, prueba *t* de student. **H)** Los RGS-RhoGEFs comparten un grado alto de homología por lo que pusimos a prueba la posibilidad de que los otros dos miembros puedan interactuar con $G\alpha_s$ Q227L. El resultado mostró que los tres RGS-RhoGEFs interaccionan con $G\alpha_s$ Q227L.

Nuestros experimentos han demostrado que la interacción de $G\alpha_s$ con PRG-DH/PH, da como resultado un incremento de afinidad y activación de Cdc42. Sin embargo, todos estos hallazgos han sido con la región DH/PH de la proteína; por lo que aún no contábamos con evidencia de que la proteína completa resultaba sensible a regulación por $G\alpha_s$ Q227L (figura 15A).

Primero realizamos ensayos de captura de PRG sobreexpresado sin y con $G\alpha_s$, el cual fue activado de manera eficiente solo cuando $G\alpha_s$ Q227L estuvo presente

(figura 15B). Tras el éxito obtenido, probamos la activación y captura del PRG endógeno en HEK293T. En la figura 15C mostramos la captura de PRG endógeno activado cuando $G\alpha_s$ QL es expresado. Estos resultados confirmaron que PRG completo es sensible a ser regulado por $G\alpha_s$ QL, además de presentar afinidad por Cdc42.

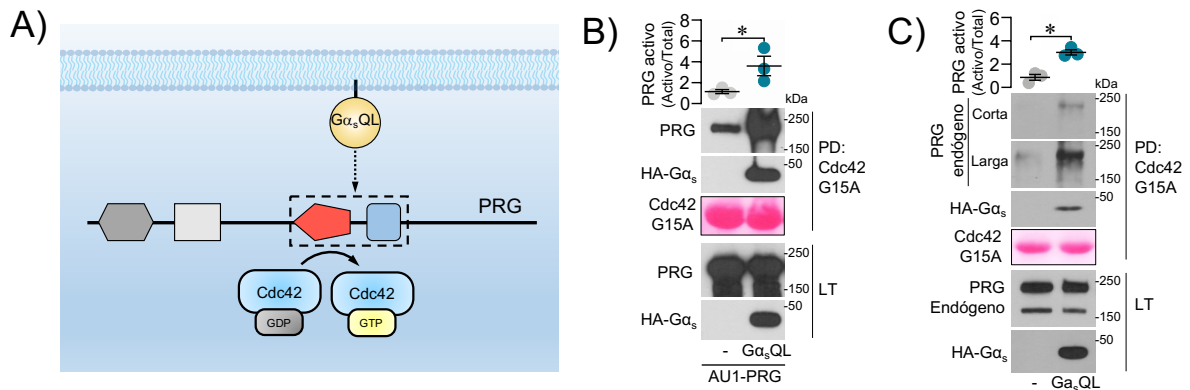


Figura 15. La versión completa de PRG es sensible a activación por $G\alpha_s$ Q227L. **A)** Representación hipotética de la interacción y activación de PRG por $G\alpha_s$ Q227L. **B)** Células HEK293T fueron transfectadas con una versión completa de PRG sin o con $G\alpha_s$ QL. Donde $G\alpha_s$ QL fue capaz de activar a PRG, el cual fue capturado con Cdc42 G15A. $G\alpha_s$ QL también detectado en el pull-down. **C)** Nuestro sistema de captura de PRG fue suficientemente sensible y eficaz para detectar la activación vía $G\alpha_s$ Q227L del PRG endógeno en células HEK293T. Las gráficas representan la media \pm S.E. del PRG activo/PRG total (n=3) **B)** *p=0.01, **C)** *p=0.04, prueba t de student.

$G\alpha_s$ es un activador de la adenilato ciclasa, con la consecuente generación de AMPc y activación de la cinasa PKA (figura 16B). Por lo que exploramos si la activación de PKA era necesaria para los efectos observados sobre PRG.

Expresando EGFP-PKA-C α (subunidad catalítica de PKA) junto con EGFP-PRG-DH/PH, detectamos un decremento de la afinidad de PRG hacia Cdc42 G15A (figura 16B). Al observar que la subunidad catalítica de PKA afectó negativamente la captura del DH/PH de PRG, decidimos analizar la posible fosforilación del DH/PH por parte de PKA. GST-PRG-DH/PH precipitado fue incubado con un anticuerpo que reconoce motivos de fosforilación de PKA (PKAS), con lo cual

detectamos la fosforilación del DH/PH en presencia de PKA (figura 16C). Como controles de la sensibilidad y especificidad del anticuerpo, usamos una construcción fosforilable y otra no fosforilable por PKAS del DEP1 de P-Rex1 (42).

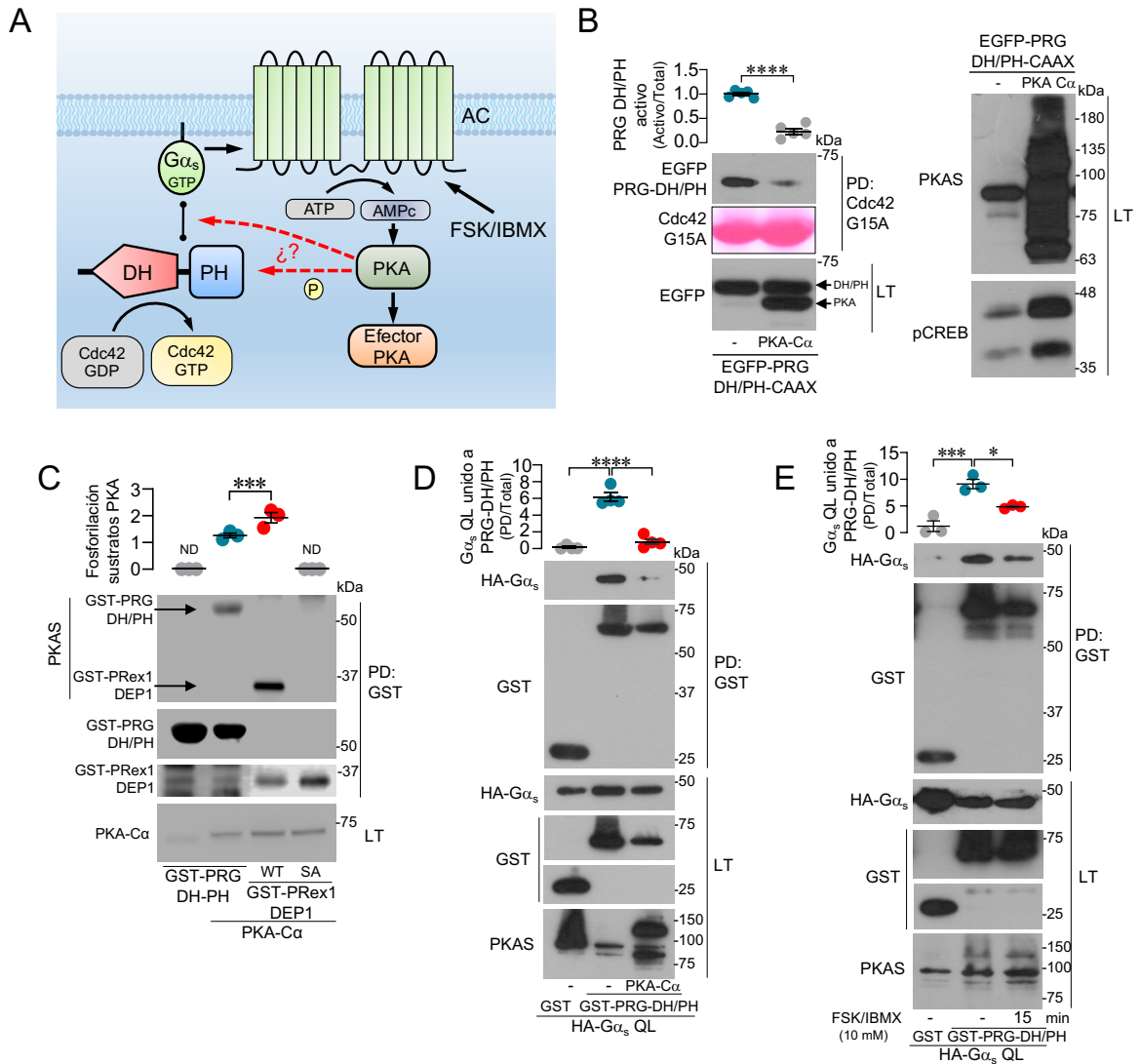


Figura 16. AMPc y PKA regulan negativamente la interacción entre $G\alpha_s$ y PRG, así como la afinidad por Cdc42. A) Modelo que muestra la señalización más caracterizada de $G\alpha_s$, generación de AMP cíclico y activación de PKA, así como los posibles efectos sobre la vía $G\alpha_s$ >PRG>Cdc42. **B)** La subunidad catalítica de PKA produjo un decremento de la afinidad de PRG-DH/PH por Cdc42. Las gráficas representan la media \pm S.E. del PRG DH/PH activo/PRG DH/PH total (n=5) ****p=0.0001, prueba *t* de student. **C)** GST-PRG DH/PH es blanco de fosforilación por la subunidad catalítica de PKA, como controles de la actividad de PKA se transfectó un GST-PRex1-DEP1 WT que es fosforilado y un GST-PRex1-DEP1 SA no fosforilable.

Las gráficas representan la media \pm S.E. (n=3) ***p=0.0006, prueba *t* de student. **D)** La interacción entre $G\alpha_s$ Q227L y GST-PRG DH/PH es susceptible de inhibición por PKA transfectada, **E)** así como por la PKA activada vía la adenilato ciclasa. Las gráficas representan la media \pm S.E. (n=3) ****p<0.0001, ***p=0.009, *p=0.0196, prueba *t* de student. *Inciso C obtenido con el apoyo de Sendi Rafael Adame-García.*

La hipótesis de que PKA propiciaba el aumento de afinidad de PRG hacia Cdc42 quedó descartada; sin embargo, PKA si disminuyó la afinidad hacia Cdc42. Por lo que decidimos evaluar si la interacción $G\alpha_s$:PRG-DH/PH también era blanco de los efectos de PKA. Tanto la expresión de EGFP-PKA-C α como su activación por FSK/IBMX, dieron como resultado una disminución de la interacción de $G\alpha_s$ con GST-PRG-DH/PH (figura 14D y 14E). Estos resultados muestran indicios de un posible circuito de regulación negativa de PRG por PKA; esta hipótesis debería ser explorada a más a profundidad, dado un posible mecanismo de activación de PRG vía $G\alpha_s$, pero también de inhibición a través de PKA.

6.4 MAPEO DE LA REGIÓN DE INTERACCIÓN DE $G\alpha_s$ Q227L CON PRG-DH/PH.

Una vez confirmada la interacción entre $G\alpha_s$ Q227L y PRG-DH/PH, resultaba interesante identificar cuales son los posibles puntos de contacto en PRG para la interacción con $G\alpha_s$ QL. Para resolver esta cuestión, realizamos un primer par de construcciones fusionadas a GST que abarcaron del dominio DH a la región que conecta con el PH (denominada linker) y del linker al dominio PH (figura 17A). Ambas construcciones asociaron a $G\alpha_s$ Q227L, pero ninguna construcción interaccionó con $G\alpha_{13}$ QL (figura 17B). El resultado anterior no permitió confirmar que región o regiones del tándem DH/PH de PRG eran indispensables para la interacción con $G\alpha_s$ Q227L.

Generamos otras tres construcciones, esta vez separando por completo cada una de las tres regiones definidas: dominio DH, región linker y dominio PH (figura 17A). Aunque nuevamente todas las construcciones interaccionaron con $G\alpha_s$ QL, lo hicieron con diferencia en la afinidad (figura 17C); siendo el dominio PH el que

mostró más afinidad por $G\alpha_s$ QL, seguido del dominio DH y el linker respectivamente.

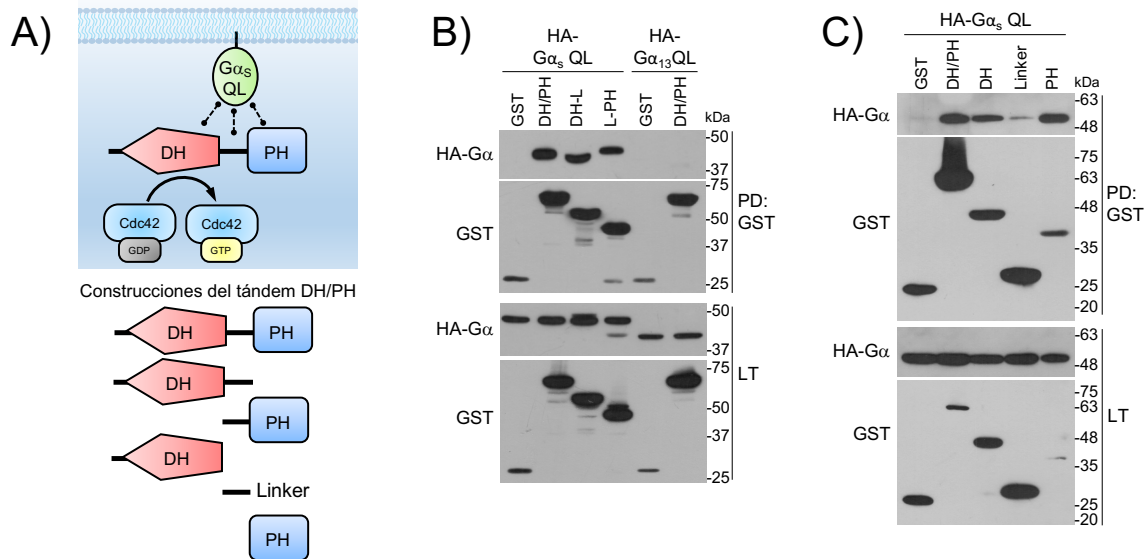


Figura 17. Mapeo de los sitios de interacción de $G\alpha_s$ Q227L con PRG-DH/PH. **A)** Representación de las tres regiones identificadas del DH/PH de PRG, los cuales podrían ser puntos de interacción de $G\alpha_s$ QL. Para determinar las regiones de interacción, se generaron una serie de construcciones de diferente longitud cada una. **B)** Pull-down de GST usando las construcciones PRG-DH/PH, PRG-DH-Linker y PRG-Linker-PH. Las tres construcciones mantuvieron su capacidad de asociar $G\alpha_s$ QL. Como control negativo se usó a $G\alpha_{13}$ QL que no se asocia a GST solo ni a GST-PRG-DH/PH (n=3). **C)** Pull-down de GST usando construcciones de cada una de las tres regiones identificadas del tándem DH/PH de PRG. Confirmamos que $G\alpha_s$ QL interacciona con DH, linker y PH; aunque con diferente afinidad, siendo el PH más afín para asociar $G\alpha_s$ QL, mientras que DH y linker son menos afines (n=3). *Incisor B obtenido con el apoyo de Irving García-Jiménez y C con repeticiones de Irving García-Jiménez.*

El linker de PRG resultó el menos afín a la interacción con $G\alpha_s$ Q227L; sin embargo, resultaba el mejor candidato para tratar de interferir la interacción $G\alpha_s$ Q227L:PRG; puesto que representaba la región mínima de la interacción y solo presentó homología con la región linker de p115 y LARG (figura 18A), con lo que posibles efectos fuera de blanco eran mínimos.

Las estructuras cristalizadas de PRG-DH/PH en interacción con RhoA e ITSN1-DH/PH en interacción con Cdc42 (43, 44) se encuentran disponibles, por lo que

podimos hipotetizar sobre como $G\alpha_s$ estaría contribuyendo a mejorar la interacción de PRG con Cdc42, y cual sería el posible papel del linker. Nuestro análisis nos llevó a desarrollar un modelo hipotético, donde el incremento en la afinidad hacia Cdc42 resulta de un efecto alostérico de $G\alpha_s$ sobre PRG. La hipótesis es que $G\alpha_s$ interacciona por el lado contrario al sitio de unión de PRG con la GTPasa, un linker flexible permitiría un cambio conformacional que incrementa la distancia entre los dominios DH y PH, dando lugar a una región catalítica (dominio DH) menos obstruida y más accesible para Cdc42 (figura 18B).

La construcción EGFP-linker fue expresada junto con $G\alpha_s$ WT o $G\alpha_s$ QL, en células COS7. Como marcador de membrana se transfectó a $G\beta$ y $G\gamma$ fusionado con la proteína fluorescente mCherry. Estas células fueron analizadas por microscopía confocal para determinar si EGFP-linker era reclutado a la membrana. Una mayor fracción de EGFP-linker fue reclutado a la membrana en presencia de la versión de $G\alpha$ QL que en presencia de $G\alpha_s$ WT, esto fue determinado a través del coeficiente de superposición de Manders' (figura 18D). Lo anterior es explicado por el hecho de que $G\alpha_s$ QL no es inhibido por $G\beta\gamma$, por lo cual EGFP-linker puede interactuar con la subunidad; lo cual no sucede con $G\alpha_s$ WT que es susceptible de ser inhibido por $G\beta\gamma$ y por tanto incapaz de interactuar con el linker (figura 18C).

También verificamos si EGFP-linker era capaz de bloquear la interacción de PRG-DH/PH con $G\alpha_s$ Q227L. En células HEK293T, la expresión de EGFP linker abatió por completo la interacción de GST-PRG-DH/PH con $G\alpha_s$ Q227L (figura 18E). La activación por $G\alpha_s$ Q227L de la versión completa de PRG también fue abatida cuando EGFP-linker fue expresado (figura 18F).

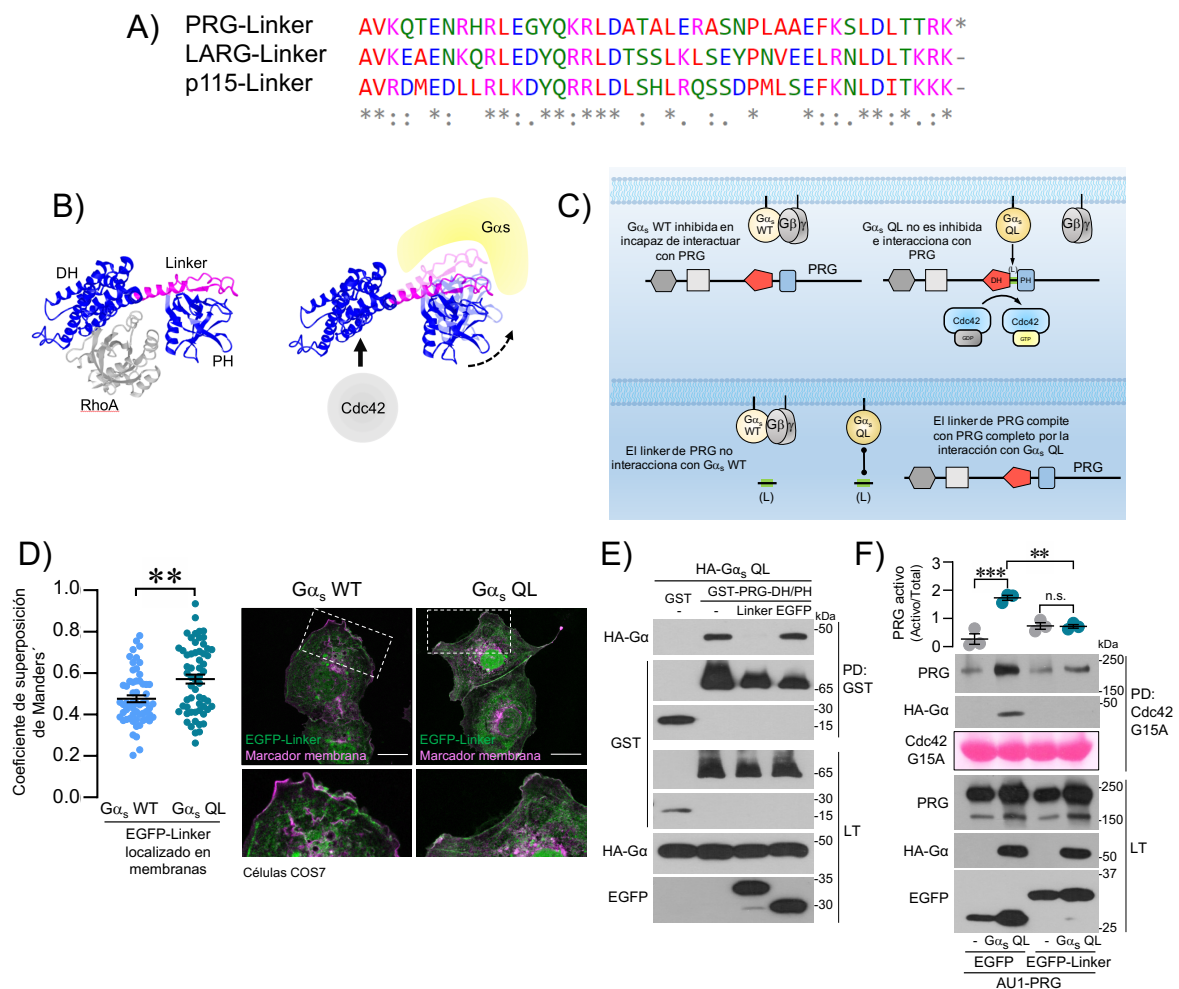


Figura 18. El linker de PRG inhibió la interacción de $G\alpha_s$ Q227L con PRG. **A)** Análisis del alineamiento de la secuencia de aminoácidos del linker de PRG, el cual solo guarda homología con el linker de p115-RhoGEF y LARG. **B)** Estructura del DH/PH de PRG en interacción con RhoA (izquierda), la cual se usó como referencia para proponer un modelo hipotético de la interacción de $G\alpha_s$ con el tándem. La interacción $G\alpha_s$:PRG-DH/PH genera un cambio conformacional que incrementa la distancia entre los dominios DH y PH, lo cual hace más accesible a Cdc42 la región catalítica del DH. **C)** Modelo donde se ilustra al linker como herramienta de inhibición de la interacción $G\alpha_s$ Q227L:PRG. $G\alpha_s$ WT se encuentra inhibida por $G\beta\gamma$ y por tanto no favorece la localización del linker a la membrana, pero $G\alpha_s$ Q227L no es inhibida por $G\beta\gamma$ y por tanto es posible su interacción con EGFP-linker. **D)** Gráfica donde se representa la distribución de células COS7 de acuerdo a su valor de coeficiente de superposición de Manders', lo cual determinó que el grupo de células con $G\alpha_s$ Q227L tuvieron una mayor colocalización del EGFP-linker con la membrana. A la derecha células representativas de cada condición, con amplificación de una parte de la membrana donde se observa la colocalización de verde con magenta resultando en blanco

para la célula con $G\alpha_s$ Q227L (barra de escala=20 μm). Células COS7 fueron transfectadas con EGFP-linker, $G\beta$, $G\gamma$ mCherry, así como con $G\alpha_s$ WT o $G\alpha_s$ QL. Se capturaron imágenes confocales que fueron procesadas con el programa Fiji, usando el autothreshold intermodes para definir las membranas se analizaron las imágenes con el plugin Coloc2 para obtener los valores de Manders' $tM1$, la gráfica representa la media \pm S.E. de 59 células de tres experimentos independientes; ** $p=0.001$, usando prueba t de student. **E)** Ensayo del pull-down de GST-PRG-DH/PH donde la presencia de EGFP-linker bloquea la interacción de $G\alpha_s$ Q227L con el tándem, EGFP control es incapaz de bloquear la interacción ($n=3$). **F)** EGFP-linker previene la activación de PRG que ocurre a través de $G\alpha_s$ QL, la captura con Cdc42 G15A mostró que cuando EGFP es expresado no hay interferencia con la activación de PRG como consecuencia de la expresión de $G\alpha_s$ Q227L, pero cuando EGFP linker es expresado la activación de PRG se ve abatida por el bloqueo de la interacción con $G\alpha_s$ Q227L. La gráfica representa la media \pm S.E. de PRG activo/total de tres experimentos independientes ($n=3$); ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, n.s.=no significativo, prueba Anova de una vía seguida de prueba de Tukey.

6.5 ESTIMULACIÓN DE RECEPTORES ENDÓGENOS ACOPLADOS A G_s PARA EVALUAR EL RECLUTAMIENTO A LA MEMBRANA DE PRG ENDÓGENO.

Los resultados previos demostraron la eficacia de $G\alpha_s$ Q227L para activar a PRG por medio de interacción directa, misma que puede ser inhibida con el linker de PRG. Sin embargo, aún faltaba por reproducir estos hallazgos en un sistema completamente endógeno (figura 19A). Se recurrió a un sistema de células PAE y HT29, las cuales expresan receptores acoplados a G_s que responden a la estimulación con prostaglandina E2 (PGE2) y análogos de PGE2 como es el butaprost (45). En respuesta a la estimulación de células PAE con PGE2 o HT29 con butaprost, PRG fue reclutado a la membrana celular a los 15 minutos de estimulación en ambos tipos celulares (figura 19B y 19C). El desplazamiento del citosol a la membrana es interpretado como una respuesta de PRG a la disponibilidad de $G\alpha_s$ activo (figura 19A).

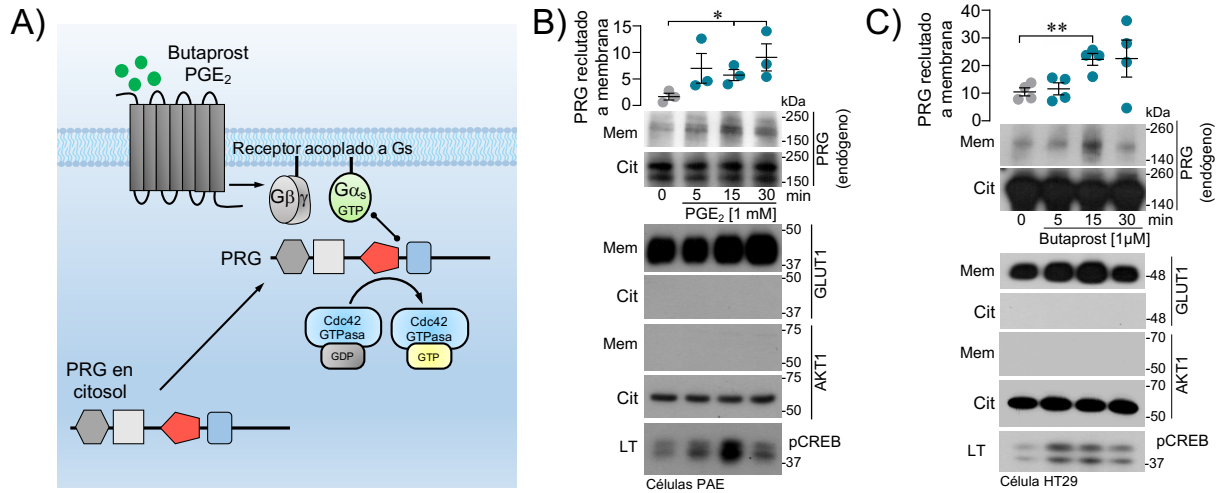


Figura 19. PRG es reclutado a la membrana celular cuando se estimulan receptores acoplados a Gs. **A)** Modelo hipotético del desplazamiento de PRG localizado en el citosol hacia la membrana celular, reclutamiento que ocurre en respuesta a la activación de receptores acoplados a Gs. **B)** Las células PAE y **C)** las células HT29 expresan receptores acoplados a Gs que responden a PGE₂ y a análogos de PGE₂. Las células fueron estimuladas a diferentes tiempos, el lisado celular fue fraccionado para aislar los componentes del citosol y de la membrana plasmática. 15 minutos de estimulación con PGE₂ o con butaprost mostraron un incremento del reclutamiento de PRG endógeno hacia la membrana. Las gráficas representan la media ± S.E. de PRG reclutado a la fracción de membrana de **B)** tres experimentos independientes (n=3) o **C)** 4 experimentos independientes (n=4); *p<0.05, **p<0.01, prueba Anova de una vía seguida de prueba de Tukey. *Incisos B y C obtenido con apoyo de Sendi Rafael Adame-García.*

6.6 USO DE HERRAMIENTAS QUIMIOGENÉTICAS (DREADDs) PARA EVALUAR LA ESPECIFICIDAD DE G α_s COMO ACTIVADOR DE PRG.

Los DREADDs (*designer receptor exclusively activated by designer drugs*) son herramientas generadas por ingeniería quimiogenética, los cuales se caracterizan por ser activados de modo selectivo por el fármaco CNO (Clozapine-N-Oxide); además son de gran utilidad para el estudio de vías específicas y dependientes de Gs, Gi o Gq, ya que fueron diseñados para acoplarse a una sola proteína G, sin opción de acople múltiple (figura 20A) (46).

Decidimos hacer uso de los DREADDs para confirmar la especificidad de la activación de PRG a través de la subunidad G α_s . En células COS7 expresamos a PRG y Gs-DREADD, posteriormente realizamos una curva temporal de

estimulación para identificar un pico de activación de PRG (figura 20A). PRG fue activado significativamente a los 15 minutos de estimulación con CNO (figura 20B). Posteriormente, validamos que Gs-DREADD, pero no Gi- o Gq-DREADD, activó a PRG a los 15 minutos de estimulación con CNO (figura 20C).

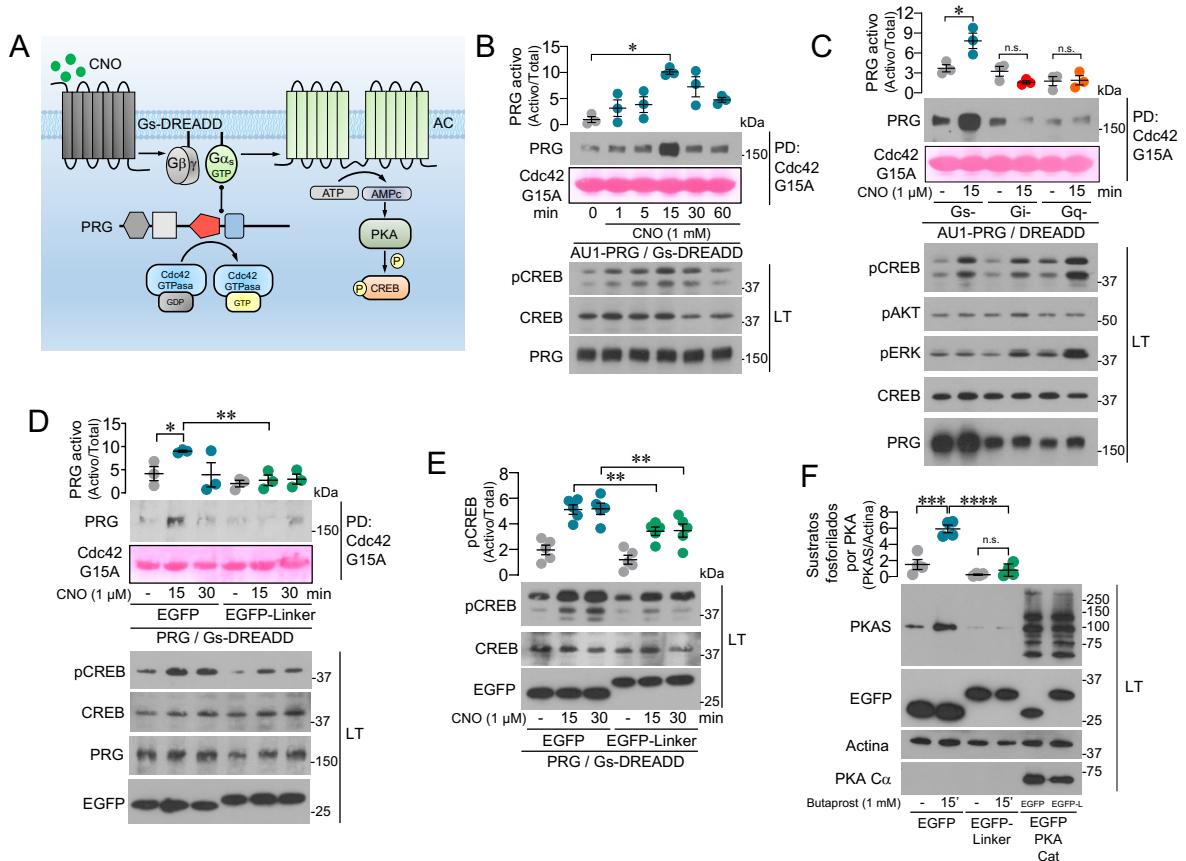


Figura 20. PRG es activado únicamente por Gs-DREADD, efecto que puede ser bloqueado con el linker de PRG. A) Modelo que muestra el mecanismo de activación de Gs-DREADD al estimular con CNO, la posible activación de PRG y la señalización a través de PKA. **B)** Células COS7 fueron transfectadas con Gs-DREADD y AU1-PRG, la curva temporal de estimulación con el fármaco CNO mostró una activación significativa de PRG a los 15 minutos. La gráfica representa la media \pm S.E. de PRG activo/total de tres experimentos independientes (n=3); *p<0.05, prueba Anova de una vía seguida de prueba de Tukey. **C)** Gs-DREADD fue el único que consiguió activar a PRG tras 15 minutos de estimulación con CNO. La estimulación de Gi- o Gq-DREADD no activaron a PRG. La gráfica representa la media \pm S.E. de PRG activo/total de tres experimentos independientes (n=3); *p<0.05, prueba Anova de una vía seguida de prueba de Tukey. **D)** La expresión de la construcción EGFP-linker fue capaz de abatir la activación de PRG vía estimulación de Gs-DREADD. La gráfica representa la media \pm S.E. de PRG activo/total de tres experimentos independientes (n=3); *p<0.05, prueba Anova de una vía seguida de prueba de

Tukey. **E)** Interesantemente, EGFP-linker no solo evito la activación de PRG, también produjo una disminución de la fosforilación de CREB, y **F)** en células PAE estimuladas con butaprost un efecto similar sobre la fosforilación de sustratos de PKA. Las gráficas representan la media \pm S.E. de **E)** pCREB activo/total de 5 experimentos independientes (n=5); **p<0.005, prueba *t* de student, o **F)** fosforilación sustratos de PKA/actina total de 4 experimentos independientes (n=4), ***p=0.0009, ***p<0.0001, n.s.=no significativo. *Incisos B y C obtenidos con el apoyo de Daniel Rodolfo Cervantes-Villagrana. Incisos D y E obtenidos con apoyo de Daniel Rodolfo Cervantes-Villagrana y Yarely Mabell Beltrán-Navarro.*

También se decidió probar si el linker de PRG podría competir por la interacción con $G\alpha_s$, y así bloquear la activación de PRG. La expresión de EGFP-linker evitó la activación de PRG a pesar de la estimulación de Gs-DREADD (figura 20D). Sin embargo, EGPF-linker no solo abatió la activación de PRG; la fosforilación de CREB dependiente de $G\alpha_s$ también fue afectada, lo cual confirmó el efecto inhibitor del linker de PRG (figura 20E). Finalmente, la expresión de EGFP-linker en células PAE estimuladas con butaprost, interfirió con la fosforilación de sustratos de PKA (20F). Es decir, el linker de PRG fue capaz de bloquear la señalización derivada de $G\alpha_s$.

7) DISCUSIÓN

La angiogénesis es la proliferación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los existentes, por lo que es un proceso relevante durante el desarrollo y crecimiento de un organismo, ya que genera la remodelación de la red vascular primaria permitiendo la correcta formación de tejidos y órganos. Aunque en etapas adultas la angiogénesis es infrecuente, esta contribuye de manera importante en la respuesta inmune, la reparación o la regeneración de tejidos, y en las mujeres genera nuevos vasos sanguíneos del revestimiento del útero durante los ciclos menstruales. Sin embargo, también existen eventos como la angiogénesis tumoral que favorecen la llegada de nutrientes y oxígeno al tumor para que continúe su crecimiento. Además, proporciona vías de transporte de células tumorales para la implantación de focos metastásicos en tejidos y órganos altamente vascularizados como pulmones, cerebro y hueso.

Un evento fundamental durante la angiogénesis es el cambio en la morfología de las células endoteliales, lo que permite su migración en respuesta a los factores proangiogénicos. Esto involucra la generación dinámica de estructuras de actina que constituyen el citoesqueleto (6, 41).

Estructuras de actina como los lamelipodios y los filopodios son generadoras de fuerzas de empuje y por lo tanto de extensión de la célula; mientras que las fibras de estrés, complejos de actomiosina y las adhesiones focales, generan las fuerzas contráctiles que permiten la retracción celular (8). Esta variedad de fenotipos estructurales del citoesqueleto de actina son resultado de la activación de complejos proteicos que permiten la nucleación de la actina, a su vez estos complejos están bajo regulación de la familia de GTPasas de Rho.

Las GTPasas de Rho son un grupo de 22 proteínas, aunque Cdc42, Rac y RhoA son las estudiadas con mayor amplitud, debido al tipo de estructuras de actina con el que se les ha relacionado (11,16). La regulación de estas GTPasas corre a cargo de 3 tipos de proteínas; GEFs activadores a través del intercambio de GDP por GTP; GAPs inhibidores que promueven la hidrólisis del GTP y GDIs que sustraen a las GTPasas de la membrana para mantenerlas inactivas en el citoplasma (16).

Para mi tesis de doctorado, decidí identificar RhoGEFs con potencial angiogénico, mediante un tamizaje a través de una estrategia de ganancia de función, diseñando y generando versiones constitutivamente activas de 20 GEFs seleccionados. Varios trabajos han demostrado que la expresión del tándem DH/PH, cuya presencia es casi inalterable para los más de 70 RhoGEFs de homología a Dbl (DH), es suficiente para conseguir una versión activa del GEF, sin que estos pierdan su especificidad por las Rho GTPasas (47-51). Por tanto, decidí generar una serie de construcciones a partir de la región DH/PH de cada RhoGEF, incluyendo a las intersectinas y a los RGS-RhoGEFs.

La expresión y localización de estas construcciones en la membrana celular, me permitió visualizar su capacidad de generar estructuras de actina a través de la activación de Rho GTPasas. Del tamizaje realizado identifiqué la capacidad de PRG (PDZ RhoGEF, ARHGEF11) para generar estructuras similares a filopodios, algo que hasta ahora no había sido reportado.

PRG es uno de los miembros de los denominados RGS-RhoGEFs, los otros dos son p115-RhoGEF y LARG. Este grupo que destaca por ser efectores directos de la subunidad $G\alpha_{13}$ de las proteínas G heterotriméricas (52-56). Los RGS-RhoGEFs son activados por la interacción de su dominio RGS con $G\alpha_{13}$, a su vez la interacción de la subunidad con el RGS produce la hidrólisis del GTP con lo que la señal de $G\alpha_{13}$ es apagada. Otra característica en común de los RGS-RhoGEFs es su especificidad por la GTPasa RhoA, así como la generación de fibras de estrés (57-59).

La estrategia de expresión del tándem DH/PH de los RhoGEFs en células PAE, me permitió identificar a PRG como responsable de generar proyecciones similares a filopodios. Los filopodios son proyecciones generadas mediante la polimerización de filamentos actina no ramificados y altamente compactados, su formación depende del complejo ARP2/3, la activación de este complejo es dependiente de WASP que a su vez es resultado de la interacción con la GTPasa Cdc42 (60). Por tanto, resultó intrigante observar que el tándem DH/PH de PRG, un GEF específico de RhoA y hasta ese momento no reconocido como un activador de Cdc42, generará estas estructuras.

Tomando como punto de partida este hallazgo, decidí confirmar si la construcción DH/PH de PRG incrementaba los niveles activos de Cdc42. Por medio de ensayos de pull-down usando el dominio PBD de PAK (efector de Cdc42 y Rac), se aisló a la fracción activa de Cdc42, con lo que constatamos que las células expresando PRG-DH/PH presentaban un incremento significativo de Cdc42. Sin embargo, existía la posibilidad de que el incremento en la activación de Cdc42 fuese atribuido a una activación en cascada, es decir, la activación de un GEF para Cdc42 como resultado de la señalización desencadenada por PRG y no como un efecto directo del DH/PH de PRG. Por tanto, pusimos a prueba la capacidad del DH/PH de PRG para interactuar con Cdc42. Con ayuda de versiones mutantes de Cdc42 y RhoA que permiten capturar RhoGEFs cuando estos están activos, confirmamos la interacción de PRG-DH/PH con Cdc42, sin la pérdida de la capacidad de interacción con RhoA.

Estos resultados demostraron que el tándem DH/PH de PRG, pero no los de p115-RhoGEF o LARG, es capaz de interactuar y activar a Cdc42. Resultaba interesante que hasta ahora no se haya tenido noticia sobre la afinidad y activación de Cdc42 por parte de PRG; pero una posible explicación a esta situación, es que una gran mayoría de los estudios enfocados al análisis de la especificidad de los GEFs por las GTPasas, fueron realizados usando estrategias *in vitro* con proteínas recombinantes aisladas. La desventaja de esta estrategia, es que difícilmente puede garantizar una completa representación del contexto de una célula, donde factores adicionales puede influir sobre las interacciones proteína-proteína (58, 61).

La vía de activación de PRG más conocida es por interacción de su dominio RGS con $G\alpha_{13}$, pero no existen reportes de interacción con otras subunidades $G\alpha$ o a través de otros dominios del GEF con $G\alpha_{13}$, como si ocurre con p115-RhoGEF (62). Sin embargo, p63RhoGEF o Tiam son activados por medio de interacción de sus regiones DH/PH con la subunidad $G\alpha_q$; mientras que PLEKHG2 es inhibido a través de la interacción de su dominio DH con la subunidad $G\alpha_s$ (20, 21, 23). Considerando una situación similar, en la que alguna subunidad $G\alpha$ pueda regular la afinidad de PRG hacia Cdc42, probamos la

expresión de versiones QL de las diferentes subunidades $G\alpha$ de las proteínas G heterotriméricas para saber si podían influenciar la actividad de PRG.

A través de la captura del DH/PH de PRG con las GTPasas libres de nucleótido y captura de GTPasa activa, se indentificó que $G\alpha_s$ Q227L interacciona con PRG, lo cual incrementa la afinidad y activación de Cdc42.

La señalización de $G\alpha_s$ lleva a la activación de la cinasa PKA a través de la generación de AMP cíclico (63); por lo que los efectos observados sobre la interacción de $G\alpha_s$ con PRG y el incremento de afinidad por Cdc42 podrían ser dependientes de la actividad de PKA. Sin embargo, al expresar a la subunidad catalítica de PKA junto con PRG-DH/PH, se pudo documentar una disminución de la interacción de $G\alpha_s$ con PRG, así como una disminución de la afinidad hacia Cdc42. PKA es un cinasa de serinas y treoninas por lo que una posible fosforilación del DH/PH de PRG debía ser verificada. Al expresar la subunidad catalítica de PKA y el dominio DH/PH de PRG, con ayuda de anticuerpos que detectan fosforilaciones de PKA, se encontró que el DH/PH era blanco de fosforilación por PKA. La actividad de la PKA no promueve la afinidad de PRG por Cdc42, pero si parecer regularlos negativamente.

Pensando en una regulación espacio-temporal de la activación de proteínas y su señalización, $G\alpha_s$ y PKA podrían estar integrando un circuito de señalización. En el cual, $G\alpha_s$ activa a PRG para hacerlo afín a Cdc42, pero la señalización canónica de $G\alpha_s$ que involucra a PKA podría servir de inhibidor del eje $G\alpha_s$ >PRG>Cdc42.

Para entender tener más detalles de como ocurre la interacción entre $G\alpha_s$ y PRG, exploramos las diferentes regiones del tándem DH/PH para identificar las regiones donde ocurre la interacción con $G\alpha_s$. Concluyendo que las regiones DH, linker y PH son capaces de interaccionar con $G\alpha_s$, aunque con diferencia en la afinidad. Pensando en la posibilidad de generar una secuencia mínima que permita inhibir la interacción de $G\alpha_s$ con PRG, decidimos que la región del linker resultaba la más útil por tener baja homología a otras proteínas (la similitud más cercana es con el linker de p115 y LARG), por lo que se esperaba que su

expresión no afectará de manera indirecta. Al probar la expresión de la región linker de PRG en experimentos de competencia, se confirmó su eficacia para abatir la interacción $G\alpha_s$ -PRG, así como la activación del GEF.

Nuestro propósito era poder validar estos hallazgos en un sistema completamente endógeno. Un trabajo recientemente publicado de nuestro laboratorio, daba cuenta de que las células PAE (células endoteliales porcinas) y las células HT29 (células de adenocarcinoma colorectal humano) resultaban ser un buen modelo para estimular receptores acoplado a Gs (45). La estimulación de receptores, involucra la movilización de RhoGEFs hacia a la membrana, donde las Rho GTPasas se encuentran ancladas por medio de la prenilación que sufren postraducciona, por tanto, nosotros podríamos evaluar los efectos de $G\alpha_s$ sobre PRG endógeno a través de su reclutamiento a la membrana plasmática. En ambas líneas celulares y en respuesta a PGE2 o butaprost (análogo de PGE2), PRG fue reclutado a la membrana como resultados de la estimulación de GPCRs acoplados a Gs.

Los receptores diseñados exclusivamente activados por fármacos diseñados (DREADDs), nos proporcionan la ventaja de ser activados únicamente por el fármaco CNO, además de tener un acople específico a la proteína G para el cual fueron diseñados, algo muy difícil de encontrar en un contexto endógeno donde los GPCRs poseen acople múltiple a las proteínas G, por lo cual estos receptores sintéticos permiten validar los efectos específicos de una proteína G (64).

A través de la expresión de Gs-DREADD y la captura con Cdc42 G15A, observamos una activación dependiente del tiempo de PRG en respuesta al estímulo de CNO, al evaluar si Gi- o Gq-DREADD eran capaces de mostrar el mismo resultado, encontramos que la activación de PRG únicamente ocurre vía Gs-DREADD. Finalmente, probamos si el linker de PRG también era capaz de bloquear la activación de PRG en un contexto de $G\alpha_s$ activado por medio de receptor. La expresión del linker demostró su eficacia para evitar la activación de PRG cuando Gs-DREADD era estimulado, incluso se observó una disminución significativa de los niveles de fosforilación de CREB.

Para validar si los efectos inhibitorios del linker podían afectar la vía $G\alpha_s$ -AMPc-PKA, utilizamos el sistema de células PAE. El linker de PRG consiguió prevenir la fosforilación de sustratos de PKA dependientes de la estimulación con butaprost; sin embargo, el linker no tiene efecto sobre la expresión de la subunidad catalítica de PKA, lo que confirma su actuación a nivel de interacción con $G\alpha_s$. Lo anterior confirma no solo el hecho de que el linker de PRG afecta la interacción de $G\alpha_s$ con PRG, sino que también el linker puede afectar la señalización derivada de $G\alpha_s$ como es la activación de la cinasa PKA.

En resumen, los resultados presentados en esta tesis, reportan la capacidad de PRG de interaccionar y activar a Cdc42, misma que puede ser regulada e incrementada por la interacción con $G\alpha_s$. Esta nueva vía que se describe, es realmente novedosa, hasta este trabajo no contábamos con informes sobre la regulación de este GEF por $G\alpha_s$ y su capacidad de activar directamente a Cdc42. Además, hemos identificado que $G\alpha_s$ tiene puntos de interacción con el dominio DH, la región linker y el dominio PH.

Tomando como referencia las estructuras reportadas del tándem DH/PH de PRG en complejo con RhoA (43) y el de ITSN1 en complejo con Cdc42 (44), podemos inferir un posible mecanismo de cómo la interacción de $G\alpha_s$ con PRG le confiere afinidad al GEF por Cdc42 (figura 21). En el complejo PRG-DH/PH-RhoA el PH participa en la interacción con la GTPasa (65), lo cual hace que el espacio de acceso hacia el dominio DH se vea restringido. Para el caso de ITSN1-DH/PH-Cdc42, el dominio PH no es requerido para el contacto con la GTPasa e incluso la conformación nos muestra que la posición del PH no tiene contacto con Cdc42 (44) (figura 21). Por lo tanto, es factible la hipótesis de que la interacción de $G\alpha_s$ con el tándem DH/PH favorece un cambio conformacional que desplaza el dominio PH, dejando al dominio DH más accesible a la GTPasa Cdc42 (figura 21).

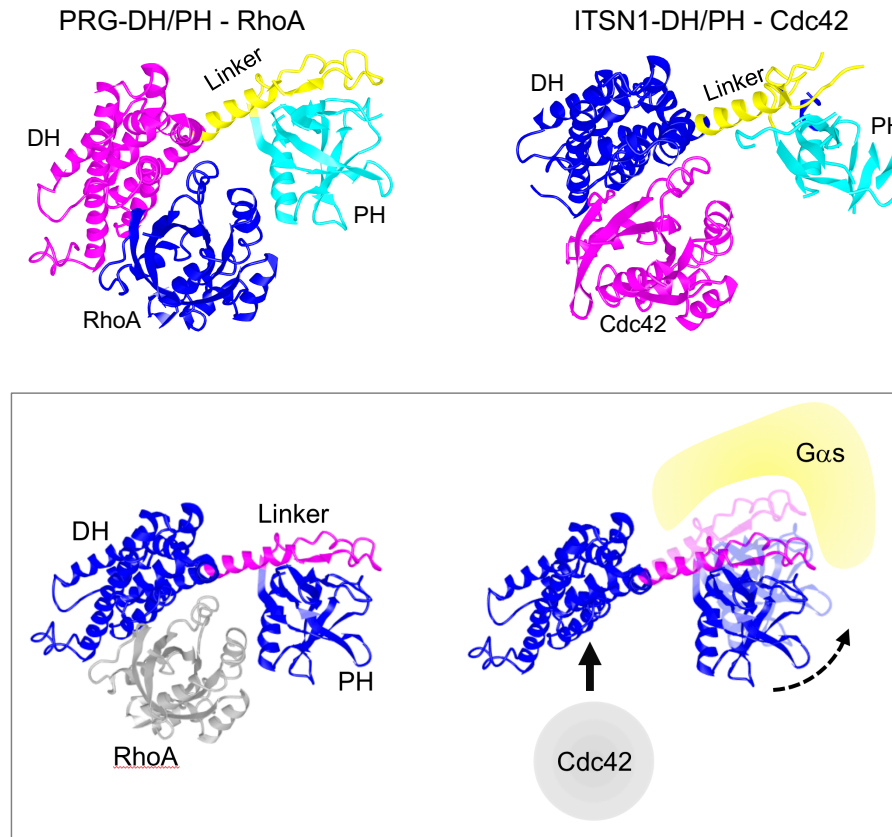


Figura 21. Mecanismo hipotético de la ganancia de afinidad de PRG como resultado de la interacción con $G\alpha_s$. En la parte superior izquierda la estructura del complejo PRG-DH/PH con RhoA y en la parte superior derecha el complejo ITSN1-DH/PH con Cdc42. En la parte inferior el modelo hipotético de como $G\alpha_s$ influye sobre la conformación de PRG, desplazando el dominio PH y permitiendo la accesibilidad de Cdc42 hacia el dominio DH para ser activado. Chen Z., *et al.* (2010) *J Biol Chem*, Snyder JT., *et al.* (2002) *Nat Struct Biol.* y Madej T., *et al.* (2014) *Nucleic Acid Res.*

Lo reportado en esta tesis, ayuda a comprender e imaginar una dinámica de activación de GTPasas donde un mismo RhoGEF, puede regular su afinidad por diferentes GTPasas en función de la vía de activación. La actividad de las diferentes Rho GTPasas no se considera fácilmente sustituible por alguna otra, por lo que se plantea una regulación de la activación espacio-temporal de las GTPasas; donde GEFs, GAPs y GDIs toman el control sobre cuales GTPasas se encuentran activas en cierta área de la célula mientras que esta activación puede variar en otra parte de la misma célula, en función del estímulo específico, en un

tiempo específico, como ocurre con la migración polarizada (66-68). El control de esta regulación espacio-temporal, con los resultados presentados, podría en parte entenderse con el hecho de que ciertos GEFs, como podría ser el caso de PRG, modifican su afinidad por otras GTPasas en función de la proteína G a la cual esta acoplada el receptor que es activado. Estímulos como LPA o trombina que generan fibras de estrés y eventos contráctiles, son resultado de una activación preferencial por RhoA, puesto que los receptores para estos agonistas tienen acoples principalmente con G13. Estímulos como PGE2 activan receptores acoplados a Gs, favoreciendo la afinidad de PRG hacia Cdc42 para generar filopodios en el frente de avance (figura 22).

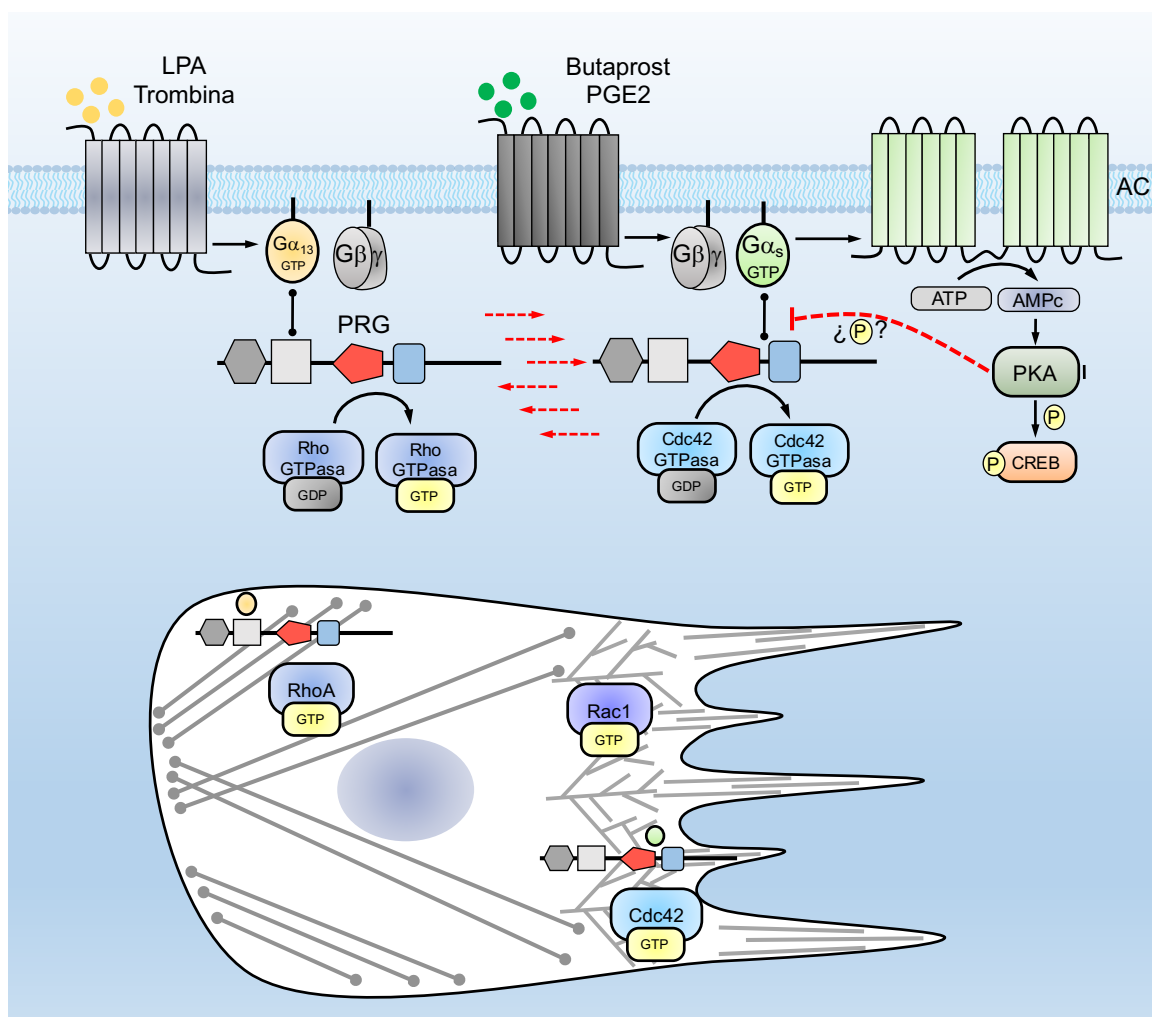


Figura 22. Modelo final de la vía G α_s -PRG-Cdc42. En este modelo se ilustra la vía de señalización G α_{13} -PRG-RhoA y la novedosa vía G α_s -PRG-Cdc42 que reportamos en este trabajo

de tesis doctoral. Elucidamos una nueva forma de activación de PRG a través de la interacción con $G\alpha_s$ que favorece la afinidad del GEF por la GTPasa Cdc42. Aún falta explorar como $G\alpha_{13}$ y $G\alpha_s$ pueden coexistir para regular a PRG en un contexto como es la migración celular polarizada y como la señalización AMPc/PKA puede repercutir sobre PRG activado a través de $G\alpha_s$ (flechas rojas punteadas).

Este trabajo contribuye con datos que permiten entender y seguir explorando como se coordinan las diferentes vías de señalización derivadas de las 4 familias de proteínas G heterotriméricas, regulando de manera precisa la participación de los RhoGEFS sobre la actividad de las GTPasas de Rho.

8) CONCLUSIONES

1. Por medio de una estrategia basada en la generación de variantes constitutivamente activas de RhoGEFs, y su expresión en líneas celulares, identificamos la capacidad de PRG (PDZ RhoGEF) de generar estructuras similares a filopodios. El artículo publicado es el primero que reporta la capacidad de PRG de generar estas estructuras de actina.
2. Demostramos que PRG es capaz de activar a la GTPasa Cdc42 por interacción directa, un hallazgo novedoso puesto que hasta ahora PRG se consideraba un GEF específico para RhoA.
3. Reportamos que PRG es un novedoso efector de la subunidad $G\alpha_s$ de las proteínas G heterotriméricas, y que la interacción entre $G\alpha_s$ -PRG activa al GEF con afinidad hacia Cdc42. También confirmamos que la actividad de cinasa de PKA no es requerida para la vía $G\alpha_s$ >PRG>Cdc42, pero puede tener un carácter inhibitorio sobre la interacción $G\alpha_s$:PRG y la afinidad de PRG hacia Cdc42.
4. El mapeo de las regiones de interacción de $G\alpha_s$ con el tándem DH/PH de PRG, permitieron identificar al linker de PRG como la mínima región de interacción y se demostró su capacidad de actuar como un inhibidor de la interacción $G\alpha_s$ -PRG, así como de la señalización canónica de $G\alpha_s$.
5. La estimulación de receptores endógenos acoplados a Gs y Gs-DREADDs son susceptibles de activar a PRG en diferentes líneas celulares.

El presente trabajo de doctorado, a través de una estrategia de RhoGEFs constitutivamente activos para identificar GEFs con potencial angiogénico, permitió identificar la capacidad de PRG de activar a Cdc42 y de interaccionar con $G\alpha_s$, lo cual integra una novedosa vía $G\alpha_s$ >PRG>Cdc42.

9) PERSPECTIVAS

1. Explorar como $G\alpha_{13}$ y $G\alpha_s$ podrían, en conjunto regular la activación y especificidad de PRG en contextos como la migración celular, donde existe una regulación espacio-temporal de la activación de Cdc42, Rac1 y RhoA.
2. Estudiar el papel de la señalización de AMPc/PKA sobre la regulación de PRG, esto como un posible circuito de activación de PRG por $G\alpha_s$ e inhibición por PKA.
3. Determinar el significado funcional de posibles fosforilaciones del tándem DH/PH por parte de PKA, así como identificar el o los sitios donde ocurren las fosforilaciones.
4. Conocer el significado funcional de la interacción de $G\alpha_q$ con PRG-DH/PH, con enfoque en la posible regulación de otras GTPasas de Rho diferentes a Cdc42 o RhoA.
5. Estudiar la importancia de la vía $G\alpha_s$ >PRG>Cdc42 en modelos de migración celular y angiogénesis tumoral.
6. Determinar si PRG contribuye al carácter oncogénico de las mutaciones del gen de $G\alpha_s$.
7. Explorar la posibilidad de que p115-RhoGEF y LARG también puedan ser regulados por $G\alpha_s$, esto como resultado de que se detectó la asociación de $G\alpha_s$ con el DH/PH de estos RGS-RhoGEFs.

10) BIBLIOGRAFÍA

1. Adair TH, Montani JP. Angiogenesis. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. Chapter 1, Overview of Angiogenesis.
2. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249-257.
3. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011;146(6):873-887.
4. Viallard C, Larrivé B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*. 2017;20(4):409-426.
5. Svitkina T. The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(1):018267.
6. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 2003;302(5651):1704-1709.
7. Suarez C, Kovar DR. Internetwork competition for monomers governs actin cytoskeleton organization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(12):799-810.
8. Rottner K, Faix J, Bogdan S, Linder S, Kerkhoff E. Actin assembly mechanisms at a glance. *J Cell Sci*. 2017;130(20):3427-3435.
9. Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, Plastino J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev*. 2014;94(1):235-263.
10. Naumanen P, Lappalainen P, Hotulainen P. Mechanisms of actin stress fibres assembly. *J Microsc*. 2008;231(3):446-454.
11. Hall A. Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans*. 2012;40(6):1378-1382.
12. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*. 1992;70(3):401-410.
13. Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. 1992;70(3):389-399.
14. Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell*. 2004;116(2):167-179.

15. Clayton, N. S., & Ridley, A. J. Targeting Rho GTPase Signaling Networks in Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020; 8, (222).
16. Cherfils J, Zeghouf M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev*. 2013;93(1):269-309.
17. Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins [published correction appears in Cell. 2007 Jul 27;130(2):385]. *Cell*. 2007;129(5):865-877.
18. Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, Der CJ. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer*. 2010;10(12):842-857.
19. Hernández-Vásquez MN, Adame-García SR, Hamoud N, et al. Cell adhesion controlled by adhesion G protein-coupled receptor GPR124/ADGRA2 is mediated by a protein complex comprising intersectins and Elmo-Dock. *J Biol Chem*. 2017;292(29):12178-12191.
20. Shankaranarayanan A, Boguth CA, Lutz S, et al. Galpha q allosterically activates and relieves autoinhibition of p63RhoGEF. *Cell Signal*. 2010;22(7):1114-1123.
21. Rojas RJ, Yohe ME, Gershburg S, Kawano T, Kozasa T, Sondek J. Galphaq directly activates p63RhoGEF and Trio via a conserved extension of the Dbl homology-associated pleckstrin homology domain. *J Biol Chem*. 2007;282(40):29201-29210.
22. Yu B, Martins IR, Li P, et al. Structural and energetic mechanisms of cooperative autoinhibition and activation of Vav1. *Cell*. 2010;140(2):246-256.
23. Sugiyama K, Tago K, Matsushita S, et al. Heterotrimeric G protein G α s subunit attenuates PLEKHG2, a Rho family-specific guanine nucleotide exchange factor, by direct interaction. *Cell Signal*. 2017; 32:115-123.
24. Hernández-García R, Iruela-Arispe ML, Reyes-Cruz G, Vázquez-Prado J. Endothelial RhoGEFs: A systematic analysis of their expression profiles in VEGF-stimulated and tumor endothelial cells. *Vascul Pharmacol*. 2015; 74:60-72.

25. Sternweis PC, Carter AM, Chen Z, Danesh SM, Hsiung YF, Singer WD. Regulation of Rho guanine nucleotide exchange factors by G proteins. *Adv Protein Chem.* 2007; 74:189-228.
26. Bhattacharya M, Babwah AV, Ferguson SS. Small GTP-binding protein-coupled receptors. *Biochem Soc Trans.* 2004;32(Pt 6):1040-1044.
27. Strathmann M, Wilkie TM, Simon MI. Diversity of the G-protein family: sequences from five additional alpha subunits in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(19):7407-7409.
28. Chan AM, Fleming TP, McGovern ES, Chedid M, Miki T, Aaronson SA. Expression cDNA cloning of a transforming gene encoding the wild-type G alpha 12 gene product. *Mol Cell Biol.* 1993;13(2):762-768.
29. Xu N, Bradley L, Ambdukar I, Gutkind JS. A mutant alpha subunit of G12 potentiates the eicosanoid pathway and is highly oncogenic in NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(14):6741-6745.
30. Xu N, Voino-Yasenetskaya T, Gutkind JS. Potent transforming activity of the G13 alpha subunit defines a novel family of oncogenes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;201(2):603-609.
31. Riobo NA, Manning DR. Receptors coupled to heterotrimeric G proteins of the G12 family. *Trends Pharmacol Sci.* 2005;26(3):146-154.
32. Fukuhara S, Murga C, Zohar M, Igishi T, Gutkind JS. A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J Biol Chem.* 1999;274(9):5868-5879.
33. Hart MJ, Jiang X, Kozasa T, et al. Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. *Science.* 1998;280(5372):2112-2114.
34. Chikumi H, Barac A, Behbahani B, et al. Homo- and hetero-oligomerization of PDZ-RhoGEF, LARG and p115RhoGEF by their C-terminal region regulates their in vivo Rho GEF activity and transforming potential. *Oncogene.* 2004;23(1):233-240.

35. Girkontaite I, Missy K, Sakk V, et al. Lsc is required for marginal zone B cells, regulation of lymphocyte motility and immune responses. *Nat Immunol.* 2001; 2(9):855-862.
36. Chang YJ, Pownall S, Jensen TE, et al. The Rho-guanine nucleotide exchange factor PDZ-RhoGEF governs susceptibility to diet-induced obesity and type 2 diabetes. *Elife.* 2015; 4:e06011.
37. Wirth A, Benyó Z, Lukasova M, et al. G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension [published correction appears in *Nat Med.* 2008 Feb;14(2):222]. *Nat Med.* 2008;14(1):64-68.
38. Mikelis CM, Palmby TR, Simaan M, et al. PDZ-RhoGEF and LARG are essential for embryonic development and provide a link between thrombin and LPA receptors and Rho activation. *J Biol Chem.* 2013;288(17):12232-12243.
39. Guilluy C, Dubash AD, García-Mata R. Analysis of RhoA and Rho GEF activity in whole cells and the cell nucleus. *Nat Protoc.* 2011;6(12):2050-2060.
40. Singh NK, Janjanam J, Rao GN. p115 RhoGEF activates the Rac1 GTPase signaling cascade in MCP1 chemokine-induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation. *J Biol Chem.* 2017;292(34):14080-14091.
41. Lawson CD, Ridley AJ. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J Cell Biol.* 2018;217(2):447-457.
42. Chávez-Vargas L, Adame-García SR, Cervantes-Villagrana RD, et al. Protein Kinase A (PKA) Type I Interacts with P-Rex1, a Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor: EFFECT ON PKA LOCALIZATION AND P-Rex1 SIGNALING. *J Biol Chem.* 2016;291(12):6182-6199.
43. Chen Z, Medina F, Liu MY, Thomas C, Sprang SR, Sternweis PC. Activated RhoA binds to the pleckstrin homology (PH) domain of PDZ-RhoGEF, a potential site for autoregulation. *J Biol Chem.* 2010;285(27):21070-21081.
44. Snyder JT, Worthylake DK, Rossman KL, et al. Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors. *Nat Struct Biol.* 2002;9(6):468-475.

45. Adame-García SR, Cervantes-Villagrana RD, Orduña-Castillo LB, et al. cAMP-dependent activation of the Rac guanine exchange factor P-REX1 by type I protein kinase A (PKA) regulatory subunits. *J Biol Chem*. 2019;294(7):2232-2246.
46. Conklin BR, Hsiao EC, Claeysen S, et al. Engineering GPCR signaling pathways with RASSLs. *Nat Methods*. 2008;5(8):673-678.
47. Viaud J, Gaits-Iacovoni F, Payrastré B. Regulation of the DH-PH tandem of guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases by phosphoinositides. *Adv Biol Regul*. 2012;52(2):303-314.
48. Rossman KL, Sondek J. Larger than Dbl: new structural insights into RhoA activation. *Trends Biochem Sci*. 2005;30(4):163-165.
49. Baumeister MA, Rossman KL, Sondek J, Lemmon MA. The Dbs PH domain contributes independently to membrane targeting and regulation of guanine nucleotide-exchange activity. *Biochem J*. 2006;400(3):563-572.
50. Hoffman GR, Cerione RA. Signaling to the Rho GTPases: networking with the DH domain. *FEBS Lett*. 2002;513(1):85-91.
51. Chhatriwala MK, Betts L, Worthylake DK, Sondek J. The DH and PH domains of Trio coordinately engage Rho GTPases for their efficient activation. *J Mol Biol*. 2007;368(5):1307-1320.
52. Kozasa T, Jiang X, Hart MJ, et al. p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Gα12 and Gα13. *Science*. 1998;280(5372):2109-2111.
53. Mao J, Yuan H, Xie W, Wu D. Guanine nucleotide exchange factor GEF115 specifically mediates activation of Rho and serum response factor by the G protein alpha subunit Gα13. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(22):12973-12976.
54. Chen Z, Singer WD, Danesh SM, Sternweis PC, Sprang SR. Recognition of the activated states of Gα13 by the rgRGS domain of PDZRhoGEF. *Structure*. 2008;16(10):1532-1543.
55. Suzuki N, Tsumoto K, Hajicek N, et al. Activation of leukemia-associated RhoGEF by Gα13 with significant conformational rearrangements in the interface. *J Biol Chem*. 2009;284(8):5000-5009.

56. Kreutz B, Hajicek N, Yau DM, Nakamura S, Kozasa T. Distinct regions of Gα13 participate in its regulatory interactions with RGS homology domain-containing RhoGEFs. *Cell Signal*. 2007;19(8):1681-1689.
57. Zheng M, Cierpicki T, Momotani K, et al. On the mechanism of autoinhibition of the RhoA-specific nucleotide exchange factor PDZ-RhoGEF. *BMC Struct Biol*. 2009;9:36.
58. Bielnicki JA, Shkumatov AV, Derewenda U, Somlyo AV, Svergun DI, Derewenda ZS. Insights into the molecular activation mechanism of the RhoA-specific guanine nucleotide exchange factor, PDZRhoGEF. *J Biol Chem*. 2011;286(40):35163-35175.
59. Jaiswal M, Gremer L, Dvorsky R, et al. Mechanistic insights into specificity, activity, and regulatory elements of the regulator of G-protein signaling (RGS)-containing Rho-specific guanine nucleotide exchange factors (GEFs) p115, PDZ-RhoGEF (PRG), and leukemia-associated RhoGEF (LARG). *J Biol Chem*. 2011;286(20):18202-18212.
60. Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(6):446-454.
61. Jaiswal M, Dvorsky R, Ahmadian MR. Deciphering the molecular and functional basis of Dbl family proteins: a novel systematic approach toward classification of selective activation of the Rho family proteins. *J Biol Chem*. 2013;288(6):4486-4500.
62. Chen Z, Guo L, Hadas J, Gutowski S, Sprang SR, Sternweis PC. Activation of p115-RhoGEF requires direct association of Gα13 and the Dbl homology domain. *J Biol Chem*. 2012;287(30):25490-25500.
63. Neves SR, Ram PT, Iyengar R. G protein pathways. *Science*. 2002;296(5573):1636-1639.
64. Kamp ME, Liu Y, Kortholt A. Function and Regulation of Heterotrimeric G Proteins during Chemotaxis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(1):90. Published 2016 Jan 14.
65. Derewenda U, Oleksy A, Stevenson AS, et al. The crystal structure of RhoA in complex with the DH/PH fragment of PDZRhoGEF, an activator of the Ca²⁺ sensitization pathway in smooth muscle. *Structure*. 2004;12(11):1955-1965.

66. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 2002;420(6916):629-635.
67. Kiyokawa E, Aoki K, Nakamura T, Matsuda M. Spatiotemporal regulation of small GTPases as revealed by probes based on the principle of Förster 67. Resonance Energy Transfer (FRET): Implications for signaling and pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2011;51:337-358.
68. Mayor R, Etienne-Manneville S. The front and rear of collective cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(2):97-109.



Protein Kinase A (PKA) Type I Interacts with P-Rex1, a Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor

EFFECT ON PKA LOCALIZATION AND P-Rex1 SIGNALING*

Received for publication, December 22, 2015. Published, JBC Papers in Press, January 21, 2016, DOI 10.1074/jbc.M115.712216

Lydia Chávez-Vargas^{+1,2}, Sendi Rafael Adame-García^{§1,2}, Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana⁺², Alejandro Castillo-Kauil^{§2}, Jessica G. H. Bruystens[¶], Shigetomo Fukuhara^{||}, Susan S. Taylor^{¶**}, Naoki Mochizuki^{||}, Guadalupe Reyes-Cruz[§], and José Vázquez-Prado⁺³

From the Departments of ⁺Pharmacology and [§]Cell Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Mexico City, 07360 Mexico, ^{||}Department of Cell Biology, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute (NCVC), Osaka, 565-8565 Japan, and Departments of [¶]Chemistry and Biochemistry and ^{**}Pharmacology, University of California San Diego, La Jolla, California 92093

Morphology of migrating cells is regulated by Rho GTPases and fine-tuned by protein interactions and phosphorylation. PKA affects cell migration potentially through spatiotemporal interactions with regulators of Rho GTPases. Here we show that the endogenous regulatory (R) subunit of type I PKA interacts with P-Rex1, a Rac guanine nucleotide exchange factor that integrates chemotactic signals. Type I PKA holoenzyme interacts with P-Rex1 PDZ domains via the CNB B domain of RI α , which when expressed by itself facilitates endothelial cell migration. P-Rex1 activation localizes PKA to the cell periphery, whereas stimulation of PKA phosphorylates P-Rex1 and prevents its activation in cells responding to SDF-1 (stromal cell-derived factor 1). The P-Rex1 DEP₁ domain is phosphorylated at Ser-436, which inhibits the DH-PH catalytic cassette by direct interaction. In addition, the P-Rex1 C terminus is indirectly targeted by PKA, promoting inhibitory interactions independently of the DEP₁-PDZ₂ region. A P-Rex1 S436A mutant construct shows increased RacGEF activity and prevents the inhibitory effect of forskolin on sphingosine 1-phosphate-dependent endothelial cell migration. Altogether, these results support the idea that P-Rex1 contributes to the spatiotemporal localization of type I PKA, which tightly regulates this guanine exchange factor by a multistep mechanism, initiated by interaction with the PDZ domains of P-Rex1 followed by direct phosphorylation at the first DEP domain and putatively indirect regulation of the C terminus, thus promoting inhibitory intramolecular interactions. This reciprocal regulation between PKA and P-Rex1 might represent a key node of integration by which chemotactic signaling is fine-tuned by PKA.

Rho guanine exchange factors (RhoGEFs)⁴ are mechanistically linked to fundamental cellular processes, such as migra-

tion, adhesion, and morphogenesis. Based on their ability to integrate signaling inputs that result in the activation of Rho GTPases, RhoGEFs indirectly contribute to establish nucleation sites for actin polymerization, thus exerting a tight control on cytoskeleton dynamics (1, 2). RhoGEFs can also play a role as scaffolds of different signaling cascades, thus representing regulatory nodes for spatial and temporal control of signaling (3). These fundamental processes are fine-tuned by phosphorylation of RhoGEFs. However, the complex interplay between RhoGEFs and kinases is not completely understood; relevant examples include RhoGEFs known to be activated or inhibited by phosphorylation, some of them by PKA (4, 5).

The ability of PKA to modulate the activity of RhoGEFs might be further facilitated by direct interactions that would also influence the subcellular localization of PKA and its accessibility to specific substrates. The paradigmatic example of this situation is AKAP-Lbc, which is a RhoGEF activated by G₁₂-coupled receptors that promotes polymerization of actin filaments downstream of Rho and also interacts with multiple kinases regulating mitogenic inputs (6, 7). AKAP-Lbc interacts with KSR-1, a scaffold of the ERK1/2 signaling cascade, allowing PKA bound to AKAP-Lbc to enhance control of this mitogenic pathway in response to cyclic AMP (8, 9). Although type II PKA translocates to the leading edge of migrating fibroblasts (10), the binding partners that restrict the kinase to this location are currently undefined. Moreover, whether type I PKA regulates RhoGEFs through direct interactions during a chemotactic response is currently unknown, although this possibility might help to explain the apparent paradox according to which PKA either activates (11–14) or inhibits (15–19) cell migration, depending on the chemoattractant and cell type.

P-Rex1 is a multidomain Rac guanine nucleotide exchange factor involved in chemotactic migration of normal and meta-

* This work was supported by CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico) Grants 152434 (to J. V.-P.) and 240119 (to G. R.-C.).

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Supported by fellowships from CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico).

³ To whom correspondence should be addressed: Dept. of Pharmacology, CINVESTAV-IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508. Col. San Pedro Zacatenco, 07360 México, D.F., Mexico. Tel.: 52-55-5747-3380; Fax: 52-55-5747-3394; E-mail: jvazquez@cinvestav.mx.

⁴ The abbreviations used are: RhoGEF, Rho guanine exchange factor; GEF, guanine nucleotide exchange factor; P-Rex1, phosphatidylinositol 3,4,5-

trisphosphate-dependent Rac exchanger 1 protein; PRKAR1 α , cAMP-dependent protein kinase type I- α regulatory subunit; PRKACA, cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit α ; AKAP, A-kinase anchoring protein; PKAS, PKA substrate; pCREB, (phospho)-cAMP response element binding; S1P, sphingosine 1-phosphate; DEP, Dishevelled, Egl-10, and Pleckstrin; PDZ domains, mTOR, mammalian target of rapamycin; SDF-1, stromal cell-derived factor 1; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; PAE, porcine aortic endothelial; DH, homology domain; PH, pleckstrin homology; IBMX, isobutylmethylxanthine; EGFP, enhanced GFP; CNB B, cyclic nucleotide-binding domain B.



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Molecular Cell Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamcr

Zonula occludens-2 regulates Rho proteins activity and the development of epithelial cytoarchitecture and barrier function

Arturo Raya-Sandino^a, Alejandro Castillo-Kauil^f, Alaide Domínguez-Calderón^a, Lourdes Alarcón^a, David Flores-Benitez^c, Francisco Cuellar-Perez^a, Bruno López-Bayghen^d, Bibiana Chávez-Munguía^e, José Vázquez-Prado^b, Lorenza González-Mariscal^{a,*}

^a Department of Physiology, Biophysics and Neuroscience, Center for Research and Advanced Studies (Cinvestav), México D.F. 07360, Mexico

^b Department of Pharmacology, Center for Research and Advanced Studies (Cinvestav), México D.F. 07360, Mexico

^c Max-Planck-Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, 01307 Dresden, Germany

^d Department of Toxicology, Center for Research and Advanced Studies (Cinvestav), México D.F. 07360, Mexico

^e Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis, Center for Research and Advanced Studies (Cinvestav), México D.F. 07360, Mexico

^f Department of Cell Biology, Center for Research and Advanced Studies (Cinvestav), México D.F. 07360, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Tight junction
ZO-2
Rho GTPases
Cofilin
Cingulin
GEF-H1

ABSTRACT

Silencing *Zonula occludens 2* (ZO-2), a tight junctions (TJ) scaffold protein, in epithelial cells (MDCK ZO-2 KD) triggers: 1) Decreased cell to substratum attachment, accompanied by reduced expression of claudin-7 and integrin $\beta 1$, and increased vinculin recruitment to focal adhesions and stress fibers formation; 2) Lowered cell-cell aggregation and appearance of wider intercellular spaces; 3) Increased RhoA/ROCK activity, mediated by GEF-H1 recruitment to cell borders by cingulin; 4) Increased Cdc42 activity, mitotic spindle disorientation and the appearance of cysts with multiple lumens; 5) Increased Rac and cofilin activity, multiple lamellipodia formation and random cell migration but increased wound closure; 6) Diminished cingulin phosphorylation and disappearance of planar network of microtubules at the TJ region; and 7) Increased transepithelial electrical resistance at steady state, coupled to an increased expression of ZO-1 and claudin-4 and a decreased expression of claudin-2 and paracingulin. Hence, ZO-2 is a crucial regulator of Rho proteins activity and the development of epithelial cytoarchitecture and barrier function.

1. Introduction

In multicellular organisms, epithelia constitute the frontier between the *interior milieu* and the environment. Epithelial cells display as a distinguishing feature, at the uppermost portion of their lateral membranes, a structure called tight junction (TJ) that regulates the passage of ions and molecules through the paracellular pathway. TJs are formed by various integral proteins like occludin, tricellulin and JAMs that establish cell-cell contact at the intercellular space, and by claudins that form the paracellular pores or barriers responsible for ionic selectivity in each tissue (for review see [1]).

These transmembrane proteins are associated at the cytoplasmic face with a complex array of proteins, including cingulin, paracingulin and several members of the family of membrane-associated guanylate kinase homologs (MAGUK) [for review see [2,3]]. This family includes the *Zonula occludens* (ZO) proteins ZO-1, -2 and -3, which contain PDZ, SH3 and GUK domains that allow them to bind to a wide variety of

proteins, including the integral proteins of the TJ [4–8], connexins of gap junctions [9–12], α -catenin of adherens junctions [13], and signaling molecules like kinases [14]. In addition, these proteins contain actin-binding regions that associate to actin [15,16] and to actin binding proteins like 4.1 [17] and cortactin [18]. This configuration thus allows ZO proteins to act as bridges that physically link transmembrane TJ proteins to the apical cytoskeleton of F-actin and myosin II (actomyosin).

The movement of ions and molecules through the TJ depends on both the charge and size of the solute. Those smaller than 4 Å in radius, pass through claudin based pores [19,20], whereas larger solutes move as the contractile tone of the apical cytoskeleton increases and expands the intercellular space (for review see [21]). The contractility of the actomyosin apical ring is regulated by protein RhoA [22] that activates Rho kinase (ROCK), which phosphorylates the myosin II regulatory light chain (MLC2) [23]. In addition, MLC2 is phosphorylated by the MLC kinase (MLCK) [24], and ROCK can increase MLC2

* Corresponding author at: Department of Physiology, Biophysics and Neuroscience, Center for Research and Advanced Studies (Cinvestav), Ave IPN 2508, México D.F. 07360, Mexico.
E-mail address: lorenza.goma@gmail.com (L. González-Mariscal).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.05.016>

Received 18 August 2016; Received in revised form 18 May 2017; Accepted 24 May 2017
Available online 26 May 2017

0167-4889/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Endothelial cell sprouting driven by RhoJ directly activated by a membrane-anchored Intersectin 1 (ITSN1) RhoGEF module

Víctor Manuel Color-Aparicio^a, Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana^a,
Irving García-Jiménez^b, Yarely Mabel Beltrán-Navarro^a, Alejandro Castillo-Kauli^b,
Estanislao Escobar-Islas^a, Guadalupe Reyes-Cruz^b, José Vázquez-Prado^{a,*}

^a Departments of Pharmacology, CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico

^b Departments of Cell Biology, CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico



ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 December 2019

Accepted 11 January 2020

Available online 21 January 2020

Keywords:

RhoJ

Intersectin

DH-PH catalytic module

RhoGEF

Rho GTPase

Endothelial cell sprouting

ABSTRACT

Endothelial cell sprouting is a critical event in tumor-induced angiogenesis. In melanoma and lung cancer murine models, targeting RhoJ prevents endothelial sprouting, tumor growth and metastasis and enhances the effects of conventional anti-neoplastic therapy. Aiming to understand how RhoJ is activated, we used a gain of function approach to identify constitutively active Rho guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs) able to promote RhoJ-dependent actin-driven membrane protrusions. We demonstrate that a membrane-anchored Intersectin 1 (ITSN1) DH-PH construct promotes endothelial cell sprouting via RhoJ. Mechanistically, this is controlled by direct interaction between the catalytic ITSN1 DH-PH module and RhoJ, it is sensitive to phosphorylation by focal adhesion kinase (FAK) and to endosomal trapping of the ITSN1 construct by dominant negative RhoJ. This ITSN1/RhoJ signaling axis is independent of Cdc42, a previously characterized ITSN1 target and a RhoJ close homologue. In conclusion, our results elucidate an ITSN1/RhoJ molecular link able to promote endothelial cell sprouting and set the basis to explore this signaling pathway in the context of tumor-induced angiogenesis.

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cancer progression is facilitated by angiogenic factors within the tumor microenvironment that guide adjacent capillaries to generate new blood vessels sustaining tumor growth and dissemination [1,2]. Endothelial cell sprouting, a major morphological marker of tumor induced angiogenesis, is characterized by dynamic adjustments of endothelial cell shape [2]. The whole process is controlled by Rho GTPases, active in the GTP-bound form. These molecular switches are subjected to cycles of activation and inactivation depending on guanine nucleotide exchange and hydrolysis. They are turned on by guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs), which are multidomain signaling effectors that integrate angiogenic cascades via multiple regulatory mechanisms, including interactions with integral plasma membrane proteins and

phosphoinositides [3]. Upon conformational changes, RhoGEFs expose their catalytic DH-PH tandem domains to directly interact with their cognate GTPases [4]. Given the existence of multiple RhoGEFs and RhoGTPases expressed in endothelial cells, a fundamental challenge is to identify which RhoGEF, among dozens present in a cell, activate any given Rho GTPase [5]. Progress in this field will advance our current understanding on how endothelial cell sprouting is dynamically controlled during tumor-induced angiogenic processes.

RhoJ promotes endothelial sprouting in tumor-induced angiogenesis, facilitating tumor growth and metastasis [6]. This small Rho GTPase, phylogenetically close to Cdc42, is enriched in tumor endothelial cells and protumoral bone marrow-derived cells [6,7]. In melanoma and lung cancer mice models, targeting RhoJ prevents tumor growth and metastasis and enhances the therapeutic effect of vascular disrupting agents [6]. Therefore, since inhibition of endothelial sprouting during angiogenic processes is the goal of anti-angiogenic therapies, revealing the identity of RhoJ activators defines a promising avenue to characterize potential anti-angiogenic targets.

Our current efforts are aimed to understand the molecular basis

* Corresponding author. Department of Pharmacology, CINVESTAV-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, 14740, Mexico City, Mexico.

E-mail address: jvazquez@cinvestav.mx (J. Vázquez-Prado).

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.068>

0006-291X/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

G α_s directly drives PDZ-RhoGEF signaling to Cdc42

Alejandro Castillo-Kauil¹, Irving García-Jiménez¹, Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana²,
Sendi Rafael Adame-García², Yarely Mabel Beltrán-Navarro², J. Silvio Gutkind³,
Guadalupe Reyes-Cruz¹ and José Vázquez-Prado^{2*}

Departments of ¹Cell Biology and ²Pharmacology, CINVESTAV-IPN, Mexico City, MEXICO.
³Moore's Cancer Center and Department of Pharmacology, UCSD, La Jolla, CA, USA.

Running title: G α_s activates Cdc42 via PDZ-RhoGEF

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

Keywords: PDZ-RhoGEF (PRG), ARHGEF11, DH/PH catalytic module, Rho guanine nucleotide exchange factor (RhoGEF), Rho GTPases, Cdc42, G α_s , Cell Signaling, GPCR.

Abstract

G α proteins promote dynamic adjustments of cell shape directed by actin cytoskeleton reorganization via their respective RhoGEF effectors. For example, G α_{13} binding to the RGS-homology (RH) domains of several RH-RhoGEFs allosterically activates these proteins, causing them to expose their catalytic DH/PH regions, which triggers downstream signals. However, whether additional G α proteins might directly regulate the RH-RhoGEFs was not known. To explore this question, we first examined the morphological effects of expressing shortened RH-RhoGEF DH/PH constructs of p115RhoGEF/ARHGEF1, PDZ-RhoGEF (PRG)/ARHGEF11 and LARG/ARHGEF12. As expected, the three constructs promoted cell contraction and activated RhoA, known to be downstream of G α_{13} . Intriguingly, PRG DH/PH also induced filopodia-like cell protrusions and activated Cdc42. This

pathway was stimulated by constitutively active G α_s (G α_s Q227L) which enabled endogenous PRG to gain affinity for Cdc42. A chemogenetic approach revealed that signaling by Gs-coupled receptors, but not by those coupled to Gi or Gq, enabled PRG to bind Cdc42. This receptor-dependent effect as well as CREB phosphorylation were blocked by a construct derived from the PRG:G α_s -binding region, PRG-linker. Active G α_s interacted with isolated PRG DH and PH domains and their linker. In addition, this construct interfered with G α_s Q227L's ability to guide PRG's interaction with Cdc42. Endogenous Gs-coupled prostaglandin receptors stimulated PRG binding to membrane fractions and activated signaling to PKA, and this canonical endogenous pathway was attenuated by PRG-linker. Altogether, our results demonstrate that active G α_s can recognize PRG as a novel effector directing its DH/PH catalytic module to gain affinity for Cdc42.

Introduction

Migrating cells follow extracellular cues that guide dynamic protrusions and contractions (1,2). At the plasma membrane, phosphoinositides and signaling proteins allosterically activate Rho guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs) exposing their catalytic DH/PH modules, composed by Dbl-homology and Pleckstrin-homology domains in tandem (3-5). RhoGEFs stimulate their cognate GTPases to exchange GDP for GTP, orchestrating cytoskeleton remodeling pathways (6,7). RhoA promotes the assembly of stress fibers and contractile actomyosin structures, whereas Rac and Cdc42 lead the extension of actin-driven plasma membrane protrusions known as lamellipodia and filopodia, respectively (8). Although these Rho GTPases exhibit contrasting effects, they can be alternatively activated at edges of moving cells (9). Therefore, fine-tuning mechanisms are likely involved.

Several RhoGEFs are effectors of heterotrimeric G proteins (3,10,11). GTP-bound G α_{13} and G α_q proteins stimulate RhoA, whereas G $\beta\gamma$ activates Rac and Cdc42 (3,10,12). G $\beta\gamma$ signaling to Rac is itself directly regulated by G α_{13} and G α_q (13). GTP-G α_{13} proteins allosterically activate RH-RhoGEFs (p115RhoGEF, PDZ-RhoGEF (PRG) and LARG (3,14,15). The mechanism involves direct interaction of G α_{13} with the RhoGEF RGS-homology (RH) domain which in consequence exposes the catalytic DH/PH cassette (16,17). The DH domain activates RhoA and it is positively modulated by the PH domain (6,18). Here, we investigated whether PRG DH/PH catalytic module is directly targeted by additional G α proteins.

Results

Membrane-anchored PRG-DH/PH promotes cell contraction and formation of filopodia-like protrusions- RH-RhoGEFs are potent activators of RhoA, which generally counteracts cell protruding processes led by Rac and Cdc42 (3,9). To characterize potential regulatory mechanisms directly targeting RH-RhoGEF DH/PH domains, we first analyzed the cellular effects of membrane-anchored, EGFP-tagged, p115RhoGEF-DH/PH, PRG-DH/PH and LARG-DH/PH constructs (Fig. 1A). Their morphological effects, assessed by confocal microscopy of transfected endothelial cells (Fig. 1B), revealed the assembly of actin stress fibers, as expected for RhoA activity (8). Intriguingly, about 50% of cells expressing PRG-DH/PH also induced actin-based thin protrusions (Fig. 1B and 1C), reminiscent of Cdc42-induced filopodia (19).

PRG-DH/PH catalytic module stimulates Cdc42- Consistent with its morphological effects, PRG-DH/PH significantly stimulated Cdc42 (Fig. 1E). In contrast, all three RH-RhoGEF EGFP-DH/PH-CAAX constructs stimulated RhoA (Fig. 1F). Furthermore, recombinant nucleotide-free Cdc42-G15A, used to isolate active Cdc42-GEFs (20), pulled-down PRG-DH/PH, and to a lesser extent p115RhoGEF-DH/PH (Fig. 1G, left panel); whereas RhoA-G17A pulled-down the three constructs (Fig. 1G, central panel). Furthermore, cotransfected into HEK293T cells, GST-PRG-DH/PH interacted with Cdc42-T17N, a dominant negative mutant (Fig. 1H).

Constitutively active G α_s -Q227L increases PRG-DH/PH activity towards Cdc42- The mechanistic basis of p63RhoGEF and TRIO activation by G α_q (21,22) inspired us to assess whether GTPase-deficient G α -

QL mutants bind PRG DH/PH to stimulate Cdc42 (Fig. 2A). By pull-down assays, we revealed that G α_s -Q227L significantly increased PRG-DH/PH interaction with Cdc42-G15A (Fig. 2B) without affecting its interaction with RhoA-G17A (Fig. 2C). G α_s -Q227L was also detected in the pull-down assay (Fig. 2B), depending on the presence of PRG-DH/PH (Fig. 2D). In HEK293T cells, G α_s -QL interacted with PRG-DH/PH (Fig. 2E) as well as with other RH-RhoGEFs (Fig. 2F), as revealed by pull-down assays using GST-DH/PH constructs. In contrast, G α_{13} -QL, known to interact with RGS-like domain of RH-RhoGEFs (14,23), was absent in the GST-DH/PH pull-downs (Fig. 2F). We also found that G α_q -QL interacted with PRG-DH/PH (Fig. 2E); however, it did not affect PRG-DH/PH:Cdc42 binding (Fig. 2B). Consistent with a functional effect, G α_s -QL stimulated PRG-DH/PH to activate Cdc42 (Fig. 2G, top panel and graph) and remained bound to the PRG-DH/PH construct pulled-down with nucleotide-free Cdc42 (Fig. 2B, 2D and 2G, middle panel). Furthermore, the interaction of PRG DH/PH with Cdc42-T17N was further stimulated by G α_s -QL (Fig. 2H).

G α_s -Q227L drives full-length PRG to interact with Cdc42. To address whether full-length PRG is sensitive to be driven by G α_s -QL to gain affinity for Cdc42, we used lysates from transfected HEK293T cells. We found that G α_s -QL stimulated full-length PRG, either transfected (Fig. 2I) or endogenous (Fig. 2J), to bind Cdc42. Furthermore, G α_s -QL remained bound to PRG pulled-down with nucleotide-free Cdc42. Expression of transfected and endogenous proteins was confirmed in total cell lysates (Fig. 2C-J, TCL).

G α_s -Q227L interaction interface at PRG involves the DH and PH domains and the

linker region joining them. To characterize how G α_s -Q227L binds PRG-DH/PH guiding this prototypic RhoA-specific GEF to interact with Cdc42, we cotransfected G α_s -Q227L with different PRG constructs spanning the DH/PH module, fused to GST (Fig. 3A), and addressed by pull down their potential interaction. As shown in Figure 3B, G α_s -QL interacted with the three PRG-DH/PH constructs which had in common the linker region that joins the DH and PH domains. When PRG-DH, -linker and -PH were used as independent constructs, the three of them interacted with G α_s -QL, indicating that PRG-linker is critical to strengthen the interaction (Fig. 3C). Consistent with previous results, G α_{13} -QL served as negative control (Fig. 3B). Since the PRG linker sequence is conserved among the three RH-RhoGEFs (Fig. 3D), but lacks homology with any other protein, we used an EGFP-tagged PRG-linker construct as a potential inhibitor of G α_s -dependent PRG:Cdc42 interaction. Based on previous results and the structure of PRG-DH/PH:RhoA complex (Fig. 3E) (24), we postulated that G α_s -Q227L interacts with PRG-DH/PH forming a complex with affinity for Cdc42 (Fig. 3F). Then, we tested the potential inhibitory effect of PRG-linker on the interaction between G α_s -Q227L and PRG (Fig. 3G). As predicted, the PRG-linker construct not only inhibited G α_s -QL:PRG-DH/PH interaction (Fig. 3H), but also interfered on the effect of G α_s -QL to drive full-length PRG to be pulled-down as an active Cdc42-GEF (Fig. 3I); EGFP served as negative control.

Agonist-dependent stimulation of Gs-coupled receptors drives PRG to gain affinity for Cdc42. To investigate whether Gs-coupled receptors stimulate PRG to acquire affinity for Cdc42, we first used PAE and HT29 cells as models of

endogenous prostaglandin-dependent Gs signaling. As an initial readout of agonist-driven Gs-dependent effect on PRG, we stimulated PAE and HT29 cells with PGE2 and butaprost, respectively, and assessed PRG recruitment to membrane fractions. In both cases, PRG exhibited a significant time-dependent association to membrane fractions (Fig. 4A and 4B, respectively). We then used COS7 cells expressing Gs-DREADDs to test the effect of endogenous Gs on PRG:Cdc42 interaction. In these cells, CNO (clozapine-N-oxide), the agonist of Gs-DREADDs, enabled PRG to bind nucleotide-free Cdc42 in a time dependent manner (Fig. 4C). This effect was elicited by Gs-, but not by Gi- or Gq-coupled DREADDs (Fig. 4D), and was inhibited by the PRG-linker peptide (Fig. 4E), which also interfered on CREB phosphorylation (Fig. 4F). Endogenous Gs-coupled endothelial EP2 receptors signaling to cAMP/PKA pathway was also inhibited by the PRG-linker construct, as indicated by a decrease on butaprost-dependent phosphorylation of PKA substrates (Fig. 4G).

Discussion

RH-RhoGEFs link heterotrimeric G proteins to Rho GTPases (25-27). They are activated by G $\alpha_{12/13}$ proteins which bind the RGS homology (RH) domains unleashing the catalytic DH/PH region, known as specific for RhoA (14,23). Here we demonstrate that active G α_s directly constrains PRG DH/PH catalytic module to activate Cdc42 while its effect on RhoA is unaltered. Although future work using purified proteins is guaranteed; our results suggest that RhoGEF DH/PH domains can be allosterically controlled to expand their specificity.

Direct activation of RhoGEF DH/PH domains by active G α subunits of

heterotrimeric G proteins has been described. Specifically, G α_q stimulates p63RhoGEF and TRIO (21,28). Physiological control of this system is lost by *GNAQ* mutation, causing the G α_q :TRIO signaling system to drive uveal melanoma progression (28,29). Similarly, mutant *GNAS* is a driving oncogene in neuroendocrine cancers (30); however, a pathological link to Rho GTPases has not been established. Our results are reminiscent of the regulation of p63RhoGEF and TRIO by G α_q (21,22,28), but differ in the fact that G α_s expands PRG specificity directing the DH/PH module to gain affinity for Cdc42 without an apparent effect on RhoA. We speculate that G α_s pulls the PRG DH/PH module to accommodate Cdc42. Consistent with this possibility, conserved residues that directly bind the GTPase are more distant in intersectin-1, a Cdc42-specific GEF compared to PRG DH/PH module in complex with RhoA (31-33).

Consistent with their reported effects (25,27,32,34-36), RH-RhoGEF DH/PH catalytic modules strongly activated RhoA and promoted the assembly of actin stress fibers and cell contraction. These results confirmed that DH/PH constructs maintain catalysis and specificity (36-44). However, we found that PRG DH/PH also exhibited a previously unrecognized ability to stimulate Cdc42 and filopodia formation. Thus, we addressed the possibility that PRG directly activates Cdc42. We used pulldown assays to isolate active RhoGEFs based on their affinity for nucleotide-free GTPases (20,45) and revealed that G α_s stimulates PRG to gain affinity for Cdc42, pointing to a direct effect (attenuated by PKA, supplementary Fig. 1). We demonstrated that GTPase-deficient G α_s binds the DH/PH module. The linker region joining these domains strengthen their interaction with active

G α_s . Our evidence arguing for a functional relevance of this interaction derives from the inhibitory effect of the PRG-linker construct which prevented PRG response to agonist-dependent stimulation of Gs-DREADDs and to GTPase-deficient G α_s coexpression. Our results not only indicate that G α_s guides PRG to bind Cdc42, but also suggest that this effector competes with other G α_s -dependent effectors. The Gs/PKA pathway activates Rho GTPases and regulates cytoskeletal dynamics at multiple levels. Recent evidence documented a role for PKA R1 α subunit as a cAMP-dependent activator of P-REX1, a RacGEF (46), whereas kinase activity of PKA is linked to cytoskeletal dynamics at cell edges and is reciprocally regulated during cell migration (47-49). Our findings showing that G α_s activates a PRG/Cdc42 pathway expand the mechanisms of Gs signaling to Rho GTPases.

Although further experiments are needed to define the spatiotemporal conditions in which PRG is guided to activate Cdc42, our current model (Fig. 4H) illustrates the potential of Gs-coupled receptors to activate this pathway. Our work raises new questions and research avenues on how Gs and G $\beta\gamma$ signaling pathways are integrated to fine-tune Cdc42 activity in the context of strong RhoA activation to regulate cytoskeletal dynamics and set the basis to further investigate how the Gs/PRG/Cdc42 pathway guides polarized cell migration and its potential pathological implications, particularly in cancers where mutant *GNAS* is a driving oncogene.

Experimental Procedures

Plasmids and cDNA constructs—RH-RhoGEF DH/PH catalytic modules and PRG DH-PH fragments were amplified by PCR and cloned into pCEFL-EGFP-CAAX, pCEFL-EGFP and pCEFL-GST.

Primer sequences are available upon request. Other constructs have been previously described (13,46).

Cell culture, transfection, immunoblotting and GST pulldown—HEK293T, PAE, HT29 and COS7 cells were maintained and transfected as described (46). Cells were serum-starved for 16 h before experiments, all done 48 h after transfection. GST-fusion proteins and their interactors were detected by pulldown (13,46). Cell lysates and pulldowns were analyzed by western blot using the following antibodies: Santa Cruz Biotechnology (EGFP SC-9996; GST B-14 SC-138; Cdc42 SC-8401; RhoA SC-418; p-AKT1/2/3 Ser473 SC-7985-R; ERK2 SC-154), Covance (HA), Cell Signaling Technology (p-CREB Ser-133 #9191; p-ERK1/2 T202/Y204 #9191; CREB # 9197S, PKAS #9624), Atlas Antibodies (PRG/ARHGEF11, HPA014658), Sigma (AKT1, P2482). Secondary antibodies were goat anti-mouse (Zymed Laboratories Inc., Invitrogen or KPL) or goat anti-rabbit (Rockland Immunochemicals or KPL).

GTPase (Cdc42 and RhoA) activation and active GEF capture assays—Activation of RhoA and Cdc42, using cells grown in 10 cm dishes, was assessed by pulldown using recombinant Rhotekin and PAK effector domains (13,46). Active RhoGEFs were detected by pulldown with nucleotide-free GTPases (RhoA G17A and Cdc42 G15A) fused to GST (20,45). Before lysis, cells were washed with PBS containing 10 mM MgCl₂ and lysed with 1 mL of ice cold lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5, containing 1% Triton X-100, 5 mM EDTA and protease and phosphatase inhibitors (13)). Lysates were subjected to GST pulldowns as described (13,46). COS7 cells were

transfected with DREADDs exclusively coupled to Gs, Gi or Gq and stimulated with CNO (Tocris) (13).

Membrane and cytoplasmic fractionation of PAE and HT29 cells—Serum-starved PAE and HT29 cells, grown in 10 cm Petri dishes, were stimulated with 1 μ M prostaglandin E2 or butaprost, as indicated in Fig. 4. Cells were washed with cold PBS, scraped into 1 mL of cold PBS containing protease and phosphatase inhibitors and subjected to three freeze/thaw cycles. Lysates were centrifuged at low speed (1,400 rpm for 10 min at 4°C). Supernatants were centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4°C. Cytosol-enriched supernatants were prepared with Laemmli buffer. Pellets were washed once with cold PBS, centrifuged again, incubated with 250 μ L of lysis buffer containing 1% Triton-X100 for 20 min and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4°C. Supernatants containing solubilized membranes were prepared with Laemmli buffer. PRG was analyzed by western blot, together with GLUT1 and AKT1, as membrane and cytosol markers, respectively.

Cytoskeletal effects of RH-RhoGEF DH/PH constructs—PAE cells were

seeded at low density on gelatin-coated coverslips. Transfected cells were starved for 16 h with serum-free medium. Subsequently, cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min, washed twice with PBS, and prepared for conventional phalloidin staining. Cell images were visualized in a Confocal Laser Scanning Microscope Leica TCS SP8 using a 63x1.4 oil immersion objective. Images were analyzed with FIJI-ImageJ software. Cells were counted as having filopodia-like structures when they had at least nine of these finger-like protrusions containing F-actin (19).

Statistical analysis—Data are presented as means \pm S.E. of at least 3 independent experiments. Densitometric quantitation of western blots was done with ImageJ. Active proteins and interactions in pulldowns were normalized respect to total proteins and pulldown efficiency. Statistical analysis was performed using Sigma Plot 11.0 and graphs were prepared with Prism software V8.0. Statistical tests are indicated at the figure legends.

Data availability

All the described data are contained within this manuscript.

Acknowledgments. Technical assistance provided by Estanislao Escobar-Islas, Margarita Valadez, Jaime Escobar Herrera, David Pérez, Omar Hernández and Jaime Estrada Trejo is acknowledged.

Conflict of interest: Nothing to be declared.

Footnotes

This work was supported by CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico) Grants 286274 (to JV-P) and 240119 (to GR-C) and fellowships awarded to AC-K, IG-J, RDC-V, SRA-G and YMB-N.

References

1. Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., and Horwitz, A. R. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**, 1704-1709

2. Pollard, T. D., and Borisy, G. G. (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-465
3. Aittaleb, M., Boguth, C. A., and Tesmer, J. J. (2010) Structure and function of heterotrimeric G protein-regulated Rho guanine nucleotide exchange factors. *Mol Pharmacol* **77**, 111-125
4. Cook, D. R., Rossman, K. L., and Der, C. J. (2014) Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene* **33**, 4021-4035
5. Lawson, C. D., and Ridley, A. J. (2018) Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J Cell Biol* **217**, 447-457
6. Rossman, K. L., Der, C. J., and Sondek, J. (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 167-180
7. Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635
8. Ridley, A. J. (2015) Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* **36**, 103-112
9. Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., Abell, A., Johnson, G. L., Hahn, K. M., and Danuser, G. (2009) Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* **461**, 99-103
10. Vazquez-Prado, J., Bracho-Valdes, I., Cervantes-Villagrana, R. D., and Reyes-Cruz, G. (2016) Gbetagamma Pathways in Cell Polarity and Migration Linked to Oncogenic GPCR Signaling: Potential Relevance in Tumor Microenvironment. *Mol Pharmacol* **90**, 573-586
11. Hernandez-Vasquez, M. N., Adame-Garcia, S. R., Hamoud, N., Chidiac, R., Reyes-Cruz, G., Gratton, J. P., Cote, J. F., and Vazquez-Prado, J. (2017) Cell adhesion controlled by adhesion G protein-coupled receptor GPR124/ADGRA2 is mediated by a protein complex comprising intersectins and Elmo-Dock. *J Biol Chem* **292**, 12178-12191
12. Welch, H. C. (2015) Regulation and function of P-Rex family Rac-GEFs. *Small GTPases* **6**, 49-70
13. Cervantes-Villagrana, R. D., Adame-Garcia, S. R., Garcia-Jimenez, I., Color-Aparicio, V. M., Beltran-Navarro, Y. M., Konig, G. M., Kostenis, E., Reyes-Cruz, G., Gutkind, J. S., and Vazquez-Prado, J. (2019) Gbetagamma signaling to the chemotactic effector P-REX1 and mammalian cell migration is directly regulated by Galphaq and Galpha13 proteins. *J Biol Chem* **294**, 531-546
14. Kozasa, T., Hajicek, N., Chow, C. R., and Suzuki, N. (2011) Signalling mechanisms of RhoGTPase regulation by the heterotrimeric G proteins G12 and G13. *J Biochem* **150**, 357-369
15. Vazquez-Prado, J., Miyazaki, H., Castellone, M. D., Teramoto, H., and Gutkind, J. S. (2004) Chimeric G alpha i2/G alpha 13 proteins reveal the structural requirements for the binding and activation of the RGS-like (RGL)-containing Rho guanine nucleotide exchange factors (GEFs) by G alpha 13. *J Biol Chem* **279**, 54283-54290
16. Bodmann, E. L., Krett, A. L., and Bunemann, M. (2017) Potentiation of receptor responses induced by prolonged binding of Galpha13 and leukemia-associated RhoGEF. *FASEB J*
17. Meyer, B. H., Freuler, F., Guerini, D., and Siehler, S. (2008) Reversible translocation of p115-RhoGEF by G(12/13)-coupled receptors. *J Cell Biochem* **104**, 1660-1670
18. Chen, Z., Medina, F., Liu, M. Y., Thomas, C., Sprang, S. R., and Sternweis, P. C. (2010) Activated RhoA binds to the pleckstrin homology (PH) domain of PDZ-RhoGEF, a potential site for autoregulation. *J Biol Chem* **285**, 21070-21081
19. Nobes, C. D., and Hall, A. (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62
20. Garcia-Mata, R., Wennerberg, K., Arthur, W. T., Noren, N. K., Ellerbroek, S. M., and Burridge, K. (2006) Analysis of activated GAPs and GEFs in cell lysates. *Methods Enzymol* **406**, 425-437

21. Lutz, S., Shankaranarayanan, A., Coco, C., Ridilla, M., Nance, M. R., Vettel, C., Baltus, D., Evelyn, C. R., Neubig, R. R., Wieland, T., and Tesmer, J. J. (2007) Structure of Galphaq-p63RhoGEF-RhoA complex reveals a pathway for the activation of RhoA by GPCRs. *Science* **318**, 1923-1927
22. Rojas, R. J., Yohe, M. E., Gershbarg, S., Kawano, T., Kozasa, T., and Sondek, J. (2007) Galphaq directly activates p63RhoGEF and Trio via a conserved extension of the Dbl homology-associated pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* **282**, 29201-29210
23. Fukuhara, S., Chikumi, H., and Gutkind, J. S. (2001) RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho? *Oncogene* **20**, 1661-1668
24. Bielnicki, J. A., Shkumatov, A. V., Derewenda, U., Somlyo, A. V., Svergun, D. I., and Derewenda, Z. S. (2011) Insights into the molecular activation mechanism of the RhoA-specific guanine nucleotide exchange factor, PDZRhoGEF. *J Biol Chem* **286**, 35163-35175
25. Hart, M. J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W. D., Gilman, A. G., Sternweis, P. C., and Bollag, G. (1998) Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. *Science* **280**, 2112-2114
26. Fukuhara, S., Murga, C., Zohar, M., Igishi, T., and Gutkind, J. S. (1999) A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J Biol Chem* **274**, 5868-5879
27. Fukuhara, S., Chikumi, H., and Gutkind, J. S. (2000) Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor (LARG) links heterotrimeric G proteins of the G(12) family to Rho. *FEBS Lett* **485**, 183-188
28. Bandekar, S. J., Arang, N., Tully, E. S., Tang, B. A., Barton, B. L., Li, S., Gutkind, J. S., and Tesmer, J. J. G. (2019) Structure of the C-terminal guanine nucleotide exchange factor module of Trio in an autoinhibited conformation reveals its oncogenic potential. *Sci Signal* **12**
29. Feng, X., Degese, M. S., Iglesias-Bartolome, R., Vaque, J. P., Molinolo, A. A., Rodrigues, M., Zaidi, M. R., Ksander, B. R., Merlino, G., Sodhi, A., Chen, Q., and Gutkind, J. S. (2014) Hippo-independent activation of YAP by the GNAQ uveal melanoma oncogene through a trio-regulated rho GTPase signaling circuitry. *Cancer Cell* **25**, 831-845
30. O'Hayre, M., Vazquez-Prado, J., Kufareva, I., Stawiski, E. W., Handel, T. M., Seshagiri, S., and Gutkind, J. S. (2013) The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer. *Nat Rev Cancer* **13**, 412-424
31. Kapp, G. T., Liu, S., Stein, A., Wong, D. T., Remenyi, A., Yeh, B. J., Fraser, J. S., Taunton, J., Lim, W. A., and Kortemme, T. (2012) Control of protein signaling using a computationally designed GTPase/GEF orthogonal pair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 5277-5282
32. Derewenda, U., Oleksy, A., Stevenson, A. S., Korczynska, J., Dauter, Z., Somlyo, A. P., Otlewski, J., Somlyo, A. V., and Derewenda, Z. S. (2004) The crystal structure of RhoA in complex with the DH/PH fragment of PDZRhoGEF, an activator of the Ca(2+) sensitization pathway in smooth muscle. *Structure* **12**, 1955-1965
33. Hernandez-Garcia, R., Iruela-Arispe, M. L., Reyes-Cruz, G., and Vazquez-Prado, J. (2015) Endothelial RhoGEFs: A systematic analysis of their expression profiles in VEGF-stimulated and tumor endothelial cells. *Vascul Pharmacol* **74**, 60-72
34. Rumenapp, U., Blomquist, A., Schworer, G., Schablowski, H., Psoma, A., and Jakobs, K. H. (1999) Rho-specific binding and guanine nucleotide exchange catalysis by KIAA0380, a dbl family member. *FEBS Lett* **459**, 313-318
35. Dubash, A. D., Wennerberg, K., Garcia-Mata, R., Menold, M. M., Arthur, W. T., and Burridge, K. (2007) A novel role for Lsc/p115 RhoGEF and LARG in regulating RhoA activity downstream of adhesion to fibronectin. *J Cell Sci* **120**, 3989-3998
36. Jaiswal, M., Gremer, L., Dvorsky, R., Haeusler, L. C., Cirstea, I. C., Uhlenbrock, K., and Ahmadian, M. R. (2011) Mechanistic insights into specificity, activity, and regulatory elements of the regulator of G-protein signaling (RGS)-containing Rho-specific guanine

- nucleotide exchange factors (GEFs) p115, PDZ-RhoGEF (PRG), and leukemia-associated RhoGEF (LARG). *J Biol Chem* **286**, 18202-18212
37. Solski, P. A., Wilder, R. S., Rossman, K. L., Sondek, J., Cox, A. D., Campbell, S. L., and Der, C. J. (2004) Requirement for C-terminal sequences in regulation of Ect2 guanine nucleotide exchange specificity and transformation. *J Biol Chem* **279**, 25226-25233
 38. Worthylake, D. K., Rossman, K. L., and Sondek, J. (2000) Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. *Nature* **408**, 682-688
 39. Reuther, G. W., Lambert, Q. T., Booden, M. A., Wennerberg, K., Becknell, B., Marcucci, G., Sondek, J., Caligiuri, M. A., and Der, C. J. (2001) Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor, a Dbl family protein found mutated in leukemia, causes transformation by activation of RhoA. *J Biol Chem* **276**, 27145-27151
 40. Rossman, K. L., Worthylake, D. K., Snyder, J. T., Siderovski, D. P., Campbell, S. L., and Sondek, J. (2002) A crystallographic view of interactions between Dbs and Cdc42: PH domain-assisted guanine nucleotide exchange. *Embo J* **21**, 1315-1326
 41. Snyder, J. T., Worthylake, D. K., Rossman, K. L., Betts, L., Pruitt, W. M., Siderovski, D. P., Der, C. J., and Sondek, J. (2002) Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors. *Nat Struct Biol* **9**, 468-475
 42. Kristelly, R., Gao, G., and Tesmer, J. J. (2004) Structural determinants of RhoA binding and nucleotide exchange in leukemia-associated Rho guanine-nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* **279**, 47352-47362
 43. Cash, J. N., Davis, E. M., and Tesmer, J. J. (2016) Structural and Biochemical Characterization of the Catalytic Core of the Metastatic Factor P-Rex1 and Its Regulation by PtdIns(3,4,5)P. *Structure* **24**, 730-740
 44. Lucato, C. M., Halls, M. L., Ooms, L. M., Liu, H. J., Mitchell, C. A., Whisstock, J. C., and Ellisdon, A. M. (2015) The Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphate-dependent Rac Exchanger 1-Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1 (P-Rex1-Rac1) Complex Reveals the Basis of Rac1 Activation in Breast Cancer Cells. *J Biol Chem* **290**, 20827-20840
 45. Guilluy, C., Dubash, A. D., and Garcia-Mata, R. (2011) Analysis of RhoA and Rho GEF activity in whole cells and the cell nucleus. *Nat Protoc* **6**, 2050-2060
 46. Adame-Garcia, S. R., Cervantes-Villagrana, R. D., Orduna-Castillo, L. B., Del Rio, J. C., Gutkind, J. S., Reyes-Cruz, G., Taylor, S. S., and Vazquez-Prado, J. (2019) cAMP-dependent activation of the Rac guanine exchange factor P-REX1 by type I protein kinase A (PKA) regulatory subunits. *J Biol Chem* **294**, 2232-2246
 47. McKenzie, A. J., Svec, K. V., Williams, T. F., and Howe, A. K. (2020) Protein kinase A activity is regulated by actomyosin contractility during cell migration and is required for durotaxis. *Mol Biol Cell* **31**, 45-58
 48. Howe, A. K., Baldor, L. C., and Hogan, B. P. (2005) Spatial regulation of the cAMP-dependent protein kinase during chemotactic cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14320-14325
 49. Lim, C. J., Han, J., Yousefi, N., Ma, Y., Amieux, P. S., McKnight, G. S., Taylor, S. S., and Ginsberg, M. H. (2007) Alpha4 integrins are type I cAMP-dependent protein kinase-anchoring proteins. *Nat Cell Biol* **9**, 415-421

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Besides its canonical effect on RhoA, PRG DH/PH activates Cdc42 and promotes filopodia formation. **A)** Hypothetical effects of membrane-anchored RH-RhoGEF DH/PH catalytic modules. **B)** Confocal images of PAE cells showing EGFP-RH-RhoGEF DH/PH-CAAX constructs (green) and their effects on F-actin (red). Zoomed areas are shown below, scale bar=20 μ m. **C)** Graph shows the percentage of cells exhibiting filopodia-like structures. Each dot represents the mean \pm S.E. of at least 30 cells per experiment (n=3); ***p<0.0001, n.s.=no significance, one-way ANOVA followed Tukey. **D)** Representative blot shows expression of EGFP-RH-RhoGEF DH/PH-CAAX constructs. **E-F)** Activation of Cdc42 (**E**) and RhoA (**F**) by EGFP-RhoGEF DH/PH-CAAX constructs transfected into HEK293T cells was detected by PAK-CRIB and Rhotekin-RBD pulldown, respectively. Graphs represent the mean \pm S.E. densitometric values (n=3). **p=0.005, ***p<0.001, ****p<0.0001, one-way ANOVA followed Tukey. **G)** Pulldown of active EGFP-RhoGEF DH/PH-CAAX constructs based on their affinity for nucleotide free recombinant Cdc42-G15A (first panel) and RhoA-G17A (second panel). Total cell lysates are shown in the third panel. **H)** Interaction between PRG DH/PH and Cdc42-T17N was assayed in transfected HEK293T cells subjected to pulldown assays (PD:GST). **D-H)** Protein expression is confirmed in total cell lysates (TCL).

Figure 2. $G\alpha_s$ -Q227L binds PRG DH/PH enabling this prototypical RhoA-specific GEF to directly activate Cdc42. **A)** Hypothetic model postulating $G\alpha$ subunits as potential regulators of PRG DH/PH catalytic module. **B-C)** The effect of GTPase-deficient $G\alpha$ subunits on the interaction of EGFP-PRG-DH/PH-CAAX with Cdc42-G15A (**B**) and RhoA-G17A (**C**) was analyzed by pulldown using lysates from HEK293T cells transfected with HA-tagged $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ or $G\alpha_{13}$ QL mutants and EGFP-PRG-DH/PH-CAAX. Graph in (**B**) represents the mean \pm S.E. (n=3). ***p<0.001, n.s.=no significance, one-way ANOVA followed Tukey. **D)** To address if $G\alpha_s$ -QL detected in the PRG-DH/PH:Cdc42-G15A pull-down was part of a ternary complex, pull-down experiments were done in the presence or absence of PRG-DH/PH. Graph represents the mean \pm S.E. (n=3); **p<0.0001, t-test. **E)** The potential interaction between active $G\alpha$ subunits and PRG DH/PH was analyzed in HEK293T cells transfected with GST-PRG-DH/PH and HA-tagged GTPase-deficient $G\alpha$ subunits subjected to pull-down assays. **F)** Interaction between $G\alpha_s$ -QL and the catalytic domain of the three RH-RhoGEFs was assayed by pull-down using HEK293T cells transfected with HA- $G\alpha_s$ -QL and GST-p115-DH/PH, GST-PRG-DH/PH or GST-LARG-DH/PH. GST and HA- $G\alpha_{13}$ -QL served as negative controls. **G)** The effect of $G\alpha_s$ -QL on the activation of Cdc42 by PRG-DH/PH was assessed by pull-down using lysates of transfected HEK293T cells. Graph represents the mean \pm S.E. (n=3); **p=0.01, t-test. Representative blots show the fraction of active Cdc42 (top panel) and the active fraction of PRG-DH/PH with affinity for Cdc42-G15A (middle panel). **H)** The effect of $G\alpha_s$ -QL on the interaction between PRG-DH/PH and Cdc42-T17N was analyzed by pull-down using lysates of transfected HEK293T cells. Graph represents the mean \pm S.E. (n=3); *p=0.01, t-test. **I-J)** The effect of $G\alpha_s$ -QL on full-length PRG affinity for Cdc42 was analyzed in HEK293T cells that were transfected with full-length AU1-PRG (**I**) without or with HA- $G\alpha_s$ -QL, or only with HA- $G\alpha_s$ -QL to address its effect on endogenous PRG (**J**). The active fraction of full-length PRG with affinity for Cdc42-G15A was isolated by pull-down and revealed by immunoblotting with anti-PRG antibodies. Graphs represents the mean \pm S.E. (n=3); (**H**) *p=0.01, (**I**) *p=0.04, t-test.

Figure 3. G α_s -Q227L binds PRG DH and PH domains and the linker region joining them. **A)** Model showing GST-tagged PRG-DH/PH constructs used to map G α_s :PRG-DH/PH interaction. **B-C)** Interaction between HA-G α_s -QL and the indicated GST-PRG-DH/PH constructs was analyzed by pull-down using lysates of transfected HEK293T cells. HA-G α_s -QL and HA-G α_{13} -QL (used as control) were revealed with anti-HA antibodies. **D)** Multiple alignment of p115RhoGEF, LARG and PRG linker regions. **E)** Structure of PRG-DH/PH:RhoA complex (24). **F)** Model showing G α_s -GTP:PRG-DH/PH complex; hypothetically, active G α_s constrains PRGDH/PH to bind Cdc42. **G)** Model showing the potential inhibitory effect of the EGFP-PRG-linker construct on PRG activation by G α_s -QL. **H)** HEK293T cells transfected with EGFP-tagged PRG linker construct (or EGFP) together with HA-G α_s -QL and GST-PRG-DH/PH (or GST) were subjected to GST pull-down assays. **I)** G α_s -dependent PRG:Cdc42 interaction was analyzed in HEK293T cells transfected with HA-G α_s -QL (or control plasmid) and AU1-PRG together with EGFP-PRG-linker or EGFP and subjected to Cdc42-G15A pull-down. Graph represents the mean \pm S.E. (n=3); **p=0.001, ***p=0.0001, ns=no significance, one-way ANOVA followed Tukey.

Figure 4. Agonist-dependent stimulation of Gs-coupled receptors enables PRG to bind Cdc42. **A-B)** Membrane recruitment of endogenous PRG promoted by Gs-coupled GPCR signaling was assessed in PAE **(A)** and HT29 **(B)** cells stimulated with 1 μ M PGE₂ or butaprost, respectively. PRG in membrane fractions was revealed by western blot. GLUT1 and AKT1 were used as membrane and cytosolic markers, respectively. Graphs represent the mean \pm S.E.; **(A)** n=3, *p<0.05; **(B)** n=4, **p<0.01, t-test. **C)** Time-course of PRG:Cdc42 interaction was assessed in COS7 expressing Gs-DREADD receptors. Cells were stimulated with 1 μ M CNO and subjected to Cdc42-G15A pull-down. Graph represents the mean \pm S.E. (n=3); *p<0.05, one-way ANOVA followed Tukey. **D)** The effect of different endogenous heterotrimeric G proteins on PRG affinity for Cdc42 was studied in COS7 cells transfected with AU1-PRG and Gs- Gi- or Gq-DREADDs. Cells were stimulated with CNO for 15 min and subjected to Cdc42-G15A pull-down assays. Graph represents the mean \pm S.E. (n=3); *p<0.05, one-way ANOVA followed Tukey. **E)** Effect of the PRG-linker construct on agonist-stimulated interaction between PRG and Cdc42 was assessed in COS7 cells transfected with Gs-DREADD, AU1-PRG, and EGFP-PRG-linker or EGFP. Cells were stimulated with CNO for 15 and 30 min and subjected to Cdc42-G15A pull-down. Graph represents the mean \pm S.E. (n=3), *p=0.0342, **p=0.0056, t-test. **F)** Effect of PRG-linker on agonist-dependent phosphorylation of CREB was assessed in COS7 cells expressing Gs-DREADDs and stimulated with CNO. Graph represents the mean \pm S.E. (n=5); **p<0.01, t-test. **G)** Agonist-dependent phosphorylation of PKA substrates was assessed using PAE cells expressing EGFP or EGFP-PRG-Linker and stimulated with butaprost. Lysates from EGFP-PKA-C α -transfected cells served as control to detect PKA substrates. Graph represents the mean \pm S.E. (n=4); ***p=0.0009, ****p<0.0001, n.s.=no significance, one-way ANOVA followed Tukey. **H)** Model depicts the canonical G₁₃-PRG signaling axis to Rho and the emerging GPCR-G α_s -PRG-Cdc42 pathway based on the current findings. In cells, both systems putatively guide dynamic adjustments on actin-cytoskeleton reorganization.

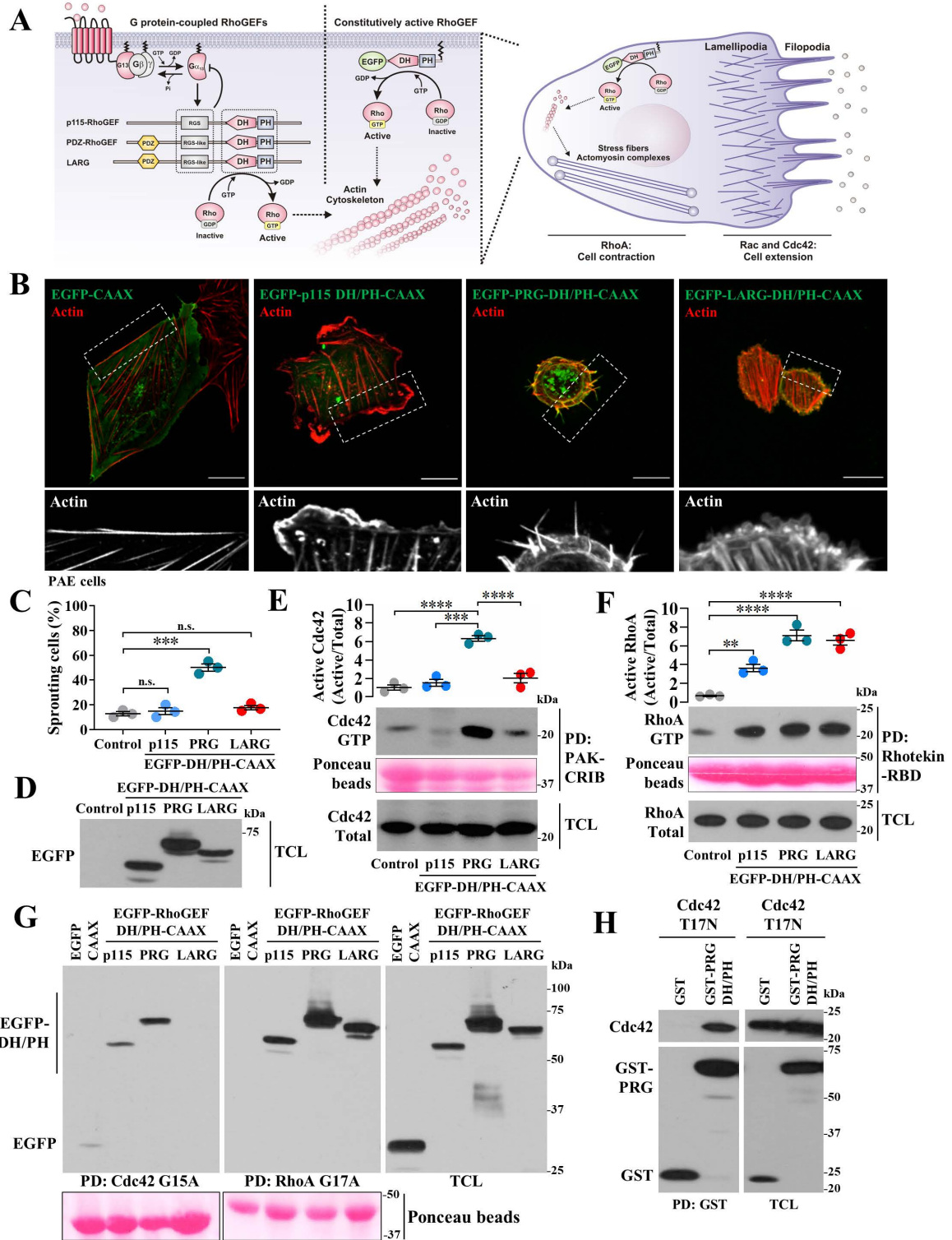


Figure 1. Besides its canonical effect on RhoA, PRG DH/PH activates Cdc42 and promotes filopodia formation.

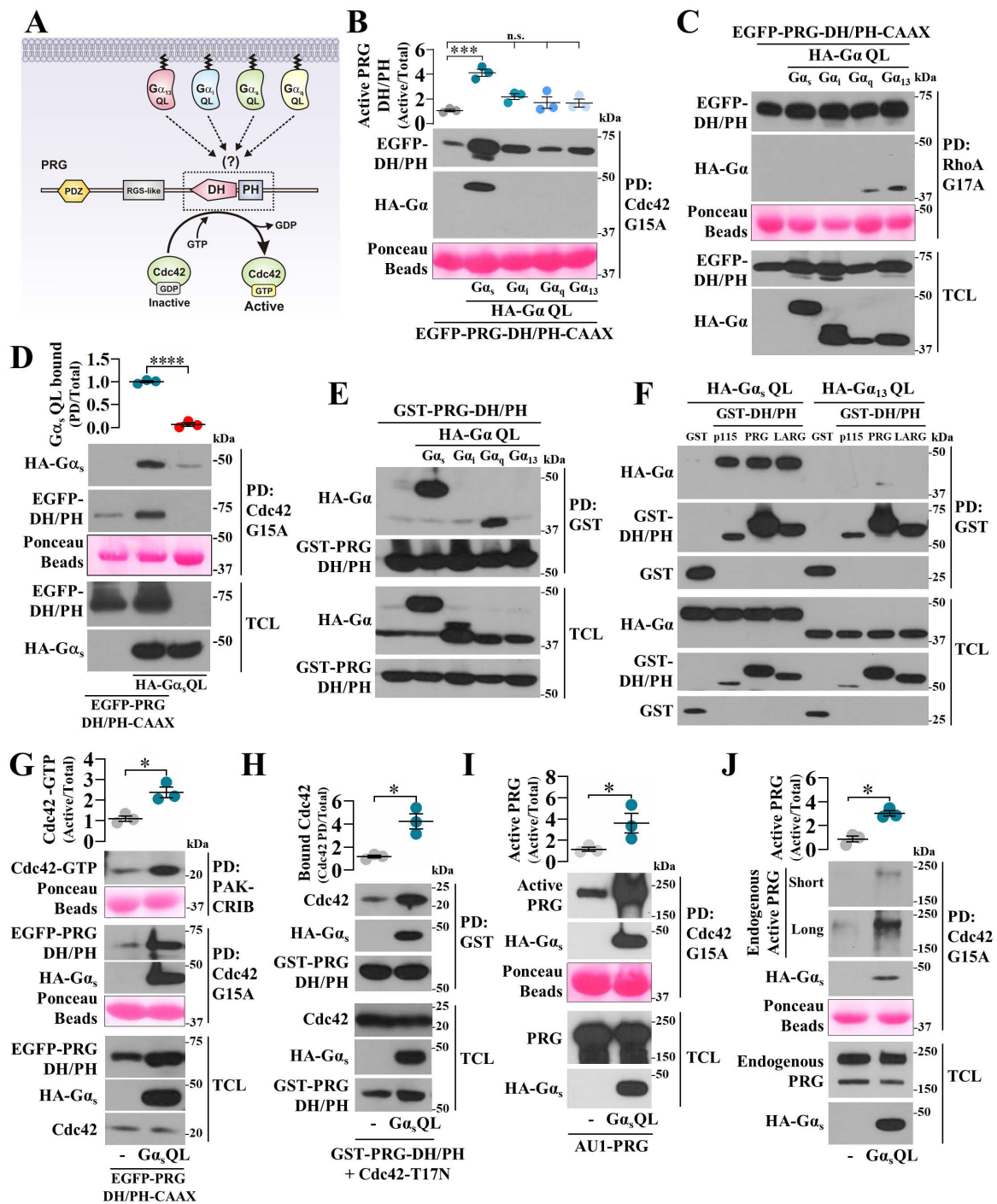
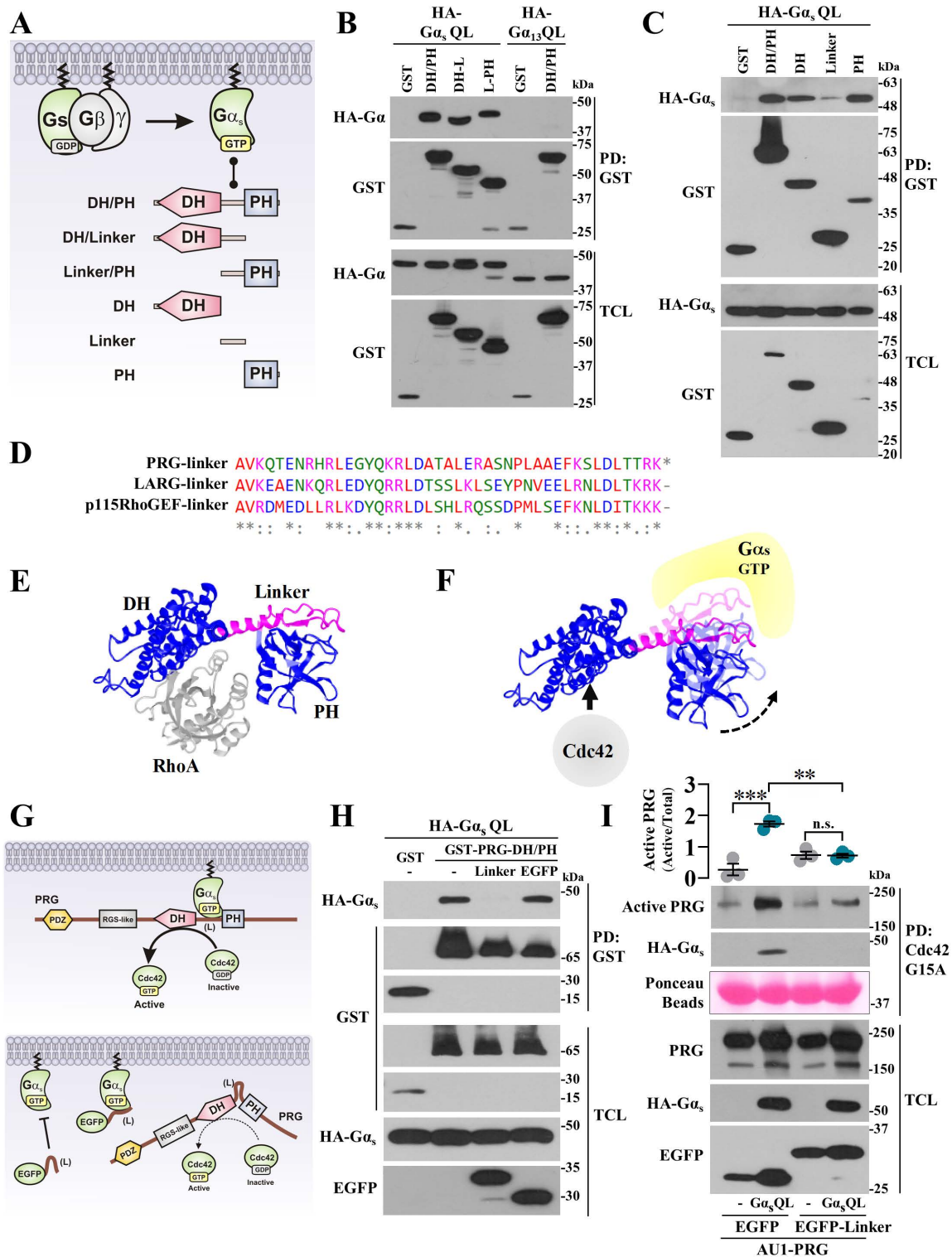


Figure 2. $G\alpha_s$ -Q227L binds PRG DH/PH enabling this prototypical RhoA-specific GEF to directly activate Cdc42.



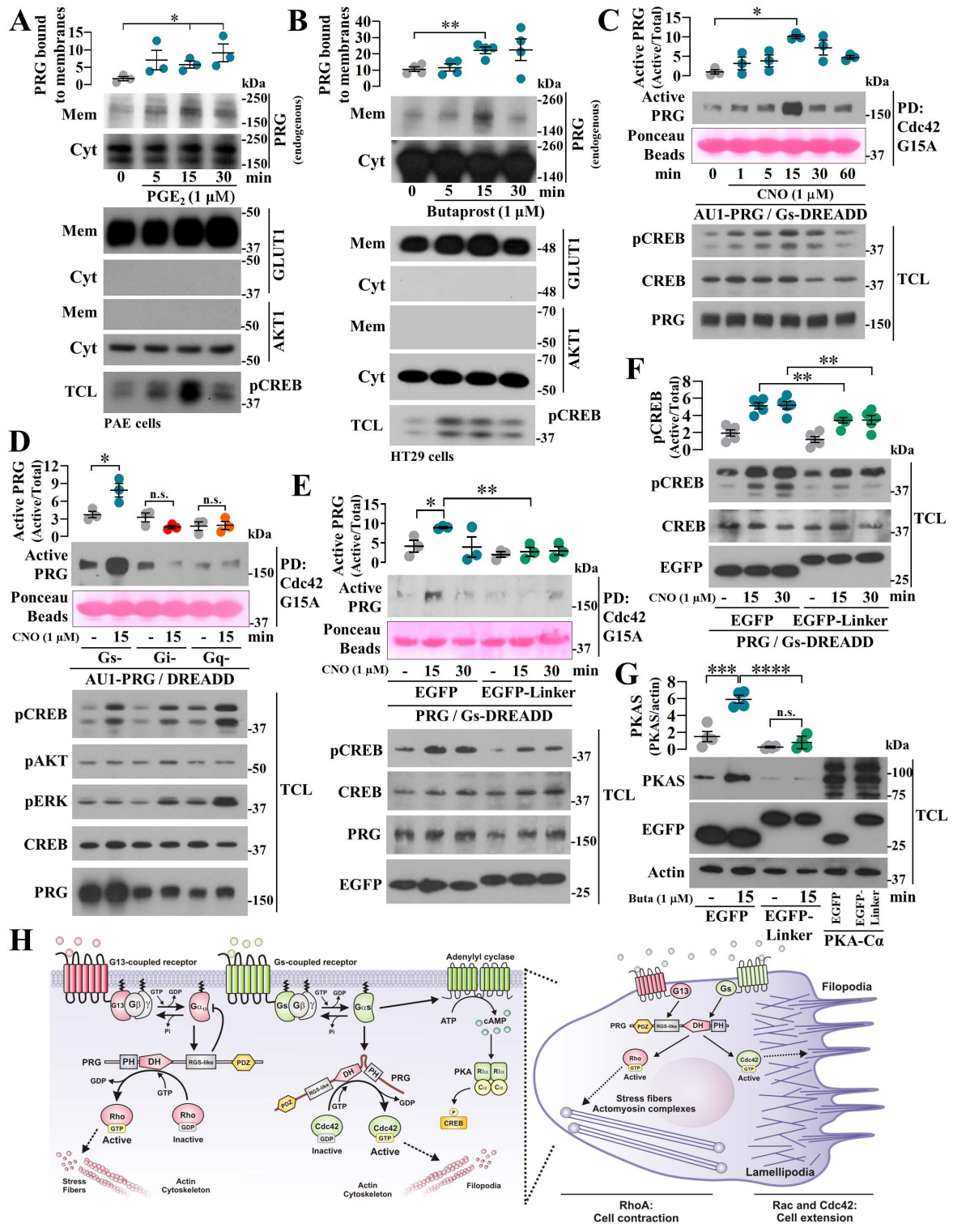
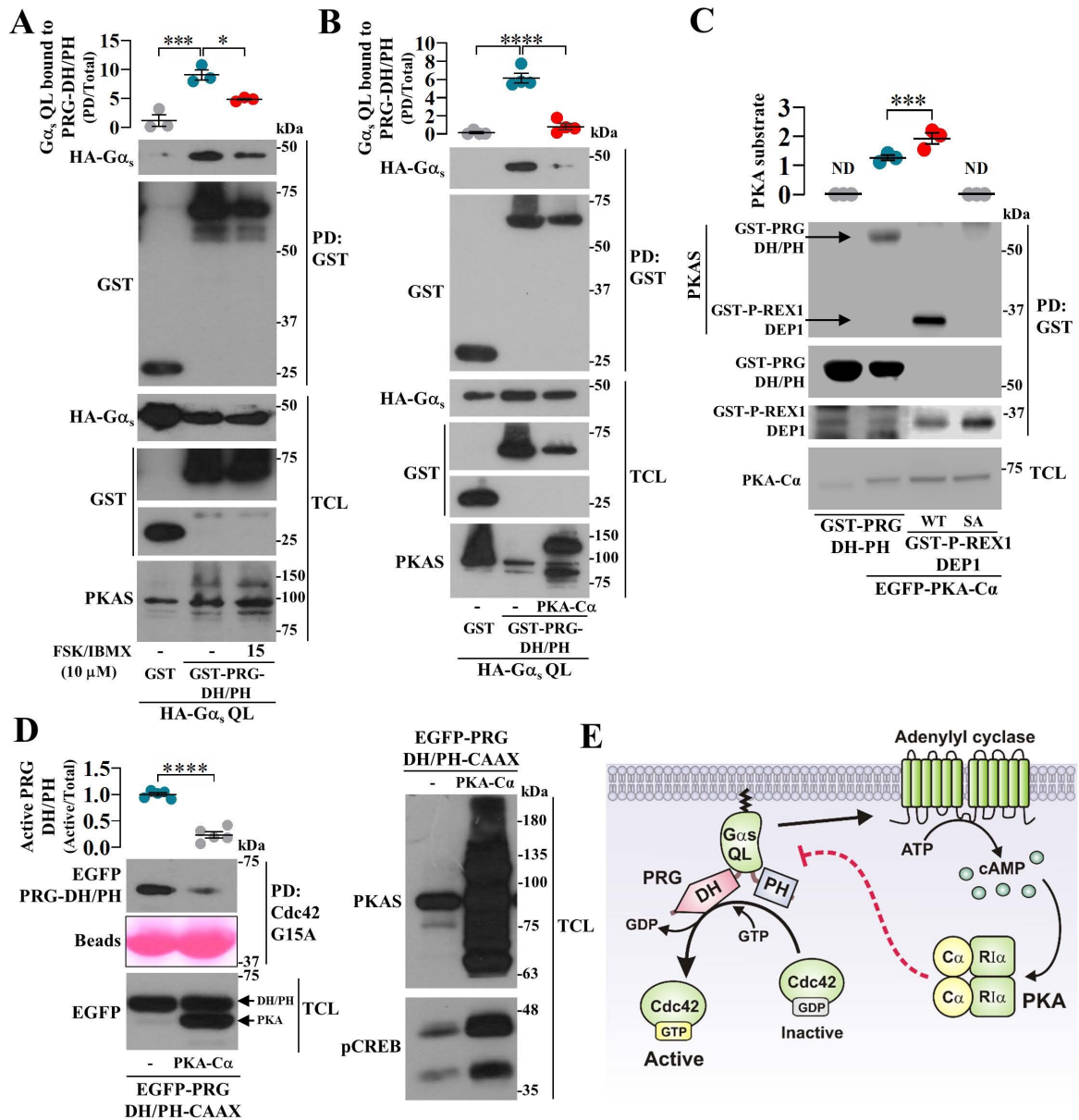


Figure 4. Agonist-dependent stimulation of Gs-coupled receptors enables PRG to bind Cdc42.



Supplementary Figure 1. cAMP/PKA signaling attenuates G α_s :PRG interaction and reduces PRG-DH/PH:Cdc42-G15A binding. A-B) Effect of cAMP/PKA signaling on G α_s :PRG interaction was studied by pull-down of GST-PRG-DH/PH and HA-G α_s -QL using lysates of HEK293T cells that were stimulated or not with forskolin/IBMX to activate adenylyl cyclase (A) or transfected with PKA catalytic subunits (B). Graphs represent the mean \pm S.E. (n=3); *p=0.0196, ***p=0.009, ****p<0.0001, one-way ANOVA followed Tukey. C) Potential phosphorylation of PRG-DH/PH by PKA was analyzed in HEK293T cells transfected with GST-PRG-DH/PH without or with EGFP-PKA-C α . Cell lysates were subjected to GST-pull-down followed by western blot with PKAS antibodies to detect PKA substrates. GST-P-Rex1-DEPI WT and SA (non-phosphorylatable mutant) were used as controls. Graphs represents the mean \pm S.E.; n=3, ***p=0.0006, t-test. D) Effect of catalytic PKA subunit on PRG-DH/PH:Cdc42-G15A binding was evaluated using lysates of HEK293T cells transfected with EGFP-PRG-DH/PH-CAAX and EGFP-PKA-C. Graphs represents the mean \pm S.E.; n=5, ****p<0.0001, t-test. E) Model postulates that the G α_s :PRG:Cdc42 signaling pathway is fine-tuned by the PKA.