



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“P-Rex1 como plataforma de señalización y efector de la
vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC2-Akt relevante en migración celular”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. YARELY MABELL BELTRÁN NAVARRO

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Director de la Tesis:

Dr. José Vázquez Prado

Ciudad de México

FEBRERO, 2023

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

El desarrollo de este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con la beca nacional de doctorado No. 736999 y los proyectos CB-2016-01 No. 286274: “MECANISMOS MOLECULARES DE MIGRACION ENDOTELIAL Y ANGIOGENESIS” y Paradigmas y Controversias de la Ciencia 2022 No. 319283: “INTEGRACIÓN DE CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN QUE GUÍAN LA REORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO Y MIGRACIÓN DE CÉLULAS CANCEROSAS”.

Para mi familia

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que contribuyeron a la realización de este proyecto, desde la parte conceptual y de ejecución hasta sus consejos y palabras de aliento.

Gracias al Dr. José Vázquez Prado por su dirección, consejos, charlas y apoyo incondicional con el proyecto, con mi desarrollo como investigadora y mi estancia en el laboratorio 35 de Farmacología. Aprecio profundamente su respaldo.

A mi comité tutorial por su guía y evaluación para enriquecer mi proyecto de doctorado. A la Dra. Guadalupe Reyes Cruz por su apoyo y entera disposición para el avance de este proyecto. A la Dra. María del Carmen García García por sus sugerencias y observaciones. Al Dr. Benjamín Florán Garduño por su visión del proyecto y recomendaciones. Y al Dr. Fernando López Casillas por sus propuestas y enfoque del proyecto.

A mis compañeros del laboratorio 35: Daniel, Dante, Irving, Ricardo y Sendi que han compartido sus días conmigo, con experimentos, tips, pláticas de nuestros proyectos y conversaciones de la vida, así como su colaboración en este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio 19: Jorge, Safir, Alex y Janik que siempre me recibieron en su laboratorio con la mejor actitud e interés por compartir experiencias.

Gracias por su apoyo técnico a Estanislao Escobar Islas, David Pérez Rangel y Omar Hernández García del laboratorio 35 de Farmacología y a Yazmin Torres Santos, Margarita Valadez Sánchez y Jaime Estrada Trejo del laboratorio 19 de Biología Celular, que hacen posible el avance de los proyectos día a día con su absoluto compromiso. Agradezco a las secretarías Beatriz Cecilia Alcántara Castro y Lucero Maricela Fernández Campos por su apoyo en trámites y cuestiones administrativas.

A Paty y Chuy por recibirme e incorporarme en su hogar, por apoyarme y cuidarme siempre. A Coco por estar pendiente de mí y alentarme con sus mensajes.

A mi abuela Felipa, mis tías, tíos, primas, primos y amigos de Culiacán, Sinaloa que se interesan en mi bienestar, avances y proyectos. Los aprecio mucho.

Gracias infinitas a mis padres Maribel y Candelario y a mis hermanos Flor y Carlos por su amor y apoyo para que logre mis sueños, los amo con todo mi ser.

Contenido

Índice de Figuras.....	9
Abstract	12
I. Introducción	13
Migración celular direccional	13
El heterodímero G $\beta\gamma$ en migración celular.....	15
Las PI3K de clase I	15
Los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina de la familia de Rho	17
Las GTPasas de la familia de Rho	19
P-Rex1, un GEF como plataforma quimiotáctica	22
Las cinasas Akt.....	25
Los complejos mTORC1 y mTORC2.....	26
Migración celular en cáncer.....	27
II. Justificación.....	30
III. Hipótesis.....	31
IV. Objetivos.....	32
Objetivo General.....	32
Objetivos Específicos	32
V. Estrategia experimental	33
1. P-Rex1 como plataforma para la interacción G $\beta\gamma$ -PI3K γ	33
2. P-Rex1 como plataforma y efector de la vía G $\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC2-Akt1 y su regulación	33
3. Algunas líneas celulares de cáncer de mama son vulnerables a la ausencia de P-Rex1, PI3K, mTORC2, Akt1 y un grupo de genes de señalización específicos.....	34
4. Acompañantes de señalización de P-Rex1 en pacientes con cáncer cuya supervivencia correlaciona con la expresión de <i>PREX1</i>	34
VI. Métodos	35
Modelos celulares.....	35
Plásmidos.....	36
Anticuerpos	36
Diluciones de anticuerpos	36
Mapeo P-Rex1-PI3K γ	37
P-Rex1 puede interactuar con otras PI3Ks	38

Efecto de $G\beta\gamma$ en la interacción P-Rex1-PI3K γ	39
P-Rex1 como plataforma para PI3K γ y $G\beta\gamma$	40
Ensayo de activación de P-Rex1	41
Inmunoprecipitación de P-Rex1 y p110 β	41
Knockdown de P-Rex1	42
Tratamiento crónico con Rapamicina.....	43
Mapeo de fosforilaciones de P-Rex1 por Akt1	44
Ensayo de ganancia de función con Myr-Akt	44
Efecto de activadores de P-Rex1 en su función de plataforma y efector.....	46
Dependencias de genes y fármacos	47
Expresión de ARNm de líneas celulares	47
Acompañantes de señalización de <i>PREX1</i>	47
Marcadores de tipos celulares	48
Fosfoproteómica y enriquecimiento de vías de señalización de la firma transcripcional.....	48
Acompañantes de señalización de P-Rex1 en pacientes con cáncer cuya supervivencia correlaciona con la expresión de <i>PREX1</i>	49
Validación de la firma transcripcional.....	50
Correlación de la firma transcripcional con marcadores de tipos celulares cerebrales	51
Análisis estadístico	52
VII. Resultados.....	53
PI3K γ interactúa con el amino terminal de P-Rex1	53
P-Rex1 como plataforma para la interacción $G\beta\gamma$ -PI3K γ	55
P-Rex1 funciona como plataforma para la vía $G\beta\gamma$ -PI3K-mTORC2-Akt1	57
La vía $G\beta\gamma$ -PI3K-mTORC2-Akt1 requiere a P-Rex1.....	60
P-Rex1 es efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K-mTORC2-Akt1	62
Akt1 activa a P-Rex1 mediante fosforilación	64
P-Rex1 es acompañado por un grupo de genes de señalización específicos	70
P-Rex1 es acompañado por un grupo específico de genes que constituyen una firma transcripcional y correlacionan con menor supervivencia en glioma de bajo grado.....	75
VIII. Discusión	90
IX. Conclusiones	104
X. Perspectivas	105

XI. Referencias..... 106
Anexos 113

Índice de Figuras

Figura 1 La migración celular direccional está presente en el desarrollo, estabilidad celular y enfermedad.....	13
Figura 2 Las células responden a señales cambiando su forma..	14
Figura 3 RhoGEFs que interactúan con el heterodímero $G\beta\gamma$	16
Figura 4 Las PI3Ks de clase I responden a RTKs y GPCRs.....	17
Figura 5 Estructura modular de RhoGEFs regulados por proteínas $G\alpha$	18
Figura 6 GTPasas de la familia de Rho..	19
Figura 7 Las RhoGTPasas se coordinan para reorganizar el citoesqueleto de actina..	20
Figura 8 Las GTPasas de la familia de Rho son reguladas por GEFs y GAPs.....	21
Figura 9 Efectores de las GTPasas de la familia de Rho..	22
Figura 10 Activación de P-Rex1 por PIP_3 y $G\beta\gamma$	23
Figura 11 P-Rex1 como plataforma quimiotáctica gracias a su estructura multidominio..	24
Figura 12 Akt1 interactúa con P-Rex1 y Rictor, mismos que favorecen su activación..	26
Figura 13 P-Rex1 interactúa con ambos complejos de mTOR, pero solo mTORC2 contribuye a migración.....	27
Figura 14 Las células cancerosas exacerban la migración celular..	28
Figura 15 Modelo de P-Rex1 como plataforma y efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC2-Akt y en otras cascadas relevantes para la sobrevivencia.....	31
Figura 16 PI3K γ interactúa con el dominio DEP1 de P-Rex1.	53
Figura 17 PI3K β y PI3K γ interactúan con P-Rex1-DEP1.	54
Figura 18 El amino terminal de P-Rex1 puede formar un complejo ternario con $G\beta\gamma$ y PI3K γ	55
Figura 19 $G\beta\gamma$ no interactúa con el complejo DEP1-PI3K γ	56
Figura 20 P-Rex1 activado por SDF-1 interactúa con $G\beta\gamma$, p110 β , Rictor y Akt1...	57
Figura 21 PI3K β y PI3K α interactúan con P-Rex1 activado por SDF-1.....	59
Figura 22 $G\beta\gamma$, p110 β , Rictor y Akt1 se asocian a P-Rex1 y el RacGEF contribuye a la señalización de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K-mTORC2-Akt1.....	60
Figura 23 P-Rex1 es efector de mTORC2.....	62
Figura 24 Akt1 fosforila el DH-PH y el DEP1 de P-Rex1.....	65
Figura 25 Akt1 activa a P-Rex1.	65
Figura 26 P-Rex1 activado por $G\beta\gamma$ y Akt constituye una plataforma más eficiente.	66
Figura 27 Efecto del CRISPR y fármacos en líneas celulares de cáncer de mama.	68
Figura 28 Expresión de ARNm de <i>PREX1</i> y proteínas de la vía PI3K-mTORC2-Akt en líneas celulares de cáncer de mama.	69
Figura 29 La alta expresión de <i>PREX1</i> correlaciona con mayor efecto de CRISPR.	69

Figura 30 Genes de señalización esenciales, exclusivos y compartidos en líneas celulares de cáncer de mama dependientes e independientes de <i>PREX1</i>	70
Figura 31 Veinticuatro genes de señalización esenciales correlacionan con <i>PREX1</i> en muestras de pacientes con cáncer de mama y exhiben buena expresión.	71
Figura 32 <i>PREX1</i> y la firma transcripcional que lo acompaña correlacionan con marcadores epiteliales.....	73
Figura 33 Genes co-esenciales cuya versión proteica se encuentra fosforilada.	74
Figura 34 Vías de señalización enriquecidas correlacionadas con las fosfoproteínas acompañantes de <i>PREX1</i>	74
Figura 35 La alta expresión de <i>PREX1</i> correlaciona con supervivencia en pacientes con LGG, LAML, KIRC y LUAD.	75
Figura 36 Genes de señalización esenciales acompañan a <i>PREX1</i> en la línea celular 42MGBA y en pacientes con LGG.	76
Figura 37 Pacientes con alteraciones en <i>EGFR</i> , <i>NF1</i> y <i>PTEN</i> exhiben mayor expresión de <i>PREX1</i>	77
Figura 38 Genes de señalización correlacionados con <i>PREX1</i> exclusivamente en pacientes con alta expresión de <i>PREX1</i> en LGG y enriquecimiento de agonistas y receptores.	78
Figura 39 Agonistas y receptores correlacionados con <i>PREX1</i> en LGG.	79
Figura 40 La alta expresión de agonistas y receptores correlaciona con menor supervivencia de pacientes con LGG.	80
Figura 41 Cinasas y fosfatasa enriquecidas en pacientes con alta expresión de <i>PREX1</i>	81
Figura 42 Cinasas y fosfatasa correlacionadas con <i>PREX1</i>	81
Figura 43 Cinasas y fosfatasa que correlacionaron con menor supervivencia. .	82
Figura 44 Fosfostratos correlacionados con <i>PREX1</i>	83
Figura 45 Otros efectores y adaptadores correlacionados con <i>PREX1</i> en LGG....	83
Figura 46 Fosfostratos y adaptadores acompañantes de <i>PREX1</i> cuya alta expresión correlaciona con menor supervivencia de pacientes con LGG.....	83
Figura 47 El eje de señalización de <i>PREX1</i> correlaciona con astrocitos, microglía y células del estroma.....	85
Figura 48 Pacientes con alta expresión de <i>PREX1</i> exhiben una mayor proporción de células inmunitarias y del estroma.....	86
Figura 49 Microambiente inmunitario en tumores LGG.	86
Figura 50 Firmas de tipos celulares correlacionadas con el eje de señalización de <i>PREX1</i>	87
Figura 51 Validación de la firma transcripcional del eje de señalización de <i>PREX1</i>	87
Figura 52 Genes acompañantes de <i>PREX1</i> en los 32 estudios del TCGA.	88
Figura 53 La firma del eje de señalización de <i>PREX1</i> (LGG) correlaciona con menor supervivencia en LUAD, BLCA y KIRC.....	89
Figura 54 Modelo de correlación de la expresión de <i>PREX1</i> con distintos tipos celulares.....	89
Figura 55 P-Rex1 es plataforma y efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K β -mTORC2-Akt1 en células de cáncer de mama.	96

Resumen

En cáncer metastásico las células cancerosas migran para invadir nuevos tejidos. Una migración exacerbada puede deberse a la sobreexpresión de controladores del citoesqueleto de actina. P-Rex1 es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina que activa a la GTPasa Rac en respuesta a señales que estimulan a las células a moverse. Vías quimiotácticas de GPCRs-G_i aportan subunidades Gβγ que pueden activar a P-Rex1. Este GEF podría tener una doble contribución para promover mayor migración. En este proyecto investigamos la posibilidad de que P-Rex1 sea una plataforma y efector de la vía Gβγ-PI3Kγ-mTORC2-Akt haciendo la señalización más eficiente y promoviendo su propia activación. Buscamos a los interactores en la fracción activa de P-Rex1 y mediante knockdown evaluamos al GEF como soporte de complejos macromoleculares. Determinamos su ubicación como efector con el uso de inhibidores de cinasas y buscamos acompañantes de señalización en diversos tipos de cáncer. Demostramos que, en efecto, P-Rex1 es una plataforma de señalización que puede asociar a Gβγ y PI3Kβ/γ, activadores sinérgicos del GEF, y a las cinasas mTORC2 (Rictor) y Akt1. P-Rex1 es efector de la vía de señalización que eventualmente lo activa y se requiere la actividad de mTORC2 para que Akt1 fosforile el casete catalítico DH-PH. A través de la minería de datos, resultaron relevantes P-Rex1 y la vía PI3K-mTORC2-Akt1 en líneas celulares de cáncer de mama como acompañantes co-esenciales. La firma transcripcional constituida por *PREX1* y 24 acompañantes de señalización correlacionó con células epiteliales ER⁺ y con la señalización de mTOR. La alta expresión de *PREX1* correlacionó con baja supervivencia de pacientes con glioma de bajo grado, donde el eje de señalización se conformó por 30 genes correlacionados diferencialmente con *PREX1*. La firma transcripcional demostró poder predictivo para la supervivencia de pacientes con glioma y en cáncer de pulmón, vejiga y riñón al someterla a un análisis pan-cancer de los estudios del TCGA. La expresión de P-Rex1 es un potencial marcador para vigilar en células cancerosas para interferir con su rol de plataforma y efector.

Abstract

In metastatic cancer, cancer cells migrate to invade new tissues. An exacerbated migration can be due to overexpression of actin cytoskeleton controllers. P-Rex1 is a guanine nucleotide exchanger that activates Rac, a GTPase that leads cytoskeletal reorganization in the leading edge of migrating cells. Chemotactic GPCRs transduce via G_i , releasing $G\beta\gamma$ subunits that activate P-Rex1. This RacGEF could have a dual role promoting cell migration. We hypothesized that P-Rex1 could be a platform and effector of the $G\beta\gamma$ -PI3K-mTORC2-Akt pathway, making more effective its signaling output and promoting its own activation. We looked for these interactors in the P-Rex1 active fraction and knocked the GEF down to assess whether it serves as a signaling hub. We use inhibitors to address the role of P-Rex1 as an effector of the mTORC2-Akt pathway and did data mining searching for signaling companions in different types of cancer. We found that P-Rex1 is indeed a signaling platform that can associate $G\beta\gamma$ and PI3K β/γ (synergic activators of P-Rex1) and the mTORC2 (Rictor) and Akt1 kinases. P-Rex1 is an effector of the signaling pathway that activates the RacGEF and requires mTORC2 activity for Akt1 to phosphorylate the DH-PH catalytic module. Through data mining, P-Rex1 and the PI3K-mTORC2-Akt1 pathway were found relevant in breast cancer cell lines as co-essential companions. The transcriptional signature consisted in *PREX1* and 24 signaling companions that correlated with ER⁺ epithelial cells and mTOR signaling. *PREX1* high expression correlated with low survival of lower grade glioma patients. Coexpression analysis indicated a potential signaling axis, formed as a transcriptional signature composed by 30 genes and it exhibited predictive power for survival of glioma patients. Pan-cancer analysis of the TCGA studies indicated a predictive value of the P-Rex1 signaling signature in lung, bladder, and kidney cancer patients. We conclude that P-Rex1 is a potential cancer biomarker and a signaling hub that represents a potential drug target by interfering with its role as platform and effector.

I. Introducción

Migración celular direccional

De los diversos procesos biológicos que realizan las células, individual o grupalmente, la migración celular constituye la habilidad de moverse ante diferentes señales y circunstancias¹⁻³. Se requiere para que las células se muevan hacia una señal como en la quimiotaxis y cierre de heridas (**Fig. 1**), o se alejen de señales repulsivas como en la guía y crecimiento del cono axonal^{2,4,5}.

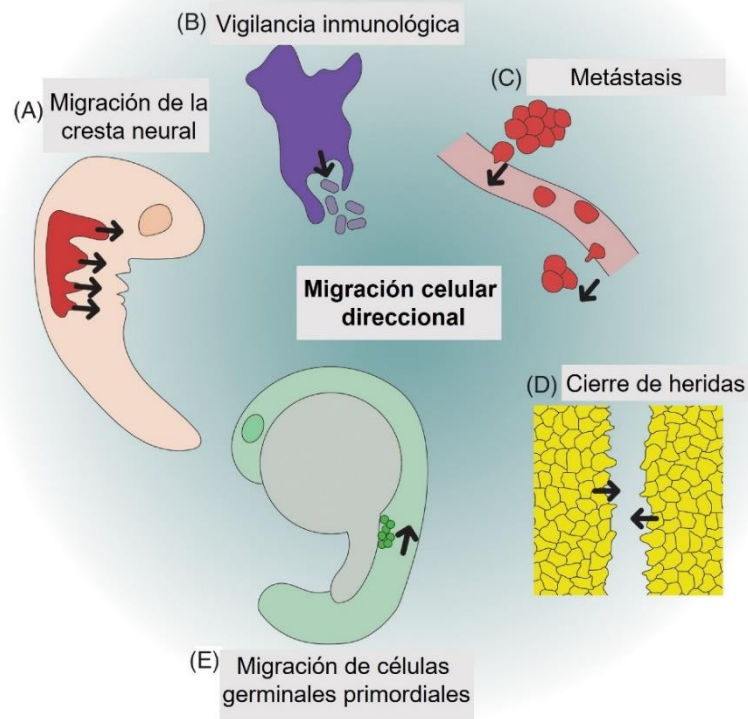


Figura 1 La migración celular direccional está presente en el desarrollo, estabilidad celular y enfermedad. Durante el desarrollo ocurre migración de la cresta neural (A) y de células germinales primordiales (E). Para el mantenimiento homeostático, las células inmunitarias vigilan el entorno y migran ante patógenos (B), y ante daños se busca restaurar la integridad de los tejidos (D). En cuestiones patológicas como cáncer metastásico, la migración celular es controlada por células malignas(C)² (Modificado de Shellard, A. & Mayor, R., 2020).

Para que las células puedan moverse, los receptores quimiotácticos reconocen las señales como péptidos y lípidos desde el medio extracelular y las transducen a través de diferentes proteínas que al redistribuirse llevan a la creación de proyecciones y a la polarización de la célula^{1,6,7}.

La quimiotaxis consiste en un tipo de migración direccionada, pues requiere de gradientes de ligandos, de receptores quimiotácticos como los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y de un amplio arsenal proteico al interior de las células para responder hacia el origen de la señal (**Fig. 2**)^{1,2}. Las proteínas G son heterotrímeros transductores esenciales en este proceso. A partir de la activación de la proteína G_i se disocian las subunidades G_α (G_α -GTP) y $G\beta\gamma$. El heterodímero $G\beta\gamma$ contribuye a la migración celular por medio de la activación de efectores como las fosfatidilinositol-3 cinasas de clase I (PI3Ks) y factores intercambiadores de nucleótidos de guanina de la familia de Rho (RhoGEFs)⁸⁻¹⁰.

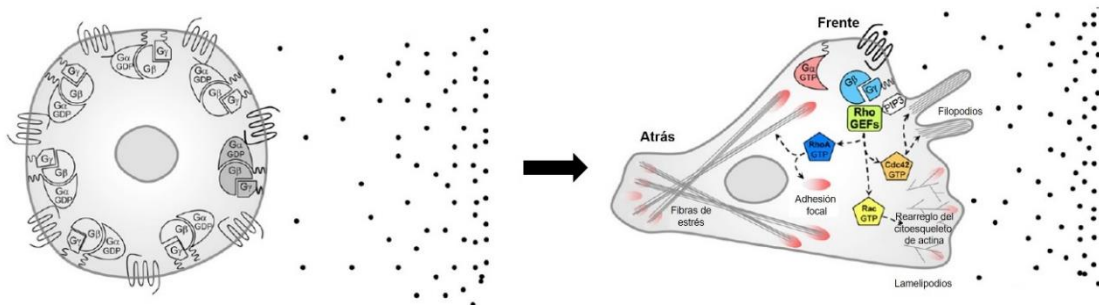


Figura 2 Las células responden a señales cambiando su forma. Ante la presencia de un gradiente de ligandos, las células detectan y transducen las señales, redistribuyendo proteínas transductoras, PI3Ks, RhoGEFs, GTPasas y sus efectores para reorganizar el citoesqueleto y moverse⁸ (Modificado de Vázquez-Prado, et al., 2016).

Las PI3K de clase I son cinasas productoras de segundos mensajeros lipídicos como PIP_3 y los RhoGEFs, como P-Rex1, son activadores indispensables de GTPasas de la familia de Rho¹¹.

Las GTPasas de la familia de Rho son interruptores moleculares que en su estado activo llevan a la formación de estructuras características vía la reorganización del citoesqueleto de actina. Las protrusiones que se generan en el frente migratorio consisten en filamentos de actina polimerizados (que resultan de la activación de efectores por las GTPasas Rac y Cdc42) y el polo contráctil en la parte trasera se debe a complejos de actina y miosina (que dependen de efectores de la GTPasa RhoA)¹².

La transducción de señales desde el reconocimiento del ligando hasta la activación de controladores del citoesqueleto es lo que permite que las células cambien su forma y puedan moverse.

El heterodímero G $\beta\gamma$ en migración celular

El heterodímero G $\beta\gamma$, proveniente de G_i, es un gran contribuyente quimiotáctico en migración celular. Esto se debe, en parte, a la abundancia de heterotrímeros G_i y a la liberación eficiente del heterodímero desde dicha proteína G^{8,13-15}.

Tras la activación de GPCRs-G_i, G $\beta\gamma$ queda libre y disponible en el plano de la membrana plasmática para activar a sus efectores, como como las PI3K β y PI3K γ , RhoGEFs, cinasas GRK, fosfolipasas PLC β , canales (GIRK) y adenilato ciclasas^{8,16,17}. Los tres primeros son conocidos participantes en migración celular, por la producción de PIP₃ y activación de proteínas con dominios PH como P-Rex1 y Akt, y la activación consecuente de la GTPasa Rac que conduce a migración celular (**Fig. 2 y 3**).

Las PI3K de clase I

Las PI3K son cinasas de lípidos relevantes en transducción de señales, pues a través de la fosforilación de un grupo hidroxilo en la posición 3 de diversos fosfoinosítidos generan segundos mensajeros como fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato (PIP₃), fosfatidilinositol-3,4 bifosfato (PIP₂) y fosfatidilinositol-3 fosfato (PI₃P)^{18,19}.

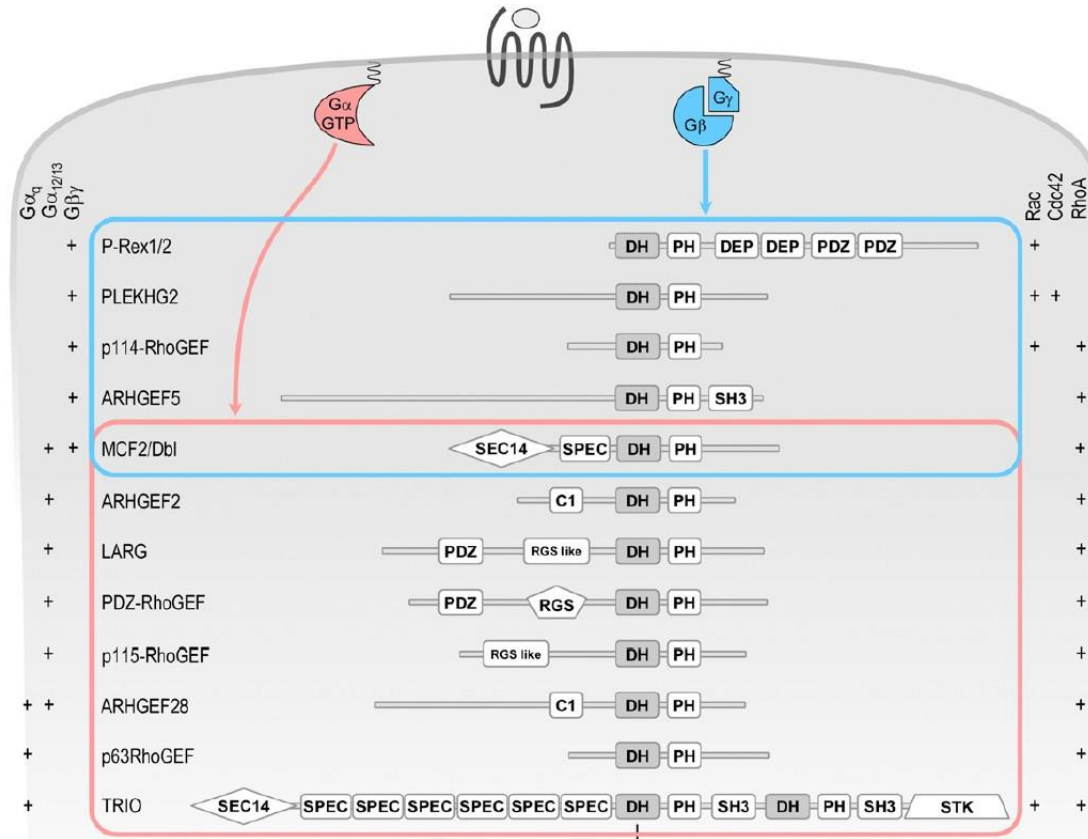


Figura 3 RhoGEFs que interactúan con el heterodímero $G\beta\gamma$. P-Rex1, P-Rex2, PLEKHG2, p114-RhoGEF, ARHGEF5 y MCF2 son RhoGEFs interactores y en algunos casos efectores de $G\beta\gamma$ (recuadro azul). Por otro lado, las subunidades $G\alpha$ -GTP también pueden activar a diferentes RhoGEFs⁸ (Modificado de Vázquez-Prado, et al., 2016).

La clase I está conformada por $PI3K\alpha$, $PI3K\beta$, $PI3K\gamma$ y $PI3K\delta$, estas cinasas son heterodímeros conformados por una subunidad catalítica y una subunidad reguladora²⁰. La clase I se subdivide según la subunidad reguladora de la $PI3K$ que determina las señales que puede detectar. La clase IA recibe señales de receptores con actividad de tirosín cinasa (RTKs) y la clase IB de GPCRs (**Fig. 4**). La clase IA representa a $PI3K\alpha$, $PI3K\beta$ y $PI3K\delta$ que poseen las subunidades catalíticas $p110\alpha$, $p110\beta$ y $p110\delta$, y las subunidades reguladoras $p85\alpha$ o $p85\beta$, siendo estas últimas las responsables de la sensibilidad a los RTKs. Cuando se activan estos receptores se fosforilan tirosinas que sirven como sitios de anclaje para el dominio SH2 encontrado en las proteínas adaptadoras $p85$ ²¹⁻²³.

Por otro lado, la clase IB sólo consiste en PI3K γ con la subunidad catalítica p110 γ y la subunidad reguladora p101 o p84/87. Tanto p101 como p110 γ pueden ser activadas por el heterodímero G $\beta\gamma$ proveniente de proteínas G i heterotriméricas estimuladas por GPCRs quimiotácticos^{24,25}.

Una particularidad de PI3K β es que también es efector de G $\beta\gamma$ vía p110 β , por lo que PI3K β puede ser activada tanto por RTKs como GPCRs¹⁷.

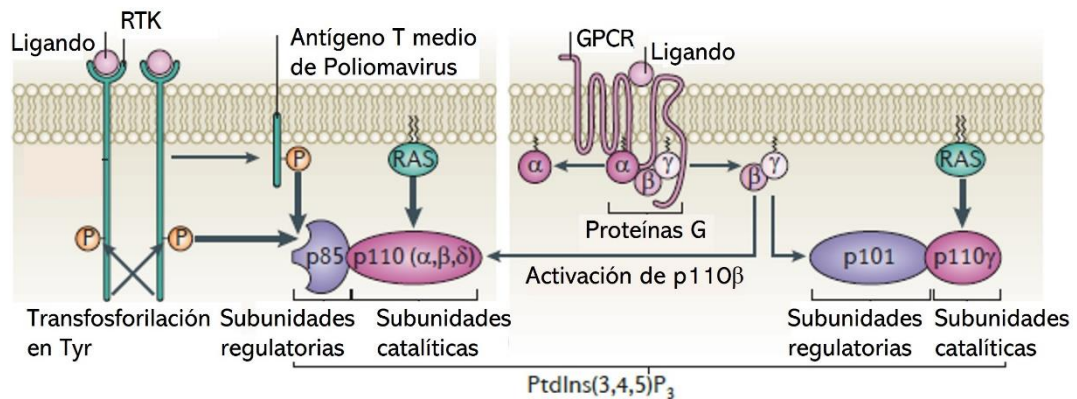


Figura 4 Las PI3Ks de clase I responden a RTKs y GPCRs. La subclase IA es activada por RTKs que al transfosforilarse reclutan a las PI3K α , PI3K β y PI3K δ desde la subunidad reguladora p85. La subclase IB se activa por el heterodímero G $\beta\gamma$ que activa a PI3K γ vía la subunidad reguladora p101 y a PI3K β vía la subunidad catalítica p110 β ^{19,26} (Modificado de Vanhaesebroeck, et al., 2012).

El PIP₃ que generan las PI3Ks lleva al reclutamiento y activación de diversos efectores como la cinasa dependiente de fosfoinosítidos 1 (PDK1), Akt, P-Rex1 y mSin1 (mTORC2), proteínas que participan en migración celular^{19,27}.

Los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina de la familia de Rho

Los RhoGEFs son proteínas multidominio capaces de integrar diferentes señales para llevar a la activación de alguna de las GTPasas de la familia de Rho. Logran la activación de las GTPasas al promover el intercambio del nucleótido GDP por GTP²⁸⁻³⁰.

Los RhoGEFs consisten en dos familias, una con homología a *Dbl* (**DH**) con 70 miembros y otra, no relacionada filogenéticamente, representada por el GEF *dedicator of cytokinesis* (DOCK1), con 11 miembros³¹. La familia más amplia posee el dominio catalítico **DH** acompañado del dominio **PH**, y además tiene dominios variados hacia al amino y al carboxilo terminal (**Fig. 5**).

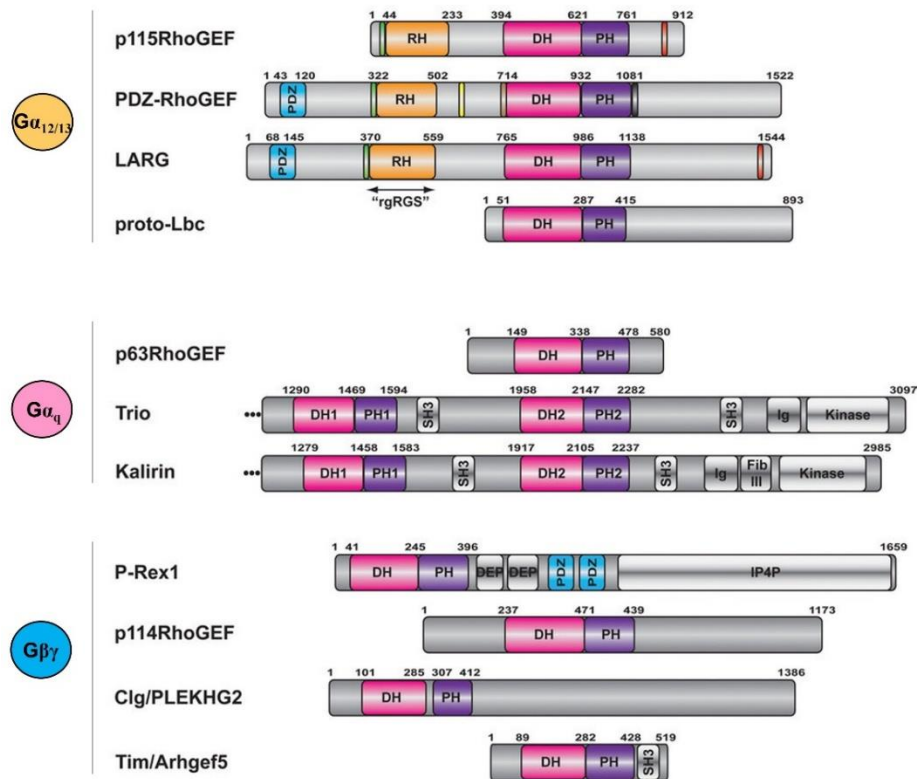


Figura 5 Estructura modular de RhoGEFs regulados por proteínas G α . RH-RhoGEFs como p115RhoGEF, PDZ-RhoGEF y LARG son regulados por G $\alpha_{12/13}$. p63RhoGEF, Trio y Kalirin son regulados por G α_q . P-Rex1, p114RhoGEF, PLEKHG2 y Arhgef5 son regulados por G $\beta\gamma$. Los GEFs de la familia de Rho con homología a *Dbl* tienen el dominio **DH** con un dominio **PH** vecino. Otros dominios que conforman a los RhoGEFs son **RH** (homólogos a RGS) activados por la proteína G $\alpha_{12/13}$, dominios **SH3** que reconocen regiones ricas en prolina, dominios **DEP** (Dishevelled, Egl-10 y Pleckstrina), dominios **PDZ** que suelen interactuar con regiones carboxilo terminal de proteínas integrales de membrana¹⁰ (Modificado de Aittaleb, et al., 2010).

Esta diversidad de dominios sugiere el requerimiento de distintas señales y su integración a nivel de los GEFs como controladores río arriba de las GTPasas de la familia de Rho. Su ubicación los vuelve proteínas interesantes para inhibir con fines terapéuticos cuando la progresión de patologías depende de la activación de GTPasas de la familia de Rho.

Las GTPasas de la familia de Rho

Las GTPasas de la familia de Rho son las encargadas de remodelar el citoesqueleto de actina. Se consideran interruptores moleculares porque solo pueden encontrarse activas o inactivas, con GTP o GDP unido, respectivamente. Son 20 GTPasas de la familia de Rho (**Fig. 6**) y las más estudiadas son Rac1, Cdc42 y RhoA^{3,7}.

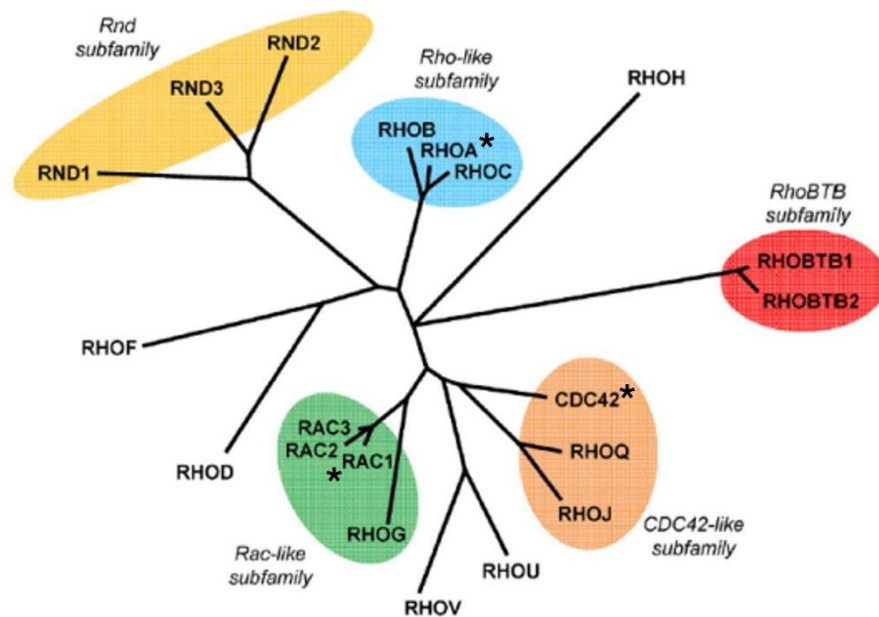


Figura 6 GTPasas de la familia de Rho. Subfamilias y representantes más estudiadas indicadas por asteriscos: RAC1, CDC42 y RHOA. Las subfamilias RAC y CDC42 se parecen más entre ellas que respecto a la subfamilia RhoA³ (Modificado de Lawson, et al., 2018).

Cada GTPasa de la familia de Rho reorganiza el citoesqueleto de actina de manera característica. Rac genera lamelipodios, Cdc42 forma filopodios y RhoA

produce fibras de estrés¹². Rac y Cdc42 se localizan en el frente migratorio, las estructuras que generan se deben a la polimerización de actina en ramificaciones y pequeños haces, respectivamente, produciendo una fuerza de empuje, mientras RhoA se ubica en la parte posterior para generar contracción. Simultáneamente el frente empuja mientras la parte trasera se contrae para que la célula avance hacia la señal (**Fig. 7**).

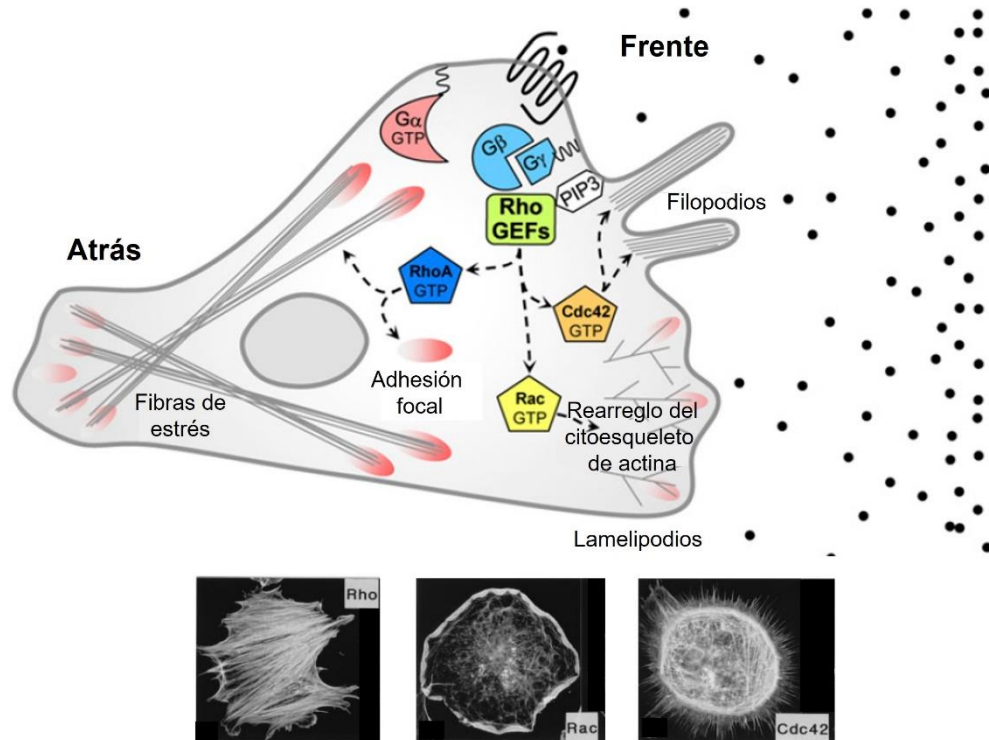


Figura 7 Las RhoGTPasas se coordinan para reorganizar el citoesqueleto de actina. Rac y Cdc42 se ubican al frente migratorio produciendo lamelipodios y filopodios. RhoA se ubica en la parte trasera generando fibras de estrés. Los fenotipos característicos de cada GTPasa se determinaron al emplear versiones constitutivamente activas en fibroblastos^{8,12} (Modificado de Vázquez-Prado, et al., 2016 y Hall, A., 1998).

Dado el alcance de los efectos de las distintas GTPasas de la familia de Rho, su ciclo de regulación es muy importante, los GEFs controlan su activación y la contraparte está a cargo de los GAPs, proteínas que estimulan la actividad intrínseca de GTPasa (**Fig. 8**). Los GEFs promueven el intercambio de GDP por

GTP y los GAPs hacen que las GTPasas hidrolicen el GTP en GDP y fosfato inorgánico²⁹.

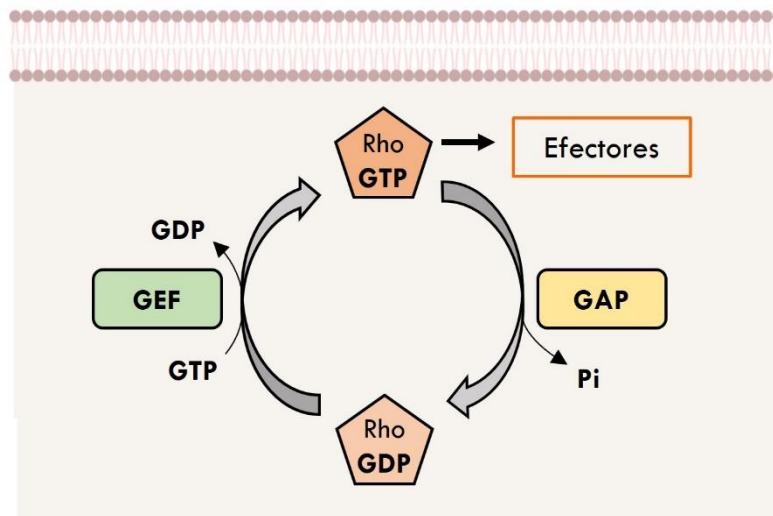


Figura 8 Las GTPasas de la familia de Rho son reguladas por GEFs y GAPs. Los GEFs promueven el intercambio de GDP por GTP, activando a las Rho GTPasas y posteriores efectores. Los GAPs apagan la señalización de las GTPasas al hidrolizar el GTP en GDP y Pi.

Las GTPasas de Rho activas se unen y estimulan a diferentes efectores que se encargan del remodelo del citoesqueleto (**Fig. 9**). Por ejemplo, Rac activa a WAVE y Cdc42 a WASP llevando a la generación de centros de nucleación de actina. Las proteínas Arp2/3 se integran en la cascada, uniéndose a los efectores de las Rho GTPasas y promoviendo que se polimerice la actina en forma de filamentos⁷. Por su parte, RhoA activa a la cinasa ROCK y lleva a la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina para generar contracción³².

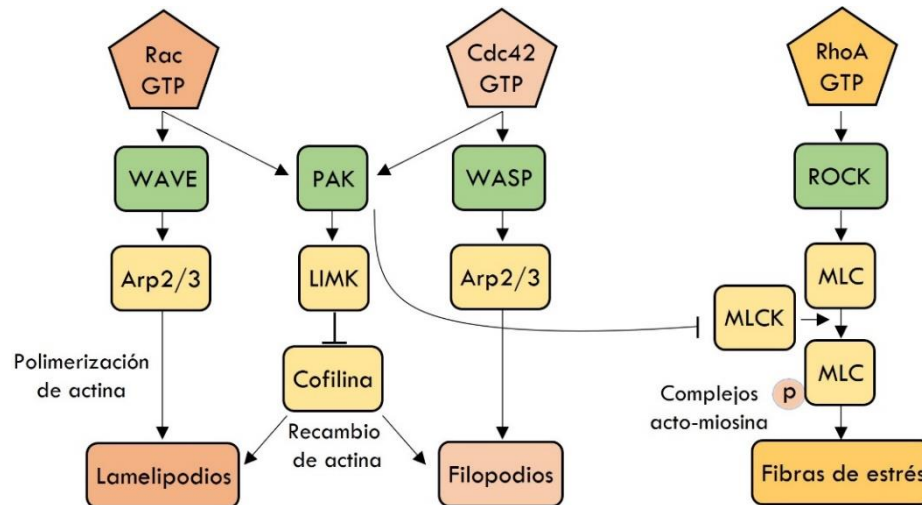


Figura 9 Efectores de las GTPasas de la familia de Rho. Rac y Cdc42 son GTPasas afines y generan fenotipos complementarios al frente migratorio, comparten efectores y suelen prevenir localmente la activación de RhoA^{7,32}.

P-Rex1, un GEF como plataforma quimiotáctica

P-Rex1 es un intercambiador para la GTPasa Rac, dependiente de PIP₃, perteneciente a los RhoGEFs con homología a *Dbl*¹¹. Participa en la cascada SDF-1-CXCR4 que promueve migración y angiogénesis en células endoteliales microvasculares humanas (HMECs)³³.

La estructura multidominio de P-Rex1 consiste en el casete DH-PH, dos dominios DEP, dos dominios PDZ en tándem y el carboxilo terminal homólogo a inositol-polifosfato 4- fosfatasa, carente de actividad. Usualmente P-Rex1 se encuentra autoinhibido (**Fig. 10**), enrollado sobre sí mismo por interacciones intramoleculares entre los DEPs y los PDZs con el casete DH-PH y el carboxilo terminal, cubriendo la mitad amino terminal³⁴⁻³⁶. PIP₃ y Gβγ activan a P-Rex1 de manera independiente y sinérgica³⁷.

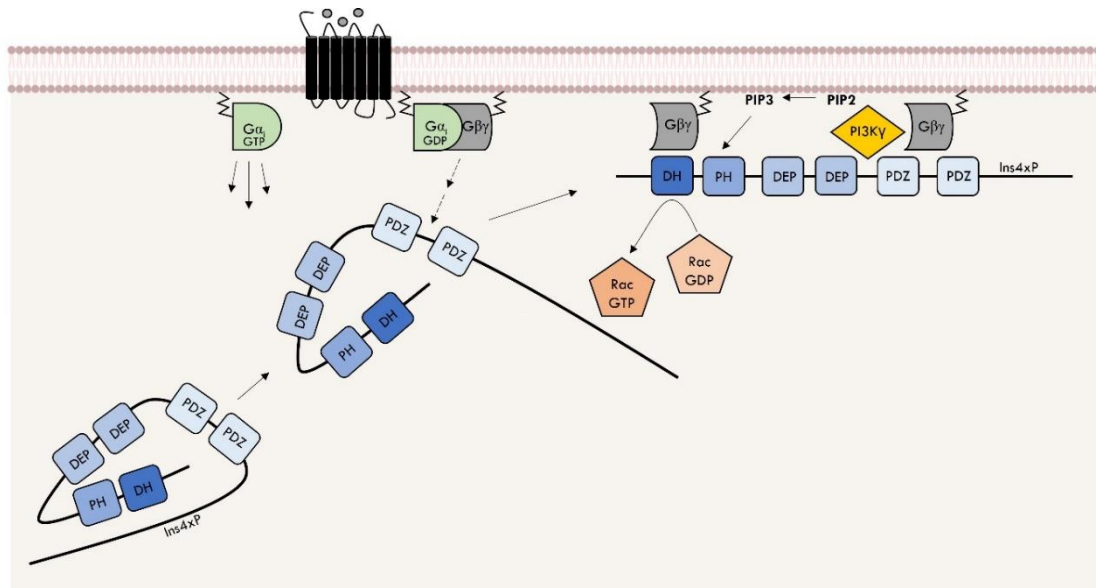


Figura 10 Activación de P-Rex1 por PIP₃ y Gβγ. El carboxilo de P-Rex1 es la primera región que se remueve de la conformación inactiva, perdiendo interacciones con la región amino. Los heterodímeros Gβγ libres reclutan a P-Rex1 desde los dominios PDZ, lo que interrumpe interacciones intramoleculares inhibitorias entre los dominios del amino terminal. Con la producción de PIP₃ y más Gβγ se termina de desenrollar P-Rex1 y se activa sinérgicamente el casete DH-PH^{38,39}.

P-Rex1 posee diferentes proteínas de señalización y segundos mensajeros lipídicos como interactores (**Fig. 11**). El heterodímero Gβγ interactúa con el DH-PH y los PDZs de P-Rex1⁴⁰. El PIP₃, producido por las PI3Ks, con el dominio PH. El carboxilo terminal del dominio de cinasa de mTOR con los dominios DEP de P-Rex1⁴¹. Las subunidades regulatorias de PKA (Riα) y el carboxilo terminal de S1P₁ con los dominios PDZ⁴². Dado que interactores como Gβγ y Riα también pueden activar a P-Rex1, este RacGEF se vuelve un nodo de señalización relevante al considerar su función de GEF y su capacidad de asociar a proteínas de señalización.

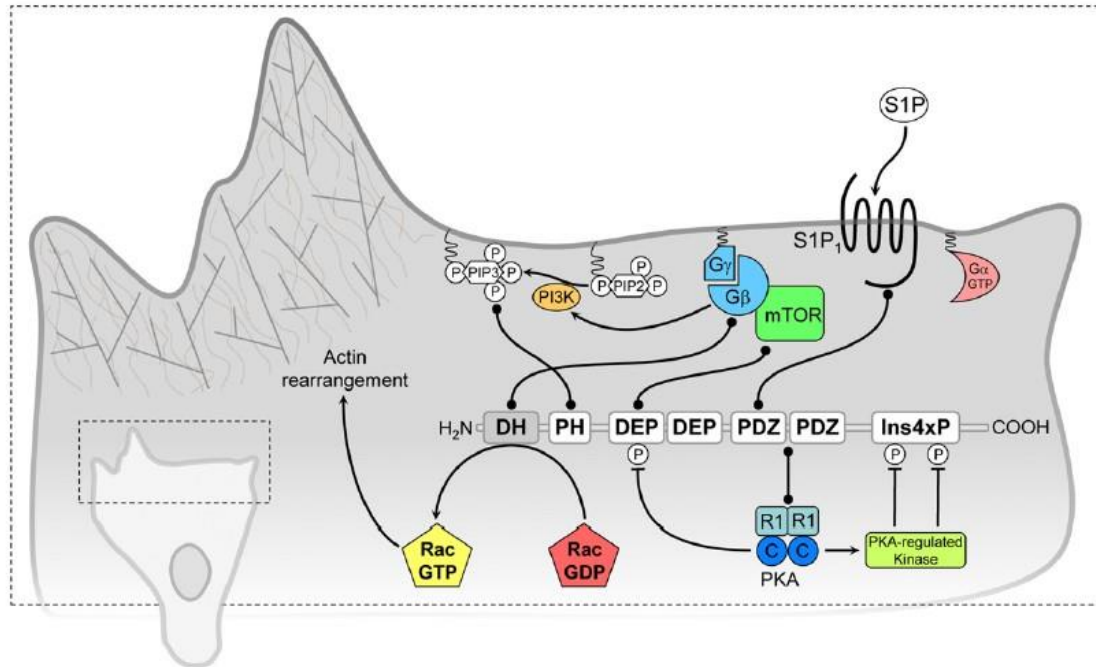


Figura 11 P-Rex1 como plataforma quimiotáctica gracias a su estructura multidominio. P-Rex1 puede desempeñarse como una plataforma para interactores de diferentes vías de señalización, por ejemplo, ante la señalización de S1P-S1P₁, el carboxilo terminal del receptor interactúa con los PDZs. Gβγ libre y activa puede interactuar con el DH-PH de P-Rex1, o bien, con el carboxilo terminal del dominio de cinasa de mTOR. Con la activación de la vía PI3K-Akt-mTOR, el PIP₃ interactúa con el PH de P-Rex1, y la cinasa mTOR puede interactuar con los DEPs. Cuando hay producción de AMPc se activa la holoenzima PKA, las subunidades catalíticas fosforilan el DEP1 e inhiben a P-Rex1, mientras las subunidades regulatorias interactúan con los PDZs activando al RacGEF⁸ (Tomado de Vázquez-Prado, et al., 2016).

Consideramos que P-Rex1 va interactuando secuencialmente con distintas proteínas, desde los estímulos se pueden ir liberando activadores e interactores para P-Rex1 que poco a poco lo van desenrollando al interrumpir las interacciones intramoleculares. Por lo que P-Rex1, con su estructura multidominio, puede funcionar como una plataforma, un GEF organizador de las señales que recibe.

Al referirnos a P-Rex1 como una plataforma quimiotáctica contemplamos el requerimiento de ligandos quimiotácticos como SDF-1 que activen a GPCRs

quimiotáticos como CXCR4 que liberen a heterodímeros $G\beta\gamma$ y desde este punto eventos sucesivos que desenrollen a P-Rex1 haciendo que los dominios queden expuestos para consolidar interacciones con otras proteínas y la eventual activación del RacGEF.

Las cinasas Akt

Las Akts son cinasas de serina/treonina con más de 100 sustratos reconocidos⁴³. Usualmente sus fosforilaciones son inhibitorias, por ejemplo, los sustratos PRAS40 y TSC2 son inhibidores de mTORC1 que al ser fosforilados permiten la activación del complejo¹⁸.

Comprenden tres isoformas, Akt1, Akt2 y Akt3 que se diferencian en su expresión y funciones celulares. Akt1 es ubicua, Akt2 se expresa en tejidos que responden a insulina y Akt3 está restringida al cerebro⁴³.

Existen diferencias en la contribución de Akt1 y Akt2 en cáncer de mama dependiendo del modelo de estudio. En modelos celulares se ha encontrado que Akt1 suprime migración y e invasión, en cambio, Akt2 promueve diseminación metastásica⁴⁴. En cambio, en modelos murinos Akt1 promueve el crecimiento tumoral de mama y la metástasis hacia los pulmones vía neutrófilos asociados a tumor, mientras Akt2 disminuye el desarrollo tumoral en glándula mamaria HER2 positivas⁴⁵.

Akt1 se encontró interactuando con P-Rex1 y la actividad de la cinasa se vio promovida (**Fig. 12**). Este aumento también se observó con la interacción de Rictor⁴⁶. Por lo tanto, puede tratarse de un complejo ternario donde alguna de las proteínas pueda servir como plataforma.

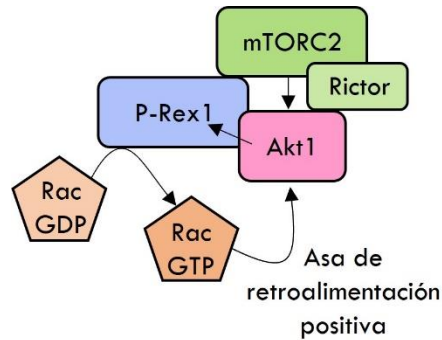


Figura 12 Akt1 interactúa con P-Rex1 y Rictor, mismos que favorecen su activación. Akt1 se sobreexpresó en células HEK293 cotransfectadas con P-Rex1 o Rictor y se evaluó la activación de Akt1 por la fosforilación de Ser473⁴⁶ (Modificado de Kim, et al., 2011).

Los complejos mTORC1 y mTORC2

La cinasa mTOR es indispensable en todas las células y puede formar dos complejos. mTORC1 participa en procesos anabólicos para llevar al crecimiento de las células, mientras mTORC2 es reconocido como el complejo que lleva a la máxima activación de Akt para promover sobrevivencia, además participa en el rearrreglo del citoesqueleto y migración celular⁴⁷. Akt se ubica río arriba mTORC1 y río abajo mTORC2¹⁸.

La cinasa es idéntica en ambos complejos, así como la proteína accesoria GβL (mLST8), son el resto de los acompañantes quienes los diferencian⁴⁸. mTORC1 contiene a Raptor, un componente sensible a la rapamicina, y mTORC2 posee a Rictor y a mSin1, un acompañante insensible a la rapamicina y una proteína adaptadora respectivamente^{49,50}. mSin1 es una proteína que al contener un dominio PH contribuye al reclutamiento de mTORC2 hacia la membrana plasmática cuando hay producción de PIP₃²⁷.

Los complejos de mTOR pueden encontrarse en diferentes compartimentos. Canónicamente, mTORC1 se localiza en endosomas gracias a la translocación por GTPasas Rags⁵¹, en tanto mTORC2 se transloca a la membrana plasmática

ante la formación de PIP₃ y la presencia de Akt por fosforilar. Recientemente también se ubicó a mTORC2 en endosomas y mitocondrias⁵².

Tanto en mTORC1 como en mTORC2 se encontró a P-Rex1 como interactores (**Fig. 13**), pero la capacidad de las células para migrar aún en presencia de un tratamiento agudo con rapamicina hizo pensar que el GEF es un efector del complejo 2 (insensible a la acción rápida de la rapamicina), el cual participa en migración celular dependiente de Rac⁴¹.

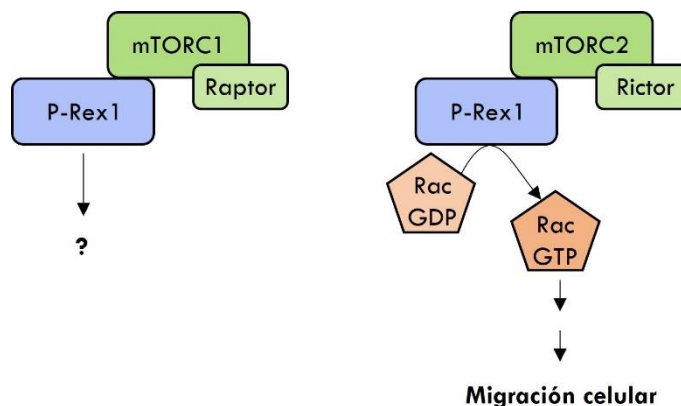


Figura 13 P-Rex1 interactúa con ambos complejos de mTOR, pero solo mTORC2 contribuye a migración. Al inmunoprecipitar a Raptor y Rictor, componentes diferenciales de los complejos, P-Rex1 se encontró co-inmunoprecipitado en mTORC1 y mTORC2. El uso de rapamicina afectó la migración celular estimulada por suero y no por leucina, descartando la participación de mTORC1⁴¹ (Modificado de Hernández-Negrete, et al., 2007).

Migración celular en cáncer

La migración celular contribuye al desarrollo de procesos patológicos como el cáncer metastásico. Las células malignas secretan ligandos para reclutar células del estroma, como células endoteliales, células del sistema inmunitario y fibroblastos que utilizan como ventaja para el tumor^{8,53}. Por ejemplo, pueden promover la creación de vasos sanguíneos hacia el tumor (angiogénesis), y mantener el ambiente inmunológicamente debilitado y aislado (**Fig. 14**).

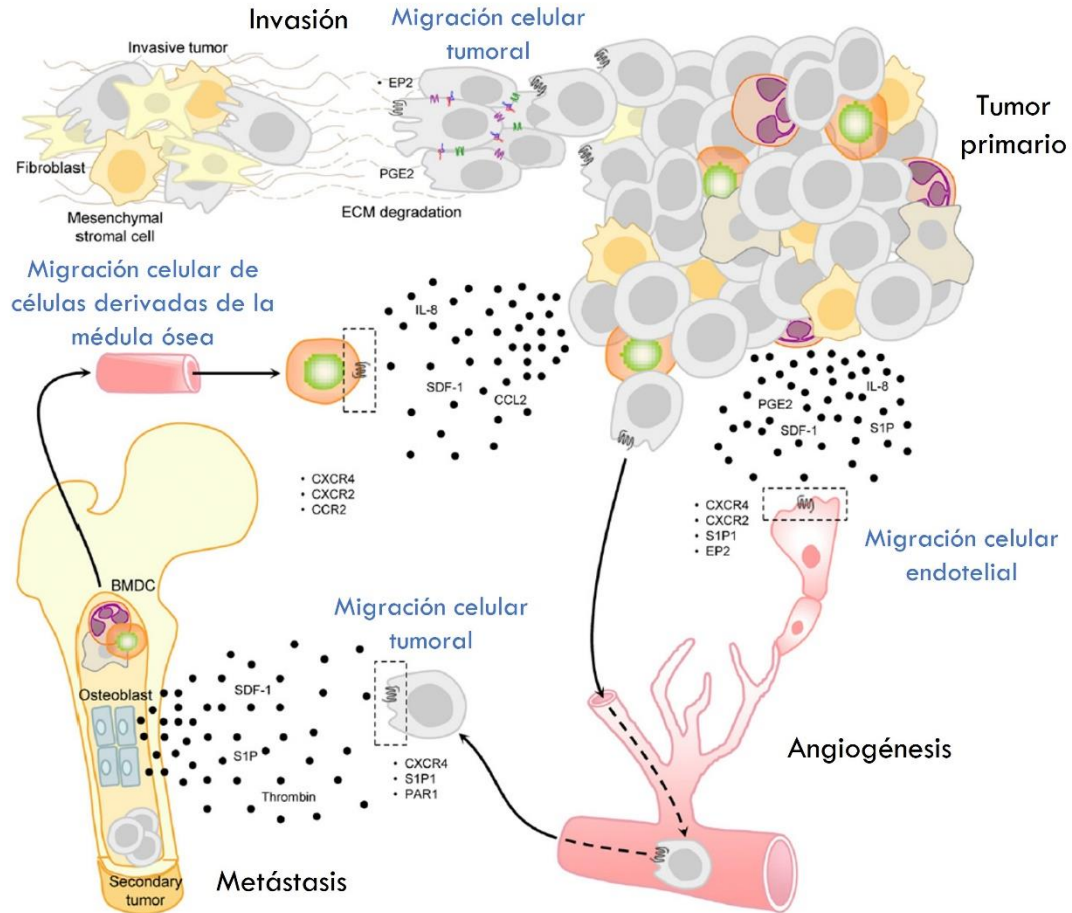


Figura 14 Las células cancerosas exacerban la migración celular. En el tumor primario se encuentran células cancerosas y del estroma, como células derivadas de la médula ósea, leucocitos y fibroblastos reclutados por las células malignas. En dicho reclutamiento, para hacerse de oxígeno y nutrientes, invadir nuevos tejidos y hacer metástasis, las células cancerosas promueven migración⁸ (Modificado de Vázquez-Prado, et al., 2016).

Las alteraciones en cáncer son diversas. Puede tratarse de mutaciones en oncogenes que establecen un contexto promigratorio mediante la hiperactividad de vías de señalización como la de PI3K/Akt/mTOR. Esto puede deberse desde mutaciones o amplificaciones de RTKs como HER2, mutaciones activantes en la subunidad catalítica de PI3K α (*PIK3CA*)^{54,55} o mutaciones desactivantes en *PTEN*^{56,57}. Con alguna de estas alteraciones es suficiente para la sobreactivación

de la vía de PI3K. En cambio, aunque Akt también puede encontrarse mutada (E17K) requiere de otros oncogenes⁵⁸.

Considerando otras proteínas que participan en migración, tenemos a los RhoGEFs y RhoGTPasas. A nivel de RhoGEFs las alteraciones consisten en proteínas muy activas o sobreexpresadas^{9,30,59}. Esto puede resultar problemático por la posición en la que se encuentran pues al ser activadores de las GTPasas de la familia de Rho, provocarían su actividad aberrante y consecuencias fenotípicas exacerbadas. Por ejemplo, P-Rex1 es un RacGEF que se encuentra sobreexpresado en cáncer de mama⁶⁰, próstata⁶¹ y melanoma⁶² lo que conlleva a migración dependiente de Rac y metástasis.

En mama se ha caracterizado la contribución de P-Rex1 en tumores ER+⁶⁰ y HER2+⁶³⁻⁶⁵, donde vía la activación de Rac⁶⁶ provoca motilidad, migración y metástasis⁶⁷. En cáncer de próstata P-Rex1 promueve migración celular e invasión en respuesta a EGF y SDF-1⁶¹ y puede generar resistencia al tratamiento antiVEGF-VEGFR⁶⁸. En melanoma, P-Rex1 contribuye a la progresión, invasión y metástasis debido a su alta expresión⁶².

Dado que P-Rex1 es un RacGEF sobreexpresado en algunos tipos de cáncer, que dada su estructura multidominio puede interactuar con varios de sus activadores y que se localiza en una posición estratégica, resulta un GEF de gran interés. En este proyecto investigamos la posibilidad hipotética de que P-Rex1 se desempeñe como plataforma para proteínas de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC2-Akt haciendo la señalización más eficiente, misma que lo activa y refleja el aspecto de efector.

II. Justificación

En cáncer de mama, melanoma, y próstata, P-Rex1 se encuentra sobreexpresado, promoviendo migración celular dependiente de la GTPasa Rac, que en un contexto quimiotáctico se acopla a la señalización de GPCRs-G_i-Gβγ. P-Rex1 posee una estructura multidominio capaz de asociarse con proteínas de la vía Gβγ-PI3Kγ-mTORC2-Akt en respuesta a SDF-1, por lo que resulta relevante caracterizar su cinética de organización y activación, con la finalidad de reconocer las distintas interfaces que se establecen y cuáles pueden ser inhibidas como parte de una estrategia farmacológica que considera a P-Rex1 como plataforma. Este concepto puede ser consolidado identificando acompañantes de señalización de P-Rex1 en bases de datos omicas de pacientes con distintos tipos de cáncer.

III. Hipótesis

P-Rex1 funciona como efector y plataforma de señalización de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC2-Akt estableciendo un mecanismo de control espaciotemporal, activado por receptores quimiotácticos. Además, el RacGEF puede integrar cascadas de señalización con repercusión en el pronóstico de pacientes con cáncer.

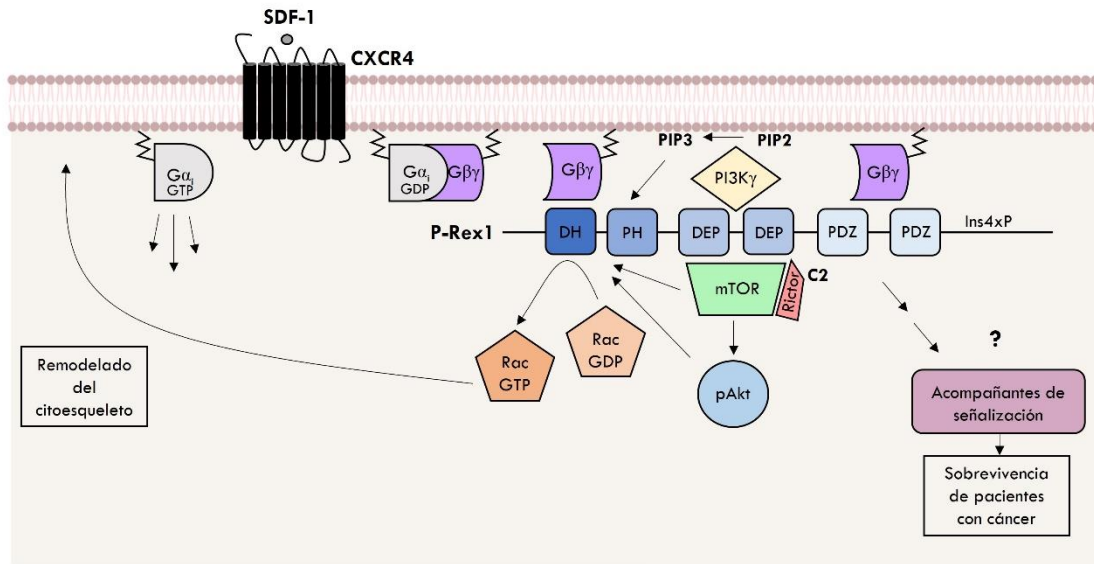


Figura 15 Modelo de P-Rex1 como plataforma y efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC2-Akt y en otras cascadas relevantes para la supervivencia. Con el estímulo SDF-1 se activan GPCRs quimiotácticos CXCR4 acoplados a G_i . Estos heterotrímeros liberan eficientemente subunidades $G\beta\gamma$ que reclutan a P-Rex1 vía los dominios PDZ. El GEF se va desenrollando gracias a la interacción de la PI3K γ con la región DEP1-PDZ2, el PIP₃, producido por la PI3K γ , con el PH y de más heterodímeros $G\beta\gamma$ por el lado del DH-PH. Con P-Rex1 extendido, la cinasa mTOR puede interactuar con los dominios DEP y fosforilar a su sustrato Akt para activar a P-Rex1 como GEF para la GTPasa Rac. P-Rex1 puede formar otras cascadas de señalización con significado en la evolución clínica de pacientes con diferentes tipos de cáncer.

IV. Objetivos

Objetivo General

Caracterizar a P-Rex1 como plataforma de señalización y efector de $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC2-Akt en respuesta al factor quimiotáctico SDF-1 y determinar los mecanismos de regulación a los que el complejo se encuentra sujeto, e identificar acompañantes de señalización de P-Rex1 que en conjunto correlacionen con la evolución clínica de pacientes con cáncer.

Objetivos Específicos

1. Determinar la dinámica de reclutamiento y activación de $G\beta\gamma$ y PI3K γ vía P-Rex1.
2. Estudiar a P-Rex1 como efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC2-Akt y determinar el tipo de regulación que ejercen sobre el GEF.
3. Identificar componentes de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K γ -mTORC2-Akt y acompañantes específicos de P-Rex1 como genes esenciales en líneas celulares de mama y su correlación con datos clínicos de pacientes con cáncer de mama.
4. Identificar acompañantes de señalización de P-Rex1 en pacientes con cáncer cuya sobrevivencia correlaciona con la expresión de *PREX1*.

V. Estrategia experimental

1. P-Rex1 como plataforma para la interacción Gβγ-PI3Kγ

Dado que P-Rex1 puede interactuar con Gβγ vía dos regiones: DH-PH y PDZ-PDZ⁴⁰, y que PI3Kγ puede asociarse a P-Rex1 a través del DEP-PDZ (Beltrán-Navarro, Tesis de maestría, 2018), se determinó si P-Rex1 puede ser un puente que acerque a Gβγ y PI3Kγ, si se forma un complejo ternario y si existe competencia en la asociación de los componentes. Se realizaron experimentos de pull-down de P-Rex1 (GST-P-Rex1) y de Gβγ (GST-Gβγ) para determinar los tipos de complejos formados.

2. P-Rex1 como plataforma y efector de la vía Gβγ-PI3Kγ-mTORC2-Akt1 y su regulación

Se evaluó si P-Rex1 puede ensamblar un complejo con Gβγ, PI3Kγ, mTORC2 y Akt y si depende del estímulo. Se compararon SDF-1 y HGF. Para verificar la contribución de P-Rex1 al ensamblado se hizo el knockdown del GEF y se evaluaron las interacciones y vías de señalización derivadas.

Para determinar que la señalización de la vía Gβγ-PI3Kγ-mTORC2-Akt consiste en un asa positiva hacia P-Rex1, se emplearon inhibidores de mTOR y Akt (rapamicina, torina y MK-2206) y se evaluó el grado de activación del RacGEF.

Se llevaron a cabo ensayos de ganancia de función al emplear a Akt constitutivamente activa (Myr-Akt) como último representante de la cascada y se evaluó su efecto hacia la activación de P-Rex1.

Para buscar posibles sitios consenso en P-Rex1 a ser fosforilados por Akt se empleó la plataforma Scansite (<https://scansite4.mit.edu/#home>) con un rigor medio de búsqueda. De acuerdo con estas predicciones, se evaluó si las distintas construcciones de P-Rex1 pueden ser fosforiladas y detectadas con el anticuerpo que reconoce sustratos fosforilados de Akt (psusAkt).

3. Algunas líneas celulares de cáncer de mama son vulnerables a la ausencia de P-Rex1, PI3K, mTORC2, Akt1 y un grupo de genes de señalización específicos

La vulnerabilidad de líneas celulares de cáncer de mama se exploró vía knockout, knockdown y uso de fármacos (<https://depmap.org/portal/>). Para evaluar la esencialidad de P-Rex1, PI3K, mTORC2 y Akt1 se buscó si el CRISPR de los genes de interés e inhibidores de cinasas afectaron la viabilidad de líneas celulares de cáncer de mama. Ambas estrategias contribuyen a confirmar el requerimiento del gen y de la actividad de la proteína. Para enriquecer la cascada con acompañantes de señalización se buscaron genes esenciales y exclusivos en líneas celulares dependientes de *PREX1* que no se encontraran en líneas celulares no dependientes de *PREX1* y se correlacionaron con muestras de pacientes de carcinoma de mama invasivo (BRCA) del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA, <https://www.cbioportal.org/>).

4. Acompañantes de señalización de P-Rex1 en pacientes con cáncer cuya supervivencia correlaciona con la expresión de *PREX1*

Para determinar los tipos de cáncer en los que la alta expresión de P-Rex1 correlaciona con baja supervivencia de pacientes con cáncer se analizó la expresión de *PREX1* en los 32 estudios del TCGA (<https://www.cbioportal.org/>) y se analizaron las curvas de supervivencia de *PREX1* en la plataforma Oncolnc (<http://www.oncolnc.org/>). Se identificaron los acompañantes de señalización exclusivos que correlacionaron con *PREX1* y se validaron como firma transcripcional.

VI. Métodos

Modelos celulares

Se emplearon tres líneas celulares distintas: MCF7, células epiteliales de adenocarcinoma mamario no metastásicas; COS-7, células renales de mono tipo fibroblastos para transfectar a P-Rex1 completo y construcciones del RacGEF; y HEK293T, células epiteliales renales para transfectar la mayoría de los plásmidos.

Los stocks p100 de MCF7, COS-7 y HEK293T se mantuvieron en 10 mL de medio completo, que se obtuvo al suplementar 450 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Merck D-7777) con 50 mL de suero fetal bovino (FBS, BYPRODUCTOS 90020500) y 5 mL de antibiótico-antimicótico (Anti-anti 100X, Gibco 15240-062).

Para resemenbrar los stocks y dividir las células para experimentos, se lavaron las cajas p100 con 4 mL de PBS 1X estéril (Merck D5773), se retiró el PBS y se agregó 1 mL de tripsina-EDTA 1X (Sigma T3924), se dejó actuar según el tipo celular (MCF7 y COS-7: 7 minutos, HEK293T: 1 minuto). Para neutralizar la tripsina se agrega medio completo:

Para cajas p100, se agregan 4mL para obtener una dilución 1:5, se coloca 1 mL en una nueva caja p100 con 10 mL de medio completo para mantener el stock y el resto del volumen puede utilizarse para 4 cajas p100 para experimento.

Para preparar cajas p60 para experimento se agregan 10 mL de medio completo, de la dilución 1:11 se coloca 1 mL del inóculo en 3 mL de medio completo.

Para una caja de 6 pozos (p35) se toma 1 mL de una dilución 1:5 y se disuelven en 7 mL de medio completo, de esta dilución 1:8 se coloca 1 mL del inóculo en 1 mL por pozo.

Plásmidos

Se emplearon los siguientes plásmidos:

pCEFL-GST-G β_1 , pCEFL-3XFlag-G β_1 , pCEFL-G γ_2 , pcDNA3-EE-PI3K γ -p110 γ , pcDNA3-EE-PI3K γ -p101, pEF1HisA-PI3K α -p110 α , pEF1HisC-PI3K β -p110 β , pcDNA3-p85 α , pCEFL-GST, pCEFL-GST-P-Rex1-DH-PH, pCEFL-GST-P-Rex1-DEP1-DEP2, pCEFL-GST-P-Rex1-PDZ1-PDZ2, pCEFL-GST-P-Rex1-DEP1-PDZ2, pCEFL-GST-P-Rex1-DEP1, pCEFL-3XFlag-P-Rex1-Nter, pCEFL-EGFP-CAAX, pCEFL-EGFP-P-Rex1-DH-PH-CAAX, pCEFL-Flag-P-Rex1, pCEFL-HA-Myr-Akt.

Anticuerpos

Cell Signaling Technology: P-Rex1, 13168S; PI3 Kinase p110 α , 4249; PI3 Kinase p110 β , 3011; PI3 Kinase p101, 5569; PI3 Kinase p110 γ , 4252; Rictor, 2114; p-Akt1/2/3, 9271; psusAkt, 9614; p-ERK1/2 (T202/Y204), 9101, p-PRAS40, 2997; PRAS40, 2691; p-S6, 2215. *Sigma*: Akt1, P2482. *Santa Cruz Biotechnology*: P-Rex1, sc-85806; GST, sc-138; G β_1 , sc-166123; ERK2, sc-154; p-Akt1/2/3 (Ser473), sc-7985-R; S6, sc-74459; GFP: sc-9996. *Bethyl*: Rictor, A300-459A. *KPL*: anti-mouse, 074-1802; anti-rabbit, 074-1516.

Diluciones de anticuerpos

Anticuerpo primario	Dilución
P-Rex1	1: 1000
p110 α	1: 5000
p110 β	1: 5000
p101	1: 5000
p110 γ	1: 5000
G β_1	1: 500 - 1:5000
Rictor	1: 1000
psusAkt	1: 5000
p-Akt1/2/3 (Ser473)	1: 5000
Akt1	1: 5 000
p-ERK1/2 (T202/Y204)	1: 10 000
ERK2	1: 10 000
p-S6	1: 5000
S6	1: 5 000

Anticuerpo primario	Dilución
GST	1: 1000
EGFP	1: 500
Flag	1: 5000
Anticuerpo secundario	Dilución
anti-mouse	1:10 000 – 1: 40 000
anti-rabbit	1:10 000 – 1: 40 000

Mapeo P-Rex1-PI3K γ

1. Preparar caja de seis pozos: incubar con poli-D-Lisina durante 15 minutos, lavar con PBS 1X, agregar 1 mL de medio completo y colocar 1 mL de la suspensión de células HEK293T.
2. Transfección con PEI 1X

*Realizar mezclas de plásmidos: en 75 μ L de medio de ayuno (DMEM sin suero, ni antibiótico) por condición.

Pool de subunidades de PI3K γ (p110 γ , p101 500 ng/p35).

Mapeo 1: GST (50 ng/p35), GST-N ter (500 ng/p35), GST-C ter (1000 ng/p35).

Mapeo 2: GST (50 ng/p35), GST-N ter (500 ng/p35), GST-DH-PH (750 ng/p35), GST- DEP1-PDZ2 (250 ng/p35).

Mapeo 3: GST (50 ng/p35), GST- DEP1-PDZ2 (500 ng/p35), GST-DEP1 (500 ng/p35), GST-DEP2 (500 ng/p35), GST-PDZ1 (250 ng/p35) y GST-PDZ2 (250 ng/p35).

*Realizar mezcla de PEI: en 75 μ L de medio de ayuno agregar 6 μ L de PEI por condición (calentar a 70°C dos minutos antes de usar).

*Agregar mezcla de PEI a cada condición e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
3. Preparar células para transfección: lavar con 2 mL de PBS 1X y agregar 1 mL de medio de ayuno.
4. Agregar mezcla de transfección y dejar toda la noche.
5. Al día siguiente, retirar medio de transfección y agregar 2 mL de medio completo.
6. Ayunar con 2 mL de medio de ayuno por pozo durante 16 horas.

7. **Lisis***

- Incubar con 500 μ L de buffer de lisis suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (aprotinina (A-1153), leupeptina (L-2884), ortovanadato de sodio (S-6508), fluoruro de sodio (S-7920), β -glicerol fosfato (G-9422) y PMSF (P-7626)) durante 5 minutos y lisar el pozo raspando con paleta durante 30 segundos.
8. Resuspender el lisado celular tres veces con la micropipeta y recolectar en tubos eppendorf previamente etiquetados.
 9. Centrifugar a 4°C, 13 000 rpm, 10 minutos.
 10. Repartir 100 μ L del lisado en tubos eppendorf con 34 μ L de buffer de muestra Laemmli 4X previamente colocado y los 400 μ L restantes se colocan en tubos eppendorf con 30 μ L de perlas de glutatión sefarosa (GE Healthcare, cat. 17-0756-05) para **pull-down***.
 11. Incubar el pull-down en hielo y shaker (“rocking”) durante 45 minutos.
 12. Centrifugar a 5000 rpm durante dos minutos a 4°C.
 13. Aspirar el sobrenadante cuidando no succionar el pellet, agregar 1 mL de buffer de lisis suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas y repetir dos veces más para un total de tres lavados.
 14. Agregar 30 μ L de buffer de muestra Laemmli 1X a cada tubo y junto con los tubos de lisado total hervirlos durante 5 minutos, centrifugarlo durante 5 minutos y guardar a -20°C hasta correr el **western blot*** (minigel bifásico 8%/10%).

P-Rex1 puede interactuar con otras PI3Ks

1. Preparar cuatro pozos de una caja de seis pozos con células HEK293T.
2. Transfección con Turbofect

Mezclar plásmidos en 200 μ L de medio de ayuno por condición.

*Pull-down de PI3K β : transfectar ambas subunidades de PI3K β para dos condiciones (p110 β , p85 α , 500 ng/p35).

*Pull-down de PI3K γ : transfectar ambas subunidades de PI3K γ para dos condiciones (p110 γ , p101, 500 ng/p35).

Dividir el volumen en dos, agregar GST a la condición uno (50 ng/p35) y GST-P-Rex1-DEP1 (500 ng/p35) a la condición dos.

3. Agregar Turbofect (2 μ L/p35) a cada condición e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
4. Preparar células para transfectar y agregar mezcla, incubar durante 16 horas.
5. Al día siguiente retirar medio de transfección y agregar 2 mL de medio completo.
6. Ayunar con 2 mL de medio de ayuno por pozo durante 16 horas.
7. **Lisis***
8. **Pull-down***
9. **Western blot***

Efecto de G $\beta\gamma$ en la interacción P-Rex1-PI3K γ

1. Preparar tres cajas p35 con células HEK293T para transfectar.
2. Transfección con PEI 1X

*Realizar mezclas de plásmidos: en 75 μ L de medio de ayuno por condición. Pool de subunidades de PI3K γ (p110 γ , p101, 500 ng/p35).

Mezclar y dividir volumen en tres tubos. Agregar GST (50 ng/p35) a la primera condición, GST-DEP1 (500 ng/p35) a la segunda y tercera condición y 3XFlag-G β_1 y G γ_2 solo en la tercera condición (250 ng/p35).

*Realizar mezcla de PEI: en 75 μ L de medio de ayuno agregar 6 μ L de PEI por condición (calentar a 70°C dos minutos antes de usar).

*Agregar mezcla de PEI a cada condición e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

3. Preparar células para transfección: lavar con 2 mL de PBS 1X y agregar 1 mL de medio de ayuno.
4. Agregar mezcla de transfección y dejar toda la noche.
5. Al día siguiente, retirar medio de transfección y agregar 2 mL de medio completo.

6. Ayunar con 2 mL de medio de ayuno por pozo durante 16 horas.
7. **Lisis***
8. **Pull-down***
9. **Western blot***

P-Rex1 como plataforma para PI3K γ y G $\beta\gamma$

1. Preparar caja de seis pozos con células HEK293T.
2. Transfección con Turbofect (Thermoscientific R0531)
Mezclar plásmidos en 200 μ L de medio de ayuno por condición.
*Pull-down de P-Rex1 (cuatro condiciones): transfectar GST-P-Rex1-N ter para cuatro condiciones (500 ng/p35). Transfectar G $\beta\gamma$ en las condiciones dos y cuatro: 3XFlag-G β_1 (250 ng/p35), G γ_2 (250 ng/p35). Transfectar ambas subunidades de PI3K γ (p110 γ , p101 500 ng/p35) en las últimas dos condiciones.
*Pull-down de G $\beta\gamma$ (cinco condiciones): transfectar GST-G β_1 y G γ_2 en las condiciones dos a cuatro (250 ng/p35). Transfectar 3XFlag-P-Rex1-Nter en las últimas tres condiciones (250 ng/p35). Transfectar ambas subunidades de PI3K γ (p110 γ , p101 250 ng/p35) en las primeras tres condiciones.
3. Agregar Turbofect (2 μ L/p35) a cada tubo e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
4. Preparar células para transfectar, agregar mezcla de transfección e incubar durante 16 horas.
5. Al día siguiente retirar medio de transfección y agregar 2 mL de medio completo.
6. Ayunar con 2 mL de medio de ayuno por pozo durante 16 horas.
7. **Lisis***
8. **Pull-down***
9. **Western blot***

Ensayo de activación de P-Rex1

1. Preparar caja de 6 pozos con células MCF7 (1 mL de una suspensión 1:7 en 1 mL de medio completo por pozo).
2. Ayunar durante 24 horas con 1.5 mL de medio de ayuno por pozo.
3. Estimular con 1.5 mL de medio de estímulo 2X: 1.5 mL con 30 μ L de SDF-1 ([50 ng/ μ L], Peprotech, cat. 300-28A) sobre el medio de ayuno. Para una curva de activación se inició con el tiempo más largo hasta el más corto para lisar en conjunto. Los tiempos de estímulo fueron 60, 30, 15, 5 y 2 minutos.
4. Proceder a **lisis***.
5. **Pull-down*** de 1 hora con 30 μ L de perlas GST-RacG15A para aislar la fracción de P-Rex1 activa.
6. **Western blot***

Inmunoprecipitación de P-Rex1 y p110 β

1. Preparar 3 cajas p100 con células MCF7.
2. Ayunar durante 24 horas con 10 mL de medio de ayuno.
3. Preparar medio de estímulo (1X)
 - *SDF-1: 6 mL de medio de ayuno y 60 μ L de SDF-1 [50 ng/ μ L].
 - *SDF-1 vs HGF: 3 mL de medio de ayuno y 30 μ L de SDF-1 [50 ng/ μ L].
3 mL de medio de ayuno y 30 μ L de HGF-1 [50 ng/ μ L]
(R&D Systems, cat. 294-HGN).
4. Retirar medio de ayuno y estimular con 3 mL de medio de estímulo:
 - *SDF-1: durante 15 minutos (caja 3) y pasados diez minutos estimular durante 5 minutos (caja 2) para lisar en conjunto.
 - *SDF-1 vs HGF: durante 15 minutos (caja 2 y 3).
5. Lisar con 2 mL por caja de buffer de lisis-CHAPS 0.3% (Sigma C-3023) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (incubar durante 5 minutos, raspar durante 1 minuto).
6. Centrifugar a 4°C ,13 000 rpm, 10 minutos.
7. Repartir 100 μ L para lisado total, 950 μ L para incubar con 10 μ L anti P-Rex1 (sc-85806) y 950 μ L para incubar con 1 μ L anti p110 β (CST 3011). Hervir los

tubos de lisado total durante 5 minutos tras colocar el buffer de muestra Laemmli 4X y centrifugar durante 5 minutos para guardar a -20°C . Para inmunoprecipitar a P-Rex1 y p110 β colocar parafilm a los tubos, colocar en hielo e incubar toda la noche.

8. Al día siguiente preparar tubos con 30 μL de proteína A/G (Protein A Agarose M16-125, Protein G Agarose fast flow M16-266) para la inmunoprecipitación de P-Rex1 y 30 μL de proteína A para la inmunoprecipitación de p110 β . Incubar durante 4 horas y proceder con los tres lavados con buffer de lisis suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas.

9. **Western blot***

Knockdown de P-Rex1

1. Apartar una caja de 6 pozos para células MCF7 que se noquearán por transfección reversa.
2. Se requieren preparar tres mezclas de transfección (mix):
Mix 1: 250 μL de OptiMEM (Gibco 31985-070) y 3 μL de Lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen, cat. 56532) por pozo (6 pozos).
Mix 2: 250 μL de OptiMEM y 12 μL de esiRNA GFP (Sigma-Aldrich, EHUEGFP) por pozo (3 pozos).
Mix 3: 250 μL de OptiMEM y 12 μL de esiRNA P-Rex1 (Sigma-Aldrich, EHU136571) por pozo (3 pozos).
3. Se mezclan los tubos y se reparte a la mitad el volumen del Mix 1 a los Mix 2 y Mix 3, estos complejos se incubarán en la caja de 6 pozos (500 μL por pozo) a temperatura ambiente durante 20 minutos.
4. Pasados los 20 minutos se dividen las células MCF7, a diferencia de la resiembra común, se utilizan 4 mL de DMEM con suero fetal bovino al 5% sin antibiótico-antimicótico para la resuspensión y se colocan 250 μL por pozo.
5. Se agitan los complejos con la suspensión celular y se incuban toda la noche.
6. Al día siguiente se retira el medio de transfección, se lava con 1 mL de PBS 1X por pozo y se agregan 2 mL de medio completo por pozo. Las células se procesarán 72 horas después.

7. Ayunar por 24 horas: se lavan los pozos con 1 mL de PBS 1X y se agregan 2 mL de medio de ayuno.
8. Al día siguiente se preparan los estímulos 1X: 1 mL de medio de ayuno con 10 μ L de SDF-1 o HGF ([50 ng/ μ L]) por pozo, se incuban durante 15 minutos.
9. Retirar el medio de ayuno de los pozos que serán estimulados y posteriormente se agregan los estímulos 1X y se incuban durante 15 minutos.
10. Proceder con **lisis***
11. **Pull-down*** de P-Rex1 activo con 30 μ L de perlas recombinantes GST-RacG15A durante 1 hora.
12. **Western blot***

Tratamiento crónico con Rapamicina

Del stock de Rapamicina (Sigma R0395) de 2000 ng/mL se requieren 10 μ L/mL para obtener una concentración de trabajo de 20 ng/mL y se deja actuar durante 24 horas.

1. Preparar caja de 6 pozos con células MCF7 (1 mL de una suspensión 1:7 en 1 mL de medio completo por pozo).
2. Ayunar durante 24 horas
 - *DMSO (Sigma D2650): 1.5 mL de medio de ayuno con 15 μ L de DMSO 100X por pozo (tres condiciones).
 - *Rapamicina: 1.5 mL de medio de ayuno con 15 μ L de Rapamicina 100X por pozo (tres condiciones).
3. Al día siguiente, estimular con medio de estímulo 2X sobre el medio de ayuno:
 - *SDF-1: 1.5 mL con 30 μ L de SDF-1 [50 ng/ μ L].
 - *HGF: 1.5 mL con 30 μ L de HGF [50 ng/ μ L].
4. Proceder a **lisis***.
5. **Pull-down*** de 1 hora con 30 μ L de perlas GST-RacG15A para aislar la fracción de P-Rex1 activa.

6. Western blot*

Mapeo de fosforilaciones de P-Rex1 por Akt1

1. Preparar una caja de 6 pozos con células HEK293T para transfectar al día siguiente.
2. Preparar mezclas de plásmidos en 200µL de medio de ayuno:
 - *Pull-down tándems de P-Rex1: GST-DH-PH (750 ng/p35), GST-DEP-DEP (500 ng/p35) y GST-PDZ-PDZ (250 ng/p35) por pozo (dos pozos). Dividir el volumen en dos partes y compensar una serie (tubos 1, 3 y 5) con plásmido vacío pCEFL (500 ng/p35) y agregar a la otra serie HA-Myr-Akt (500 ng/p35) (tubos 2, 4 y 6).
 - *Pull-down de P-Rex1-DEPs: HA-Myr-Akt (250 ng/p35) por condición (cuatro condiciones), mezclar y repartir en cuatro tubos. Agregar GST en la primera condición (50 ng/p35). Agregar GST-P-Rex1-DEP-DEP (1000 ng/p35) en el tubo dos, GST-P-Rex1-DEP1 (500 ng/p35) en el tubo tres y GST-P-Rex1-DEP2 (500 ng/p35) en el tubo cuatro.
3. Agregar 2 µL de Turbofect por condición e incubar durante 16 horas.
4. Al día siguiente retirar el medio de transfección y agregar 2 µL de medio completo.
5. Ayunar las células, lavar con 1mL de PBS 1X por pozo y agregar 2 mL de medio de ayuno. Incubar durante 16 horas.

6. Lisis*

7. **Pull-down*** con 30 µL de glutatión sefarosa por tubo durante 45 minutos.

8. Western Blot*

Ensayo de ganancia de función con Myr-Akt

P-Rex1-DH-PH

1. Preparar dos cajas p35 con células COS-7 para transfectar.

2. Preparar pool de cDNA de P-Rex1 con 200 μ L de medio de ayuno y 250 ng del plásmido EGFP-P-Rex1-DH-PH-CAAX por pozo, mezclar y dividir el volumen a la mitad, compensar el tubo uno con 125 ng de plásmido pCEFL vacío y agregar 125 ng del plásmido HA-Myr-Akt al tubo dos.
3. Agregar 2 μ L de Turbofect por condición e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
4. Durante este tiempo preparar las células para agregar los complejos de transfección. Lavar con 1 mL de PBS 1X por pozo y agregar 2 mL de medio completo.
5. Agregar los 200 μ L de los complejos e incubar toda la noche.
6. Al día siguiente retirar el medio de transfección y agregar 1 mL de medio completo.
7. Ayunar 16 horas con 2 mL de medio de ayuno por pozo.
8. **Lisis***
9. **Pull-down*** con 30 μ L de perlas recombinantes RacG15A durante 1 hora.
10. **Western blot***

P-Rex1 completo

1. Preparar cuatro cajas p60 con células COS-7 para transfectar.
2. Preparar pool de cDNA de P-Rex1 con 500 μ L de medio de ayuno y 1000 ng del plásmido Flag-P-Rex1 por caja (cuatro cajas), mezclar y dividir el volumen a la mitad, compensar el tubo uno con plásmido pCEFL vacío (250 ng/p60, condiciones uno y tres) y agregar el plásmido HA-Myr-Akt al tubo dos (250 ng/p60, condiciones dos y cuatro).
3. Agregar 2 μ L de Turbofect por condición e incubar durante 15 minutos.
4. Durante este tiempo preparar las células para agregar los complejos de transfección. Lavar con 1 mL de PBS 1X por pozo y agregar 2 mL de medio completo.
5. Agregar los 500 μ L de complejos e incubar toda la noche.

6. Al día siguiente retirar el medio de transfección y agregar 1 mL de medio completo.
7. Ayunar 16 horas con 2 mL de medio de ayuno.
8. Agregar el inhibidor MK-2206 (sc-364537) en las cajas tres y cuatro (2 μ L/mL), dejar actuar durante dos horas.

*El stock de MK-2206 se encuentra a 1mM en DMSO por lo que se requieren 2 μ L/mL para obtener una concentración de trabajo de 2 μ M.

9. **Lisis***
10. **Pull-down*** con 30 μ L de perlas recombinantes RacG15A durante 1 hora.
11. **Western blot***

Efecto de activadores de P-Rex1 en su función de plataforma y efector

1. Preparar cuatro cajas p60 con células COS-7 para transfectar.
2. Preparar pool de cDNA de P-Rex1 con 500 μ L de medio de ayuno y 1000 ng de Flag-P-Rex1 por caja (cuatro cajas), mezclar y dividir el volumen en cuatro tubos. Agregar 3xFlag-G β_1 y G γ_2 (750 ng/p60) a los tubos dos y cuatro y HA-Myr-Akt (250 ng/p60) al tubo tres y cuatro. Compensar los tubos uno, dos y tres con plásmido pCEFL vacío.
3. Agregar 6 μ L de Turbofect por condición e incubar durante 15 minutos.
4. Preparar las células para agregar los complejos de transfección. Lavar con 1 mL de PBS 1X por pozo y agregar 2 mL de medio completo.
5. Agregar los 500 μ L de complejos e incubar toda la noche.
6. Al día siguiente retirar el medio de transfección y agregar 3 mL de medio completo.
7. Ayunar 16 horas con 5 mL de medio de ayuno.
8. **Lisis***
9. **Pull-down*** de P-Rex1 activo con 30 μ L de perlas recombinantes RacG15A durante 1 hora.
10. **Western blot***

Dependencias de genes y fármacos

Dada la expresión de P-Rex1 en células de cáncer de mama exploramos la plataforma Depmap (<https://depmap.org/portal/>). A partir de los datos de esencialidad por CRISPR pudimos filtrarlos a genes específicos que participan en una cascada de señalización particular: P-Rex1-PI3K-mTORC2-Akt1.

La version DepMap 21Q2 Public+Score (CERES) contenía información de 43 líneas celulares. A partir del efecto del CRISPR de *PREX1* se determinó un punto de corte cercano a -0.5 y se seleccionaron cinco líneas celulares donde *PREX1* fue esencial, estas cinco líneas celulares también se identificaron en las nubes de distribución de los estadísticos T de genes de la cascada, como *PREX2*, *PIK3CA*, *PIK3CB*, *PIK3CG*, *MTOR*, *RICTOR*, *AKT1*, *AKT2* y *AKT3*.

Para investigar cuáles actividades son esenciales en el contexto de líneas celulares de cáncer de mama se exploró en la plataforma DepMap el efecto de diferentes fármacos.

Expresión de ARNm de líneas celulares

Para validar los efectos por CRISPR y fármacos se exploraron los niveles de expresión de transcritos de los genes de interés. Se descargaron los datos de expresión 21Q2 Public ($\log_2(\text{TPM}+1)$) del portal Depmap para cuatro de las cinco líneas celulares donde *PREX1* fue esencial (OCUBM no posee datos de expresión) y se ordenaron de mayor a menor nivel de acuerdo con los valores de *PREX1*.

Para analizar la correlación entre la expresión de los transcritos y el efecto de su respectivo CRISPR se empleó el portal Depmap donde se calcularon los coeficientes de Pearson.

Acompañantes de señalización de *PREX1*

Nos propusimos identificar genes de señalización co-esenciales, genes cuyo noqueo fuera relevante junto con el de *PREX1*, y que fueran acompañantes exclusivos. Para ello designamos dos grupos de líneas celulares de cáncer de

mama como dependientes e independientes al CRISPR de *PREX1* de acuerdo con los valores del estadístico T cercanos a -0.5. Con valores más negativos fueron líneas donde *PREX1* fue esencial y con valores positivos donde *PREX1* no fue esencial.

Además del criterio de co-esencialidad en alguna de las cinco líneas celulares dependientes de *PREX1*, se correlacionó con la información de pacientes del estudio de carcinoma de mama invasivo (BRCA) del TCGA (https://www.cbioportal.org/study/summary?id=brca_tcg_pan_can_atlas_2018). Se tomó en cuenta la correlación de los genes co-esenciales con la expresión de *PREX1* en las muestras de pacientes y que tuvieran un buen nivel de expresión del transcrito en dichas muestras.

Marcadores de tipos celulares

Los 24 genes de señalización, co-esenciales y acompañantes exclusivos de *PREX1* conformaron una firma transcripcional cuya correlación con marcadores de células de cáncer de mama se comparó con la de *PREX1*. Los genes designados para los tipos celulares fueron *ESR1* y *ERBB2* para células epiteliales, *CD3G* (células T), *MS4A1* (células B) y *CD14* (macrófagos) para células inmunitarias y *HTRA1* (fibroblastos) para células del estroma.

Fosfoproteómica y enriquecimiento de vías de señalización de la firma transcripcional

A partir de los genes de señalización esenciales y exclusivos y genes esenciales compartidos se filtraron los que además estuvieran como proteínas fosforiladas en muestras de pacientes (RPPA, TCGA).

Resultaron 15 genes esenciales con proteínas fosforiladas en pacientes que junto con *PREX1* se sometieron como firma transcripcional a Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) para determinar el enriquecimiento de vías de señalización establecidas.

Acompañantes de señalización de P-Rex1 en pacientes con cáncer cuya supervivencia correlaciona con la expresión de *PREX1*

Para determinar en cuáles contextos cancerosos *PREX1* es relevante para el pronóstico de pacientes, se analizaron 21 estudios disponibles del TCGA en la plataforma OncoPrint (<http://www.oncolnc.org/>). Se segregaron los pacientes de acuerdo con la media de expresión (50:50) de *PREX1*.

Los estudios donde hubo correlación con la supervivencia continuaron al análisis de expresión de ARNm (cBioportal-TCGA) y esencialidad (Depmap).

En cBioportal se descargaron los datos de expresión de *PREX1* (RSEM (Batch normalized from Illumina HiSeq_RNASeqV2)) de los estudios LGG, LAML, KIRC y LUAD. Respecto al efecto del CRISPR de *PREX1* se buscaron líneas celulares representativas de esos cuatro estudios del TCGA.

Para seleccionar el estudio con mayor correlación entre la alta expresión de *PREX1* y baja supervivencia, se compararon los valores estadísticos, y se seleccionó el estudio LGG para profundizar en la búsqueda de acompañantes esenciales de *PREX1*. Se exploraron genes y actividades esenciales en la línea celular 42MGBA, representativa de glioma. De los genes blanco encontrados se buscó si existía correlación entre su alta expresión y la de *PREX1* en pacientes con LGG (TCGA).

Para explorar la posibilidad de alteraciones (mutaciones, deleciones, amplificaciones) relacionadas con la alta expresión de *PREX1*, se comparó la tasa de alteración de los diez genes principales segregando a los pacientes con LGG en baja y alta expresión de *PREX1*. De acuerdo con los genes alterados exclusivamente en pacientes con alta expresión de *PREX1* se comparó la expresión del ARNm de P-Rex1 al separar a los pacientes según su estado silvestre y alterado (mutado, amplificado, eliminado).

Para identificar acompañantes de señalización coexpresados con *PREX1* exclusivamente, se identificaron los genes que participan en señalización, si

correlacionaban con *PREX1* en el grupo de baja o alta expresión, o en ambos y que tuvieran una diferencia de al menos 0.05 al comparar los coeficientes de correlación de Spearman con la expresión de *PREX1*. Se aplicaron estos filtros para diferentes proteínas de señalización, como agonistas y receptores, cinasas y fosfatasas, y demás proteínas con dominios de señalización.

Se determinó si genes de alguna categoría o subcategoría de señalización se enriquecieron en el grupo de alta expresión de *PREX1*. Se comparó el número de genes encontrados en el cuartil superior con el número de genes esperado en una cuarta parte del total de genes. Un valor superior a uno indicaría que se encontraron más genes que lo esperado y, por lo tanto, habría un enriquecimiento.

De los genes de señalización correlacionados con *PREX1* exclusivamente en el grupo de alta expresión se buscaron cuáles de ellos también correlacionan con baja sobrevivencia cuando se dividen los pacientes con LGG por su media de expresión. Un comportamiento similar al de *PREX1* podría guiar a la formación de una firma transcripcional relevante en LGG que pudiera correlacionar con un peor pronóstico para los pacientes.

Validación de la firma transcripcional

PREX1 y los genes de señalización que cumplieron los criterios de coexpresión se probaron como una firma transcripcional en el estudio de LGG (TCGA). En la plataforma [Kaplan-Meier plotter](http://www.kmplot.com/analysis/index.php?p=service&cancer=custom_plot#) (http://www.kmplot.com/analysis/index.php?p=service&cancer=custom_plot#) se analizó si la firma transcripcional correlaciona con menor sobrevivencia de acuerdo con el riesgo acumulado. Los resultados fueron validados usando datos de otro grupo de pacientes no relacionado (datos del Chinese Glioma Genome Atlas, CGGA, <http://www.cgga.org.cn/>).

Para probar el poder predictivo de la firma transcripcional encontrada en LGG, se comparó el grado de correlación de los acompañantes de señalización con *PREX1* en los 31 estudios restantes del TCGA. Se evaluó si la firma transcripcional representa mayor riesgo acumulado.

Correlación de la firma transcripcional con marcadores de tipos celulares cerebrales

Se identificaron genes que representen a los diferentes tipos celulares en los tumores cerebrales de acuerdo con marcadores reconocidos y utilizados en RNASeq. Para marcadores de células cerebrales se establecieron *GFAP* para astrocitos, *MBP* para oligodendrocitos, *TMEM119* para microglía y *ALDH1A1* para células cancerosas troncales. Para marcadores de células del estroma se utilizaron *PECAM1* para células del endotelio, *PTPRC* para células inmunitarias, *ITGAM* para macrófagos, *CSPG4* para pericitos y *EPCAM* para células epiteliales⁶⁹⁻⁷¹. Se comparó el grado de correlación de *PREX1* y sus genes de señalización acompañantes con cada uno de los marcadores.

Se realizó un análisis de correlación recíproco, entre los marcadores de las poblaciones cerebrales y marcadores específicos de macrófagos, células T y endoteliales, que resultaron exclusivos, con *PREX1* al segregar a los pacientes con baja y alta expresión de este.

Se analizó el puntaje de poblaciones inmunitarias y estromales establecidas por el algoritmo ESTIMATE (cBioportal) de los pacientes con baja y alta expresión de *PREX1* en LGG. Se utilizaron otros algoritmos que determinan proporciones de poblaciones celulares para analizar la de macrófagos y linfocitos T por XCELL, TIMER y EPIC (<http://timer.comp-genomics.org/>) y determinar si representan un mayor riesgo para la sobrevivencia de los pacientes en LGG.

Análisis estadístico

Las pruebas t de Student no pareadas con corrección de Welch, ANOVA de una vía seguida de comparaciones múltiples Dunnett o Tukey y las pruebas log-rank (Mantel-Cox) se realizaron en GraphPad Prism (6.01). Los modelos multivariados de riesgos proporcionales se analizaron en la plataforma KM plotter/Custom (http://www.kmplot.com/analysis/index.php?p=service&cancer=custom_plot#)

VII. Resultados

PI3K γ interactúa con el amino terminal de P-Rex1

P-Rex1 es un RacGEF multidominio con variadas interacciones reportadas, como la de su dominio PH con el segundo mensajero lipídico PIP₃ producido por PI3Ks de clase I⁷².

Para determinar si existe una interacción entre la PI3K γ con P-Rex1 se mapearon distintas regiones del RacGEF. Se compararon las regiones amino y carboxilo terminal, al realizar el pull-down de estas construcciones se encontró que la subunidad catalítica p110 γ y la subunidad p101 interactúan específicamente con el amino terminal de P-Rex1 (**Fig. 16A**).

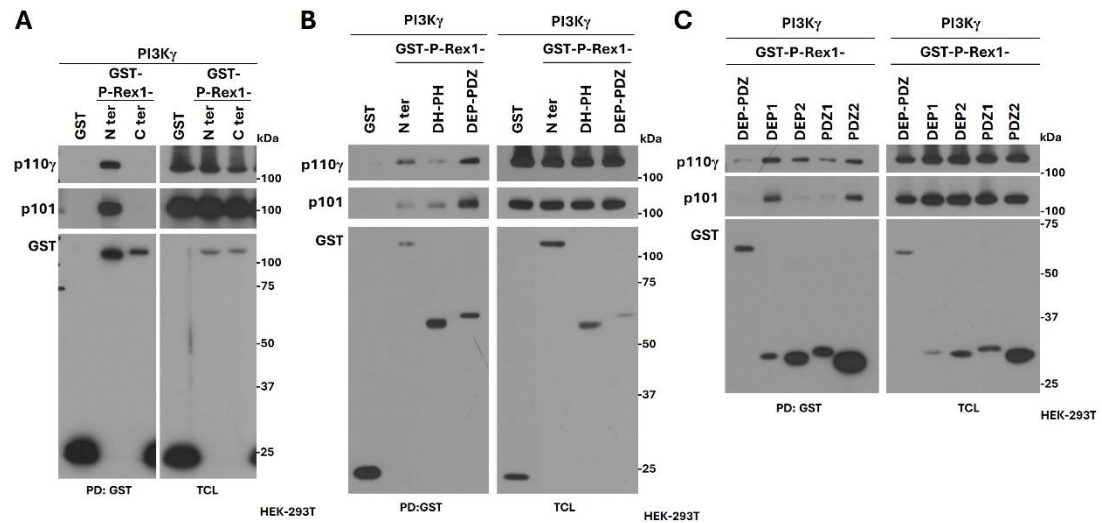


Figura 16 PI3K γ interactúa con el dominio DEP1 de P-Rex1.

A, PI3K γ interactúa con el amino terminal de P-Rex1 (n=3). **B**, PI3K γ interactúa con la región DEP-PDZ de P-Rex1 (n=3). **C**, PI3K γ interactúa con los dominios DEP1 y PDZ2 (n=2). Se transfectoron las subunidades de PI3K γ (p110 γ y p101) y las diferentes construcciones de GST-P-Rex1 en células HEK293T para realizar los mapeos. Manuscrito en preparación, Beltrán-Navarro, et al., 2023.

La región amino terminal contiene los dominios DH, PH, DEP-DEP y PDZ-PDZ en tándem y para encontrar regiones de interacción menores, se dividió el amino terminal en el casete catalítico DH-PH y la región DEP1-PDZ2. Se observó una

mayor asociación de las subunidades de PI3K γ con la construcción DEP1-PDZ2 (**Fig. 16B**). Por lo tanto, se continuó dividiendo dicha construcción en los dominios individuales y se determinó que PI3K γ interactúa con el dominio DEP1 y PDZ2 (**Fig. 16C**). La región mínima de interacción estaría conformada por PI3K γ y P-Rex1-DEP1 por la afinidad de la construcción ante el enriquecimiento en el pull-down.

En cuanto a la especificidad de interacción de las PI3K de clase I, elegimos a P-Rex1-DEP1 para probar la interacción mínima con PI3K β . Encontramos que la subunidad catalítica p110 β también interactúa con el dominio DEP1 de P-Rex1 (**Fig. 17A**), tal como PI3K γ (**Fig. 17B**). Sugiriendo que el dominio DEP1 puede establecer contacto con diversas PI3Ks de clase I.

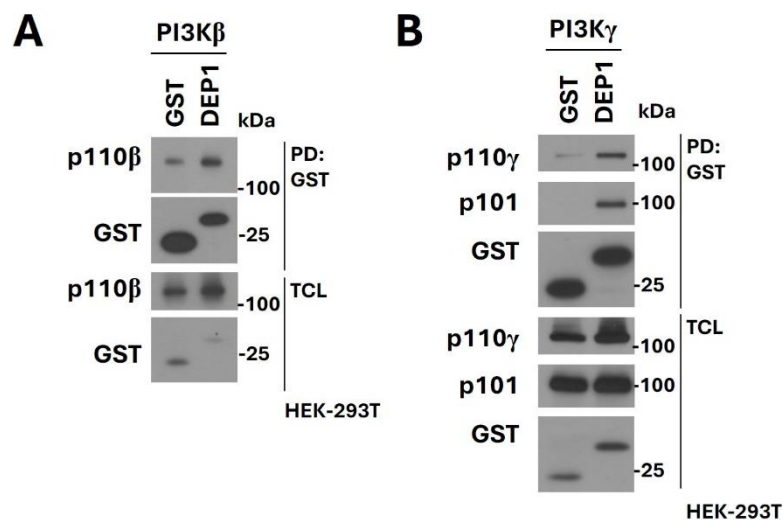


Figura 17 PI3K β y PI3K γ interactúan con P-Rex1-DEP1.

A, PI3K β interactúa con el DEP1 (n=2). **B**, PI3K γ interactúa con el DEP1 (n=3). Se transfectaron las subunidades de PI3K γ (p110 γ y p101), GST (control negativo) y GST-P-Rex1-DEP1 en células HEK293T para realizar pull-down de GST. Manuscrito en preparación, Beltrán-Navarro, et al., 2023. Inciso B obtenido con apoyo de Irving García Jiménez.

Aprovechando la interacción mínima del dominio DEP1 de P-Rex1 con PI3K γ se realizó el pull-down de dicha región para evaluar el efecto de G $\beta\gamma$. P-Rex1-DEP1 aisló a PI3K γ y la presencia de G $\beta\gamma$ no alteró dicha unión, ni se aisló con el complejo DEP1-PI3K γ (**Fig. 19**). Por lo tanto, la PI3K γ que aisló P-Rex1-DEP1 no traía consigo al heterodímero ni influyó en la cinasa.

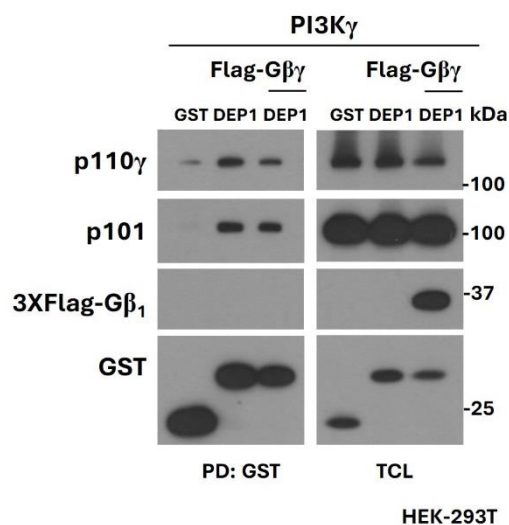


Figura 19 G $\beta\gamma$ no interactúa con el complejo DEP1-PI3K γ .

Se transfectaron las subunidades de PI3K γ (p110 γ y p101) con GST (control negativo) o con el dominio DEP1 de P-Rex1, sin y con 3XFlag-G $\beta\gamma$ en células HEK293T. Se realizó pull-down de GST (n=2).

P-Rex1 funciona como plataforma para la vía $G\beta\gamma$ -PI3K-mTORC2-Akt1

Para caracterizar a P-Rex1 como plataforma se realizó un curso temporal estimulando con SDF-1³³ a células MCF7 y aislando la fracción activa con perlas recombinantes de Rac libre de nucleótido (RacG15A).

SDF-1 logró activar a P-Rex1 y en esta fracción encontramos a $G\beta\gamma$, p110 β , Rictor y Akt1, proteínas que coinciden en una misma vía de señalización. Dicha unión dependió del estímulo y coincidió con la máxima activación de P-Rex1. La asociación de Akt1 y $G\beta\gamma$ se observó de manera basal (**Fig. 20**).

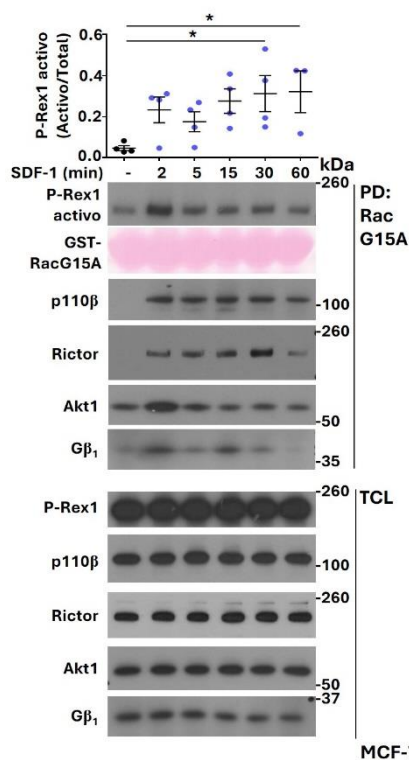


Figura 20 P-Rex1 activado por SDF-1 interactúa con $G\beta\gamma$, p110 β , Rictor y Akt1.

Curva de activación de P-Rex1 en células MCF7 estimuladas con SDF-1 [50 ng/ μ L]. ANOVA de una vía seguida de Dunnett para comparaciones múltiples. * $p < 0.05$ (n=3). Manuscrito en preparación, Beltrán-Navarro, et al., 2023.

Las células MCF7 son un excelente modelo para analizar la activación de P-Rex1 endógeno y probar las interacciones. Además de analizar la fracción activa probamos inmunoprecipitando a P-Rex1. Comparando la condición basal con

las estimuladas a cinco y quince minutos con SDF-1. Encontramos que p110 β y p110 α interactúan con P-Rex1 dependiendo del estímulo, mientras que la unión de Rictor, Akt1 y G $\beta\gamma$ se observó desde el basal (**Fig. 21A**).

Se probó si la unión de p110 β a P-Rex1 era recíproca. Al realizar la inmunoprecipitación de p110 β se encontró a P-Rex1 co-inmunoprecipitado (**Fig. 21A**, sección media).

Para determinar que las interacciones fueran específicas se compararon las proteínas co-inmunoprecipitadas cuando se estimuló con SDF-1 o HGF. Las proteínas p110 β , p110 α , Rictor, Akt1 y G $\beta\gamma$ se observaron co-inmunoprecipitadas ante ambos estímulos con cierta preferencia cuando el estímulo fue SDF-1 (**Fig. 21B**).

Para analizar el rol de plataforma de P-Rex1 también realizamos inmunoprecipitaciones del RacGEF en células MCF7, estimulando con SDF-1 y evaluando el efecto de inhibidores de mTOR y Akt. Como resultados preliminares obtuvimos que en presencia de torina, p110 β , p110 α , Rictor, Akt1 y G $\beta\gamma$ continuaron asociados a P-Rex1. Interesantemente, con la presencia del inhibidor alostérico MK-2206, p110 β , p110 α y Akt1 se encontraron asociados a P-Rex1 en menor proporción cuando hubo estímulo, incluso la interacción basal de Akt1 se vio inhibida por MK-2206. En cambio, G $\beta\gamma$ se encontró más asociada a P-Rex1 en presencia del inhibidor. Esto sugiere la influencia de Akt1 en la estabilidad del complejo formado por P-Rex1-PI3K-Akt, independientemente de G $\beta\gamma$.

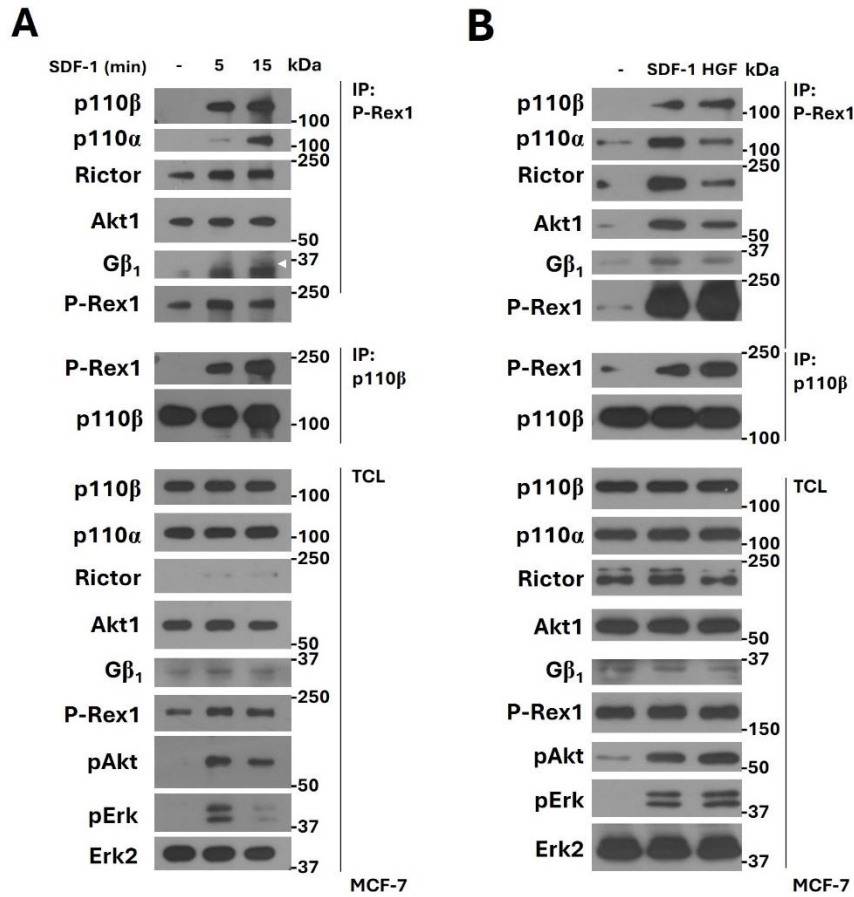


Figura 21 PI3Kβ y PI3Kα interactúan con P-Rex1 activado por SDF-1.

A, PI3Kβ y PI3Kα interactúan con P-Rex1 estimulado por SDF-1 [50 ng/μL] e inmunoprecipitado en células MCF7. P-Rex1 interactúa con p110β inmunoprecipitada (n=3). **B**, Efecto de SDF-1 y HGF [50 ng/μL] (15 minutos de estímulo) en la interacción de p110β, p110α, Rictor, Akt1 y Gβγ con P-Rex1 inmunoprecipitado en células MCF7. P-Rex1 interactúa con p110β inmunoprecipitada en células MCF7 (n=2). Manuscrito en preparación, Beltrán-Navarro, et al., 2023. Incisos A y B obtenidos con apoyo de Dante Gustavo Juan Guadarrama.

La vía $G\beta\gamma$ -PI3K-mTORC2-Akt1 requiere a P-Rex1

Dadas las asociaciones encontradas de $G\beta\gamma$, PI3K, Rictor y Akt1 con P-Rex1 en células MCF7 se determinó, mediante análisis de captura de GEF activo, si estas proteínas de transducción de señales interactuaban de manera preferencial con P-Rex1 durante su activación. Mediante el knockdown de P-Rex1 evaluamos las interacciones con proteínas de la vía en esta misma línea celular.

En experimentos en los que el knockdown de P-Rex1 resultó efectivo se observaron dos comportamientos en cuanto a las interacciones. La unión de $G\beta\gamma$ dependió completamente de P-Rex1, mientras que la de p110 β , Rictor y Akt1 dependió parcialmente (**Fig. 22A**). La variabilidad de contribución de P-Rex1 puede deberse a la participación de otros RacGEFs que también hayan podido aislarse con las perlas recombinantes de RacG15A.

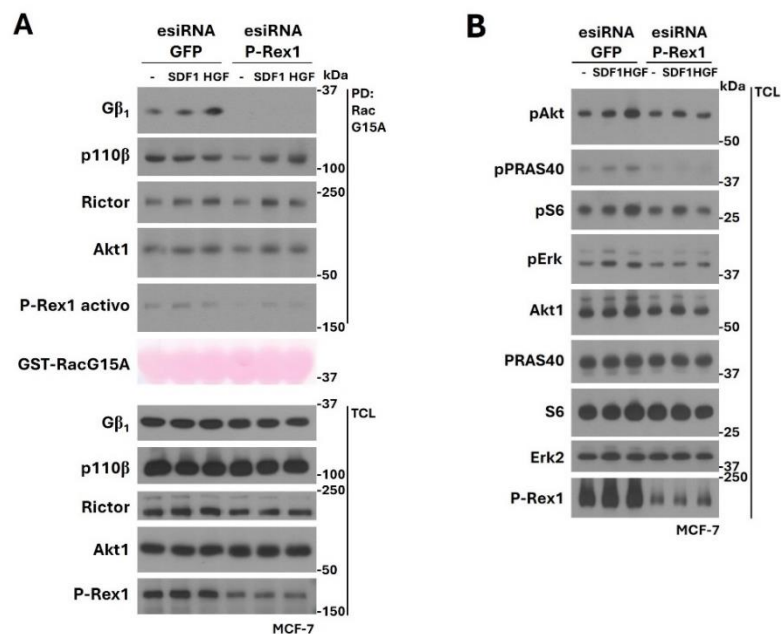


Figura 22 $G\beta\gamma$, p110 β , Rictor y Akt1 se asocian a P-Rex1 y el RacGEF contribuye a la señalización de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K-mTORC2-Akt1.

A, Análisis de interactores de P-Rex1 y efecto del knockdown del GEF en células MCF7 estimuladas con SDF-1 o HGF [50 ng/ μ L] durante 15 minutos (n=3). **B**, Contribución de P-Rex1 a vías de señalización (n=3). Manuscrito en preparación, Beltrán-Navarro, et al., 2023.

Se evaluaron vías de señalización derivadas del complejo que ensambla P-Rex1, como la activación de Akt como efector de mTORC2, comparándola con la de S6 como efector de mTORC1 y la de una vía independiente como la de las MAPK. Se encontró que el knockdown de P-Rex1 afectó la activación de Akt y la de su efector PRAS40, la de S6 y la de Erk (**Fig. 22B**). El complejo que forma P-Rex1 puede contribuir a coordinar mejor la señalización de mTORC2 hacia Akt.

P-Rex1 es efector de la vía Gβγ-PI3K-mTORC2-Akt1

Para evaluar si la activación de P-Rex1 se ve favorecida gracias al complejo multiproteico que ensambla, se utilizaron inhibidores de mTOR y de Akt1.

Al emplear rapamicina en un tratamiento de 24 horas se inhibió a mTORC2 y se observó menor activación de P-Rex1 (**Fig. 23**). La fosforilación de Akt y S6 se vio disminuida, tal como se esperaba. En el caso de S6 también se inhibió a mTORC1 por la duración del tratamiento con rapamicina.

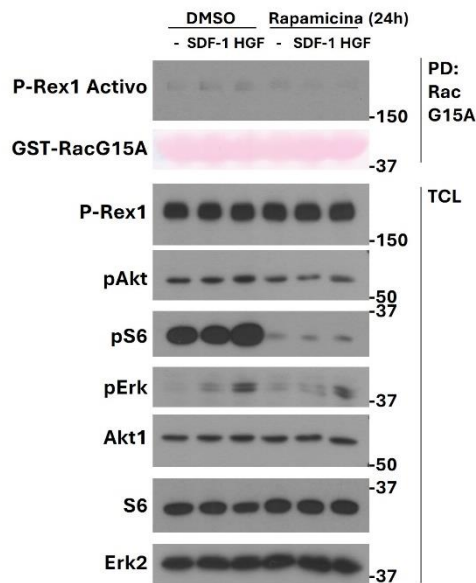


Figura 23 P-Rex1 es efector de mTORC2.

Captura de GEF activo en células MCF7 tratadas con DMSO o Rapamicina [20ng/μL] durante 24 horas, y estimuladas con SDF-1 o HGF [50 ng/μL] durante 15 minutos (n=3). Manuscrito en preparación, Beltrán-Navarro, et al., 2023.

En experimentos preliminares se utilizó torina durante 30 minutos, resultando muy efectiva para inhibir efectores de mTORC1 y mTORC2, como S6 y Akt1, respectivamente. En cuanto a P-Rex1, se observó menor activación ante los estímulos en presencia de torina. Dado que Akt1 es la última cinasa de la cascada, se empleó el inhibidor alostérico MK-2206. Sorpresivamente, P-Rex1 se encontró más activo en presencia del inhibidor de Akt1. Lo que sugiere que en una cascada estimulada por agonistas, Akt1 podría tener un efecto dinámico

que dependa no solo de su actividad de cinasa sino de sus interacciones con P-Rex1. Por lo tanto, ubicamos a P-Rex1 como efector de mTORC2 al requerir la actividad de este complejo para su activación y encontramos que la regulación por Akt parece ser particularmente compleja, ya que parece tener un efecto regulador al que contribuye no sólo su actividad de cinasa sino también las interacciones proteína-proteína, mismas que a su vez parecen estar reguladas por fosforilación. Considerando que el inhibidor usado es alostérico, resulta importante investigar el efecto de inhibidores de la actividad de cinasa, ya que el inhibidor alostérico podría estar afectando interacciones de Akt con otras proteínas y con segundos mensajeros lipídicos.

Akt1 activa a P-Rex1 mediante fosforilación

Consideramos que P-Rex1 es activado gracias al complejo que forma, en el que se requieren las actividades e interacciones con mTORC2 y Akt. Por lo que nos preguntamos si P-Rex1 podría ser fosforilado por Akt.

La búsqueda en Scansite reveló la existencia de tres sitios consenso en P-Rex1 para ser fosforilados por Akt: la Ser319 en el dominio PH, la Thr437 en el dominio DEP1 y la Ser993 en el carboxilo terminal. Por lo que se mapearon estas posibles fosforilaciones en construcciones de los tándems de P-Rex1. Se encontraron fosforilados el casete catalítico DH-PH y el tándem DEP-DEP al emplear un anticuerpo anti-fosfosustratos de Akt. La fosforilación del DH-PH fue inducida por la presencia de Akt miristoilada (constitutivamente activa) y la del DEP-DEP además tuvo una alta fosforilación basal (**Fig. 24A**). Al dividir el tándem DEP-DEP en los dominios individuales, se encontró el DEP1 fosforilado por Akt, coincidiendo con la predicción (**Fig. 24B**). A pesar de un sitio predicho en el carboxilo terminal, cuando mapeamos las fosforilaciones en el amino y en el carboxilo, este último no se detectó fosforilado (datos no mostrados).

Que el casete DH-PH reciba una fosforilación por parte de Akt nos llevó a investigar su naturaleza activante o inhibitoria. Se probó la versión constitutivamente activa del DH-PH de P-Rex1 y en presencia de Akt se capturó más activo, sugiriendo que la fosforilación que recibe, probablemente en la Ser319 del dominio PH, es activante (**Fig. 25A**).

Para corroborar el efecto de Akt en el RacGEF completo, realizamos un pull-down de P-Rex1 activo. Akt miristoilada llevó a una mayor activación y captura del GEF completo y el inhibidor alostérico de Akt, MK-2206, evitó tal activación (**Fig. 25B**). Por lo tanto, Akt fosforila y activa a P-Rex1.

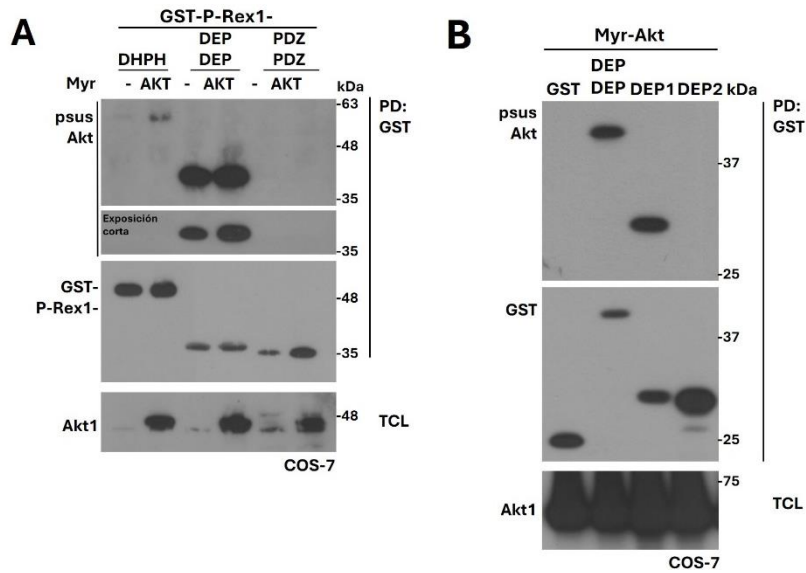


Figura 24 Akt1 fosforila el DH-PH y el DEP1 de P-Rex1.

A, Akt1 fosforila el DH-PH y el tándem DEP-DEP de P-Rex1 (n=3). **B**, Akt fosforila el dominio DEP1 de P-Rex1 (n=3). Pull-downs de GST-P-Rex1 en células COS-7 transfectadas con las construcciones de P-Rex1 y Akt miristoilada. Manuscrito en preparación, Beltrán-Navarro, et al., 2023. Incisos A y B obtenidos con apoyo de Rodolfo Daniel Cervantes Villagrana.

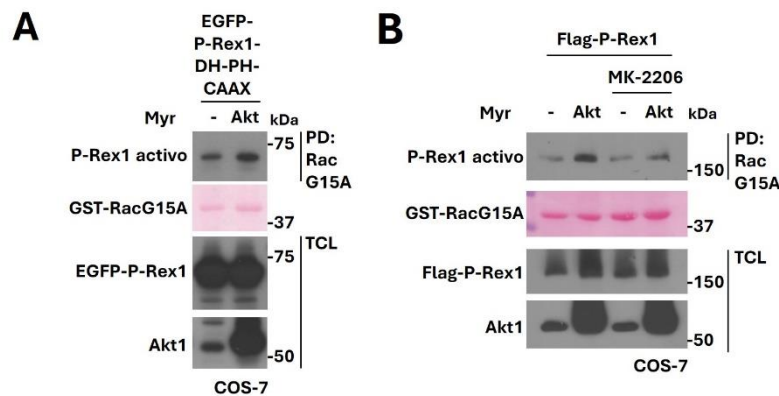


Figura 25 Akt1 activa a P-Rex1.

A, Akt1 activa el DH-PH de P-Rex1 (n=3). **B**, Akt1 activa a P-Rex1 completo (n=3). Captura de P-Rex1 activo en células COS-7 transfectadas con el módulo catalítico constitutivamente activo de P-Rex1 (A) o Flag-P-Rex1 completo (B) y Akt miristoilada. Inhibición con MK-2206 [2µM] durante 2 hrs. Manuscrito en preparación, Beltrán-Navarro, et al., 2023. Incisos A y B obtenidos con apoyo de Rodolfo Daniel Cervantes Villagrana.

Con la intención de analizar el efecto activador de Akt1, respecto al de Gβγ, en P-Rex1 como plataforma y efector en distintos tipos celulares, se aisló la fracción activa del GEF en células COS7 transfectadas con el P-Rex1 completo, Gβγ y Akt miristoilada.

La combinación de activadores Gβγ y Akt resultó la más efectiva para que se asociaran p110β y Rictor a P-Rex1 activo (**Fig. 26**). Lo que sugiere que Gβγ y Akt activan a P-Rex1 hasta cierto grado, y que en conjunto la activación es mayor, provocando una mejor disponibilidad de los dominios de P-Rex1 para que se asocien proteínas de la vía Gβγ-PI3K-mTORC2-Akt1.

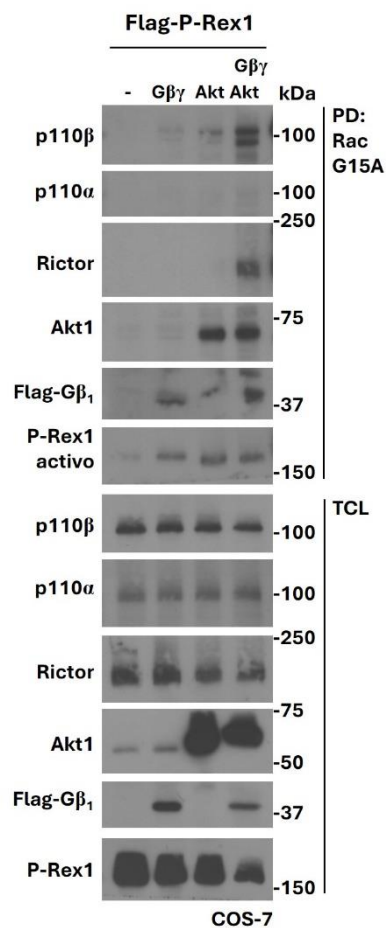


Figura 26 P-Rex1 activado por Gβγ y Akt constituye una plataforma más eficiente.

Captura de P-Rex1 activo en células COS-7 transfectadas con Gβγ y/o Akt miristoilada (n=2). Manuscrito en preparación, Beltrán-Navarro, et al., 2023. Resultado obtenido con apoyo de Rodolfo Daniel Cervantes Villagrana.

P-Rex1 es esencial en algunas líneas celulares de cáncer de mama y es acompañado por PI3K, mTORC2, Akt1

Para examinar la relevancia de P-Rex1 y de proteínas del complejo multiproteico que ensambla, se exploró la plataforma Depmap en cuanto a datos de esencialidad por CRISPR y con el uso de fármacos en líneas celulares cancerosas.

Se compararon los valores de los estadísticos T y se encontraron cinco líneas celulares donde el knockout de *PREX1* disminuyó la viabilidad celular, siendo SKBR3, MCF7, SUM52PE, T47D y OCUBM. A comparación de *PREX1*, el knockout de *PREX2* no resultó esencial en las líneas de cáncer de mama. De las PI3Ks, *PIK3CA* y *PIK3CB* resultaron esenciales en varias líneas celulares, pero no *PIK3CG*. De mTORC2, *MTOR* fue esencial en todas las líneas celulares de cáncer de mama, coincidente con mTOR como una cinasa esencial en todas las células, mientras el knockout de *RICTOR* afectó algunas líneas celulares. De las Akts, sólo *AKT1* fue esencial, pues el knockout de *AKT2* y *AKT3* no afectó la viabilidad celular de ninguna línea (**Fig. 27A**). Por lo tanto, *PREX1*, *PIK3CA*, *PIK3CB*, *MTOR*, *RICTOR* y *AKT1* pueden considerarse vitales en algunas líneas celulares de cáncer de mama, lo que es consistente con la idea de que actúan como componentes de una vía integrada.

Similar a los datos de esencialidad por CRISPR, se compararon los estadísticos T del efecto de diversos fármacos que disminuyeran la viabilidad de líneas celulares de cáncer de mama. Esto apuntó a los blancos de dichos fármacos y sus actividades como esenciales. Se ordenaron los valores de estadístico T de mayor a menor y se identificaron los blancos de los fármacos. Resaltamos fármacos que tuvieran como blanco a cinasas del complejo P-Rex1-PI3K-mTORC2-Akt1. Encontramos dos inhibidores de mTOR, tres inhibidores de PI3K y seis de Akt (**Fig. 27B**).

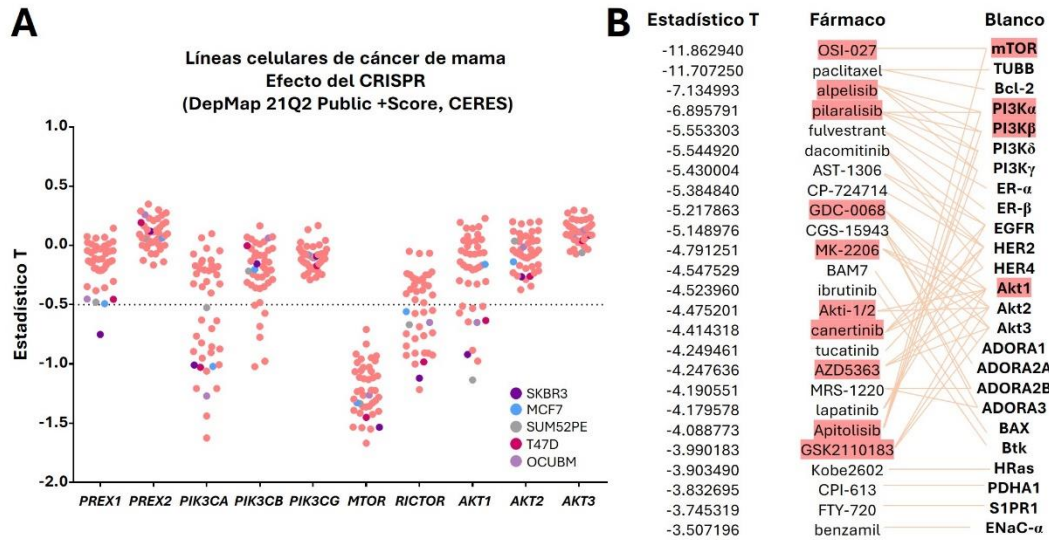


Figura 27 Efecto del CRISPR y fármacos en líneas celulares de cáncer de mama.

A, Estadísticos T para *PREX1*, *PREX2*, *PIK3CA*, *PIK3CB*, *PIK3CG*, *MTOR*, *RICTOR*, *AKT1*, *AKT2* y *AKT3* en líneas celulares de cáncer de mama. Punto de corte para considerar líneas celulares vulnerables: valores cercanos o más negativos a -0.5. Las líneas SKBR3, MCF7, SUM52PE, T47D y OCUBM se identificaron con colores. **B**, Fármacos y blancos correspondientes. Se resaltaron los fármacos que tuvieron a PI3K, mTOR y Akt1 como blancos. Manuscrito en preparación, Beltrán-Navarro, et al., 2023.

Al correlacionar los datos de esencialidad por CRISPR y fármacos consideramos que PI3K α , PI3K β y Akt1 son acompañantes diferenciales de P-Rex1. Aunque los inhibidores funcionan contra diferentes isoformas, solo el knockout de *PIK3CA*, *PIK3CB* y *AKT1* afectó la viabilidad de líneas celulares de cáncer de mama.

Para que estos ensayos de pérdida de función fueran efectivos se requirió la presencia de los transcritos, por lo que en la misma base de datos buscamos la información respecto a los niveles de ARNm. Salvo *PREX2* y *PIK3CG*, todos los demás genes se encontraron expresados en las líneas celulares de cáncer de mama, independientemente de la expresión de *PREX1* (**Fig. 28**). Solo la expresión de *PREX1* correlacionó con un mayor efecto del CRISPR del mismo gen (**Fig. 29**).

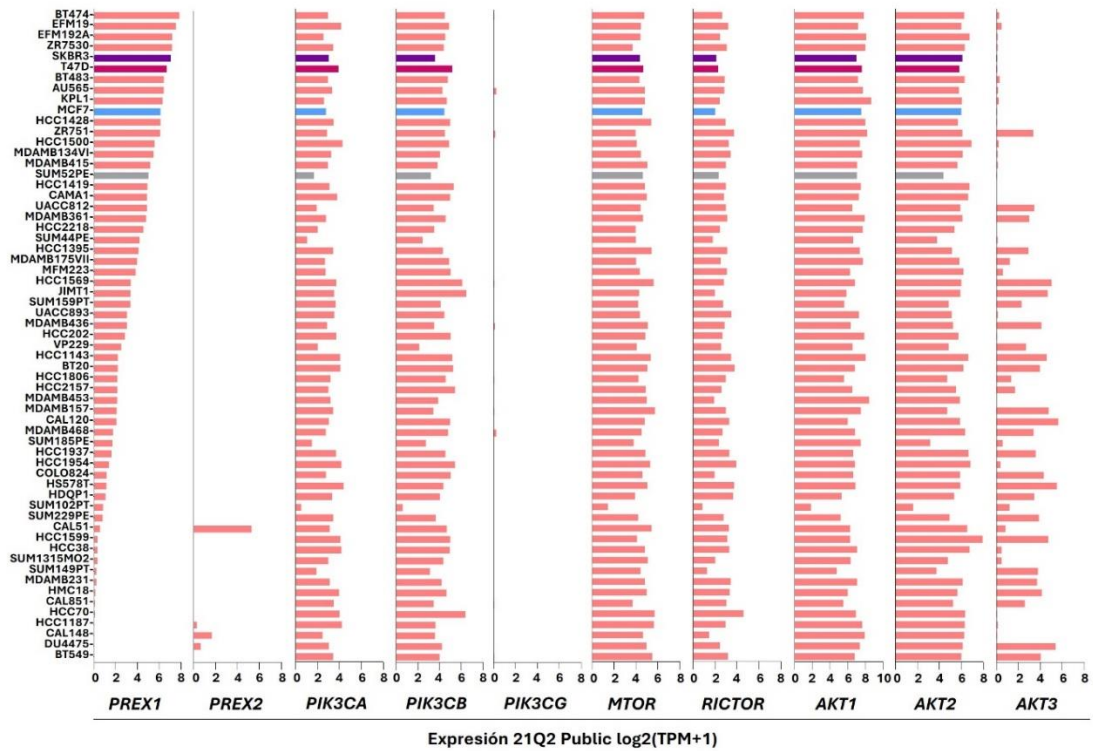


Figura 28 Expresión de ARNm de *PREX1* y proteínas de la vía PI3K-mTORC2-Akt en líneas celulares de cáncer de mama.

Datos de expresión de *PREX1*, *PREX2*, *PIK3CA*, *PIK3CB*, *PIK3CG*, *MTOR*, *RICTOR*, *AKT1*, *AKT2* y *AKT3* en líneas celulares de cáncer de mama. Manuscrito en preparación, Beltrán-Navarro, et al., 2023.

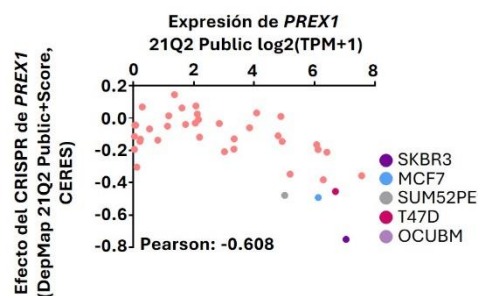


Figura 29 La alta expresión de *PREX1* correlaciona con mayor efecto de CRISPR.

Correlación entre la expresión de *PREX1* y el efecto de su CRISPR. Coeficiente de correlación de Pearson calculado en Depmap. Manuscrito en preparación, Beltrán-Navarro, et al., 2023.

P-Rex1 es acompañado por un grupo de genes de señalización específicos

Con P-Rex1 y proteínas de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K-mTORC2-Akt1 encontrados como esenciales en líneas celulares de cáncer de mama, nos preguntamos qué otras proteínas podrían enriquecer al complejo. Analizamos las cinco líneas celulares que resultaron dependientes de *PREX1* para buscar acompañantes de señalización específicos, por lo que comparamos con los genes encontrados en otras cinco líneas celulares donde el knockout de *PREX1* no tuvo efecto (**Fig. 30A**). Encontramos 482 genes de señalización esenciales y exclusivos en líneas celulares dependientes de *PREX1* (fondo lila), 349 genes de señalización en líneas celulares independientes de *PREX1* (fondo gris) y 538 genes esenciales compartidos (fondo azul, **Fig. 30B**).

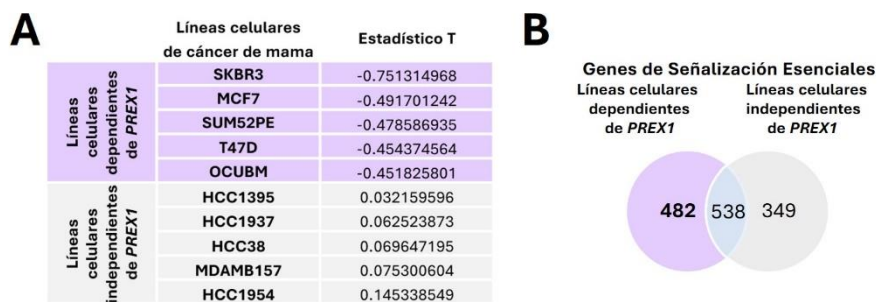


Figura 30 Genes de señalización esenciales, exclusivos y compartidos en líneas celulares de cáncer de mama dependientes e independientes de *PREX1*.

A, Clasificación de líneas celulares de cáncer de mama como dependientes e independientes de *PREX1* de acuerdo con el efecto del CRISPR. **B**, Análisis de exclusividad de genes de señalización esenciales en líneas dependientes e independientes de *PREX1*. Manuscrito en preparación, Beltrán-Navarro, et al., 2023.

Los 482 genes de señalización esenciales y exclusivos se filtraron a 24 genes que además correlacionaron con la expresión de *PREX1* en pacientes con carcinoma de mama invasivo (BRCA) y que estaban expresados en los mismos pacientes (**Fig. 31**).

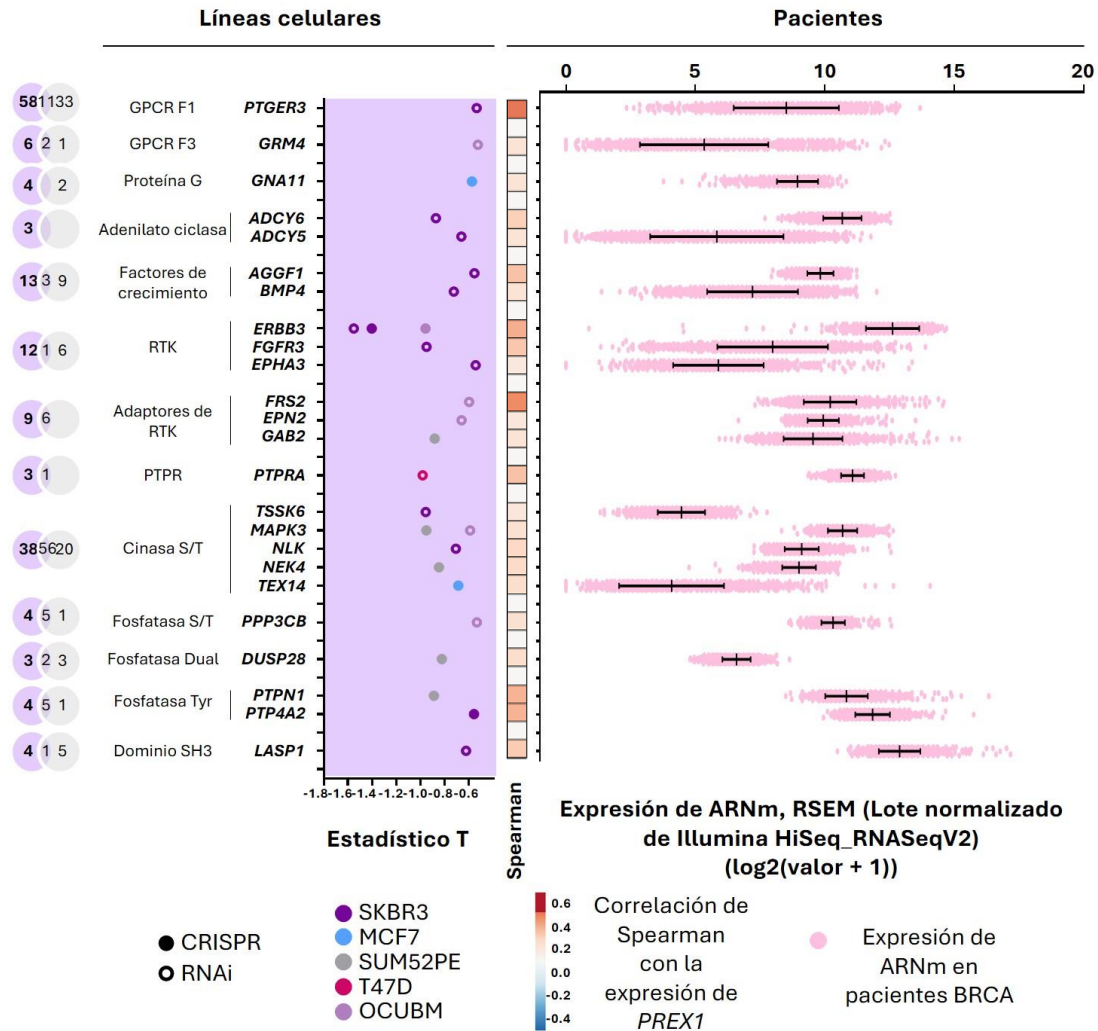


Figura 31 Veinticuatro genes de señalización esenciales correlacionan con *PREX1* en muestras de pacientes con cáncer de mama y exhiben buena expresión.

Análisis de exclusividad de genes por categoría de señalización (izquierda). Genes de señalización co-esenciales en líneas celulares dependientes de *PREX1* (fondo lila). Correlación con la expresión de *PREX1* en muestras de pacientes con carcinoma de mama invasivo (mapa de calor, coeficiente de correlación de Spearman calculado en cBioportal). Expresión de ARNm de genes correlacionados (derecha). Manuscrito en preparación, Beltrán-Navarro, et al., 2023.

Entre los 24 acompañantes de *PREX1* se encontraron a dos GPCRs, *PTGER3* y *GRM4*, una proteína G, *GNA11*, y adenilato ciclasas, *ADCY5* y *ADCY6*, dos factores de crecimiento, *AGGF1* y *BMP4*, tres RTKs, *ERBB3*, *FGFR3* y *EPHA3*, tres

adaptadores de RTKs, *FRS2*, *EPN2* y *GAB2*, un receptor fosfatasa de tirosina, *PTPRA*, cinco cinasas de serina/treonina, *TSSK6*, *MAPK3*, *NLK*, *NEK4* y *TEX14*, una fosfatasa de serina/treonina, *PPP3CB*, una fosfatasa dual, *DUSP28*, dos fosfatasas de tirosina, *PTPN1* y *PTP4A2*, y una proteína con dominio SH3, *LASP1*.

Para probar estos 24 acompañantes de señalización como una firma transcripcional analizamos su correlación con marcadores de células epiteliales, inmunitarias y estromales y los comparamos con el grado de correlación de *PREX1*. *PREX1* correlacionó con células que expresaron el receptor de estrógenos (*ESR1*) y el receptor HER2 (*ERBB2*). Congruentemente, la mayoría de los 24 genes acompañantes también correlacionaron positivamente con *ESR1* y con *ERBB2* (**Fig. 32**). *PREX1* y estos 24 acompañantes de señalización constituyen una firma transcripcional que puede encontrarse en células de cáncer de mama ER⁺ y HER2⁺.

Con el objetivo de identificar vías de señalización representadas por los genes acompañantes encontrados, buscamos genes esenciales y de señalización tanto en líneas celulares dependientes como independientes del knockout de *PREX1* y que tuvieran datos de fosfoproteómica de pacientes.

Encontramos nueve genes esenciales exclusivos (*YAP1*, *RICTOR*, *ERBB3*, *ESR1*, *BAD*, *MAPK3*, *STAT3*, *ERBB2* y *AKT1*) y seis genes esenciales compartidos (*PDPK1*, *TBX1*, *CHEK1*, *MTOR*, *MYH9* y *RPS6*) con sus versiones proteicas con residuos fosforilados (**Fig. 33**).

Tomamos los quince genes esenciales junto con *PREX1* y los sometimos como una firma transcripcional en Metascape para que esta plataforma nos indicara cuáles vías de señalización están enriquecidas. Las fosfoproteínas acompañantes de P-Rex1 correlacionaron con vías de resistencia de inhibidores de tirosín cinasas, señalización de RTKs y en concordancia con el hallazgo de *RICTOR*, *AKT1* y *MTOR* se encontró la vía de señalización de TOR (**Fig. 34**).

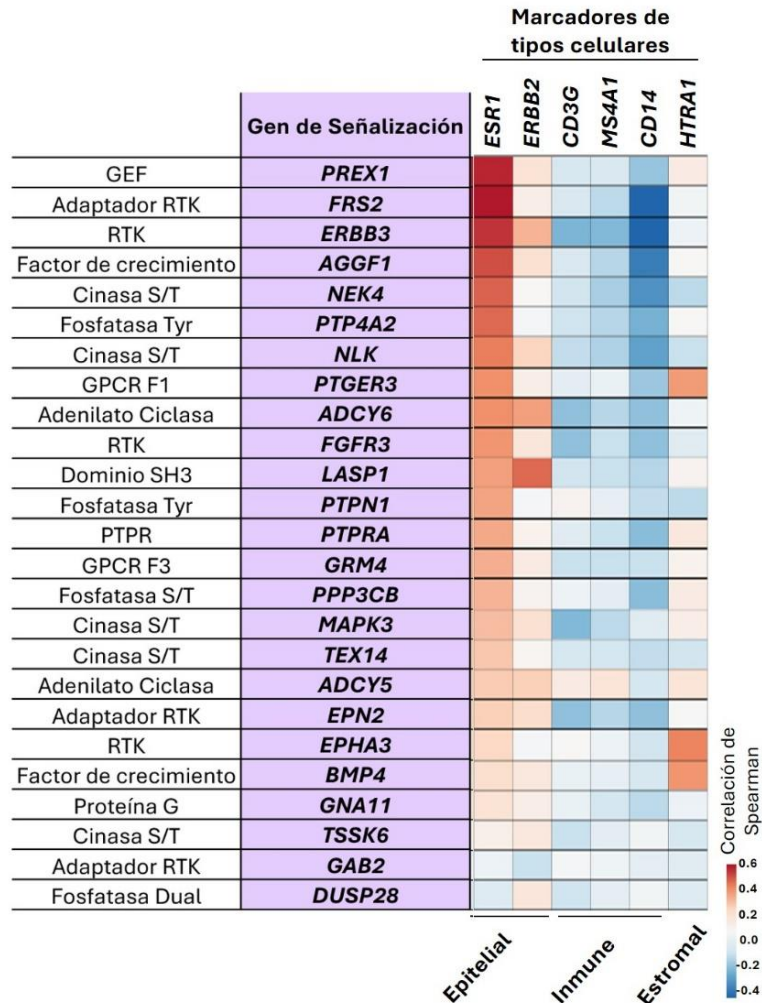


Figura 32 *PREX1* y la firma transcripcional que lo acompaña correlacionan con marcadores epiteliales.

Correlación con *ESR1* y *ERBB2* como marcadores de subtipos de cáncer de mama, con *CD3G*, *MS4A1* y *CD14* como células inmunitarias (linfocitos T, linfocitos B y macrófagos, respectivamente), y con *HTRA1* como marcador del estroma (fibroblastos). Mapa de calor de los coeficientes de correlación de Spearman (calculados en cBioportal). Manuscrito en preparación, Beltrán-Navarro, et al., 2023.

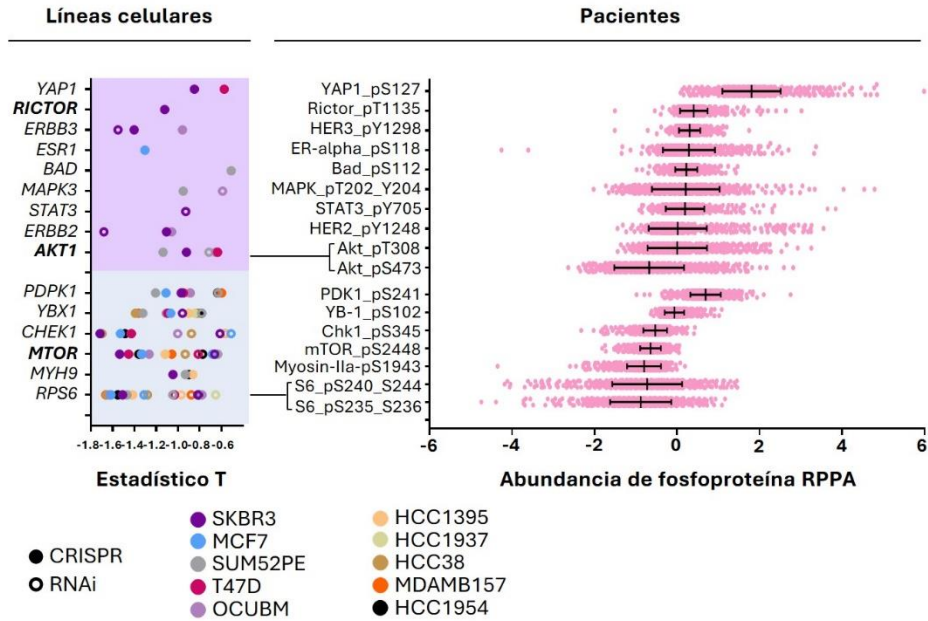


Figura 33 Genes co-esenciales cuya versión proteica se encuentra fosforilada.

Genes co-esenciales exclusivos de líneas dependientes de *PREX1* (fondo lila) y compartidos en líneas dependientes e independientes de *PREX1* (fondo azul) con fosfoproteínas presentes en muestras de pacientes con cáncer de mama. Manuscrito en preparación, Beltrán-Navarro, et al., 2023.

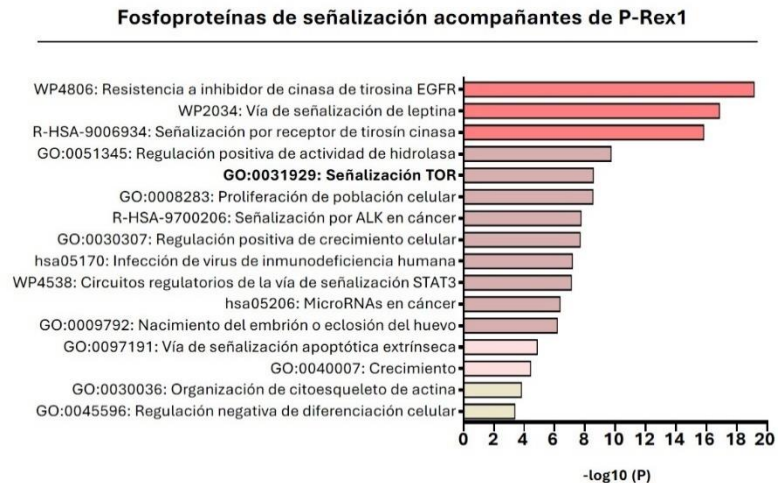


Figura 34 Vías de señalización enriquecidas correlacionadas con las fosfoproteínas acompañantes de *PREX1*.

PREX1 y las fosfoproteínas de señalización acompañantes se sometieron como firma transcripcional en Metascape para comparar con cascadas de señalización conocidas. Manuscrito en preparación, Beltrán-Navarro, et al., 2023.

P-Rex1 es acompañado por un grupo específico de genes que constituyen una firma transcripcional y correlacionan con menor supervivencia en glioma de bajo grado

Para evaluar si la expresión de *PREX1* correlaciona con la supervivencia de pacientes de los estudios del TCGA, analizamos los grupos de baja y alta expresión (50:50) en los 21 estudios de supervivencia disponibles en la plataforma Oncolnc. Encontramos que en cuatro de esos tipos de cáncer hubo correlación significativa entre la expresión de *PREX1* y la supervivencia de los pacientes. Estos tipos de cáncer fueron: glioma de bajo grado (LGG) y leucemia mieloide aguda (LAML), que correlacionaron la alta expresión de *PREX1* con baja supervivencia y carcinoma renal de células claras (KIRC) y adenocarcinoma pulmonar (LUAD) que correlacionaron con mayor supervivencia (Fig. 35A). Corroboramos los niveles de *PREX1* de estos cuatro estudios en cBioportal (TCGA), encontramos que LGG y LAML fueron los estudios de mayor expresión de *PREX1* correlacionando con un peor pronóstico (Fig. 35B).

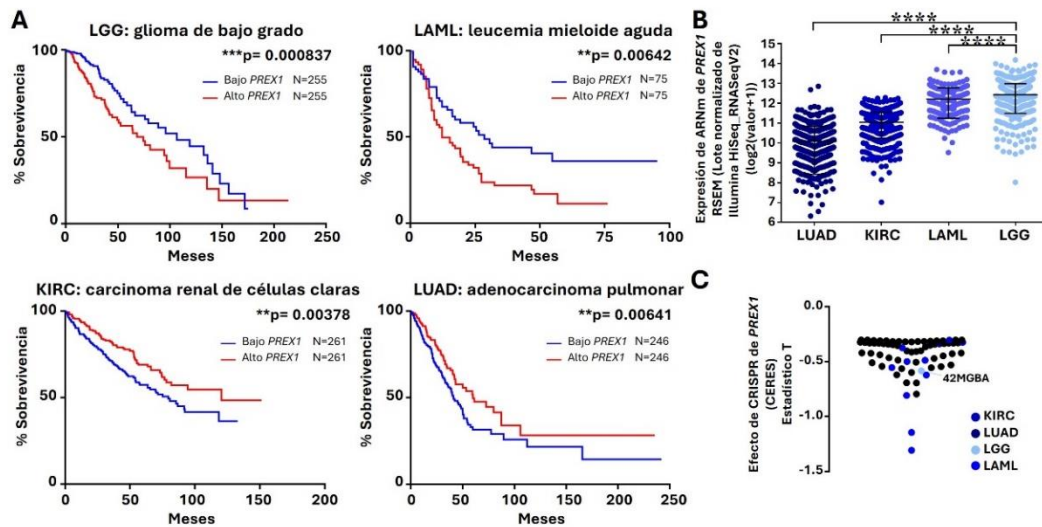


Figura 35 La alta expresión de *PREX1* correlaciona con supervivencia en pacientes con LGG, LAML, KIRC y LUAD.

A, Curvas de supervivencia de acuerdo con la media de expresión de *PREX1* en LGG, LAML, KIRC y LUAD. **B**, Expresión de *PREX1* en los estudios de A. Barras de error representan media y SD. ANOVA de una vía, ****p<0.0001. **C**, Líneas celulares representativas de los estudios de A vulnerables tras el CRISPR de *PREX1*.

De los cuatro estudios buscamos datos de esencialidad en líneas celulares que los representaran, hubo varias líneas correspondientes a LAML, seguidas de una línea celular de glioma, 42MGBA (**Fig. 35C**). Esta última fue seleccionada para buscar acompañantes de señalización de *PREX1*, teniendo en cuenta que el estudio LGG fue el de mayor correlación entre la alta expresión de *PREX1* y la baja sobrevivencia de los pacientes.

En la línea celular 42MGBA se encontraron 26 genes esenciales, seis por CRISPR, diecisiete por RNAi y cuatro con el uso de fármacos (**Fig. 36A**). Encontramos algunos acompañantes de *PREX1* minando la plataforma Depmap que también se han determinado experimentalmente como *PRKAR1A*, subunidad reguladora de PKA, y *RPTOR*, componente de mTORC1. *MET* se encontró como gen esencial por RNAi y vía el inhibidor PHA-665752, el doble hallazgo apunta al requerimiento del gen y de la actividad del MET. Los 26 genes se analizaron como genes coexpresados con *PREX1* al segregar a los pacientes de LGG (TCGA) con baja y alta expresión de *PREX1*. *PRKAR1A*, *ACVR1*, *KIF2C*, *TEX14*, *MET* y *PDGFRB* correlacionaron positivamente con *PREX1* en el grupo de alta expresión, mientras *RPTOR* y *PLPPR5* correlacionaron negativamente (**Fig. 36B**).

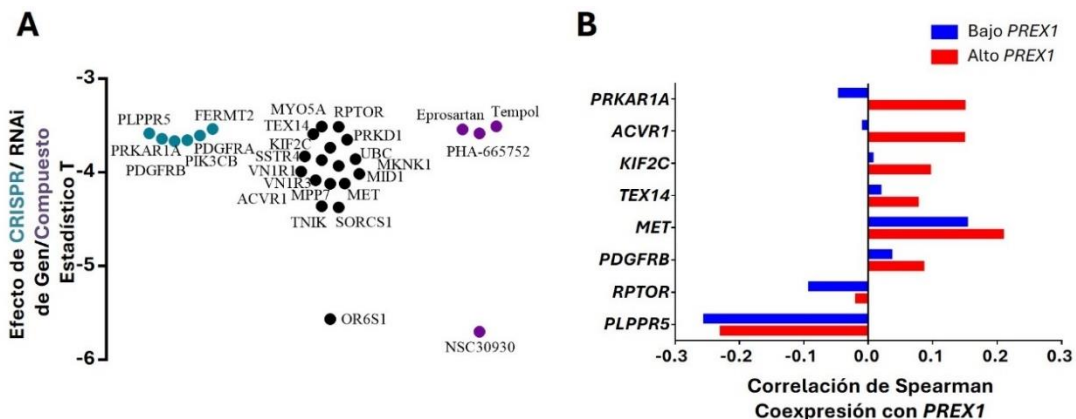


Figura 36 Genes de señalización esenciales acompañan a *PREX1* en la línea celular 42MGBA y en pacientes con LGG.

A, Identificación de genes co-esenciales por CRISPR, RNAi y con el uso de fármacos en la línea celular de glioma 42MGBA. **B**, Genes co-esenciales que correlacionan con *PREX1* en muestras de pacientes con LGG.

Para determinar si existe un trasfondo mutacional que correlacione con una mayor expresión de *PREX1*, comparamos las frecuencias de alteración de los diez genes más alterados. *IDH1* fue el gen más alterado en LGG, *FLT3* en LAML, *VHL* en KIRC y *TP53* en LUAD (Fig. 37A). También analizamos la tasa de alteración de *PREX1* y no se encontraron valores elevados, por lo que la alta expresión de *PREX1* en pacientes con LGG no se debe a mutaciones, eliminaciones o amplificaciones del propio gen.

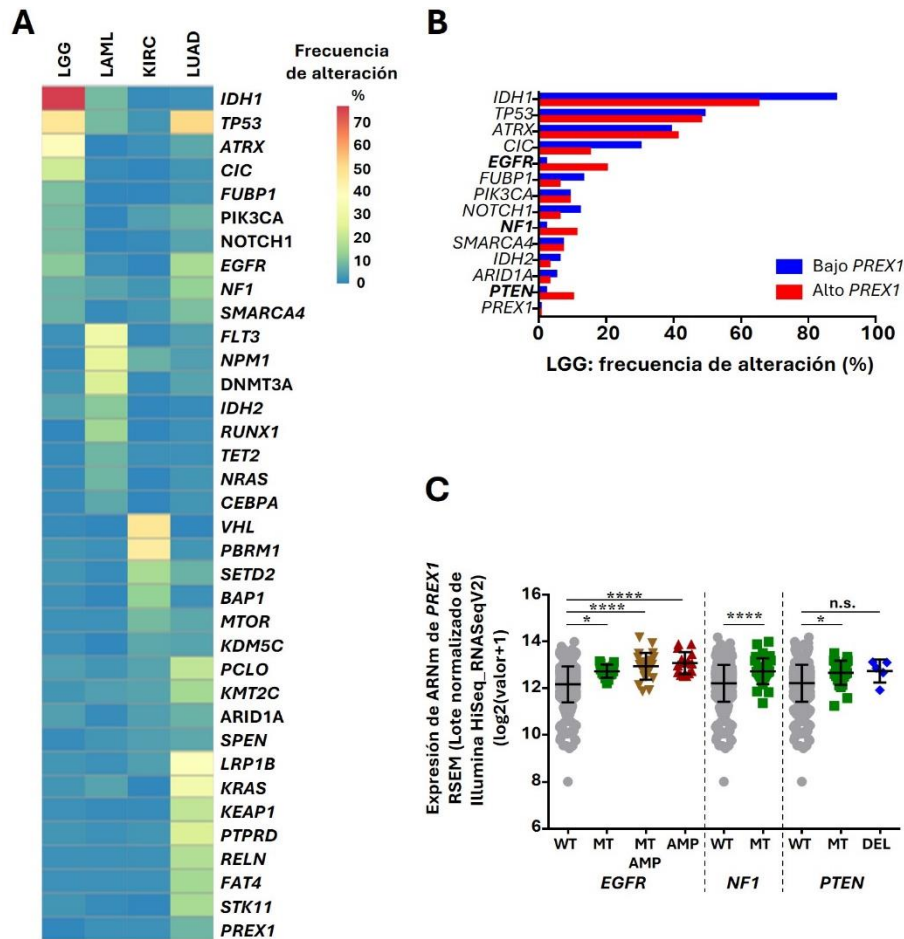


Figura 37 Pacientes con alteraciones en *EGFR*, *NF1* y *PTEN* exhiben mayor expresión de *PREX1*.

A, Mapa de calor de la frecuencia de alteración de los 10 genes más alterados por estudio. **B**, Frecuencia de alteración de los 10 genes más alterados en LGG en pacientes con baja y alta expresión de *PREX1*. **C**, Expresión de *PREX1* en pacientes con LGG con *EGFR*, *NF1* o *PTEN* silvestres o alterados.

Continuando con el estudio LGG, analizamos a detalle los 10 genes más alterados al separar a los pacientes por baja y alta expresión de *PREX1*. Al comparar los porcentajes de alteración encontramos que solo *EGFR*, *NF1* y *PTEN* correlacionaron diferencialmente en el grupo de alta expresión de *PREX1* (**Fig. 37B**). Pacientes con mutaciones y amplificaciones de *EGFR*, y mutaciones de *NF1* y *PTEN* exhibieron mayor expresión de *PREX1* (**Fig. 37C**).

Para encontrar acompañantes de *PREX1* analizamos los datos de coexpresión de pacientes con LGG. Primero segregamos a los pacientes con baja y alta expresión de *PREX1*, obtuvimos las listas de genes coexpresados con *PREX1* e identificamos genes exclusivos del grupo de baja y alta expresión y genes que fueran compartidos. De alrededor de 20 000 genes por lista, se analizaron los cuartiles y se filtraron solo los genes de señalización. Encontramos 1041 genes de señalización correlacionados con *PREX1* con un coeficiente de Spearman de al menos 0.2 en el grupo de pacientes con alta expresión de *PREX1* (**Fig. 38A**).

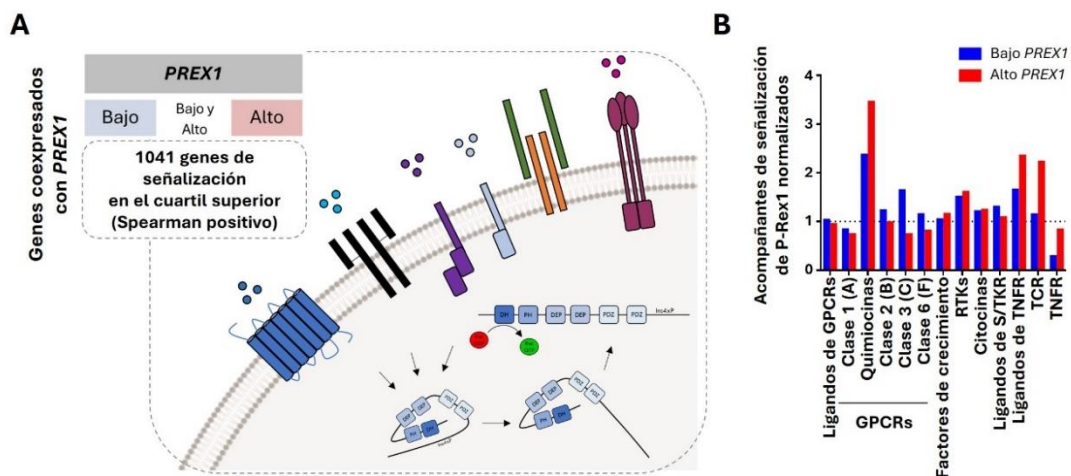


Figura 38 Genes de señalización correlacionados con *PREX1* exclusivamente en pacientes con alta expresión de *PREX1* en LGG y enriquecimiento de agonistas y receptores.

A, Diagrama de exclusividad de genes coexpresados con *PREX1* en el cuartil superior y búsqueda de agonistas y receptores correlacionados. **B**, Enriquecimiento diferencial de agonistas y receptores.

Por genes de señalización se consideraron genes que codificaron para péptidos agonistas y para proteínas como receptores, cinasas, fosfatasa, proteínas fosforilables y con dominios de señalización. Para los receptores, se observó un enriquecimiento de los GPCRs quimiotácticos, un poco de factores de crecimiento y RTKs, ligandos para receptores para TNF y TCRs en pacientes con alta expresión de *PREX1* (Fig. 38B).

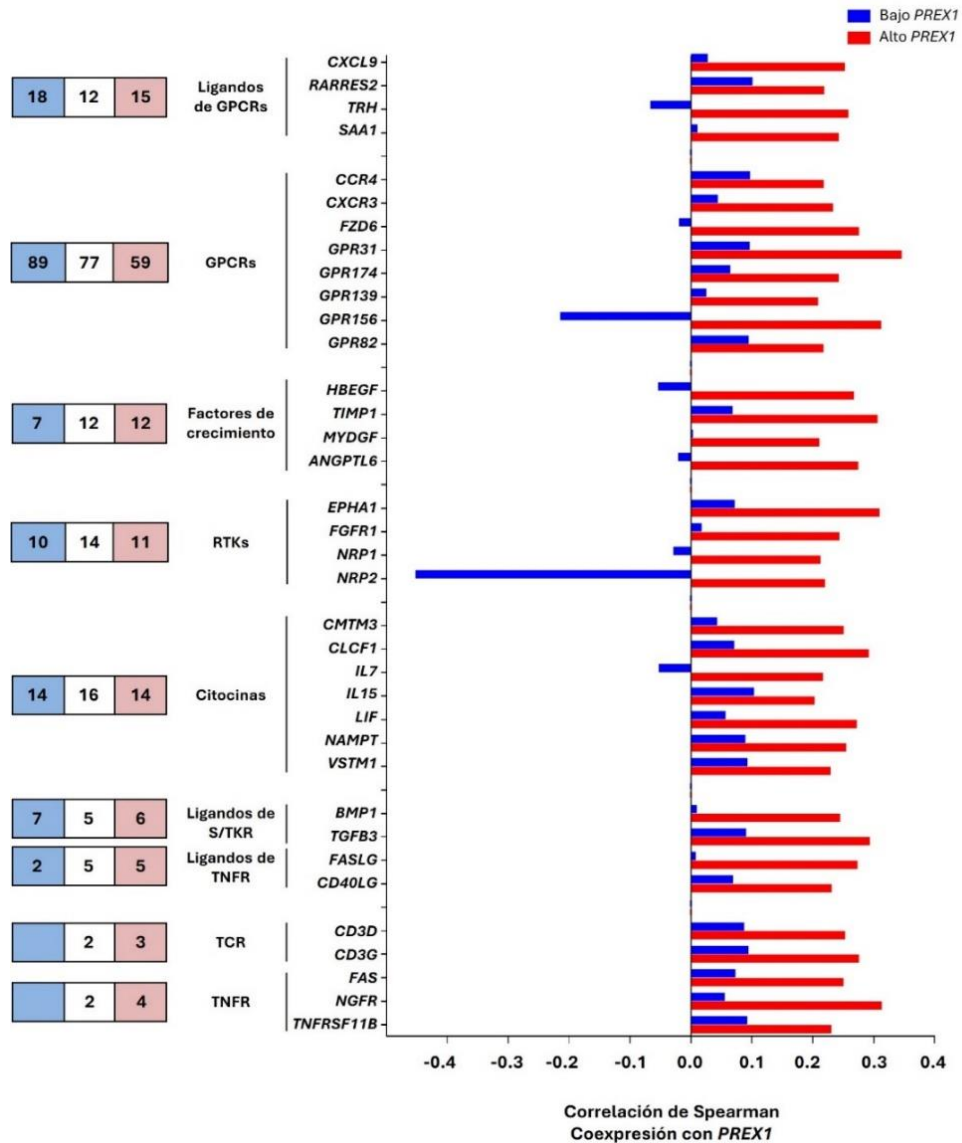


Figura 39 Agonistas y receptores correlacionados con *PREX1* en LGG.

Análisis de exclusividad de agonistas y receptores en el cuartil superior (izquierda). Agonistas y receptores correlacionados diferencialmente con *PREX1* en pacientes con alta expresión de *PREX1* (barras rojas).

Se encontraron cuatro ligandos de GPCRs, ocho GPCRs, cuatro factores de crecimiento, cuatro RTKs, siete citocinas, dos ligandos para receptores con actividad de serina/treonina, dos ligandos para receptores para TNF, dos TCRs y dos receptores para TNF correlacionados con *PREX1* exclusivamente en el grupo de alta expresión (**Fig. 39**). A la izquierda se muestran recuadros con el número de genes encontrados solo en pacientes con baja y alta expresión o compartidos en ambas listas.

Posteriormente se analizaron los agonistas y receptores correlacionados en cuestión de sobrevivencia. Se obtuvieron las curvas de sobrevivencia al segregar a los pacientes (50:50) de acuerdo con la expresión de cada gen. Once genes exhibieron un comportamiento similar a *PREX1*, la alta expresión de *FZD6*, *GPR82*, *CXCR3*, *TIMP1*, *ANGPTL6*, *CLCF1*, *CMTM3*, *NAMPT*, *IL7*, *BMP1* y *TNFRSF11B* correlacionó con menor sobrevivencia en pacientes con LGG (**Fig. 40**).

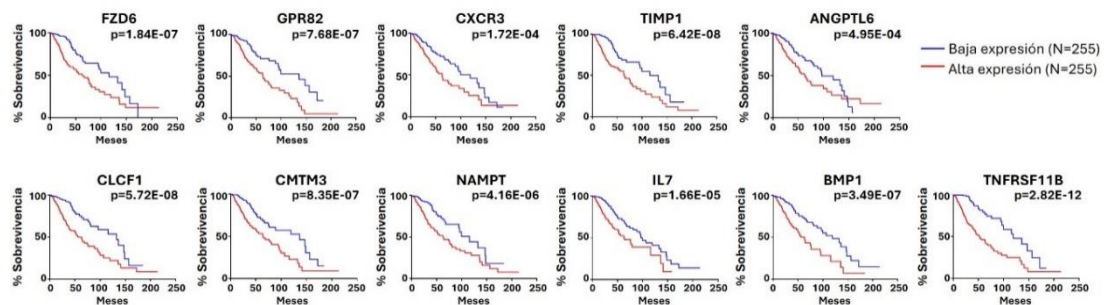


Figura 40 La alta expresión de agonistas y receptores correlaciona con menor sobrevivencia de pacientes con LGG.

Curvas de sobrevivencia de agonistas y receptores dividiendo a los pacientes con LGG por media de expresión (50:50). Valores p igual o más significativos que el de *PREX1*.

De las cinasas encontramos enriquecidas a la familia STE de las cinasas de serina/treonina y a la familia SYK/ZAP70 de las cinasas de tirosina. De las fosfatasas estuvieron enriquecidas las fosfatasas duales (PTPc) y fosfatasas de tirosina (PTPc, **Fig. 41**).

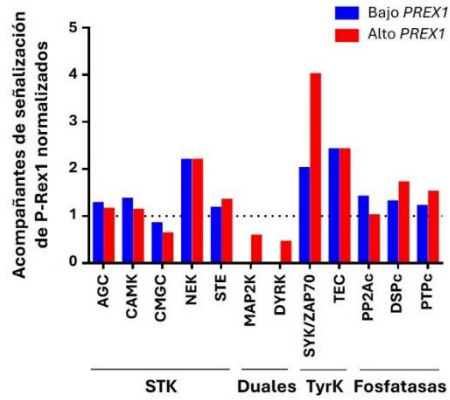


Figura 41 Cinasas y fosfatasa enriquecidas en pacientes con alta expresión de **PREX1**.

Enriquecimiento diferencial de familias de cinasas y fosfatasa.

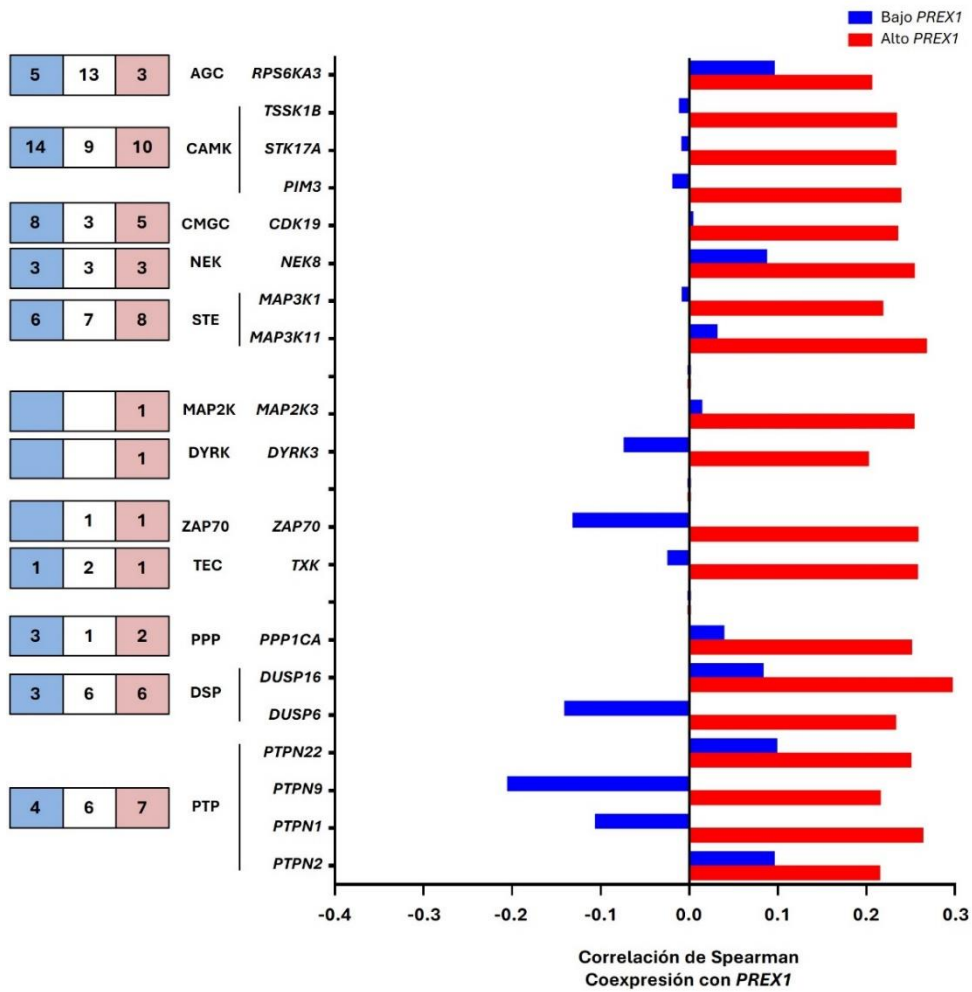


Figura 42 Cinasas y fosfatasa correlacionadas con **PREX1**.

Cinasas y fosfatasa exclusivas y compartidas (izquierda) y correlación diferencial con **PREX1** (barras rojas).

Correlacionaron ocho cinasas de serina/treonina, dos cinasas duales y dos cinasas de tirosina. Así como una fosfatasa de serina/treonina, dos duales y cuatro fosfatasas de tirosina (**Fig. 42**).

La alta expresión de las cinasas *MAP3K1*, *NEK8*, *RPS6KA3*, *DYRK3*, *MAP2K3* y *ZAP70*, y de las fosfatasas *PTPN2* y *PTPN22* correlacionó con menor supervivencia de los pacientes con LGG (**Fig. 43**).

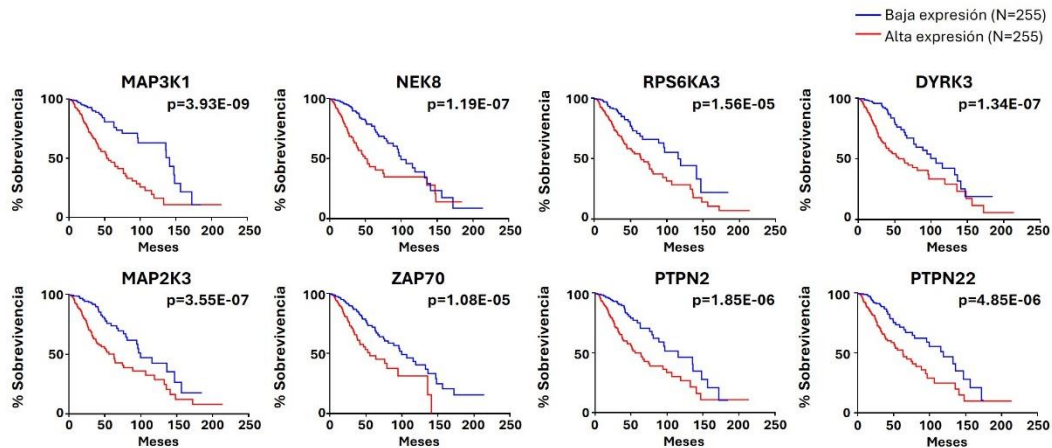


Figura 43 Cinasas y fosfatasas que correlacionaron con menor supervivencia.

Curvas de supervivencia de cinasas y fosfatasas de acuerdo con la media de expresión (50:50) en pacientes con LGG. Valores p igual o más significativos que el de *PREX1*.

De acuerdo con las cinasas que encontramos correlacionadas con *PREX1* buscamos los sustratos fosforilados por las mismas. Nueve genes que codifican para proteínas fosforiladas correlacionaron con *PREX1* (**Fig. 44**). Se identificaron los dominios de los sustratos y se colocó el más representativo a la izquierda del gen y la cinasa responsable de la fosforilación a la derecha.

Para encontrar otras proteínas efectoras, buscamos dominios de señalización frecuentes y exclusivos. Encontramos siete genes de proteínas efectoras y adaptadoras correlacionados con *PREX1* en pacientes con alta expresión de este (**Fig. 45**). En conjunto, la alta expresión de los fosfosustratos *CFLAR*, *BRCA1*, *KPNA2*, *SHC1*, *FADD* y *ZYX*, y de los efectores *MACC1*, *IQGAP2*, *PLCE1*, *FBXO22* y *SFN* correlacionó con menor supervivencia de pacientes con LGG, similar a *PREX1* (**Fig. 46**).

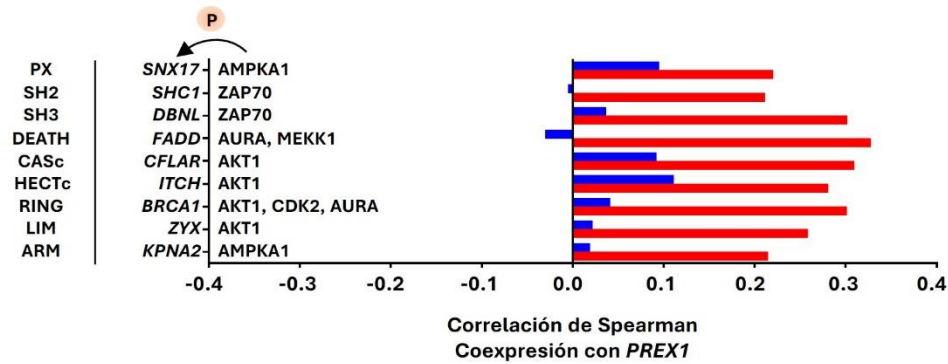


Figura 44 Fosfosustratos correlacionados con PREX1.

Genes correlacionados diferencialmente con *PREX1* (barras rojas) fosforilables por cinasas que correlacionaron con *PREX1*. Dominio de señalización representativo a la izquierda y cinasa responsable a la derecha.

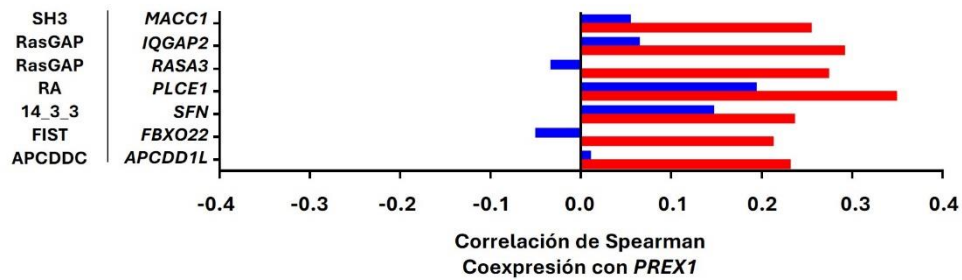


Figura 45 Otros efectores y adaptadores correlacionados con PREX1 en LGG.

Genes correlacionados diferencialmente con *PREX1* (barras rojas) cuya versión proteica contiene dominios de señalización.

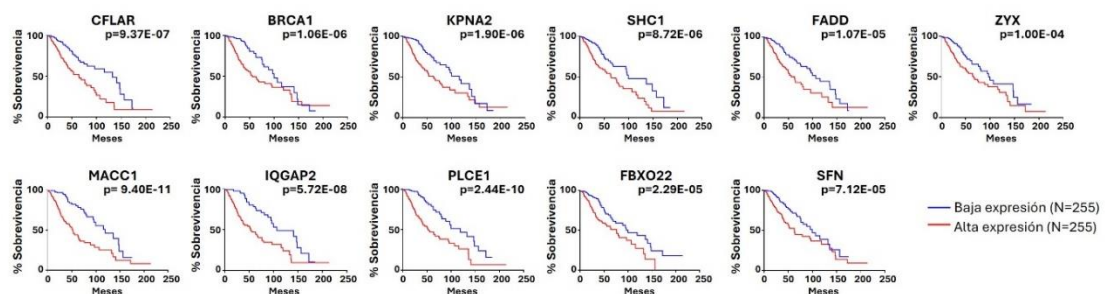


Figura 46 Fosfosustratos y adaptadores acompañantes de PREX1 cuya alta expresión correlaciona con menor supervivencia de pacientes con LGG.

Curvas de supervivencia de fosfosustratos y adaptadores por media de expresión (50:50) en LGG. Valores p igual o más significativos que el de *PREX1*.

Posteriormente, analizamos la correlación de la firma transcripcional de *PREX1* con marcadores de distintos tipos celulares. *PREX1* correlacionó con los marcadores de astrocitos (*GFAP*), oligodendrocitos (*MBP*), microglía (*TMEM119*), células endoteliales (*PECAM1*), células inmunitarias (*PTPRC*) y macrófagos (*ITGAM*). Acorde al acompañamiento de la firma transcripcional, los genes también correlacionaron con esos mismos marcadores y el grado de correlación fue mayor con los marcadores del estroma, apuntando a la firma transcripcional de *PREX1* presente tanto en células cerebrales tumorales, como en células del estroma (**Fig. 47**).

De manera recíproca se analizó la correlación de los marcadores celulares con *PREX1* al segregar a los pacientes. Los marcadores de células cerebrales correlacionaron con *PREX1* en el grupo de baja expresión y los de macrófagos, linfocitos T y células endoteliales correlacionaron diferencialmente con *PREX1* en el grupo de alta expresión (**Fig. 48A, B**). La carga de células inmunitarias y células estromales de todos los pacientes con LGG pudo analizarse al separar a los pacientes por baja y alta expresión de *PREX1*. Los pacientes con alta expresión de *PREX1* correlacionaron con una mayor proporción de células inmunitarias y estromales (**Fig. 48C**).

Por la alta correlación de la firma transcripcional de *PREX1* con células inmunitarias, específicamente macrófagos y linfocitos T, comparamos si estas poblaciones pudieran constituir mayor riesgo para los pacientes. A través de los algoritmos XCELL, TIMER y EPIC de la plataforma TIMER2.0, encontramos que macrófagos y linfocitos CD4⁺ representaron mayor riesgo para los pacientes, sugiriendo un infiltrado inmunitario que puede contener la firma transcripcional de *PREX1* (**Fig. 49**).

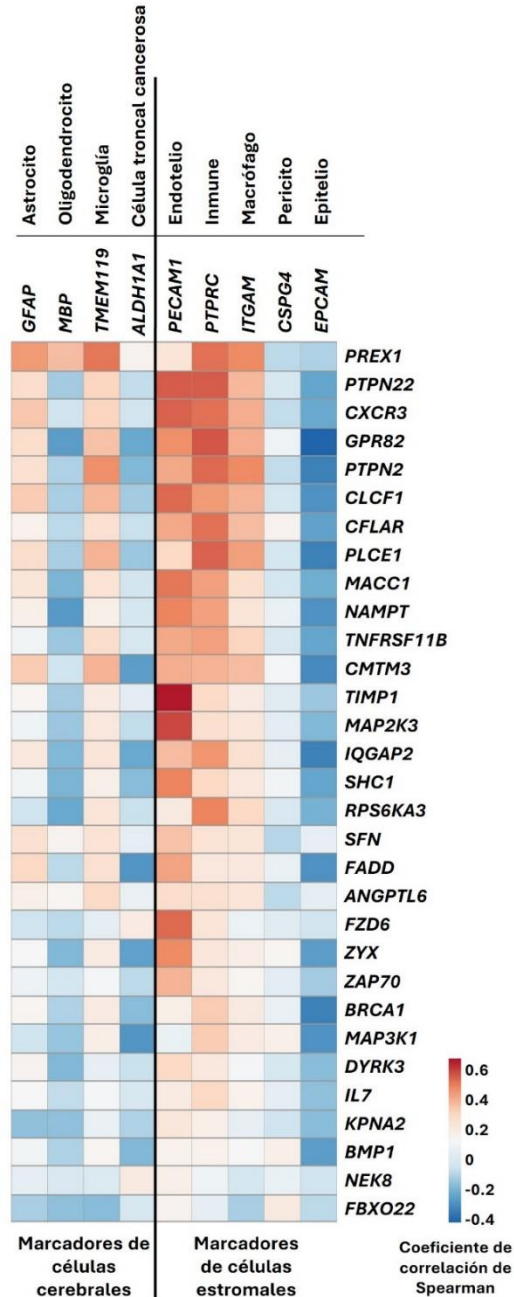


Figura 47 El eje de señalización de *PREX1* correlaciona con astrocitos, microglía y células del estroma.

Correlación de *PREX1* y sus acompañantes de señalización con marcadores de células cerebrales y estromales. Células cerebrales: astrocitos (*GFAP*), oligodendrocitos (*MBP*), microglía (*TMEM119*) y células troncales cancerosas (*ALDH1A1*). Células del estroma: células endoteliales (*PECAM1*), células inmunitarias (*PTPRC*), macrófagos (*ITGAM*), pericitos (*CSPG4*) y células epiteliales (*EPCAM*).

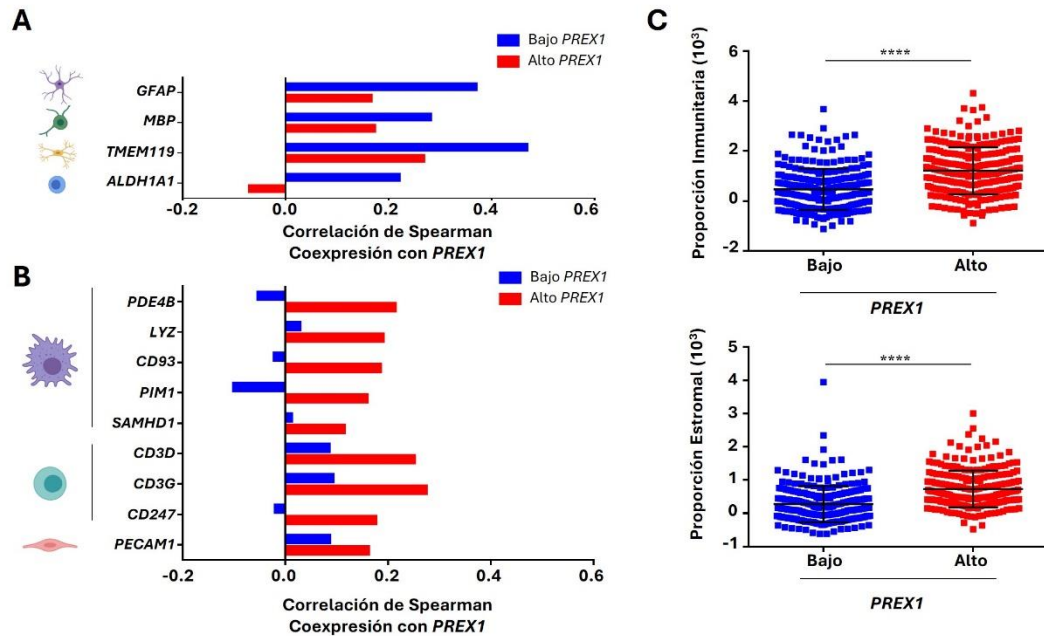


Figura 48 Pacientes con alta expresión de *PREX1* exhiben una mayor proporción de células inmunitarias y del estroma.

A, Correlación diferencial de marcadores de células cancerosas con *PREX1* en pacientes con baja expresión de *PREX1* (barras azules). **B**, Correlación diferencial de marcadores de macrófagos, linfocitos T y células endoteliales con *PREX1* en pacientes con alta expresión de *PREX1* (barras rojas). **C**, Proporciones de poblaciones inmunitarias y estromales en pacientes con baja y alta expresión de *PREX1*.

Algoritmo	Z-score (riesgo incrementado p<0.05)		
	MO	CD8 ⁺	CD4 ⁺
XCELL	5.46	(-)	n.s.
TIMER	4.72	(-)	5.13
EPIC	4.43	(-)	(-)

Figura 49 Microambiente inmunitario en tumores LGG.

Evaluación del riesgo por presencia de macrófagos y linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ en pacientes con LGG. Puntajes calculados por los algoritmos XCELL, TIMER y EPIC.

Comparamos el eje de señalización de *PREX1* encontrado en LGG con otras firmas características de distintos tipos celulares en la plataforma Metascape.

Acorde a la correlación con poblaciones de células inmunitarias y del estroma los tipos celulares más correlacionados fueron monocitos y células endoteliales (Fig. 50).

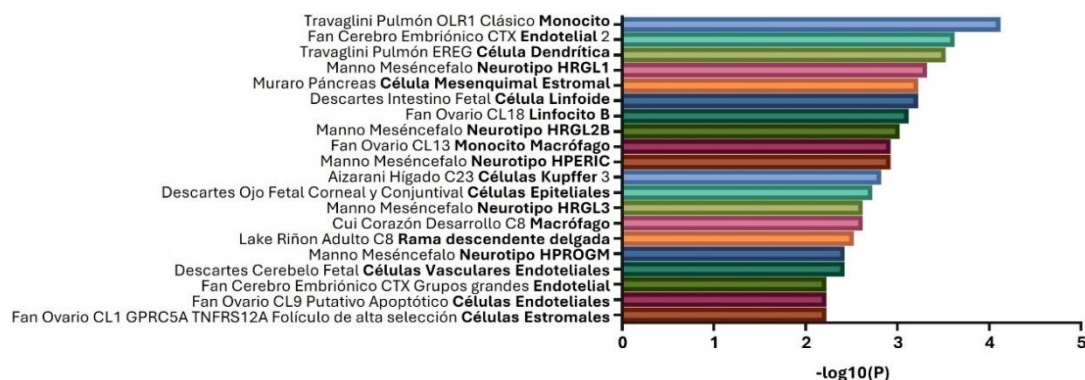


Figura 50 Firmas de tipos celulares correlacionadas con el eje de señalización de *PREX1*.

Correlación de *PREX1* y sus acompañantes de señalización con firmas de tipos celulares establecidas.

Todos los genes de señalización correlacionados con *PREX1* exclusivamente en pacientes con alta expresión de *PREX1* se consideraron como acompañamiento específico y junto con *PREX1* constituyeron una firma transcripcional en LGG. Para validar la firma transcripcional, analizamos su impacto en sobrevivencia. *PREX1* y los 30 genes acompañantes representaron mayor riesgo para los pacientes con LGG, incluso con mayor poder predictivo que *PREX1* por sí solo (Fig. 51A). Esta firma también se validó con dos grupos de datos independientes de la base de datos Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA, Fig. 51B, C).

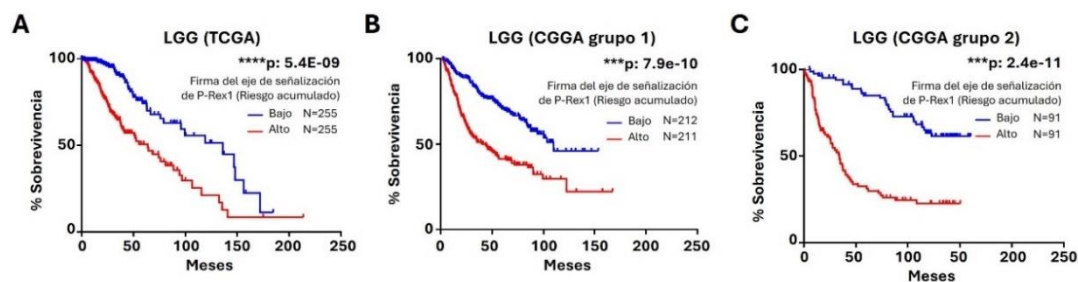


Figura 51 Validación de la firma transcripcional del eje de señalización de *PREX1*.

A, Curva de sobrevivencia de la firma transcripcional de *PREX1* en LGG (TCGA). **B-C**, Curvas de sobrevivencia de la firma transcripcional de *PREX1* con datos del Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA).

Los 30 genes de señalización acompañantes de *PREX1* en LGG se compararon en los 31 estudios del TCGA restantes (**Fig. 52**).

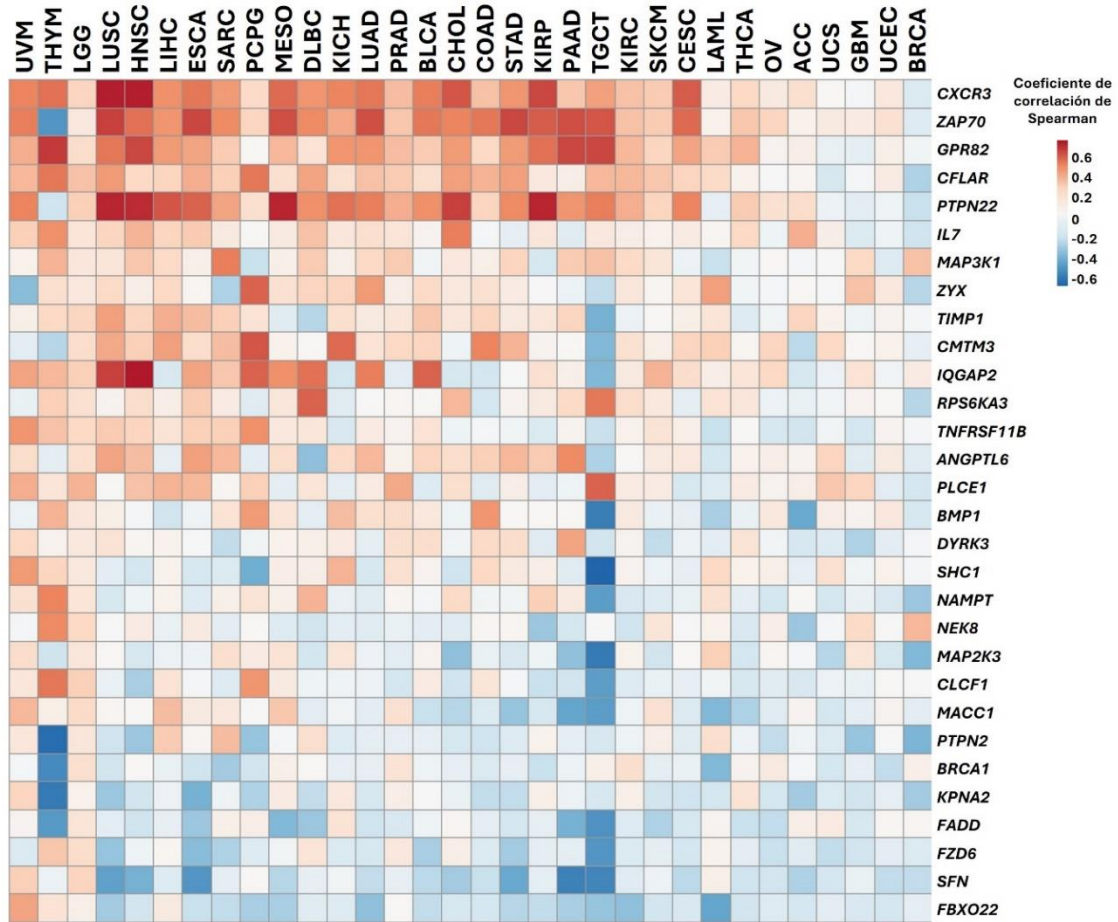


Figura 52 Genes acompañantes de *PREX1* en los 32 estudios del TCGA.

Correlación de los genes acompañantes con la expresión de *PREX1* en los estudios del TCGA.

Tres tipos de cáncer diferentes: adenocarcinoma pulmonar (LUAD), carcinoma de vejiga (BLCA) y carcinoma renal (KIRC) tuvieron a la firma transcripcional de *PREX1* con valor pronóstico en supervivencia, representando mayor riesgo acumulado (**Fig. 53**).

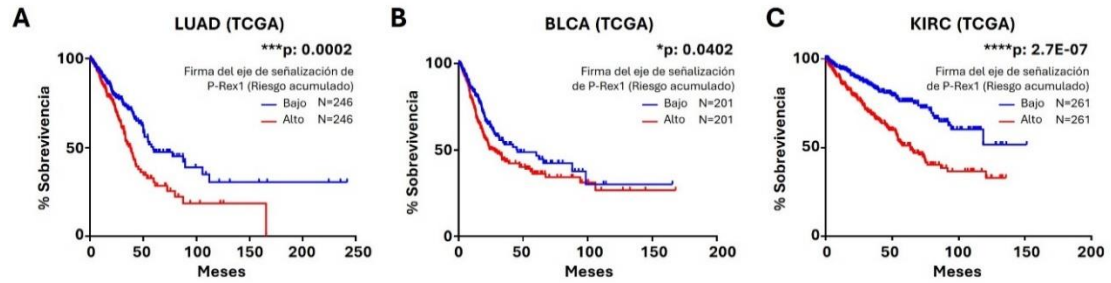


Figura 53 La firma del eje de señalización de *PREX1* (LGG) correlaciona con menor supervivencia en LUAD, BLCA y KIRC.

Curvas de supervivencia de la firma transcripcional de *PREX1* en LUAD (A), BLCA (B) y KIRC (C).

LUAD y KIRC fueron estudios donde la alta expresión de *PREX1* correlacionó con mayor supervivencia, pero al agregar a los genes acompañantes, la firma transcripcional correlacionó con un mal pronóstico.

A través de la minería de datos encontramos a *PREX1* con baja expresión en células cerebrales y alta expresión en células del estroma acompañado de 30 genes que como firma correlacionó con menor supervivencia de los pacientes con LGG (Fig. 54).

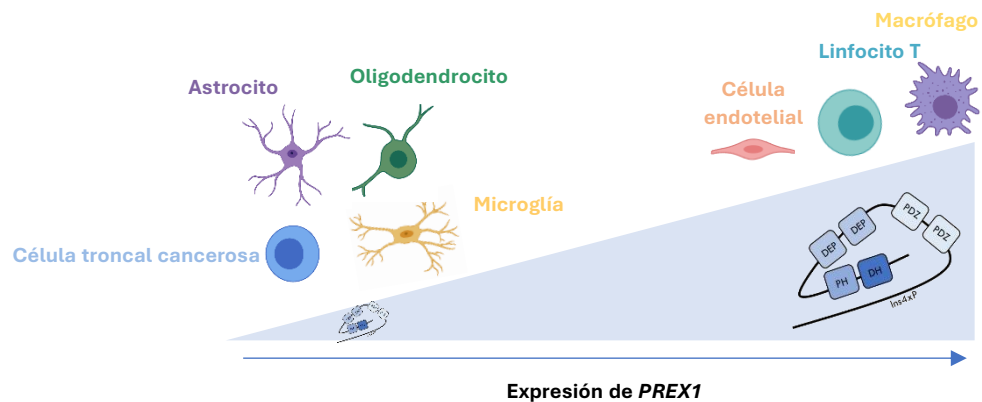


Figura 54 Modelo de correlación de la expresión de *PREX1* con distintos tipos celulares.

En células cerebrales se expresa poco *PREX1*, mientras en células del estroma hay alta expresión de *PREX1* y es acompañado por una firma transcripcional que correlaciona con baja supervivencia de pacientes con distintos tipos de cáncer.

VIII. Discusión

Con el desarrollo de este proyecto encontramos que P-Rex1 es un GEF relevante en varios contextos cancerígenos, desde la comprobación experimental hasta interesantes perspectivas a través de la minería de datos. Determinamos la interacción novedosa de P-Rex1 con PI3K, el efecto activador de Akt1 sobre P-Rex1 mediante fosforilación, la validación de P-Rex1 acompañado de proteínas de la vía PI3K-mTORC2-Akt1 como genes esenciales en líneas celulares de cáncer de mama, la correlación de la alta expresión de P-Rex1 con baja supervivencia en pacientes con glioma de bajo grado (LGG) y leucemia mieloide aguda (LAML) y la ganancia de valor pronóstico del eje de señalización de P-Rex1 conformado por acompañantes de señalización específicos en distintos tipos de cáncer.

Al evaluar a P-Rex1 como plataforma para $G\beta\gamma$ y $PI3K\gamma$, primero determinamos si la $PI3K\gamma$ podía interactuar con el GEF. Fuimos mapeando las regiones desde el amino terminal, a la región DEP-PDZ hasta los dominios DEP1 y PDZ2. Elegir al DEP1 como la región mínima se basó en dos cuestiones, la poca existencia de dominios DEP en las proteínas y el mayor grado de afinidad de las subunidades $p110\gamma$ y $p101$ por el dominio, que con un buen enriquecimiento en el pull-down mantuvo la interacción (**Fig. 16C**). Los análisis y experimentos que involucren a los dominios DEP pueden indicar una mayor especificidad.

La interacción novedosa P-Rex1- $PI3K\gamma$ contribuye a ampliar la relación entre el GEF y la cinasa, pues además del reclutamiento y activación por PIP_3 debido al dominio PH en P-Rex1, las PI3K productoras de este fosfolípido podrían contribuir al desenrollamiento y activación del GEF.

Probamos otras PI3Ks considerando que la coexpresión de P-Rex1 con $PI3K\gamma$ sucede en neutrófilos⁷³. $PI3K\beta$ es ubicua y encontramos que también interactúa con P-Rex1-DEP1 (**Fig. 17A**). Por lo tanto, la $PI3K\beta$ podría sustituir a $PI3K\gamma$ en la vía $G\beta\gamma$ - $PI3K\gamma$ -mTORC2-Akt en células como las epiteliales, donde P-Rex1 también está presente. Esto concuerda con la redundancia de función de $p110\beta$

y p110 γ en diferentes células y ante señales provenientes de GPCRs⁷⁴ como proponemos para la vía de señalización desencadenada por SDF-1.

Una vez que agregamos al heterodímero G $\beta\gamma$ al complejo P-Rex1-PI3K γ se volvió un triángulo interesante, ya que son activadores e interactores recíprocos, es decir, G $\beta\gamma$ puede activar a P-Rex1 y a PI3K γ , PI3K γ puede interactuar con P-Rex1 y activarlo vía PIP₃, y P-Rex1 puede ser una plataforma para G $\beta\gamma$ y PI3K γ . El aspecto de plataforma conlleva otorgar espacio en la proteína para que se ensamblen complejos de proteínas de señalización y se coordine la transducción de señales⁷⁵, al encontrar complejos ternarios vía el amino terminal de P-Rex1 se ve reflejada la parte del ensamble (**Fig. 18**).

Al evaluar el efecto de G $\beta\gamma$ sobre la interacción mínima de P-Rex1-DEP1 con PI3K γ sabíamos que G $\beta\gamma$ no vendría unida al DEP1 porque el heterodímero no interacciona con los DEPs, sino con el DH-PH y PDZ1⁴⁰, por lo que hubiera sido solo a través de PI3K γ . Al no encontrar a G $\beta\gamma$ interactuando con la cinasa, que se aisló con el DEP1, sugiere que la interfaz P-Rex1-DEP1 con PI3K γ podría ser la misma que se establece entre PI3K γ y G $\beta\gamma$ (**Fig. 19**). Dado que se conocen las regiones de interacción entre PI3K γ y G $\beta\gamma$ ²⁵, podemos hipotetizar que P-Rex1 interactúa con la región linker entre el dominio C2 y el dominio helicoidal de la subunidad catalítica p110 γ y/o con el carboxilo terminal de la subunidad regulatoria p101.

Encontramos que P-Rex1 puede ser una plataforma endógena para la vía G $\beta\gamma$ -PI3K β -mTORC2-Akt1 en células de cáncer de mama MCF7. Al aislar al RacGEF activo estimulado con SDF-1, en la misma fracción encontramos a G $\beta\gamma$, p110 β , a Rictor (representante de mTORC2) y a Akt1 (**Fig. 20**). Acorde a las características de plataformas proteicas, P-Rex1 activo puede ensamblar un complejo macromolecular que incluye a estas proteínas que participan en una misma vía de señalización.

Una particularidad interesante es el estado activo del RacGEF, por lo que determinamos si el P-Rex1 inmunoprecipitado también podía aislar proteínas de la vía de interés. Encontramos la interacción de p110 β y p110 α con dependencia del estímulo, lo que refleja el efecto activador de SDF-1 sobre la conformación de P-Rex1. Además, la co-inmunoprecipitación de las proteínas interactoras fue mayor con SDF-1 que con HGF (**Fig. 21**).

La subunidad p110 β es relevante en contextos cancerígenos donde la fosfatasa PTEN se encuentra inactiva, como en cáncer de próstata⁷⁶. Existen pocos interactores preferenciales para p110 β , tal como CRKL, una proteína adaptadora que regula la señalización de p110 β independientemente de p110 α ⁷⁷.

Es interesante la semejanza de contextos alterados por deficiencia de PTEN y por la mutación activante de PI3K α (*PIK3CA*), pues generan hiperactividad de la señalización de PI3Ks. El primer contexto es el de cáncer de próstata y el segundo el de cáncer de mama, como en las células MCF7 donde encontramos a p110 β y p110 α interactuando con P-Rex1.

Las interacciones de G $\beta\gamma$, PI3K, Rictor y Akt1 con P-Rex1 se pusieron a prueba mediante el knockdown del RacGEF. Encontramos que P-Rex1 contribuye como plataforma al ensamblado de dichas proteínas con diferencia en el grado de dependencia. Con la disminución de P-Rex1 y su menor activación, G $\beta\gamma$ ya no se encontró asociada, en cambio p110 β , Rictor y Akt1 no se vieron afectadas (**Fig. 22A**). Esto puede deberse a una población residual de P-Rex1 en complejo con dichas proteínas independientemente del estímulo, complejos preformados, o bien, la participación de otros RacGEFs activos, como Tiam1^{78,79}.

P-Rex1 es una plataforma efectiva para la activación de la cascada mTORC2-Akt1, pues al disminuir la expresión del GEF se observó una señalización atenuada de Akt1 (**Fig. 22B**). La presencia de P-Rex1 y mTORC2 puede activar selectivamente a Akt1⁴⁶ y consideramos que P-Rex1 acerca temporalmente a mTORC2 y a Akt. La activación de Akt sucede rápidamente y después del

ensamblado, pues en nuestros experimentos no encontramos a Akt activa interactuando con P-Rex1 activo.

El P-Rex1 inmunoprecipitado puede representar a diferentes poblaciones del GEF, una suma de la fracción activa e inactiva, esta última afín al aspecto tradicional de otros GEFs funcionando como plataformas. Por ejemplo, Arhgef5 se desempeña como plataforma para Src y PI3K para la formación de podosomas⁸⁰. Los motivos ricos en prolina de Arhgef5 se unen al dominio SH3 de Src y una región del amino terminal del GEF se une a PI3K. En este complejo ternario Src fosforila a Arhgef5 llevando a la activación de RhoA, y la presencia de PI3K funciona como un asa positiva para Src y Arhgef5 al producir PIP₃. Otro ejemplo es un GAP que involucra a un GEF en el complejo. IQGAP1 es una plataforma pro-migratoria para CD13, integrinas β 1, un GEF para ARF (EFA6) y ARF6 activo, el complejo se ubica al frente migratorio para reciclar a las integrinas y que las células puedan continuar migrando efectivamente⁸¹.

En el complejo que P-Rex1 ensambla con G $\beta\gamma$, PI3K, mTORC2 y Akt1 existe la posibilidad de mecanismos alternos para el reclutamiento de las proteínas. Una interpretación del significado de las interacciones P-Rex1-Rictor y P-Rex1-Akt1 que determinamos (**Fig. 20**) es que pudiera existir un complejo ternario donde mTOR sea el reclutador al ser un complejo más grande y con la evidencia de Akt interactuando tanto con P-Rex1 como con Rictor⁴⁶.

Otra alternativa se puede dar por el lado de Rac, ya que en el plano de la membrana plasmática puede reclutar a mTORC2 y este complejo podría servir de plataforma para P-Rex1⁸². Esto contrasta con la dinámica que proponemos para el complejo ensamblado por P-Rex1, consideramos que primero sucede el acomodo de proteínas de la vía sobre P-Rex1 y como consecuencia tanto la vía de señalización como el GEF se activan, obteniendo posteriormente la activación de Rac. En la vía alterna podría tratarse de cascadas independientes que llevan a la activación de Rac^{78,79} para reclutar a mTORC2 y P-Rex1.

Además de plataforma, propusimos a P-Rex1 como efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K-mTORC2-Akt1. Esto lo corroboramos con el uso de inhibidores de mTOR y Akt1. El tratamiento crónico de rapamicina por 24 horas ubicó a P-Rex1 como un efector de mTORC2 (**Fig. 23**). La inhibición de mTORC2 provocó menor activación de P-Rex1, en concordancia con la interacción del GEF con dicho complejo y su estado activo promoviendo migración vía Rac⁴¹.

Datos preliminares contrastan el efecto de torina y MK-2206 en la interacción de proteínas de la vía con P-Rex1 inmunoprecipitado. Mientras torina no tuvo efecto, MK-2206 provocó menor asociación de p110 β y p110 α cuando hubo estímulo. Interesantemente Akt1 no se encontró interactuando con P-Rex1 desde la condición basal, sugiriendo el requerimiento de Akt1 y su actividad para estabilizar el complejo que forma P-Rex1.

La influencia en la actividad de P-Rex1 al ser efector de cinasas de la vía también refleja otra característica de ser una plataforma, en este caso es el efecto positivo que tiene el ensamble de proteínas de señalización de la vía sobre P-Rex1⁷⁵. Dicho efecto positivo resultó por la fosforilación de Akt en los dominios DH-PH y DEP-DEP de P-Rex1 (**Fig. 24A**) y su activación a nivel del casete catalítico que se mantuvo en el GEF completo (**Fig. 25**). Se trata de fosforilaciones novedosas a cargo de Akt hacia P-Rex1 que, al correlacionar la información de Scansite, corresponderían a la Ser319 en el PH y la Thr437 en el DEP1. La fosforilación en el dominio DEP1 la confirmamos por la disponibilidad de las construcciones (**Fig. 24B**), por lo que nos quedaría por confirmar si el PH por sí solo se detecta fosforilado con el anticuerpo para fosfosustratos de Akt.

En PhosphoSitePlus® se encuentran diez estudios que determinaron una fosforilación en la Ser319 de P-Rex1, ocho emplearon espectrometría de masas y dos utilizaron otras estrategias como inmunoprecipitación, western blot y fosfoanticuerpos. Según estas fuentes, la señalización neuregulina-ErbB lleva a la desfosforilación de las Ser313 y Ser319 y fosforilación de las Ser605 y Ser1169⁶⁴. Posteriormente se identificó a PKC δ como la responsable de la

fosforilación en S313⁸³. Así que Akt1 puede ser la cinasa responsable de la fosforilación en la Ser319 del PH de P-Rex1. Además, hay una nueva función en PhosphoSitePlus® (enero 2023), al seleccionar el residuo fosforilado Ser319 en P-Rex1 se puede acceder a la biblioteca de cinasas (KL: Kinase Library) y hacer una predicción de las cinasas que pueden fosforilar dicho residuo. Akt1 aparece en lugar 86.

Con la fosforilación del DEP1 por Akt (Thr437, **Fig. 24B**) se derivan cuestiones interesantes pues se trata de un residuo contiguo al sitio fosforilado por PKA (Ser436)³⁶. Por un lado, queda determinar si la naturaleza de dicha fosforilación es activante o inhibitoria como su vecina y cómo se integra con la fosforilación activante en el DH-PH. Con los resultados obtenidos con P-Rex1 completo se sugiere que la suma de ambas fosforilaciones es activante (**Fig. 25B**). Por otro lado, podría investigarse cómo coexisten estas dos fosforilaciones y si alguna tiene mayor jerarquía.

Combinando los aspectos de plataforma y efector de P-Rex1 obtuvimos que G $\beta\gamma$ y Akt activaron al GEF y se encontraron interactuando con P-Rex1 activo (**Fig. 26**). La combinación de estos activadores resultó en una mayor interacción con p110 β y Rictor, lo que sugiere una conformación de P-Rex1 más disponible para interactuar cuanto más activo esté.

Por lo tanto, llegamos al siguiente modelo (**Fig. 55**): con la señal quimiotáctica SDF-1-CXCR4, se activan proteínas G $_i$ que disocian a las subunidades G α y G $\beta\gamma$. G $\beta\gamma$ ayuda a desinhibir a P-Rex1 al reclutarlo desde los dominios PDZ, y continúa el desenrollamiento con la presencia de interactores y activadores. PI3K β/γ puede ser reclutada como efector de G $\beta\gamma$ y como interactor novedoso de P-Rex1 al asociarse al dominio DEP1. PI3K activa generará PIP $_3$ que interactúa con el dominio PH del GEF. Otras subunidades G $\beta\gamma$ pueden interactuar con el DH-PH de P-Rex1 y junto con el PIP $_3$ activan sinérgicamente al RacGEF. mTOR puede asociarse a los dominios DEP de P-Rex1, quien acerca a Akt para ser activado por mTORC2. Akt1 activa puede fosforilar el DH-PH y activar a P-Rex1.

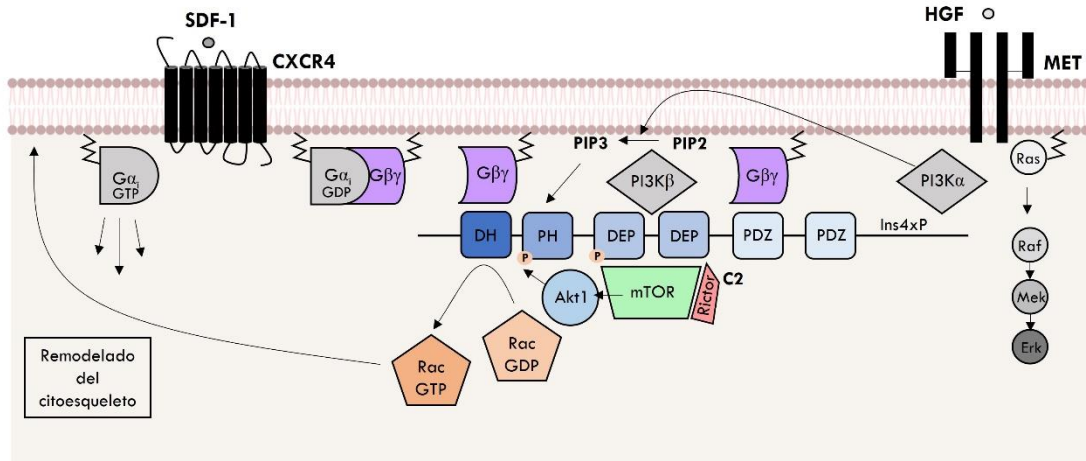


Figura 55 P-Rex1 es plataforma y efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K β -mTORC2-Akt1 en células de cáncer de mama. Modelo del complejo multiproteico que ensambla P-Rex1 a medida que es activado por cascadas quimiotácticas.

Con la evidencia experimental de P-Rex1 ensamblando y formando parte de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K-mTORC2-Akt1 en células de cáncer de mama investigamos en bases de datos de líneas celulares y muestras de pacientes la posible relevancia clínica de los componentes de este complejo.

El encontrar a *PREX1*, *PIK3CA*, *PIK3CB*, *MTOR*, *RICTOR* y *AKT1* como genes esenciales en líneas celulares de cáncer de mama (**Fig. 27A**) coincide con estudios experimentales donde llevaron a cabo silenciamientos y knockouts de estos genes. El knockdown de P-Rex1, Akt1 y mTORC2 (vía Rictor) reveló su requerimiento para migración, invasión y metástasis de cáncer de ovario⁴⁶. En cáncer de mama, el knockdown de P-Rex1 en el tumor primario disminuyó la metástasis a hueso⁶⁰ y aumentó la sobrevivencia de modelos murinos al afectar la cooperación oncogénica entre P-Rex1 y Neu⁶⁷, y en este proyecto encontramos que el knockdown de P-Rex1 afecta su papel de plataforma hacia $G\beta\gamma$ (**Fig. 22A**).

Tanto p110 α como p110 β se asociaron a P-Rex1 ante estímulos (**Fig. 21**). La esencialidad de diferentes isoformas de PI3K como *PIK3CA* y *PIK3CB* tiene que ver con el contexto mutacional de los tipos de cáncer. Cuando los tumores

tienen mutado RTKs de la familia de ErbB, *PIK3CA* o Ras se ha observado dependencia de *PIK3CA*^{84,85} en cáncer de mama. En cambio, en tumores deficientes de PTEN y con la participación de cascadas de GPCRs la PI3K esencial es *PIK3CB*, esto se ha observado en cáncer de próstata, cerebro y mama⁸⁶. Por este trasfondo mutacional es importante identificar las alteraciones en los pacientes para idear mejores estrategias terapéuticas hacia proteínas y vías de señalización tratables.

Que hayamos encontrado a Rictor interactuando con P-Rex1 activo (**Fig. 20**) nos llevó a considerar al complejo mTORC2, el cual logra silenciarse a través de este componente diferencial. Además de líneas celulares, Rictor también es esencial para el desarrollo tumoral en modelos murinos y humanos de cáncer de próstata con pérdida de PTEN⁸⁷ y para el crecimiento tumoral independiente de anclaje en cáncer de mama⁸⁸.

Resultó de gran interés la esencialidad diferencial de *AKT1* respecto a *AKT2* (**Fig. 27A**), a pesar de que los inhibidores de las tres isoformas de Akt afectaron la sobrevivencia de líneas celulares de cáncer de mama (**Fig. 27B**), y de la expresión comparable de *AKT1* y *AKT2* en las líneas celulares (**Fig. 28**), solo el knockout de *AKT1* afectó la sobrevivencia. Esto estaría acorde a la contribución específica de Akt1, y no de Akt2, en cáncer de mama promoviendo el crecimiento del tumor y metástasis^{45,46}.

Entre los inhibidores de PI3K, Akt y mTOR identificados por minería de datos en base a su efecto letal en células de cáncer de mama, los más frecuentes fueron los de las cinasas Akt (**Fig. 27B**). Seis inhibidores afectaron la viabilidad de células de cáncer de mama, GDC-0068 (Ipatasertib), MK-2206, Akti-1/2 (Akt Inhibitor VIII), canertinib, AZD5323 y GSK2110183 (Afuresertib). Este último es el único inhibidor selectivo de Akt1 del grupo y al igual que GDC-0068 (Ipatasertib), MK-2206 y canertinib se encuentran en estudios clínicos en fase 2 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>; https://www.selleckchem.com/subunits/Akt1_Akt_selpan.html).

MK-2206 es un inhibidor alostérico de Akt utilizado ampliamente en cuestiones experimentales, antiguo pero muy efectivo, tal como lo observamos en experimentos preliminares. Su mecanismo de acción consiste en unirse al dominio PH de Akt impidiendo su unión al PIP₃. Si comparamos las estrategias de pérdida de función, el uso de inhibidores como MK-2206 puede considerarse más efectivo por su espectro de acción amplio, a diferencia del uso de esiRNAs contra las Akts. En cuanto al efecto sorprendente de MK-2206 en la activación de P-Rex1 podemos considerar que este inhibidor podría afectar el reclutamiento de los complejos a la membrana plasmática donde se genera PIP₃, ya que varios componentes de la vía que ensambla P-Rex1 poseen dominios PH que pueden ser reclutados por este segundo mensajero, iniciando por P-Rex1 y continuando con mSin1 de mTORC2 y Akt.

En cuanto al inhibidor Apitolisib, que tiene como blancos a PI3Ks de clase I y a mTOR, se ve reflejada la homología de mTOR con las PI3K al corresponder a la familia de cinasas relacionadas a PI3Ks (PIKKs).

El hallazgo de las PI3Ks de clase I (PI3K β y PI3K γ) interactuando con P-Rex1 en el dominio DEP1 como región mínima (**Fig. 17B**) es consistente con la interacción del dominio de cinasa de mTOR con los dominios DEP-DEP de P-Rex1⁴¹. Podríamos considerar, hipotéticamente, que en el complejo ensamblado por P-Rex1, PI3K y mTOR se unen a superficies contrarias en el RacGEF y por ello encontramos simultáneamente a las subunidades catalíticas de PI3K y a Rictor. Sería interesante investigar el efecto del dominio DEP1 como modulador de la actividad de PI3K y mTORC2. Gracias al mapeo se obtuvo una región mínima de interacción y esto puede servir de guía para el desarrollo de moléculas pequeñas que bloqueen la interfase de interacción con posible aplicación terapéutica.

Identificamos 24 genes de señalización esenciales acompañando de manera exclusiva a P-Rex1 al comparar los genes de líneas celulares donde tuvo efecto el knockout de P-Rex1 contra las líneas celulares en las que el CRISPR no afectó la sobrevivencia (**Fig. 31**). Entre los 24 genes de señalización encontramos a

PTGER3, *GNA11*, *ERBB3*, *FGFR3*, *FRS2*, *GAB2* y *MAPK3*. *ERBB3* y *MAPK3* son los genes para las proteínas HER3 y Erk1, respectivamente, que han sido estudiadas en el contexto de la señalización de P-Rex1. Encontrar acompañantes de señalización de P-Rex1 previamente conocidos valida nuestra estrategia de minería de datos, y para los nuevos acompañantes representa la posibilidad de estudiarlos experimentalmente como reguladores de P-Rex1.

PTGER3 codifica para el receptor EP3, si bien este receptor no se ha asociado a P-Rex1, sí se ha estudiado un receptor de la misma familia. El receptor EP2 es un GPCR acoplado a G_s que lleva a la producción de AMP_c , a la activación de la holoenzima PKA que se separa en las subunidades regulatorias y catalíticas capaces de regular a P-Rex1⁴². En cambio, EP3 se encuentra acoplado a G_i y podría ser un regulador novedoso afín a las cascadas quimiotácticas en las que participa P-Rex1 gracias a la liberación de heterodímeros $G\beta\gamma$.

GNA11 codifica para la proteína $G\alpha_{11}$ que pertenece a la subfamilia G_q de las proteínas $G\alpha$. Considerando a $G\alpha_{11}$ funcionalmente redundante a $G\alpha_q$, se esperaría que también logre evitar la activación de P-Rex1 al mantener unido al heterodímero $G\beta\gamma$ para evitar la activación del RacGEF y dirigir la señalización hacia la activación de Rho⁸⁹.

ERBB3 codifica para HER3, un RTK cuyo dominio de cinasa es inactivo, pero que forma dímeros con HER2 causando resistencia a tratamientos empleados en cáncer de mama. Su hallazgo como acompañante exclusivo de P-Rex1 apoya la vía de señalización alterna a la de GPCRs quimiotácticos, pues P-Rex1 también puede ser activado por RTKs como HER2/3^{64,65}.

FGFR3, *FRS2*, *GAB2* y *MAPK3* pueden formar una pequeña cascada funcional al tratarse de un RTK, dos adaptadores y la cinasa Erk1, respectivamente. P-Rex1 podría participar en esta cascada río abajo teniendo en cuenta la participación de $PI3K\alpha$ del lado de RTKs. *FGFR3* podría unirse a otros RTKs que activan a P-Rex1 como $PDGFR\beta$, IGF-1R y MET⁸⁹⁻⁹¹.

Encontrar a *MAPK3* como acompañante de *PREX1* apoya la participación del RacGEF en vías mitogénicas, como en el asa positiva para la activación de PI3K-Akt y MEK-ERK vía el receptor para el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1R)⁶³. La participación de P-Rex1 en la activación de Erk es una cuestión que ha estado en debate, pues dependiendo de los modelos celulares de cáncer de mama se ha encontrado relacionado con la vía mitogénica o se ha especificado que en líneas luminales P-Rex1 sólo contribuye a motilidad vía Rac⁹². De manera que P-Rex1 podría integrar diferentes cascadas de señalización con los acompañantes novedosos que identificamos, virtualmente hasta el momento, y con visión a probarlas experimentalmente.

La correlación de *PREX1* y los acompañantes de señalización con marcadores de subtipos de cáncer de mama (**Fig. 32**), en especial con *ESR1* (receptor de estrógenos α) apunta a la posible existencia de esta firma transcripcional en cáncer de mama luminal tal como nuestro modelo en células MCF7, y en menor proporción en tumores HER2⁺, subtipos en los que P-Rex1 se ha estudiado ampliamente^{63-65,90,92}.

Las fosfoproteínas identificadas como acompañantes de señalización de P-Rex1, esenciales en líneas celulares y presentes en muestras de pacientes, consistieron en varios genes cuyos productos proteicos participan en cáncer de mama como *ERBB3* y *ESR1*. Apoyando la relevancia de la vía G β γ -PI3K-mTORC2-Akt1-P-Rex1 y su actividad en cáncer de mama encontramos a *RICTOR*, *AKT1* y *MTOR* como proteínas fosforiladas, así como a *BAD* y *RPS6* como sustratos de estas cinasas (**Fig. 33**). El haber encontrado a fosfoproteínas como acompañantes correlacionados con *PREX1* se tradujo en un enriquecimiento de vías de señalización relevantes en cáncer de mama y acorde a la participación del complejo ensamblado por P-Rex1 que proponemos, como resistencia a inhibidores de EGFR, señalización de RTKs y de mTOR (**Fig. 34**). Consistente con esta posibilidad, recientemente se descubrió que P-Rex1 contribuye a la resistencia de bevacizumab, como terapia dirigida en cáncer de próstata, a

través de su unión con neuropilina 2 y posterior activación de Rac, por lo que inhibir a P-Rex1 resulta en la recuperación de sensibilidad al tratamiento⁶⁸.

Para indagar si P-Rex1 es relevante en otros tipos de cáncer analizamos los estudios del TCGA y encontramos que la alta expresión de *PREX1* correlaciona con menor supervivencia en glioma de bajo grado (LGG) y en leucemia mieloide aguda (LAML, **Fig. 35A**). Estos dos estudios están incluidos en 21 estudios del TCGA con datos de supervivencia disponibles. En contraste, en otros dos estudios la alta expresión de *PREX1* correlacionó con mayor supervivencia, en carcinoma renal de células claras (KIRC) y adenocarcinoma pulmonar (LUAD). Esto puede significar que P-Rex1 participa diferencialmente en el desarrollo del cáncer, según el contexto patológico, de acuerdo con las señales que puede recibir e integrar y en cuáles tipos celulares esté presente.

Profundizamos los análisis posteriores en el estudio LGG por exhibir el mayor significado estadístico entre la alta expresión de *PREX1* y baja supervivencia.

En la búsqueda de acompañantes de señalización de P-Rex1 analizamos líneas celulares de glioma y muestras de pacientes. Por el lado de co-esencialidad encontramos a *PRKAR1A*, *RPTOR* y *MET* en astrocitoma (**Fig. 36A**), un conjunto de líneas celulares de glioma como la 42MGBA donde *PREX1* fue esencial (**Fig. 35C**). Estos acompañantes corresponden a la subunidad reguladora de PKA, $R1\alpha$, que puede activar a P-Rex1⁴², al componente diferencial de mTORC1 donde P-Rex1 se ha encontrado interactuando⁴¹, y al RTK activado por HGF que participa en la progresión de glioma⁹³. Su identificación mediante minería de datos valida la estrategia y es consistente con la relación funcional establecida por P-Rex1 y sus acompañantes de señalización identificados como coesenciales en células cancerosas y altamente correlacionados en expresión en muestras de pacientes.

Por el lado de las muestras de pacientes, analizamos el trasfondo mutacional de LGG y encontramos que ante mutaciones y/o amplificaciones de *EGFR*, *NF1* y

PTEN hay mayor expresión de *PREX1* (**Fig. 37C**). Estos genes se han identificado en tamizajes genéticos de glioma difuso^{94,95} y podrían estar llevando a la activación de factores transcripcionales que actúen sobre el promotor de P-Rex1, o bien, logrando la estabilización del mensajero de P-Rex1 por diversos mecanismos.

Para encontrar a los acompañantes de señalización realizamos un análisis exhaustivo de genes cuya expresión mostró correlación exclusiva y diferencial con *PREX1*. Entre agonistas, receptores, cinasas, fosfatasas y proteínas adaptadoras, resultaron 30 acompañantes que potencialmente conforman un eje de señalización integrado por P-Rex1 en LGG (**Figs. 39, 42, 44-45**). Encontramos a *CXCR3* y *FZD6*, GPCRs que participan en migración e invasión de gliomas^{96,97} y que podrían sumarse a *CXCR4* como GPCRs que activan a P-Rex1 vía $G\beta\gamma$ -PI3K β/γ , y *PTPN22*, una fosfatasa que interfiere con la respuesta inmune antitumoral⁹⁸. *PTPN2*, *CLCF1* y *RPS6KA3* (RSK2) codifican para proteínas estudiadas como blancos terapéuticos en otros tipos de cáncer y que al ser potenciales acompañantes de P-Rex1 abren el panorama de estudio en otros contextos⁹⁹⁻¹⁰¹.

La obtención de la firma transcripcional de *PREX1* con sus acompañantes de señalización tuvo como determinante la correlación con menor supervivencia (**Figs. 40, 43, 46**). Dicha correlación genera la perspectiva de un valor pronóstico sobre cómo les irá a los pacientes y resulta informativa sobre potenciales relaciones entre proteínas que pueden estudiarse experimentalmente.

PREX1 correlacionó con marcadores de astrocitos, oligodendrocitos y microglía del lado de células cerebrales que pueden verse alteradas en gliomas y con células endoteliales, inmunitarias (en general) y macrófagos del lado de células estromales (**Fig. 47**). En cuanto a los acompañantes de señalización de la firma hubo notable correlación con las células estromales, sugiriendo una contribución de *PREX1* y compañía en procesos angiogénicos y un infiltrado inmunitario que podría contribuir a agravar el pronóstico de los pacientes^{102,103}.

Hubo cinco marcadores para macrófagos que se encontraron enriquecidos en el grupo de alta expresión de *PREX1* (**Fig. 48B**) y que pueden representar la población de macrófagos asociados a tumor (TAMs)^{69,104}, distintos a la microglía con la que también se observó correlación en el grupo de baja expresión de *PREX1*.

Resultó todavía más interesante que al probar a *PREX1* con los 30 acompañantes como una firma del eje de señalización la correlación con menor supervivencia ganó significancia, validando la firma transcripcional (**Fig. 51**).

Al comparar el perfil de correlación de los 30 acompañantes de señalización en LGG contra los 31 estudios del TCGA resultó evidente que el posible eje de señalización integrado por P-Rex1 es relevante en otros tipos de cáncer, reflejando una participación global, por ejemplo, en algunos tipos de cáncer, la coexpresión de P-Rex1 con *CXCR3*, *ZAP70*, *GPR82*, *PTPN22* e *IQGAP2* tuvo un mayor grado de correlación respecto a LGG (**Fig. 52**).

La firma transcripcional de *PREX1*, que incluye a 30 acompañantes de señalización, demostró valor pronóstico en adenocarcinoma pulmonar (LUAD), carcinoma de vejiga (BLCA) y carcinoma renal (KIRC), sugiriendo la participación de las cascadas que puede integrar P-Rex1 en diferentes tipos de cáncer (**Fig. 53**).

Así pues, determinamos que el RacGEF P-Rex1 es una plataforma y efector de la vía $G\beta\gamma$ -PI3K-mTORC2-Akt1, una cascada relevante en cáncer de mama y que mediante el análisis de estos componentes por minería de datos ampliamos los potenciales interactores de P-Rex1 que, en conjunto, pueden servir como huellas para identificar, vigilar y tratar farmacológicamente a pacientes con varios tipos de cáncer.

IX. Conclusiones

1. Las PI3K de clase I pueden interactuar con P-Rex1 en respuesta a SDF-1. p110 α y p110 β se unen endógenamente a P-Rex1 en células MCF7. p110 β y PI3K γ se asocian al dominio DEP1. P-Rex1 permite la formación de un complejo ternario con PI3K γ y G $\beta\gamma$.
2. P-Rex1 es efector de la vía G $\beta\gamma$ -PI3K-mTORC2-Akt1 que ensambla y Akt1 contribuye fosforilando el casete catalítico del GEF, activándolo.
3. P-Rex1, PI3K, mTORC2 y Akt1 son componentes esenciales en líneas celulares de cáncer de mama y los acompañantes específicos determinados por minería correlacionan con células epiteliales ER⁺ y la vía de señalización de mTOR.
4. El eje de señalización de P-Rex1 acompañado por 30 genes es indicativo de infiltrado de células estromales y correlaciona con baja supervivencia en pacientes con LGG. La firma transcripcional demostró poder predictivo en cáncer de pulmón, vejiga y riñón.

X. Perspectivas

Con los hallazgos de este proyecto nos interesa profundizar en la caracterización del complejo $G\beta\gamma$ -PI3K-mTORC2-Akt1-P-Rex1 desde la parte temporal y espacial, así como el aprovechamiento de la minería de datos. Consideramos los siguientes estudios a futuro:

- Identificación de firmas transcripcionales pan-cancer integradas por P-Rex1. Un análisis *in silico* para identificar acompañantes de señalización de P-Rex1 compartidos en múltiples tipos de cáncer hasta la evaluación experimental de cascadas de señalización novedosas.
- Mecanismos de contribución de la firma transcripcional de P-Rex1 al infiltrado inmunitario en cáncer de pulmón, vejiga y riñón.
- Fosfoproteoma asociado a P-Rex1-Akt1 en cáncer.
- Dado el complejo ternario P-Rex1- $G\beta\gamma$ -PI3K γ , determinar por microscopía la localización del complejo y si P-Rex1, como puente entre las proteínas, tiene algún efecto fenotípico.
- Aprovechando la región mínima de interacción entre PI3Ks y P-Rex1, emplear el dominio DEP1 como péptido bloqueante en ensayos de cierre de herida y migración.
- Por la detección de P-Rex1-DH-PH fosforilado por Akt1, generar la mutación S319A y evaluar la versión de P-Rex1 no fosforilable por Akt1.
- Dada la fosforilación de P-Rex1-DEP1 por Akt1, caracterizar si resulta en activación o inhibición del GEF y cómo conviven las cinasas Akt1 y PKA al fosforilar el mismo dominio.
- Uso de inhibidores selectivos de Akt1 para corroborar la contribución específica de esta isoenzima al complejo ensamblado por P-Rex1.

XI. Referencias

- 1 SenGupta, S., Parent, C. A. & Bear, J. E. The principles of directed cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **22**, 529-547, doi:10.1038/s41580-021-00366-6 (2021).
- 2 Shellard, A. & Mayor, R. All Roads Lead to Directional Cell Migration. *Trends Cell Biol* **30**, 852-868, doi:10.1016/j.tcb.2020.08.002 (2020).
- 3 Lawson, C. D. & Ridley, A. J. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J Cell Biol* **217**, 447-457, doi:10.1083/jcb.201612069 (2018).
- 4 Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635, doi:10.1038/nature01148 (2002).
- 5 Ridley, A. J. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* **114**, 2713-2722, doi:10.1242/jcs.114.15.2713 (2001).
- 6 Mayor, R. & Etienne-Manneville, S. The front and rear of collective cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 97-109, doi:10.1038/nrm.2015.14 (2016).
- 7 Jaffe, A. B. & Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247-269, doi:10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721 (2005).
- 8 Vazquez-Prado, J., Bracho-Valdes, I., Cervantes-Villagrana, R. D. & Reyes-Cruz, G. Gbetagamma Pathways in Cell Polarity and Migration Linked to Oncogenic GPCR Signaling: Potential Relevance in Tumor Microenvironment. *Mol Pharmacol* **90**, 573-586, doi:10.1124/mol.116.105338 (2016).
- 9 Cook, D. R., Rossman, K. L. & Der, C. J. Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene* **33**, 4021-4035, doi:10.1038/onc.2013.362 (2014).
- 10 Aittaleb, M., Boguth, C. A. & Tesmer, J. J. Structure and function of heterotrimeric G protein-regulated Rho guanine nucleotide exchange factors. *Mol Pharmacol* **77**, 111-125, doi:10.1124/mol.109.061234 (2010).
- 11 Welch, H. C. *et al.* P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P₃- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell* **108**, 809-821, doi:10.1016/s0092-8674(02)00663-3 (2002).
- 12 Hall, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514, doi:10.1126/science.279.5350.509 (1998).
- 13 Bondar, A. & Lazar, J. Dissociated GalphaGTP and Gbetagamma protein subunits are the major activated form of heterotrimeric Gi/o proteins. *J Biol Chem* **289**, 1271-1281, doi:10.1074/jbc.M113.493643 (2014).
- 14 Neptune, E. R., Iiri, T. & Bourne, H. R. Galphai is not required for chemotaxis mediated by Gi-coupled receptors. *J Biol Chem* **274**, 2824-2828, doi:10.1074/jbc.274.5.2824 (1999).
- 15 Neptune, E. R. & Bourne, H. R. Receptors induce chemotaxis by releasing the betagamma subunit of Gi, not by activating Gq or Gs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14489-14494, doi:10.1073/pnas.94.26.14489 (1997).
- 16 Gulati, S. *et al.* Targeting G protein-coupled receptor signaling at the G protein level with a selective nanobody inhibitor. *Nat Commun* **9**, 1996, doi:10.1038/s41467-018-04432-0 (2018).
- 17 Brock, C. *et al.* Roles of G beta gamma in membrane recruitment and activation of p110 gamma/p101 phosphoinositide 3-kinase gamma. *J Cell Biol* **160**, 89-99, doi:10.1083/jcb.200210115 (2003).

- 18 Hoxhaj, G. & Manning, B. D. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* **20**, 74-88, doi:10.1038/s41568-019-0216-7 (2020).
- 19 Vanhaesebroeck, B., Stephens, L. & Hawkins, P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 195-203, doi:10.1038/nrm3290 (2012).
- 20 Geering, B., Cutillas, P. R., Nock, G., Gharbi, S. I. & Vanhaesebroeck, B. Class IA phosphoinositide 3-kinases are obligate p85-p110 heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7809-7814, doi:10.1073/pnas.0700373104 (2007).
- 21 Cuevas, B. D. *et al.* Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **276**, 27455-27461, doi:10.1074/jbc.M100556200 (2001).
- 22 McGlade, C. J. *et al.* SH2 domains of the p85 alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase regulate binding to growth factor receptors. *Mol Cell Biol* **12**, 991-997, doi:10.1128/mcb.12.3.991-997.1992 (1992).
- 23 Hu, P. *et al.* Interaction of phosphatidylinositol 3-kinase-associated p85 with epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptors. *Mol Cell Biol* **12**, 981-990, doi:10.1128/mcb.12.3.981-990.1992 (1992).
- 24 Rynkiewicz, N. K. *et al.* Gbetagamma is a direct regulator of endogenous p101/p110gamma and p84/p110gamma PI3Kgamma complexes in mouse neutrophils. *Sci Signal* **13**, doi:10.1126/scisignal.aaz4003 (2020).
- 25 Vadas, O. *et al.* Molecular determinants of PI3Kgamma-mediated activation downstream of G-protein-coupled receptors (GPCRs). *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 18862-18867, doi:10.1073/pnas.1304801110 (2013).
- 26 Kurig, B. *et al.* Ras is an indispensable coregulator of the class IB phosphoinositide 3-kinase p87/p110gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20312-20317, doi:10.1073/pnas.0905506106 (2009).
- 27 Liu, P. *et al.* PtdIns(3,4,5)P3-Dependent Activation of the mTORC2 Kinase Complex. *Cancer Discov* **5**, 1194-1209, doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0460 (2015).
- 28 Muller, P. M. *et al.* Systems analysis of RhoGEF and RhoGAP regulatory proteins reveals spatially organized RAC1 signalling from integrin adhesions. *Nat Cell Biol* **22**, 498-511, doi:10.1038/s41556-020-0488-x (2020).
- 29 Hodge, R. G. & Ridley, A. J. Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 496-510, doi:10.1038/nrm.2016.67 (2016).
- 30 Rossman, K. L., Der, C. J. & Sondek, J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 167-180, doi:10.1038/nrm1587 (2005).
- 31 Thompson, A. P., Bitsina, C., Gray, J. L., von Delft, F. & Brennan, P. E. RHO to the DOCK for GDP disembarking: Structural insights into the DOCK GTPase nucleotide exchange factors. *J Biol Chem* **296**, 100521, doi:10.1016/j.jbc.2021.100521 (2021).
- 32 Goicoechea, S. M., Awadia, S. & Garcia-Mata, R. I'm coming to GEF you: Regulation of RhoGEFs during cell migration. *Cell Adh Migr* **8**, 535-549, doi:10.4161/cam.28721 (2014).
- 33 Carretero-Ortega, J. *et al.* Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex-1), a guanine nucleotide exchange factor for Rac, mediates angiogenic responses to stromal cell-derived factor-1/chemokine stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL-12) linked to Rac activation,

- endothelial cell migration, and in vitro angiogenesis. *Mol Pharmacol* **77**, 435-442, doi:10.1124/mol.109.060400 (2010).
- 34 Chang, Y. G. *et al.* Structure of the metastatic factor P-Rex1 reveals a two-layered autoinhibitory mechanism. *Nat Struct Mol Biol* **29**, 767-773, doi:10.1038/s41594-022-00804-9 (2022).
- 35 Ravala, S. K. *et al.* The first DEP domain of the RhoGEF P-Rex1 autoinhibits activity and contributes to membrane binding. *J Biol Chem* **295**, 12635-12647, doi:10.1074/jbc.RA120.014534 (2020).
- 36 Chavez-Vargas, L. *et al.* Protein Kinase A (PKA) Type I Interacts with P-Rex1, a Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor: EFFECT ON PKA LOCALIZATION AND P-Rex1 SIGNALING. *J Biol Chem* **291**, 6182-6199, doi:10.1074/jbc.M115.712216 (2016).
- 37 Welch, H. C. Regulation and function of P-Rex family Rac-GEFs. *Small GTPases* **6**, 49-70, doi:10.4161/21541248.2014.973770 (2015).
- 38 Srijakotre, N. *et al.* P-Rex1 and P-Rex2 RacGEFs and cancer. *Biochem Soc Trans* **45**, 963-977, doi:10.1042/BST20160269 (2017).
- 39 Barber, M. A. *et al.* The guanine-nucleotide-exchange factor P-Rex1 is activated by protein phosphatase 1 α . *Biochem J* **443**, 173-183, doi:10.1042/BJ20112078 (2012).
- 40 Cervantes-Villagrana, R. D. *et al.* Gbetagamma recruits and activates P-Rex1 via two independent binding interfaces. *Biochem Biophys Res Commun* **539**, 20-27, doi:10.1016/j.bbrc.2020.12.089 (2021).
- 41 Hernandez-Negrete, I. *et al.* P-Rex1 links mammalian target of rapamycin signaling to Rac activation and cell migration. *J Biol Chem* **282**, 23708-23715, doi:10.1074/jbc.M703771200 (2007).
- 42 Adame-Garcia, S. R. *et al.* cAMP-dependent activation of the Rac guanine exchange factor P-REX1 by type I protein kinase A (PKA) regulatory subunits. *J Biol Chem* **294**, 2232-2246, doi:10.1074/jbc.RA118.006691 (2019).
- 43 Manning, B. D. & Toker, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* **169**, 381-405, doi:10.1016/j.cell.2017.04.001 (2017).
- 44 Dillon, R. L. *et al.* Akt1 and akt2 play distinct roles in the initiation and metastatic phases of mammary tumor progression. *Cancer Res* **69**, 5057-5064, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4287 (2009).
- 45 Chen, X. *et al.* Cell-Autonomous versus Systemic Akt Isoform Deletions Uncovered New Roles for Akt1 and Akt2 in Breast Cancer. *Mol Cell* **80**, 87-101 e105, doi:10.1016/j.molcel.2020.08.017 (2020).
- 46 Kim, E. K. *et al.* Selective activation of Akt1 by mammalian target of rapamycin complex 2 regulates cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Oncogene* **30**, 2954-2963, doi:10.1038/onc.2011.22 (2011).
- 47 Saxton, R. A. & Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **168**, 960-976, doi:10.1016/j.cell.2017.02.004 (2017).
- 48 Bracho-Valdes, I. *et al.* mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused. *IUBMB Life* **63**, 896-914, doi:10.1002/iub.558 (2011).
- 49 Yang, G., Murashige, D. S., Humphrey, S. J. & James, D. E. A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Rep* **12**, 937-943, doi:10.1016/j.celrep.2015.07.016 (2015).
- 50 Stutfeld, E. *et al.* Architecture of the human mTORC2 core complex. *Elife* **7**, doi:10.7554/eLife.33101 (2018).

- 51 Meng, J. & Ferguson, S. M. GATOR1-dependent recruitment of FLCN-FNIP to lysosomes coordinates Rag GTPase heterodimer nucleotide status in response to amino acids. *J Cell Biol* **217**, 2765-2776, doi:10.1083/jcb.201712177 (2018).
- 52 Ebner, M., Sinkovics, B., Szczygiel, M., Ribeiro, D. W. & Yudushkin, I. Localization of mTORC2 activity inside cells. *J Cell Biol* **216**, 343-353, doi:10.1083/jcb.201610060 (2017).
- 53 Cervantes-Villagrana, R. D., Color-Aparicio, V. M., Reyes-Cruz, G. & Vazquez-Prado, J. Protumoral bone marrow-derived cells migrate via Gbetagamma-dependent signaling pathways and exhibit a complex repertoire of RhoGEFs. *J Cell Commun Signal* **13**, 179-191, doi:10.1007/s12079-018-00502-6 (2019).
- 54 Samuels, Y. *et al.* High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* **304**, 554, doi:10.1126/science.1096502 (2004).
- 55 Campbell, I. G. *et al.* Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* **64**, 7678-7681, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2933 (2004).
- 56 Maehama, T. & Dixon, J. E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **273**, 13375-13378, doi:10.1074/jbc.273.22.13375 (1998).
- 57 Li, J. *et al.* PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**, 1943-1947, doi:10.1126/science.275.5308.1943 (1997).
- 58 Lauring, J. *et al.* Knock in of the AKT1 E17K mutation in human breast epithelial cells does not recapitulate oncogenic PIK3CA mutations. *Oncogene* **29**, 2337-2345, doi:10.1038/onc.2009.516 (2010).
- 59 Barrio-Real, L. & Kazanietz, M. G. Rho GEFs and cancer: linking gene expression and metastatic dissemination. *Sci Signal* **5**, pe43, doi:10.1126/scisignal.2003543 (2012).
- 60 Clements, M. E. & Johnson, R. W. PREX1 drives spontaneous bone dissemination of ER+ breast cancer cells. *Oncogene* **39**, 1318-1334, doi:10.1038/s41388-019-1064-3 (2020).
- 61 Qin, J. *et al.* Upregulation of PIP3-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex1) promotes prostate cancer metastasis. *Oncogene* **28**, 1853-1863, doi:10.1038/onc.2009.30 (2009).
- 62 Lindsay, C. R. *et al.* P-Rex1 is required for efficient melanoblast migration and melanoma metastasis. *Nat Commun* **2**, 555, doi:10.1038/ncomms1560 (2011).
- 63 Dillon, L. M. *et al.* P-REX1 creates a positive feedback loop to activate growth factor receptor, PI3K/AKT and MEK/ERK signaling in breast cancer. *Oncogene* **34**, 3968-3976, doi:10.1038/onc.2014.328 (2015).
- 64 Montero, J. C., Seoane, S., Ocana, A. & Pandiella, A. P-Rex1 participates in Neuregulin-ErbB signal transduction and its expression correlates with patient outcome in breast cancer. *Oncogene* **30**, 1059-1071, doi:10.1038/onc.2010.489 (2011).
- 65 Sosa, M. S. *et al.* Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an essential mediator of ErbB signaling in breast cancer. *Mol Cell* **40**, 877-892, doi:10.1016/j.molcel.2010.11.029 (2010).
- 66 Lucato, C. M. *et al.* The Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphate-dependent Rac Exchanger 1.Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1 (P-Rex1.Rac1) Complex Reveals the Basis of Rac1 Activation in Breast Cancer Cells. *J Biol Chem* **290**, 20827-20840, doi:10.1074/jbc.M115.660456 (2015).

- 67 Srijakotre, N. *et al.* PtdIns(3,4,5)P3-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex1) promotes mammary tumor initiation and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 28056-28067, doi:10.1073/pnas.2006445117 (2020).
- 68 Goel, H. L. *et al.* P-Rex1 Promotes Resistance to VEGF/VEGFR-Targeted Therapy in Prostate Cancer. *Cell Rep* **14**, 2193-2208, doi:10.1016/j.celrep.2016.02.016 (2016).
- 69 Klemm, F. *et al.* Interrogation of the Microenvironmental Landscape in Brain Tumors Reveals Disease-Specific Alterations of Immune Cells. *Cell* **181**, 1643-1660 e1617, doi:10.1016/j.cell.2020.05.007 (2020).
- 70 Racle, J., de Jonge, K., Baumgaertner, P., Speiser, D. E. & Gfeller, D. Simultaneous enumeration of cancer and immune cell types from bulk tumor gene expression data. *Elife* **6**, doi:10.7554/eLife.26476 (2017).
- 71 Cahoy, J. D. *et al.* A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* **28**, 264-278, doi:10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008 (2008).
- 72 Barber, M. A. *et al.* Membrane translocation of P-Rex1 is mediated by G protein betagamma subunits and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* **282**, 29967-29976, doi:10.1074/jbc.M701877200 (2007).
- 73 Welch, H. C. *et al.* P-Rex1 regulates neutrophil function. *Curr Biol* **15**, 1867-1873, doi:10.1016/j.cub.2005.09.050 (2005).
- 74 Guillermet-Guibert, J. *et al.* The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8292-8297, doi:10.1073/pnas.0707761105 (2008).
- 75 Good, M. C., Zalatan, J. G. & Lim, W. A. Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science* **332**, 680-686, doi:10.1126/science.1198701 (2011).
- 76 Dbouk, H. A. *et al.* G protein-coupled receptor-mediated activation of p110beta by Gbetagamma is required for cellular transformation and invasiveness. *Sci Signal* **5**, ra89, doi:10.1126/scisignal.2003264 (2012).
- 77 Zhang, J. *et al.* CRKL Mediates p110beta-Dependent PI3K Signaling in PTEN-Deficient Cancer Cells. *Cell Rep* **20**, 549-557, doi:10.1016/j.celrep.2017.06.054 (2017).
- 78 Hervieu, A. *et al.* A PI3K- and GTPase-independent Rac1-mTOR mechanism mediates MET-driven anchorage-independent cell growth but not migration. *Sci Signal* **13**, doi:10.1126/scisignal.aba8627 (2020).
- 79 Palamidessi, A. *et al.* Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell* **134**, 135-147, doi:10.1016/j.cell.2008.05.034 (2008).
- 80 Kuroiwa, M., Oneyama, C., Nada, S. & Okada, M. The guanine nucleotide exchange factor Arhgef5 plays crucial roles in Src-induced podosome formation. *J Cell Sci* **124**, 1726-1738, doi:10.1242/jcs.080291 (2011).
- 81 Ghosh, M. *et al.* CD13 tethers the IQGAP1-ARF6-EFA6 complex to the plasma membrane to promote ARF6 activation, beta1 integrin recycling, and cell migration. *Sci Signal* **12**, doi:10.1126/scisignal.aav5938 (2019).
- 82 Saci, A., Cantley, L. C. & Carpenter, C. L. Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size. *Mol Cell* **42**, 50-61, doi:10.1016/j.molcel.2011.03.017 (2011).

- 83 Montero, J. C., Seoane, S., Garcia-Alonso, S. & Pandiella, A. Multisite phosphorylation of P-Rex1 by protein kinase C. *Oncotarget* **7**, 77937-77949, doi:10.18632/oncotarget.12846 (2016).
- 84 Jia, S., Roberts, T. M. & Zhao, J. J. Should individual PI3 kinase isoforms be targeted in cancer? *Curr Opin Cell Biol* **21**, 199-208, doi:10.1016/j.ceb.2008.12.007 (2009).
- 85 Oda, K. *et al.* PIK3CA cooperates with other phosphatidylinositol 3'-kinase pathway mutations to effect oncogenic transformation. *Cancer Res* **68**, 8127-8136, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0755 (2008).
- 86 Wee, S. *et al.* PTEN-deficient cancers depend on PIK3CB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13057-13062, doi:10.1073/pnas.0802655105 (2008).
- 87 Guertin, D. A. *et al.* mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice. *Cancer Cell* **15**, 148-159, doi:10.1016/j.ccr.2008.12.017 (2009).
- 88 Hietakangas, V. & Cohen, S. M. TOR complex 2 is needed for cell cycle progression and anchorage-independent growth of MCF7 and PC3 tumor cells. *BMC Cancer* **8**, 282, doi:10.1186/1471-2407-8-282 (2008).
- 89 Cervantes-Villagrana, R. D. *et al.* Gbetagamma signaling to the chemotactic effector P-REX1 and mammalian cell migration is directly regulated by Galpha(q) and Galpha(13) proteins. *J Biol Chem* **294**, 531-546, doi:10.1074/jbc.RA118.006254 (2019).
- 90 Liu, H. J. *et al.* PtdIns(3,4,5)P3-dependent Rac Exchanger 1 (PREX1) Rac-Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) Activity Promotes Breast Cancer Cell Proliferation and Tumor Growth via Activation of Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) Signaling. *J Biol Chem* **291**, 17258-17270, doi:10.1074/jbc.M116.743401 (2016).
- 91 Campbell, A. D. *et al.* P-Rex1 cooperates with PDGFRbeta to drive cellular migration in 3D microenvironments. *PLoS One* **8**, e53982, doi:10.1371/journal.pone.0053982 (2013).
- 92 Barrio-Real, L. *et al.* P-Rex1 is dispensable for Erk activation and mitogenesis in breast cancer. *Oncotarget* **9**, 28612-28624, doi:10.18632/oncotarget.25584 (2018).
- 93 Cheng, F. & Guo, D. MET in glioma: signaling pathways and targeted therapies. *J Exp Clin Cancer Res* **38**, 270, doi:10.1186/s13046-019-1269-x (2019).
- 94 Brat, D. J. *et al.* Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med* **372**, 2481-2498, doi:10.1056/NEJMoa1402121 (2015).
- 95 Verhaak, R. G. *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **17**, 98-110, doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020 (2010).
- 96 Boye, K. *et al.* The role of CXCR3/LRP1 cross-talk in the invasion of primary brain tumors. *Nat Commun* **8**, 1571, doi:10.1038/s41467-017-01686-y (2017).
- 97 Huang, T. *et al.* A regulatory circuit of miR-125b/miR-20b and Wnt signalling controls glioblastoma phenotypes through FZD6-modulated pathways. *Nat Commun* **7**, 12885, doi:10.1038/ncomms12885 (2016).
- 98 Ho, W. J. *et al.* Systemic inhibition of PTPN22 augments anticancer immunity. *J Clin Invest* **131**, doi:10.1172/JCI146950 (2021).

- 99 Goh, P. K. *et al.* PTPN2 elicits cell autonomous and non-cell autonomous effects on antitumor immunity in triple-negative breast cancer. *Sci Adv* **8**, eabk3338, doi:10.1126/sciadv.abk3338 (2022).
- 100 Zhang, X. *et al.* CX-F9, a novel RSK2 inhibitor, suppresses cutaneous melanoma cells proliferation and metastasis through regulating autophagy. *Biochem Pharmacol* **168**, 14-25, doi:10.1016/j.bcp.2019.06.014 (2019).
- 101 Kim, J. W. *et al.* Antitumor activity of an engineered decoy receptor targeting CLCF1-CNTFR signaling in lung adenocarcinoma. *Nat Med* **25**, 1783-1795, doi:10.1038/s41591-019-0612-2 (2019).
- 102 Thorsson, V. *et al.* The Immune Landscape of Cancer. *Immunity* **48**, 812-830 e814, doi:10.1016/j.immuni.2018.03.023 (2018).
- 103 Hoadley, K. A. *et al.* Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. *Cell* **173**, 291-304 e296, doi:10.1016/j.cell.2018.03.022 (2018).
- 104 Venteicher, A. S. *et al.* Decoupling genetics, lineages, and microenvironment in IDH-mutant gliomas by single-cell RNA-seq. *Science* **355**, doi:10.1126/science.aai8478 (2017).
- 105 Beltran-Navarro, Y. M., Reyes-Cruz, G. & Vazquez-Prado, J. P-Rex1 Signaling Hub in Lower Grade Glioma Patients, Found by In Silico Data Mining, Correlates With Reduced Survival and Augmented Immune Tumor Microenvironment. *Front Oncol* **12**, 922025, doi:10.3389/fonc.2022.922025 (2022).

Anexos

Artículos publicados

Los resultados del objetivo cuatro (**Fig. 35-54**) fueron publicados en mi artículo como primera autora en *Frontiers in Oncology*¹⁰⁵:

> *Front Oncol.* 2022 Jul 7;12:922025. doi: 10.3389/fonc.2022.922025. eCollection 2022.

P-Rex1 Signaling Hub in Lower Grade Glioma Patients, Found by *In Silico* Data Mining, Correlates With Reduced Survival and Augmented Immune Tumor Microenvironment

Yarely Mabell Beltrán-Navarro ¹, Guadalupe Reyes-Cruz ², José Vázquez-Prado ¹

Affiliations + expand

PMID: 35875157 PMID: PMC9300953 DOI: 10.3389/fonc.2022.922025

> *J Cell Commun Signal.* 2022 Jun;16(2):239-252. doi: 10.1007/s12079-021-00662-y. Epub 2021 Dec 1.

Calcium sensing receptor stimulates breast cancer cell migration via the Gβγ-AKT-mTORC2 signaling pathway

Lennis Beatriz Orduña-Castillo ¹, Jorge Eduardo Del-Río-Robles ¹, Irving García-Jiménez ¹, César Zavala-Barrera ¹, Yarely Mabell Beltrán-Navarro ², Joseline Janai Hidalgo-Moyle ¹, Iliana Ramírez-Rangel ², Marco A Hernández-Bedolla ¹ ³, Alma P Reyes-Ibarra ¹, Margarita Valadez-Sánchez ¹, José Vázquez-Prado ², Guadalupe Reyes-Cruz ⁴

Affiliations + expand

PMID: 34854057 PMID: PMC8891408 DOI: 10.1007/s12079-021-00662-y

> *J Biol Chem.* 2022 Jan;298(1):101440. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101440. Epub 2021 Nov 20.

G β mediates activation of Rho guanine nucleotide exchange factor ARHGEF17 that promotes metastatic lung cancer progression

Irving García-Jiménez ¹, Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana ², Jorge Eduardo Del-Río-Robles ¹, Alejandro Castillo-Kauil ¹, Yarely Mabell Beltrán-Navarro ², Jonathan García-Román ², Guadalupe Reyes-Cruz ¹, José Vázquez-Prado ³

Affiliations + expand

PMID: 34808208 PMID: PMC8703085 DOI: 10.1016/j.jbc.2021.101440

> *Biochem Biophys Res Commun.* 2021 Feb 5;539:20-27. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.12.089.

Epub 2021 Jan 4.

G β recruits and activates P-Rex1 via two independent binding interfaces

Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana ¹, Yarely Mabell Beltrán-Navarro ¹, Irving García-Jiménez ², Sendi Rafael Adame-García ¹, Adán Olguín-Olguín ¹, Guadalupe Reyes-Cruz ², José Vázquez-Prado ³

Affiliations + expand

PMID: 33412417 DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.12.089

> *J Biol Chem.* 2020 Dec 11;295(50):16920-16928. doi: 10.1074/jbc.AC120.015204. Epub 2020 Oct 6.

G α_s directly drives PDZ-RhoGEF signaling to Cdc42

Alejandro Castillo-Kauil ¹, Irving García-Jiménez ¹, Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana ², Sendi Rafael Adame-García ², Yarely Mabell Beltrán-Navarro ², J Silvio Gutkind ³, Guadalupe Reyes-Cruz ¹, José Vázquez-Prado ⁴

Affiliations + expand

PMID: 33023908 PMID: PMC7863908 DOI: 10.1074/jbc.AC120.015204

> *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Mar 26;524(1):109-116. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.068.
Epub 2020 Jan 21.

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

Víctor Manuel Color-Aparicio ¹, Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana ¹, Irving García-Jiménez ², Yarely Mabell Beltrán-Navarro ¹, Alejandro Castillo-Kauil ², Estanislao Escobar-Islas ¹, Guadalupe Reyes-Cruz ², José Vázquez-Prado ³

Affiliations + expand

PMID: 31980169 DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.01.068