



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

“Análisis de activación de Rac-GTPasa por el CaSR de tipo silvestre y receptores mutantes encontrados en pacientes con cáncer de mama”

TESIS

Que presenta

M. en C. Lennis Beatriz Orduña Castillo

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR

Directora de la Tesis:
Dra. Guadalupe Reyes Cruz.

México, CDMX.

Marzo del 2022

Este trabajo estuvo apoyado por la beca con número de registro 455391 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y fue realizado en el Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Doctora Guadalupe Reyes Cruz y apoyado por los proyectos CONACyT 240119 y 1794.

DEDICATORIA

A mis padres, Esteban Orduña Nava y Mónica Castillo Jimenez, por su ejemplo, apoyo y comprensión a lo largo de estos años.

A mi esposo Sendi Rafael Adame García por su paciencia, apoyo, cariño y fortaleza durante toda la etapa del posgrado.

A mi hermana sanguínea, Fernanda Orduña Castillo, y hermanas por elección Lorena Carrillo, Aida Navarrete y Julia Manzanares por sus sabios consejos y ayudarme a reír aún en las etapas más difíciles.

A mi abuelo materno Nazario Castillo por su constante fe en mí, aunque desafortunadamente ya no estás conmigo de manera física, siempre estarás en mi corazón, y te agradezco enormemente el impulso y motivación por seguir mis metas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las personas e instituciones que facilitaron el desarrollo de este trabajo de tesis.

A mi mentora del posgrado, la Dra. Guadalupe Reyes Cruz, por aceptarme como parte de su laboratorio y guiarme en las valiosas lecciones y desafíos que se presentan en la investigación científica.

A los doctores miembros de mi comité tutorial, tantos pasados como actuales, por su juicio crítico y observaciones que me permitieron ajustar los planteamientos a lo largo del desarrollo de este trabajo.

Al departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN por fomentar y alimentar la curiosidad de diversas generaciones, entre ellas la mía.

Agradezco el apoyo brindado por la Licenciada Margarita Raquel Valadez Sánchez y el Técnico Jaime Estrada Trejo del Laboratorio 19 del departamento de Biología Celular, así como al Auxiliar Estanislao Escobar Islas del Laboratorio 35 del departamento de Farmacología.

A mis compañeros de laboratorio Alejandro Castillo Kauil, Jorge Eduardo del Río Robles y Yarely Beltrán Navarro por su apoyo en el desarrollo de diversos experimentos. Así como los miembros pasados y presentes del laboratorio 19 de Biología Celular.

A los compañeros del laboratorio 35 de Farmacología, por sus consejos y observaciones en el desarrollo de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme una beca con número de registro 455391 que permitió el desarrollo de este proyecto a lo largo de tantos años.

RESUMEN

El Receptor sensor de calcio (*Calcium sensing receptor, CaSR*) es un receptor de membrana plasmática, miembro de la superfamilia de los Receptores acoplados a proteínas G (*G protein coupled receptor, GPCR*), señala principalmente a través de las proteínas Gi y Gq heterotriméricas, y representa a uno de los GPCR más mutados en cáncer, en donde las mutaciones contrasentido son las de mayor frecuencia de acuerdo con distintas bases de datos. En células de cáncer de mama se ha demostrado que CaSR promueve la migración y la secreción de péptidos quimiotácticos, contribuyendo así en los procesos tumorales. A partir de la identificación de mutaciones contrasentido del *CASR* en pacientes con cáncer de mama, nosotros generamos cuatro receptores CaSR (N639K, T732A, R886Q y V894I) para analizar si existen diferencias en su señalización con respecto del CaSR silvestre que contribuyan a los procesos tumorales, con énfasis en la activación de Rac-GTPasa, proteína involucrada en la migración, adhesión y secreción a través del remodelamiento del citoesqueleto de actina. En este trabajo encontramos que los receptores CaSR mutantes forman homodímeros funcionales que activan al heterotrímero Gi, que a diferencia del CaSR silvestre no requieren a Gq para promover la activación de ERK1/2 y promueven la activación diferencial de otras cinasas. Los receptores CaSR silvestre, N639K, T732A y V894I promueven la activación de Rac-GTPasa dependiente de la actividad del mTORC2; sin embargo, la respuesta ejercida por CaSR N639K es mayor con respecto al CaSR silvestre. Mientras que el CaSR R886Q es incapaz de promover la activación de Rac-GTPasa en nuestro tiempo de estudio. Nuestros resultados demuestran que la activación de Rac-GTPasa por los CaSR mutantes no promueve la migración de las células HEK293, pero participa en la secreción del factor quimiotáctico IL-8 promovida por el CaSR.

ABSTRACT

The Calcium-Sensing Receptor (CaSR) is a receptor that belongs to the superfamily of G Protein Coupled Receptors (GPCRs). CaSR signals primarily through Gi and Gq heterotrimeric proteins and is one of the most mutated GPCRs in cancer, in which missense mutations are the most common alterations according to cBioPortal. In breast cancer tissue CaSR promotes the migration and secretion of different peptides that contribute to breast cancer invasion, angiogenesis and the formation of metastatic niches. We identified four different missense *CASR* mutations found in breast cancer patients by using COSMIC database, which led us to generate four different CaSR mutant receptors (N639K, T732A, R886Q y V894I). We investigated if these CaSR mutant receptors show differences in their signaling when compared to CaSR Wt. We particularly analyzed if there are differences in their ability to promote Rac-GTPase activation, a protein that regulates cell migration and adhesion of different cancer cells, as well as peptide secretion in other systems. We found that mutant CaSR receptors form functional homodimers that activated the Gi heterotrimer, that unlike CaSR Wt they do not require Gq to promote ERK1/2 activation and instead promote differential activation of other kinases. Additionally CaSR, Wt and mutants N639K, T732A and V894I, promote Rac-GTPase activation through mTORC2. However, CaSR N639K promotes an increase on Rac-GTPase activation when compare with CaSR Wt. On the other hand, CaSR R886Q does not promote Rac-GTPase activation in our time of study. Our results demonstrated that Rac-GTPase activation due to stimulus of CaSR mutant receptors do not promote HEK-293 cell migration, instead Rac-GTPase is involved in the secretion of IL-8 regulated by CaSR.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	11
El gen <i>CASR</i> y su expresión.	12
La estructura del CaSR.....	13
CaSR en el tejido de mama normal y tumoral.	15
Señalización del CaSR.....	17
Los complejos mTOR.	19
mTORC1.	20
mTORC2.	21
La proteína Rac-GTPasa.....	22
JUSTIFICACIÓN.....	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	27
Análisis computacional del valor patogénico predictivo de las mutantes del CaSR.	27
Modelaje computacional de los receptores CaSR.....	27
Análisis de superficie de accesibilidad de la PKC hacia el CaSR R886Q...	27
Análisis de valores predictivos de modificaciones post-traduccionales por fosforilación y ubiquitinación en receptores CaSR.	28
Generación de los receptores mutantes del CaSR.	28
Cultivo celular.	29
Transfección transitoria de células HEK293 con los receptores mutantes del CaSR.	29
Evaluación de la expresión de los receptores mutantes del CaSR.	30
Activación de la proteína ERK1/2 por los receptores mutantes del CaSR.	31
Análisis de la activación de las proteínas g por las mutantes del CaSR....	32
Análisis de fosforilación de CREB por mutantes del CaSR.	33
Análisis de activación de Rac-GTPasa por casr silvestre y mutantes.	34
Evaluación de la migración celular regulada por CaSR silvestre y CaSR mutantes mediante ensayos de cierre de herida.....	35
Evaluación de la expresión de fibronectina en células HEK293 transfectadas con CaSR silvestre o mutantes.....	35
Determinación de la función de Rac-GTPasa sobre la secreción de IL-8 mediada por el CaSR en células HEK293 transfectadas establemente con CaSR silvestre (Clona 7).	36
Participación del citoesqueleto de actina en la secreción de IL-8 promovida por el CaSR.	36
RESULTADOS.....	38

Las mutaciones de tipo contrasentido son las principales alteraciones del gen <i>CASR</i> en cáncer de mama.....	38
Predicción patogénica de los receptores CaSR mutantes.....	39
Modelaje de los receptores CaSR silvestre y mutantes.....	42
Los <i>CASR</i> mutantes R886Q Y V894I potencialmente alteran los motivos consenso de modificaciones post-traduccionales.....	44
Los receptores mutantes del CaSR forman homodímeros funcionales y señalizantes.....	47
Análisis de acople a proteínas G heterotriméricas por los receptores mutantes del CaSR.....	49
El CaSR promueve la activación de Rac-GTPasa de manera dependiente del complejo mTORC2.....	53
Los receptores CaSR mutantes alteran la activación de Rac-GTPasa.....	54
Migración celular regulada por los receptores del CaSR en células HEK293.....	55
Los CaSR mutantes alteran la expresión de fibronectina.....	57
El estado de activación de Rac-GTPasa regula la secreción de IL-8 promovida por actividad del CaSR.....	58
DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIONES.....	67
PERSPECTIVAS.....	67
REFERENCIAS.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

FIG.1. MODULACIÓN CONFORMACIONAL DEL CASR POR LOS ESTADOS INACTIVO-ACTIVO.	14
FIG. 2. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DEL PTHrP EN EL TEJIDO MAMARIO.	16
FIG. 3. SEÑALIZACIÓN DEL CASR.	18
FIG. 4. COMPONENTES DE LOS COMPLEJOS DE mTOR.	20
FIG. 5. SEÑALIZACIÓN DEL mTORC2.	21
FIG. 6. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LAS RHOgTPASAS EN MAMÍFEROS.	23
FIG.7. EFECTORES DE LA PROTEÍNA RAC-GTPASA.	24
FIG. 8. ESTRATEGIA FARMACOLÓGICA DE INHIBICIÓN DEL CASR.	32
FIG. 9. GRÁFICAS DE DONA DONDE SE MUESTRAN MUTACIONES EN EL GEN CASR EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA IDENTIFICADAS A TRAVÉS DE DISTINTAS BASES DE DATOS.	38
FIG. 10. IDENTIFICACIÓN DE LOS RESIDUOS N639, T732, R886 Y V894 EN LA ESTRUCTURA DEL CASR EN ESTADO ACTIVO.	43
FIG.11. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES EN CASR DE ACUERDO CON PHOSPHOSITEPLUSV6.	45
FIG. 12. EXPRESIÓN DE FORMAS MADURAS E INMADURAS DE CASR SILVESTRE Y MUTANTES.	47
FIG. 13. LOS RECEPTORES CASR MUTANTES SEÑALIZAN EN LA MISMA PROPORCIÓN HACIA ERK1/2 QUE EL CASR SILVESTRE.	48
FIG. 14. LOS RECEPTORES CASR MUTANTES ALTERAN LA SEÑALIZACIÓN REQUERIDA PARA LA ACTIVACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ERK1/2.	50
FIG. 15. LA PROTEÍNA PKI DISMINUYE LA FOSFORILACIÓN DE CREB DEPENDIENTE DE LA ACTIVIDAD DE LA PKA.	51
FIG. 16. LA PROTEÍNA PKI NO INHIBE LA ACTIVACIÓN DE ERK1/2 NI POSEE UN EFECTO SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CREB POR LOS RECEPTORES DEL CASR.	52
FIG. 17. CASR SILVESTRE PROMUEVE LA ACTIVACIÓN DE RAC-GTPASA DE MANERA DEPENDIENTE DE mTORC2.	53
FIG. 18. ACTIVACIÓN DE RAC-GTPASA POR RECEPTORES CASR MUTANTES.	55
FIG. 19. CASR SILVESTRE PROMUEVE LA MIGRACIÓN CELULAR EN CÉLULAS HEK293.	56
FIG. 20. MIGRACIÓN CELULAR REGULADA POR ESTÍMULO DE CASR MUTANTES EN CÉLULAS HEK293.	57
FIG. 21. LA EXPRESIÓN DE FIBRONECTINA EN CÉLULAS TRANSFECTADAS CON CASR MUTANTES ES MAYOR A LA EXPRESIÓN OBTENIDA DE CÉLULAS TRANSFECTADAS CON EL CASR SILVESTRE.	58
FIG. 22. LA ACTIVIDAD DE RAC Y EL CITOESQUELETO DE ACTINA REGULAN LA SECRECIÓN DE IL-8 PROMOVIDA POR EL CASR.	59

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. BASES CONSULTADAS PARA LA APROXIMACIÓN PREDICTIVA DEL POTENCIAL PATOGENICO DE MUTACIONES CONTENIDAS EN EL GEN <i>CASR</i> EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA.....	27
TABLA 2. SECUENCIAS DE LOS C-TERMINALES DE LOS RECEPTORES <i>CASR</i> SILVESTRE, R886Q Y V894I ANALIZADOS EN <i>SCANSITE 4.0</i>	28
TABLA 3. SECUENCIAS DE ICL-1 DE LOS RECEPTORES <i>CASR</i> SILVESTRE Y N639K.	28
TABLA 4. MEZCLA DE TUBO A EN MÉTODO DE LIPOFECTAMINA.....	29
TABLA 5. MEZCLA DE TUBO B EN MÉTODO DE LIPOFECTAMINA.....	29
TABLA 6. MEZCLA DE TUBO A EN MÉTODO DE PEI 25 kDA.....	30
TABLA 7. MEZCLA DE TUBO B EN MÉTODO DE PEI 25 kDA.....	30
TABLA 8. INHIBIDORES CONTENIDOS EN EL BUFFER DE LISIS B.	30
TABLA 9. INHIBIDORES DE LA SEÑALIZACIÓN DE PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS.	32
TABLA 10. FÁRMACOS QUE PERTURBAN LA DINÁMICA DEL CITOESQUELETO DE ACTINA.	37
TABLA 11. ANÁLISIS DE MUTACIONES POR CARÁCTER QUÍMICO.	39
TABLA 12. ANÁLISIS DEL VALOR PREDICTIVO PATOGENICO PARA LAS MUTACIONES DEL <i>CASR</i>	41
TABLA 13. EXPLORACIÓN DE LA SUPERFICIE DE ACCESIBILIDAD POR PKC SOBRE LOS RECEPTORES <i>CASR</i>	44
TABLA 14. VALORES PREDICTIVOS DE MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES EN EL ICL-1 DE LOS RECEPTORES <i>CASR</i> SILVESTRE Y N639K MEDIANTE ANÁLISIS EN MUSITEDEEP.....	46
TABLA 15. VALORES PREDICTIVOS DE MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES EN LOS C-TERMINALES DE LOS RECEPTORES <i>CASR</i> SILVESTRE, R886Q Y V894I MEDIANTE ANÁLISIS EN MUSITEDEEP.....	46

INTRODUCCIÓN

El Receptor sensor de calcio (*Calcium sensing receptor*, CaSR) es un receptor de siete pasos transmembranales que señala a través de las proteínas G heterotriméricas, por lo que pertenece a la superfamilia de los denominados Receptores acoplados a proteínas G (*G protein coupled receptor*, GPCR), la cual representa la principal familia de receptores transmembranales con más de 800 miembros identificados en el ser humano.

El CaSR fue clonado por primera vez a partir de glándulas paratiroides bovinas por el grupo del Dr. Edward Brown en 1993, y desde entonces se reconoce su papel sobre la regulación de las concentraciones plasmáticas del ion calcio. En el humano el CaSR se expresa principalmente en las glándulas paratiroides y en los túbulos renales donde regula la homeostasis del ion calcio en el organismo. Cuando los niveles de calcio son bajos, la actividad basal del CaSR promueve la expresión, síntesis y secreción de la hormona paratiroidea (PTH), que a su vez promueve la absorción de calcio en los riñones y en el intestino. Por otro lado, altos niveles de calcio activan al CaSR para inhibir la síntesis y secreción de la PTH para regular de manera positiva la secreción de la calcitonina, la cual incrementa la excreción de calcio en orina y la deposición de calcio en hueso (Zhang et al., 2015).

El ion calcio es el ligando endógeno por excelencia para el CaSR, sin embargo, este receptor también puede ser activado por otros iones di y trivalentes como lo son el magnesio, manganeso y gadolinio, entre otras moléculas con carga positiva (Zhang et al., 2015). Como parte de las funciones tejido específicas del CaSR se encuentran la regulación de la presión sanguínea, la síntesis y secreción de péptidos y hormonas, la proliferación celular, el desarrollo axonal y dendrítico, la diferenciación de diversos tipos celulares, el remodelamiento del hueso, el transporte del calcio dentro de la leche materna, y la regulación del tono vascular (Tennakoon et al., 2015).

La expresión y actividad del CaSR han sido señaladas como marcadores y reguladores importantes en el desarrollo de distintas patologías relacionadas con la homeostasis del calcio, así como no relacionadas, entre estas últimas destacan diversos tipos de cáncer, como lo es el cáncer de mama (Tennakoon et al., 2015; Wang et al., 2017). En este sentido, la actividad del CaSR en el tejido tumoral mamario se ha asociado con un incremento en la proliferación, invasión y migración celular, así como la regulación de la secreción de factores que favorecen el establecimiento del nicho metastásico (Boudot et al., 2017; Hernández-Bedolla et al., 2015; Kim et al., 2016).

En este trabajo analizamos la posible contribución del CaSR sobre el desarrollo del cáncer de mama a través del estudio en la base de datos COSMIC de receptores CaSR mutantes identificados a partir de la secuenciación de muestras de pacientes con cáncer de mama, que nos permiten evaluar las

diferencias en la señalización con énfasis en los eventos de activación de Rac-GTPasa en comparación con la respuesta generada por el CaSR silvestre.

El gen *CASR* y su expresión.

El gen *CASR* se localiza en el cromosoma 3q13.3-21 y consiste en ocho exones. El primer exón codifica para regiones no traducidas en la región 5', mientras que los exones 2-7 codifican para 1078 residuos o aminoácidos dispuestos en tres regiones principales: el dominio amino terminal o N-terminal (N-ter), siete dominios transmembranales (transmembrane domain, TMD) y la región carboxilo terminal intracelular (C-ter) (Hannan et al., 2018; Tennakoon et al., 2015).

La expresión de *CASR* es regulada por al menos tres elementos: la vitamina D, citocinas como la IL-6 e IL-1 β , y el regulador específico de células paratiroides (GCM2); cada uno de los cuales se une a su receptor nuclear o plasmático para regular diversas cascadas de señalización (Hendy and Canaff, 2016).

Aunque el CaSR tiene una expresión ubicua en el cuerpo humano, los principales tejidos de expresión son la glándula paratiroidea, páncreas, riñón y el tracto gastrointestinal. En menor proporción el CaSR se expresa en el sistema nervioso central, piel, sistema cardiovascular, hueso, colón, pulmón y mama (Tennakoon et al., 2015).

Las mutaciones de carácter inactivante en el gen *CASR* llevan al desarrollo de desórdenes calcitrópicos denominados hipercalcemias que pueden deberse a mutaciones homocigotas (Hiperparatiroidismo neonatal severo) o heterocigotas (Síndrome hipercalcémico hipocalciúrico de tipo 1). Por otro lado, las mutaciones en *CASR* de carácter activante son menos frecuentes y de tipo heterocigoto, estas mutaciones generan hipocalcemia y frecuentemente propician el desarrollo de la Hipocalcemia autosomal dominante y el Síndrome Bartter de tipo V (Töke et al., 2021). Los polimorfismos más representativos en el gen *CASR* se han identificado en las regiones que codifican para las regiones intracelulares; siendo los tres polimorfismos del CaSR más estudiados el rs1801725 que codifica para CaSR A986S, el rs1042636 que codifica para CaSR R990G y el rs1801726 que codifican para CaSR Q1011E, que poseen una frecuencia mundial de 0.1259, 0.1456 y 0.9462, respectivamente (Töke et al., 2021). La caracterización molecular de estos polimorfismos han mostrado asociaciones con el desarrollo de patologías como dislipidemias y urolitiasis (Daryanto et al., 2020; Grzegorzewska et al., 2019).

Por otro lado, estudios sobre la expresión y función del receptor CaSR en distintos tipos de cáncer han identificado asociaciones importantes. En este sentido se ha determinado que el *CASR* en el tejido de colon puede actuar como un supresor tumoral; mientras que en el tejido mamario CaSR se comporta como un oncogen (Jeong et al., 2016), ya que en el tejido mamario tumoral la activación

del CaSR promueve la secreción del péptido relacionado a la hormona paratiroidea (PTHrP) que favorece la degradación del hueso e incrementa las concentraciones plasmáticas de calcio por tanto reforzando la activación del receptor (Sanders et al., 2000).

Estudios epigenéticos en CASR así como la regulación transcripcional del receptor han identificado que el promotor *CASR P2* se encuentra altamente metilado en pacientes con cáncer de colon y neuroblastomas, generando como resultado una menor expresión. A su vez, ciertos miRNAs, como los miR-135b y miR-146b de carácter oncogénico en el tejido de colon, llevan a una menor expresión del CaSR (Hendy and Canaff, 2016).

La estructura del CaSR.

Las principales regiones del CaSR se dividen en: la región N-terminal, que a su vez se divide en el dominio de atrapa moscas (*Venus Flytrap Domain* o VFT por sus siglas en inglés) y la región rica en cisteínas (*Cysteine Rich Domain* o CRD por sus siglas en inglés), los siete pases transmembranales unidos a través de tres asas intracelulares (ICL) y tres asas extracelulares (ECL), así como la región C-ter que se localiza de manera intracelular.

CaSR forma homodímeros funcionales a partir de enlaces por puentes disulfuro entre residuos de cisteína (C) presentes en su N-terminal. Los residuos C129 y C131 son los residuos requeridos en la formación de los homodímeros (Hu and Spiegel, 2007), mientras que para el correcto plegamiento del VFT de la proteína además se reconoce la contribución de los residuos C236 y C561 (Zhang et al., 2001).

El VFT es la región del CaSR requerida para el reconocimiento de sus ligandos. En presencia de bajas concentraciones de calcio u otro ligando, el VFT se mantiene abierto; mientras que un incremento en dichas concentraciones favorece el cierre del VFT, un rearrreglo estructural de la región transmembranal y la subsecuente activación del CaSR (**Fig.1**).

Tras la cristalización completa de la región N-terminal del CaSR se han identificado cuatro sitios de reconocimiento y unión al calcio dentro del VFT de cada protómero del CaSR. Cada uno de estos sitios presenta una afinidad diferencial por el ligando, por lo cual la unión del calcio a cada uno de estos sitios genera cambios conformacionales que contribuyen de diferente manera en la activación del receptor. De manera particular, el denominado Sitio 4, que está conformado por la interface del homodímero, ha sido reconocido como el sitio requerido para la estabilización del complejo activo (Geng et al., 2016a).

Se ha descrito que como parte del mecanismo de activación del CaSR, el aminoácido L-triptófano se asocia al VFT en presencia de calcio para fungir como un modulador alostérico positivo (Ling et al., 2021).

Dentro de la región N-terminal del CaSR además existen residuos de asparagina (N) que son procesados para asociarse a glucósidos, los cuales son N261, N287, N446, N468, N488 y N541, y que son importantes para la maduración del receptor (Ray et al., 1998). El proceso de N-glicosilación del CaSR comienza en el retículo endoplásmico de manera co-traduccional que representa una banda inmadura de aproximadamente 140 kDa reconocida por el anticuerpo ADD en los ensayos de *Western blot*. El proceso de final de N-glicosilación genera una proteína de aproximadamente 160 kDa reconocida por el anticuerpo ADD. La modificación post-traduccional por glicosilación de las proteínas, como el CaSR, es importante para su localización en membrana plasmática, el tráfico y por tanto para su señalización (Dong et al., 2010; Ray, 2015).

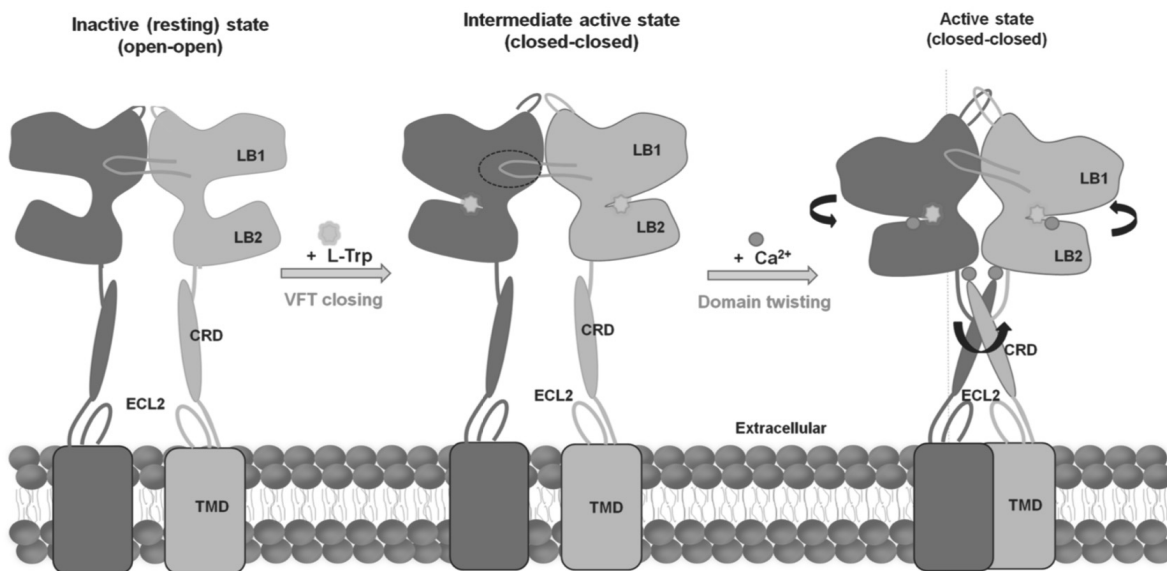


Fig.1. Modulación conformacional del CaSR por los estados inactivo-activo. Esquema de los cambios estructurales en CaSR en estado inactivo sin unión a L-aminoácidos ni iones calcio, en el cual el VFT del CaSR se estabiliza en un estado abierto. La unión al L-triptófano en cada monómero del CaSR estabiliza el cierre del VFT, generando un estado intermedio de transición para favorecer el estado activo tras el reconocimiento de cuatro iones calcio. En el estado activo, el homodímero del CaSR se pliega favoreciendo tanto el acercamiento como la torsión de cada monómero, generando interacciones intra e intermoleculares entre los dominios VFT, CRD, ECL2 y TMD. Tomado de Ling et al. 2021

La región 7TM está compuesta por siete pases transmembranales y funge como transmisor físico entre los ambientes extra e intracelular. El arreglo espacial de los pases transmembranales regulan interacciones intra e intermoleculares de cada protómero del CaSR que son importantes para la activación del receptor,

entre ellos destacan los TMD6, el asa ECL2 y las regiones CRD (Kniazeff et al., 2011; Ling et al., 2021).

Se ha propuesto que para la clase C de los GPCRs, las regiones ICL2, ECL2, ICL3, así como la región proximal del C-terminal son críticos para la señalización y activación de las proteínas G heterotriméricas (Bai et al., 1999; Chang et al., 2000; Goolam et al., 2014; Jacobsen et al., 2017; Koehl et al., 2019). Más aún, el C-terminal del CaSR, que consta de 218 residuos y que se localiza intracelularmente, se ha descrito como un módulo regulatorio importante que participa en las interacciones proteína-proteína así como en los eventos de desensibilización del receptor.

Las interacciones entre el CaSR y las proteínas G heterotriméricas, 14-3-3, Filamina y STAMPB, que son importantes para la localización en membrana plasmática, señalización y degradación del receptor, dependen de la integridad de la región C-terminal del CaSR (Arulpragasam et al., 2012; Herrera-Vigenor et al., 2006; Stepanchick et al., 2010). La región C-terminal del CaSR contiene además motivos de fosforilación por las proteínas cinasas GRK y PKC, las cuales han sido identificadas como las cinasas responsables de la desensibilización homóloga y heteróloga del CaSR, respectivamente (Binmahfouz et al., 2019; Lorenz et al., 2007; Pi et al., 2005). Asimismo, la región comprendida entre los residuos 870-900 contiene sitios potenciales de fosforilación por la cinasa PKA, modificaciones post-traduccionales que han sido sugeridas como requisitos indispensables para la interacción de las proteínas 14-3-3 y la retención del CaSR en el retículo endoplásmico (Stepanchick et al., 2010).

CaSR en el tejido de mama normal y tumoral.

En el tejido mamario CaSR puede regular funciones tanto homeostáticas de calcio así como funciones no calcitrópicas. Se ha identificado que el mRNA de CaSR se incrementa durante la etapa de lactancia y que su expresión incrementa considerablemente en la membrana basolateral de las células de las glándulas mamarias para regular el transporte de calcio dentro de la leche materna durante esta etapa. Además, se ha reportado que el tráfico del CaSR en endosomas positivos a Rab11 regula la secreción paracrina/autocrina del péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) (Reyes-Ibarra et al., 2007), que a su vez promueve la diferenciación de osteoclastos y con ello un incremento en las concentraciones plasmáticas de calcio al favorecer la degradación de hueso (Vanhouten et al., 2004).

De manera particular, se ha observado que la secreción del PTHrP se vuelve sistémica durante los procesos de lactancia y tumorigénicos del tejido

mamario; mientras que de manera fisiológica la activación del CaSR suprime la secreción del PTHrP en células de tejido mamario normal no lactante (**Fig. 2**).

El papel del CaSR como un oncogen en cáncer de mama es reforzado por el incremento en la expresión del CaSR en líneas celulares de cáncer de mama como MDA-MB-231 y MCF-7 con respecto de líneas de tejido mamario normal no transformado como Hs578Bst y MCF-10A (Vanhouten and Wysolmerski, 2013). También se ha descrito que en células MDA-MB-231 la sobreexpresión del CaSR podría llevar a un incremento en la degradación de hueso mediante un aumento en la expresión y secreción de los factores PTHrP y Epiregulina (Boudot et al., 2017).

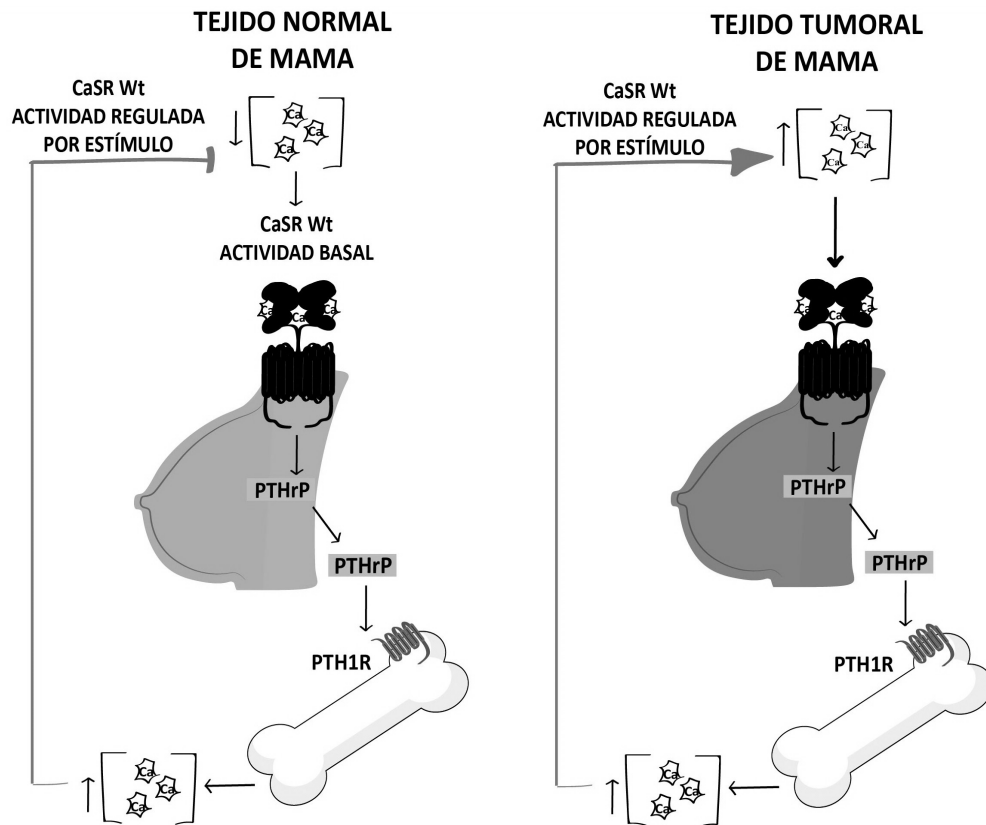


Fig. 2. Regulación de la secreción del PTHrP en el tejido mamario.

En el tejido normal de mama, la actividad basal del CaSR promueve la secreción del PTHrP para incrementar los niveles plasmáticos del calcio. Una vez que dichos niveles incrementan, el ion calcio activa al CaSR para suprimir la secreción de este péptido. De manera aberrante en el tejido tumoral de mama la activación del CaSR por calcio favorece la expresión y secreción del PTHrP que lleva a un incremento en las concentraciones del ion calcio, favoreciendo un ciclo vicioso osteolítico. Modificado de Hannan et al., 2018.

Por otro lado, la activación del CaSR está relacionada con un incremento en la migración de líneas de cáncer de mama MDA-MB-231, T47D y MCF-7 mediante

la activación de la PLC y ERK1/2 (Saidak et al., 2009). En nuestro laboratorio hemos demostrado que la activación del CaSR promueve la secreción de diversos péptidos tanto de carácter quimiotáctico como angiogénico, que potencialmente regularían la formación del nicho tumoral y la formación de nuevos vasos sanguíneos (Hernández-Bedolla et al., 2015); ambos eventos considerados por Hanahan como marcadores moleculares claves en el desarrollo del cáncer (Hanahan and Weinberg, 2011).

Señalización del CaSR.

El CaSR es un receptor que presenta dos tipos de actividades: una basal y otra regulada por estímulo. La primera ha sido ampliamente estudiada desde el enfoque calcitrópico, en el cual la actividad basal del CaSR favorece la secreción de PTH para regular las concentraciones plasmáticas de calcio; además esta actividad regula la secreción de IL-6 en células tumorales de cáncer de mama MDA-MB-231 (Hernández-Bedolla et al., 2016). Por otro lado, la actividad regulada por estímulo depende de la unión del CaSR a su ligando. Entre los ligandos descritos para este receptor se incluyen iones Ca^{2+} y Mg^{2+} y trivalentes, antibióticos de tipo aminoglucósido y péptidos con cargas positivas como la espermina y putrescina.

Asimismo, la actividad del CaSR puede ser alterada por moléculas denominadas moduladores alostéricos positivos (PAM), responsables de favorecer el estado activo del receptor en presencia de ligando. Como parte de los PAMs sintéticos del CaSR se encuentran el Cinacalcet y el R-568, los cuales tienen la capacidad de estabilizar una conformación activa del CaSR al interactuar con el residuo E837 que se localiza en el ECL3. Por otro lado, como parte de los PAMs naturales se encuentran los L-aminoácidos como L-triptófano y L-fenilalanina.

De manera opuesta, las moléculas descritas como moduladores alostéricos negativos o NAMs regulan de manera negativa la actividad del CaSR. El NAM sintético del CaSR más reconocido es el NPS2143 que también se une al residuo E837. Recientemente se ha descrito que el efecto de la modulación alostérica negativa ejercida por el NPS2143 sobre el CaSR requiere la unión de una molécula de NPS2143 sobre cada subunidad del homodímero conformado por el CaSR; contrario al efecto del R-568 el cual sólo requiere la unión a una de las subunidades (Jacobsen et al., 2017).

En el estado activo, el CaSR señala principalmente a través de las proteínas G heterotriméricas, que consisten en tres subunidades, la subunidad $G\alpha$ y el heterodímero $G\beta\gamma$ (**Fig.3**). Las proteínas G comúnmente activadas por CaSR son las proteínas $Gq/11$ y Gi heterotriméricas, lo cual genera la activación de la $PLC\beta$ y la inhibición de la adenilato ciclasa (AC). Se ha reconocido a la señalización del CaSR dependiente de la vía Gq como un regulador de la homeostasis de calcio; tal que ratones knockout para los genes *GNAQ* y *GNA11*

muestran las mismas alteraciones en las concentraciones plasmáticas del ion calcio que los modelos de ratón knockout para el gen *CASR* (Leach et al., 2020).

CaSR promueve la activación de las proteínas ERK1/2, (Fang et al., 2020; Saidak et al., 2009) principalmente a través de la señalización desencadenada por Gq/11 y la subsecuente activación de PKC, así como la señalización dependiente de Gi hacia cinasas de la familia Src, así como la activación de Ras (Kifor et al., 2001).

Además, puesto que la señalización del CaSR promueve la activación de Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina o RhoGEFs que promueven el estado activo de RhoA, se ha sugerido que CaSR señala a través de las proteínas G12/13 y Gq heterotriméricas (Hannan et al., 2018; Pi et al., 2002).

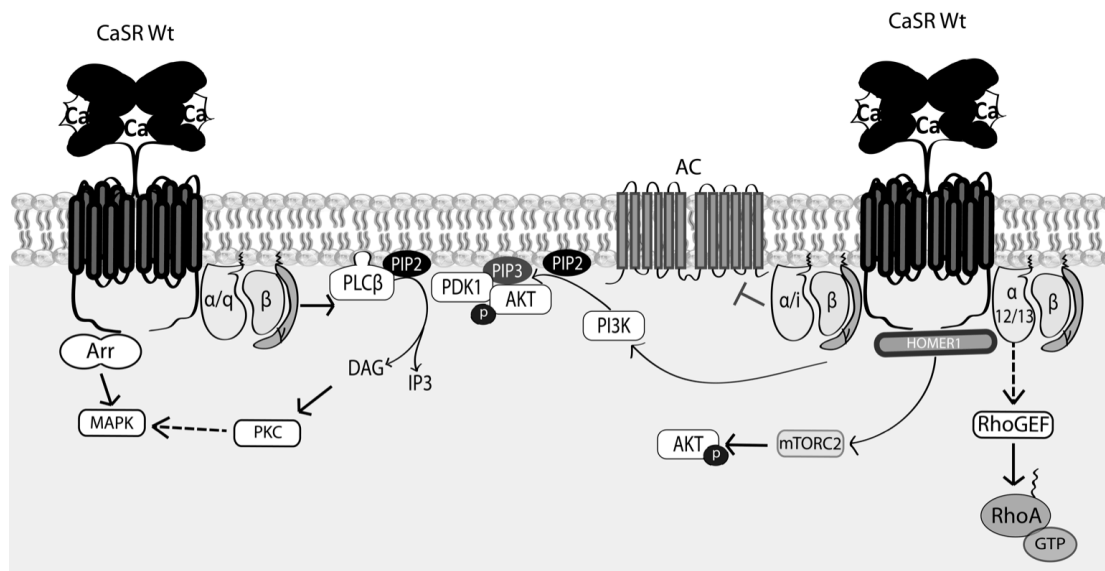


Fig. 3. Señalización del CaSR.

El CaSR promueve la señalización de distintas proteínas G heterotriméricas como Gq, Gi y G12/13; cada una de las cuales genera una señalización particular. En el esquema además se ilustra la señalización generada por dos proteínas adaptadoras, Arrestinas y Homero1. La proteína Arrestina se ha sugerido como una adaptadora que promueve la activación de ERK1/2 por distintos GPCRs; mientras que la proteína Homero1 es una adaptadora que al interactuar con el CaSR lleva a la activación de mTORC2 y AKT. Modificado de Smith et al., 2016 (Smith et al., 2016).

Hallazgos realizados en modelos de células pituitarias murinas y células de carcinoma mamario murino han demostrado que la activación del CaSR promueve un incremento en las concentraciones del AMPc. Con esta evidencia se ha propuesto que la señalización del CaSR también es capaz de promover la señalización de las proteínas Gs heterotriméricas (Mamillapalli and Wysolmerski,

2010; Mamillapalli et al., 2008). Al respecto, en nuestro laboratorio hemos caracterizado que la señalización del CaSR, aparentemente hacia la proteína Gs, promueve la activación de la proteína GTPasa Rab27B para favorecer la secreción de IL-6 y de factores quimiotácticos regulada por estímulo del CaSR en células de cáncer de mama MDA-MB-231 (Hernández-Bedolla et al., 2016; Zavala-Barrera et al., 2021).

CaSR también regula la adhesión y migración celular mediante la interacción con las proteínas Integrinas α V, β 1 y β 5, de manera dependiente de la actividad de la PLC, cinasas citosólicas de tirosinas como Src, y del incremento de calcio intracelular (Tharmalingam et al., 2011); por lo cual la señalización del CaSR hacia los heterotrimeros Gq y Gi generan mecanismos claves para este proceso celular.

Por otro lado se ha descrito que la internalización del CaSR, tanto basal como regulada por estímulo, es dependiente de las proteínas β -arrestinas e independiente de la señalización de las proteínas G heterotriméricas (Mos et al., 2019). Diversos estudios han sugerido que estas proteínas adaptadoras promueven la activación de las proteínas MAPK, en específico de ERK1/2, desde los compartimentos endosomales en un efecto denominado como señalización no canónica (Eichel et al., 2018). En nuestro laboratorio hemos determinado que la activación de ERK1/2 promovida por CaSR en tiempos cortos de hasta diez minutos requiere de la presencia del receptor en la membrana plasmática, pues al inhibir la internalización del CaSR con una mutante dominante negativa de Rab11 se incrementa la fosforilación de ERK1/2 (Reyes-Ibarra et al., 2007); sin embargo no se ha explorado aún si la activación de ERK1/2 en tiempos mayores requiere la señalización regulada por las β -arrestinas.

Otra proteína adaptadora que regula la señalización del CaSR es Homero1. Al respecto se ha reportado que el eje CaSR-Homero1-mTORC2 promueve la fosforilación de AKT en el residuo Ser473 en osteoblastos (Rybchyn et al., 2019); sin embargo, si esta señalización depende de las proteínas G heterotriméricas no es claro.

Los complejos mTOR.

La proteína mTOR es una cinasa con actividad sobre residuos de serina/treonina (S/T) compuesta de aproximadamente 2500 residuos organizados en diferentes dominios, de tal manera que a partir del N-ter se identifica una serie de repetidos HEAT, seguidos de un dominio FAT, un FRB, un catalítico de cinasa y finalmente en el C-ter un dominio FATC (Tatebe and Shiozaki, 2017).

La propiedad multidominio de mTOR le permite interactuar con distintas proteínas para formar dos complejos, el denominado complejo 1 de mTOR (mTORC1) y el complejo 2 de mTOR (mTORC2), cada uno de los cuales regula

procesos celulares específicos que pueden ser activados por señales redundantes o específicas.

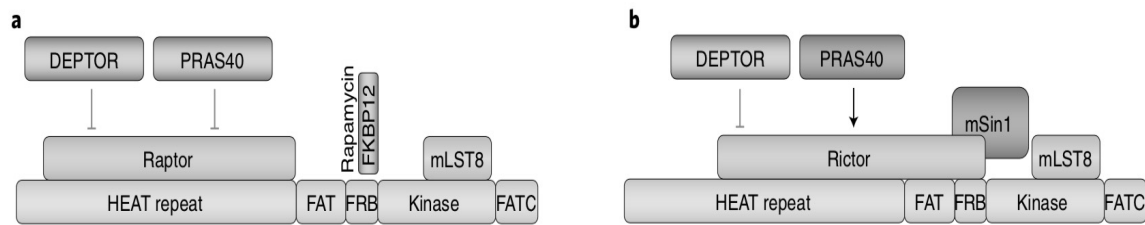


Fig. 4. Componentes de los complejos de mTOR.

a. El mTORC1 indicado en el lado izquierdo está compuesto por las proteínas mTOR, Raptor, y mLST8. Como moduladores negativos del mTORC1 se encuentran las proteínas DEPTOR, PRAS40 y la proteína FKBP12, cuya afinidad por mTOR se incrementa por la interacción con el fármaco Rapamicina (Rapa). **b.** El mTORC2 está compuesto por mTOR, Rictor, mSin1 y mLST8. Como moduladores de la actividad del complejo se encuentran Deptor, el cual lo inhibe, y PRAS40, que por otro lado favorece dicha activación. Tomado de Kim and Guan, 2019.

mTORC1.

El mTORC1 consta de los tres componentes principales ilustrados en la **Fig.4a**. Se ha descrito que la proteína mLST8 favorece la asociación de la proteína Raptor a mTOR y estimula la actividad catalítica de mTOR; mientras que la proteína Raptor favorece directamente el reconocimiento de mTOR por sus distintos sustratos y regula la localización celular del complejo, y el cual puede presentarse en membrana plasmática, mitocondria y gránulos de estrés (Kim and Guan, 2019; Melick and Jewell, 2020).

La actividad del mTORC1 está relacionado con la síntesis de proteínas, la autofagia, la inhibición del catabolismo, la biogénesis lipídica, la síntesis de nucleótidos, el metabolismo y el crecimiento celular mediante sus distintas cascadas de señalización por efectores (Kim and Guan, 2019).

Uno de los principales sustratos del mTORC1 es la proteína S6K1, cuya fosforilación en el residuo T389 promueve su actividad catalítica para fosforilar a la proteína ribosomal S6 y así promover la síntesis y traducción de proteínas. S6K1 también puede promover la activación de factores de transcripción como eIF4B y eIF4A de manera indirecta mediante la fosforilación que promueve la degradación de PDCD4, el cual actúa como inhibidor (Melick and Jewell, 2020; Saxton and Sabatini, 2017).

El mTORC1 puede ser activado por GPCRs mediante la actividad de las PI3K β ó γ que propician la formación del fosfoinositido de membrana PIP₂, el cual recluta a las proteínas Akt y PDK1 para la subsecuente activación de la cinasa Akt

mediante la fosforilación por PDK1 en el residuo T308. Akt en estado activo favorece la activación de la GTPasa Rheb para permitir la activación del mTORC1.

Puesto que el CaSR promueve la activación de la cinasa PI3K γ a través de las proteínas G heterotriméricas, la actividad regulada por estímulo del CaSR genera la activación del mTORC1.

mTORC2.

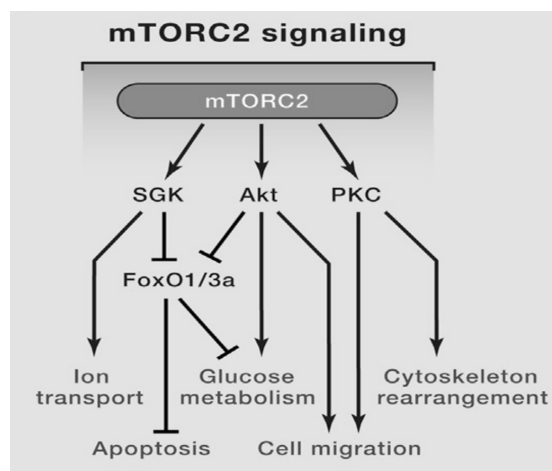
Como se ilustra en la **Fig. 4b**, el mTORC2 está compuesto por las proteínas mTOR, mLST8, Rictor y mSIN1; éstas últimas proteínas se han descrito como los elementos reguladores del complejo que determinan su localización subcelular, y que en el caso particular de Rictor estabilizan al complejo.

Si bien el compuesto Rapa no posee un efecto sobre la actividad de este complejo macromolecular en condiciones de tratamiento agudo, los tratamientos crónicos logran disminuir su actividad a través de dos posibles mecanismos: la inhibición de la síntesis de las proteínas componentes del complejo o la inhibición alostérica de una nueva molécula mTOR disponible para el ensamble del mTORC2.

La actividad del mTORC2 se ha relacionado con los eventos de proliferación, supervivencia, crecimiento, transporte de iones, homeostasis de la membrana plasmática y el reordenamiento del citoesqueleto. Aunque las cascadas de señalización que llevan a su activación no han sido del todo determinadas, estas parecen ser variadas y dependen del tipo celular y del organismo evaluado (Diz-Muñoz et al., 2016; Fu and Hall, 2020; Riggi et al., 2018, 2020).

Fig. 5. Señalización del mTORC2.

Una vez que el mTORC2 se encuentra activo, puede promover la fosforilación de tipo activante sobre diversas proteínas conocidas como sustratos. Como principales sustratos de mTORC2 se han descrito a las proteínas cinasas de la familia AGC que participan en diversos procesos celulares, entre ellos el reordenamiento del citoesqueleto y la migración celular. Tomado de Saxton and Sabatini, 2017.



Como se ha mencionado, a la fecha se ha reportado que el CaSR promueve la activación del mTORC2 mediante la interacción con la proteína de andamiaje Homero1 en osteoblastos de ratón (Rybczyn et al., 2019). Por otro lado,

se ha demostrado que en células de carcinoma renal, cáncer gástrico y osteosarcoma la activación del CaSR con distintos ligandos como calcio y gadolinio promueven la fosforilación del residuo Ser 473 (S473) de la proteína AKT, considerado como un marcador de actividad del mTORC2; concordantemente este efecto disminuye significativamente por el modulador alostérico negativo del CaSR NPS2143 (Joeckel et al., 2014; Zhang et al., 2020; Zhao et al., 2019). Sin embargo, si esta señalización depende de la activación de proteínas G heterotriméricas por el CaSR no ha sido determinado.

AKT puede regular el reordenamiento del citoesqueleto mediante la interacción con moléculas que participan en procesos de polimerización del citoesqueleto, tales como β -tubulina, actina, α -actinina, proteínas que promueven la actividad intrínseca de las RhoGTPasas (RhoGAPs) y factores intercambiadores de nucleótidos de guanina de las proteínas RhoGTPasas (RhoGEFs) (Balasuriya et al., 2020). En este último aspecto se ha demostrado que AKT puede fosforilar de manera activante a los RhoGEFs Tiam1, Dock6 y Vav3 que promueven el estado de RacGTPasa activo, sin embargo es probable que la actividad de otros RhoGEFs sea modulada por fosforilaciones de AKT (Balasuriya et al., 2020; Liu et al., 2008; Miyamoto et al., 2013).

La proteína Rac-GTPasa.

Las RhoGTPasas son proteínas con un peso molecular aproximado de 20 kDa, que pertenecen a la superfamilia de Ras, y que a través de su estado de unión a nucleótidos de guanina regulan la organización del citoesqueleto tanto de actina como de tubulina. La familia de las RhoGTPasas comprende 20 miembros que están divididos en subfamilias, y una de las más estudiadas es la subfamilia clásica de Rac (**Fig. 6**). Dentro de esta subfamilia están las GTPasas Rac1, Rac2, Rac3 y RhoG. Rac1 es la GTPasa cuya expresión es ubicua, en cambio la expresión de Rac2 se asocia con el tejido hematopoyético, mientras que Rac3 se asocia con el tejido neuronal (Heasman and Ridley, 2008).

El mecanismo general de activación de las Rac-GTPasas que funcionan como interruptores moleculares consiste en pasar de un estado inactivo unido a GDP y de localización citoplasmática a un estado activo unido a GTP asociado a membranas mediante la interacción con las proteínas RhoGEFs. A su vez, la actividad de Rac es modulada de manera negativa por las proteínas RhoGAPs que promueven la capacidad intrínseca de la GTPasa para hidrolizar el GTP y pasar a su estado inactivo.

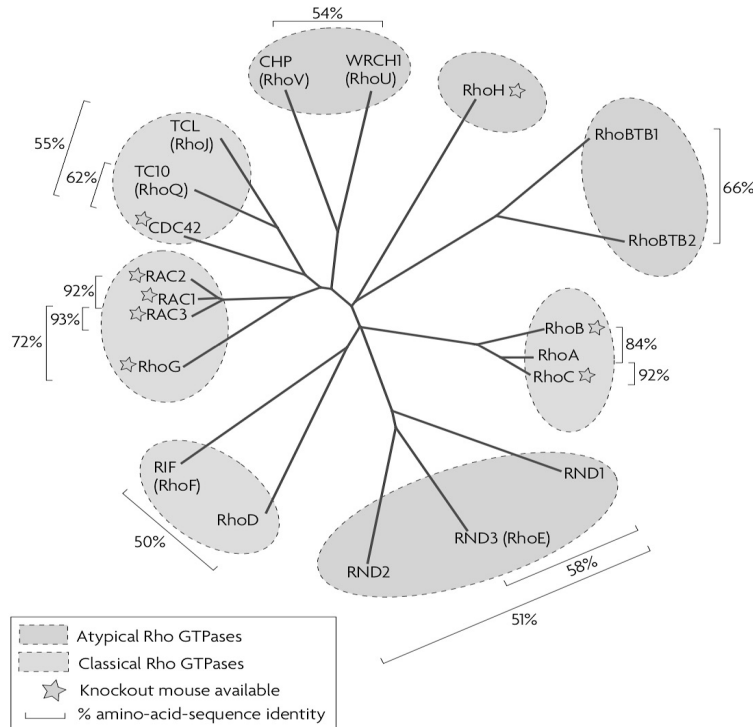


Fig. 6. Árbol filogenético de las RhoGTPasas en mamíferos.

La subfamilia de Rac pertenece a la familia de las RhoGTPasas que consiste en 4 distintos miembros de acuerdo con su origen filogenético y similitud. Tomada de Heasman and Ridley, 2008.

La funcionalidad de la subfamilia Rac ha sido evaluada mediante ensayos de microscopía y la tinción del citoesqueleto en los que se ha determinado su papel fundamental para la formación de lamelipodios, ondas y extensión de membranas; por lo que dentro de los procesos celulares que regulan están: el desarrollo embrionario, la reparación de heridas, la renovación de los tejidos, la respuesta inmune, fagocitosis, endocitosis, la adhesión y la metástasis tumoral (Ligeti et al., 2012). Además el incremento en la expresión de Rac-GTPasa ha sido correlacionada con un mal pronóstico en algunos tipos de cáncer, y a su vez la delección de Rac1 en ratones mutantes que contienen al oncogen *K-Ras* genera una disminución en el tamaño tumoral (Kazanietz and Caloca, 2017; Wang et al., 2010) por lo que Rac-GTPasa posee un papel regulatorio en los procesos tumorales transformantes.

Se ha descrito que el CaSR puede regular tanto la expresión como la activación de Rac en diversos tejidos como en el esófago y células del sistema inmune para regular las uniones célula-célula, la migración celular y la macropinocitosis (Canton et al., 2016; Chang et al., 2018; Nakhoul et al., 2019). El

mecanismo por el cual la señalización del CaSR promueve la activación de Rac ha sido analizado desde la dependencia en la señalización de las proteínas G heterotriméricas, en particular Gi y Gq, PI3Ky y PLC (Canton et al., 2016; Chang et al., 2018); sin embargo, si el CaSR promueve la activación de Rac mediante la activación del mTORC2 hasta la fecha no ha sido explorado.

Como parte de los efectores con los que Rac-GTPasa puede interactuar en su estado activo se encuentran varios señalados en la **Fig.7**. Uno de los efectores más reconocidos es el complejo WAVE/WASP cuya señalización desencadena la activación de Arp2/3 encargado de generar las estructuras de entrecruzamiento de actina requeridas para la formación de lamelas, así como nuevos sitios de nucleación para los filamentos de actina.

Por otro lado, Rac-GTPasa promueve la señalización del complejo PAK/PIX/GIT involucrado en la motilidad y adhesión celular, así como el tráfico endocítico de receptores de membrana. Si bien la actividad de Rac-GTPasa ha sido ampliamente descrita como un regulador de la polimerización de actina en la migración celular, esta proteína posee algunas otras actividades como la regulación sobre la adhesión y la proliferación celular, expresión y transcripción de genes, entre otras, que dependen de la interacción con sus efectores específicos (Bustelo et al., 2007; Müller et al., 2020).

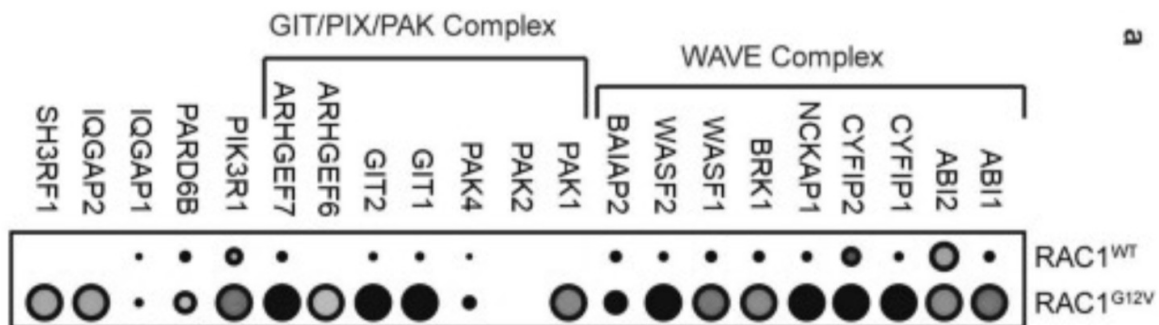


Fig.7. Efectores de la proteína Rac-GTPasa.

Al transfectar a la proteína mutante constitutivamente activa de Rac, RacG12V, en células HEK y HeLa, se ha logrado identificar y validar interacciones de Rac-GTPasa con sus distintos efectores, en la imagen se indican algunos. Tomado de Bagci et al., 2020.

JUSTIFICACIÓN

El CaSR es un receptor miembro de la superfamilia de los GPCRs que se expresa en diversos tejidos en el cuerpo humano. En el tejido mamario el CaSR participa en la formación de la leche materna durante la lactancia y en la homeostasis de calcio del tejido. El CaSR también puede contribuir al desarrollo del proceso tumoral mediante la promoción de la quimiotaxis a través de la secreción de diversos factores quimiotácticos y osteolíticos, la proliferación celular, la evasión de la apoptosis, la migración celular, entre otros (Tennakoon et al., 2015).

Se ha identificado que el gen *CASR* se encuentra altamente mutado en diversas patologías, entre ellas en algunos tipos de cáncer, tanto en regiones intrónicas como exónicas, y que dichas mutaciones pueden repercutir tanto en la expresión como en la funcionalidad del receptor (Campos-Verdes et al., 2018; Grzegorzewska et al., 2016; Jeong et al., 2016).

Mediante la búsqueda de mutaciones somáticas en cáncer de mama en la base de datos *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (COSMIC) nosotros hemos identificado diferentes mutaciones en *CASR*. De particular interés para nuestro laboratorio ha sido investigar mutaciones de tipo contrasentido que codifiquen para las regiones intracelulares del CaSR, ya sea en las asas intracelulares, pases transmembranales o en el C-ter, ya que dichas mutaciones pudiesen alterar las interacciones proteína-proteína, así como generar alteraciones en el arreglo estructural del CaSR, y de esta manera modificar diferencialmente la señalización y los procesos celulares que de ella dependen tales como la migración, secreción, adhesión, entre otros.

Entre las cascadas de señalización evocadas por el CaSR silvestre, y de particular interés para el desarrollo de este proyecto, se encuentra el eje $G\beta\gamma$ -PI3K-AKT, el cual involucra cascadas de señalización río abajo que llevan a la activación de ambos complejos de mTOR, mTORC1 y mTORC2. En particular el mTORC2 se asocia con la reorganización del citoesqueleto a través de la activación de distintos RhoGEFs, que a su vez promueven el estado activo de las RhoGTPasas. La proteína Rac-GTPasa es un miembro de las RhoGTPasas cuya actividad se asocia al reordenamiento del citoesqueleto de actina a través de la interacción con sus proteínas efectoras, que subsecuentemente puede regular procesos como la adhesión, migración, secreción y progresión del ciclo celular.

Nosotros investigamos en este trabajo si receptores mutantes del CaSR generados a partir de mutaciones identificadas en pacientes de cáncer de mama y las cuales se localizan en regiones intracelulares del receptor como son N639K, R886Q y V894I, y uno más localizado en el cuarto pase transmembranal del TMD, T732A, pueden alterar la señalización regulada por el CaSR que es requerida para promover la activación de Rac-GTPasa.

HIPÓTESIS

Las mutaciones en CaSR encontradas en pacientes con cáncer de mama, N639K, T732A, R886Q y V894I, al modificar las regiones intracelulares o transmembranales del receptor generan alteraciones en la señalización y la capacidad para activar a la Rac-GTPasa.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la activación de Rac-GTPasa por el CaSR silvestre y receptores mutantes encontrados en pacientes con cáncer de mama CaSR (N639K, T732A, R886Q y V894I) en el sistema heterólogo células HEK293.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar mediante bases de datos si los receptores mutantes del CaSR encontrados en pacientes con cáncer de mama (N639K, T732A, R886Q y V894I) poseen potencial patogénico.
- Determinar mediante herramientas bioinformáticas si los receptores mutantes del CaSR (N639K, T732A, R886Q y V894I) alteran la conformación estructural del receptor o motivos consenso de modificaciones post-traduccionales.
- Evaluar si los receptores mutantes del CaSR (N639K, T732A, R886Q y V894I) son funcionales.
- Evaluar la activación de Rac-GTPasa por los receptores mutantes del CaSR (N639K, T732A, R886Q y V894I) expresados en células HEK293.
- Evaluar si la activación de Rac-GTPasa por los receptores CaSR mutantes (N639K, T732A, R886Q y V894I) depende del complejo mTORC2.
- Determinar el efecto funcional de la activación de Rac-GTPasa por estímulo del CaSR silvestre y mutantes (N639K, T732A, R886Q y V894I) en el sistema heterólogo HEK293.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

ANÁLISIS COMPUTACIONAL DEL VALOR PATOGENICO PREDICTIVO DE LAS MUTANTES DEL CaSR.

Evaluamos los cambios en el carácter químico de los aminoácidos implicados por las mutaciones CASR N639K, T732A, R886Q y V894I mediante la consulta del libro de bioquímica Lehninger: Principios de bioquímica.

El potencial patogénico predictivo de cada una de estas mutaciones fue determinado mediante la examinación de las siguientes bases de datos:

Tabla 1. Bases consultadas para la aproximación predictiva del potencial patogénico de mutaciones contenidas en el gen CASR en pacientes con cáncer de mama.

Base de datos	Dirección electrónica
FATHMM (COSMIC)	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic
Mutation taster	http://www.mutationtaster.org/
FATHMM-XF (Universidad de Bristol)	http://fathmm.biocompute.org.uk/
Polyphen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/dokuwiki/

Dichos análisis los ejecutamos sobre los identificadores del CaSR ENST00000490131 ó P41180 sesgado para el tejido mamario, y en ellos reportamos los valores numéricos predictivos.

MODELAJE COMPUTACIONAL DE LOS RECEPTORES CaSR.

Analizamos la estructura del CaSR en su estado activo depositada en *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org>) en el enlace 7M3G (Gao et al., 2021) y considerando esta estructura como templado modelamos las mutaciones en el software UCSF Chimera. Evaluamos los enlaces por puente de hidrógeno y contactos entre los residuos de interés y residuos distintos a los adyacentes.

ANÁLISIS DE SUPERFICIE DE ACCESIBILIDAD DE LA PKC HACIA EL CaSR R886Q.

Como parte de la caracterización de los CaSR mutantes exploramos si los receptores CaSR R886Q y V894I, que alteran la secuencia primaria del C-terminal del CaSR, alteran la superficie de accesibilidad por PKC mediante un análisis de alta exigencia en la plataforma *Scansite* 4.0.

Tabla 2. Secuencias de los C-terminales de los receptores CaSR silvestre, R886Q y V894I analizados en Scansite 4.0.

C-ter de Receptor	Secuencia
Silvestre (861-1078)	LFKPSRNTIEEVRCSTAAHAFKVAARATLRRSNVSRKRSSSLGGSTGSTP SSSISKSNSSEDPFPQPERQKQQQPLALTQQEQQQQPLTLPQQQRSQQ QPRCKQKVIFGSGTVTFSLSFDEPQKNAMAHNRNSTHQNSLEAQKSSDTL TRHEPLLPLQCGETDLDLTVQETGLQGPVGGDQRPEVEDPEELSPALVV SSSQSFVISGGGSTVTENVVNS
R886Q	LFKPSRNTIEEVRCSTAAHAFKVAARATLRRSNVSRKRSSSLGGSTGSTP SSSISKSNSSEDPFPQPERQKQQQPLALTQQEQQQQPLTLPQQQRSQQ QPRCKQKVIFGSGTVTFSLSFDEPQKNAMAHNRNSTHQNSLEAQKSSDTL TRHEPLLPLQCGETDLDLTVQETGLQGPVGGDQRPEVEDPEELSPALVV SSSQSFVISGGGSTVTENVVNS
V894I	LFKPSRNTIEEVRCSTAAHAFKVAARATLRRSNVSRKRSSSLGGSTGSTP SSSISKSNSSEDPFPQPERQKQQQPLALTQQEQQQQPLTLPQQQRSQQ QPRCKQKVIFGSGTVTFSLSFDEPQKNAMAHNRNSTHQNSLEAQKSSDTL TRHEPLLPLQCGETDLDLTVQETGLQGPVGGDQRPEVEDPEELSPALVV SSSQSFVISGGGSTVTENVVNS

ANÁLISIS DE VALORES PREDICTIVOS DE MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES POR FOSFORILACIÓN Y UBIQUITINACIÓN EN RECEPTORES CaSR.

Evaluamos las modificaciones post-traduccionales de manera general para los receptores CaSR mutantes en la plataforma *MusiteDeep* (<https://www.musite.net/>) con un valor de corte de 0.5 sobre la secuencia del asa intracelular 1 (ICL1) del CaSR Silvestre y N639K, así como los C-terminales de los receptores CaSR silvestre, R886Q y V894I.

Tabla 3. Secuencias de ICL-1 de los receptores CaSR silvestre y N639K.

ICL1 de Receptor	Secuencia
Silvestre (638-646)	RNTPIVKAT
N639K	RKTPIVKAT

GENERACIÓN DE LOS RECEPTORES MUTANTES DEL CaSR.

A partir de la identificación de mutaciones en el gen *CASR* en pacientes con cáncer de mama de acuerdo con la base de datos COSMIC en nuestro laboratorio

generamos cuatro receptores mutantes del CaSR (N639K, T732A, R886Q y V894I) mediante la estrategia de mutagénesis sitio dirigida utilizando como templado al plásmido pCR3.1hCaSR y mediante el kit *QuickChange Site-Directed Mutagenesis de Stratagene* (Tesis de maestría Hidalgo-Moyle JJ. 2014).

CULTIVO CELULAR.

Mantuvimos células HEK293 en medio DMEM (Sigma-Aldrich Co.) suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%, mientras que las Clona estable de células HEK293 que expresa al CaSR silvestre fue mantenida con medio DMEM suplementada con Higromicina B (200 µg/mL).

TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS HEK293 CON LOS RECEPTORES MUTANTES DEL CaSR.

La línea celular HEK293, que corresponde a células aisladas de tejido de riñón de embrión humano que de manera basal no expresan las formas maduras e inmaduras descritas para el CaSR, fue transfectada de manera transitoria con Lipofectamina (Invitrogen Co) o con Polietilenimina (PEI) de 25 kDa (Polysciences, Inc.) con el plásmido pCR3.1hCaSR Silvestre o con un plásmido pCR3.1 que codifica para los receptores CaSR N639K, T732A, R886Q y V894I.

Brevemente, en un primer tubo A generamos las siguientes mezclas para el método de transfección con Lipofectamina:

Tabla 4. Mezcla de tubo A en método de Lipofectamina.

Área de caja a transfectar	Volumen DMEM sin suero fetal bovino (SFB) ni antibiótico (µL)	DNA (µg)
35 mm	75	1
60 mm	250	2

En un segundo tubo denominado como B preparamos la mezcla:

Tabla 5. Mezcla de tubo B en método de Lipofectamina.

Área de caja a transfectar	Volumen DMEM sin SFB ni antibiótico (µL)	Lipofectamina (µL)
35 mm	75	4.3
60 mm	250	2.5

Homogenizamos ambas mezclas en un solo tubo, y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Para la transfección con el compuesto PEI generamos la mezcla A de la siguiente manera:

Tabla 6. Mezcla de tubo A en método de PEI 25 kDa.

Área de caja a transfectar	Volumen DMEM sin SFB ni antibiótico (µL)	DNA (µg)
35 mm	75	1
60 mm	250	1

El tubo B se generó considerando la relación de µg de DNA-PEI (1:3):

Tabla 7. Mezcla de tubo B en método de PEI 25 kDa.

Área de caja a transfectar	Volumen DMEM sin SFB ni antibiótico (µL)	PEI (µg)
35 mm	75	3
60 mm	250	3

Homogenizamos los volúmenes en una sola mezcla e incubamos a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Posteriormente colocamos las mezclas de transfección sobre el cultivo e incubamos a 37 °C durante 5 horas para el caso de la transfección con Lipofectamina ó 4 horas para la transfección con PEI, tras lo cual retiramos la mezcla y colocamos medio DMEM SFB 10% fresco.

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES MUTANTES DEL CaSR.

Las células HEK293 transfectadas en cajas de 35 mm, fueron lisadas con 150 µL de buffer de lisis B frío de pH 7.5, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl y 1% Tritón X-100 suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Tabla 8).

Tabla 8. Inhibidores contenidos en el Buffer de Lisis B.

Inhibidor	Concentración
Aprotinina	10 µg/mL
Leupeptina	10 µg/mL
PMSF	10 mM
Ortovanadato de Sodio	1 µM
Fluoruro de Sodio	1 µM
Beta glicerol fosfato	10 µM

Los lisados celulares fueron centrifugados a 1550 x g a 4°C durante 10 minutos y cuantificados por el método colorimétrico de Bradford empleando el kit de Bio-Rad. Posteriormente, preparamos los lisados celulares conteniendo 20 µg de proteína con buffer de muestra 4X de 250 mM Tris-HCl, 10% SDS, 40% glicerol y azul de bromofenol, sin y con el agente reductor β-mercaptoetanol al 20%. Procesamos las muestras resultantes en geles de poliacrilamida al 08%, y transferimos los geles a membranas de nitrocelulosa a 320 mA durante 150 minutos en una cámara de transferencia de Bio-Rad. La membrana fue incubada en leche descremada al 5% en TBS-Tween 1X durante 1 hora y posteriormente incubada toda la noche a 4 °C con el anticuerpo ADD, el cual reconoce una

secuencia específica del N-terminal del CaSR, para evaluar la formación de homodímeros así como la maduración de los receptores CaSR con la siguiente dilución de anticuerpos:

- Anti-ADD (1:15 000)
- Anti-ratón conjugado a HRP Seracare KPL (1:30 000)

Subsecuentemente, incubamos las membranas con su anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rábano y reveladas en películas auto radiográficas utilizando los sustratos quimioluminiscentes ECL de *Thermo Fisher Scientific*.

ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA ERK1/2 POR LOS RECEPTORES MUTANTES DEL CaSR.

Para determinar si los receptores mutantes del CaSR poseen la capacidad de transducir señales, evaluamos la fosforilación de las proteínas cinasas ERK1/2 tras la estimulación de los receptores CaSR silvestre y mutantes. Para esto células HEK293 ya transfectadas con los distintos CaSR en cajas de 35 mm fueron ayunadas durante 16 horas con medio DMEM sin calcio suplementado con 0.25 mM de calcio. Posteriormente estimulamos a las células transfectadas con DMEM con calcio (1.5 mM) en presencia del agente calcimimético R568 (1 μ M) de *Tocris Bioscience* durante 3 minutos. Los lisados celulares se colectaron utilizando 150 μ L del Buffer de lisis con B con inhibidores de proteasas y fosfatasa (**Tabla 8**), y preparamos muestras de los lisados en buffer de muestra en condiciones reductoras para analizarlas en un gel de poliacrilamida al 10 % que nos permitió resolver las bandas correspondientes a las proteínas ERK1 y 2. Transferimos los geles a membranas de PVDF, que posteriormente fueron bloqueadas con una solución de leche descremada al 5% en TBS-Tween 1X e incubada toda la noche con los anticuerpos que reconocen la fosforilación en los residuos T202/Y204 de ERK1/2 así como las proteínas totales de la compañía *Signaling Technology, Inc.*

Dilución de los anticuerpos:

- Anti-fosfo ERK1/2 (1:40 000)
Anti-conejo conjugado a HRP Seracare KPL (1:20 000)
- Anti-ERK (1:10 000)
Anti-conejo conjugado a HRP Seracare KPL (1:10 000)

Las membranas se revelaron en placas auto radiográficas de la manera anteriormente descrita y las bandas obtenidas se analizaron mediante densitometría con el software ImageJ. Los análisis estadísticos los realizamos con el software *Prism6* mediante una prueba *t*-Student no pareada utilizando los píxeles obtenidos con la señal de fosforilación de ERK.

ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE LAS PROTEÍNAS G POR LAS MUTANTES DEL CaSR.

Puesto que se ha descrito que el CaSR silvestre señaliza principalmente a través de las proteínas heterotriméricas Gi y Gq en las células HEK293, determinamos si los receptores CaSR mutantes pudiesen alterar dicho acople y señalizar de manera diferencial. Adicionalmente exploramos si la inhibición de la proteína PKA cuya activación normalmente se reconoce como efecto de la señalización de la proteína Gs y la cual se activa aberrantemente por estimulación del CaSR en cáncer de mama (Mamillapalli and Wysolmerski, 2010), altera la señalización de los CaSR mutantes.

Utilizamos tres distintos inhibidores farmacológicos (**Tabla 9**) para bloquear la señalización de las proteínas G heterotriméricas o a sus efectores. Específicamente empleamos al compuesto U73122 (5 μ M) de Calbiochem para inhibir la PLC, la cual es el efector de la proteína heterotrimérica Gq. La toxina pertusis (PTX) de Calbiochem a una concentración de 200 ng/mL se utilizó para inhibir la señalización de la proteína Gi; y el compuesto H89 (10 μ M) de Sigma-Aldrich se empleó para bloquear la actividad de la cinasa PKA.

Tabla 9. Inhibidores de la señalización de proteínas G heterotriméricas.

Compuesto	Pretratamiento	Concentración
U73122	15 minutos	5 μ M
PTX	20 horas	200 ng/mL
H89	1 hora	10 μ M

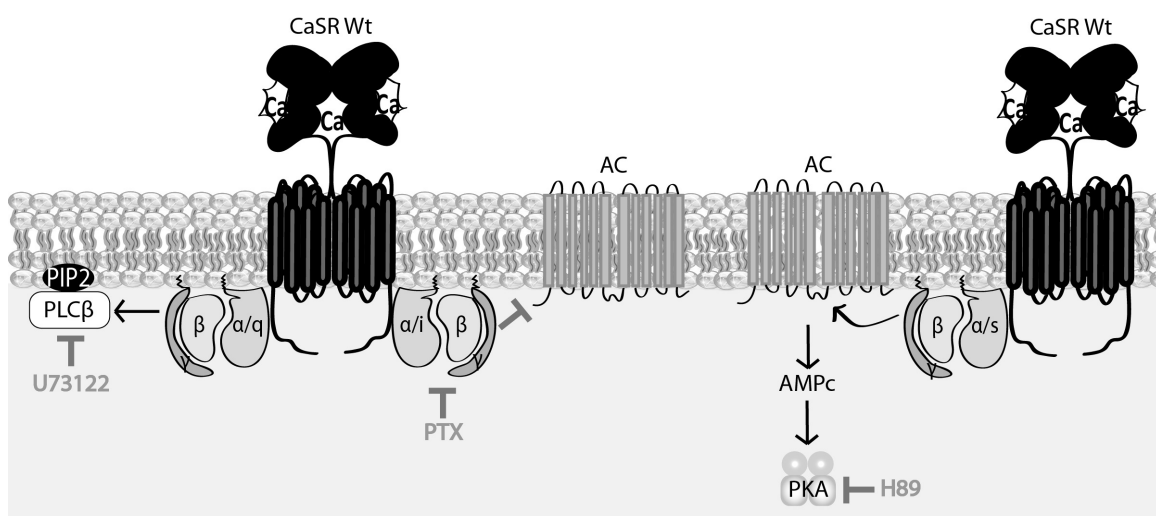


Fig. 8. Estrategia farmacológica de inhibición del CaSR.

Las proteínas heterotriméricas Gq y Gi, comúnmente activadas por CaSR silvestre, pueden ser inhibidas mediante los fármacos U73122 y PTX respectivamente. A su vez, el fármaco inhibidor de cinasas H89 puede inhibir la actividad de la PKA,

proteína frecuentemente activada río debajo de la señalización de Gs heterotrimérica.

Las células HEK293 transfectadas en cajas de 35 mm y previamente ayunadas como ya se ha descrito, se trataron con los distintos inhibidores en condiciones de ayuno (**Tabla 9**) así como durante la estimulación con calcio (1.5 mM) y el calcimimético R568 (1 μ M) en medio DMEM durante 3 minutos. Colectamos los lisados celulares mediante el uso de 150 μ L del buffer de lisis B con inhibidores de proteasas y fosfatasas (**Tabla 8**), y los preparamos con buffer de muestra en condiciones reductoras. Posteriormente analizamos las muestras en un gel de poliacrilamida al 10% y transferimos los geles a membranas de PVDF. Para determinar el efecto de los inhibidores farmacológicos sobre la activación de ERK1/2 se incubaron anticuerpos que determinan las fosforilaciones en ERK 1/2 (T202/Y204) así como ERK total de la compañía de *Cell Signaling Technology, Inc* durante toda la noche; y la técnica de *western blot* se realizó de la manera anteriormente descrita.

El análisis densitométrico de las bandas obtenidas se realizó con ImageJ y el análisis estadístico se realizó mediante el software Prism6 mediante una prueba *t*-Student no pareada.

ANÁLISIS DE FOSFORILACIÓN DE CREB POR MUTANTES DEL CaSR.

Considerando que todos los receptores CaSR mutantes de este estudio se identificaron en pacientes con cáncer de mama, exploramos si los receptores CaSR mutantes promueven la fosforilación de la proteína CREB debido a la actividad de la proteína cinasa PKA como parte de la cascada de señalización de la proteína Gs. Para ello empleamos a la proteína myc-mCherry-PKI la cual se une a la subunidad catalítica de la PKA y previene la fosforilación de sustratos por la cinasa.

Determinamos el efecto inhibitorio de la proteína PKI en las células HEK293 mediante el tratamiento de células ya transfectadas en cajas de 35 mm con vector o la proteína myc-mCherry-PKI y previamente ayunadas en medio DMEM 0.25 mM de calcio, a las cuales tratamos con los fármacos FSK (1 μ M) e IBMX (50 μ M) de Sigma en medio DMEM 0.25 mM de calcio durante 3 minutos para posteriormente coleccionar los lisados celulares.

Después evaluamos el efecto de PKI sobre la señalización de los receptores CaSR mutantes en células HEK293 ya transfectadas con los distintos CaSR, silvestre o mutantes, mediante la determinación de las fosforilaciones de tipo activante sobre el residuo Serina 133 de CREB y ERK1/2 (T202/Y204) de la manera descrita tras el estímulo de calcio (1.5 mM) y el calcimimético R568 (1 μ M) en medio DMEM durante 3 minutos.

Brevemente, posterior al estímulo colectamos los lisados celulares con 150 μ L de buffer de lisis B suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Tabla 8). Preparamos las muestras proteicas con buffer de muestra en condiciones reductoras para su posterior análisis en geles de poliacrilamida al 10%. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF, y las membranas se bloquearon con leche al 5% previamente a su incubación de toda la noche con los anticuerpos que reconocen las fosforilaciones de ERK1/2 y CREB, éste último adquirido en la compañía Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Dilución de los anticuerpos:

- Anti-fosfo CREB (1:3000)
Anti-conejo conjugado a HRP Seracare KPL (1:10000)

Como control de transfección de la proteína myc-mCherry-PKI evaluamos la expresión de Myc en ensayos de *western blot* empleando el anticuerpo que reconoce a la proteína de la compañía *Thermo Fisher Scientific* en incubación a 4 °C toda la noche.

Dilución de los anticuerpos:

- Anti-Myc (1:20 000)
Anti-ratón conjugado a HRP Seracare KPL (1:20 000)

ANÁLISIS DE ACTIVACIÓN DE RAC-GTPasa POR CaSR SILVESTRE Y MUTANTES.

Realizamos el análisis de activación de Rac-GTPasa mediante la captura de esta GTPasa con la región mínima de interacción con su efector PAK. Para este fin generamos perlas de Glutación sefarosa (de GE Healthcare) en cuya superficie contienen a la proteína recombinante GST-PAK-N para capturar a la fracción Rac-GTP mediante ensayos de purificación por afinidad o *pulldown*.

Sembramos células HEK293 en cajas de 60 mm, las transfectamos y ayunamos, posteriormente las estimulamos con calcio (1.5 mM) y R568 (1 μ M) en DMEM durante 3 minutos en ausencia o presencia del calcilítico NPS2143 (10 μ M) de *Tocris Bioscience* o Rapa (40 ng/mL) de Calbiochem. Las células posteriormente fueron lavadas una vez con PBS1X suplementado con MgCl₂ y lisadas con 350 μ L de buffer de lisis frío 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ y 1% Tritón X-100 suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Tabla 8). Centrifugamos 220 μ L de lisado total a 1550 x g a 4°C durante 5 minutos y el sobrenadante se incubó con 40 μ L perlas de Glutación sefarosa GST-PAK-N durante 45 minutos en agitación a 4 °C. Las perlas fueron lavadas tres veces con el buffer de lisis frío, resuspendidas en buffer de muestra 1X, ebulidas y analizamos las muestras en un gel de poliacrilamida al 12%. Con el resto de los lisados generamos muestras proteicas en buffer de muestra para su análisis por ensayos de *western blot*. Transferimos los geles a membranas de PVDF con una cámara de Bio-Rad, las membranas se bloquearon

con una solución de leche al 5% y se incubaron toda la noche con anticuerpo dirigido contra la proteína Rac (BD Transduction Laboratories).

Dilución de los anticuerpos:

- Anti-Rac (1:30 000)
Anti-ratón conjugado a HRP Seracare KPL (1:50 000)

Como control de activación del CaSR analizamos la fosforilación de ERK1/2 en las muestras. El análisis de las bandas obtenidas por exposición de las placas auto radiográficas se realizó mediante un análisis densitométrico en el software ImageJ y con una prueba estadística de *t*-Student no pareada en el software Prism6.

EVALUACIÓN DE LA MIGRACIÓN CELULAR REGULADA POR CaSR SILVESTRE Y CaSR MUTANTES MEDIANTE ENSAYOS DE CIERRE DE HERIDA.

Evaluamos la migración celular regulada por efecto de la activación de los CaSR, silvestre y mutantes, mediante ensayos por cierre de herida en células HEK293 transfectadas con Lipofectamina (Invitrogen Co) y sembradas en cajas de 35 mm tratadas con gelatina al 0.02%. Una vez confluentes, ayunamos a las células con medio DMEM 0.25 mM de calcio, y las tratamos con 12 μ M de Mitomicina C (Sigma) durante 1 hora en incubación. Posteriormente realizamos una herida sobre la monocapa de cada caja, y colocamos el estímulo de calcio (1.5 mM) y R568 (1 μ M) en medio DMEM; como control positivo empleamos al factor de crecimiento de hepatocitos alfa (HGF α) 10 ng/mL. El cierre de la herida se siguió en el tiempo de 24 horas, y determinamos el porcentaje del área cubierta de la herida mediante ImageJ para hacer un análisis estadístico en el software Prism6 por prueba *t*-Student no pareada.

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FIBRONECTINA EN CÉLULAS HEK293 TRANSFECTADAS CON CaSR SILVESTRE O MUTANTES.

Puesto que CaSR regula la adhesión celular de manera dependiente de Fibronectina en distintos tipos celulares, determinamos la expresión de la proteína Fibronectina en lisados provenientes de células HEK293 transfectadas con los distintos receptores CaSR y obtenidos de la manera anteriormente descrita.

Analizamos las muestras proteicas en un gel de poliacrilamida al 6%, y posteriormente transferimos los geles a membranas de nitrocelulosa. Bloqueamos las membranas con una solución de BSA al 4% durante 1 hora e incubamos toda la noche a 4°C con un anticuerpo-anti-fibronectina (1:2 000), gentilmente donado por el Dr. Enrique Othón Hernández González del departamento de Biología Celular del CINVESTAV sede Zacatenco. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas en la placa auto radiográfica lo realizamos en el software ImageJ y el análisis estadístico mediante una prueba *t*-Student no pareada ajustada a los pixeles de expresión obtenidos para el CaSR silvestre lo realizamos en el software Prism6.

DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN DE RAC-GTPasa SOBRE LA SECRECIÓN DE IL-8 MEDIADA POR EL CaSR EN CÉLULAS HEK293 TRANSFECTADAS ESTABLEMENTE CON CaSR SILVESTRE (CLONA 7).

Para determinar si Rac-GTPasa posee una función regulatoria sobre la secreción de IL-8 promovida por el CaSR utilizamos a la denominada Clona7, que se refiere a un cultivo de células HEK293 que de manera estable expresan al CaSR silvestre, y las cuales se transfectaron con proteínas mutantes de Rac-GTPasa, Rac Q61L representa el estado constitutivamente activo de la proteína y RacT17N representa la forma dominante negativa ó inactiva de Rac.

Las células de la Clona7 fueron transfectadas en cajas de 35 mm con las proteínas Rac mutantes (1µg) utilizando Lipofectamina (Invitrogen Co), y posteriormente fueron ayunadas durante 16 horas. Después tratamos a las células con un estímulo de calcio (1.5 mM) en presencia de R-568 (1 µM), y como control negativo empleamos DMEM 0.25 mM de calcio durante 3 horas. Posteriormente los medios condicionados fueron centrifugados a 200 x g por 5 minutos a 4°C, e incubamos 200 µL de medios condicionados de cada condición con 12.5 µL de una mezcla de perlas citométricas para la detección de quimiocinas humanas y 12.5 µL del reactivo de detección de ficoeritrina durante 3 horas en oscuridad a temperatura ambiente del kit de detección de quimiocinas humanas (BD Biosciences, CBA). Posteriormente las perlas fueron lavadas con buffer de lavado del kit, centrifugadas a 200 x g por 5 minutos a 4°C y resuspendidas en 250 µL de buffer de lavado.

Las muestras se leyeron en el citómetro de flujo de Beckman Coulter de los laboratorios centrales del CINVESTAV Zacatenco para determinar la concentración de IL-8 mediante una curva estándar y el ajuste al número de células sembradas para cada condición. Procesamos los datos de manera estadística en el software Prism6 por prueba *t*-Student ajustada a la condición de estímulo para el CaSR silvestre con vector vacío.

PARTICIPACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA EN LA SECRECIÓN DE IL-8 PROMOVIDA POR EL CaSR.

La señalización inducida por la actividad de Rac-GTPasa comúnmente involucra a efectores que promueven la remodelación del citoesqueleto de actina, por ello investigamos si al perturbar el estado dinámico de polimerización de actina se altera la secreción de IL-8 promovida por el CaSR silvestre.

Las células Clona7 sembradas en cajas de 35mm fueron ayunadas en presencia de los fármacos: Jasplakinolido (Jaspk) que favorece el estado de actina filamentoso, y Latrunculina B (LatB) que incrementa el estado globular de actina (**Tabla 10**).

Tabla 10. Fármacos que perturban la dinámica del citoesqueleto de actina.

Compuesto	Pretratamiento	Concentración
Jaspk	1 hora	50 nM
Lat B	1 hora	1 μ M

Posteriormente, estimulamos a las células con calcio (1.5 mM) y R568 (1 μ M) en presencia de los fármacos antes mencionados, utilizando como control negativo células Clona7 mantenidas en calcio (0.25 mM) en DMEM durante 3 horas. Transcurrido el tiempo de estímulo, recuperamos los medios condicionados y centrifugamos a 200 x *g* por 5 minutos a 4 °C para su posterior análisis por citometría de flujo con el kit de detección para quimiocinas previamente descrito (BD Biosciences, CBA). Analizamos los resultados en el software Prism6 por prueba *t*-Student no pareada ajustada a la condición de estímulo para el CaSR sin tratamiento farmacológico.

RESULTADOS

LAS MUTACIONES DE TIPO CONTRASENTIDO SON LAS PRINCIPALES ALTERACIONES DEL GEN *CASR* EN CÁNCER DE MAMA.

Puesto que la secuenciación de muestras clínicas ha generado una creciente información depositada en distintas bases de datos, nosotros analizamos las distintas mutaciones contenidas en el gen *CASR* en pacientes con cáncer de mama a partir de la consulta de las bases COSMIC, cBioPortal y TCGA.

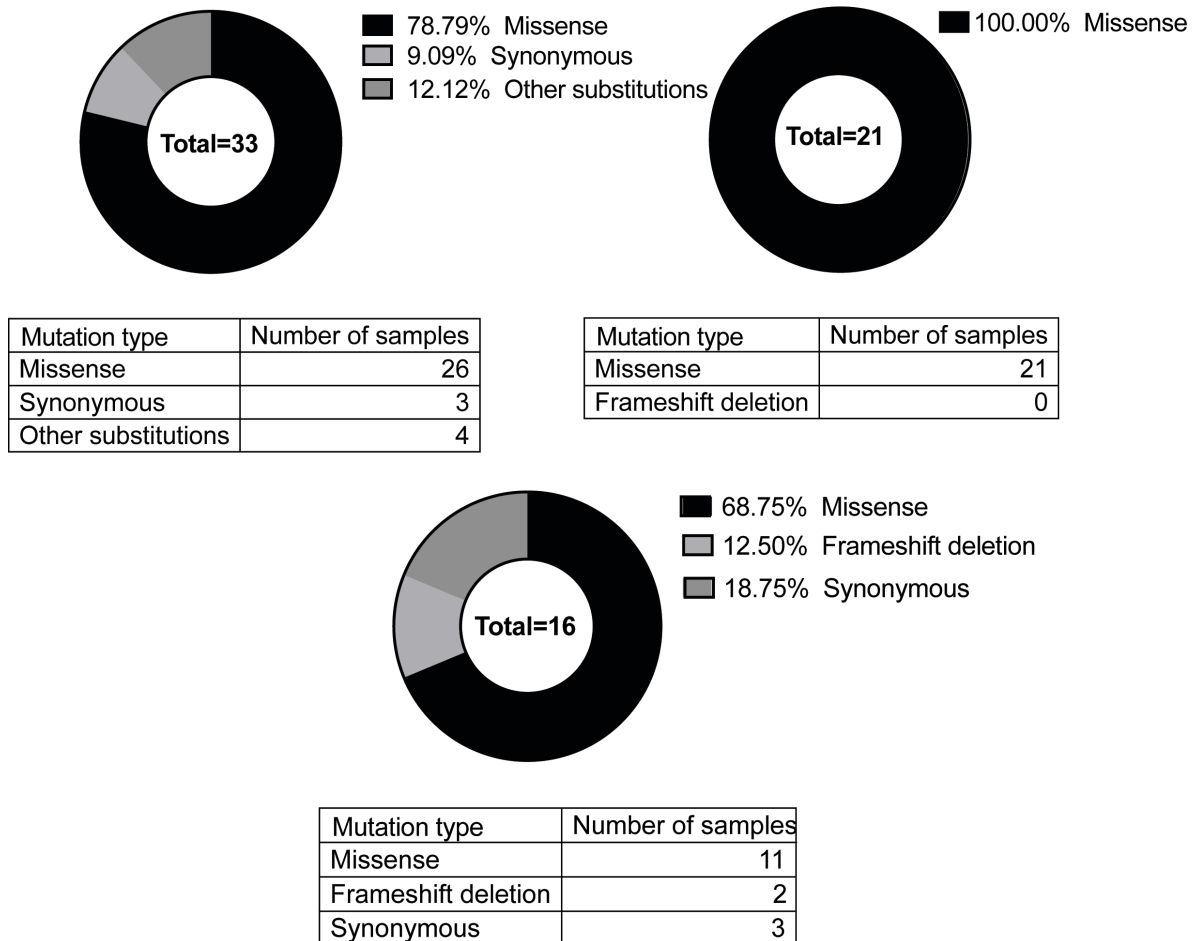


Fig. 9. Gráficas de dona donde se muestran mutaciones en el gen *CASR* en pacientes con cáncer de mama identificadas a través de distintas bases de datos.

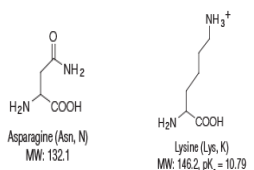

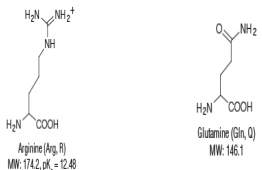
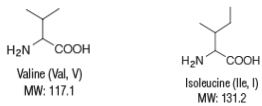
A la fecha la base COSMIC reporta 33 distintas mutaciones para el gen *CASR*, cBioPortal 21 mientras que TCGA reporta 16.

De manera consistente observamos que, en las tres bases de datos, las mutaciones de tipo contrasentido son las principales mutaciones identificadas en el gen *CASR* en pacientes con este tipo de cáncer.

PREDICCIÓN PATOGENICA DE LOS RECEPTORES CaSR MUTANTES.

Con base en el carácter químico de los aminoácidos involucrados en cada una de las mutaciones en los receptores CaSR mutantes nosotros realizamos un análisis para estimar las repercusiones que pudiesen generar (**Tabla 11**).

Tabla 11. Análisis de mutaciones por carácter químico.

Mutación	Nuevo residuo	Carácter químico
CaSR N639K	c.1917C>A K : Lisina	El residuo K aporta una carga positiva por lo que podría modificar interacciones electrostáticas del asa intracelular 1
	 <p>Asparagine (Asn, N) MW: 132.1</p> <p>Lysine (Lys, K) MW: 146.2, pK_a = 10.79</p>	
CaSR T732A	c.2194A>G A : Alanina	El residuo A es de menor tamaño y polaridad que la T, al presentarse en el cuarto pase transmembranal pudiese afectar el arreglo de los pases transmembranales cercanos.
	 <p>Threonine (Thr, T) MW: 119.1, pK_a = 16</p> <p>Alanine (Ala, A) MW: 89.09</p>	
CaSR R886Q	c.2657G>A Q : Glutamina	La mutación genera una pérdida de carga positiva, el residuo Q aunque de carácter polar no posee ninguna carga y pudiese alterar interacciones electrostáticas.
	 <p>Arginine (Arg, R) MW: 174.2, pK_a = 12.48</p> <p>Glutamine (Gln, Q) MW: 146.1</p>	
CaSR V894I	c.2680G>A I : Isoleucina	El residuo I al igual que la V es de carácter no polar sin carga y posee un tamaño similar.
	 <p>Valine (Val, V) MW: 117.1</p> <p>Isoleucine (Ile, I) MW: 131.2</p>	

Entre los cuatro receptores CaSR mutantes analizados en este trabajo, el CaSR V894I presenta el menor cambio de carácter químico ya que los aminoácidos implicados en la mutación son similares en tamaño y polaridad.

Para predecir el carácter patogénico de las mutaciones evaluadas en este proyecto (*CASR* N639K, T732A, R886Q y V894I), generamos análisis

bioinformáticos mediante el uso de distintas bases de datos que calculan valores numéricos a partir de logaritmos. Los valores más cercanos a 1 se consideran de mayor potencial patogénico (**Tabla 12**). Adicionalmente investigamos si las mutaciones en *CASR* se han identificado y/o asociado a otro tipo de fenotipos clínicos, esto de acuerdo con los reportes en la base *Clinical Variation* (ClinVar) del Centro Nacional para la información Biotecnológica de los Estados Unidos de América (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>).

Las predicciones FATHMM (*Functional Analysis through Hidden Markov Models*), reportadas en COSMIC y en la página de la Universidad de Bristol, analizan consecuencias funcionales de polimorfismos de un solo nucleótido no sinónimo que asocian la conservación evolutiva de secuencias homólogas con mutaciones relacionadas a enfermedades mediante modelos de probabilidad bayesiana. Por otro lado, la base *Mutation taster* genera predicciones del potencial patogénico de una variación genética, sea sustitución de un aminoácido, mutación sinónima o inclusive intrónica, mediante clasificación de Bayes. Finalmente, Polyphen-2 es un software que predice un posible impacto de las sustituciones de los aminoácidos en la estructura y función de una proteína a través de consideraciones comparativas físicas y evolutivas.

Tabla 12. Análisis del valor predictivo patogénico para las mutaciones del CaSR.

Analizamos las mutaciones identificadas en la base de datos COSMIC en cuatro distintas plataformas que evalúan la patogenicidad de distintas variantes de un solo nucleótido mediante un valor numérico. Además investigamos si las mutaciones se han asociado a fenotipos clínicos de acuerdo con los reportes de la base de datos ClinVar.

Mutación	Predicción FATHMM (COSMIC)	Predicción FATHMM-XF (UB)	Predicción Mutation taster	Predicción Polyphen-2	Predicción ClinVar
CaSR N639K	0.94	0.745492	Causante de enfermedad: 0.999964780	Mutación probablemente dañina: 0.961	No hay reportes
CaSR T732A	1.00	0.962285	Causante de enfermedad: 0.999999990	Mutación probablemente dañina: 0.780	Alteraciones en la homeostasis del calcio DepMap: Linfoma de Hodgkin
CaSR R886Q	0.96	0.937216	Causante de enfermedad: 0.998140098	Mutación probablemente dañina: 0.968	Alteraciones en la homeostasis del calcio COSMIC: Cáncer de endometrio
CaSR V894I	0.93	0.483935	Mutación probablemente inofensiva: 0.961759774	Mutación benigna: 0.0	Alteraciones en la homeostasis del calcio COSMIC: Cáncer de estómago

La mutación R886Q muestra los valores predictivos con mayor potencial patogénico entre los diferentes softwares, con valores que van desde 0.937 a 0.998 (**Tabla 12**). Interesantemente el residuo R886 se ha visto mutado en pacientes con distintos tipos de cáncer; en este sentido la mutación R886Q se ha identificado tanto en pacientes con cáncer de mama como de endometrio, mientras que en pacientes con glioblastoma se ha identificado la mutación R886W de acuerdo con la base de datos COSMIC. Además la mutación CaSR R886Q también se ha identificado en pacientes con alteraciones en la homeostasis del calcio de acuerdo con los datos reportados en ClinVar (**Tabla 12**), dichas evidencias sugieren un potencial patogénico.

Por otro lado, los valores patogénicos predictivos para la mutación V894I presentaron una mayor variación, con valores que van desde 0 hasta 0.962 (**Tabla 12**). Dado que la mutación CaSR V894I ha sido identificada en pacientes con cáncer de mama y de estómago de acuerdo con COSMIC y que la búsqueda de la mutación CASR V894I en ClinVar se ha identificado en pacientes con alteraciones en la homeostasis del calcio no se descartó su potencial patogénico.

MODELAJE DE LOS RECEPTORES CaSR SILVESTRE Y MUTANTES.

A partir de la reciente cristalización de la estructura molecular del CaSR silvestre en estado activo y unión a calcio con una resolución de 2.5 Å depositada en Protein Data Bank (Gao et al., 2021), identificamos los residuos mutados en la estructura del CaSR silvestre para determinar si existen diferencias importantes en la estructura tridimensional de los receptores CaSR mutantes. Puesto que no toda la región C-terminal del CaSR silvestre forma una estructura organizada por Cryo-EM ni mediante el software Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0 o Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>), en el cual se obtiene el modelaje de sólo el 17% de la secuencia total de 218 residuos que conforman al C-ter del CaSR; el modelaje correspondiente al CaSR V894I en este trabajo fue un modelo hipotético.

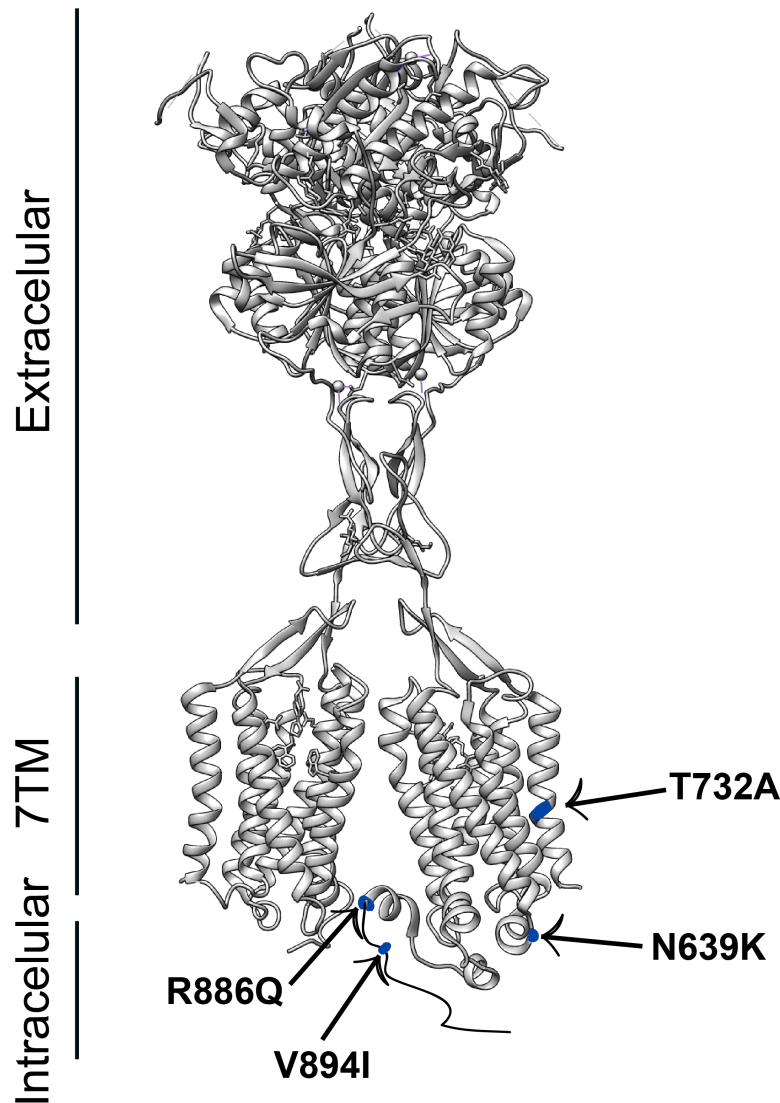


Fig. 10. Identificación de los residuos N639, T732, R886 y V894 en la estructura del CaSR en estado activo.

En la estructura resuelta del CaSR en estado activo y unión a calcio, identificamos los residuos N639, T732, R886 y V894 indicados en color azul. No encontramos contactos o enlaces entre los residuos que indiquen una contribución en el arreglo tridimensional del CaSR.

El residuo del CaSR N639 se localiza en el ICL-1 y se orienta hacia el exterior de la molécula en contacto con el citoplasma y potencialmente expuesto para interacciones intermoleculares, sin embargo no identificamos interacciones intramoleculares que dependan de este residuo mediante enlaces por puente de hidrógeno ni contactos con otros residuos (**Fig.10**). Por otro lado el residuo T732 se presenta en el dominio 4 de los 7TM; el modelaje de este residuo T732 muestra

una orientación hacia la superficie de interacción entre los dominios transmembranales 4 y 3, de manera opuesta a la región orientada hacia la membrana plasmática (**Fig.10**), no identificamos enlaces por puente de hidrógeno dependientes de este residuo diferentes a los adyacentes al residuo. El residuo R886 se localiza en la región C-terminal proximal (**Fig.10**), y no observamos que el residuo medie interacciones intramoleculares que alteren la estructura del CaSR. Finalmente el residuo V894I en nuestro modelaje fue meramente hipotético y no se analizaron si existen contactos a través de enlaces dependientes de este residuo por falta de una resolución de la región.

LOS CaSR MUTANTES R886Q Y V894I POTENCIALMENTE ALTERAN LOS MOTIVOS CONSENSO DE MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES.

La región proximal C-terminal del CaSR es importante para su señalización puesto que participa en interacciones proteína-proteína, así como su regulación post-traducciona al contener sitios consenso de fosforilación. Considerando los eventos de fosforilación en el C-terminal del CaSR investigamos si los receptores CaSR R886Q y V894I alteran la señalización del CaSR mediante cambios en la superficie de accesibilidad a proteínas cinasas que modifican al receptor. En este sentido, se ha descrito que la internalización y desensibilización del CaSR es dependiente de la fosforilación por PKC en los residuos S875 y T888 (Binmahfouz et al., 2019); mediante un análisis bioinformático en la base Scansite 4.0 con alta exigencia investigamos si los receptores mutantes CaSR R886Q y V894I, cuyas mutaciones se encuentran en regiones cercanas al residuo T888, alteran dicha fosforilación.

Tabla 13. Exploración de la superficie de accesibilidad por PKC sobre los receptores CaSR.

El análisis del C-ter del CaSR R886Q en la base Scansite 4.0 indica un cambio en la superficie de accesibilidad a un sitio fosforilable por PKC.

Receptor	Motivo	Sitio	Secuencia	Superficie de accesibilidad
CaSR silvestre	PKC $\alpha/\beta/\gamma$ (PKC común)	T888	FKVAARA t LRRSNVS	2.0703
CaSR R886Q	PKC $\alpha/\beta/\gamma$ (PKC común)	T888	FKVAAQA t LRRSNVS	1.8306
CaSR V894I	PKC $\alpha/\beta/\gamma$ (PKC común)	T888	FKVAARA t LRRSNIS	2.0703

Encontramos que la mutación R886Q alteró el valor de superficie de accesibilidad por PKC al residuo T888, no así la mutación V894I que muestra un valor de accesibilidad igual al CaSR silvestre.

Posteriormente nosotros consultamos las modificaciones post-traduccionales reportadas para el CaSR silvestre mediante la base de datos *PhosphoSitePlusV6*.

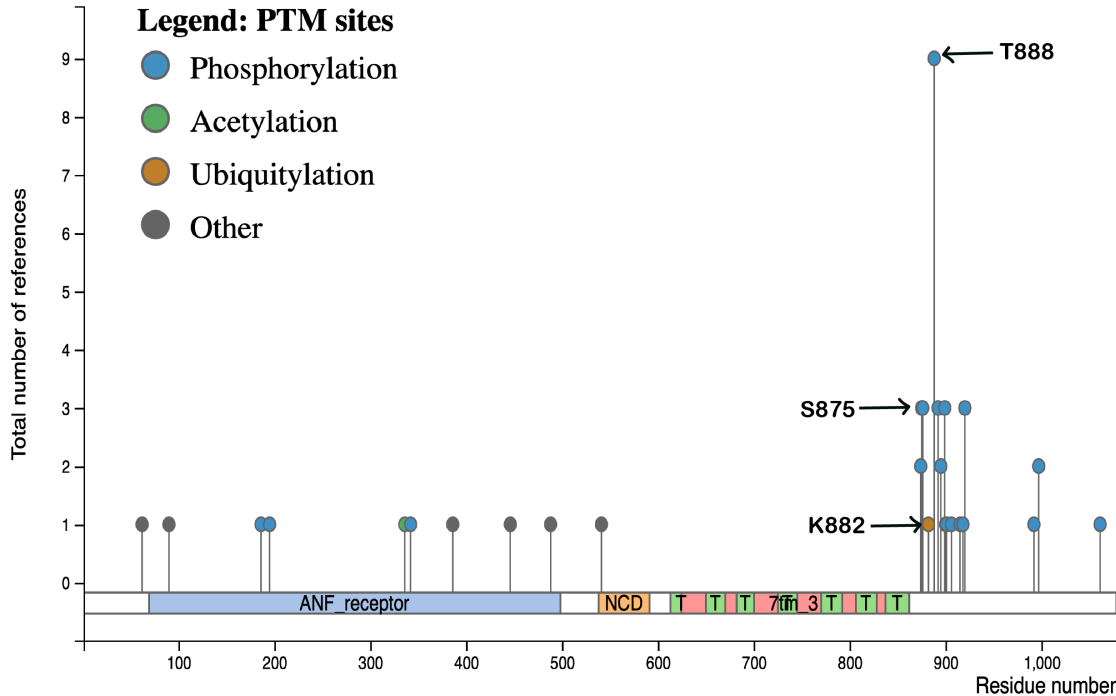


Fig.11. Modificaciones post-traduccionales en CaSR de acuerdo con PhosphoSitePlusV6.

En el esquema se muestran las modificaciones post-traduccionales a lo largo de la estructura compuesta de 1078 residuos del CaSR, entre ellas destacan las fosforilaciones indicadas en color azul y las cuales representan el principal tipo de modificación post-traduccionales en el C-terminal del CaSR, seguidas de la glicosilación indicada en color gris y que se presentan en la región N-terminal.

Encontramos que la región C-terminal del CaSR contiene varios residuos potencialmente fosforilables, siendo quizá los más importantes la S875 y T888 (**Fig.11**). Por otro parte, el residuo K882 indicado en color café es hasta ahora el único sitio de ubiquitinación reportado para el CaSR (Wagner et al., 2012). Esta modificación post-traduccionales se relaciona con el tráfico y degradación de los GPCRs, así como la interacción con diversos efectores (Patwardhan and Cheng, 2021). Con estos antecedentes investigamos si las mutaciones R886Q y V894I que alteran la secuencia primaria del C-terminal de CaSR, o la mutación N639K que altera la secuencia primaria del ICL1 pudiesen alterar los valores predictivos de las modificaciones post-traduccionales de fosforilación y ubiquitinación mediante el software MusiteDeep (**Tabla 14 y 15**).

Tabla 14. Valores predictivos de modificaciones post-traduccionales en el ICL-1 de los receptores CaSR silvestre y N639K mediante análisis en MusiteDeep.

Posición ICL-1	Residuo	Modificación Post-traduccional	Wt Confianza=0.5	N639K Confianza=0.5
640	T	Fosforilación	0.838	0.84

Para el ICL-1 encontramos que MusiteDeep indica una fosforilación en el residuo Treonina640 que hasta ahora por ensayos de alta fidelidad no ha sido detectado de acuerdo con la información de la base de datos PhosphoSitePlusV6. Nosotros no encontramos diferencias significativas entre los valores predictivos de esta modificación post-traduccional por los receptores CaSR silvestre y N639K (**Tabla 14**).

Tabla 15. Valores predictivos de modificaciones post-traduccionales en los C-terminales de los receptores CaSR silvestre, R886Q y V894I mediante análisis en MusiteDeep.

Posición C-terminal	Residuo	Modificación Post-traduccional	Wt Confianza =0.5	R886Q Confianza =0.5	V894I Confianza =0.5
888	T	Fosforilación	0.501	0.563	0.0
897	K	Ubiquitinación	0.0	0.0	0.518
899	S	Fosforilación	0.803	0.807	0.81
900	S	Fosforilación	0.667	0.677	0.672
901	S	Fosforilación	0.869	0.87	0.868
905	S	Fosforilación	0.683	0.683	0.688
908	S	Fosforilación	0.634	0.634	0.636
909	T	Fosforilación	0.696	0.696	0.698
918	S	Fosforilación	0.735	0.735	0.735
920	S	Fosforilación	0.805	0.805	0.805
931	K	Ubiquitinación	0.52	0.52	0.52
992	S	Fosforilación	0.746	0.746	0.746
993	T	Fosforilación	0.516	0.516	0.516
997	S	Fosforilación	0.83	0.83	0.83
1003	S	Fosforilación	0.511	0.511	0.511
1051	S	Fosforilación	0.725	0.725	0.725

Con respecto de los receptores CaSR R886Q y V894I encontramos que los valores predictivos de fosforilación en el residuo T888 presentaron alteraciones, para la mutación R886Q dicho valor se incrementa en 0.6 unidades con respecto al CaSR silvestre (**Tabla15**); mientras que el CaSR V894I parece interrumpir la

secuencia consenso de reconocimiento por cinasas para generar la fosforilación (**Tabla15**).

Interesantemente el análisis en MusiteDeep además señaló que la mutación CASR V894I generó un nuevo motivo consenso de ubiquitinación sobre el residuo Lisina897 con un valor de 0.518 (**Tabla15**). Nuestros resultados indican que los receptores CaSR mutantes R886Q y V894I potencialmente alteran los motivos moleculares que conducen a la modificación post-traducciona del receptor CaSR silvestre.

LOS RECEPTORES MUTANTES DEL CaSR FORMAN HOMODÍMEROS FUNCIONALES Y SEÑALIZANTES.

Como se ha mencionado el CaSR forma homodímeros necesarios para adquirir la funcionalidad total del receptor. En este sentido analizamos los lisados totales provenientes de células HEK293 transfectadas transitoriamente con el CaSR silvestre o uno de los cuatro receptores CaSR mutantes mediante ensayos de *western blot* en condiciones no reductoras o no desnaturizantes. Mediante el uso del anticuerpo ADD detectamos una banda de aproximadamente 320 kDa en células HEK293 transfectadas con los plásmidos que codifican para los receptores CaSR (Tesis de Maestría Orduña-Castillo L,B. 2016). De manera concordante no detectamos señal de expresión del CaSR en células HEK293 transfectadas con el plásmido vacío. Dichos hallazgos son consistentes con los reportados en dos tesis de maestría realizados en nuestro laboratorio (Tesis de Maestría Hidalgo-Moyle J,J. 2014; Tesis de Maestría Orduña-Castillo L,B. 2016)

Por otro lado, detectamos que los CaSR, silvestre y mutantes, se expresan en una proporción similar como dos bandas de aproximadamente 160 y 140 kDa de acuerdo con los ensayos de *western blot* realizados bajo condiciones reductoras en presencia del compuesto β -mercaptoetanol y empleando el anticuerpo ADD (**Fig.12**). Dichas formas son correspondientes a las formas madura e inmadura del receptor CaSR de acuerdo con la literatura (Ray et al., 1998).

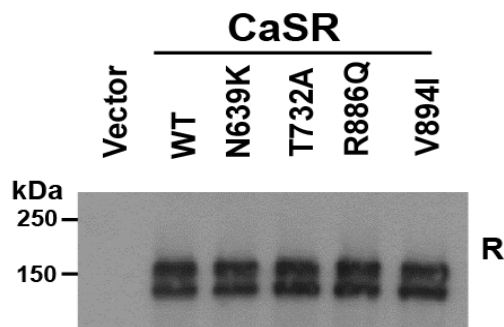


Fig. 12. Expresión de formas maduras e inmaduras de CaSR silvestre y mutantes.

Células HEK293 se transfectaron transitoriamente con el CaSR silvestre o mutantes. Posterior a la lisis celular, la expresión y maduración de los receptores se evaluó mediante *Western blot* en condiciones reductoras (R).

Posteriormente analizamos si los receptores CaSR mutantes son señalizantes. Dado que la estimulación de GPCRs promueve la fosforilación de ERK1/2, se evaluó la activación de ERK 1/2 mediante su fosforilación tras un estímulo con calcio (1.5 mM) en presencia del R568 (1 μ M) en células HEK293 transfectadas con los distintos receptores CaSR. Todos los receptores CaSR estudiados en este proyecto promovieron la activación de las proteínas ERK 1/2 de manera dependiente de estímulo (**Fig. 13A-D**). Las respuestas obtenidas por todos los receptores CaSR no muestran diferencias significativas en cuanto a la magnitud de activación hacia dichas proteínas.

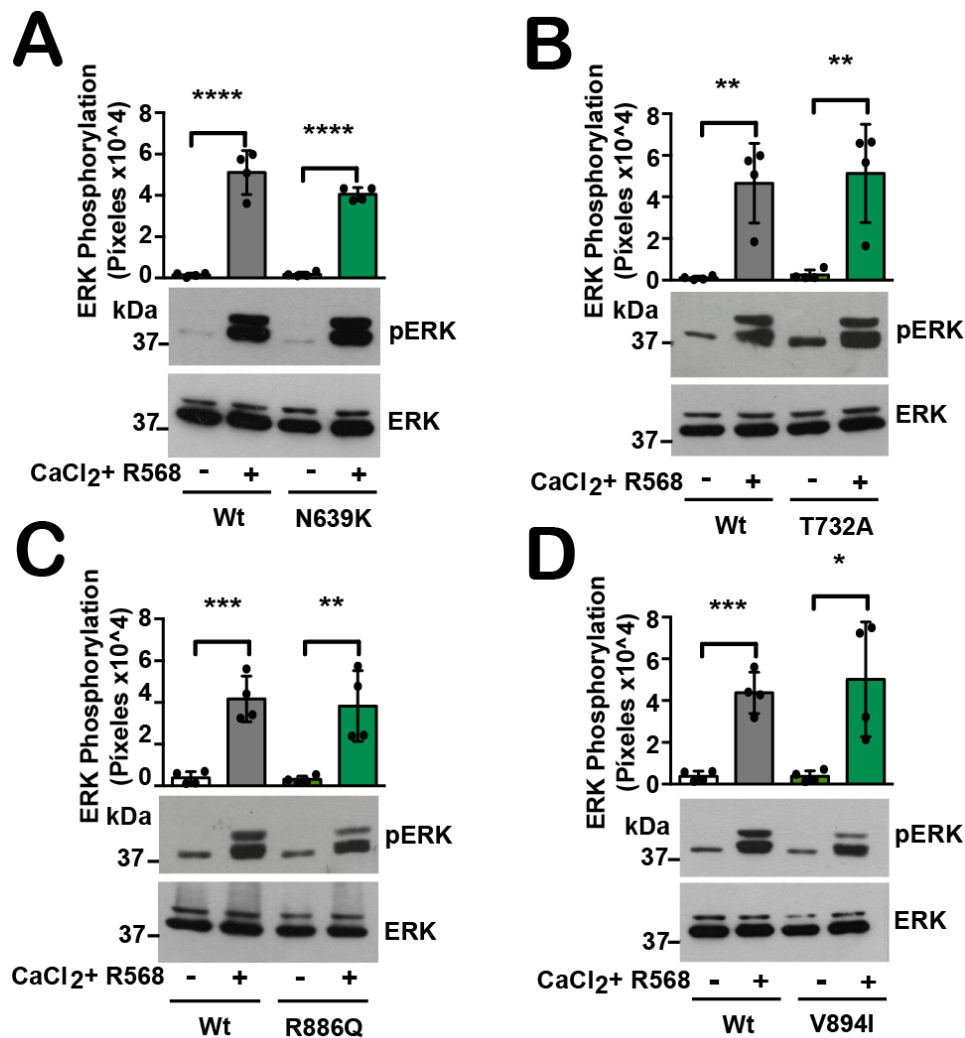


Fig. 13. Los receptores CaSR mutantes señalizan en la misma proporción hacia ERK1/2 que el CaSR silvestre.

Células HEK293 transfectadas transitoriamente con los receptores CaSR, silvestre (Wt) o mutantes, se estimularon con calcio en presencia de R568. Los lisados obtenidos fueron procesados mediante *western blot* para determinar la activación de las proteínas ERK 1/2. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba

estadística *t*-Student no pareada, n=4 experimentos independientes, barras de error indican S.D., (A) CaSR Silvestre Vs N639K; **** p<0.0001; (B) CaSR Silvestre Vs T732A; ** p= 0.0031, ** p= 0.0064; (C) CaSR Silvestre Vs R886Q; *** p = 0.0005, ** p= 0.0060; (D) CaSR Silvestre Vs. V894I; *** p= 0.0002, # p=0.0151.

ANÁLISIS DE ACOPLE A PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS POR LOS RECEPTORES MUTANTES DEL CaSR.

Puesto que la señalización del CaSR silvestre hacia las proteínas Gq y Gi heterotriméricas ha sido ampliamente documentada, investigamos si los receptores CaSR mutantes activan a dichas proteínas G heterotriméricas o muestran diferencias en su activación. Adicionalmente considerando que en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231.1833 el CaSR aparentemente señala de manera aberrante hacia las proteínas Gs heterotriméricas, también analizamos si los receptores CaSR mutantes son capaces de señalar hacia Gs. Con este objetivo nosotros empleamos una serie de inhibidores farmacológicos (**Tabla 9**) como pretratamientos y durante la incubación con el estímulo de calcio en presencia de R568 en células HEK293 transfectadas transitoriamente con el CaSR, silvestre o mutantes, para evaluar su efecto sobre la activación de las proteínas ERK1/2.

Con este acercamiento demostramos que la fosforilación de ERK 1/2 promovida por estímulo del CaSR silvestre disminuyó de manera significativa por los inhibidores U73122 y PTX (**Fig. 14.A**), lo cual es consistente con la señalización descrita para este receptor hacia las proteínas Gq y Gi heterotriméricas (Hannan et al., 2018; Tennakoon et al., 2015).

Encontramos que la fosforilación de las proteínas ERK1/2 regulada por estímulo de los receptores CaSR mutantes disminuyó por efecto del compuesto U73122 en todos los casos, sin embargo, este efecto solo fue significativo para el CaSR N639K (**Fig. 14.B**). Este hallazgo nos indica que la temporalidad de activación hacia la proteína Gq por los receptores CaSR Silvestre y N639K es la misma. Por otro lado, la activación de las proteínas ERK1/2 regulada por estímulo de todos los receptores CaSR estudiados en este proyecto disminuyó de manera consistente por el tratamiento con la toxina PTX (**Fig. 14. A-E**).

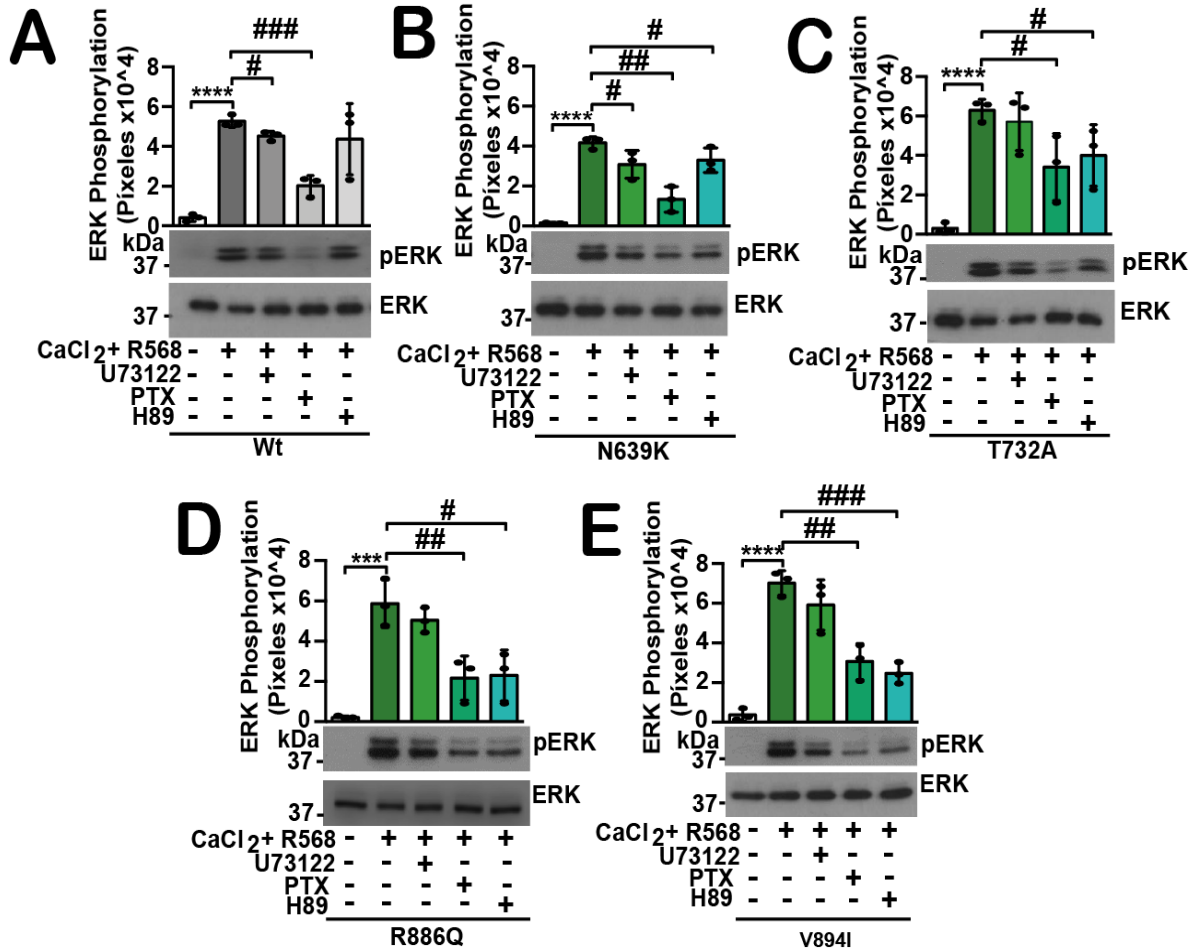


Fig. 14. Los receptores CaSR mutantes alteran la señalización requerida para la activación de las proteínas ERK1/2.

Células HEK293 transfectadas transitoriamente con el CaSR silvestre o mutantes se ayunaron y posteriormente se pretrataron con los inhibidores farmacológicos (Tabla 9) seguido de un estímulo con calcio y R568 durante 3 minutos en presencia de los inhibidores farmacológicos U73122, PTX y H89. Procesamos los lisados por *western blot* para evaluar la fosforilación de ERK1/2. Las gráficas de barras representan el análisis densitométrico por pruebas de *t*-Student no pareadas de tres experimentos independientes, Barras de error indican S.D. (A) CaSR silvestre **** $p < 0.0001$, # $p = 0.0144$, #### $p = 0.0004$, (B) CaSR N639K **** $p < 0.0001$, # $p = 0.0339$, ## $p = 0.0011$, # $p = 0.0465$ (C) CaSR T732A **** $p < 0.0001$, # $p = 0.0248$, # $p = 0.0367$ (D) CaSR R886Q *** $p = 0.0006$, ## $p = 0.0082$, # $p = 0.0114$, (E) CaSR V894I **** $p < 0.0001$, ## $p = 0.0017$, #### $p = 0.0003$.

Además tras el tratamiento con el inhibidor farmacológico H89 observamos una disminución en la activación de las cinasas ERK1/2 por estímulo de los receptores CaSR mutantes N639K, T732A, R886Q y V894I de manera significativa (Fig. 14. B-E) y encontramos que dicho efecto fue más pronunciado en la señalización de los receptores CaSR R886Q y V894I (Fig. 14. D-E). Para

corroborar si la señalización de los receptores CaSR mutantes genera la activación del heterotrímero Gs, evaluamos la activación de las proteínas CREB y ERK en presencia de la proteína PKI, un inhibidor de la PKA. En primer lugar, analizamos el efecto del PKI en la fosforilación de la proteína CREB dependiente de la actividad de PKA tras el tratamiento con Fsk/IBMX. Así pues, encontramos que la fosforilación de CREB generada por el incremento en los niveles de AMPc y la subsecuente activación de PKA disminuyó en células HEK293 transfectadas con la proteína recombinante myc-mCherry-PKI (**Fig. 15**).

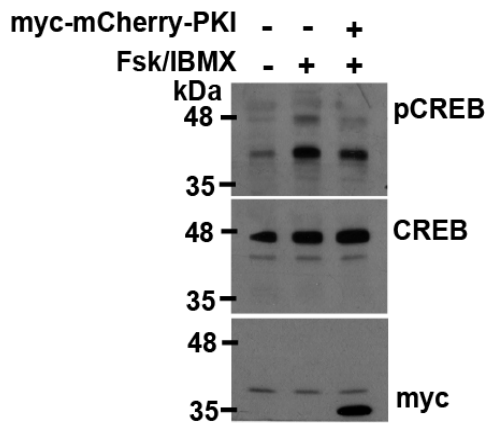


Fig. 15. La proteína PKI disminuye la fosforilación de CREB dependiente de la actividad de la PKA.

Células HEK293 transfectadas transitoriamente con vector o la proteína myc-mCherry-PKI fueron tratadas con Fsk/IBMX. Determinamos que el tratamiento promovió la fosforilación en la Ser133 de CREB, y que dicho efecto disminuyó en presencia de PKI

Posteriormente cotransfectamos de manera transitoria al CaSR, silvestre o mutante, con la proteína myc-mCherry-PKI en las células HEK293 para evaluar la activación de las proteínas CREB y ERK tras el estímulo de los receptores CaSR (**Fig. 16**).

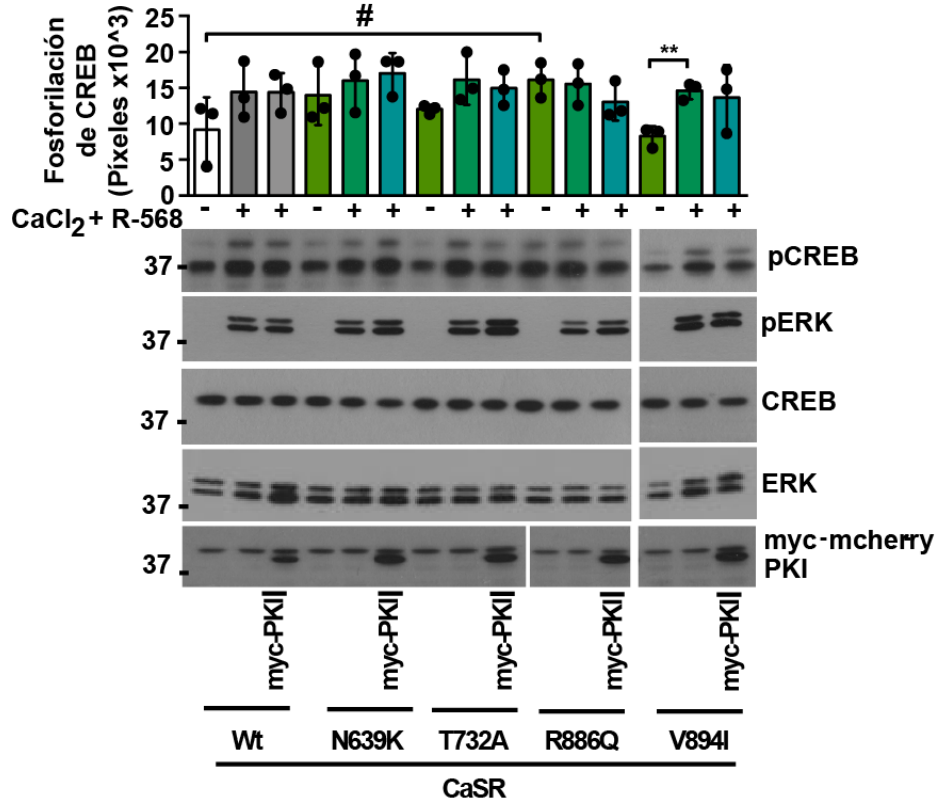


Fig. 16. La proteína PKI no inhibe la activación de ERK1/2 ni posee un efecto sobre la activación de CREB por los receptores del CaSR.

Células HEK293 cotransfectadas con el CaSR, silvestre o mutantes, y la proteína myc-mCherry-PKI se ayunaron, y posteriormente se estimularon con calcio y R568. En el lisado celular evaluamos la fosforilación de S133 de CREB y T202/Y204 de ERK1/2. La gráfica de barras representa el análisis densitométrico de la fosforilación sobre la proteína CREB por prueba de *t*-Student no pareada. $n=3$ experimentos independientes. Barras de error indican S.D. *** ≤ 0.0005 , & < 0.05 .

Encontramos que la estimulación del CaSR V894I promovió significativamente la fosforilación de CREB, mientras que el CaSR R886Q incrementó el nivel basal de fosforilación de CREB con respecto a la respuesta generada por el CaSR silvestre. De manera consistente observamos que la proteína PKI fue incapaz de inhibir la activación de ERK1/2, y que no reguló de manera negativa la activación de CREB por los receptores CaSR R886Q ni V894I. Estos hallazgos descartaron la posibilidad de que los receptores CaSR mutantes promuevan la activación de la cinasa PKA.

EL CaSR PROMUEVE LA ACTIVACIÓN DE RAC-GTPasa DE MANERA DEPENDIENTE DEL COMPLEJO mTORC2.

La actividad del mTORC2 se ha asociado con el remodelamiento del citoesqueleto a través de la activación de al menos dos distintos miembros de las RhoGTPasas, Rac y Cdc42. Considerando que en el sistema celular HEK293 determinamos un tiempo óptimo para el estudio de la activación de Rac-GTPasa por estímulo de calcio en presencia de R568 (Tesis de maestría Orduña-Castillo LB. 2016), procedimos a validar que dicha activación fuese debida a la actividad del CaSR al emplear el compuesto calcilítico NPS2143, un inhibidor del CaSR, en los ensayos de captura de Rac-GTPasa activa (**Fig. 17A**). La activación de Rac-GTPasa observada tras el estímulo de calcio y R568 disminuyó consistentemente por el tratamiento con NPS2143 (**Fig.17A**), indicando que esta activación es dependiente de la actividad regulada por ligando del CaSR. Adicionalmente, puesto que el tratamiento con el compuesto NPS2143 en ausencia de calcio no tuvo efecto sobre la activación de Rac pudimos determinar que la actividad basal del CaSR silvestre no regula la actividad de la GTPasa. Por otro lado, la inhibición crónica del mTORC2 mediante el tratamiento con Rapa previno la activación de Rac-GTPasa por el CaSR silvestre regulada por estímulo (**Fig.17B**). Adicionalmente observamos que la fosforilación de la proteína S6 tras el estímulo del CaSR silvestre fue inhibida por la presencia de Rapa. Dichos hallazgos indican que el tratamiento con el fármaco Rapa inhibe de manera eficiente a mTOR.

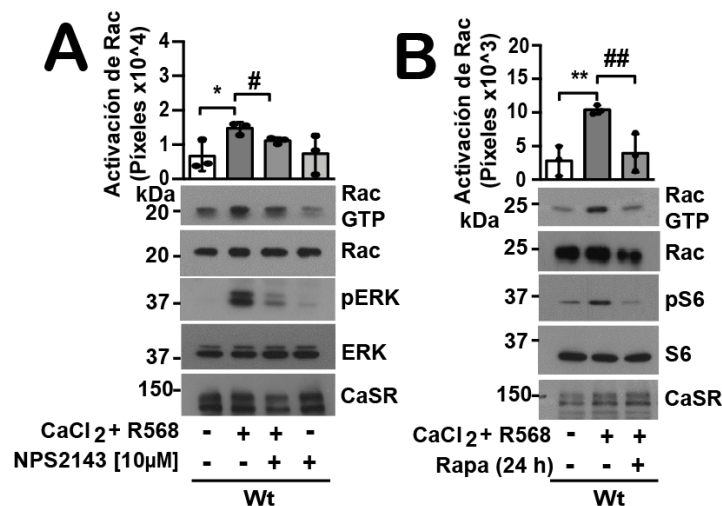


Fig. 17. CaSR silvestre promueve la activación de Rac-GTPasa de manera dependiente de mTORC2.

Células HEK293 transfectadas con el CaSR silvestre fueron ayunadas, y posteriormente tratadas con los inhibidores (A) NPS2143 y (B) Rapa respectivamente. Tras el estímulo de calcio y R568, obtuvimos los lisados

celulares para evaluar la activación de Rac-GTPasa mediante ensayos de *pull-down*. La gráfica de barras representa el análisis densitométrico por prueba de *t*-Student no pareada. (A) n=3 experimentos independientes * p = 0.0191, # = 0.0166, (B) n=3 experimentos independientes, ** p = 0.0024, ### p = 0.0094. Barras de error indican S.D.

LOS RECEPTORES CaSR MUTANTES ALTERAN LA ACTIVACIÓN DE RAC-GTPasa.

Tras el establecimiento del eje de señalización CaSR-mTORC2-Rac-GTPasa, procedimos a analizar si los receptores CaSR mutantes alteran la activación de Rac-GTPasa. Con este fin comparamos la fracción de Rac-GTPasa activa tras el estímulo de los receptores CaSR mutantes con respecto de la respuesta observada para el CaSR silvestre. Mediante los ensayos de *pull-down* para capturar a Rac-GTPasa activa, encontramos que el estímulo del CaSR N639K incrementó significativamente la fracción de Rac-GTP (Rac-GTPasa activa) con respecto de la respuesta correspondiente al CaSR silvestre (**Fig.18A**); dicho efecto fue independiente de la vía de activación de ERK1/2 puesto que esta vía no mostró diferencias significativas entre ambos receptores. A su vez los receptores CaSR T732A y V894I promovieron la activación de Rac-GTPasa en una proporción similar al CaSR silvestre de manera dependiente del estímulo (**Fig.18C y F**). De manera consistente con el eje de activación CaSR-mTOR-Rac-GTPasa, la cantidad de activación de Rac-GTPasa ejercida por los receptores CaSR N639K, T732A y V894I en presencia del tratamiento crónico con Rapa disminuyó significativamente (**Fig.18B, D y G**).

Interesantemente, la estimulación del CaSR R886Q no promovió la activación de la Rac-GTPasa en nuestro tiempo de estudio (**Fig.18E**). Esta respuesta aparentemente inactivante es única hacia la vía de activación de Rac-GTPasa ya que el estímulo de este CaSR mutante promovió la activación de las proteínas ERK1/2.

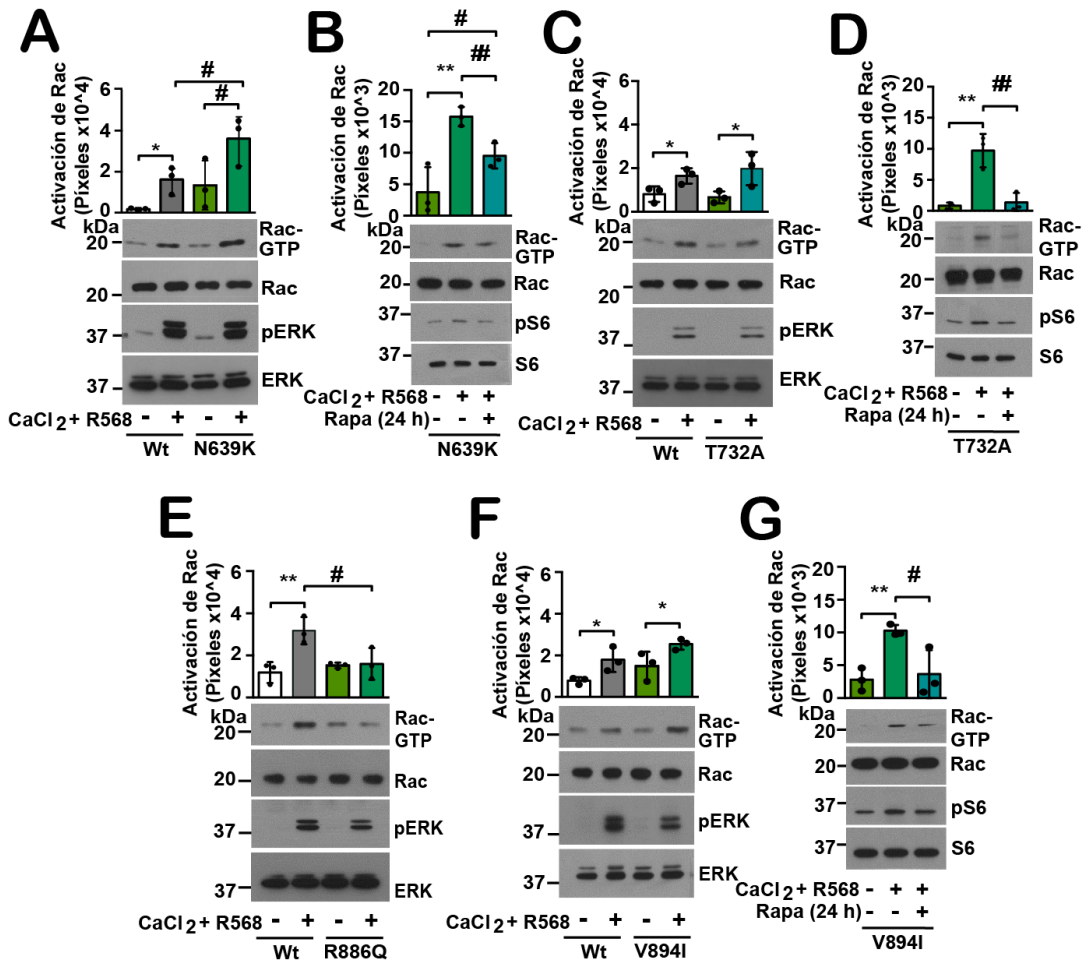


Fig. 18. Activación de Rac-GTPasa por receptores CaSR mutantes.

(A, C, E y F) La fracción de Rac-GTPasa activa se determinó mediante ensayos de *pull-down* en células HEK293 transfectadas con el CaSR silvestre y uno de los receptores CaSR mutantes para un análisis comparativo. (B, D y G) Células HEK293 transfectadas con CaSR N639K, T732A y V894I fueron tratadas con Rapa durante 24 horas para evaluar la activación de Rac-GTPasa. Las gráficas de barras representan el análisis densitométrico por prueba de *t*-Student no pareada de tres experimentos independientes; (A) * $p = 0.01$, # $p = 0.0410$, # $p = 0.0332$, (B) ** $p = 0.0040$, ## $p = 0.0064$, # $p = 0.0439$, (C) * $p = 0.0226$, * $p = 0.0237$, (D) ** $p = 0.0025$, ## $p = 0.0048$, (E) ** $p = 0.0067$, # $p = 0.0256$, (F) * $p = 0.0232$, * $p = 0.0339$, y (G) ** $p = 0.0013$, # $p = 0.0187$. Barras de error indican S.D.

MIGRACIÓN CELULAR REGULADA POR LOS RECEPTORES DEL CaSR EN CÉLULAS HEK293.

El CaSR promueve la migración celular tanto en condiciones fisiológicas y patológicas de manera dependiente de la activación de RhoGTPasas (Fang et al., 2020; Saidak et al., 2009; Tharmalingam et al., 2011; Zhang et al., 2020), sin embargo el potencial migratorio regulado por los receptores CaSR mutantes

estudiados en este trabajo aún no ha sido explorado. Tras el estudio de activación de Rac-GTPasa por los receptores CaSR mutantes, investigamos la capacidad migratoria de células HEK293 transfectadas con los diferentes CaSR mutantes mediante ensayos de cierre de herida. Primero demostramos que el estímulo de calcio y R568 promovió la migración de células HEK293 transfectadas con el CaSR silvestre con aproximadamente 15% de cobertura de la herida tras 24 horas de estímulo. Como control positivo de migración de estas células utilizamos HGF α en células HEK293 transfectadas únicamente con vector, lo cual generó un porcentaje de cobertura de la herida del 20% aproximadamente (**Fig.19**). Aunque el potencial migratorio del sistema celular HEK293 fue bajo, este ensayo nos permitió detectar la migración celular de forma discreta pero significativa por la actividad del CaSR.

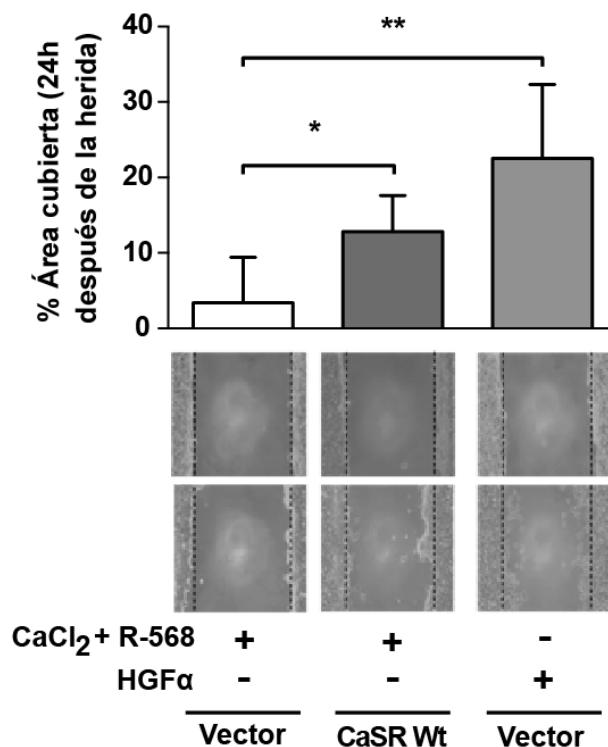


Fig. 19. CaSR silvestre promueve la migración celular en células HEK293. Células HEK293 sembradas en cajas pretratadas con gelatina al 0.02%, se transfectaron transitoriamente con vector vacío o CaSR silvestre. Tras realizar una herida sobre la monocapa, evaluamos la capacidad del estímulo calcio (1.5 mM) con R568 o HGF α 10 ng/mL para cerrar la herida debido a la migración celular mediante la determinación del porcentaje del área cubierta tras 24 horas. La gráfica de barras representa el análisis por prueba *t*-Student no pareada de cuatro experimentos independientes. Barras de error indican S.D, * $p = 0.0251$, ** $p = 0.0080$.

Posteriormente evaluamos la capacidad migratoria de células HEK293 transfectadas con los diferentes CaSR mutantes. Por un lado, analizamos las respuestas migratorias debido a la activación de receptores CaSR mutantes que alteran las regiones intracelulares del receptor y los cuales fueron CaSR N639K, R886Q y V894I (**Fig. 20A**); mientras que en ensayos independientes analizamos la migración celular regulada por el CaSR T732A que altera el cuarto pase transmembranal (**Fig. 20B**). Observamos que la estimulación de los receptores CaSR mutantes N639K, R886Q y V894I no condujo a la migración celular (**Fig. 20A**). En cambio, el CaSR T732A promovió la migración en una magnitud similar a la observada para el CaSR silvestre (**Fig.20B**).

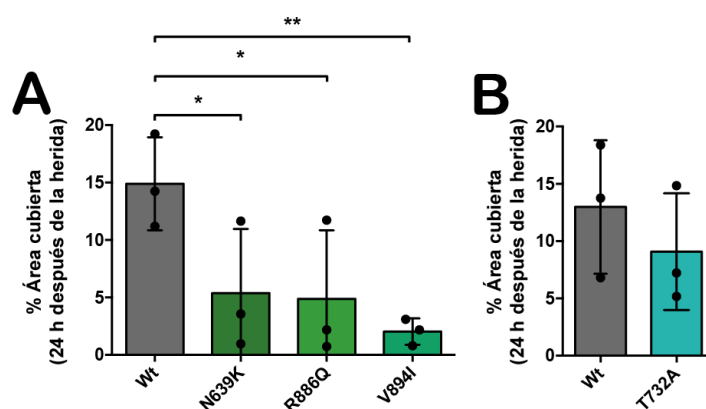


Fig. 20. Migración celular regulada por estímulo de CaSR mutantes en células HEK293.

Células HEK293 sembradas en cajas de 35 mm pretratadas con gelatina al 0.02% fueron transfectadas transitoriamente con los receptores CaSR silvestre y mutantes. Tras 48 horas de transfección realizamos una herida sobre la monocapa y estimulamos con calcio en presencia de R568. La gráfica representa el análisis por prueba de *t*-Student no pareada de tres experimentos independientes. Barras de error indican S.D, * $p = 0.0376$, * $p = 0.0371$, ** $p = 0.0031$.

LOS CaSR MUTANTES ALTERAN LA EXPRESIÓN DE FIBRONECTINA.

Puesto que la respuesta migratoria tras la activación de los receptores CaSR mutantes fue escasa, exploramos la posibilidad de que la activación de Rac-GTPasa mediada por estos receptores CaSR mutantes regule otro proceso como lo es la adhesión celular. Mediante el análisis por *western blot* de lisados obtenidos a partir de células HEK293 transfectadas con los distintos CaSR determinamos la expresión de la proteína Fibronectina, un componente de matriz extracelular que favorece la adhesión celular mediada por el CaSR (Tharmalingam et al., 2011). Encontramos que la expresión de Fibronectina fue mayor en las

células HEK293 transfectadas con los receptores CaSR mutantes con respecto de las que fueron transfectadas con CaSR silvestre (**Fig.21**).

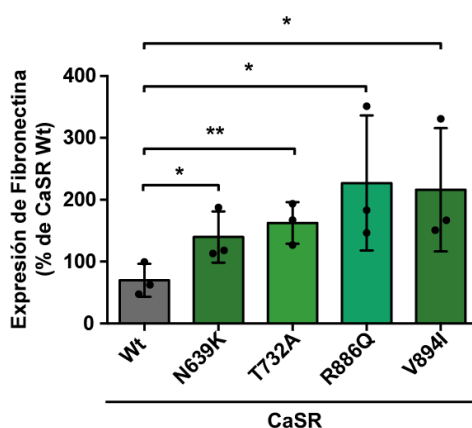


Fig. 21. La expresión de Fibronectina en células transfectadas con CaSR mutantes es mayor a la expresión obtenida de células transfectadas con el CaSR silvestre.

Células HEK293 transfectadas transitoriamente con los diferentes receptores CaSR, fueron lisadas 48 horas posterior a la transfección. Procesamos las muestras para su análisis por *western blot*. La gráfica representa el análisis por prueba de *t*-Student no pareada de tres experimentos independientes. Barras de error indican S.D, * $p = 0.0352$, ** $p = 0.001$, * $p = 0.0363$, * $p = 0.0348$

El incremento en la expresión de Fibronectina por la expresión de los receptores CaSR mutantes en este ensayo correlaciona con una disminución del potencial migratorio. Interesantemente el incremento en la expresión de Fibronectina se ha asociado tanto a un efecto de inducción de la invasión epitelio-mesenquima (Hellinger et al., 2020; Ioachim et al., 2002; Li et al., 2017), así como la disminución del potencial invasivo de células de cáncer de mama (Shinde et al., 2018).

EL ESTADO DE ACTIVACIÓN DE RAC-GTPasa REGULA LA SECRECIÓN DE IL-8 PROMOVIDA POR ACTIVIDAD DEL CaSR.

La proteína Rac-GTPasa promueve el remodelamiento del citoesqueleto de actina, el cual modula diversos procesos celulares entre ellos: la secreción de diversos factores, la endocitosis y el tráfico vesicular de manera tejida específica (Bi et al., 2005; Bosco et al., 2009; Han et al., 2015; Hong-Geller and Cerione, 2000; Parri and Chiarugi, 2010). Un enfoque subsecuente fue el análisis de la capacidad de secreción de las células HEK293 transfectadas con CaSR con respecto de la actividad de la Rac-GTPasa. En este sentido en nuestro laboratorio se ha descrito que la secreción de IL-8 es dependiente de la actividad del CaSR

silvestre en células HEK293 transfectadas de manera estable denominadas como Clona7 (Tesis de Maestría Del Río-Robles J, E. 2018).

Como primer acercamiento evaluamos el efecto de dos proteínas mutantes de Rac-GTPasa transfectadas en células Clona7 sobre la secreción de IL-8. La proteína RacQ61L asemeja al estado constitutivamente activo de Rac-GTPasa (Rac-GTP), mientras que la proteína mutante RacT17N posee una menor afinidad por el GTP y por lo tanto permanece en estado inactivo (Rac-GDP). Así pues, después de la transfección de las proteínas Rac mutantes, estimulamos al CaSR para promover la secreción de factores y los medios condicionados fueron colectados para determinar la secreción de IL-8 por citometría de flujo. Encontramos que la proteína mutante RacQ61L no alteró la secreción de IL-8 promovida por el estímulo del CaSR (**Fig.22A**). En cambio la mutante RacT17N incrementó significativamente la secreción de IL-8 regulada por estímulo del CaSR (**Fig. 22B**). Por lo tanto, el estado inactivo de Rac-GTPasa en las células HEK293 promovió la secreción de IL-8.

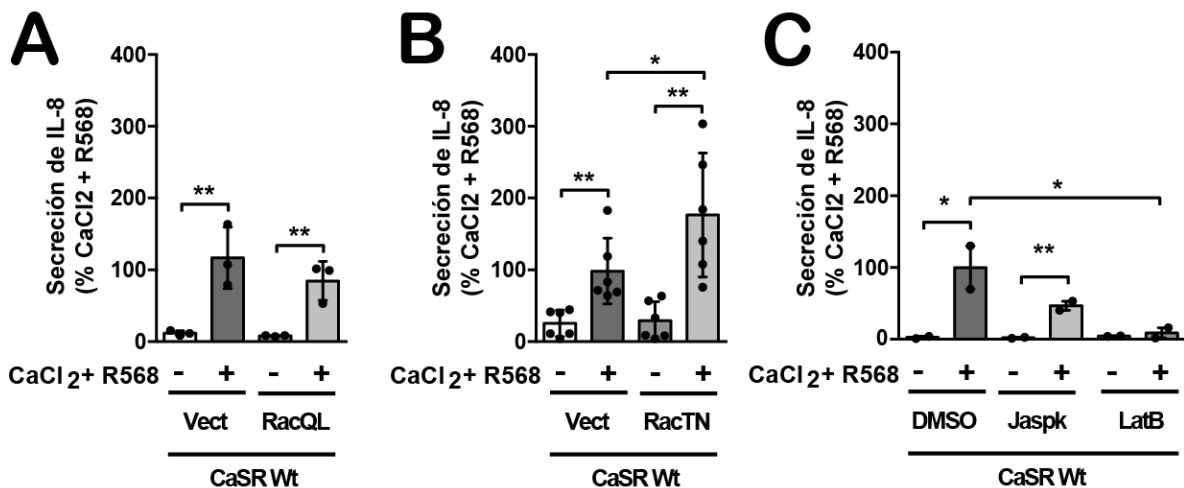


Fig. 22. La actividad de Rac y el citoesqueleto de actina regulan la secreción de IL-8 promovida por el CaSR.

Células HEK293 que de manera estable expresan al CaSR silvestre (Clona 7) se transfectaron con plásmido vacío o proteínas mutantes de Rac, RacQ61L y RacT17N (A y B, respectivamente). Tras 48 horas post-transfección en las que se incluyó un ayuno de 16 horas, estimulamos a las células con calcio (1.5 mM) y R568 durante 3 horas. Los medios condicionados se recuperaron y se analizaron con el kit CBA (perlas citométricas). (A) La gráfica representa el análisis por prueba *t*-Student no pareada de tres experimentos independientes. Barras de error indican S.D, ** $p = 0.0067$, ** $p = 0.0041$. (B) La gráfica representa el análisis por prueba *t*-Student de seis experimentos independientes. Barras de error indican S.D. ** $p = 0.0024$, ** $p = 0.0013$, * $p = 0.0394$ (C) Células HEK293 que de manera estable expresan al CaSR silvestre fueron ayunadas y pretratadas con fármacos

que actúan sobre el citoesqueleto de actina, Jasplakinolido y Latrunculina B, posteriormente se estimularon con calcio y el R568 en presencia de estos fármacos durante 3 horas y los medios condicionados se analizaron por ensayos de perlas citométricas. La gráfica representan el análisis por prueba de *t*-Student no pareada de dos experimentos independientes. Barras de error indican S.D, * $p = 0.0418$, ** < 0.0096 , * $p = 0.0491$.

Finalmente, considerando que la señalización río abajo de la activación de Rac-GTPasa genera el reordenamiento del citoesqueleto de actina, nosotros alteramos la dinámica de polimerización del citoesqueleto de actina mediante el uso de dos distintos fármacos: el fármaco Jasplakinolido (Jaspk), el cual estabiliza los filamentos de actina y promueve nuevos sitios de nucleación, y el fármaco Latrunculina B (LatB), que favorece el estado globular de la actina y por tanto inhibe su polimerización. Con la alteración en la dinámica de polimerización del citoesqueleto de actina con ambos fármacos encontramos que se perturbó la secreción de IL-8. El efecto más notorio fue el de la LatB ya que previno la secreción de IL-8 regulada por la actividad CaSR silvestre (**Fig.22C**).

DISCUSIÓN.

El CaSR es un receptor de superficie miembro de la familia de los GPCRs y su actividad en el contexto tumoral ha sido descrita como pro- o anti-tumoral dependiendo del tejido en el cual se exprese. En específico, la participación del CaSR en el cáncer de mama se evidencia debido a los efectos proliferativos, antiapoptóticos y reguladores de la secreción de diversos péptidos que modulan el ciclo osteolítico, así como la quimiotaxis de diversas células (Hernández-Bedolla et al., 2015; Saidak et al., 2009; Tennakoon et al., 2015). En este trabajo investigamos si mutaciones contrasentido en CaSR alteran su señalización con respecto del CaSR silvestre, como un indicador de su posible potencial pro-tumoral. Los receptores CaSR mutantes que en este trabajo fueron generados y analizados son N639K, T732A, R886Q y V894I.

Encontramos que CaSR R886Q es el receptor que posee un mayor potencial patogénico predictivo de acuerdo con las distintas bases de datos consultadas, y que dicha mutación se ha identificado en distintos pacientes con cáncer así como con alteraciones en la homeostasis del calcio. Por el contrario, el análisis del CaSR V894I sugiere la menor patogenicidad puesto que la mutación no implica un cambio en el carácter químico del residuo; sin embargo, esta mutación no solo ha sido identificada en pacientes con cáncer, ya que también ha sido asociada con alteraciones en las concentraciones plasmáticas de calcio de acuerdo con ClinVar. La capacidad patogénica calculada mediante el análisis bioinformático aunado a la correlación con datos clínicos no generaron suficiente evidencia que permitiera la identificación de un efecto claro para los receptores CaSR mutantes.

Como parte de las estrategias bioinformáticas para el análisis de los CaSR mutantes realizamos una examinación estructural del CaSR en estado activo mediante el modelaje molecular de una estructura disponible en *Protein Data Bank* (Gao et al., 2021). Nuestros resultados sugieren que las mutaciones N639K y R886Q no alteran los contactos intramoleculares del CaSR en la región ICL-1 ni en la región C-terminal proximal resuelta. En contraste, el modelaje de CaSR T732A indica una pérdida del volumen estérico aportado por el grupo hidroxilo del residuo T732 que podría modificar ligeramente el estado conformacional del receptor. Puesto que la longitud total del C-terminal del CaSR no ha sido resuelta estructuralmente, se desconoce si esta región forma estructuras secundarias, en las cuales los receptores CaSR R886Q y V894I podrían modificar los estados conformacionales del CaSR o alterar las interacciones entre el receptor y proteínas citosólicas que son relevantes para su señalización. A la fecha se ha descrito que la región N-terminal de CaSR aporta los residuos requeridos para el reconocimiento y unión de los iones calcio (Geng et al., 2016b), la región transmembranal establece los arreglos estructurales en la conformación tridimensional de CaSR que permiten la transición de los estados activo o inactivo

(Chen et al., 2021; Gao et al., 2021; Ling et al., 2021; Liu et al., 2020), mientras que las regiones intracelulares del CaSR así como de otros GPCRs median la transducción de señales a través de la interacción y activación de distintas proteínas tales como proteínas G heterotriméricas, la cinasas GRK, arrestinas, filaminas, entre otras (Azevedo et al., 2015; Sandhu et al., 2019; Zhang and Breitwieser, 2005). Por lo anterior, es probable que mutaciones que ocurren en regiones intracelulares de CaSR tengan un efecto en la capacidad señalizante del receptor. En este sentido mediante estudios genómicos se ha determinado que las variaciones más frecuentes dentro de la clase C de los GPCRs se presentan en el C-terminal lo cual altera la señalización, internalización y el tráfico de los receptores; y que las regiones ICL-1 así como el TMD4 albergan sitios de alta frecuencia mutacional en cáncer (Marti-Solano et al., 2020; Wu et al., 2019).

Como parte de los eventos que regulan la actividad del CaSR se han descrito la desensibilización y el tráfico vesicular mediado por proteínas como AP2, AMSH y proteínas cinasas que fosforilan la región C-terminal (Gorvin et al., 2018a; Herrera-Vigener et al., 2006; Lorenz et al., 2007; Pi et al., 2005). Puesto que la secuencia consenso de reconocimiento para las cinasas GRKs aún se desconoce, se evaluaron las accesibilidades a los distintos receptores CaSR que alteran el C-terminal por la cinasa PKC, la cual fosforila en al menos dos distintos residuos al CaSR para promover su desensibilización (Binmahfouz et al., 2019). Nuestros estudios bioinformáticos en Scansite 4.0 y MusiteDeep indican que el CaSR R886Q altera el motivo consenso de fosforilación cercano al residuo T888 que llevaría a un cambio en el proceso de desensibilización del receptor mutante con respecto del CaSR silvestre.

Por otro lado, en nuestro laboratorio hemos caracterizado la asociación entre el C-terminal del CaSR y la proteína de andamiaje AMSH, un componente de los ESCRT que reconoce de manera indirecta a ubiquitinas (Herrera-Vigener et al., 2006). El análisis del CaSR V894I por MusiteDeep indica que la mutación permite la formación de un motivo consenso de ubiquitinación que no está presente en el resto de los receptores CaSR, y que podría influenciar la interacción con AMSH, el tráfico vesicular y la degradación del receptor; sin embargo puesto que nuestros ensayos de *western blot* no indican diferencias en la expresión de los receptores CaSR, es poco probable que la mutación V894I modifique la asociación entre CaSR y la proteína de andamiaje AMSH. Cabe resaltar que los análisis bioinformáticos que nos permiten inferir potenciales modificaciones post-traduccionales no predicen la ubiquitinación del residuo K882, que si ha sido detectada por análisis experimental de alta fidelidad de espectrometría de masas en tejido murino (Wagner et al., 2012); por lo que estos análisis predictivos no deben sobreestimarse.

Los receptores CaSR mutantes, al igual que el CaSR silvestre, son señalizantes ya que en ensayos de *western blot* se observa que en todos los CaSR se mantiene la capacidad para promover la fosforilación de la vía ERK1/2

dependiente del estímulo. Los inhibidores farmacológicos U73122, PTX y H89 evidencian las diferencias en la señalización de los receptores CaSR mutantes que regulan la activación de las proteínas ERK1/2. Todos los receptores CaSR mutantes promueven la activación de la proteína Gi en una proporción similar a la observada para el CaSR silvestre ya que presentan una sensibilidad similar a la toxina PTX. Sin embargo los receptores CaSR T732A, R886Q y V894I presentan una menor sensibilidad al compuesto U73122 que indica diferencias en la activación de la proteína Gq heterotrimérica y que podrían deberse a eventos temporales. Interesantemente, la señalización hacia la proteína Gq/11 por el CaSR silvestre ha sido descrita como la principal vía de señalización que mantiene la función homeostática sobre las concentraciones del ion calcio (Brown and MacLeod, 2001). Estas evidencias sugieren un papel patológico para estos receptores CaSR mutantes y que son consistentes con los reportes de la base de datos ClinVar (**Tabla 12**).

Por otro lado los ensayos de fosforilación de ERK1/2 en presencia de H89 y la proteína PKI indican que ninguno de los receptores CaSR promueven la activación de la proteína PKA como parte del mecanismo de activación de ERK1/2, en cambio los CaSR mutantes promueven la activación de una o varias cinasas que son sensibles al compuesto H89 como parte de efectos fuera de blanco y que regulan la activación de dicha vía de manera diferencial con respecto del CaSR silvestre. Se ha descrito que la fosforilación de CREB puede deberse a la actividad de otras cinasas distintas a la PKA, como PKC, PDK1 y/o SGK1 (David and Kalb, 2005; Macías-García et al., 2019), las cuales muestran sensibilidad al compuesto H89 al menos de manera *in vitro*, por lo que es probable que los receptores CaSR R886Q y V894I, los cuales son capaces de promover la fosforilación de CREB por actividad basal y dependiente de estímulo respectivamente, promuevan la actividad de dichas cinasas para regular la fosforilación de CREB. Aunque se ha descrito que el CaSR silvestre promueve la fosforilación de tipo activante sobre CREB de manera dependiente de las proteínas Gq, PLC y PKC, en nuestro estudio no se observó la fosforilación de CREB tras la activación del CaSR debido a que nuestro tiempo de estimulación fue muy corto y que probablemente dicha fosforilación requiera de al menos un tiempo de estímulo de 10 (Avlani et al., 2013).

En este trabajo hemos caracterizado el eje de señalización CaSR- G β γ -PI3K-AKT-mTOR, el cual activa a diversas proteínas, entre ellas la proteína Rac-GTPasa (Orduña-Castillo et al., 2021). Adicionalmente puesto que se ha descrito que el heterodímero G β γ puede interactuar de manera directa con la cinasa mTOR para promover su actividad (Robles-Molina et al., 2014), es probable que CaSR regule la actividad de los complejos mTOR por al menos dos distintos mecanismos que no serían excluyentes, pero en los cuales la disponibilidad del heterodímero G β γ es un elemento clave para la activación del mTOR por CaSR. Al respecto hemos demostrado que Galeína, un fármaco que inhibe la actividad del

heterodímero $G\beta\gamma$, disminuye significativamente las fosforilaciones de tipo activante en Serina236 de S6 y Serina473 de AKT (Orduña-Castillo et al., 2021).

Encontramos que el estímulo calcio en presencia del compuesto R568 promueve la activación de Cdc42 y Rac-GTPasa, y que al menos para Rac-GTPasa esta activación es dependiente del mTORC2 tanto en células tumorales de cáncer de mama MDA-MB-231 que de manera endógena expresan al CaSR así como en células normales HEK293 transfectadas con el plásmido que codifica para el CaSR silvestre (Tesis de Maestría Mazariegos-Monzón F. 2015; Tesis de Maestría Orduña-Castillo LB. 2016); estas evidencias señalan la importancia del eje de señalización CaSR- $G\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR tanto en condiciones patológicas como fisiológicas. Nuestros hallazgos además sugieren que el eje CaSR- $G\beta\gamma$ -PI3K-AKT-mTOR posee distintos mecanismos regulatorios, por ejemplo, encontramos que la activación de AKT dependiente de mTORC2 tras el estímulo del CaSR es sensible al tratamiento con AG1478, un inhibidor del EGFR, (Orduña-Castillo et al., 2021) por lo cual los mecanismos de transactivación mediados por CaSR también contribuyen a la activación de mTOR. También se ha descrito que en osteoblastos la proteína Homero1 forma un complejo con CaSR para promover la activación de mTORC2 y llevar a la activación de las cinasas AKT y GSK3 β (Rybchyn et al., 2019). Sin embargo la expresión de la proteína Homero1 en células de cáncer de mama o HEK293 no ha sido determinada por lo que desconocemos la proporción de contribución real de esta proteína en nuestro eje de estudio.

Si bien la activación de Rac-GTPasa mediada por los receptores CaSR N639K, T732A y V894I depende de la actividad del mTORC2 al igual que el CaSR silvestre puesto que el tratamiento con Rapa disminuye la activación de Rac-GTPasa; el estímulo del CaSR N639K genera un incremento en la activación de Rac-GTPasa con respecto del CaSR silvestre y dicha activación no promueve la migración celular. Dado que la activación de la Rac-GTPasa se ha asociado con eventos de proliferación celular, adhesión y tráfico vesicular (Etienne-Manneville and Hall, 2002), sería pertinente explorar si el CaSR N639K es capaz de regular estos efectos de manera diferencial con respecto del CaSR silvestre. Interesantemente el CaSR R886Q no promueve el estado activo de Rac-GTPasa dependiente del estímulo en el tiempo de estudio seleccionado. En nuestro laboratorio hemos caracterizado la asociación entre la proteína de andamiaje AMSH y el C-terminal del CaSR que permite el reclutamiento de un Rac-GAP para favorecer el estado inactivo de Rac-GTPasa (*Manuscrito en preparación*); puesto que nuestros resultados bioinformáticos sugieren cambios en las modificaciones post-traduccionales en el CaSR R886Q, especulamos que la interacción entre el receptor CaSR R886Q mutante y AMSH se encuentra alterada y lo cual influiría sobre el estado de activación de Rac-GTPasa. Además puesto que la transactivación del CaSR hacia el EGFR contribuye en la activación de mTORC2 en nuestro sistema celular de estudio, puede ser que las alteraciones en la

comunicación cruzada por los CaSR mutantes hacia el EGFR expliquen las diferencias en la activación de Rac-GTPasa.

Asimismo se ha descrito que tanto la activación de mTORC2 así como de Rac-GTPasa pueden regularse desde compartimentos endosomales (Ebner et al., 2017; Gleason et al., 2019; Palamidessi et al., 2008), por lo que los mecanismos de desensibilización e internalización diferenciales para los CaSR mutantes dependientes de interacciones proteína-proteína y modificaciones post-traduccionales repercutirían en la activación de mTOR y Rac-GTPasa. Descripciones previas que ilustran la especificidad de la señalización compartimentalizada del CaSR son la señalización hacia las proteínas Gq, la activación de ERK1/2 y la secreción de factores quimiotácticos (Gorvin et al., 2018a; Hernández-Bedolla et al., 2016; Reyes-Ibarra et al., 2007), en donde además se ha descrito que mutaciones de tipo contrasentido en CaSR pueden generar señalización de tipo sesgada hacia las proteínas Gq (Gorvin et al., 2018b), por lo cual a partir de estas evidencias nosotros proponemos que los receptores CaSR mutantes N639K, R886Q y V894I modifican interacciones proteína-proteína que finalmente comprometen la activación de vías de señalización tales como CREB y mTOR-Rac-GTPasa mediante la localización espacio temporal de los receptores CaSR.

Mediante ensayos de cierre de herida por estimulación de los distintos CaSR encontramos que únicamente los receptores CaSR silvestre y T732A promueven una migración discreta de células HEK293, mientras que el resto de los receptores no lo hace. Al explorar si la disminución en la capacidad migratoria de las células HEK293 transfectadas con los CaSR mutantes está relacionada con la adhesión celular, la cual se ha descrito puede ser regulada por CaSR en células de carcinoma de tiroides y β -pancráticas mediante transactivación y regulación de expresión de E-cadherinas e Integrinas β 1 (Hills et al., 2012; Tharmalingam et al., 2011); encontramos que la expresión de Fibronectina, una de las proteínas de matriz extracelular que fungen como ligando para las integrinas β 1, es mayor en células transfectadas con CaSR mutantes con respecto de la expresión observada para el CaSR silvestre. Este hallazgo sugiere un incremento en la adhesión celular, y el cual requeriría la determinación de secreción de Fibronectina por los CaSR mutantes así como la determinación en la expresión y asociación a Integrinas. Interesantemente la secreción de Fibronectina depende del tráfico mediado por Rab7, Rab27 y Rab11 (Armstrong et al., 2018; Hamidi and Ivaska, 2017; Sung et al., 2015), por lo que las diferencias de los receptores CaSR para activar a Rab27 y Rab11 se reflejarían en la secreción de Fibronectina y con ello en la adhesión.

Por otro lado se ha demostrado que las proteínas Rab11 y Rac-GTPasa regulan su actividad de GTPasas de manera recíproca mediante distintos efectores (Erasmus et al., 2021; Ramel et al., 2013) y que estas proteínas a su vez pueden regular la secreción de diversos péptidos (Hong-Geller and Cerione, 2000; Humeau et al., 2002; Khandelwal et al., 2013). Específicamente en nuestro

laboratorio hemos reportado que el tráfico vesicular mediado por las proteínas Rab11 y Rab27 regula la secreción de péptidos mediada por el CaSR tales como PTHrP, IL-1 β , IL-8 y RANTES (Reyes-Ibarra et al., 2007; Zavala-Barrera et al., 2021). Aunado a esta evidencia, se ha descrito que el remodelamiento del citoesqueleto es un elemento importante en la fusión de membranas vesiculares con la membrana plasmática, ya que los filamentos de actina actúan como rieles sobre los cuales transitan las vesículas secretorias, o bien la actina cortical puede funcionar como una red que detiene a las vesículas y por tanto frena la fusión de membranas (Johnson et al., 2012; Segal et al., 2018). Puesto que Rac-GTPasa ejerce una señalización que lleva al reordenamiento del citoesqueleto de actina y que además regula la activación de Rab11, exploramos el papel de Rac-GTPasa como un elemento regulador de la secreción de factores quimiotácticos regulada por CaSR. Encontramos que la proteína mutante RacT17N transfectada en células HEK293 que de manera estable expresan al CaSR incrementa significativamente la secreción de IL-8 regulada por el estímulo de calcio, demostrando que Rac-GTPasa también es un elemento regulador de la secreción regulada por el CaSR. Concordantemente con este hallazgo se ha descrito que la proteína Rac-GTPasa regula la secreción de diversos factores a través de diversos mecanismos moleculares, entre ellos: la regulación de la expresión de proteínas Rab, el reclutamiento de RabGAPs, RabGDIs y la señalización que promueve el remodelamiento del citoesqueleto de actina (Davila et al., 2015; Erasmus et al., 2021; Frasa et al., 2010; Goyal et al., 2013; Hobert et al., 2002; Mitchell et al., 2008; Veluthakal et al., 2015). Con respecto de este último punto en este trabajo encontramos que las alteraciones en la dinámica del citoesqueleto de actina impactan sobre la secreción de IL-8 regulada por CaSR, siendo que el tratamiento con el agente despolimerizador LatB previene su secreción regulada por estímulo. Puesto que el tratamiento con LatB incrementa los niveles de Rac-GTPasa activa en algunos tipos celulares (Diring et al., 2019; Graziano et al., 2017), es probable que la inhibición de la secreción de IL-8 tras el tratamiento con LatB en las células HEK293 involucre un incremento del estado de activo de Rac-GTPasa. Hemos reportado que la secreción de IL-8 promovida por la activación del CaSR N639K es significativamente menor a la respuesta obtenida por el CaSR silvestre en células HEK293 transfectadas de manera estable (Tesis de maestría Del Río-Robles J.E, 2018). Interesantemente nuestros resultados indican que el CaSR N639K incrementa significativamente el estado Rac-GTP (Rac-GTPasa activa) con respecto del CaSR silvestre, por lo que esta respuesta sería consistente con la disminución en la secreción de IL-8.

En conjunto estas evidencias indican que tanto las interacciones proteína-proteína, la localización, así como la desensibilización de los CaSR son parámetros fundamentales que regulan de manera exquisita su señalización. En este sentido el CaSR N639K podría disminuir la tasa de internalización del receptor y con ello disminuir la señalización requerida para la secreción de factores quimiotácticos, en cambio generar un incremento en el tiempo de

residencia en membrana plasmática que incrementa la magnitud de activación de Rac-GTPasa.

En este trabajo hemos demostrado que los receptores CaSR silvestre y mutantes promueven el eje de señalización proteína G heterotrimérica ($G\beta\gamma$)-PI3K-AKT-mTOR, y que la actividad de mTOR es requerida para la subsecuente activación de Rac-GTPasa. Si bien los receptores CaSR N639K y V894I promueven la activación de Rac-GTPasa en las células HEK293 esta activación no promueve la migración celular, y en cambio podría regular la secreción de diversos péptidos como la fibronectina. Nuestros resultados apoyan el papel de Rac-GTPasa como un elemento regulador de la secreción de IL-8 regulada por el CaSR. Por tanto, diferencias en la magnitud de activación de la GTPasa llevarían a una secreción diferencial de diversos factores como lo es la IL-8.

CONCLUSIONES.

- Los receptores CaSR mutantes encontrados en pacientes con cáncer de mama (N639K, T732A, R886Q y V894I) se expresan de igual manera que el CaSR silvestre y señalizan a través de la proteína G_i heterotrimérica.
- La activación de la proteína ERK1/2 por los receptores CaSR T732A, R886Q y V894I es independiente de la actividad PLC derivada del heterotrímico G_q .
- Los receptores CaSR silvestre, N639K, T732A y V894I propician la activación de Rac-GTPasa de manera dependiente de mTORC2.
- El CaSR R886Q no promueve la activación de Rac-GTPasa en nuestro tiempo de estudio.
- Los receptores CaSR N639K, R886Q y V894I no promueven la migración celular en células HEK293.
- La proteína Rac-GTPasa es un elemento regulador de la secreción de IL-8 promovida por el CaSR.

PERSPECTIVAS.

- Determinar la identidad del o los GEFs que se activan de manera dependientes del mTORC2 por estímulo del CaSR silvestre y N639K.
- Determinar si el CaSR R886Q es incapaz de promover la activación de Rac-GTPasa mediante una asociación diferencial a AMSH.
- Determinar el tráfico vesicular regulado por activación de los receptores CaSR silvestre, N639K y R886Q.
- Determinar el mecanismo por el cual Rac regula la secreción de IL-8.

REFERENCIAS.

- Armstrong, H.K., Gilli, J.L., Johnson, I.R.D., Nassar, Z.D., Moldovan, M., Levrie, C., Sadowski, M.C., Chin, M.Y., Tomlinson, E.S., Tarulli, G., et al. (2018). Dysregulated fibronectin trafficking by Hsp90 inhibition restricts prostate cancer cell invasion. *Sci. Rep.* 1–14.
- Arulpragasam, A., Magno, A.L., Ingle, E., Brown, S.J., Conigrave, A.D., Ratajczak, T., and Ward, B.K. (2012). The adaptor protein 14-3-3 binds to the calcium-sensing receptor and attenuates receptor-mediated Rho kinase signalling. *Biochem. J* 1006, 995–1006.
- Avlani, V.A., Ma, W., Mun, H., Leach, K., Delbridge, L., Christopoulos, A., and Conigrave, A.D. (2013). Calcium-sensing receptor-dependent activation of CREB phosphorylation in HEK293 cells and human parathyroid cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 1097–1104.
- Azevedo, A.W., Doan, T., Moaven, H., Sokal, I., Baameur, F., Gurevich, V. V., Chen, J., and Rieke, F. (2015). C-terminal threonines and serines play distinct roles in the desensitization of rhodopsin , a G protein-coupled receptor. *Elife* 1–22.
- Bai, M., Trivedi, S., Kifor, O., Quinn, S.J., and Brown, E.M. (1999). Intermolecular interactions between dimeric calcium-sensing receptor monomers are important for its normal function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2834–2839.
- Balasuriya, N., Davey, N.E., Johnson, J.L., Liu, H., Biggar, K.K., Cantley, L.C., Li, S.S.-C., and O'Donoghue, P. (2020). Phosphorylation-dependent substrate selectivity of protein kinase B (AKT1). *J. Biol. Chem.* 3, 8120–8134.
- Bi, Y., Page, S. Le, Williams, J.A., Page, S. Le, and Rho, J.A.W. (2005). Rho and Rac promote acinar morphological changes , actin reorganization , and amylase secretion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 0622, 561–570.
- Binmahfouz, L.S., Centeno, P.P., Conigrave, A.D., and Ward, D.T. (2019). Identification of Serine-875 as an Inhibitory Phosphorylation Site in the Calcium-Sensing Receptor s. *Mol. Pharmacol.* 204–211.
- Bosco, E.E., Mulloy, J.C., Zheng, Y., and Biology, C. (2009). HHS Public Access. *Cell Mol. Life Sci.* 66, 370–374.
- Boudot, C., Hénaut, L., Thiem, U., Geraci, S., Galante, M., Saldanha, P., Saidak, Z., Six, I., Clézardin, P., Kamel, S., et al. (2017). Overexpression of a functional calcium-sensing receptor dramatically increases osteolytic potential of MDA-MB-231 cells in a mouse model of bone metastasis through epiregulin- mediated osteoprotegerin downregulation. *Oncotarget* 1–13.
- Brown, E.M., and MacLeod, R.J. (2001). Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol. Rev.* 81, 239–297.
- Bustelo, X.R., Sauzeau, V., and Berenjano, I.M. (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* 29, 356–370.
- Campos-Verdes, L.M., Costa-Silva Danylo Raphael, da Silva-Sampaio, J.P., Barros-Oliveira, M., Escórcio-Dourado, C.S., Martins, L.M., Sampaio, F., Revoredo, C., Alves-Ribeiro, F.A., and Borges da Silva, B. (2018). Review of Polymorphism of the Calcium Sensing Receptor Gene and Breast Cancer Risk. *Can Inv.* 2018.pdf. *Cancer Invest.*
- Canton, J., Schlam, D., Breuer, C., Gütschow, M., Glogauer, M., and Grinstein, S.

(2016). Calcium-sensing receptors signal constitutive macropinocytosis and facilitate the uptake of NOD2 ligands in macrophages. *Nat. Commun.* 7, 11284.

Chang, F., Kim, J.M., Choi, Y., and Park, K. (2018). MTA promotes chemotaxis and chemokinesis of immune cells through distinct calcium-sensing receptor signaling pathways. *Biomaterials* 150, 14–24.

Chang, W., Chen, T., Pratt, S., and Shoback, D. (2000). Amino Acids in the Second and Third Intracellular Loops of the Parathyroid Ca^{2+} -sensing Receptor Mediate Efficient Coupling to Phospholipase C * of the CaRs mutated at Leu-798 and Phe-802 appeared. *J. Biol. Chem.* 275, 19955–19963.

Chen, X., Wang, L., Cui, Q., Ding, Z., Han, L., Kou, Y., Zhang, W., Wang, H., Jia, X., Dai, M., et al. (2021). Structural insights into the activation of human calcium-sensing receptor. *Elife* 1–24.

Daryanto, B., Purnomo, B.B., Gunawan, A., Tamara, F., Hutama, S.A., Mayasari, E.D., Kusumaningrum, A.G., and Fajar, J.K. (2020). Association between calcium-sensing receptor (CaSR) R990G , CaSR A986S , and CaSR Q1011E gene polymorphisms and the risk of urolithiasis : a meta-analysis. *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* 1–12.

David, S., and Kalb, R.G. (2005). Serum/glucocorticoid-inducible kinase can phosphorylate the cyclic AMP reponse element binding protein, CREB.pdf. *FEBS Lett.*

Davila, J., Laws, M.J., Kannan, A., Li, Q., Taylor, R.N., Bagchi, M.K., and Bagchi, I.C. (2015). Rac1 Regulates Endometrial Secretory Function to Control Placental Development. *PLOS Genet.*

Diring, J., Moulleron, S., Mcdonald, N.Q., and Treisman, R. (2019). RPEL-family rhoGAPs link Rac/Cdc42 GTP loading to G-actin availability. *Nat. Cell Biol.* 21.

Diz-Muñoz, A., Thurley, K., Chintamen, S., Altschuler, S.J., Wu, L.F., Fletcher, D.A., and Weiner, O.D. (2016). Membrane Tension Acts Through PLD2 and mTORC2 to Limit Actin Network Assembly During Neutrophil Migration. *PLOS Biol.* 1–30.

Dong, Q., Cheng, Z., Chang, W., Blackman, B.E., Conte, F.A., Hu, J., Shoback, D., and Miller, W.L. (2010). Naturally-Occurring Mutation in the Calcium-Sensing Receptor Reveals the Significance of Extracellular Domain Loop III Region for Class C G-Protein-Coupled Receptor Function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 245–252.

Ebner, M., Sinkovics, B., Szczygie, M., Ribeiro, D.W., and Yudushkin, I. (2017). Localization of mTORC2 activity inside cells. 216, 343–353.

Eichel, K., Jullié, D., Barsi-rhyne, B., Latorraca, N.R., and Masureel, M. (2018). Catalytic activation of β -arrestin by GPCRs. *Nature.*

Erasmus, J.C., Smolarczyk, K., Brezovjakova, H., Mohd-naim, N.F., Lozano, E., and Matter, K. (2021). Rac1-PAK1 regulation of Rab11 cycling promotes junction destabilization. *J. Cell Biol.* 220.

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629–635.

Fang, Y., Liu, S., Hu, L., Cai, W., Wan, X., Liu, D., He, Y., and Zhu, Z. (2020). Calcium-sensing receptor promotes tumor proliferation and migration in human intrahepatic cholangiocarcinoma by targeting ERK signaling pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 172915.

Frasa, M.A.M., Maximiano, F.C., Smolarczyk, K., Francis, R.E., Betson, M.E.,

Lozano, E., Goldenring, J., Seabra, M.C., Rak, A., Ahmadian, M.R., et al. (2010). Article Armus Is a Rac1 Effector that Inactivates Rab7 and Regulates E-Cadherin Degradation. *Curr. Biol.* 20, 198–208.

Fu, W., and Hall, M.N. (2020). Regulation of mTORC2 signaling. *Genes* (Basel).

Gao, Y., Robertson, M.J., Rahman, S.N., Seven, A.B., Zhang, C., Meyerowitz, J.G., Panova, O., Hannan, F.M., Thakker, R. V, Bräuner-osborne, H., et al. (2021). Asymmetric activation of the calcium-sensing receptor homodimer. *Nature* 595.

Geng, Y., Mosyak, L., Kurinov, I., Zuo, H., Sturchler, E., Cheng, T.C., Subramanyam, P., Brown, A.P., Brennan, S.C., Mun, H., et al. (2016a). Structural mechanism of ligand activation in human calcium-sensing receptor. 1–25.

Geng, Y., Mosyak, L., Kurinov, I., Zuo, H., Sturchler, E., Cheng, T.C., Subramanyam, P., Brown, A.P., Brennan, S.C., Mun, H., et al. (2016b). Structural mechanism of ligand activation in human calcium-sensing receptor. *Elife* 1–25.

Gleason, C.E., Osés-prieto, J.A., Li, K.H., Saha, B., Situ, G., Burlingame, A.L., and Pearce, D. (2019). Phosphorylation at distinct subcellular locations underlies specificity in mTORC2-mediated activation of SGK1 and Akt. *J. Cell Sci.*

Goolam, M. a., Ward, J.H., Avlani, V. a., Leach, K., Christopoulos, A., and Conigrave, A.D. (2014). Roles of intraloops-2 and -3 and the proximal C-terminus in signalling pathway selection from the human calcium-sensing receptor. *FEBS Lett.* 588, 3340–3346.

Gorvin, C.M., Rogers, A., Hastoy, B., Hanyaloglu, A.C., Breitwieser, G.E., Thakker, R. V, Gorvin, C.M., Rogers, A., Hastoy, B., Tarasov, A.I., et al. (2018a). AP2 s Mutations Impair Calcium-Sensing Receptor Trafficking and Signaling, and Show an Endosomal Pathway to Spatially Direct G-Protein Selectivity. *CellReports* 22, 1054–1066.

Gorvin, C.M., Frost, M., Malinauskas, T., Cranston, T., Boon, H., Siebold, C., Jones, E.Y., Hannan, F.M., and Thakker, R. V (2018b). Calcium-sensing receptor residues with loss- and gain-of-function mutations are located in regions of conformational change and cause signalling bias. *Hum. Mol. Genet.* 27, 3720–3733.

Goyal, P., Brünnert, D., Ehrhardt, J., Bredow, M., Piccenini, S., and Zygmunt, M. (2013). Cytokine IL-6 secretion by trophoblasts regulated via sphingosine-1-phosphate receptor 2 involving Rho / Rho-kinase and Rac1 signaling pathways. *Mol. Hum. Reprod.* 19, 528–538.

Graziano, B.R., Gong, D., Anderson, K.E., Pipathsouk, A., Goldberg, A.R., and Weiner, O.D. (2017). A module for Rac temporal signal integration revealed with optogenetics. *J. Cell Biol.*

Grzegorzewska, A.E., Paciorkowski, M., Mostowska, A., and Frycz, B. (2016). Associations of the calcium-sensing receptor gene CASR rs7652589 SNP with nephrolithiasis and secondary hyperparathyroidism in haemodialysis patients. *Nat. Publ. Gr.* 1–12.

Grzegorzewska, A.E., Frycz, B.A., Monika, Ś., Niepolski, L., Mostowska, A., and Jagodzi, P. (2019). Calcium-sensing receptor gene (CASR) polymorphisms and CASR transcript level concerning dyslipidemia in hemodialysis patients : a cross-sectional study. 1–14.

Hamidi, H., and Ivaska, J. (2017). Vascular Morphogenesis : An Integrin and Fibronectin Highway. *Curr. Biol.* 27, R158–R161.

Han, Y.-E., Lim, A., Park, S.-H., Chang, S., Lee, S.-H., and Ho, W.-K. (2015). Rac-mediated actin remodeling and myosin II are involved in K ATP channel trafficking in pancreatic β -cells. *Exp. Mol. Med.* 1–12.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144, 646–674.

Hannan, F.M., Kallay, E., Chang, W., Brandi, M.L., and Thakker, R. V. (2018). The calcium-sensing receptor in physiology and in calcitropic and noncalcitropic diseases. *Nat. Rev. Endocrinol.* 15, 33–51.

Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases : new insights into their functions from in vivo studies. *Mol. Cell Biol.* 9.

Hellinger, J.W., Schömel, F., Buse, J. V, and Lenz, C. (2020). Identification of drivers of breast cancer invasion by secretome analysis : insight into CTGF signaling. *Sci. Rep.* 1–21.

Hendy, G.N., and Canaff, L. (2016). Calcium-Sensing Receptor Gene : Regulation of Expression. *Front. Physiol.* 7, 1–12.

Hernández-Bedolla, M.A., Carretero-Ortega, J., Valadez-Sánchez, M., Vázquez-Prado, J., and Reyes-Cruz, G. (2015). Chemotactic and proangiogenic role of calcium sensing receptor is linked to secretion of multiple cytokines and growth factors in breast cancer MDA-MB-231 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 166–182.

Hernández-Bedolla, M.A., Domínguez, E.G., Zavala-Barrera, C., Gutierrez-Lopez, T.Y., Hidalgo-Moyle, J.J., Vázquez-Prado, J., Sánchez-Torres, C., and Reyes-Cruz, G. (2016). Calcium-sensing-receptor (CaSR) controls IL-6 secretion in metastatic breast cancer MDA-MB-231 cells by a dual mechanism revealed by agonist and inverse-agonist modulators. *Mol. Cell. Endocrinol.* 436, 159–168.

Herrera-Vigener, F., Hernández-García, R., Valadez-Sánchez, M., Vázquez-Prado, J., and Reyes-Cruz, G. (2006). AMSH regulates calcium-sensing receptor signaling through direct interactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347, 924–930.

Hills, C.E., Younis, M.Y.G., Bennett, J., Siamantouras, E., Liu, K.-K., and Squires, P.E. (2012). Calcium-Sensing Receptor Activation Increases Cell-Cell Adhesion and β -Cell Function. *Cell. Physiol. Biochem.* 30, 575–586.

Hobert, M.E., Sands, K.A., Mrsny, R.J., and Madara, J.L. (2002). Cdc42 and Rac1 Regulate Late Events in Salmonella typhimurium - induced Interleukin-8 Secretion from Polarized Epithelial Cells *. 277, 51025–51032.

Hong-Geller, E., and Cerione, R.A. (2000). Cdc42 and Rac Stimulate Exocytosis of Secretory Granules by Activating the IP 3 / Calcium Pathway in RBL-2H3 Mast Cells. *J. Cell Biol.* 148, 481–493.

Hu, J., and Spiegel, A.M. (2007). Structure and function of the human calcium-sensing receptor: Insights from natural and engineered mutations and allosteric modulators: Ca²⁺-Sensing Receptor Review Series. *J. Cell. Mol. Med.* 11, 908–922.

Humeau, Y., Popoff, M.R., Kojima, H., Doussau, F., and Poulain, B. (2002). Rac GTPase plays an essential role in exocytosis by controlling the fusion competence of release sites. *J. Neurosci.* 22, 7968–7981.

Ioachim, E., Charchanti, A., Briasoulis, E., Karavasilis, V., and Tsanou, H. (2002). Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin , fibronectin , collagen type IV and laminin in breast cancer : their prognostic value and role in tumour invasion and progression. *Eur. J. Cancer* 38, 2362–2370.

Jacobsen, S.E., Gether, U., and Bräuner-osborne, H. (2017). Investigating the molecular mechanism of positive and negative allosteric modulators in the calcium-sensing receptor dimer. *Nat. Publ. Gr.* 1–14.

Jeong, S., Kim, J.H., Kim, M.G., Han, N., Kim, I.W., Kim, T., and Oh, J.M. (2016). Genetic polymorphisms of CASR and cancer risk: Evidence from meta-analysis and HuGe review. *Onco. Targets. Ther.* 9, 655–669.

Joeckel, E., Haber, T., Prawitt, D., Junker, K., Hampel, C., Thüroff, J.W., Roos, F.C., and Brenner, W. (2014). High calcium concentration in bones promotes bone metastasis in renal cell carcinomas expressing calcium-sensing receptor. *Mol. Cancer* 13, 42.

Johnson, J.L., Monfregola, J., Napolitano, G., Kiosses, W.B., and Catz, S.D. (2012). Vesicular trafficking through cortical actin during exocytosis is regulated by the Rab27a effector JFC1 / Slp1 and the RhoA-GTPase – activating protein Gem-interacting protein. *Mol. Biol. Cell.*

Kazanietz, M.G., and Caloca, M.J. (2017). The Rac GTPase in Cancer : From Old Concepts to New Paradigms. *Cancer Res.* 5445–5452.

Khandelwal, P., Prakasam, H.S., Clayton, D.R., and Ruiz, W.G. (2013). A Rab11a-Rab8a-Myo5B network promotes stretch-regulated exocytosis in bladder umbrella cells. *24*, 1007–1019.

Kifor, O., Macleod, R.J., Diaz, R., Bai, M., Yamaguchi, T., Yao, T., Kifor, I., and Brown, E.M. (2001). Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK293 cells. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 280, 291–302.

Kim, J., and Guan, K.-L. (2019). mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth. *Nat. Cell Biol.* 21, 63–71.

Kim, W., Takyar, F.M., Swan, K., Jeong, J., Vanhouten, J., Sullivan, C., Dann, P., Yu, H., Fiaschi-taesch, N., Chang, W., et al. (2016). Calcium-Sensing Receptor Promotes Breast Cancer by Stimulating Intracrine Actions of Parathyroid Hormone – Related Protein. *Cancer Res.* 76, 5348–5361.

Kniazeff, J., Prézeau, L., Rondard, P., Pin, J.P., and Goudet, C. (2011). Dimers and beyond: The functional puzzles of class C GPCRs. *Pharmacol. Ther.* 130, 9–25.

Koehl, A., Hu, H., Feng, D., Sun, B., Zhang, Y., Robertson, M.J., Chu, M., Kobilka, T.S., Laeremans, T., Steyaert, J., et al. (2019). Structural insights into the activation of metabotropic glutamate receptors. *Nature.*

Leach, K., Hannan, F.M., Josephs, T.M., Keller, A.N., Møller, T.C., Ward, D.T., Kallay, E., and Mason, R.S. (2020). International Union of Basic and Clinical Pharmacology . CVIII . Calcium-Sensing Receptor Nomenclature , Pharmacology , and Function. *Pharmacol. Rev.* 797497, 558–604.

Li, C.L.I.N., Yang, D.A.N., Cao, X.I.N., Wang, F.A.N., Hong, D.Y., Wang, J., Shen, X.C., and Chen, Y.A.N. (2017). Fibronectin induces epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer MCF-7 cells via activation of calpain. *Oncol. Lett.* 3889–3895.

Ligeti, E., Welti, S., and Scheffzek, K. (2012). Inhibition and termination of physiological responses by GTPase activating proteins. *Physiol Rev* 92, 237–272.

Ling, S., Shi, P., Liu, S., Meng, X., Zhou, Y., Sun, W., Chang, S., Zhang, X., Zhang, L., Shi, C., et al. (2021). Structural mechanism of cooperative activation of the

human calcium-sensing receptor by Ca²⁺ ions and L-tryptophan. *Cell Res.*

Liu, H., Yi, P., Zhao, W., Wu, Y., Acher, F., and Pin, J. (2020). Illuminating the allosteric modulation of the calcium-sensing receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117.

Liu, Y., Mo, J.Q., Hu, Q., Boivin, G., Levin, L., Lu, S., Yang, D., Dong, Z., and Lu, S. (2008). Targeted Overexpression of Vav3 Oncogene in Prostatic Epithelium Induces Nonbacterial Prostatitis and Prostate Cancer. *Cancer Res.* 68, 6396 LP – 6406.

Lorenz, S., Frenzel, R., Paschke, R., Breitwieser, G.E., and Miedlich, S.U. (2007). Functional Desensitization of the Extracellular Calcium- Sensing Receptor Is Regulated via Distinct Mechanisms : Role of G Protein-Coupled Receptor Kinases , Protein. *Endocrinology* 148, 2398–2404.

Macías-García, B., García-Marín, L.J., Bragado, M.J., and González-Fernández, L. (2019). The calcium-sensing receptor regulates protein tyrosine phosphorylation through PDK1 in boar spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*

Mamillapalli, R., and Wysolmerski, J. (2010). The calcium-sensing receptor couples to Galpha(s) and regulates PTHrP and ACTH secretion in pituitary cells. *J. Endocrinol.* 204, 287–297.

Mamillapalli, R., VanHouten, J., Zawalich, W., and Wysolmerski, J. (2008). Switching of G-protein usage by the calcium-sensing receptor reverses its effect on parathyroid hormone-related protein secretion in normal versus malignant breast cells. *J. Biol. Chem.* 283, 24435–24447.

Marti-Solano, M., Crilly, S.E., Malinverni, D., Munk, C., Harris, M., Pearce, A., Quon, T., Mackenzie, A.E., Wang, X., Peng, J., et al. (2020). Combinatorial expression of GPCR isoforms affects signalling and drug responses. *Nature* 587.

Melick, C.H., and Jewell, J.L. (2020). Regulation of mTORC1 by upstream stimuli. *Genes (Basel)*.

Mitchell, T., Lo, A., Logan, M.R., Lacy, P., and Eitzen, G. (2008). Primary granule exocytosis in human neutrophils is regulated by Rac-dependent actin remodeling. Mitchell T, Eitzen G. *Am J Physiol.* 2008.pdf. *Am. J. Cell Physiol.*

Miyamoto, Y., Torii, T., Yamamori, N., Ogata, T., Tanoue, A., and Yamauchi, J. (2013). Akt and PP2A Reciprocally Regulate the Guanine Nucleotide Exchange Factor Dock6 to Control Axon Growth of Sensory Neurons. *Sci. Signal.* 6, ra15 LP- ra15.

Mos, I., Jacobsen, S.E., Foster, S.R., and Bräuner-Osborne, H. (2019). Calcium-Sensing Receptor Internalization Is b -Arrestin – Dependent and Modulated by Allosteric Ligands. *Mol. Pharmacol.* 463–474.

Müller, P.M., Rademacher, J., Bagshaw, R.D., Wortmann, C., Barth, C., Unen, J. Van, Alp, K.M., Giudice, G., Eccles, R.L., Heinrich, L.E., et al. (2020). Systems analysis of RhoGEF and RhoGAP regulatory proteins reveals spatially organized RAC1 signalling from integrin adhesions. *Nat. Cell Biol.*

Nakhoul, N.L., Tu, C., Brown, K.L., Islam, M.T., Hodges, A.G., and Abdulnour-Nakhoul, S.M. (2019). Calcium-sensing receptor deletion in the mouse esophagus alters barrier function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 144–161.

Orduña-Castillo, L.B., del-Río-Robles, J.E., García-Jiménez, I., Zavala-Barrera, C., Beltrán-Navarro, Y.M., Hidalgo-Moyle, J.J., Ramírez-Rangel, I., Hernández-Bedolla,

M.A., Reyes-Ibarra, A.P., Valadez-Sánchez, M., et al. (2021). Calcium sensing receptor stimulates breast cancer cell migration via the G β γ -AKT-mTORC2 signaling pathway. *J. Cell Commun. Signal.*

Palamidessi, A., Frittoli, E., Garre, M., Faretta, M., Mione, M., Testa, I., Diaspro, A., Lanzetti, L., Scita, G., and Di Fiore, P.P. (2008). Endocytic Trafficking of Rac Is Required for the Spatial Restriction of Signaling in Cell Migration. *Cell* 135–147.

Parri, M., and Chiarugi, P. (2010). Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Commun. Signal.* 1–14.

Patwardhan, A., and Cheng, N. (2021). Post-Translational Modifications of G Protein – Coupled Receptors Control Cellular Signaling Dynamics in Space and Time. *Pharmacol. Rev.* 120–151.

Pi, M., Spurney, R.F., Tu, Q., Hinson, T., and Quarles, L.D. (2002). Calcium-Sensing Receptor Activation of Rho Involves Filamin and Rho-Guanine Nucleotide Exchange Factor. *Endocrinology* 143, 3830–3838.

Pi, M., Oakley, R.H., Gesty-palmer, D., Cruickshank, R.D., Spurney, R.F., Luttrell, L.M., and Quarles, L.D. (2005). β -Arrestin- and G Protein Receptor Kinase-Mediated Calcium-Sensing Receptor Desensitization. *Mol. Endocrinol.* 19, 1078–1087.

Ramel, D., Wang, X., Laflamme, C., Montell, D.J., and Emery, G. (2013). Rab11 regulates cell-cell communication during collective cell movements. *Nat. Cell Biol.* 15, 317–324.

Ray, K. (2015). Calcium-sensing receptor: Trafficking, endocytosis, recycling, and importance of interacting proteins (Elsevier Inc.).

Ray, K., Clapp, P., Goldsmith, P.K., and Spiegel, A.M. (1998). Identification of the Sites of N -Linked Glycosylation on the Human Calcium Receptor and Assessment of Their Role in Cell Surface Expression and Signal Transduction *. 273, 34558–34567.

Reyes-Ibarra, A.P., García-Regalado, A., Ramírez-Rangel, I., Esparza-Silva, A.L., Valadez-Sánchez, M., Vázquez-Prado, J., and Reyes-Cruz, G. (2007). Calcium-sensing receptor endocytosis links extracellular calcium signaling to parathyroid hormone-related peptide secretion via a Rab11a-dependent and AMSH-sensitive mechanism. *Mol. Endocrinol.* 21, 1394–1407.

Riggi, M., Niewola-Staszowska, K., Chiaruttini, N., Colom, A., Kusmider, B., Mercier, V., Soleimanpour, S., Stahl, M., Matile, S., Roux, A., et al. (2018). Decrease in plasma membrane tension triggers PtdIns(4,5)P2 phase separation to inactivate TORC2. *Nat. Cell Biol.* 20, 1043–1051.

Riggi, M., Kusmider, B., and Loewith, R. (2020). The flipside of the TOR coin – TORC2 and plasma membrane homeostasis at a glance. *Cell Sci. a Glance.*

Robles-Molina, E., Dionisio-Vicuña, M., Guzmán-Hernández, M.L., Reyes-Cruz, G., and Vázquez-Prado, J. (2014). G β γ interacts with mTOR and promotes its activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 444, 218–223.

Rybchyn, M.S., Islam, K.S., Brennan-Speranza, T.C., Cheng, Z., Brennan, S.C., Chang, W., Mason, R.S., and Conigrave, A.D. (2019). Homer1 mediates CaSR-dependent activation of mTOR complex 2 and initiates a novel pathway for AKT-dependent b-catenin stabilization in osteoblasts. *J. Biol. Chem.*

Saidak, Z., Boudot, C., Abdoune, R., Petit, L., Brazier, M., Mentaverri, R., and

Kamel, S. (2009). Extracellular calcium promotes the migration of breast cancer cells through the activation of the calcium sensing receptor. *Exp. Cell Res.* *315*, 2072–2080.

Sanders, J.L., Chattopadhyay, N., Kifor, O., Yamaguchi, T., Butters, R.R., and Brown, E.M. (2000). Extracellular Calcium-Sensing Receptor Expression and Its Potential Role in Regulating Parathyroid Hormone- Related Peptide Secretion in Human Breast Cancer. *Endocrinology* *141*, 0–7.

Sandhu, M., Touma, A.M., Dysthe, M., Sadler, F., and Sivaramakrishnan, S. (2019). Conformational plasticity of the intracellular cavity of GPCR – G-protein complexes leads to G-protein promiscuity and selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *116*, 11956–11965.

Saxton, R.A., and Sabatini, D.M. (2017). mTOR Signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell* *168*, 960–976.

Segal, D., Zaritsky, A., Schejter, E.D., and Shilo, B. (2018). Feedback inhibition of actin on Rho mediates content release from large secretory vesicles. *J. Cell Biol.* *217*.

Shinde, A., Libring, S., Alpsoy, A., Abdullah, A., Schaber, J.A., Solorio, L., and Wendt, M.K. (2018). Autocrine Fibronectin Inhibits Breast Cancer Metastasis. *Mol. Cancer Res.* *1579–1590*.

Smith, K.A., Ayon, R.J., Tang, H., Makino, A., and Yuan, J.X. (2016). Calcium-Sensing Receptor Regulates Cytosolic [Ca²⁺] and Plays a Major Role in the Development of Pulmonary Hypertension. *Front. Physiol.* *7*, 1–7.

Stepanchick, A., McKenna, J., McGovern, O., Huang, Y., and Breitwieser, G.E. (2010). Calcium sensing receptor mutations implicated in pancreatitis and idiopathic epilepsy syndrome disrupt an arginine-rich retention motif. *Cell. Physiol. Biochem.* *26*, 363–374.

Sung, B.H., Ketova, T., Hoshino, D., Zijlstra, A., and Weaver, A.M. (2015). Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion. *Nat. Commun.*

Tatebe, H., and Shiozaki, K. (2017). Evolutionary conservation of the components in the TOR signaling pathways. *Biomolecules*.

Tennakoon, S., Aggarwal, A., and Kállay, E. (2015). The calcium-sensing receptor and the hallmarks of cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*

Tharmalingam, S., Daulat, A.M., Antflick, J.E., Ahmed, S.M., Nemeth, E.F., Angers, S., Conigrave, A.D., and Hampson, D.R. (2011). Calcium-sensing receptor modulates cell adhesion and migration via integrins. *J. Biol. Chem.* *286*, 40922–40933.

Töke, J., Czirják, G., Enyedi, P., and Tóth, M. (2021). Rare diseases caused by abnormal calcium sensing and signalling. *Endocr. Rev.*

Vanhouten, J.N., and Wysolmerski, J.J. (2013). The calcium-sensing receptor in the breast. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *27*, 403–414.

Vanhouten, J., Dann, P., Mcgeoch, G., Brown, E.M., Krapcho, K., Neville, M., and Wysolmerski, J.J. (2004). The calcium-sensing receptor regulates mammary gland parathyroid hormone – related protein production and calcium transport. *J. Clin. Invest.* *113*, 598–608.

Veluthakal, R., Tunduguru, R., Arora, D.K., Sidarala, V., Syeda, K., Vlaar, C.P., Thurmond, D.C., and Kowluru, A. (2015). VAV2, a guanine nucleotide exchange

factor for Rac1, regulates glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 58, 2573–2581.

Wagner, S.A., Beli, P., Weinert, B.T., Scho, C., Kelstrup, C.D., Young, C., Nielsen, M.L., Olsen, J. V, Brakebusch, C., and Choudhary, C. (2012). Proteomic Analyses Reveal Divergent Ubiquitylation Site Patterns in Murine Tissues. *Mol. Cell. Proteomics* 1578–1585.

Wang, L., Widatalla, S.E., Whalen, D.S., Ochieng, J., and Sakwe, A.M. (2017). Association of calcium sensing receptor polymorphisms at rs1801725 with circulating calcium in breast cancer patients. *BMC Cancer* 1–8.

Wang, Z., Pedersen, E., Basse, A., Lefever, T., Peyrollier, K., Kapoor, S., Mei, Q., Karlsson, R., and Brakebusch, C. (2010). Rac1 is crucial for Ras-dependent skin tumor formation by controlling Pak1-Mek-Erk hyperactivation and hyperproliferation in vivo. *Oncogene* 3362–3373.

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

Zavala-Barrera, C., del-Río-Robles, J.E., García-Jiménez, I., Egusquiza-Alvarez, C.A., Hernández-Maldonado, J.P., Vázquez-Prado, J., and Reyes-Cruz, G. (2021). The calcium sensing receptor (CaSR) promotes Rab27B expression and activity to control secretion in breast cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1868, 119026.

Zhang, M., and Breitwieser, G.E. (2005). High Affinity Interaction with Filamin A Protects against Calcium-sensing Receptor Degradation * with filamin A , suggesting the targeting of critical sig-. *J. Biol. Chem.* 280, 11140–11146.

Zhang, C., Miller, C.L., Brown, E.M., and Yang, J.J. (2015). The calcium sensing receptor: from calcium sensing to signaling. *Sci. China. Life Sci.* 58, 14–27.

Zhang, Z.-L., Li, Z.-R., Li, J.-S., and Wang, S.-R. (2020). Calcium-sensing receptor antagonist NPS-2143 suppresses proliferation and invasion of gastric cancer cells. *Cancer Gene Ther.* 548–557.

Zhang, Z., Sun, S., Quinn, S.J., Brown, E.M., and Bai, M. (2001). The Extracellular Calcium-sensing Receptor Dimerizes through Multiple Types of Intermolecular Interactions *. *J. Biol. Chem.* 276, 5316–5322.

Zhao, W., Zhang, Z., Zheng, L., You, C., and Chi, H. (2019). Calcium-sensing receptor activating ERK1 / 2 and PI3K-Akt pathways to induce the proliferation of osteosarcoma cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 517–519.

[Click here to view linked References](#)

1
2
3
4 **Calcium sensing receptor stimulates breast cancer cell migration via the G β γ -AKT-**
5 **mTORC2 signaling pathway**
6
7
8

9
10 Lennis Beatriz Orduña-Castillo¹, Jorge Eduardo del-Río-Robles¹, Irving García-Jiménez¹, César
11 Zavala-Barrera¹, Yarely Mabell Beltrán-Navarro², Joseline Janai Hidalgo-Moyle¹, Iliana Ramírez-
12 Rangel², Marco A. Hernández-Bedolla^{1,3}, Alma P. Reyes-Ibarra¹, Margarita Valadez-Sánchez¹,
13 José Vázquez-Prado², and Guadalupe Reyes-Cruz^{1*}
14
15
16
17

18
19 Departments of ¹Cell Biology and ²Pharmacology, CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico
20
21

22
23 ³Current address: Licenciatura en Enfermería, Escuela Superior de Huejutla, Universidad
24 Autónoma del Estado de Hidalgo, Huejutla de Reyes, Hidalgo, México.
25
26
27

28
29 *Corresponding author:

30 Guadalupe Reyes-Cruz, Ph.D.

31
32 CINVESTAV

33
34 Cell Biology Department

35
36 Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco,

37
38 CP 07360 Ciudad de México, México.

39
40 Phone: (+52) (55) 5747-3989

41
42 E-mail: greyesc@cinvestav.mx
43
44
45

46 Running title: CaSR activates cell migration via G β γ /PI3K/mTORC2
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

ABSTRACT

1 Calcium sensing receptor, a pleiotropic G protein coupled receptor, activates secretory
2 pathways in cancer cells and putatively exacerbates their metastatic behavior. Here, we show
3 that various CaSR mutants, identified in breast cancer patients, differ in their ability to
4 stimulate Rac, a small Rho GTPase linked to cytoskeletal reorganization and cell protrusion,
5 but are similarly active on the mitogenic ERK pathway. To investigate how CaSR activates
6 Rac and drives cell migration, we used invasive MDA-MB-231 breast cancer cells. We
7 revealed, by pharmacological and knockdown strategies, that CaSR activates Rac and cell
8 migration via the G $\beta\gamma$ -PI3K-mTORC2 pathway. These findings further support current efforts
9 to validate CaSR as a relevant therapeutic target in metastatic cancer.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

20 **Key words:** Calcium sensing receptor, Cell migration, GPCR signaling, Breast cancer, Rac-1
21 GTPase, mTORC2.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

INTRODUCTION

1 The calcium sensing receptor (CaSR) controls parathyroid hormone (PTH) secretion in
2 response to fluctuations of extracellular calcium. This G protein-coupled receptor (GPCR), in
3 concert with PTH, regulates calcium removal from bone and renal calcium reabsorption
4 (Brown and MacLeod, 2001; Riccardi and Valenti, 2016). Inherited point mutations in the
5 *CASR* gene cause mild to severe parathyroid diseases characterized by altered calcium
6 homeostasis (Mayr et al., 2016; Pollak et al., 1993). The structural consequences of these single
7 amino acid changes and how they affect CaSR signaling are better understood in the context
8 of the recent structural analysis of CaSR (Ling et al., 2021; Wen et al., 2021). Based on their
9 localization, these mutations affect agonist binding, as those in the extracellular Venus Flytrap
10 and cysteine-rich extracellular domains, or the conformational adjustments mechanistically
11 linked to signal transduction, as those in the seven-helix transmembrane region or intracellular
12 domains (Ling et al., 2021; Wen et al., 2021). CaSR functions as a constitutive homodimer
13 which exhibits different conformations depending on the binding of agonists or allosteric
14 modulators. In the active form, CaSR dimers are more compact and therefore the intracellular
15 regions, involved in the dynamic association to signaling transducers and effectors, are closely
16 engaged (Ling et al., 2021; Wen et al., 2021). Point mutations in these regions might affect the
17 signaling properties not only of pathological CaSR variants known in parathyroid diseases, but
18 also CaSR mutants potentially involved in cancer and other pathologies.

19 Beyond its physiological and pathological effects in the parathyroid glands, CaSR promotes
20 contrasting effects in breast, colon and prostate cancer cells and contributes to tumor
21 progression in mice models (Bhagavathula et al., 2005; Joeckel et al., 2014; Liao et al., 2006a;
22 Sanders et al., 2000; Tennakoon et al., 2015). Specificities of CaSR signaling in various cancer
23 cells might be related to cell differences on the available signaling repertoire, changes on CaSR
24 expression and structural consequences of CaSR mutations. In colon cancer cells, elevated
25 CaSR correlates with an ERK-dependent anti-proliferative effect linked to increased E-
26 cadherin expression and differentiation (Bhagavathula et al., 2005). In the case of metastatic
27 prostate cancer cells, CaSR promotes proliferation and AKT-dependent cell adhesion (Liao et
28 al., 2006b). In breast cancer cells, CaSR promotes parathyroid hormone-related protein
29 (PTHrP) production and proliferation, whereas in a conditional knockout mice model of breast
30 cancer, ablation of CaSR slowed tumor growth (Kim et al., 2016). In breast cancer patients,
31 elevated expression of CaSR was associated with significantly shorter survival (Kim et al.,
32 2016), and might indicate metastatic progression (Mihai et al., 2006). Deep sequencing of
33 human cancer genomes revealed that *CASR* is one of the most frequently mutated GPCRs

1 (O'Hayre et al., 2013). An updated list of these mutations is maintained in the COSMIC v94
2 database (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>; (Tate et al., 2019)). Although the oncogenic
3 capacity of mutant CaSR has not been fully characterized, it potentially contributes to the
4 transforming effects of major driving oncogenes. These include PIK3CA, the gene coding for
5 the catalytic subunit of phosphoinositide 3-kinase alpha (PI3K α), which is frequently altered
6 in the group of breast cancer patients with amplified or mutated *CASR*
7 (<https://www.cbioportal.org/> (Gao et al., 2013). To contribute to malignant transformation of
8 breast epithelial cells, CaSR appears to switch its G-protein usage, gaining ability to couple to
9 Gs as an abnormal mechanism to activate PKA-dependent production of PTHrP (Mamillapalli
10 et al., 2008). Moreover, secretion of a variety of chemotactic, angiogenic, and growth factors
11 by metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells (MDA-MB-321 cells) is stimulated by CaSR
12 (Hernandez-Bedolla et al., 2015), via the secretory Rab27b GTPase (Zavala-Barrera et al.,
13 2021), indicating its potential to exacerbate the microenvironment in tumor settings.
14 Furthermore, in metastatic tissues, overexpression of CaSR has been correlated with
15 chemotactic behavior of cancer cells and with their osteolytic potential (Aguirre et al., 2010;
16 Boudot et al., 2017; Olszak et al., 2000; Saidak et al., 2009; Yamaguchi et al., 1998a;
17 Yamaguchi et al., 1998b). However, the molecular mechanisms by which CaSR promotes cell
18 migration remain elusive.

19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33 The mechanistic target of rapamycin (mTOR) controls cell growth, proliferation,
34 survival, and migration (Bracho-Valdes et al., 2011; Saxton and Sabatini, 2017; Wullschleger
35 et al., 2006). This multifunctional kinase is the catalytic subunit of a rapamycin-sensitive
36 complex, known as mTORC1, which reacts to nutritional status and energy levels (Bracho-
37 Valdes et al., 2011; Saxton and Sabatini, 2017; Wullschleger et al., 2006). This signaling
38 complex, the target of immunosuppressive therapies, controls cell growth by phosphorylating
39 S6K1 (S6 kinase 1) and 4E-BP1 (eIF-4E binding protein 1), key regulators of protein synthesis
40 (Bracho-Valdes et al., 2011; Saxton and Sabatini, 2017; Wullschleger et al., 2006). The mTOR
41 kinase is also part of a distinct macromolecular and functional complex, known as mTORC2,
42 containing Rictor, but not Raptor, as one of its defining subunits. This rapamycin-resistant
43 complex phosphorylates AKT, widely known as a promoter of cell survival, but also
44 recognized for its control over metabolic, proliferative, and cytoskeletal pathways (Bracho-
45 Valdes et al., 2011; Huang and Fingar, 2014; Sarbassov et al., 2005). Although rapamycin does
46 not inhibit mTORC2 catalytic activity, chronic treatment with this inhibitor prevents assembly
47 of the mTORC2 complex (Bhaskar and Hay, 2007; Bracho-Valdes et al., 2011; Jacinto et al.,
48 2004; Oh and Jacinto, 2011; Sarbassov et al., 2006).

1 To control cell migration, mTORC2 promotes dynamic adjustments of the actin
2 cytoskeleton via Rho GTPase-dependent pathways (Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2004).
3 Among the RhoGEFs linking mTOR signaling to cell migration, we identified P-Rex1 as an
4 mTOR-interacting partner (Hernandez-Negrete et al., 2007). This guanine nucleotide exchange
5 factor, specific for Rac, is activated by chemotactic GPCRs via PIP3 (phosphatidylinositol-3,
6 4, 5-triphosphate) and Gβγ (Cervantes-Villagrana et al., 2019; Cervantes-Villagrana et al.,
7 2021; Hernandez-Negrete et al., 2007; Vazquez-Prado et al., 2016). Interestingly, Gβγ directly
8 activates PI3Kβ and PI3Kγ, and also interacts with mTORC2, orchestrating chemotactic
9 responses to agonists acting on Gi-coupled receptors (Houslay et al., 2016; Robles-Molina et
10 al., 2014; Stephens et al., 1997). In the current study, we assessed how endogenous CaSR drives
11 migration of MDA-MB-231 cells, and compared the wild type CaSR and four CaSR mutants
12 in terms of their signaling to Rac and ERK pathways. These mutants differ by a single amino
13 acid substitution, one of them at the first intracellular loop, other at the fourth transmembrane
14 helix domain and two at the intracellular carboxyl-terminal region. The four CaSR mutants
15 were found in breast cancer patients as reported in the Catalogue of Somatic Mutations In
16 Cancer (COSMIC).
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

31 **MATERIALS AND METHODS**

32 **DNA constructs, reagents, and antibodies**

33 CaSR cDNA and anti-CaSR antibodies were kindly provided by Dr. Allen Spiegel
34 (NIDDK/NIH); shRNA-CaSR was kindly donated by Dr. Laurie McCauley (University of
35 Michigan). The CaSR mutants N639K, T732A, R886Q, V894I, R795W, and Δ895-1075 were
36 obtained by the QuickChangeTM mutagenesis kit (Stratagene) and confirmed by sequencing
37 with the dRhodamine terminator cycle kit. Myc-mCherry-PKI was kindly provided by Dr.
38 Silvio Gutkind (UC San Diego). PTX (Pertussis Toxin) was from MERCK & Co., Inc. The
39 following antibodies were from Cell Signaling Technology, Inc.: anti-phospho-Erk p44/42
40 mitogen-activated protein kinase (MAPK (used at 1:40,000); Thr-202/Tyr-204); anti-phospho-
41 mTOR (used at 1:10,000); anti-mTOR (used at 1:10,000); anti-phospho-S6 (used at 1:30,000);
42 anti-S6 (used at 1:5,000); anti-phospho-S6K (used at 1:10,000); anti-S6K (used at 1:5,000);
43 anti-pCREB Ser-133 (used at 1:30,000), and anti-CREB antibodies (used at 1:10,000). Anti-
44 phospho-AKT (used at 1:5,000) and anti-AKT antibodies (used at 1:5,000) were from Santa
45 Cruz Biotechnology, Inc. and RD Systems, respectively. Anti-Rac-1 antibody (used at
46 1:30,000) was purchased from BD Transduction Laboratories. The anti-mouse-HRP (used at
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1:30,000) and anti-rabbit-HRP (used at 1:10,000) secondary antibodies were from Seracare KPL. R568 (calcimimetic) and NPS2143 (calcilytic) were from Tocris Bioscience.

Cell culture, transient transfection of wild type and CaSR mutant, lentiviral production, and cell infection

MDA-MB-231 and HEK-293 cells were maintained in DMEM (Sigma-Aldrich Co.) supplemented with 5% or 10% fetal bovine serum (FBS), respectively. HEK-293 cells were transfected as previously reported (Reyes-Cruz et al., 2001), using 2 µg of plasmid DNA and Lipofectamine (Invitrogen Co.) or Polyethylenimine (PEI, MW 25000, from Polysciences, Inc.). MDA-MB-231 cells were transfected with control shRNA or shRNA-CaSR using Lipofectamine LTX and PLUS reagents (Invitrogen), as previously reported (Hernandez-Bedolla et al., 2015). HEK-293 and MDA-MB-231 cells were serum-starved in low calcium medium (prepared with calcium-free DMEM supplemented with 0.5 mM calcium) for 16 or 24 h, respectively. For experiments, cells were stimulated with 1 mM CaCl₂ plus 1 µM R568 in MIX medium. This medium consisted of three volumes of calcium-free DMEM plus one volume DMEM containing 1.8 mM of calcium, but lacking sodium bicarbonate (MIX medium contains 0.45 mM calcium chloride) (Hernandez-Bedolla et al., 2015). Signaling inhibitors were added before cell stimulation as follows: PTX (200 ng/ml), 20 h; H89 (10 µM), rapamycin (20, 40, or 60 ng/ml), AG1478 (700 nM), UO126 (10 µM), wortmannin (Wm) (300 nM), 1 h, or U73122 (5 µM), 15 min as indicated in the Figure Legends. Then the cells were stimulated with calcium or 10 ng/ml EGF, as positive control. Lentiviral shRNA-Rictor was obtained as previously reported (Carretero-Ortega et al., 2010). Briefly, HEK-293T cells (70% confluence) growing in 10-centimeter dishes were transfected with pTRIPZ-shRNA-Rictor or pTRIPZ-shRNA-control (2 µg), PAX2 packaging vector (1.8 µg), and pVSV-G (0.2 µg) (pTRIPZ Inducible Lentiviral shRNA was from GE Healthcare Dharmacon, Inc.) using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.). The day after transfection, media were replaced, and viral supernatants were harvested at 48 and 72 h. MDA-MB-231 cells were incubated with media containing viral supernatants, previously filtered (0.45-µm filters) and supplemented with protamine sulfate (6 µg/ml; Sigma-Aldrich). After 4 h, media were substituted with fresh media. Cells were selected with 2 µg/ml puromycin for 5-7 days. Pilot studies confirmed that these conditions killed 100% of uninfected MDA-MB-231 cells. For knockdown experiments, pools of puromycin-resistant cells were induced with 2 µg/ml Doxycycline.

Immunoblot analyses

Serum-starved confluent cells were lysed with Buffer B containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM sodium vanadate, 1 mM NaF, 10 mM

1 β -glycerophosphate, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml Leupeptin, and 1 μ g/ml Aprotinin. Total cell
2 extracts were forced through a 22-gauge needle (5-8 times) and centrifuged at 14,000 rpm for
3 15 min at 4 °C. Thirty micrograms of protein were resolved per lane on 6% or 10% SDS-PAGE
4 and transferred onto nitrocellulose. Subsequently, membranes were incubated with the
5 corresponding primary antibodies, followed by incubation with horseradish peroxidase-
6 conjugated secondary antibodies and revealed by using autoradiography films and SuperSignal
7 West Pico Substrate or ECL Western Blotting Substrate Chemiluminescent (Thermo Fisher
8 Scientific). We normalized Westerns blots to low calcium concentrations, without R-568 (-,
9 control or 0.25mM), as these conditions are reported to have a minimal effect on CaSR
10 signaling (Davey et al., 2012; Hauache et al., 2000).

18 **Chemotactic and wound-healing assays**

20 Cell migration was analyzed in Boyden chambers as reported (Hernandez-Bedolla et al., 2015).
21 Briefly, the bottom wells of the chamber were filled with 159 μ l of media containing or lacking
22 1 mM calcium in the presence or absence of 1 μ M R568 as chemoattractant, 10% FBS was
23 used as positive control. The lower part of the chamber was covered with gelatin-coated
24 polycarbonate filters having 8- μ m pores (Neuro Probe, Inc.). Filters were previously coated
25 with 2% Gelatin (Calbiochem, Merck). MDA-MB-231 cells were placed in the upper wells of
26 the chamber (100,000 cells/well). The effect of rapamycin, PTX, or wortmannin (Wm) on cell
27 migration was assessed with cells previously treated with these agents for 24, 16, or 1 h,
28 respectively. Chemotactic assays were carried out at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere for 6 h. At
29 the end of the experiment, cells in the filters were fixed with methanol, stained with 10 mg/ml
30 crystal violet, and those that remained on the top side of the filter were removed with a cotton
31 swab. Scratch assays were conducted as previously reported elsewhere (Liang et al., 2007).
32 Briefly, serum-starved confluent MDA-MB-231 cells expressing pTRIPZ shRNA-Rictor or
33 pTRIPZ shRNA-control were incubated in low calcium medium for 24 h. Then, they were
34 incubated with 12 μ M of mitomycin C (SIGMA) for 2 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Cell
35 monolayers were then scratched with a p20 pipette tip, washed with PBS, and stimulated with
36 calcium and R568 for 24 h. Images were acquired with a 10X DIC objective using a Nikon
37 Eclipse-TiE microscope. Densitometric analysis of cell migration was determined with ImageJ
38 software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

54 **Rac-GTP assay**

56 Transfected HEK-293 cells or MDA-MB-231 cells, on 60-mm plates, were serum-starved in
57 low calcium medium and stimulated with 1.5 mM calcium plus R568 for 3 min. Cells were
58

1 washed with PBS containing 10 mM MgCl₂ and lysed with 350 µl of ice-cold buffer B
2 containing 10 mM MgCl₂. Cell lysates were incubated with 40 µl of GST-CRIB beads for 45
3 min in a shaker. Beads were collected, washed three times with lysis buffer, and finally
4 resuspended in 40 µl of Laemmli buffer, boiled for 5 min, and centrifuged at 13,000 rpm for 1
5 min. Proteins were resolved in 12% acrylamide gels, transferred onto nitrocellulose
6 membranes, and immunoblotted using anti-Rac-1 monoclonal antibodies. As controls, total cell
7 lysates were analyzed in parallel.

12 **CASR-GNBI-MTOR pathway data mining**

14 To address whether *CASR* and genes of the AKT-MTOR pathway were co-expressed in breast
15 cancer tumors, transcriptomic datasets from 1,084 patients/samples (TCGA, PanCancer Atlas)
16 were obtained from cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>). This TCGA study includes six
17 breast cancer types as follows: Invasive Ductal Carcinoma (n=780); Invasive Lobular
18 Carcinoma (n=201); Invasive Carcinoma not otherwise specified (NOS, n=77); Invasive Mixed
19 Mucinous Carcinoma (n=17); Metaplastic Breast Cancer (n=8), and Invasive Breast Carcinoma
20 (n=1), the latter type was excluded from the analysis due to data unavailability. All transcripts
21 were ordered according to the Spearman correlation value with co-expressed *CASR* and sorted
22 by cancer type.

31 **Statistics**

32 Data are presented as the mean + standard deviation of the mean (SD) of at least three
33 independent experiments. Blots were scanned at 300 dpi (dots per inch), background was
34 subtracted, and densitometric quantitation of western blots was performed with ImageJ
35 software. Statistical analysis was performed with version 6.0 GraphPad Prism software
36 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Statistical tests are indicated in the Figure
37 Legends. *P* <0.05 was considered a statistically significant difference.

46 **RESULTS**

47 **CaSR mutants identified in breast cancer patients differ in their ability to stimulate Rac** 48 **but not ERK**

49 CaSR was identified as a mutated GPCR in cancer (O'Hayre et al., 2013). The COSMIC Cancer
50 Genomics Database registers 1,012 mutations in the *CASR* gene (Fig. 1A)
51 (https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=CASR_ENST00000639785#distribution), 32 of these in breast cancer patients (Fig. 1B). Point mutations that change the CaSR
52 primary sequence are distributed throughout the extracellular, transmembrane, and intracellular
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 regions of this receptor, which is a constitutive homodimer (Fig. 1C). Recent structural analysis
2 of CaSR indicates that mutations in the extracellular Venus Flytrap domains affect agonist
3 binding, whereas those in the 7-helix transmembrane domain might interfere on the
4 conformational changes that bring CaSR monomers closer during agonist-elicited activation,
5 affecting its signaling properties (Ling et al., 2021; Wen et al., 2021). Although the oncogenic
6 impact of CaSR mutants found in breast cancer patients has not been characterized, we
7 hypothesized that their signaling properties are likely affected by non-synonymous mutations
8 that change its membrane or intracellular sequences. Therefore, we studied the signaling
9 properties of CaSR mutants with single amino acid substitutions in the first intracellular loop
10 (CaSR N639K), the fourth transmembrane domain (CaSR T732A), or the carboxyl-terminal
11 region (CaSR R886Q, and CaSR V894I), as indicated in one of the subunits of the CaSR dimer
12 shown in Figure 1C (Protein Data Bank, 7DTV, (Ling et al., 2021)). All were expressed at
13 similar levels as wild type CaSR and had comparable electrophoretic properties under reducing
14 and non-reducing conditions in transfected HEK-293 cells (Fig. 1D).

15 Given that CaSR regulates breast cancer cell migration (Saidak et al., 2009), we aimed to
16 address the signaling mechanisms involved in this process. We hypothesized that CaSR
17 activates Rac via the PI3K/AKT/mTORC2 signaling pathway (Fig. 1E). We addressed this
18 possibility in HEK-293 cells expressing wild type CaSR as well as the indicated CaSR mutants,
19 and also compared their effects on ERK phosphorylation. To detect Rac activation, we used
20 GST-PAK-CRIB beads to isolate Rac-GTP, which was revealed by western blot (Hernandez-
21 Negrete et al., 2007). As depicted in Figure 1F-I, extracellular calcium + R568 stimulated CaSR
22 to activate Rac (Fig. 1F-I; Wt, left panels) and promoted ERK phosphorylation (Fig. 1F-I; Wt,
23 right panels). These effects were inhibited by NPS-2143 (Supplemental Fig. 1A), an allosteric
24 calcilytic characterized as a selective and potent CaSR antagonist (Nemeth et al., 2001). CaSR
25 mutants exhibited differential abilities to stimulate Rac (Fig. 1F-I; Rac-GTP, left panels) but
26 were similarly effective on Erk phosphorylation (Fig. 1F-I; pERK, right panels). CaSR N639K
27 promoted the strongest effect on Rac (Fig. 1F), CaSR T732A was as effective as wild type
28 CaSR (Fig. 1G), whereas CaSR R886Q had slightly increased baseline levels but did not elicit
29 an agonist-dependent activation of Rac (Fig. 1H), despite that this mutant effectively activated
30 ERK (Fig. 1H; pERK, right). Finally, CaSR V894I showed higher baseline activity on Rac,
31 and exhibited a further increase when the receptor was stimulated (Fig. 1I). The CaSR mutants
32 that activated Rac involved mTOR in the pathway as evidenced by the inhibitory effect of
33 chronic rapamycin (Supplemental Fig. 1B-E).

Endogenous CaSR promotes Rac activation in MDA-MB-231 cells

1 To investigate how MDA-MB-231 cells migrate in response to stimulation of endogenous
2 CaSR (Hernandez-Bedolla et al., 2015), we first analyzed the effect of R568 plus extracellular
3 calcium on Rac activation in these cells. As depicted in Figure 2A, in the presence of R568, 1-
4 and 3-mM extracellular calcium promoted a significant increase in Rac activation. This
5 response was inhibited by NPS-2143 (Fig. 2B) and was attenuated in shRNA-CaSR
6 knockdown cells (Fig. 2C). These results confirmed the role of CaSR in the activation of Rac
7 in MDA-MB-231 cells. Consistent with a potential role of AKT in this pathway, CaSR
8 knockdown also prevented the activation of this serine/threonine kinase (Fig. 2C, third panel).
9 The effect of CaSR as a promoter of Rac activation was also observed in human microvascular
10 endothelial cells (HMEC) (Supplementary Fig. 2). Overall, our data indicate that endogenous
11 CaSR activates Rac in MDA-MB-231 and HMEC cells, as it does in transfected HEK-293
12 cells, suggesting a broad potential of CaSR to activate Rac-dependent cellular effects.

Endogenous CaSR promotes breast cancer cell migration

13 The metastatic behavior of breast cancer cells invading bone tissues is potentially linked to
14 CaSR-dependent cell migration (Liao et al., 2006a; Saidak et al., 2009). Thus, we initially
15 confirmed the role of CaSR in the chemotactic response of MDA-MB-231 cells to extracellular
16 calcium (Saidak et al., 2009); then we addressed the signaling mechanisms sustaining this
17 process. As shown in Figure 2D, MDA-MB-231 cells demonstrated a significant chemotactic
18 response to extracellular calcium in the presence of R568; this response was diminished by
19 increasing the concentrations of NPS-2143. The chemotactic effect elicited by extracellular
20 calcium and R568 was effectively reduced by inhibiting Gi with pertussis toxin and PI3K with
21 wortmannin (Fig. 2E, PTX and Wm, respectively). We then tested whether the chemotactic
22 migration of MDA-MB-231 cells, elicited by CaSR, involved mTORC2-dependent signaling
23 pathways. As shown in Fig. 2F, chronic treatment with rapamycin inhibited the chemotactic
24 effect elicited by CaSR. Thus, our results are consistent with the idea that CaSR stimulates
25 MDA-MB-231 cell migration via a Gi/PI3K/mTORC2-dependent pathway.

CaSR regulates mTORC1 and mTORC2 signaling pathways in MDA-MB-231 cells

26 To characterize how CaSR activates mTORC1 complexes, we examined the effect of
27 extracellular calcium and R568 on the phosphorylation of S6 in MDA-MB-231 cells (Fig. 3A)
28 and of HEK-293 cells expressing CaSR (Supplementary Fig. 3A). S6 phosphorylation was
29 maximal at 30 min and decreased at 60 min of calcium stimulation. In addition, in MDA-MB-
30 231 cells, CaSR stimulated mTOR phosphorylation at Ser2448 (p-mTOR), which increased to
31 above baseline levels at 5 min and decreased at 60 min (Fig. 3A, pmTOR). The effect of CaSR

1 was prevented with NPS-2143 (Fig. 3B) as well as with Calhex (Supplementary Fig. 3B), a
2 CaSR negative allosteric modulator. CaSR-induced S6 phosphorylation was inhibited with
3 Gallein (Fig. 3C), a G $\beta\gamma$ -dependent signaling inhibitor (Casey et al., 2010; Tang et al., 2011),
4 wortmannin (Fig. 3D, Wm), and by a 1-h incubation with rapamycin (Fig. 3E and
5 Supplementary Fig. 3C). A similar effect was observed in the CaSR-dependent
6 phosphorylation of S6K (p-S6K, Supplementary Fig. 3C). Phosphorylation of S6, downstream
7 of mTORC1, was independent of the ERK pathway, as indicated by the lack of effect of U0126,
8 which prevented the activation of ERK1/2 (Supplementary Fig. 3D). Then, we examined
9 whether the activation of mTOR occurs via EGF-receptor transactivation, known to be relevant
10 in proliferative signaling by CaSR (MacLeod et al., 2004; Tfelt-Hansen et al., 2005; Tomlins
11 et al., 2005). As depicted in Supplementary Figure 3D, AG1478, an inhibitor of the EGF-
12 receptor tyrosine kinase, failed to suppress CaSR-dependent S6 phosphorylation; in contrast,
13 it inhibited AKT phosphorylation. To further confirm the ability of CaSR to stimulate the
14 mTOR pathway, we studied whether activating (CaSR Δ 895-1075) or dominant negative
15 (CaSR-R795W) CaSR mutants modulate mTOR signaling according to their phenotype (Bai
16 et al., 1996; Bai et al., 1999; Lienhardt et al., 2000). As shown in Supplementary Figure 3E,
17 the phosphorylation of S6 (pS6) and mTOR at Ser2448 (pmTOR) were increased by
18 extracellular calcium in cells expressing the CaSR-activating Δ 895-1075 mutant. In contrast,
19 the dominant negative CaSR-R795W mutant reduced mTOR and S6 phosphorylation. Our
20 results indicate that CaSR activates mTORC1.

21
22 Then we characterized the activation of mTORC2 as an effector of CaSR by assessing
23 the phosphorylation of AKT at Ser473 (Fig. 4A) (Sarbasov et al., 2005). This mTOR signaling
24 complex is characterized by the presence of Rictor and its resistance to acute inhibition by
25 rapamycin; although chronic treatment with rapamycin prevents its assembly and has been
26 utilized to address its functions (Sarbasov et al., 2006). CaSR promoted AKT phosphorylation
27 (Fig. 4B and Supplementary Fig. 3D, F), which was attenuated with NPS-2143 (Fig. 4C and
28 Supplementary Fig. 3F), Calhex (Supplementary Fig. 3F), Gallein (Fig. 4D), and wortmannin
29 (Fig. 4E, Wm), indicating the participation of G $\beta\gamma$ and PI3K in the activation of mTORC2 by
30 CaSR. As presented in Figure 4F, CaSR promoted the phosphorylation of AKT and of PKC at
31 5 and 10 min of stimulation. In both cases, the effect was inhibited in cells pre-incubated for
32 24 h with rapamycin, revealing the involvement of mTORC2 in this pathway (Sarbasov et al.,
33 2006), and further confirming that mTORC2 is an effector of CaSR. As shown previously,
34 CaSR knockdown experiments were also consistent with the idea that CaSR stimulates the
35 mTORC2 complex to activate AKT and Rac (Fig. 2C).

Rictor knockdown prevents CaSR-dependent Rac activation and cell migration in MDA-MB-231 cells

Initial results showing that CaSR-dependent cell migration and AKT activation in MDA-MB-231 cells were inhibited by chronic treatment with rapamycin (Figs. 2F and 4F) suggested that mTORC2 drives chemotactic pathways elicited by CaSR. Based on previous reports showing that Rac is activated downstream of mTORC2 (Hernandez-Negrete et al., 2007), we used Rictor-knockdown cells (Fig. 5A) to assess Rac activation by CaSR. Consistent with a central role of mTORC2 in CaSR-elicited signaling pathways driving cell migration, we found that CaSR-induced Rac-GTP (Fig. 5B) and cell migration, assessed as a chemotactic response (Fig. 5C), as well as in wound-healing assays (Fig. 5D), were notably reduced in Rictor-knockdown MDA-MB-231 cells (Figs. 5B-D). Taken together, our data indicate that CaSR, endogenously expressed in metastatic MDA-MB-231 cells, activates mTORC1 and mTORC2 complexes, promoting cell migration via G β γ -PI3K and, as indicated by the Rictor knockdown experiments, it involves mTORC2 in this process (Fig. 5E).

DISCUSSION

CaSR has been found to be mutated or overexpressed in cancer patients, indicating a potential contribution of this GPCR to cancer progression (Das et al., 2020; Iamartino et al., 2020). In the COSMIC database, this receptor was identified as one of the most frequently mutated GPCRs (O'Hayre et al., 2013). Here, we studied the signaling properties of four, not previously characterized, CaSR mutants originally identified in breast cancer patients (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>; (Tate et al., 2019)). Each had a single amino-acid substitution, one in the four transmembrane helix (CaSR T732A), other in the first intracellular loop (CaSR N639K) and two in the carboxyl-terminal intracellular region (CaSR R886Q and CaSR V894I). The functional consequences of these single amino acid changes are currently unknown but some possibilities might be speculated based on the recent structural analysis of dimeric CaSR which, upon agonist binding, forms a compact dimer that engages the intracellular regions (Ling et al., 2021; Wen et al., 2021). In the structure of CaSR, the intracellular domains appeared as disorganized regions (Ling et al., 2021; Wen et al., 2021), indicating its potential dynamism. Hypothetically, point mutations within these regions might have an impact on their conformational organization and their interactions with signaling transducers and effectors, affecting the signaling capacities of mutant receptors. To assess this possibility, we studied the effect of wild type and mutant CaSR on the Rac GTPase and ERK signaling pathways, known to be involved in cell migration and proliferation, and investigated

1 how wild type CaSR activates Rac and promotes cell migration. We found that mutant CaSR
2 receptors differed in the magnitude of their effect on Rac but were as effective as the wild type
3 CaSR to activate ERK. CaSR stimulated ERK via Gi, as indicated by the inhibitory effect of
4 PTX, which also prevented ERK activation by the four mutant CaSR (Supplementary Fig. 4).
5 This pathway was not sensitive to PKI (a competitive PKA inhibitor), indicating that in our
6 system CaSR was not coupled to Gs (Supplementary Figure 4F), as it has been suggested in
7 some cancer cells (Mamillapalli et al., 2008). Regarding Rac, we characterized that this small
8 GTP-binding protein is activated by CaSR via the mTORC2 pathway and found that
9 endogenous CaSR activates this pathway to guide MDA-MB-231 cells to migrate. Specifically,
10 we characterized mTORC2 as a signaling effector of CaSR required to activate Rac and
11 promote cell migration.
12
13
14
15
16
17
18
19

20 Knowing that Rac, a master regulator of the actin cytoskeleton at the leading edge of
21 migrating cells, can be activated via the PI3K/AKT/mTORC2 signaling pathway (Hanna and
22 El-Sibai, 2013; Lyda et al., 2019; Vazquez-Prado et al., 2016), we analyzed whether this
23 pathway mediates the activation of Rac by wild type CaSR and CaSR mutants. CaSR mutants
24 differed in the magnitude of their effects on Rac. CaSR N639K was the most effective activator
25 of Rac, followed by CaSR T732A, which was as effective as wild type CaSR, whereas agonist-
26 stimulated CaSR R886Q was unable to activate Rac, and CaSR V894I promoted constitutive
27 Rac activation. However, because these mutants, as well as the wild type receptor, were
28 similarly effective in promoting the phosphorylation of ERK and S6, these results indicate that
29 CaSR mutants acquire differential properties to stimulate the mTORC2/Rac pathway. CaSR
30 uses Gβγ as the main transducer to activate this pathway, as indicated by the inhibitory effect
31 of Gallein. The Gβγ heterodimers implicated in this pathway are likely released from Gi, as
32 shown by the inhibitory effect of PTX. In breast cancer patients, the signaling repertoire of the
33 PI3K/mTOR pathway is well expressed and some of its components exhibit a positive
34 correlation with *CASR*, suggesting that CaSR might activate this pathway within the tumor
35 microenvironment (Supplementary Fig. 5).
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 Wild type and mutant CaSR receptors activate mTORC1 and mTORC2, as indicated
50 by the phosphorylation of S6 and AKT, *bona fide* readouts of these pathways (Arvisais et al.,
51 2006; Dada et al., 2008; Hou and Klann, 2004; Huang and Fingar, 2014; Zhang et al., 2007).
52 Additionally, S6 phosphorylation was inhibited by acute incubation with rapamycin, which
53 under these conditions specifically inhibits mTORC1 (Bracho-Valdes et al., 2011; Liu and
54 Sabatini, 2020). CaSR proliferative pathways are elicited via the transactivation of EGFR,
55 however mTORC1 pathway does not involve EGFR transactivation because AG1478 only
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 inhibited EGF signaling but not signaling elicited by CaSR (El Hiani et al., 2009; Yano S,
2 2004). In addition, CaSR promoted the phosphorylation of mTOR at Ser2448 (p-mTOR,
3 Supplementary Figure 3C), a post-translational modification that fine-tunes the regulatory loop
4 by S6K (Arvisais et al., 2006; Reynolds et al., 2002). Regarding mTORC2 activation by CaSR,
5 our findings extend the previously demonstrated role of mTORC2 as an effector of CaSR,
6 promoting osteoblast differentiation and survival (Rybchyn et al., 2019). This pathway appears
7 to also be relevant in other cancer cells, such as gastric cancer cells, in which NPS-2143 inhibits
8 AKT and mTOR phosphorylation (Zong-Lin Zhang, 2020). The identification of mTORC2 as
9 an effector in CaSR-dependent cell migration was confirmed in Rictor-knockdown cells, which
10 exhibited reduced activation of Rac and cell migration in the absence of mTORC2, a complex
11 that integrates Rictor as an essential component (Oh and Jacinto, 2011; Sarbassov et al., 2006;
12 Xu et al., 2014). Furthermore, our findings showing that CaSR activates Rac via mTOR
13 indicate the potential involvement of a RacGEF as an effector of mTOR, acting downstream
14 of CaSR. A potential candidate for participation in this pathway is P-Rex1, a RacGEF that
15 directly interacts with mTOR and which has been proposed as an effector of mTORC2
16 (Hernandez-Negrete et al., 2007). Interestingly, this GEF is a direct effector of G $\beta\gamma$ (Welch et
17 al., 2002), which also interacts with mTOR (Robles-Molina et al., 2014). Altogether, our results
18 indicate that CaSR promotes breast cancer cell migration via the G $\beta\gamma$ /PI3K/AKT/mTOR
19 pathway (Fig. 5E).
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 **CONCLUSION**

37 CaSR mutants identified in breast cancer patients exhibit differential abilities to activate Rac
38 but were similarly effective to activate ERK, indicating that some of these mutants display
39 some biased signaling. In MDA-MB-231 cells, endogenously expressed CaSR promotes cell
40 migration via a G $\beta\gamma$ /PI3K/AKT/mTOR /Rac signaling pathway.
41
42
43
44
45
46

47 **Acknowledgments**

48 We acknowledge the technical assistance provided by Estanislao Escobar-Islas, Jaime Estrada-
49 Trejo, Israel Valencia-Martínez and David Pérez. The authors express their gratitude to Maggie
50 Brunner, MA, for editorial/style corrections. The authors declare no conflict of interest. This
51 work was supported by grants from CONACyT (240119 and CF-2019-1794 to G.R.C.) and
52 (286274 to J.V.P.), Fondo Sep-CINVESTAV (FidSC2018/3 to G.R.C.). L.B. O-C, J.E. del-R-
53 R, I. G-J, C. Z-B, Y.M. B-N, J. J. H-M, I. R-R, M.A, H-B; and A.P. R-I are and were graduate
54 students supported by CONACyT fellowships.
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

The authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: L.B. O-C; J.E. del-R-R; I. R-R; J.V.P., and G.R.C. Supervised the study: G.R.C. Performed the experiments: L.B. O-C; J.E. del-R-R; C. Z-B; I. G-J; I. R-R; M.A. H-B; A.P. R-I, J. J.H-M, and M.V-S. Performed data mining: Y.M. B-N. Analyzed the data: L.B. O-C; J.E. del-R-R; C. Z-B; I.G-J; I.R-R, and M.A.H-B. Wrote the paper: L.B. O-C; J.V.P. and G.R.C. All authors reviewed and approved the final manuscript.

REFERENCES

- Aguirre A, Gonzalez A, Planell JA and Engel E (2010) Extracellular calcium modulates in vitro bone marrow-derived Flk-1+ CD34+ progenitor cell chemotaxis and differentiation through a calcium-sensing receptor. *Biochemical and biophysical research communications* **393**(1): 156-161.
- Arvaisis EW, Romanelli A, Hou X and Davis JS (2006) AKT-independent phosphorylation of TSC2 and activation of mTOR and ribosomal protein S6 kinase signaling by prostaglandin F2alpha. *The Journal of biological chemistry* **281**(37): 26904-26913.
- Bai M, Quinn S, Trivedi S, Kifor O, Pearce SH, Pollak MR, Krapcho K, Hebert SC and Brown EM (1996) Expression and characterization of inactivating and activating mutations in the human Ca²⁺-sensing receptor. *The Journal of biological chemistry* **271**(32): 19537-19545.
- Bai M, Trivedi S, Kifor O, Quinn SJ and Brown EM (1999) Intermolecular interactions between dimeric calcium-sensing receptor monomers are important for its normal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(6): 2834-2839.
- Bhagavathula N, Kelley EA, Reddy M, Nerusu KC, Leonard C, Fay K, Chakrabarty S and Varani J (2005) Upregulation of calcium-sensing receptor and mitogen-activated protein kinase signalling in the regulation of growth and differentiation in colon carcinoma. *Br J Cancer* **93**(12): 1364-1371.
- Bhaskar PT and Hay N (2007) The two TORCs and Akt. *Dev Cell* **12**(4): 487-502.
- Boudot C, Henaut L, Thiem U, Geraci S, Galante M, Saldanha P, Saidak Z, Six I, Clezardin P, Kamel S and Mentaverri R (2017) Overexpression of a functional calcium-sensing receptor dramatically increases osteolytic potential of MDA-MB-231 cells in a mouse model of bone metastasis through epiregulin-mediated osteoprotegerin downregulation. *Oncotarget* **8**(34): 56460-56472.
- Bracho-Valdes I, Moreno-Alvarez P, Valencia-Martinez I, Robles-Molina E, Chavez-Vargas L and Vazquez-Prado J (2011) mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused. *IUBMB Life* **63**(10): 896-914.
- Brown EM and MacLeod RJ (2001) Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev* **81**(1): 239-297.
- Carretero-Ortega J, Walsh CT, Hernandez-Garcia R, Reyes-Cruz G, Brown JH and Vazquez-Prado J (2010) Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex-1), a guanine nucleotide exchange factor for Rac, mediates angiogenic responses to stromal cell-derived factor-1/chemokine stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL-12) linked to Rac activation, endothelial cell migration, and in vitro angiogenesis. *Mol Pharmacol* **77**(3): 435-442.
- Casey LM, Pistner AR, Belmonte SL, Migdalovich D, Stolpnik O, Nwakanma FE, Vorobiof G, Dunaevsky O, Matavel A, Lopes CM, Smrcka AV and Blaxall BC (2010) Small molecule disruption of G beta gamma signaling inhibits the progression of heart failure. *Circ Res* **107**(4): 532-539.
- Cervantes-Villagrana RD, Adame-Garcia SR, Garcia-Jimenez I, Color-Aparicio VM, Beltran-Navarro YM, Konig GM, Kostenis E, Reyes-Cruz G, Gutkind JS and Vazquez-Prado J (2019)

- 1 Gbetagamma signaling to the chemotactic effector P-REX1 and mammalian cell migration is
2 directly regulated by Galphaq and Galpha13 proteins. *J Biol Chem* **294**(2): 531-546.
- 3 Cervantes-Villagrana RD, Beltran-Navarro YM, Garcia-Jimenez I, Adame-Garcia SR, Olguin-Olguin
4 A, Reyes-Cruz G and Vazquez-Prado J (2021) Gbetagamma recruits and activates P-Rex1 via
5 two independent binding interfaces. *Biochem Biophys Res Commun* **539**: 20-27.
- 6 Dada S, Demartines N and Dormond O (2008) mTORC2 regulates PGE2-mediated endothelial cell
7 survival and migration. *Biochemical and biophysical research communications* **372**(4): 875-
8 879.
- 9 Das S, Clezardin P, Kamel S, Brazier M and Mentaverri R (2020) The CaSR in Pathogenesis of Breast
10 Cancer: A New Target for Early Stage Bone Metastases. *Frontiers in oncology* **10**: 69.
- 11 Davey AE, Leach K, Valant C, Conigrave AD, Sexton PM and Christopoulos A (2012) Positive and
12 negative allosteric modulators promote biased signaling at the calcium-sensing receptor.
13 *Endocrinology* **153**(3): 1232-1241.
- 14 El Hiani Y, Lehen'kyi V, Ouadid-Ahidouch H and Ahidouch A (2009) Activation of the calcium-
15 sensing receptor by high calcium induced breast cancer cell proliferation and TRPC1 cation
16 channel over-expression potentially through EGFR pathways. *Arch Biochem Biophys* **486**(1):
17 58-63.
- 18 Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson
19 E, Cerami E, Sander C and Schultz N (2013) Integrative analysis of complex cancer genomics
20 and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* **6**(269): p11.
- 21 Hanna S and El-Sibai M (2013) Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cellular signalling*
22 **25**(10): 1955-1961.
- 23 Hauache OM, Hu J, Ray K, Xie R, Jacobson KA and Spiegel AM (2000) Effects of a calcimimetic
24 compound and naturally activating mutations on the human Ca²⁺ receptor and on Ca²⁺
25 receptor/metabotropic glutamate chimeric receptors. *Endocrinology* **141**(11): 4156-4163.
- 26 Hernandez-Bedolla MA, Carretero-Ortega J, Valadez-Sanchez M, Vazquez-Prado J and Reyes-Cruz G
27 (2015) Chemotactic and proangiogenic role of calcium sensing receptor is linked to secretion
28 of multiple cytokines and growth factors in breast cancer MDA-MB-231 cells. *Biochimica et*
29 *biophysica acta* **1853**(1): 166-182.
- 30 Hernandez-Negrete I, Carretero-Ortega J, Rosenfeldt H, Hernandez-Garcia R, Calderon-Salinas JV,
31 Reyes-Cruz G, Gutkind JS and Vazquez-Prado J (2007) P-Rex1 links mammalian target of
32 rapamycin signaling to Rac activation and cell migration. *The Journal of biological chemistry*
33 **282**(32): 23708-23715.
- 34 Hou L and Klann E (2004) Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of
35 rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-
36 term depression. *J Neurosci* **24**(28): 6352-6361.
- 37 Houslay DM, Anderson KE, Chessa T, Kulkarni S, Fritsch R, Downward J, Backer JM, Stephens LR
38 and Hawkins PT (2016) Coincident signals from GPCRs and receptor tyrosine kinases are
39 uniquely transduced by PI3Kbeta in myeloid cells. *Sci Signal* **9**(441): ra82.
- 40 Huang K and Fingar DC (2014) Growing knowledge of the mTOR signaling network. *Semin Cell Dev*
41 *Biol* **36**: 79-90.
- 42 Iamartino L, Elajnaf T, Gall K, David J, Manhardt T, Heffeter P, Grusch M, Derdak S, Baumgartner-
43 Parzer S, Schepelmann M and Kallay E (2020) Effects of pharmacological calcimimetics on
44 colorectal cancer cells over-expressing the human calcium-sensing receptor. *Biochimica et*
45 *biophysica acta Molecular cell research* **1867**(12): 118836.
- 46 Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A and Hall MN (2004) Mammalian TOR
47 complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* **6**(11):
48 1122-1128.
- 49 Joeckel E, Haber T, Prawitt D, Junker K, Hampel C, Thuroff JW, Roos FC and Brenner W (2014) High
50 calcium concentration in bones promotes bone metastasis in renal cell carcinomas expressing
51 calcium-sensing receptor. *Mol Cancer* **13**: 42.
- 52 Kim W, Takyar FM, Swan K, Jeong J, VanHouten J, Sullivan C, Dann P, Yu H, Fiaschi-Taesch N,
53 Chang W and Wysolmerski J (2016) Calcium-Sensing Receptor Promotes Breast Cancer by
54 Stimulating Intracrine Actions of Parathyroid Hormone-Related Protein. *Cancer research*
55 **76**(18): 5348-5360.

- 1 Liang CC, Park AY and Guan JL (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method
2 for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* **2**(2): 329-333.
- 3 Liao J, Schneider A, Datta NS and McCauley LK (2006a) Extracellular calcium as a candidate mediator
4 of prostate cancer skeletal metastasis. *Cancer Res* **66**(18): 9065-9073.
- 5 Liao J, Schneider A, Datta NS and McCauley LK (2006b) Extracellular calcium as a candidate mediator
6 of prostate cancer skeletal metastasis. *Cancer research* **66**(18): 9065-9073.
- 7 Lienhardt A, Garabedian M, Bai M, Sinding C, Zhang Z, Lagarde JP, Boulesteix J, Rigaud M, Brown
8 EM and Kottler ML (2000) A large homozygous or heterozygous in-frame deletion within the
9 calcium-sensing receptor's carboxylterminal cytoplasmic tail that causes autosomal dominant
10 hypocalcemia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **85**(4): 1695-1702.
- 11 Ling S, Shi P, Liu S, Meng X, Zhou Y, Sun W, Chang S, Zhang X, Zhang L, Shi C, Sun D, Liu L and
12 Tian C (2021) Structural mechanism of cooperative activation of the human calcium-sensing
13 receptor by Ca(2+) ions and L-tryptophan. *Cell Res* **31**(4): 383-394.
- 14 Liu GY and Sabatini DM (2020) mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev*
15 *Mol Cell Biol* **21**(4): 183-203.
- 16 Lyda JK, Tan ZL, Rajah A, Momi A, Mackay L, Brown CM and Khadra A (2019) Rac activation is
17 key to cell motility and directionality: An experimental and modelling investigation. *Comput*
18 *Struct Biotechnol J* **17**: 1436-1452.
- 19 MacLeod RJ, Yano S, Chattopadhyay N and Brown EM (2004) Extracellular calcium-sensing receptor
20 transactivates the epidermal growth factor receptor by a triple-membrane-spanning signaling
21 mechanism. *Biochemical and biophysical research communications* **320**(2): 455-460.
- 22 Mamillapalli R, VanHouten J, Zawalich W and Wysolmerski J (2008) Switching of G-protein usage by
23 the calcium-sensing receptor reverses its effect on parathyroid hormone-related protein
24 secretion in normal versus malignant breast cells. *The Journal of biological chemistry* **283**(36):
25 24435-24447.
- 26 Mayr B, Glauco M and Schofl C (2016) Activating Calcium-Sensing Receptor Mutations: Prospects
27 for Future Treatment with Calcilytics. *Trends Endocrinol Metab* **27**(9): 643-652.
- 28 Mihai R, Stevens J, McKinney C and Ibrahim NB (2006) Expression of the calcium receptor in human
29 breast cancer--a potential new marker predicting the risk of bone metastases. *Eur J Surg Oncol*
30 **32**(5): 511-515.
- 31 O'Hayre M, Vazquez-Prado J, Kufareva I, Stawiski EW, Handel TM, Seshagiri S and Gutkind JS (2013)
32 The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer.
33 *Nat Rev Cancer* **13**(6): 412-424.
- 34 Oh WJ and Jacinto E (2011) mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle* **10**(14): 2305-2316.
- 35 Olszak IT, Poznansky MC, Evans RH, Olson D, Kos C, Pollak MR, Brown EM and Scadden DT (2000)
36 Extracellular calcium elicits a chemokinetic response from monocytes in vitro and in vivo. *J*
37 *Clin Invest* **105**(9): 1299-1305.
- 38 Pollak MR, Brown EM, Chou YH, Hebert SC, Marx SJ, Steinmann B, Levi T, Seidman CE and
39 Seidman JG (1993) Mutations in the human Ca(2+)-sensing receptor gene cause familial
40 hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Cell* **75**(7): 1297-1303.
- 41 Reyes-Cruz G, Hu J, Goldsmith PK, Steinbach PJ and Spiegel AM (2001) Human Ca(2+) receptor
42 extracellular domain. Analysis of function of lobe I loop deletion mutants. *The Journal of*
43 *biological chemistry* **276**(34): 32145-32151.
- 44 Reynolds THt, Bodine SC and Lawrence JC, Jr. (2002) Control of Ser2448 phosphorylation in the
45 mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. *The Journal of biological*
46 *chemistry* **277**(20): 17657-17662.
- 47 Riccardi D and Valenti G (2016) Localization and function of the renal calcium-sensing receptor. *Nat*
48 *Rev Nephrol* **12**(7): 414-425.
- 49 Robles-Molina E, Dionisio-Vicuna M, Guzman-Hernandez ML, Reyes-Cruz G and Vazquez-Prado J
50 (2014) Gbetagamma interacts with mTOR and promotes its activation. *Biochemical and*
51 *biophysical research communications* **444**(2): 218-223.
- 52 Rybchyn MS, Islam KS, Brennan-Speranza TC, Cheng Z, Brennan SC, Chang W, Mason RS and
53 Conigrave AD (2019) Homer1 mediates CaSR-dependent activation of mTOR complex 2 and
54 initiates a novel pathway for AKT-dependent beta-catenin stabilization in osteoblasts. *The*
55 *Journal of biological chemistry* **294**(44): 16337-16350.
- 56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 Saidak Z, Boudot C, Abdoune R, Petit L, Brazier M, Mentaverri R and Kamel S (2009) Extracellular
2 calcium promotes the migration of breast cancer cells through the activation of the calcium
3 sensing receptor. *Exp Cell Res* **315**(12): 2072-2080.
- 4 Sanders JL, Chattopadhyay N, Kifor O, Yamaguchi T, Butters RR and Brown EM (2000) Extracellular
5 calcium-sensing receptor expression and its potential role in regulating parathyroid hormone-
6 related peptide secretion in human breast cancer cell lines. *Endocrinology* **141**(12): 4357-4364.
- 7 Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P and
8 Sabatini DM (2004) Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive
9 and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* **14**(14): 1296-1302.
- 10 Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL and Sabatini DM
11 (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*
12 **22**(2): 159-168.
- 13 Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM and Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of
14 Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**(5712): 1098-1101.
- 15 Saxton RA and Sabatini DM (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **169**(2):
16 361-371.
- 17 Stephens LR, Eguinoa A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Cooke F, Coadwell J, Smrcka AS, Thelen M,
18 Cadwallader K, Tempst P and Hawkins PT (1997) The G beta gamma sensitivity of a PI3K is
19 dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* **89**(1): 105-114.
- 20 Tang X, Sun Z, Runne C, Madsen J, Domann F, Henry M, Lin F and Chen S (2011) A critical role of
21 Gbetagamma in tumorigenesis and metastasis of breast cancer. *The Journal of biological*
22 *chemistry* **286**(15): 13244-13254.
- 23 Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, Boutselakis H, Cole CG, Creatore C,
24 Dawson E, Fish P, Harsha B, Hathaway C, Jupe SC, Kok CY, Noble K, Ponting L, Ramshaw
25 CC, Rye CE, Speedy HE, Stefancsik R, Thompson SL, Wang S, Ward S, Campbell PJ and
26 Forbes SA (2019) COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic acids*
27 *research* **47**(D1): D941-D947.
- 28 Tennakoon S, Aggarwal A and Kallay E (2015) The calcium-sensing receptor and the hallmarks of
29 cancer. *Biochimica et biophysica acta* **2015**.
- 30 Tfelt-Hansen J, Yano S, John Macleod R, Smajilovic S, Chattopadhyay N and Brown EM (2005) High
31 calcium activates the EGF receptor potentially through the calcium-sensing receptor in Leydig
32 cancer cells. *Growth Factors* **23**(2): 117-123.
- 33 Tomlins SA, Bollinger N, Creim J and Rodland KD (2005) Cross-talk between the calcium-sensing
34 receptor and the epidermal growth factor receptor in Rat-1 fibroblasts. *Exp Cell Res* **308**(2):
35 439-445.
- 36 Vazquez-Prado J, Bracho-Valdes I, Cervantes-Villagrana RD and Reyes-Cruz G (2016) Gbetagamma
37 Pathways in Cell Polarity and Migration Linked to Oncogenic GPCR Signaling: Potential
38 Relevance in Tumor Microenvironment. *Mol Pharmacol* **90**(5): 573-586.
- 39 Welch HC, Coadwell WJ, Ellson CD, Ferguson GJ, Andrews SR, Erdjument-Bromage H, Tempst P,
40 Hawkins PT and Stephens LR (2002) P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- and Gbetagamma-regulated
41 guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell* **108**(6): 809-821.
- 42 Wen T, Wang Z, Chen X, Ren Y, Lu X, Xing Y, Lu J, Chang S, Zhang X, Shen Y and Yang X (2021)
43 Structural basis for activation and allosteric modulation of full-length calcium-sensing receptor.
44 *Sci Adv* **7**(23).
- 45 Wullschleger S, Loewith R and Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**(3):
46 471-484.
- 47 Xu K, Liu P and Wei W (2014) mTOR signaling in tumorigenesis. *Biochimica et biophysica acta*
48 **1846**(2): 638-654.
- 49 Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Kifor O, Butters RR, Jr., Sugimoto T and Brown EM (1998a) Mouse
50 osteoblastic cell line (MC3T3-E1) expresses extracellular calcium (Ca²⁺o)-sensing receptor
51 and its agonists stimulate chemotaxis and proliferation of MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*
52 **13**(10): 1530-1538.
- 53 Yamaguchi T, Kifor O, Chattopadhyay N, Bai M and Brown EM (1998b) Extracellular calcium
54 (Ca²⁺o)-sensing receptor in a mouse monocyte-macrophage cell line (J774): potential mediator
55 of the actions of Ca²⁺o on the function of J774 cells. *J Bone Miner Res* **13**(9): 1390-1397.
- 56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Yano S MR, Chattopadhyay N, Tfelt-Hansen J, Kifor O, Butters RR, Brown EM. (2004) Calcium-
 2 sensing receptor activation stimulates parathyroid hormone-related protein secretion in prostate
 3 cancer cells: role of epidermal growth factor receptor transactivation. *Bone* **35**(3): 664-672.
 4 Zavala-Barrera C, Del-Rio-Robles JE, Garcia-Jimenez I, Egusquiza-Alvarez CA, Hernandez-
 5 Maldonado JP, Vazquez-Prado J and Reyes-Cruz G (2021) The calcium sensing receptor
 6 (CaSR) promotes Rab27B expression and activity to control secretion in breast cancer cells.
 7 *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1868**(7): 119026.
 8 Zhang H, Bajraszewski N, Wu E, Wang H, Moseman AP, Dabora SL, Griffin JD and Kwiatkowski DJ
 9 (2007) PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR. *J Clin*
 10 *Invest* **117**(3): 730-738.
 11 Zong-Lin Zhang Z-RL, Jun-Sheng Li & Su-Rong Wang (2020) Calcium-sensing receptor antagonist
 12 NPS-2143 suppresses proliferation and invasion of gastric cancer cells. *Cancer Gene Ther* **27**:
 13 *Cancer Gene Ther*.
 14
 15
 16
 17
 18

19 Figure Legends

20
 21 **Fig. 1 CaSR mutants identified in breast cancer patients differ in their ability to stimulate**
 22 **Rac but not ERK. CaSR mutations detected in general (A) and in breast cancer patients**
 23 **(B), according to the COSMIC database. (C) Structure of CaSR dimers.** Human Calcium-
 24 Sensing Receptor in the active state (Ling et al., 2021), corresponds to the 7DTV structure in
 25 the Protein Data Bank, the carboxyl terminal region was introduced in the model. The position
 26 of single amino acid changes in the CaSR mutants studied in this work is shown in the right
 27 CaSR monomer. **(D) Expression of wild type and mutant CaSR.** Electrophoretic mobility of
 28 wild type and mutant CaSR expressed in HEK-293. Immunoblots were revealed with the anti-
 29 CaSR ADD (1:15,000) monoclonal antibody. Cells transfected with empty vector served as
 30 control. **(E) Hypothetical model showing CaSR signaling to Rac-GTPase via mTORC2.**
 31 **(F-I) CaSR mutants identified in breast cancer patients activate Rac-1 GTPase and the**
 32 **ERK pathway.** Rac-1-GTP was isolated by pull-down with GST-PAK-CRIB-domain beads
 33 using lysates from HEK-293 cells transiently transfected with wild type CaSR or the indicated
 34 mutant. Cells were stimulated with R568+extracellular calcium for 3 min, and isolated Rac-1-
 35 GTP was revealed by western blot. Graphs represent three independent experiments.
 36 **Comparative analyses of Rac-1 activation by wild type and mutant CaSR (F-I, left**
 37 **panels). (F) Wild type CaSR vs N639K; * p=0.0100, # p<0.05; (unpaired Student t test; n=3).**
 38 **(G) Wild type CaSR vs T732A; * p=0.0226, # p=0.0237; (unpaired Student t test; n=3). (H)**
 39 **Wild type CaSR vs R886Q; ** p=0.0067, # p=0.0256; (unpaired Student t test; n=3). (I) Wild**
 40 **type CaSR vs. V894I; * p=0.0232, * p=0.0339; (n=3). Comparative effect of wild type and**
 41 **CaSR mutants on ERK phosphorylation (F-I, right panels).** HEK-293 cells expressing wild
 42 type CaSR or the indicated CaSR mutants were stimulated or not with 1 μ M R-568 + 1.5 mM
 43 CaCl₂ for 3 min. Graph represents the densitometric analysis of ERK phosphorylation. Bars
 44 represent mean \pm standard deviation (SD). **(F) Wild type CaSR vs N639K; **** p<0.0001;**
 45 **(G) Wild type CaSR vs T732A; ** p= 0.0031, ** p= 0.0064; (H) Wild type CaSR vs R886Q;**
 46 ***** p = 0.0005, ** p= 0.0060; (I) Wild type CaSR vs. V894I; *** p= 0.0002, # p=0.0151;**
 47 **(unpaired Student t test; n=4).**
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54

55 **Fig. 2 Endogenous CaSR promotes Rac activation and cell migration in MDA-MB-231**
 56 **cells. (A) Effect of CaSR stimulation on Rac-1 activation.** MDA-MB-231 cells were
 57 stimulated for 10 min with R568+calcium and total cell lysates were used to isolate Rac-1-GTP
 58 with GST-PAK-CRIB beads. The fraction of active Rac was revealed by western blot. Bars
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65

1 represent mean \pm standard deviation (SD); * $p=0.0320$; (one-way ANOVA followed by Sidak's
2 test; $n=3$). **(B) NPS-2143 prevents CaSR-dependent Rac-1 activation.** Rac-1-GTP was
3 detected by pull-down assays using lysates from MDA-MB-231 cells pre-incubated or not with
4 5 or 10 μ M NPS-2143 before stimulation of CaSR. Bars represent mean \pm SD, ** $p=0.0022$,
5 ## $p=0.0032$; (one-way ANOVA followed by Fisher test; $n=3$). **(C) CaSR knockdown**
6 **prevents Rac-1 and AKT activation by R568+calcium.** Representative western blots
7 showing CaSR knockdown and its effect on the activation of Rac-1 and AKT. **(D) NPS-2143**
8 **prevents CaSR-dependent MDA-MB-231 cell migration.** Cells were incubated in Boyden
9 chambers to address the effect of extracellular calcium+R568 or NPS-2143 on CaSR-
10 dependent cell migration. Bars represent mean \pm standard deviation (SD), ** $p<0.01$, ###
11 $p<0.001$; (one-way ANOVA followed by Sidak's test; $n=3$). **(E) Effect of pertussis toxin**
12 **(PTX) and wortmannin (Wm) on CaSR-dependent migration of MDA-MB-231 cells.**
13 Graph represents mean \pm standard deviation (SD), * $p=0.0351$, # $p=0.0445$; (Student t test;
14 $n=3$). **(F) Effect of chronic treatment with rapamycin (40 ng/ml) on CaSR-dependent**
15 **MDA-MB-231 cell migration.** Graph represents mean values, normalized to cell migration
16 induced by fetal bovine serum (FBS); error bars represent SD, *** $p=0.001$; (one-way ANOVA
17 followed by Tukey's; $n=3$).
18
19
20
21
22
23
24

25 **Fig. 3 CaSR activates mTORC1 in MDA-MB-231 cells. (A) CaSR stimulates S6**
26 **phosphorylation.** MDA-MB-231 cells were stimulated for 10 min with R568+calcium at the
27 indicated times. EGF was used as positive control. Total cell lysates were utilized for western
28 blot analysis to reveal S6 phosphorylation, normalized to non-stimulated cells (NS) which was
29 considered 100%. Bars indicate mean \pm standard deviation (SD), * $p=0.0190$; (Student t test;
30 $n=3$). **(B) NPS-2143 calcilytic inhibits CaSR-dependent S6 phosphorylation in MDA-**
31 **MB231.** * $p=0.0247$, # $p=0.0141$, ## $p=0.0076$; data was analyzed by one-way ANOVA
32 followed by uncorrected Fisher; ($n=3$). **(C) Effect of Gallein on S6 phosphorylation**
33 **stimulated by R568+calcium.** Error bars indicate SD, ** $p=0.0096$, # $p=0.0241$; (unpaired
34 Student t test; $n=3$). **(D) Effect of wortmannin (Wm) on S6 phosphorylation stimulated by**
35 **CaSR in MDA-MB-231 cells.** Error bars indicate SD, * $p=0.04$; (one-way ANOVA followed
36 by Bonferroni; $n=3$). **(E) Effect of rapamycin on CaSR-induced S6 phosphorylation in**
37 **MDA-MB231 cells.** Bars represent mean \pm SD, ** $p=0.01$, ### $p<0.001$; (one-way ANOVA
38 followed by Tukey; $n=3$).
39
40
41
42
43
44
45

46 **Fig. 4 CaSR activates mTORC2 in MDA-MB-231 cells. (A) Hypothetical model of CaSR**
47 **signaling to mTORC2 and downstream kinases. (B) Effect of CaSR stimulation on AKT**
48 **phosphorylation in MDA-MB-231 cells.** Bars represent mean \pm standard deviation (SD), *
49 $p=0.0118$; (one-way ANOVA followed by Tukey; $n=3$). **(C) NPS-2143 calcilytic prevents**
50 **CaSR-dependent phosphorylation of AKT in MDA-MB231 cells.** Bars represent mean
51 \pm SD, * $p=0.0127$, & $p=0.0127$, ## $p=0.0033$, ### $p=0.0004$; (one-way ANOVA followed by
52 uncorrected Fisher; $n=3$). **(D) Effect of Gallein on AKT phosphorylation stimulated by**
53 **R568+calcium.** Bars indicate mean \pm SD, ** $p=0.0022$, # $p=0.0198$; (unpaired Student t test;
54 $n=3$). **(E) Effect of wortmannin (Wm) on AKT phosphorylation in MDA-MB-231 cells.**
55 Bars indicate mean \pm SD, * $p<0.05$, ## $p=0.007$; (one-way ANOVA followed by Bonferroni;
56 $n=3$). **(F) Effect of rapamycin on CaSR-induced AKT and PKC phosphorylation.** MDA-
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 MB-231 cells were incubated for 24 h with rapamycin before stimulation with R568+calcium
2 for 5 or 10 min. Cell lysates were analyzed by western blot to detect AKT and PKC
3 phosphorylation. Bars represent mean \pm SD, ** $p < 0.01$, # $p < 0.05$; (one-way ANOVA followed
4 by Bonferroni; $n=3$).
5
6

7 **Fig. 5. mTORC2 participates in MDA-MB-231 cell migration elicited by CaSR. (A)**
8 **Rictor-knockdown MDA-MB-231 cells.** To achieve Rictor knockdown, cells were infected
9 with lentiviral Rictor-shRNA. Bars represent mean \pm standard deviation (SD) of Rictor
10 expression (normalized to actin expression), **** $p < 0.0001$; (unpaired Student t test; $n=3$).
11 Anti-actin immunoblot served as loading control. **(B) Effect of CaSR on Rac activation in**
12 **control and Rictor-knockdown MDA-MB-231 cells.** Control and Rictor-knockdown cells
13 were stimulated for 10 min with R568+calcium, and active Rac (Rac GTP) was isolated from
14 cell lysates with GST-PAK-CRIB beads and revealed by western blot. Bars represent mean
15 \pm SD, *** $p=0.0009$, ## $p=0.0091$; (unpaired Student t test; $n=3$). **(C) Effect of Rictor-**
16 **knockdown on CaSR-dependent MDA-MB-231 cell migration.** Serum-starved Rictor-
17 **knockdown or control MDA-MB-231 breast cancer cells were stimulated with 2 mM**
18 **calcium+1 μ M R568 (+) for 6 h, or left in 0.25 mM calcium (-), EGF was used as control. Cell**
19 **migration was tested in Boyden chambers. A representative filter is shown. Bars represent**
20 **mean \pm SD, ** $p=0.005$; (one-way ANOVA followed by Tukey; $n=3$). **(D) Effect of Rictor-**
21 **knockdown on MDA-MB-231 cell migration in scratch assays.** Wound-closure experiments
22 were carried out with Rictor-knockdown and control MDA-MB-231 cells stimulated for 24 h
23 with 2 mM calcium + 1 μ M R568. Bars indicate mean \pm SD, * $p < 0.05$, # $p < 0.05$; (one-way
24 ANOVA followed Tukey's; $n=3$). **(E) Model depicting how CaSR drives cell migration via**
25 **the G β γ /PI3K/AKT/mTORC2/Rac signaling pathway.**
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65**

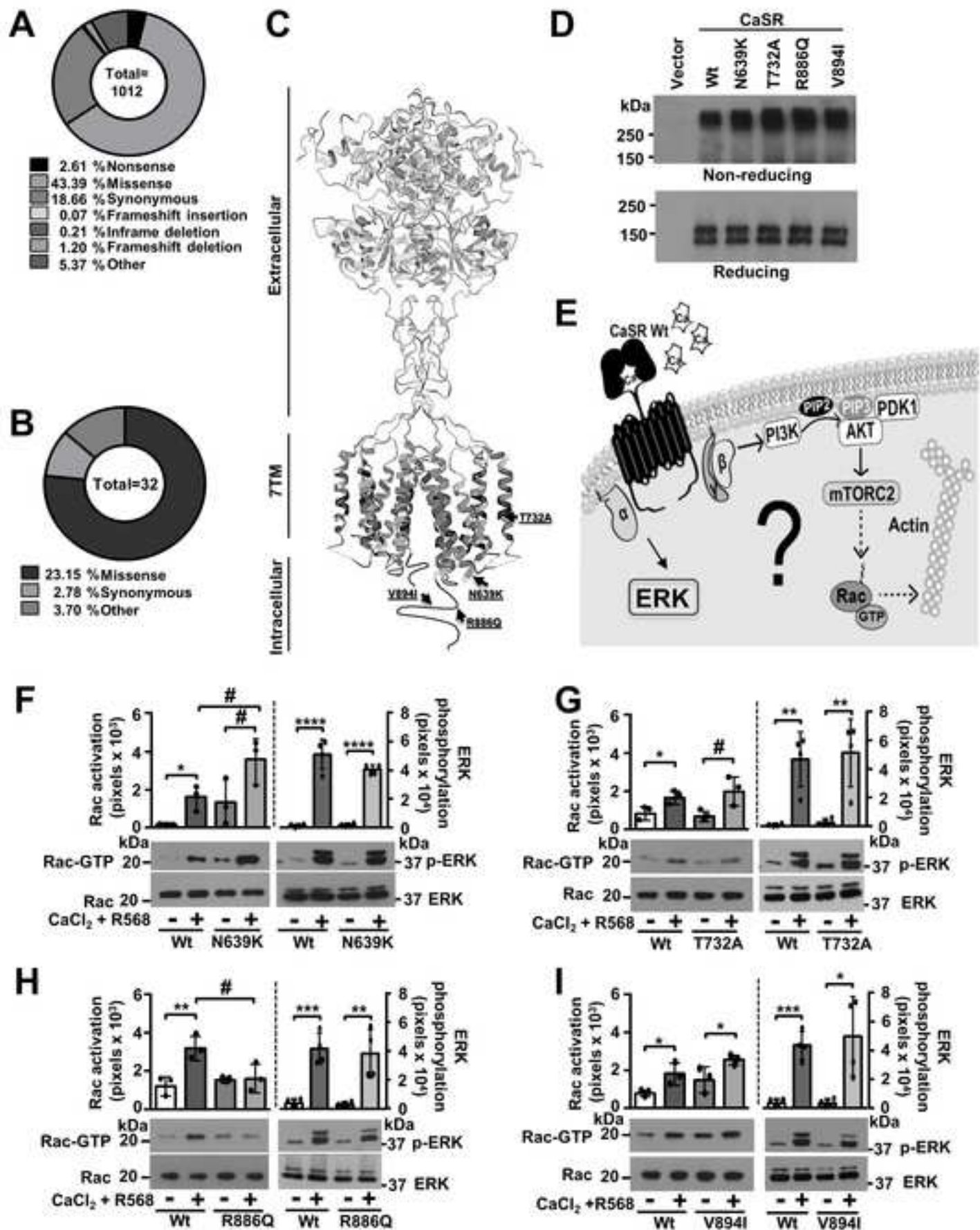


Fig 1. CaSR mutants identified in breast cancer patients differ in their ability to stimulate Rac but not ERK.

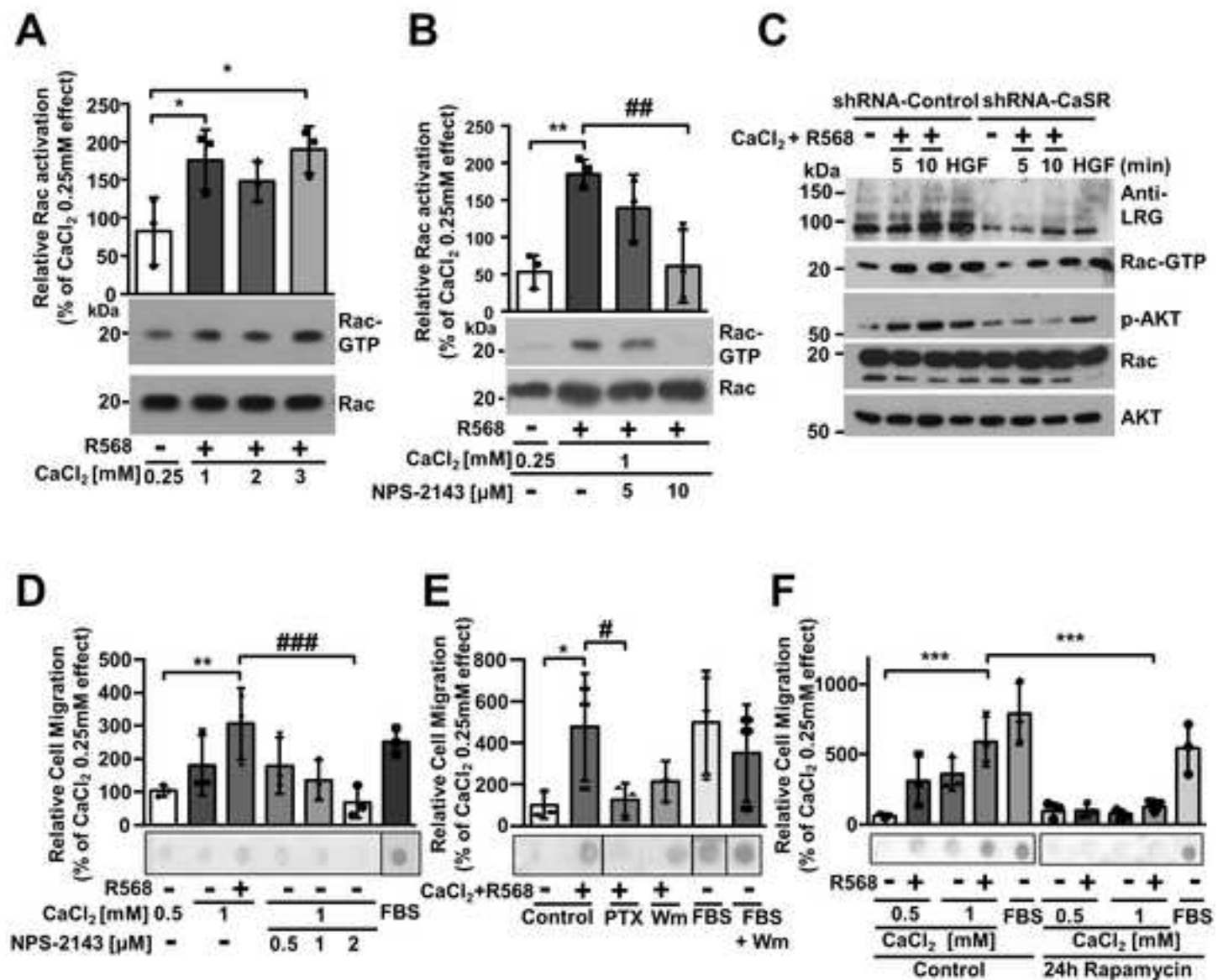


Fig 2. Endogenous CaSR promotes Rac activation and cell migration in MDA-MB-231 breast cancer cells .

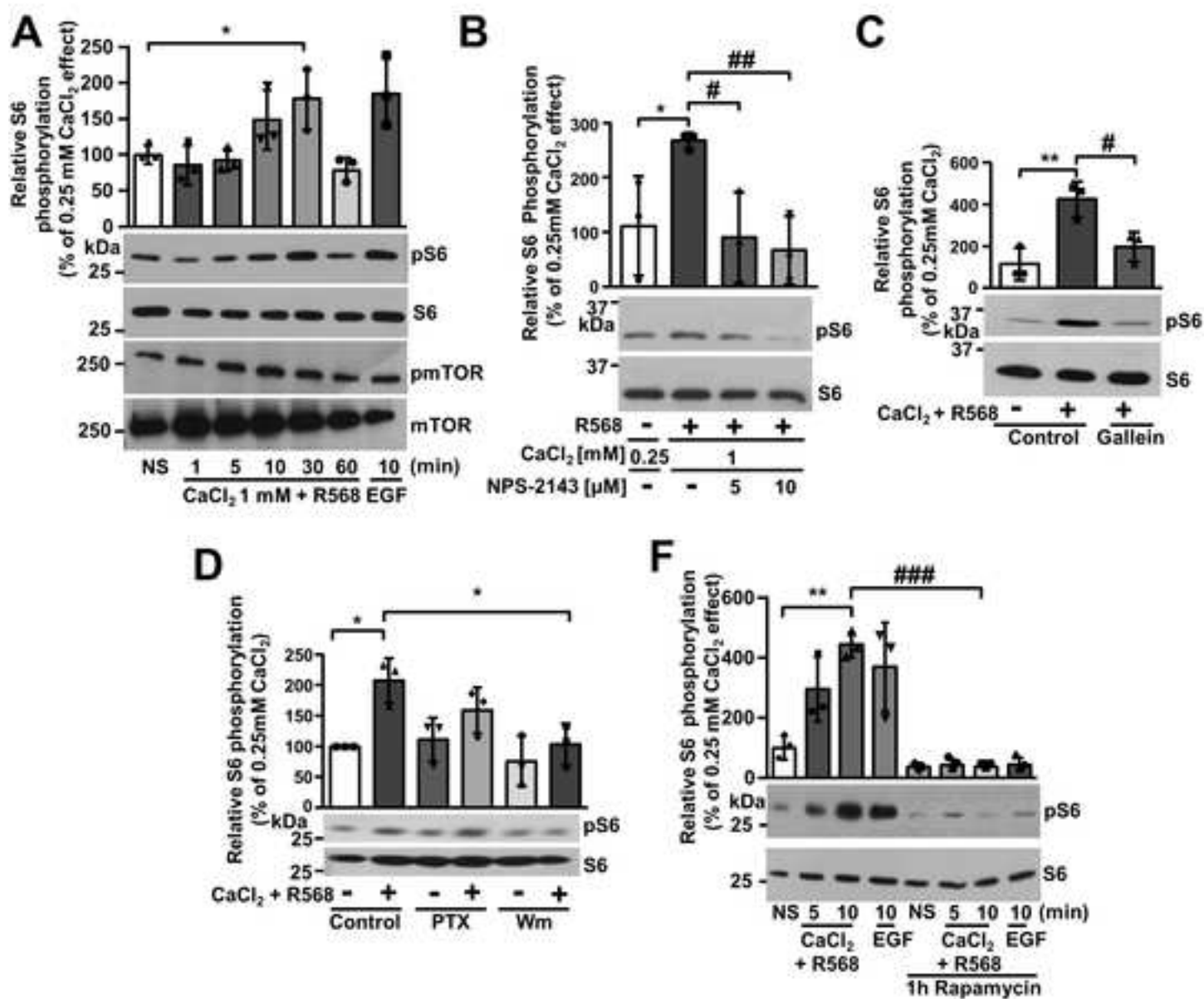


Fig 3. CaSR activates mTORC1 in MDA-MB-231.

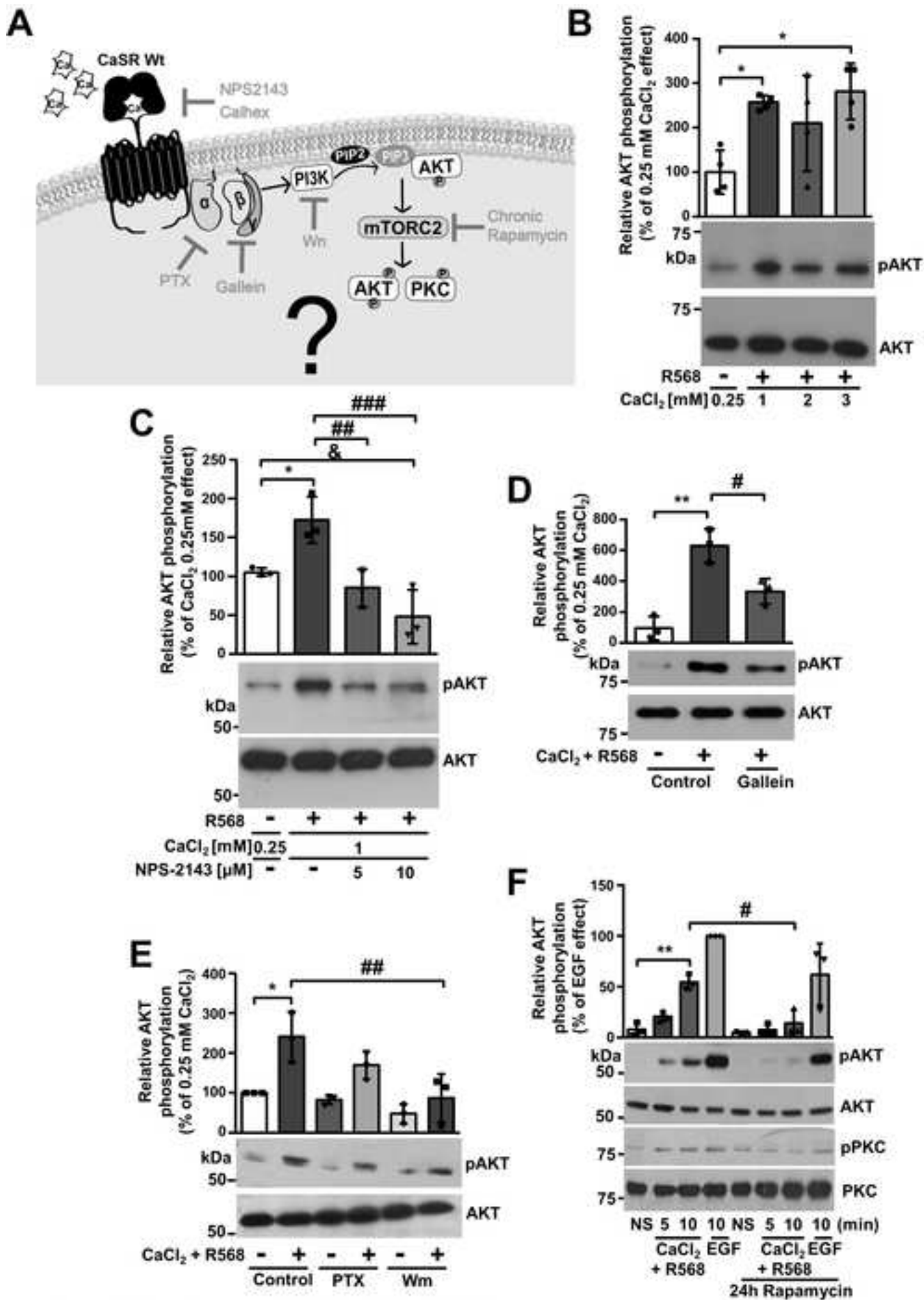


Fig 4. CaSR activates mTORC2 in MDA-MB-231.

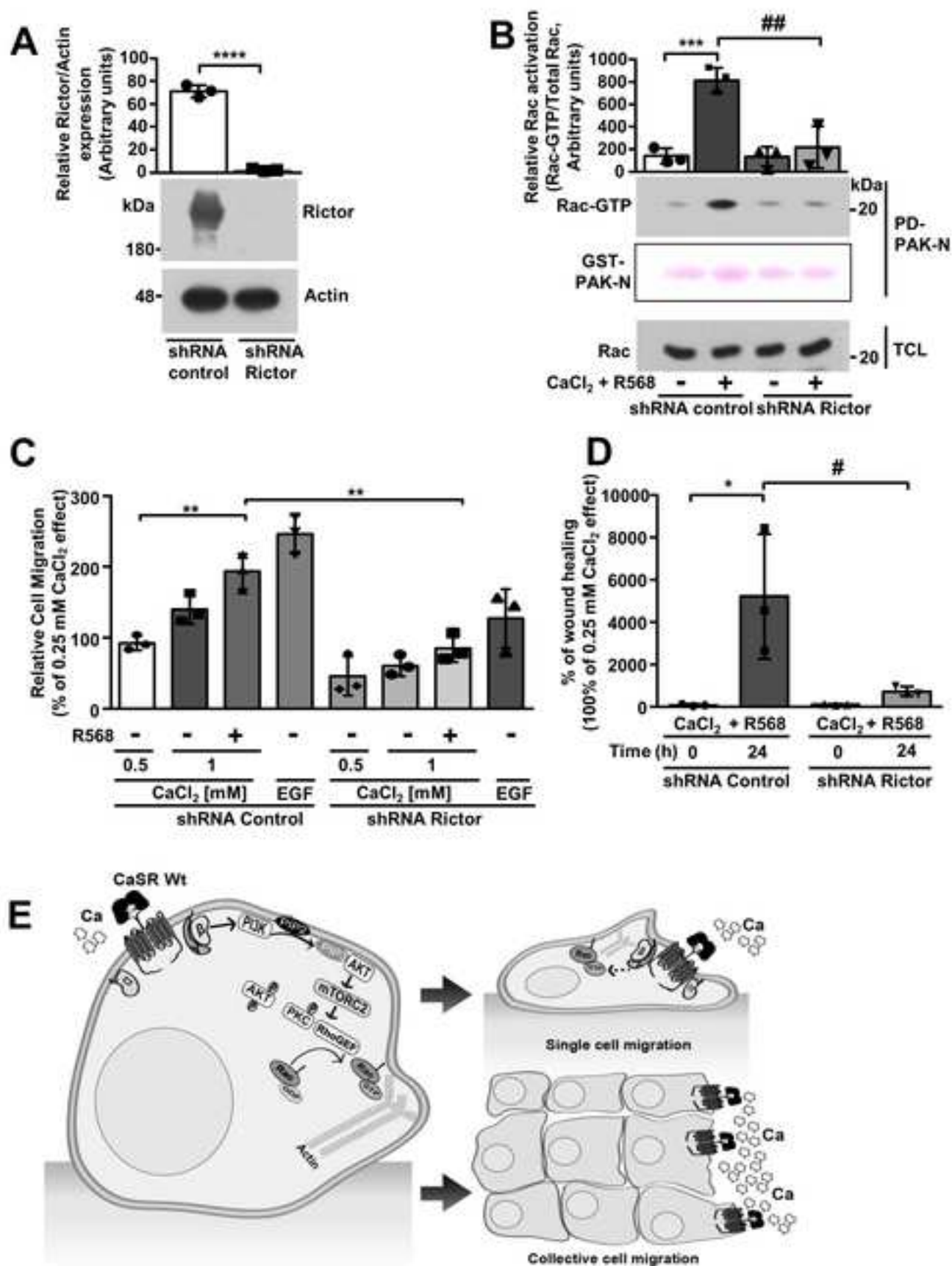
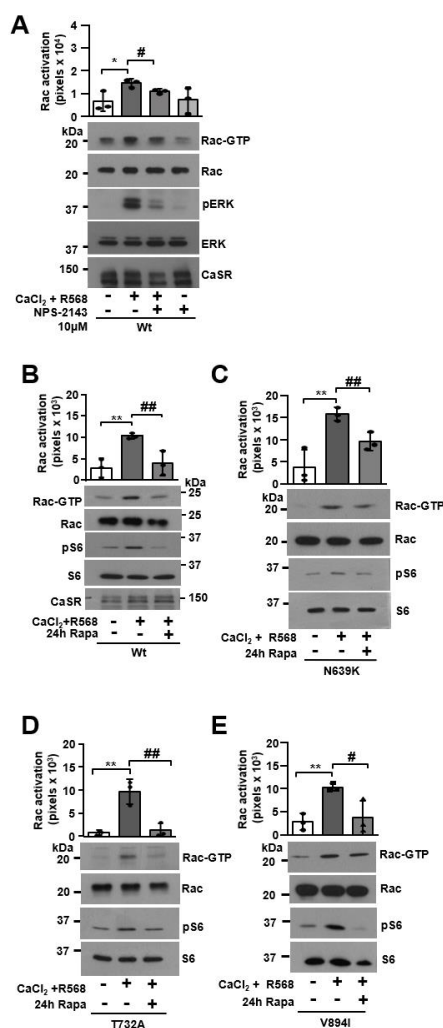
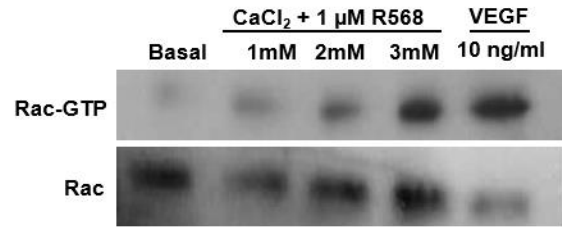


Fig 5. mTORC2 plays an essential role in MDA-MB-231 breast cancer cell migration elicited by CaSR.

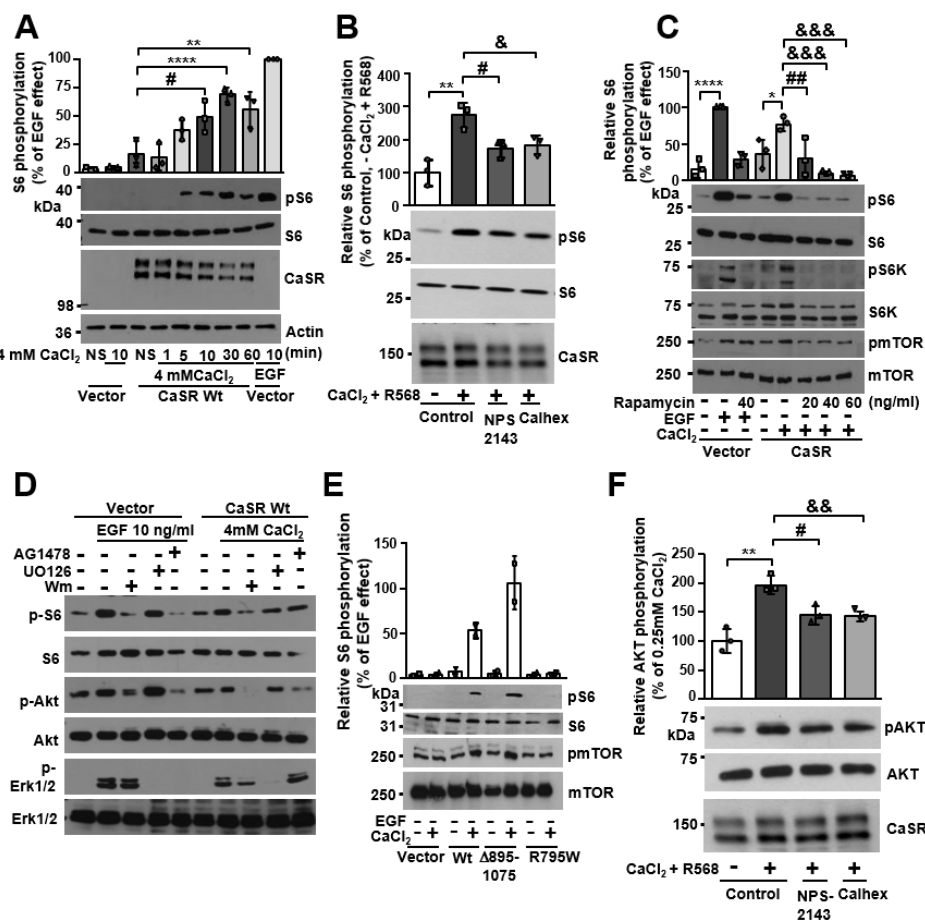
[Click here to view linked References](#)1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Supplementary Fig. 1. CaSR mutants identified in breast cancer patients activate Rac-1 GTPase via mTOR. (A) Rac1-GTP was isolated by pull-down with GST-PAK-CRIB-domain beads using lysates from HEK-293 cells transiently transfected with wild type CaSR. Cells were stimulated with R568+extracellular calcium for 3 min in the presence or not of NPS-2143, and isolated Rac-1-GTP was revealed by western blot. Graph represents three independent experiments. Bars indicate mean \pm standard deviation (SD), * $p=0.0191$, # $p=0.0166$; (unpaired Student *t* test; $n=3$). (B) Chronic incubation with rapamycin prevents CaSR-dependent Rac-1 activation. HEK-293 cells expressing wild type CaSR were incubated or not with rapamycin (40 ng/mL) for 24 h prior to stimulation (3 min) with calcium+R568. Cell lysates were subjected to Rac1-GTP pull-down assays with GST-PAK-CRIB-domain beads. Bars represent mean \pm (SD), ** $p=0.024$, ## $p=0.0094$; (unpaired Student *t* test; $n=3$). (C-E) Comparative analyses of Rac-1 activation by CaSR mutants incubated or not with rapamycin (40 ng/mL) for 24 h prior to stimulation with R568+calcium followed by Rac pull-down assays. Graphs represent three independent experiments; bars represent mean \pm (SD). Results were analyzed by unpaired Student *t* test. (C) CaSR N639K in the presence or not of rapamycin. ** $p=0.0040$, ## $p=0.0064$; ($n=3$). (D) CaSR T732A in the presence or not of rapamycin. ** $p=0.0025$, ## $p=0.0048$; ($n=3$). (E) CaSR V894I in the presence or not of rapamycin; ** $p=0.0013$, # $p=0.0187$; ($n=3$).

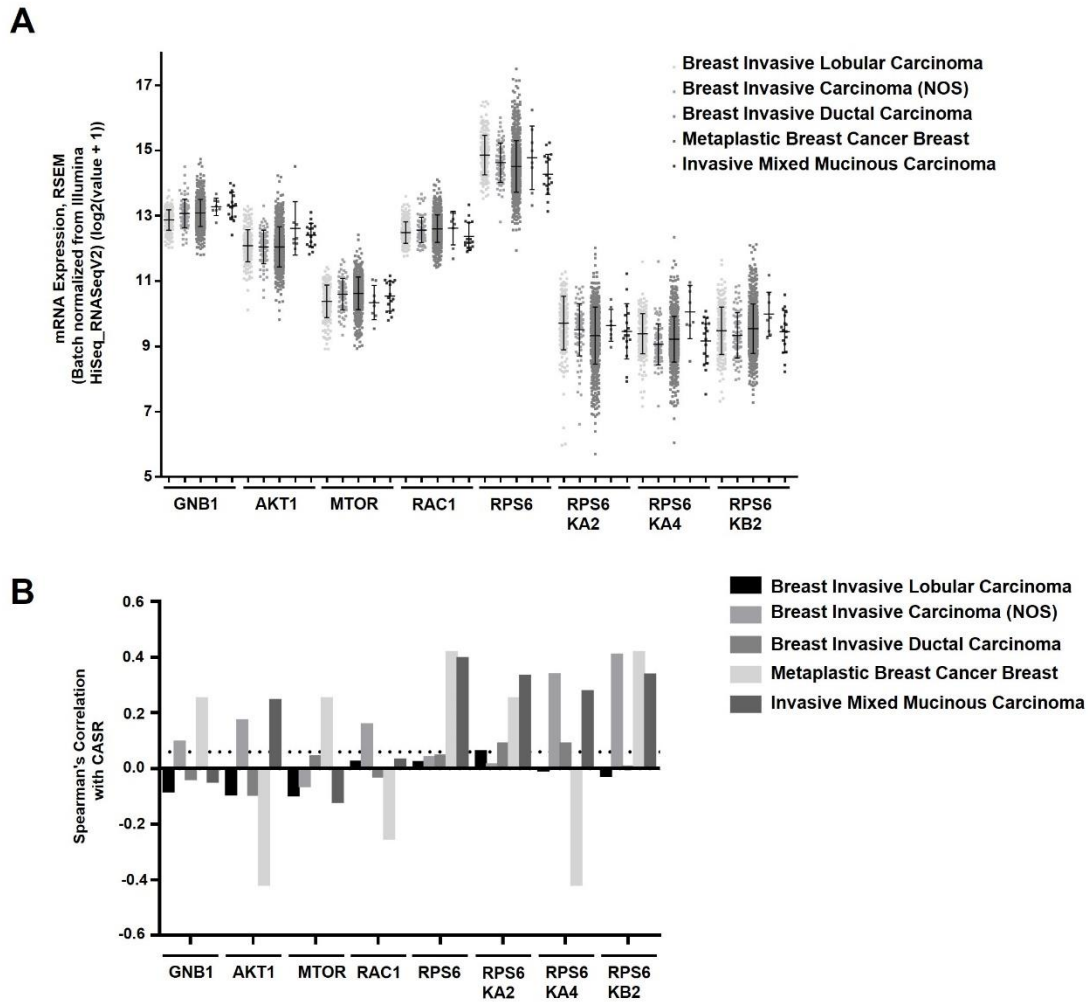
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65



Supplementary Fig. 2. CaSR activates Rac in human microvascular endothelial cells (HMEC). HMEC cells were stimulated for 10 min with R568 and the indicated amounts of calcium, VEGF was used as positive control. Active Rac (Rac-GTP) was isolated by pull-down with GST-PAK-CRIB domain beads and revealed by western blot.



Supplementary Fig. 3. CaSR stimulates mTORC1 and mTORC2 signaling pathways, role of EGFR transactivation. (A) CaSR stimulates S6 phosphorylation. HEK293 cells transfected with CaSR or control vector were stimulated with R568+calcium for 1-60 min or left without stimulus (NS). Cell lysates were used to reveal S6 phosphorylation. Bars represent mean densitometric values of S6 phosphorylation; error bars indicate standard deviation (SD). # p=0.05, **** p=0.0001, ** p=0.005; (one-way ANOVA followed by Bonferroni's; n=3). **(B) NPS-2143 and Calhex inhibit CaSR-dependent S6 phosphorylation in HEK-293 cells.** Bars indicate SD. ** p=0.0054, # p=0.0193, & p=0.0321; (unpaired Student *t* test; n=3). **(C) Effect of rapamycin on CaSR-induced S6, S6K and mTOR phosphorylation in HEK-293 cells expressing CaSR.** Graph represents densitometric values of S6 phosphorylation. Bars represent mean ± (SD). **** p<0.0001, * p=0.05, ## p=0.005, &&& p=0.001; (one-way ANOVA followed by Tukey; n=3). **(D) HEK-293 cells transfected with CaSR cDNA or empty vector were incubated with the indicated inhibitors and stimulated with 4 mM calcium or EGF, as positive control. Phosphorylation of S6, AKT, and ERK and the expression of total proteins were analyzed by western blot in total cell lysates. Representative blots are shown. (E) Effect of CaSR mutants on S6 phosphorylation.** Graph represents two independent experiments. **(F) Calhex prevents CaSR-dependent phosphorylation of AKT in HEK-293 cells expressing CaSR.** Bars represent mean ± (SD). ** p=0.0030, # p=0.0154, && p=0.0066; (unpaired Student *t* test; n=3).



Supplementary Fig. 5. mRNA expression of CASR and components of the GNB1-MTOR pathway in breast cancer patients. (A) Components of the GNB1-MTOR pathway are expressed in breast cancer patients as revealed by transcriptomic datasets of the TCGA, PanCancer Atlas (Gao et al., 2013). (A) Mean values and standard deviations (SD) are shown. . **** $p < 0.0001$ (one-way ANOVA followed by Tukey; $n=1,082$). (B) Spearman's coefficient indicates co-expression of CASR with the indicated genes of the mTOR pathway. The dotted line represents the minimum cut-off value for all cancer subtypes. Lobular ($n=201$ samples), NOS ($n=77$ samples), Ductal ($n=780$ samples), Metaplastic Breast Cancer ($n=8$ samples) and Invasive Mixed Mucinous Carcinoma ($n=17$ samples). RNAseq data are indicated as Log₂ (value + 1) RSEM (Batch normalized from Illumina HiSeq_RNASeqV2) of CASR, GNB1, AKT1, MTOR, RAC1, RPS6, RPS6KA2, RPS6KA4, and RPS6KB2 genes.