



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

**Departamento de Farmacología**

**Efexinas en el microambiente tumoral, un grupo de RhoGEFs multidominio y sus  
acompañantes de señalización que definen una firma transcripcional con posible valor  
pronóstico**

**TESIS**

Que presenta

**Q.F.B Dante Gustavo Juan Guadarrama**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en la Especialidad de Farmacología**

**Director de Tesis**

**Dr. José Vázquez Prado**

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

El desarrollo del presente trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con la beca No. 787886

## **Dedicatoria**

El presente trabajo se lo dedico a mi madre Adelina y a mi padre Jesús, por ser fuente de inspiración, educación, amor, y motivación día con día, son un ejemplo por seguir. A mis hermanos Adriana, Jesús y Valeria que constantemente me muestran su apoyo incondicional y me motivan a ser mejor. A mi cuñado Sergio que me ha visto crecer y ha sido un confidente importante y mi sobrina Julia. Astrid, Héctor y Liliana, mis compañeros de universidad que a pesar del tiempo y la distancia nos continuamos apoyando. Al Dr. Marco A. Loza por ser mi mentor durante la universidad y motivarme a explorar la ciencia.

## **Agradecimientos**

Agradezco al Dr. José Vázquez Prado por brindarme la oportunidad de integrarme al laboratorio 35. Compartir su vasto conocimiento y guía para el desarrollo del presente trabajo. Así como su filosofía que me han ayudado a enriquecer mi perspectiva profesional y personal.

A la Dra. Guadalupe Reyes Cruz por sus comentarios al presente trabajo, su apoyo y formar parte de mi comité tutorial.

A la Dra. María del Carmen García García por formar parte de mi comité tutorial y comentarios a este trabajo.

A Yarely por su paciencia y sus enseñanzas computacionales y experimentales, necesarias para el desarrollo de este trabajo. Un gran ejemplo para seguir por todo lo que ha logrado y continúa haciendo

A Alejandro y Yazmin que me han alentado continuamente para alcanzar mis metas, brindarme su amistad, conocimiento y consejos.

A mis compañeros del laboratorio Jorge del Río, Irving García, Daniel Cervantes y Ricardo García, por las pláticas, consejos y comentarios sobre el trabajo.

Al personal técnico del Laboratorio Estanislao Escobar, Omar García, Jaime Estada y David Rangel por el apoyo técnico.

A mis compañeros de generación Rubén, Frida, Fernanda e Isaac por el apoyo mutuo, consejos y la amistad brindada.

## Índice General

Índice de figuras

Índice de tablas

Abreviaciones

Abstract

Resumen

1. Introducción.....	<a href="#">1</a>
1.1. Cáncer.....	<a href="#">1</a>
1.2. Microambiente Tumoral.....	<a href="#">2</a>
1.3. Invasión y Metástasis.....	<a href="#">4</a>
1.4. Migración Celular.....	<a href="#">6</a>
1.5. Rho GTPasas.....	<a href="#">9</a>
1.6. Rho GEFs.....	<a href="#">10</a>
1.7. Efexinas.....	<a href="#">11</a>
1.8. Estudios Omicos Masivos.....	<a href="#">14</a>
1.9. TCGA.....	<a href="#">14</a>
1.10. DepMap.....	<a href="#">15</a>
2. Justificación.....	<a href="#">15</a>
3. Hipótesis.....	<a href="#">16</a>
4. Objetivo General.....	<a href="#">16</a>
5. Objetivos Particulares.....	<a href="#">16</a>
6. Estrategia Experimental.....	<a href="#">17</a>
7. Materiales y Métodos.....	<a href="#">18</a>
7.1. Expresión de efexinas en estudios del TCGA.....	<a href="#">18</a>
7.2. Alteraciones en los genes que codifican a las efexinas.....	<a href="#">19</a>
7.3. Descarga de los transcritos con un valor de correlación con las efexinas en estudios del TCGA.....	<a href="#">19</a>
7.4. Correlación entre las efexinas y con marcadores de poblaciones celulares para la generación de mapas de calor.....	<a href="#">20</a>
7.5. Generación de mapas de calor empleando clustergrammer.....	<a href="#">20</a>
7.6. Sensibilidad de líneas celulares de cáncer a la pérdida de función de los genes que codifican a las efexinas...	<a href="#">21</a>
7.7. Etiquetado transcritos de señalización con un valor de correlación con efexina 3.....	<a href="#">22</a>
7.8. Extracción genes de señalización.....	<a href="#">23</a>
7.9. Obtención de los acompañantes de señalización coexpresados con efexina 3.....	<a href="#">23</a>
7.10. Visualización global de los acompañantes de señalización de efexina 3.....	<a href="#">24</a>

7.11. Etiquetado por proceso biológico asociado a migración celular.....	<a href="#">25</a>
7.12. Etiquetado por la participación en la reorganización del citoesqueleto.....	<a href="#">25</a>
7.13. Etiquetado con Metascape.....	<a href="#">26</a>
7.14. Segmentación estructural y funcional de los acompañantes de señalización asociados a la reorganización del citoesqueleto.....	<a href="#">26</a>
7.15. Selección de líneas celulares de cáncer vulnerables al <i>knock-out</i> de efexina 3.....	<a href="#">27</a>
7.16. Extracción de datos de covulnerabilidad.....	<a href="#">28</a>
7.17. Extracción de genes que codifican proteínas involucradas en señalización de líneas celulares de cáncer sensibles al K.O de efexina 3.....	<a href="#">28</a>
7.18. Extracción de covulnerabilidades en líneas susceptibles al K.O de efexina 3 asociadas a la reorganización del citoesqueleto y coexpresadas en el TCGA.....	<a href="#">29</a>
7.19. Determinación acompañantes de señalización PanCancer.....	<a href="#">30</a>
7.20. Determinación acompañantes de señalización particulares (óptimo para cada tipo de cáncer).....	<a href="#">30</a>
7.21. Determinación acompañantes de señalización TCGA-DepMap.....	<a href="#">30</a>
7.22. Descarga de datos de expresión de acompañantes de señalización de los criterios PanCan, Particular y TCGA-DepMap.....	<a href="#">31</a>
7.23. Descarga de datos de supervivencia de pacientes del TCGA.....	<a href="#">31</a>
7.24. Preparación de datos de supervivencia.....	<a href="#">32</a>
7.25. Preparación datos de expresión.....	<a href="#">32</a>
7.26. Armonización de datos.....	<a href="#">32</a>
7.27. Preparación de archivos Km Plotter y evaluación de la correlación estadística con la supervivencia de los acompañantes de señalización.....	<a href="#">33</a>
7.28. Preparación Km Plotter Evaluación del riesgo acumulado.....	<a href="#">34</a>
7.29. Obtención mapas de color binario.....	<a href="#">34</a>
<b>8. Resultados.....</b>	<a href="#">36</a>
8.1. Expresión de las Efexinas en diversos tipos de cáncer.....	<a href="#">36</a>
8.2. Las efexinas presentan diversos patrones de correlación entre ellas y con marcadores de poblaciones celulares.....	<a href="#">39</a>
8.3. Líneas celulares cancerosas sensibles al knock-out de efexina 3.....	<a href="#">41</a>
8.4. Acompañantes de señalización de efexina 3 en diversos tipos de cáncer.....	<a href="#">43</a>
8.5. Extracción ACS asociados a la reorganización del citoesqueleto.....	<a href="#">45</a>
8.6. Organización de los ACS-efx3 con base en criterios estructurales.....	<a href="#">48</a>
8.7. Acompañantes de señalización PanCancer que definen firmas transcripcionales con posible valor pronóstico.....	<a href="#">50</a>
8.8. Acompañantes de señalización particulares que definen posibles firmas transcripcionales.....	<a href="#">53</a>
8.9. Acompañantes de señalización esenciales en líneas cancerosas vulnerables al K.O de efexina 3 que conforman firmas transcripcionales con posible valor pronóstico.....	<a href="#">56</a>
8.10. Tipos de cáncer con firmas transcripcionales y acompañantes de señalización.....	<a href="#">60</a>
<b>9. Discusión.....</b>	<a href="#">62</a>
<b>10. Conclusiones.....</b>	<a href="#">73</a>
<b>11. Referencias.....</b>	<a href="#">73</a>

## Índice de Figuras

<a href="#">Figura 1</a>	El microambiente tumoral y su participación en el desarrollo tumoral.....	4
<a href="#">Figura 2</a>	Proceso Metastásico.....	6
<a href="#">Figura 3</a>	Estructuras especializadas en la migración mesenquimal.....	8
<a href="#">Figura 4</a>	Rho GTPasas y sus mecanismos de regulación.....	10
<a href="#">Figura 5</a>	Arbol filogenético de RhoGEFs.....	11
<a href="#">Figura 6</a>	Representación estructural de las efexinas.....	14
<a href="#">Figura 7</a>	Estrategia experimental.....	17
<a href="#">Figura 8</a>	Las efexinas se expresan en diversos tipos de cáncer.....	38
<a href="#">Figura 9</a>	Las efexinas presentan patrones diferenciales de coexpresión entre ellas y con marcadores de poblaciones celulares.....	40
<a href="#">Figura 10</a>	Sensibilidad de líneas celulares de cáncer a la pérdida de función de los genes que codifican a las efexinas.....	42
<a href="#">Figura 11</a>	Repertorio de Acompañantes de Señalización (ACS) para Efexina 3.....	44
<a href="#">Figura 12</a>	ACS de efexina 3 que participan en la reorganización del citoesqueleto.....	47
<a href="#">Figura 13</a>	Organización de ACS en base a criterios estructurales y funcionales asociados a la reorganización del citoesqueleto.....	49
<a href="#">Figura 14</a>	ACS PanCancer y obtención de firmas transcripcionales que correlacionan con un pronóstico menos favorable.....	51
<a href="#">Figura 15</a>	Curvas de Supervivencia de las firmas transcripcionales PanCancer.....	52
<a href="#">Figura 16</a>	ACS particulares que conforman firmas transcripcionales.....	54
<a href="#">Figura 17</a>	Curvas de supervivencia y ACS particulares que constituyen firmas transcripcionales significativas.....	55
<a href="#">Figura 18</a>	Covulnerabilidades en líneas celulares sensibles a efexina 3 definen ACS en pacientes del TCGA.....	58
<a href="#">Figura 19</a>	Firmas transcripcionales obtenidas de las CES asociadas a la reorganización del citoesqueleto.....	59
<a href="#">Figura 20</a>	Acompañantes de Señalización para efexina 3 con los que potencialmente integra cascadas de señalización.....	72

## Índice de tablas

<a href="#">Tabla 1</a> Tipos de cáncer que conforman el estudio del TCGA.....	37
<a href="#">Tabla 2</a> Etiquetas GO y ACS identificados para la selección de acompañantes involucrados en migración celular.....	45
<a href="#">Tabla 3</a> Etiquetas GO y ACS identificados para procesos asociados a la reorganización del citoesqueleto.....	46
<a href="#">Tabla 4</a> Tipos de cáncer con firmas transcripcionales según el criterio empleado.....	61
<a href="#">Tabla 5</a> ACS que conforman firmas transcripcionales con Eflexina 3 que correlacionan con un pronóstico menos favorable en pacientes del TCGA.....	61



## Abreviaciones

ACS: Acompañantes de señalización

Ag: Antígeno

DepMap: Mapa de dependencias de cáncer

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EMT: Transición epitelial mesenquimal

EGFR: Receptor para factor de crecimiento epidérmico

FGF2: Factor de crecimiento de fibroblastos 2

GEF: Factor intercambiador de nucleótidos de guanina

GAP: Proteína activadora de la actividad GTPasa

GDI: Inhibidor de la disociación de Guanina

GDP: Guanosín difosfato

GTP: Guanosín trifosfato

GO: Gene ontology

GPCR: Receptor Acoplado a proteínas G

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

HIF: Factor inducido por hipoxia

IL: Interleucina

IFN: Interferón

K.O: *Knock-out*

MEC/ECM: Matriz Extracelular

MDSC: Célula Mieloide Supresora

mRNA:RNA mensajero

NK: *Natural Killer*

PI3K: Fosfatidil inositol 3 cinasa

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

RTK: Receptor tirosín cinasa

TCGA: Atlas del Genoma del Cáncer

TGF: Factor Transformante

TGFBR: Receptor para Factor Transformante Beta

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

## **Abstract**

Cell migration is a complex process that involves cytoskeleton reorganization and specialized structures required for cell movement. Metastasis hijacks and employs cell migration mechanisms for cancer cells to invade distant tissues. Dissemination of cancer cells and establishment of secondary tumors that leads to systemic failure is responsible for nearly 90% of cancer deaths. Rho GTPases are proteins that interact and activate effectors of cytoskeleton reorganization; therefore, they are considered regulators of cell migration. RhoGEFs activate Rho GTPases and integrate signaling complexes. In the human genome there is a larger number of RhoGEFs than Rho GTPases, suggesting that multiple RhoGEFs activate a particular Rho GTPase. Identifying those RhoGEFs that participate in oncologic events would provide novel therapeutic targets. Ephexins is a group of 5 RhoGEFs capable of interacting and being activated by Eph tyrosine kinase receptor family and characterized by a carboxyl terminal region that consists in the catalytic region followed by a SH3 domain. Experimental evidence suggests an oncogenic role for ephexins in cancer cells proliferation, survival, migration, and transformation. Applying data mining approaches led us to identify expression of ephexins in samples from 32 cancer types and vulnerabilities of cancer cell lines to loss of function strategies revealed that ephexin 3 is essential in various types of cancer cells. This led us to identify potential ephexin 3 signaling partners as coexpressed mRNAs categorized according to their structural characteristics, applying custom database (SPIM-YY) and Gene Ontology criteria, we selected for mRNAs coding proteins involved in signaling and cytoskeleton reorganization. Cancer patient's data coexpression and sensibility of cell lines were analyzed using three strategies to obtain ephexin 3-signaling companions: PanCan, cancer-specific and TCGA-DepMap. Once the signaling companions were defined, we evaluated the statistical significance of their expression and survival of patients as low and high-risk groups. Those signaling companions that correlated with a poor survival rate in patients were recognized as transcriptional signatures for each cancer type. The accumulated risk of the transcriptional signature with ephexin 3 was evaluated. Transcriptional signatures that correlate with a poorer survival were obtained for 17 cancer types. This suggest new signaling axis for ephexin 3 that might be related with cancer progression.

## Resumen

La migración celular es un proceso complejo que implica la reorganización del citoesqueleto y formación de estructuras especializadas en el movimiento. La metástasis emplea mecanismos de migración para la invasión de células cancerosas a tejidos diferentes al de origen. Alrededor del 90% de las defunciones por cáncer se deben a la diseminación de células cancerosas y formación de tumores secundarios que conllevan a una falla sistémica. Las GTPasas de la familia de Rho son proteínas que interactúan y activan efectores de la reorganización del citoesqueleto, por tanto, son reguladores de la migración celular. Los RhoGEFs activan a las Rho GTPasas y ensamblan complejos de señalización. En el genoma humano se encuentran codificados más RhoGEFs que Rho GTPasas lo que sugiere que múltiples RhoGEFs activan a una Rho GTPasa. Identificar aquellos RhoGEFs que participan en procesos oncogénicos proveería de nuevos blancos terapéuticos. Las efexinas son un grupo de RhoGEFs caracterizados como efectores de la familia Eph, que son cinasas con especificidad por residuos de tirosina, así como por su estructura; la región carboxilo terminal está compuesta del módulo catalítico seguido de un dominio SH3. La participación de las efexinas en proliferación, sobrevivencia, migración y transformación de células cancerosas se ha demostrado experimentalmente. Empleando estrategias de minería de datos, en este trabajo caracterizamos la expresión de las efexinas en 32 tipos de cáncer y la sensibilidad de líneas celulares de cáncer a la pérdida de función del gen que codifica para la efexina 3. Dada la vulnerabilidad de células cancerosas al *Knock-out* de efexina 3, nos enfocamos en caracterizar a sus acompañantes de señalización (ACS) como transcritos coexpresados. Empleamos una herramienta desarrollada en el laboratorio (SPIM-YY) y criterios *Gene Ontology* para seleccionar transcritos que codifican proteínas de señalización asociadas a la reorganización del citoesqueleto. Con los datos de coexpresión en pacientes y sensibilidad de líneas celulares establecimos tres criterios para la selección de ACS de efexina 3; PanCan, Particular y TCGA-DepMap. Se evaluó la correlación de la expresión de los ACS con la sobrevivencia de pacientes. Aquellos que correlacionaron con un pronóstico menos favorable conformaron una firma transcripcional para cada tipo de cáncer, de la cual se evaluó el riesgo acumulado junto con efexina 3. Esto resultó en 17 tipos de cáncer con firmas transcripcionales que correlacionaron con un pronóstico menos favorable, sugiriendo nuevos ejes de señalización integrados por efexina 3.

## **1. Introducción**

### **1.1. Cáncer**

El cáncer es una de las principales causas de muerte. Las defunciones a nivel global aumentaron de 8 a 10 millones entre 2010 y 2019, con una proyección a 16 millones para 2040 (Kocarnik et al., 2022). Las neoplasias de origen pulmonar, colorrectal, hepatocelular, gástrico y mamario son las más letales, en conjunto causan el 50.3% de las defunciones (IARC, 2020). El cáncer resulta de la proliferación descontrolada que deriva de la acumulación de alteraciones genéticas que terminan acelerando el ciclo celular. Fisiológicamente, el ciclo celular se divide en las fases G1, S, G2 y M. El material genético es replicado durante la fase S (Síntesis) y en la fase M (Mitosis) es separado junto con componentes celulares para la generación de dos células hijas. La fase G1 ocurre tras la mitosis y previo a la fase S, es promovida por la presencia de factores de crecimiento y nutrientes necesarios para la síntesis del material genético. En ausencia de señales y nutrientes que promueven el ciclo celular, las células entran a un estado de quiescencia o G0 en el que las células se pueden diferenciar. La fase G2 ocurre posterior a la fase S, en ésta se reparan los errores que hubieran ocurrido durante la replicación del DNA y la célula se prepara para entrar en mitosis. El avance entre las fases del ciclo celular está regulado por mecanismos de vigilancia que aseguran la integridad del material genético. La identificación de errores durante la replicación detiene el ciclo con la finalidad de repararlos o promover la muerte celular cuando son irreparables (Barnum & O'Connell, 2014; Walston et al., 2021; Wenzel & Singh, 2018; Williams & Stoeber, 2012). La alteración de genes que codifican proteínas involucradas en promover, detener y vigilar el ciclo celular, resulta en la proliferación descontrolada (Barnum & O'Connell, 2014; P. Chen & Dey, 2022). El perfil de genes alterados varía entre cada cáncer, lo que genera una diversidad intertumoral (Torti & Trusolino, 2011). Asimismo, la proliferación sostenida y la pérdida de mecanismos de reparación de errores durante la replicación del material genético genera diversidad intratumoral (P. Chen & Dey, 2022; Tabassum & Polyak, 2015). La proliferación sostenida suele formar masas denominadas tumores. En los tumores existen ambientes que favorecen la sobrevivencia y desarrollo de las células cancerosas (Anderson & Simon, 2020). La

separación de células cancerosas de un tumor primario, su diseminación a través de la circulación y establecimiento de tumores secundarios en órganos diferentes al de origen se denomina metástasis (Majidpoor & Mortezaee, 2021). Los tumores secundarios comprometen la función de múltiples órganos, lo que conlleva a una falla sistémica y consecuentemente la muerte. Alrededor del 90% de las defunciones por cáncer se deben a la aparición de tumores secundarios (Ganesh & Massagué, 2021). El potencial metastásico requiere de la participación de diversas poblaciones celulares que secretan factores que promueven la migración y sobrevivencia celulares.

## **1.2. Microambiente tumoral**

Los tumores son masas heterogéneas compuestas de células cancerosas, endoteliales, mieloides, linfoides, fibroblastos, matriz extracelular y factores solubles que conforman un microambiente (Bejarano et al., 2021; Hirata & Sahai, 2017). Las células del estroma son esenciales para el desarrollo tumoral y pueden conformar hasta un 50% de la masa tumoral (Bejarano et al., 2021). Las poblaciones celulares del estroma tumoral provienen de células residentes del tejido en el que se genera un tumor o atraídas de la circulación sistémica mediante factores quimiotácticos (Quail & Joyce, 2013). Las células reclutadas al tumor participan en mecanismos de comunicación celular que permiten aprovechar capacidades biológicas como la angiogénesis, proliferación, regulación de la respuesta inmune y reorganización de la matriz extracelular (Choi & Moon, 2018; Hinshaw & Shevde, 2019; Quail & Joyce, 2013). Entre los procesos biológicos fundamentales para el desarrollo de tumores se encuentran la secreción de factores solubles, proteasas que remodelan la matriz extracelular y la migración celular. El microambiente tumoral es dinámico, su composición varía entre cada etapa y tipo de cáncer. La progresión y agresividad de la enfermedad depende en gran medida de las capacidades biológicas adquiridas (Hirata & Sahai, 2017; Quail & Joyce, 2013).

Durante el desarrollo tumoral temprano, las células cancerosas y del estroma dependen de la difusión pasiva de nutrientes y oxígeno. Cuando los tumores alcanzan volúmenes entre 1 y 3mm<sup>3</sup> se generan ambientes poco favorables para la viabilidad celular (T. Li et al., 2018; Sobierajska et al., 2020). El aumento en la demanda de nutrientes y oxígeno, así como la necesidad de contar con vías para el desecho de productos metabólicos que acidifican el

microambiente, no es satisfecha por una carencia vascularización. La ausencia de oxígeno deriva en la activación del Factor Inducido por Hipoxia (HIF). El HIF promueve la expresión de proteasas que degradan la matriz extracelular, así como de factores angiogénicos entre los que destaca el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) (Hida et al., 2016; T. Li et al., 2018; Viallard & Larrivé, 2017). Las células endoteliales que conforman vasos sanguíneos adyacentes a los tumores son activadas por factores angiogénicos y atraídas a su fuente de origen. Esto resulta en la formación de nuevos vasos sanguíneos (Angiogénesis tumoral) que proveerán a los tumores de nutrientes, oxígeno, ruta para el tráfico y comunicación celular, así como el desecho de productos metabólicos (Hida et al., 2016).

Las células del sistema inmune que residen en un tejido o están presentes en la circulación sistémica reconocen y destruyen células cancerosas. Sin embargo, pueden promover la sobrevivencia y progresión tumoral. La actividad protumoral o antitumoral de las células inmunes depende de su estado de activación. Las células cancerosas y del estroma secretan IL-4, IL-2, IL-10 y TGF- $\beta$  que polariza a las células inmunes a un estado inmunosuprimido en el que promueven la proliferación, angiogénesis y metástasis. Por otro lado, la secreción de IL-2, IL-6, TNF y IFN $\gamma$  por células del sistema inmune promueve un estado proinflamatorio en el que las células cancerosas son destruidas (Binnewies et al., 2018; Hinshaw & Shevde, 2019; Lei et al., 2020; Quail & Joyce, 2013).

Fisiológicamente los fibroblastos se encuentran en un estado quiescente y son activados cuando ocurre un daño en su tejido de residencia. Su activación culmina en la reparación del tejido al secretar factores de crecimiento, angiogénicos, quimiotácticos y remodelado de la matriz extracelular mediante proteasas y componentes de la matriz. En el microambiente tumoral, la presencia de TGF- $\beta$  FGF2 y PDGF mantiene a los fibroblastos en un estado activo, por lo que constantemente promueven la proliferación, angiogénesis, quimiotaxis y remodelado de la matriz extracelular (Liao et al., 2019; Ping et al., 2021; Tao et al., 2017).

La matriz extracelular está compuesta por diversos tipos de laminina, colágeno y fibronectina. Al ser remodelada por enzimas como metaloproteinasas, se liberan factores de crecimiento, angiogénicos y transformantes que se encuentran depositados en la matriz. La deposición de diferentes tipos de colágeno por los fibroblastos puede regular la dureza y porosidad de la matriz extracelular. El cambio en la dureza puede llevar a la activación de

vías de señalización que promueven la proliferación y migración celular. Por otro lado, la porosidad puede impedir el paso de células del sistema inmunitario y fármacos (Henke et al., 2020; Nallanthighal et al., 2019).

El microambiente tumoral es un entorno clave para el desarrollo y progresión del cáncer. Su composición ha sido considerada un factor pronóstico para la evolución clínica de los pacientes con distintos tipos de cáncer. Dado que proporciona rutas de tráfico celular, promueve la proliferación, migración y regula la respuesta inmune, el microambiente tumoral es clave en el proceso metastásico.

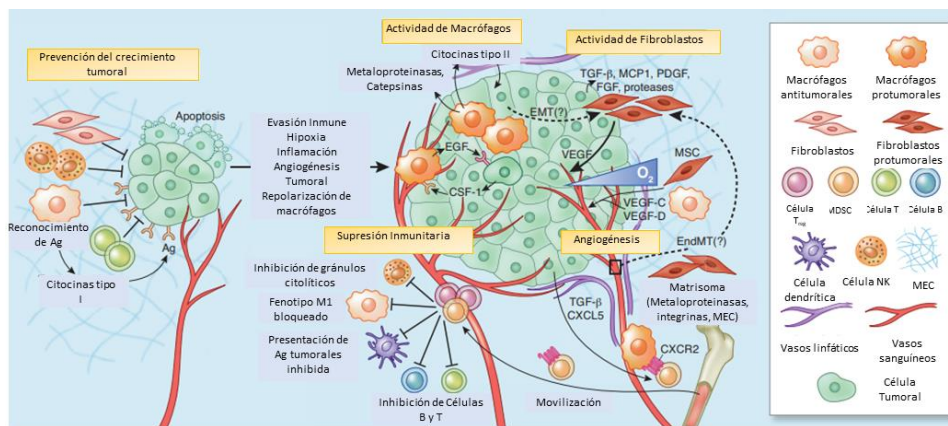


Figura 1 El microambiente tumoral y su participación en el desarrollo tumoral. En el inicio del desarrollo tumoral las células del sistema inmune se encargan de destruir células cancerosas. Al secretar quimiocinas y factores solubles que desregulan la respuesta inmune, promueven la angiogénesis un estado inmunosuprimido, células inmunes, endoteliales y fibroblastos participan en la progresión y desarrollo del tumor. Modificado de Quail & Joyce, 2013.

### 1.3. Invasión y Metástasis

Cuando las células cancerosas se encuentran limitadas a su órgano de origen, los tratamientos farmacológicos y quirúrgicos suelen tener una alta tasa de efectividad. Sin embargo, si las células cancerosas se han diseminado y establecido tumores secundarios, los tratamientos convencionales no son efectivos (Massagué & Obenauf, 2016; Valastyan & Weinberg, 2011; Welch & Hurst, 2019). La metástasis es un evento fatal. Sólo unas cuantas células cancerosas que se separan de tumores primarios logran sobrevivir, cuando éstas llegan a formar tumores secundarios, la vida de los pacientes se encuentra en riesgo máximo (van Zijl et al., 2011). Para sobrevivir, las células cancerosas metastásicas adquieren capacidades biológicas que les permiten enfrentar ambientes que les son ajenos y que les resultan hostiles, en los cuales deben prevalecer durante su diseminación (Lambert et al., 2017; Valastyan & Weinberg,

2011). Las vulnerabilidades que las células cancerosas manifiestan durante este proceso pueden ser explotadas para identificar potenciales blancos farmacológicos.

En el inicio de la metástasis, las células cancerosas metastásicas evaden la muerte celular usualmente causada por la pérdida de adhesiones celulares (Anoikis). La transición Epitelial-Mesenquimal (*EMT*) promueve la plasticidad celular mediante un cambio en el fenotipo a un estado pobremente diferenciado y con alta capacidad migratoria. Fisiológicamente la *EMT* ocurre durante la embriogénesis, cierre de heridas y respuesta inmune. En los tumores, las células cancerosas metastásicas se disocian e invaden tejidos adyacentes al secretar proteasas que degradan la matriz extracelular y permiten su paso. Posteriormente, atraviesan endotelios para introducirse a la circulación sistémica, tanto de vasos sanguíneos como linfáticos, donde deben escapar a los mecanismos de vigilancia inmunitaria ejercidos por células *Natural Killer* y macrófagos, además de sobrevivir al estrés físico generado por la presión sanguínea. Las células cancerosas pueden adherirse entre ellas o a otras poblaciones como neutrófilos y plaquetas. Esto brinda una barrera física e inmunosupresora que permite a las células cancerosas sobrevivir a las condiciones adversas de la circulación (Alečković et al., 2019; Lambert et al., 2017; Massagué & Obenauf, 2016; Welch & Hurst, 2019).

Las células cancerosas metastásicas que logran extravasar y establecerse en un nuevo tejido, se deben adaptar a la vigilancia inmunitaria y a la ausencia o cambio en el repertorio local de factores de crecimiento. Para ello, las células diseminadas pasan a un estado de quiescencia en el que pueden permanecer meses o años. Esto explica el surgimiento de neoplasias tras la resección de tumores primarios y tratamientos farmacológicos (Alečković et al., 2019; Lambert et al., 2017; Valastyan & Weinberg, 2011).

Para que las células cancerosas se trasladen de una región a otra es necesario que reorganicen su citoesqueleto y se generen estructuras especializadas para la migración celular. Por tanto, la migración celular es fundamental para el desarrollo del proceso metastásico (Fares et al., 2020; Welch & Hurst, 2019).



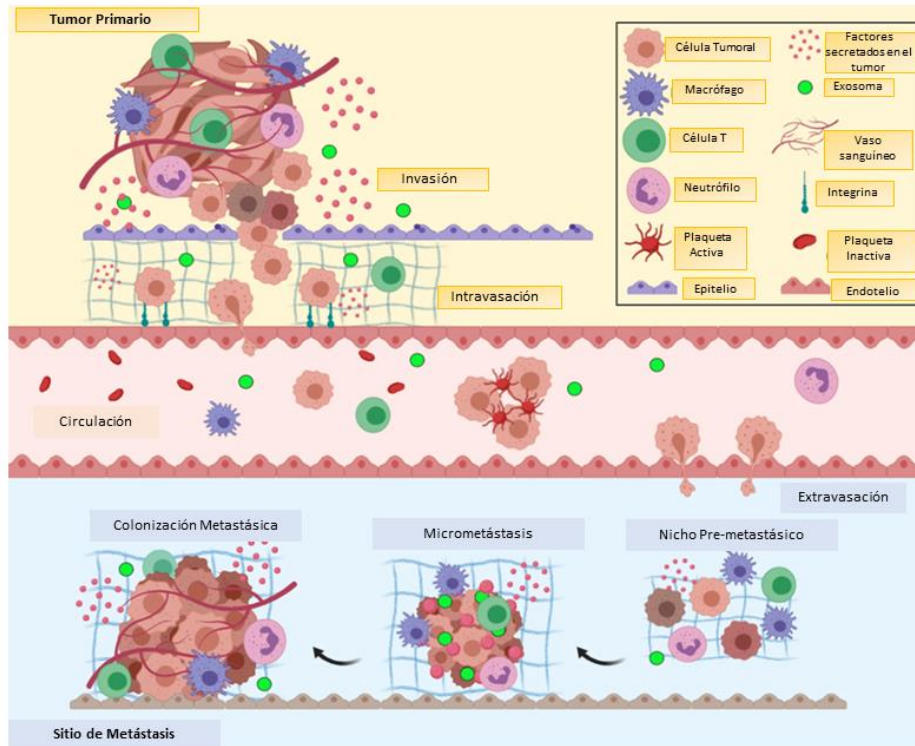


Figura 2 Proceso Metastásico. En el tumor primario las células cancerosas son estimuladas con factores promigratorios que causan un cambio en el fenotipo de las células. A través de la secreción de proteasas que degradan la matriz extracelular las células cancerosas invaden tejidos adyacentes para intravasarse y pasar a circulación sistémica. La adhesión de células cancerosas o de circulación les permite evadir mecanismos de vigilancia inmunitaria hasta extravasarse y comenzar la colonización del órgano. Modificado de Fares et al., 2020

## 1.4. Migración celular

La migración celular es un proceso fundamental para la vida. Sus mecanismos moleculares básicos se encuentran conservados en diversos organismos. Los organismos unicelulares migran para la búsqueda de nutrientes y reproducción. Mientras que, en organismos multicelulares la migración celular es fundamental en eventos fisiológicos como la embriogénesis, respuesta inmunitaria, formación de sinapsis, reparación de heridas y angiogénesis, entre otros. En células cancerosas y organismos patógenos, la migración contribuye a la progresión de la enfermedad al favorecer la diseminación en un organismo (Devreotes & Horwitz, 2015; Lehtimaki et al., 2017; Schaks et al., 2019).

La migración de células eucariontes depende de la reorganización del citoesqueleto de actina. Este proceso consta de varias etapas, entre ellas, la nucleación de actina globular, formando trímeros o tetrámeros que favorecen la incorporación de más monómeros, generando actina filamentosa, que es esencial para la construcción de estructuras celulares migratorias. La nucleación depende en gran medida de proteínas que mimetizan a un trímero (nucleadores)

para favorecer la formación de actina filamentosa (Blanchoin et al., 2014; Schaks et al., 2019; Svitkina, 2018).

El movimiento celular requiere de señales que encienden mecanismos de comunicación celular que activan proteínas efectoras de la reorganización del citoesqueleto y que brindan direccionalidad. La interacción ligando-receptor activa mecanismos de señalización clásicos que conducen a la migración. Las señales quimioatrayentes son reconocidas por receptores diversos, entre los que destacan los Receptores Acoplados a Proteínas G (GPCRs) con especificidad por quimiocinas. También se efectúa a través de receptores para factores de crecimiento pertenecientes a la familia de los receptores de tipo tirosín-cinasa (RTKs) (SenGupta et al., 2021; Shellard & Mayor, 2020).

Existen diversos mecanismos de migración celular que dependen de las señales, estirpe celular y organismo. La migración mesenquimal se caracteriza por la formación de estructuras especializadas compuestas de actina filamentosa, adhesiones focales y secreción de enzimas que degradan la matriz extracelular. Por otro lado, la migración ameboide no requiere de una polimerización activa de actina filamentosa, enzimas que degradan la matriz y adhesiones focales (Valastyan & Weinberg, 2011; Welch & Hurst, 2019).

Las células cancerosas migratorias comúnmente emplean mecanismos de migración mesenquimal caracterizada por tres estructuras migratorias. Los lamelipodios resultan del entrecruzamiento de actina filamentosa en un ángulo de 70°. Se forman cuando factores promotores de la nucleación de actina como N-WASp reclutan al complejo nucleador ARP2/3. Los filopodios se componen de paquetes de actina filamentosa organizados en haces paralelos que se forman con la intervención de los complejos WAVE/SCAR, Ena/VASP y la formina mDIA2 que actúa como un nucleador de actina, reemplazando al complejo ARP2/3. Las fibras de estrés están formadas por haces cortos de actina filamentosa que se encuentran interactuando con miosina II para generar la fuerza contráctil necesaria para el movimiento. Usualmente, estas estructuras están acopladas a adhesiones focales generadas en los sitios en los que las integrinas reconocen a la matriz extracelular (BurrIDGE & Guilly, 2016; Lambert et al., 2017; Schaks et al., 2019; SenGupta et al., 2021).

La migración se resume en un ciclo de cuatro eventos. Inicialmente la formación de un frente migratorio de filopodios y lamelipodios generado en respuesta a señales quimioatrayentes, la

formación de adhesiones tempranas con la matriz extracelular, su maduración en adhesiones focales al ensamblar la maquinaria contráctil y de unión al citoesqueleto, finalmente la pérdida de las adhesiones con el movimiento por la retracción y empuje de las células. Las proteínas Rac1, RhoA y Cdc42 son maestros regulares de la migración celular debido a que activan a las proteínas responsables de la remodelación del citoesqueleto. La activación de RhoA conduce a la formación de fibras de estrés, Cdc42 a la formación de filopodios y Rac1 a lamelipodios (SenGupta et al., 2021).

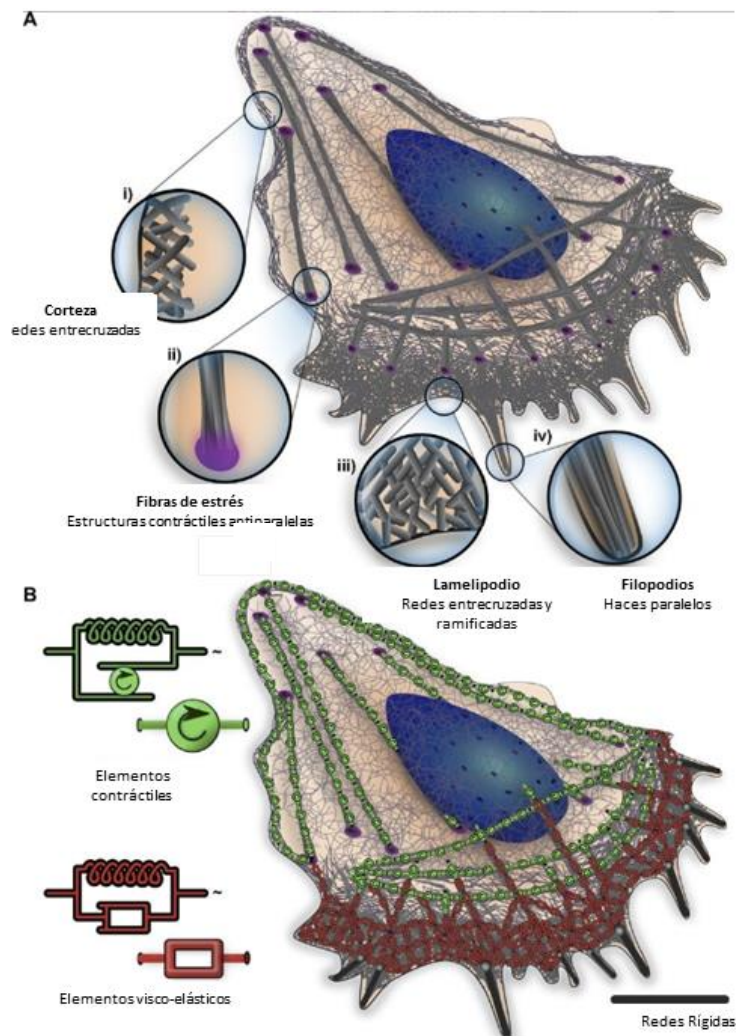


Figura 3: Estructuras especializadas en la migración mesenquimal. Las células que han recibido estímulos reorganizan su citoesqueleto como parte de mecanismos de migración celular. En la migración mesenquimal son 3 las estructuras empleadas: lamelipodios, filopodios y fibras de estrés. Modificado de Blanchoin et al., 2014

## 1.5. Rho GTPasas

Las Rho GTPasas se distinguen por regular la migración celular, proliferación, supervivencia y transporte vesicular. Se han identificado 20 miembros de la familia de las Rho GTPasas entre las que destacan RhoA, Rac1 y Cdc42. Estas proteínas se han caracterizado por actuar como switches moleculares pues transitan de un estado de encendido molecular unido a GTP a uno de apago unido a GDP. Como GTPasas, tienen la capacidad intrínseca de hidrolizar al GTP; sin embargo, esta actividad suele ser promovida por proteínas reguladoras, para hacerla más efectiva en el contexto de los procesos celulares que dependen de la acción precisa de estas GTPasas. Los cambios conformacionales generados por la unión a GTP permiten la interacción de las Rho GTPasas con proteínas efectoras de la remodelación del citoesqueleto como N-WASp y cinasas como ROCK y PAK, reconocidas específicamente por distintas GTPasas, que conducen a la organización de centros de nucleación de actina y remodelado de filamentos existentes, respondiendo a las vías de señalización involucradas en migración (Guan et al., 2020; Haga & Ridley, 2016; Sadok & Marshall, 2014).

La transición entre un estado de encendido y apagado de las GTPasas de la familia de Rho se encuentra regulado por 3 clases de proteínas. Los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (RhoGEFs) que promueven el intercambio de GDP por GTP, activando a las GTPasas. Las proteínas promotoras de la actividad de las GTPasas (RhoGAPs) que facilitan la hidrólisis de GTP a GDP, favoreciendo la inactivación de éstas y los inhibidores de la disociación de guanina (GDIs) que interactúan con las GTPasas cuando se encuentran unidas a GDP, manteniéndolas en un estado inactivo (Haga & Ridley, 2016; Hodge & Ridley, 2016).

Ya que las Rho GTPasas activan a proteínas efectoras de la migración, proliferación y supervivencia, ha surgido un interés por el estudio de su participación en patologías cuya evolución depende de estos procesos, como el cáncer. Aunque se han hallado alteraciones en los genes que codifican para las Rho GTPasas, no resultan tan comunes. Además, al existir pocos miembros de esta familia, que además se expresan de forma ubicua, su inhibición podría resultar en efectos secundarios no deseados, ya que potencialmente se afectarían células normales. Por ello, dada su diversidad y en algunos casos, expresión diferencial, los RhoGEFs, RhoGAPs y RhoGDIs podrían ser blancos farmacológicos de interés en el

contexto del cáncer, particularmente impidiendo la migración celular y con ello la diseminación metastásica (Svensmark & Brakebusch, 2019).

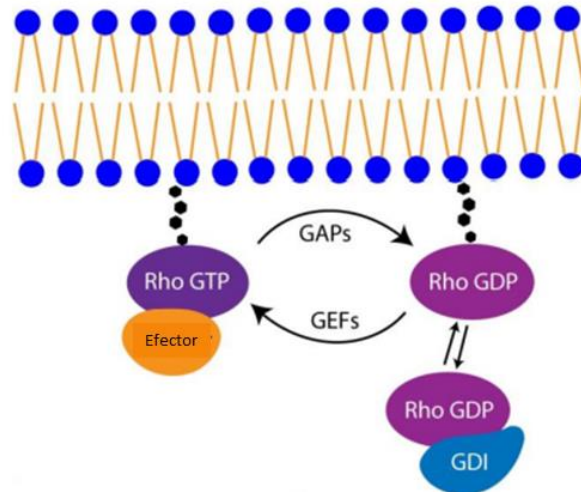


Figura 4 Rho GTPasas y sus mecanismos de regulación. El estado activo de las Rho GTPasas es promovido por la acción de GEFs, mientras que los Rho GAPs y Rho GDIs promueven un estado inactivo. Modificado de Haga & Ridley, 2016

## 1.6. RhoGEFs

Los RhoGEFs son proteínas que estructuralmente se caracterizan por una región catalítica unida en tándem compuesta por un dominio de homología a Dbl (DH) responsable de la actividad intercambiadora de GDP por GTP y un dominio de homología a Pleckstrina (PH) encargado de la activación y localización debido a su capacidad de interactuar con fosfolípidos de membrana (Cherfils & Zeghouf, 2013; Goicoechea et al., 2014).

En el genoma humano se encuentran codificados 80 RhoGEFs, lo que sugiere que varios de ellos pueden activar a una misma GTPasa. Debido a esto, en el contexto del cáncer la inhibición de un RhoGEFs que participe en la cascada de señalización oncogénica sería una estrategia razonable y precisa (Cherfils & Zeghouf, 2013; Goicoechea et al., 2014).

Los RhoGEFs tienen dominios de señalización que se extienden hacia las regiones amino y carboxilo terminal, lo que permite la interacción con diversas proteínas y segundos mensajeros que participan en cascadas de señalización. Esto diversifica las funciones de los RhoGEFs ya que además de activar a las GTPasas podrían fungir como plataformas de señalización al ensamblar complejos funcionales.

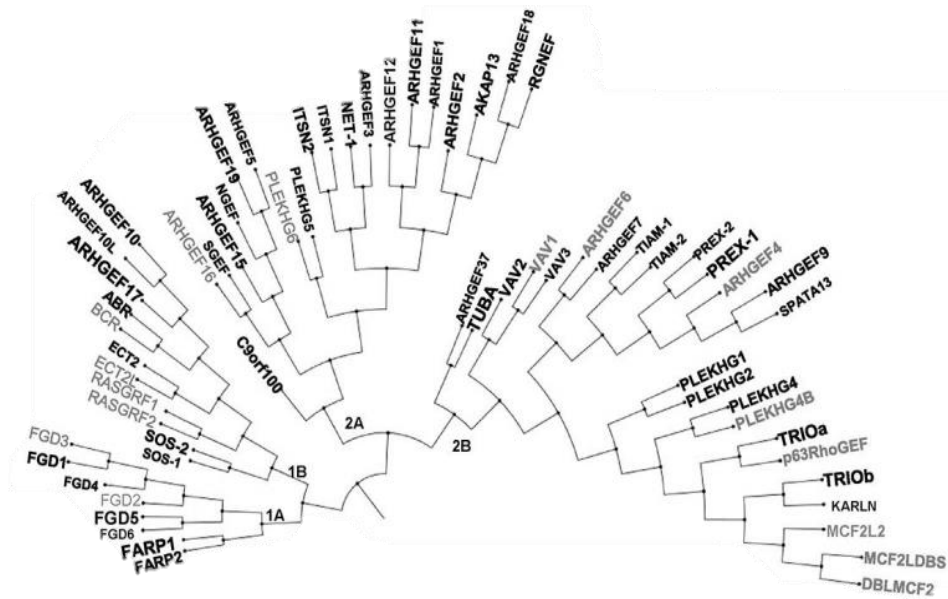


Figura 5: Arbol filogenético de RhoGEFs. Agrupamiento de RhoGEFs según el grado de homología de su región catalítica DH-PH; Tomado de Hernández-García et al., 2015

## 1.7. Efequinas

Los RhoGEFs se clasifican en familias y subfamilias de acuerdo con el grado de homología de la región catalítica. Entre las subfamilias se encuentra una compuesta por cinco miembros que además se relacionan estructuralmente al contar con una región amino terminal poco conservada, la región catalítica y un dominio SH3 en la porción carboxilo terminal (Hernández-García et al., 2015).

Los primeros miembros de esta familia se identificaron como parte de los proyectos del mapeo de cDNAs codificantes durante el desarrollo del proyecto de secuenciación del genoma humano y de ratón. La efexina 3 (ARHGEF5/TIM) se caracterizó como parte de una librería de cDNAs de células epiteliales que al ser expresada en fibroblastos NIH3T3 que fueron inoculados en ratones produjeron tumores. Por lo que su caracterización inicial resultó en la expresión de una proteína truncada, dando lugar a considerarlo un oncogen (Chan et al., 1994). La efexina 1 (NGEF) se aisló como una clona del repertorio de cDNAs del cerebro de ratón (Rodrigues et al., 2000). La efexina 2 (ARHGEF19/WGEF) se caracterizó de una librería de cDNAs de hígado de ratón (Y. Wang et al., 2004). La efexina 4 (ARHGEF16/NBR) como parte del repertorio de transcritos de líneas celulares de neuroblastoma (Sasaki et al., 1996). Por último, la efexina 5 (ARHGEF15/VSM-RhoGEF)

fue identificada como una proteína de expresión en células vasculares de músculo liso (Ogita et al., 2003).

Las efexinas reciben este nombre debido a que son efectoras de los receptores a efrina, la familia más grande de RTKs (K. Kim et al., 2019). En ausencia de estímulo, la efexina 1 se une al receptor EphA4 conduciendo a la activación de Rac1, Cdc42 y RhoA. Sin embargo, cuando células embrionarias corticales son estimuladas con efrina 1, el receptor EphA4 fosforila a efexina 1 en residuos de tirosina y aumenta su afinidad por RhoA (Rodrigues et al., 2000; Sahin et al., 2005). Por su parte las efexinas 2 y 3 tienen preferencia por RhoA (Debily et al., 2004; Y. Wang et al., 2004). La activación de efexina 4 por el receptor EphA2 conlleva a la activación de RhoG y consecuentemente Rac1 (Hiramoto-Yamaki et al., 2010). La efexina 5 es un activador de RhoA y Cdc42 (Kusuhara et al., 2012; Ogita et al., 2003).

La efexina 1 se encuentra sobreexpresada en muestras de neoplasias pulmonares y colorrectales. Experimentalmente se ha observado que esta efexina es fosforilada por AKT, promoviendo su interacción con la GTPasa Ras y su participación en cascadas oncogénicas (J. Kim et al., 2021). Por otro lado, la efexina 1 es responsable de la formación de heterodímeros entre EGFR y EphA2 que parecen favorecer el crecimiento tumoral, ya que impidiendo la expresión de esta efexina se atenúa el crecimiento de tumores en modelos murinos (J. Kim et al., 2022).

La efexina 2 ha sido detectada como una proteína sobreexpresada en muestras de neoplasias pulmonares. En líneas celulares de cáncer de pulmón esta efexina interactúa con BRAF y H-Ras, promoviendo cascadas de señalización oncogénicas que favorecen la activación de las MAPK-Cinasas, con el consecuente efecto en proliferación, migración e invasión. La expresión disminuida de efexina 2 en líneas cancerosas inoculadas en modelos murinos atenúa el crecimiento de tumores en comparación con los generados por células control (Y. Li et al., 2018; Z. Wang et al., 2020).

La efexina 3, sujeto central de los estudios presentados en este trabajo, participa en la formación de podosomas, estructuras relacionadas con la capacidad invasiva de células cancerosas. El mecanismo estudiado en fibroblastos que migran como células mesenquimales, depende de que la efexina 3 interactúe con la cinasa Src, la PI3K y la cortactina, una proteína de unión a actina filamentosa (Kuroiwa et al., 2011). Aunado a esto,

la efexina 3 participa en la señalización del TGF $\beta$ R en líneas celulares de cáncer colorrectal y en fibroblastos (Komiya et al., 2016). Además, la efexina 3 forma parte del repertorio de RhoGEFs sobreexpresados en células derivadas de la médula ósea, expandidas *in vitro*, con propiedades tumorales. Tales células favorecen la formación de tumores al ser inoculadas junto con células de cáncer de pulmón en ratones inmunocompetentes, en contraste con el efecto de células frescas de la médula ósea que atenúan el crecimiento tumoral (Cervantes-Villagrana et al., 2019).

La efexina 4 en líneas celulares de cáncer de mama coordina la formación de un complejo de señalización compuesto por EphA2, EGFR, ELMO, DOCK1, RhoG y Rac1. La formación de este complejo contribuye a la proliferación, migración y capacidad invasiva de dichas células cancerosas (Hiramoto-Yamaki et al., 2010). En células HeLA, la efexina 4 promueve la resistencia a la anoikis mediante la interacción con EpHA2, RhoG y AKT (Harada et al., 2011). En células de glioma, la expresión de efexina 4 aumenta por la actividad del oncogén GLI2, lo que favorece la interacción de efexina 4 con CKAP5 promoviendo en consecuencia un aumento de la proliferación celular (Huang et al., 2018). En muestras de neoplasias colorrectales y en líneas celulares de cáncer de colon, efexina 4 es capaz de interactuar con FYN, una tirosín cinasa que pertenece a la familia de las cinasas de Src. Esta interacción promueve la sobrevivencia, proliferación, migración e invasión de tales células (Yu et al., 2020).

La efexina 5 tiene una expresión particularmente restringida a células endoteliales. En la retina, esta efexina regula el proceso angiogénico mediante la activación de Cdc42 (Kusuhara et al., 2012). Efexina 5 se ha encontrado en células vasculares de músculo liso, células en las que esta efexina interactúa con el receptor EphA4 y activa a RhoA (Ogita et al., 2003). En el contexto del adenocarcinoma pancreático ductal, un grupo de pacientes con alta expresión de efexina 5 tuvo una menor sobrevivencia, considerándose que esta efexina pudiera marcar un pronóstico poco favorable, en líneas celulares, se detectó que efexina 5 activa a RhoA, Rac1 y Cdc42 (Fukushima et al., 2016).





Figura 6 Representación estructural de las efexinas. Las efexinas se caracterizan por una región amino terminal de longitud variable, una hélice autoinhibitoria, seguida del tándem catalítico DH-PH y un dominio SH3 que interactúa con residuos ricos en prolina

## 1.8. Estudios Omicos Masivos

El desarrollo de nuevas técnicas como secuenciación masiva, proteómica y fosfoproteómica han permitido realizar estudios sistemáticos de diversas patologías. Con ello, se pretende explorar el contexto genético y molecular que podría ayudar a diseñar estrategias para el desarrollo de nuevos fármacos, a raíz de identificar blancos moleculares novedosos. La aplicación de tales técnicas genera grandes cantidades de información biológica cuya interpretación requiere del uso de sistemas computacionales. En conjunto, la minería de datos y la biología computacional extraen grandes cantidades de información disponibles en bases de datos de proyectos biológicos, su posterior análisis permite establecer posibles relaciones causa-efecto de las que surgen hipótesis experimentales.

## 1.9. TCGA

El Atlas del Genoma del Cáncer (*TCGA*) es un proyecto desarrollado por los *National Institutes of Health* (NIH), particularmente el *National Cancer Institute* (NCI), posterior a la secuenciación del genoma humano. Inicialmente el proyecto buscaba secuenciar el genoma del cáncer, sin embargo, la implementación de técnicas novedosas permitió complementar el alcance del proyecto con las variaciones en el número de copias de los genes, transcriptómica, proteómica, fosfoproteómica, así como datos clínicos que involucran la progresión de la enfermedad y respuesta a tratamientos. A lo largo de 12 años, el proyecto ha estudiado 33 tipos de cáncer de los cuales se han obtenido alrededor de 11,000 muestras de pacientes con sus respectivos datos clínicos. La información obtenida es de libre acceso con la finalidad de promover su uso por la comunidad científica, lo que permita acelerar la investigación de

mecanismos novedosos en el desarrollo del cáncer (Ganini et al., 2021; Tomczak et al., 2015; J. N. Weinstein et al., 2013)

### **1.10. DepMap**

En el contexto del cáncer, identificar las vulnerabilidades de las células cancerosas resulta importante para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. La letalidad sintética es la pérdida de la viabilidad celular cuando se tiene un par de genes donde el primero se encuentra alterado y el segundo es inhibido farmacológicamente o su expresión es disminuida. Este concepto da lugar a nuevas estrategias para el desarrollo de fármacos novedosos y esquemas terapéuticos según el contexto de alteraciones en cáncer. Las múltiples alteraciones genéticas que tienen las células cancerosas hacen que éstas dependan de vías de señalización que le son vitales, por lo que inhibir a proteínas esenciales en tales vías, permite explorar el reposicionamiento de fármacos, nuevas moléculas pequeñas y estrategias terapéuticas (Luo et al., 2009; Petroni et al., 2022; Torti & Trusolino, 2011; I. B. Weinstein & Joe, 2006)

El Mapa de Dependencias del Cáncer o DepMap, desarrollado por el instituto Broad, es un proyecto que hace uso sistemático de estrategias de letalidad sintética. El DepMap tiene por objetivo identificar puntos débiles en las células cancerosas entre sus genes y proteínas como resultado de ser inhibidas mediante RNAi, CRISPR-Cas y moléculas con propiedades farmacológicas. A través de la caracterización genética de las líneas celulares de cáncer es posible establecer posibles interacciones que resulten en letalidad sintética, estableciendo nuevas estrategias terapéuticas con base en la información obtenida (*DepMap: The Cancer Dependency Map Project at Broad Institute*, n.d.; Tsherniak et al., 2017)

## **2. Justificación**

La metástasis es la principal causa de mortalidad en pacientes con cáncer. Este proceso involucra a proteínas que integran cascadas de señalización necesarias para que las células cancerosas invadan, migren y establezcan tumores secundarios. Las proteínas que participan en la transducción de señales relacionadas con este proceso tienen potencial como biomarcadores pronósticos y blancos terapéuticos. Los RhoGEFs en particular son proteínas complejas con una posición estratégica en cascadas de señalización que coordinan la migración celular. Entre ellos destacan las efexinas, quienes por su expresión han sido

relacionadas con un pronóstico menos favorable en diversos tipos de cáncer, lo que sugiere que participan en cascadas de señalización oncogénicas que conducen mayor agresividad. Para investigar esta hipótesis, resulta ideal diseñar estrategias de minería de datos con información recolectada en proyectos como el TCGA y DepMap. Mediante una estrategia sistemática enfocada en la identificación de acompañantes de señalización de las efexinas, relevantes en el contexto de la migración celular, un proceso fundamental de la metástasis y de la comunicación en el microambiente tumoral, junto con el análisis de vulnerabilidades en líneas celulares de cáncer, es posible identificar cascadas de señalización que pudieran correlacionar con un pronóstico poco favorable de la evolución clínica de pacientes con distintos tipos de cáncer y elucidar la identidad de potenciales blancos terapéuticos.

### **3. Hipótesis**

Las efexinas integran cascadas de señalización en el microambiente tumoral que podrían correlacionar con un pronóstico poco favorable en pacientes con cáncer

### **4. Objetivo General**

Caracterizar *in silico* a las efexinas como posibles integrantes clave en cascadas de señalización del microambiente tumoral, relacionadas con un pronóstico poco favorable.

### **5. Objetivos Particulares**

Identificar transcritos de señalización coexpresados con las efexinas en el microambiente tumoral con los que potencialmente integran complejos funcionales relevantes en el desarrollo tumoral.

Identificar líneas celulares de cáncer sensibles a la inhibición de las efexinas y sus posibles acompañantes de señalización

Analizar la relación de los acompañantes de señalización en curvas de supervivencia que definan la correlación estadística y funcional de las cascadas de señalización integradas por las efexinas en distintos tipos de cáncer.

## 6. Estrategia Experimental

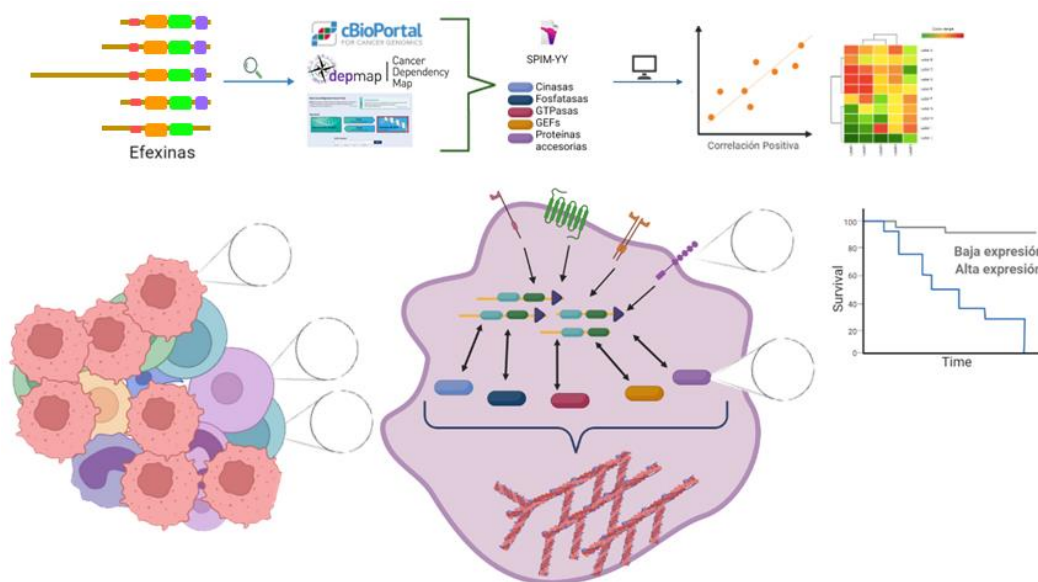


Figura 7 Estrategia experimental. Las efexinas fueron analizadas por su expresión y esencialidad en diversas bases de datos. Los transcritos coexpresados con las efexinas en muestras de pacientes con cáncer fueron segregados con base en su participación en cascadas de señalización relacionadas con migración celular y en criterios funcionales. Posteriormente se evaluó la correlación de firmas transcripcionales conformadas por ACS con la supervivencia de los pacientes.

Empleando las bases de datos cBioportal y DepMap se obtuvieron datos de expresión en pacientes y sensibilidad de líneas celulares a la pérdida de función de las efexinas en diversos tipos de cáncer. Se descargaron los datos de transcritos con un valor de correlación con las efexinas y las vulnerabilidades de líneas celulares a la pérdida de función de las efexinas. Se identificaron las poblaciones celulares en las que posiblemente se expresan las efexinas mediante la coexpresión con marcadores celulares. A través de la base de datos SPIM-YY se etiquetaron a los transcritos correlacionados y covulnerabilidades para seleccionar aquellos que participan en procesos de señalización. Mediante herramientas computacionales se seleccionaron aquellas correlaciones que indicaran una coexpresión en pacientes del TCGA, así como covulnerabilidades relevantes en líneas celulares de cáncer. Mediante etiquetas funcionales *Gene Ontology* se filtraron aquellos transcritos coexpresados que codifican para proteínas que participan en la reorganización del citoesqueleto y potencialmente migración celular. Con base en los criterios SMART se definió la funcionalidad de proteínas de señalización codificadas por los transcritos coexpresados con las efexinas. Los integrantes

de ejes de señalización en los que participan las efexinas se definieron con base en criterios de coexpresión PanCan, particular y vulnerabilidad en líneas celulares. Las firmas transcripcionales se conjuntaron a partir de seleccionar a los ACS individuales cuya expresión tuvo correlación estadística con la sobrevivencia de los pacientes. Aquellos que correlacionaron con un pronóstico menos favorable en determinados tipos de cáncer, formaron parte de la firma transcripcional correspondiente, a la cual se le integró la efexina 3. Este procedimiento se aplicó para cada tipo de cáncer, con cada uno de los acompañantes de señalización identificados empleando cualquiera de los tres criterios generales; PanCan, Particular o TCGA-DepMap y con cada firma obtenida se evaluó el riesgo acumulado de la firma transcripcional en los pacientes.

## **7. Materiales y Métodos**

### **7.1. Expresión de efexinas en estudios del TCGA**

1. En la plataforma cBioportal (<https://www.cbioportal.org/>) se seleccionó la opción “TCGA PanCancer Atlas Studies” para realizar una búsqueda por gen empleando el apartado “*Query By Gene*”.
2. La última selección redireccionó a una página. En el apartado “*Enter Genes*” se ingresó el nombre de un gen de una efexina; Efexina 1 (NGEF), Efexina 2 (ARHGEF19), Efexina 3 (ARHGEF5), Efexina 4 (ARHGEF16) y Efexina 5 (ARHEF15). Posteriormente se seleccionó la opción “*Submit Query*”.
3. En la nueva página se seleccionó el apartado “*Plots*” que desplegó la visualización de la información “*mRNA vs Study*” para identificar los tipos de cáncer en los que se expresa la efexina de interés.
4. Empleando el apartado “*Download*” se seleccionó la opción de descarga “*Tab Delimited Format*” para “*mRNA Expression RSEM (Batch Normalized from Illumina HiSeq\_RNASeqV2)*”) para obtener un archivo con extensión .txt.
5. En un archivo nuevo de Microsoft Excel se seleccionó el archivo descargado para su transformación a extensión. xlsx para su apertura y manejo de la información en el programa.
6. El archivo obtenido el apartado anterior se compone de las columnas “*Sample ID*”, “*Study of Origin*”, “*ARHGEFX: mRNA Expression*”, “*Mutations*”, “*Copy Number Alterations*”.

7. Para evaluar la expresión de la efexina en un tipo de cáncer de interés, se filtró empleando la columna “*Study of Origin*”. Los datos para el tipo de cáncer seleccionados se copiaron y pegaron en una nueva hoja. La expresión se evaluó empleando la columna “*ARHGFX: mRNA Expression*”. Este paso se repitió para los 31 tipos de cáncer restantes.
8. Estos pasos se repitieron para las efexinas restantes

### **7.2. Alteraciones en los genes que codifican a las efexinas**

1. Derivado del archivo obtenido en el apartado anterior para una efexina, se evaluó la alteración en el número de copias del gen que la codifican en un tipo de cáncer empleando la columna “*Copy Number Alterations*”.
2. Con base en esta columna se extrajeron el número de pacientes con las alteraciones; “*Diploid*”, “*Gain*” “*Shallow Deletion*” “*Deep Deletion*” y “*Amplification*”.
3. Empleando la función “*contar.si*” de Microsoft Excel, se determinó el número de pacientes que cuentan con las alteraciones mencionadas
4. Estos pasos se repitieron para los 31 tipos de cáncer restantes y para las 4 efexinas.

### **7.3. Descarga de los transcritos con un valor de correlación con las efexinas en estudios del TCGA**

1. Una vez identificados los tipos de cáncer en los que se expresan las efexinas, empleando cBioportal se seleccionó un tipo de cáncer perteneciente al proyecto “TCGA-PanCancer” para emplear la opción “*Query by gene*”.
2. En la nueva página se seleccionaron las opciones “*mRNA Expression*”, “*mRNA Expression Z-scores relative to diploid samples*” y “*Complete Samples*”. En el apartado “*Enter Genes*” se ingresó la efexina de interés y se seleccionó la opción “*Submit Query*”.
3. Una vez direccionado a la nueva página, en el apartado “*Co-expression*” se seleccionó el ícono para la descarga de todos los transcritos con un valor de correlación.
4. Empleando un nuevo archivo de Microsoft Excel, el archivo con extensión .tsv descargado fue transformado a extensión .xlsx para su manejo en el programa.

5. Los pasos anteriores se repitieron para cada tipo de cáncer en el que se expresa la efexina seleccionada. Asimismo, para las 4 efexinas restantes y los tipos de cáncer en los que se expresan.

#### **7.4. Correlación entre las efexinas y con marcadores de poblaciones celulares para la generación de mapas de calor**

1. En los archivos de correlación para una efexina dada se buscaron los valores de correlación con el resto de las efexinas.
2. En un nuevo archivo de Microsoft Excel, en la sección de columnas comenzando en la B se ingresaron los tipos de cáncer. En el apartado de las filas, comenzando en la 2 se ingresaron las efexinas y el valor de correlación con la efexina seleccionada en los tipos de cáncer.
3. Los dos pasos previos se repitieron para el resto de las efexinas en hojas de Excel nuevas.
4. El diseño descrito en el paso 2 de este apartado se repitió en una nueva hoja de Excel donde se pegaron los valores de correlación globales entre las efexinas. Esta hoja se guardó en formato .txt para la generación de un mapa de calor
5. Los pasos descritos se repitieron para las correlaciones de las efexinas con marcadores de poblaciones celulares

#### **7.5. Generación de mapas de calor empleando clustergrammer**

1. Los mapas de calor se generaron con el paquete Clustergrammer desarrollado por Ma'yan Lab. Fue necesaria la instalación previa de un ambiente de programación adecuado. La versión más reciente del lenguaje Python y un entorno adecuado se descargaron de la página Anaconda (<https://www.anaconda.com/>)
2. Se empleó el entorno “Jupyter Lab” que al ejecutarse direccionó a la interfaz de Python en la cual se generaron carpetas específicas para guardar los archivos con extensión .txt generados
3. Con la selección secuencial de los pasos se generó una “Notebook”; “File”, “New”, “Notebook”, “Kernel Python 3”. En el archivo generado, se ingresaron los siguientes comandos:

```
Import numpy as np
```

```
Import pandas as pd
```

```
Pip install clustergrammer 2
```

```
From clustergrammer import net
```

```
Net.load_file("Nombre del archivo.txt")
```

```
Df=net.export_df()
```

```
Df.shape
```

```
Net.load_df(df)
```

```
Net.widget()
```

4. Para obtener los mapas de calor en el orden inicial del archivo .txt se seleccionaron las opciones "INI" para los apartados "COL" y "ROW".

#### **7.6. Sensibilidad de líneas celulares de cáncer a la pérdida de función de los genes que codifican a las efexinas**

1. Empleando la plataforma DepMap (<https://depmap.org/portal/>) se seleccionó la opción "*Data Explorer*".
2. En la página direccionada, se seleccionaron secuencialmente las opciones; "*X Axis*", "*Gene*", "*Enter Gene Symbol*", en este último se ingresó el nombre del gen de una efexina de interés. En el apartado "*Select Data Set*" se seleccionó el repositorio "*CRISPR (DepMap 21Q4 Public+Score, Chronos)*".
3. La descarga de los datos de vulnerabilidad de la efexina seleccionada se seleccionó la opción "*Download Plot Data*" para guardar un archivo con extensión .txt.
4. Empleando Microsoft Excel se transformaron los archivos descargados a extensión .xlsx para su manejo en el programa
5. El archivo descargado está compuesto por las columnas "*DepMap ID*", "*CRISPR (DepMap 21Q4 Public+Score, Chronos)*", "*Cell Line Name*", "*Primary Disease*", "*Lineage*", "*Lineage Subtype*", "*Expression 21Q4 Public*" y "*Mutation*". Empleando la



columna “Primary Disease” las líneas celulares son separadas en hojas de Excel diferentes de acuerdo con el tejido de origen de la línea celular.

6. Empleando la columna “CRISPR (DepMap 21Q4 Public+Score, Chronos)” los valores se ordenaron de menor a mayor para seleccionar y extraer los datos de las líneas celulares con un valor igual o menor a -0.5.
7. Los pasos anteriores se repitieron para el resto de las efexinas.

### **7.7. Etiquetado transcritos de señalización con un valor de correlación con efexina 3**

1. En los 32 archivos generados en el apartado “**Descarga de los transcritos con un valor de correlación con las efexinas en estudios del TCGA**” para efexina 3, se agregaron las siguientes columnas; Approved name HUGO, Protein name UNIPROT, Structural label, Domain 1-n, Secretome Annotated category, Ligand ID, Ligand Precursor Uniprot, Ligand type, Receptor Ligand, GPCR Ligand type, Ligand, Ligand family, Receptor, Receptor family, Receptor family SIMILARITY, G protein coupling, Rho regulators, Protein Kinase UNIPROT, Kinase SMART, Kinase Group, Kinase Family, Kinase Family SIMILARITY, PSP Phosphorylated by, PI's Binding, Functional label GO, GO Molecular function, GO Biological process, Ensembl gene ID, UniProt accession, Protein name SMART, Length, MW kDa, Organism, HuRI Bait (Pt1), HuRI Prey (Pt2), Bioplex 3.0 Bait (Pt1), Bioplex 3.0 Prey (Pt2), Interactome RhoReg Bait, Interactome RhoReg Prey, Cancer (tissue) Cancer-Cell Marker, Normal (tissue), Cell Marker, Normal Cell Marker Source, Cancer Cell Marker Source, Cancer Marker (Lung), Stromal Marker (Lung). Cada archivo se guardó con un nombre identificable para cada tipo de cáncer
2. Empleando el Software FileMaker Pro Advanced 11.0v1, empleando la opción “Convertir un archivo existente”, los 32 archivos del apartado anterior se transformaron a la extensión sugerida para su manejo en el programa.
3. Una vez abierto uno de los archivos transformados en el paso anterior, desde la interfaz inicial de FileMaker se seleccionaron secuencialmente las opciones “Archivo”, “Importar Registros”, “Archivo”, se seleccionó el archivo correspondiente a la base de datos SPIM-YY. En la nueva ventana se seleccionaron las opciones “Organizar por: Nombres coincidentes”, y “Actualizar Registros coincidentes en el conjunto hallado”. Fue necesario armonizar las etiquetas presentes en las columnas “Campos de Origen” y “Campos de Destino”. Para los apartados “Approved Symbol” y “Correlated Gene” es necesario que el símbolo sea “=” para

etiquetar los datos de acuerdo con su identidad como gen. Para el resto de las etiquetas se emplea el símbolo “-“. Una vez armonizados los datos, se seleccionó la opción “Importar”.

4. Una vez importados los datos de SPIM-YY, el archivo se guardó con un nombre identificable.
5. El proceso se repitió para los 31 tipos de cáncer restantes.

#### **7.8. Extracción genes de señalización**

1. Empleando el archivo con extensión FileMaker generado para un tipo de cáncer en el apartado anterior, se seleccionó la columna “*Spearman’s Correlation*”, seguido de “Ordenar de Forma descendente”.
2. La extracción de los genes que codifican proteínas involucradas en procesos de señalización se realizó con la opción “Buscar”, en la columna “*Structural Label*” se introdujo la descripción “*Signaling*” y “Ejecutar Búsqueda”.
3. Los genes resultantes con la etiqueta “*Signaling*” se guardaron empleando las opciones “Vista previa” y “Guardar como excel”.
4. Se repitieron los pasos anteriores para los 31 archivos de los tipos de cáncer restantes.

#### **7.9. Obtención de los acompañantes de señalización coexpresados con efexina 3**

1. Derivado de los archivos con extensión .xlsx del apartado anterior, se seleccionó el 10% de los transcritos de señalización obtenidos. Es decir, si se etiquetaron 4000 transcritos de señalización coexpresados, se extrajeron 400 transcritos, los cuales se colocaron en una segunda hoja del archivo.
2. En los tipos de cáncer en los que el 10% de los transcritos extraídos contuvieran transcritos con un valor de correlación de Spearman menor a 0.2, éstos fueron eliminados.
3. Estos pasos se repitieron para los 31 tipos de cáncer restantes.

### **7.10. Visualización global de los acompañantes de señalización de efexina 3**

1. En un nuevo archivo de Microsoft Excel se ingresaron los Acompañantes de señalización de efexina 3 y su valor de correlación de Spearman en los 32 tipos de cáncer
2. En una misma columna se pegaron la lista de los acompañantes de señalización de efexina 3 en los 32 tipos de cáncer, en la columna adyacente su valor de correlación.
3. La columna que contenía a los acompañantes de señalización globales fue copiada y pegada en una tercera columna. En la pestaña “Datos” se seleccionaron las herramientas “Quitar Datos Duplicados”, “Continuar con la selección actual”, “Mis datos tienen encabezados” y “Aceptar”.
4. En la tercera columna se obtendrá la lista de genes sin duplicidades que se expresan en los 32 tipos de cáncer. Empleando la función “=sumar.si()” se obtuvo el valor de correlación de Spearman acumulado para cada gen. Los Acompañantes de señalización se ordenaron de forma descendente de acuerdo con el valor de Spearman acumulado.
5. En una nueva hoja del mismo archivo, en las filas se pegó la lista de los acompañantes de señalización con el orden del paso 4. Comenzando en la columna B2 se colocó el nombre de los 32 tipos de cáncer.
6. En el extremo de la tabla generada del paso anterior, se pegaron los datos de correlación de los transcritos de señalización (sea positiva, 0 o negativa) para los 32 tipos de cáncer.
7. Empleando la función “=buscarx()” se extrajeron los datos de correlación de Spearman de los Acompañantes de señalización en cada tipo de cáncer.
8. De cada columna (Tipo de cáncer) se sumaron los valores de correlación de Spearman mayores a 0.2. Las columnas se reorganizaron de forma descendente de acuerdo con el acumulado de Spearman de izquierda a derecha.
9. Los datos de esta tabla fueron copiados y pegados en una nueva hoja para ser guardados en un archivo de extensión .txt para la generación de su mapa de calor correspondiente.

### **7.11. Etiquetado por proceso biológico asociado a migración celular**

1. En la plataforma Panther ([pantherdb.org/about.jsp](http://pantherdb.org/about.jsp)), los Acompañantes de Señalización de efexina 3 fueron ingresados en el Apartado 1 con la sección de la opción “ID List”. En el Apartado 2 se seleccionó la opción “*Homo sapiens*”. En el Apartado 3 las opciones seleccionadas fueron “*Statistical Overrepresentation Test*”, “*Go Biological Process Complete*”. Finalmente se seleccionó “*Submit*”.
2. En la siguiente página se seleccionaron las opciones “*Use a Reference List that includes all genes from a whole-genome list*” y “*Homo sapiens*”. Una vez direccionado a una nueva página, las opciones de selección fueron “*Go Biological Process Complete*”, “*Fisher’s Exact*”, “*Calculate False Discovery Rate*” y la opción “*Launch Analysis*”.
3. El resultado del análisis desplegará una nueva página donde se seleccionará la columna “#” que a su vez mostrará los acompañantes de señalización asociados con un proceso biológico. Se seleccionaron aquellas etiquetas que en su descripción se indique que participan en procesos de migración celular. La tabla resultante fue copiada y pegada en un archivo Excel.
4. Los acompañantes de señalización etiquetados con una etiqueta GO fueron eliminados de la lista inicial empleando la función “=coincidir()”. Aquellos que resultaron con la descripción “N/A” se reingresaron a Panther con los parámetros descritos en este apartado.
5. Los pasos anteriores se repitieron hasta la ausencia de etiquetas relacionadas con la migración celular.

### **7.12. Etiquetado por la participación en la reorganización del citoesqueleto**

1. De la lista resultante del apartado anterior, es decir, acompañantes de señalización asociados a la migración celular, se ingresaron en la plataforma Panther con los mismos parámetros de los pasos 1 y 2 del apartado anterior.
2. Se seleccionaron las etiquetas GO relacionadas con la formación de estructuras especializadas en la migración celular.

3. Los acompañantes de señalización etiquetados fueron eliminados de la lista inicial empleando la función “=coincidir()”. Aquellos con la descripción “N/A” se reingresaron a Panther con los parámetros mencionados.
4. Los pasos anteriores se repitieron hasta la ausencia de etiquetas relacionadas con estructuras involucradas en migración celular.

### **7.13. Etiquetado con Metascape**

1. En la plataforma Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) se ingresaron los acompañantes de señalización asociados a la reorganización del citoesqueleto obtenidos en el apartado anterior. Empleando las opciones “*Use a list*” donde se ingresó la lista de genes, se seleccionó “*Submit*”, “*Input as species*”, “*H. sapiens*” y “*Express Analysis*”.
2. Una vez generados los análisis correspondientes, se seleccionó el apartado “*Analysis Report Page*”. Se descargó un archivo de extensión .zip con la opción “*All in One Zip File*”.
3. Tras descomprimir el archivo descargado, en las carpetas se identificó y seleccionó el archivo “*Enrichment Go*” para abrir el archivo “*Final\_GO*” y extraer las etiquetas más enriquecidas.

### **7.14. Segmentación estructural y funcional de los acompañantes de señalización asociados a la reorganización del citoesqueleto**

1. Empleando la lista de genes obtenida en el apartado **Etiquetado por la participación en la reorganización del citoesqueleto**, se procedió a realizar nuevamente su etiquetado con SPIM-YY (Descrito en **Etiquetado transcritos de señalización con un valor de correlación con Eflexina 3**).
2. Para segmentar los acompañantes de señalización con base en criterios funcionales y estructurales se consultó la plataforma SMART. Del apartado “*Domains Detected By SMART*” se seleccionó “*Browse*” y tomando como referencia el apartado “*Signalling*” se realizó una consulta descriptiva de los dominios involucrados en procesos de señalización y su funcionalidad en una cascada de señalización.

3. En la aplicación FileMaker se empleó la función buscar para extraer los acompañantes de señalización de interés. Para los ligandos se empleó el apartado “*Structural Label*” con la descripción “*Extracellular*”. Para los receptores se empleó el apartado “Receptor” con las descripciones “GPCR o “RTK”, los demás receptores explorando el apartado “*Receptor Family*”. La extracción de proteínas citosólicas se realizó empleando el apartado “Domain 1\_n” tomando en cuenta los dominios de señalización descritos en SMART.
4. De cada búsqueda se obtuvieron los archivos con extensión .xlsx
5. Los Acompañantes de señalización se agruparon en 5 grupos de acuerdo con su clasificación por criterio funcional; Ligandos y Receptores, Proteínas con Actividad Catalítica, Proteínas Adaptadoras, Proteínas Involucradas en el ciclo de las GTPasas y Proteínas de interacción con el citoesqueleto.
6. Se generó un archivo Excel que contuviera de forma global e identificada los acompañantes de señalización de cada criterio estructural y su correlación en los 32 tipos de cáncer del TCGA.

#### **7.15. Selección de líneas celulares de cáncer vulnerables al *knock-out* de efexina**

##### **3**

1. Para identificar los genes cuya pérdida de función resulta en la vulnerabilidad de líneas celulares previamente reconocidas como sensibles a la pérdida de función del gen de efexina 3, obtenidas en el apartado (**Sensibilidad de Líneas Celulares de Cáncer a la pérdida de función de los genes que codifican a las efexinas**), se seleccionaron las líneas celulares con un estadístico T menor a -0.5 separadas por el tejido de origen y su información se recolectó en un archivo adicional. Sólo se seleccionaron líneas celulares cuyos tejidos de origen correspondieran a neoplasias estudiadas en el TCGA.
2. En la página principal de DepMap se empleó la herramienta “*Cell Line Selector*” con la opción “*Create Custom List*”, se crearon listas de líneas celulares basadas en el tejido de origen. En el apartado “Cell line” se realizó la búsqueda de las líneas celulares sensibles, posteriormente se emplearon las opciones “*Include these cell lines*” y “*Save List*”.

3. Nuevamente en la página principal de DepMap, se seleccionó el apartado “Download” seguido de “Custom Download”. En la nueva página se emplearon las opciones “Use a Custom Cell line List” para seleccionar la lista de líneas celulares de interés, se descargaron los datos del repositorio “CRISPR (DepMap 21Q4 Public +Score Chronos) con la opción “Download File”.
4. Estos pasos se repitieron para las líneas celulares de cáncer provenientes de cada tejido en común.

#### **7.16. Extracción de datos de covulnerabilidad**

1. Empleando Microsoft Excel en el apartado “Datos” se seleccionó la herramienta “Obtener Datos” seguido de “De un archivo .txt/CSV” y se seleccionó uno de los archivos obtenidos en el apartado anterior. Se seleccionó la opción “Importar” lo que llevó a la apertura de “Conexión con Microsoft”. En las nuevas opciones se seleccionó “Transformar Datos”, lo que a su vez lleva a la apertura del editor “Power Query” en una nueva ventana.
2. En Power Query se seleccionaron las opciones “Transformar y Transponer” lo que reordenó los datos obtenidos. Posteriormente la opción “Cerrar y cargar” lo que generó un archivo de extensión .txt que se transformó a .xlsx.
3. Se repitió el proceso para los archivos generados en el apartado anterior.

#### **7.17. Extracción de genes que codifican proteínas involucradas en señalización de líneas celulares de cáncer sensibles al K.O de efexina 3**

1. Derivado de los archivos generados en el apartado anterior, se obtuvieron documentos compuestos por filas que contienen el nombre de los genes y en las columnas las líneas celulares seleccionadas con el valor de estadístico T, indicativo del grado de vulnerabilidad que la pérdida de función de un gen genera en las células.
2. Se seleccionó la columna de los genes y los valores de vulnerabilidad para una línea celular, los datos fueron copiados y pegados en una nueva hoja. Los genes se ordenaron de menor a mayor con respecto al valor del estadístico T. Este paso se repitió para las líneas celulares presentes en el archivo obtenido.

3. En una nueva hoja, sobre una columna se pegaron todos los datos de vulnerabilidad en las líneas celulares con su respectivo valor de estadístico T en la célula adyacente. Los genes se pegaron en una tercera columna adyacente, en la pestaña “Datos” se seleccionaron las herramientas “Quitar Datos Duplicados”, “Continuar con la selección actual”, “Mis datos tienen encabezados” y “Aceptar”.
4. Posteriormente, empleando la función “=sumar.si()” se obtuvo el acumulado de genes con un valor de estadístico T menor o igual a -0.5, reordenándolos de un valor menor a mayor.
5. En una nueva hoja, los genes esenciales (aquellos que al ser noqueados hacen a las células vulnerables) y con el ordenamiento anterior se pegaron en las filas, mientras que comenzando en la columna B se ingresó el nombre de las líneas celulares. Las vulnerabilidades de las líneas celulares se pegaron en la columna adyacente. Los valores de vulnerabilidad de cada línea celular ante la pérdida de cada gen de la lista obtenida el paso 4 de esta sección se buscaron empleando la función “=buscarx()”.
6. La lista obtenida es etiquetada para obtener las covulnerabilidades que participan en señalización como lo indicado en la sección (**Etiquetado transcritos de señalización con un valor de correlación con Efectina 3**).
7. Se repitió el proceso para cada set de datos de líneas celulares de cáncer provenientes de un tejido en común

#### **7.18. Extracción de covulnerabilidades en líneas susceptibles al K.O de efexina 3 asociadas a la reorganización del citoesqueleto y coexpresadas en el TCGA**

1. Derivado de las covulnerabilidades de señalización obtenidas en el apartado anterior, se armonizaron los datos de vulnerabilidad con datos de coexpresión en pacientes del proyecto del TCGA.
2. En el archivo de Excel generado en el apartado **Segmentación Estructural y funcional de los acompañantes de señalización asociados a la reorganización del citoesqueleto**, los datos de coexpresión en los 32 tipos de cáncer se copiaron y se pegaron en una hoja. En una columna adyacente se pegaron los genes que al ser noqueados causan vulnerabilidad en líneas celulares cancerosas.



3. Empleando la función “=buscarx()”, se extrajeron los datos de coexpresión en pacientes del TCGA. Los genes se ordenaron de mayor a menor de acuerdo con el valor de correlación de Spearman.

#### **7.19. Determinación de acompañantes de señalización PanCancer**

1. En un archivo Excel se pegaron los Acompañantes de Señalización de Efexina 3 en los 32 tipos de cáncer asociados a la reorganización del citoesqueleto separados por los criterios estructurales; “Ligandos y Receptores”, “Actividad Catalítica”, “Adaptadores”, “Ciclo de las GTPasas” e “Interacción con el citoesqueleto”.
2. En la columna final de cada criterio estructural se empleó la función “=contar.si()” para identificar los acompañantes de señalización coexpresados en varios tipos de cáncer.
3. El orden de los acompañantes de señalización se reorganizó de mayor a menor de acuerdo con el número de neoplasias en el que se coexpresaran.
4. Se seleccionaron los 5 acompañantes de señalización coexpresados con efexina 3 en al menos 20 tipos de cáncer.
5. Se generaron los mapas de calor correspondientes.

#### **7.20. Determinación de acompañantes de señalización particulares (óptimo para cada tipo de cáncer)**

1. Del archivo Excel generado en el paso 1. en el apartado anterior, se reorganizaron los acompañantes de señalización mejor coexpresados para cada tipo de cáncer de cada criterio estructural.
2. Se extrajeron los 5 acompañantes de señalización mejor coexpresados para cada tipo de cáncer.
3. Estos pasos se repitieron para los 31 tipos de cáncer

#### **7.21. Determinación de acompañantes de señalización TCGA-DepMap**

1. Derivado del archivo obtenido en el apartado **Extracción de covulnerabilidades en líneas susceptibles al K.O. de efexina 3 asociadas a la reorganización del citoesqueleto y coexpresadas en el TCGA** se extrajeron los 10 acompañantes de

señalización mejor coexpresados en cada tipo de cáncer con líneas celulares sensibles al Knock out de efexina 3.

2. Se repitió el proceso para los tipos de cáncer con líneas celulares vulnerables a la pérdida de función de efexina 3

#### **7.22. Descarga de datos de expresión de acompañantes de señalización de los criterios PanCan, Particular y TCGA-DepMap**

1. En la plataforma cBioportal se seleccionó un tipo de cáncer de interés para descargar los datos de expresión
2. Se seleccionó la opción “*mRNA Expression*”, seleccionando la opción “*mRNA expression z-score relative to diploid samples*”. En el apartado “*Enter Genes*” se ingresaron los acompañantes de señalización de uno de los tres criterios (PanCancer, Individual o TCGA-Individual) junto con Efexina 3 (ARHGGEF5) y se selecciona “*Submit Query*”.
3. En el apartado “*Download*” se seleccionó la opción “*Tab Delimited Format*” para el repositorio “*mRNA expression RSEM (Batch Normalized from Illumina HiSeq RNAseqV2)*”.
4. Estos pasos se repitieron para los 31 tipos de cáncer restantes empleando los acompañantes de señalización “PanCancer”, “Individual” y “TCGA-DepMap”.
5. Los archivos descargados en formato .txt se abrieron y transformaron a formato .xlsx empleando Microsoft Excel.

#### **7.23. Descarga de datos de sobrevivencia de pacientes del TCGA**

1. En la página principal de cBioportal en la sección “*Search*” se introdujo un tipo de cáncer deseado perteneciente al proyecto TCGA. Posteriormente se seleccionó “*Explore Selected Studies*”.
2. En la nueva página direccionada, se seleccionó la gráfica con la descripción “*KM Plot: Overall survival (Months)*”, se seleccionó el ícono con tres puntos para emplear la opción “*Download Data*” y descargar el archivo correspondiente en formato .txt para ser abierto y transformado en archivo .xlsx empleando Microsoft Excel.
3. Estos pasos se repitieron para los 32 tipos de cáncer del TCGA.

#### 7.24. Preparación de datos de sobrevivencia

1. El archivo generado en el apartado **Descarga Datos de Sobrevivencia de Pacientes del TCGA** está compuesto por las columnas “*Patient ID*”, “*OS\_Status*” y “*OS\_Months*”. La columna “*Patient\_ID*” identifica cada paciente con un código alfanumérico de 12 caracteres empleado en otros repositorios como datos de expresión.
2. De la columna “*OS\_STATUS*” y “*OS\_Months*” se eliminaron los pacientes con la descripción “N/A” en cualquiera de las dos columnas.
3. Los datos de la columna “*OS\_STATUS*” están compuestos por un código binario que indica un evento (defunción) en los pacientes, “1:DECEASED” y “0:LIVING”. Se extrajo solo el número con la función “=si()”, con la cual se realizó una prueba lógica, en la que si la fila evaluada es igual a “1:DECEASED”, el valor devuelto es 1, en caso contrario, es 0.
4. Estos pasos se repitieron para los 31 tipos de cáncer restantes

#### 7.25. Preparación datos de expresión

1. Los archivos obtenidos en el apartado **Descarga Datos de expresión de Acompañantes de señalización de los criterios PanCan, Individual y TCGA-Individual** están compuestos por las columnas “*Study ID*”, “*Sample ID*” seguida de los acompañantes de señalización y efexina 3
2. En estos archivos, la columna “*Sample ID*” se compone por los 12 caracteres alfanuméricos compartidos por “*Patient\_ID*” de los archivos de sobrevivencia seguido de la numeración “-01”.
3. Para eliminar la numeración “-01” se empleó la función “=extrae()” en la cual se indicó la extracción de los primeros 12 caracteres de las etiquetas “*Sample ID*” para poder armonizar los datos de expresión y sobrevivencia

#### 7.26. Armonización de datos

1. De las tablas que contienen información de sobrevivencia de cada paciente, se extrajeron las columnas “*Patient ID*”, “*OS\_Status*” y “*OS\_Months*”. En las columnas siguientes se agregaron los acompañantes de señalización ya sea de los criterios “PanCancer”, “Individual” y “TCGA-Individual”.

2. En otra sección se pegaron los datos de expresión de los acompañantes de señalización del criterio “PanCancer”, “Individual” o “TCGA-Individual” empleado.
3. Haciendo uso de la función “=buscarx” se extrajeron los datos de expresión de cada uno de los genes que conforman el criterio empleado en las columnas generadas en el paso 1. Empleando las etiquetas “*Patient ID*” y “*Sample ID*” fue posible armonizar los datos.

#### **7.27. Preparación de archivos Km Plotter y evaluación de la correlación estadística con la sobrevivencia de los acompañantes de señalización**

1. Una vez efectuada la armonización de los datos, la tabla generada se guardó en dos formatos. El primero con extensión .xlsx y un segundo con extensión .txt.
2. Empleando la plataforma Kmplotter (<https://kmplot.com/analysis/>) se seleccionó la opción “Custom” que direccionó a una nueva página. En la sección “*1. Upload Data*” se seleccionó el archivo armonizado a evaluar.
3. Con la selección “*Use Multiple Variables*”, se empleó la opción “*Use List of Genes*” y en la sección “*Paste List of Genes*” se ingresaron los genes que conforman el archivo de interés a evaluar.
4. En la sección “*Survival Time*” se seleccionó la opción “*OS Months*” y “*Months*”. En la sección “*Survival Event*” se seleccionó “*OS\_Status*”. En la opción “*Split patients by*” se empleó “*Median*”.
5. En la sección final se seleccionaron las opciones “*Export Plot data as text*” y “*Draw Kaplan Meier Plot*”
6. Se guardaron en PDF las curvas de sobrevivencia individuales de los acompañantes de señalización de efexina 3
7. Se seleccionaron sólo los acompañantes de señalización que correlacionaron con un pronóstico poco favorable para conformar las firmas transcripcionales “PanCancer”, “Individual” y “TCGA-Individual”.
8. Estos pasos se repitieron para los 32 tipos de cáncer con los acompañantes de señalización que conforman los criterios “PanCancer”, “Individual” y “TCGA-Individual”.

### 7.28. Preparación Km Plotter Evaluación del riesgo acumulado

1. Una vez identificados los Acompañantes de señalización que individualmente correlacionan con un pronóstico menos favorable en pacientes con cáncer e integraron una firma transcripcional, empleando los pasos 1 y 2 del apartado anterior.
2. Del paso 3 del apartado anterior se modificó la opción “*Use List of Genes*” a “*Use Mean expression of selected genes*”, en el apartado “*Paste list of genes*” se ingresaron los acompañantes de señalización que correlacionaron con un pronóstico menos favorable y efexina 3. Posteriormente se seleccionó “*Start Analysis Using Selected Probes*”.
3. Se realizó la misma selección del apartado 4 para “*Survival Time*”, “*Survival Event*” y “*Split patients by*”.
4. Se seleccionaron las opciones “*Explot Plot data as text*” y “*Draw Kaplan Meier Plot*”.
5. El proceso anterior se repitió para los tipos de cáncer con firmas transcripcionales empleando uno de los tres criterios “PanCancer”, “Invididual” y “TCGA-Individual”.

### 7.29. Obtención de mapas de color binario

1. La conversión de los archivos a un código binario se realizó empleando la función “=si()”. En la que se aplicó una prueba lógica como, por ejemplo, una correlación estadística con un pronóstico poco favorable se cumple, el valor asignado es 1, de lo contrario, -1.
2. Empleando clustergrammer hasta el paso 3 de la sección **Generación de Mapas de Color empleando Clustergrammer**, se generaron los siguientes cambios:

```
Import numpy as np
    Import pandas as pd
    Pip install clustergrammer 2
    From clustergrammer import net
    Net.load_file(“Nombre del archivo.txt”)
    Df=net.export_df()
    Df.shape
    Net.load_df(df)
```

```
Net.set_matrix_colors(pos='black', neg='white')
```

```
Net.widget()
```

3. Para obtener los mapas de calor en el orden inicial se seleccionó la opción “INI” para los apartados “COL” y “ROW”.

## 8. Resultados

### 8.1. Expresión de las Efexinas en diversos tipos de cáncer

La plataforma cBioportal sirvió de fuente para explorar y obtener información de 10967 pacientes distribuidos en 32 tipos de cáncer que conforman el estudio del TCGA (<https://www.cbioportal.org/>). La tabla 1 muestra los datos recolectados de este estudio. La Figura 8 muestra la expresión de las efexinas en 32 tipos de cáncer y las alteraciones en el número de copias de sus genes. El porcentaje de pacientes con alteraciones en el número de copias de los genes de las efexinas se presenta en gráficos de barras, de arriba hacia abajo, se muestran en orden, los datos para efexina 1, 2, 3, 4 y 5, en cada tipo de cáncer. El estado “Diploide”, corresponde a la situación normal en la que no hay ganancia o pérdida en el número de copias de los genes, se muestra en barras grises claro. En la mayoría de los casos, el estado diploide corresponde al mayor porcentaje de pacientes. La pérdida de copias se identifica por “Deleción Profunda”, mostrada en un color violeta oscuro y “Deleción Superficial”, mostrada en violeta claro y se muestran adyacentes al estado diploide. El aumento en el número de copias de los genes se muestra como “Amplificación” en color verde oscuro y “Ganancia”, en color verde claro. La expresión de las efexinas en los 32 tipos de cáncer se muestra por paciente en los gráficos de dispersión adyacentes a los gráficos de barras. El orden de arriba hacia abajo es el mismo con un código de colores identificable: efexina 1 (Negro), efexina 2 (Café), efexina 3 (Rojo), efexina 4 (Azul) y efexina 5 (Verde). Estas observaciones permitieron identificar que las efexinas se expresan en niveles comparables en los 32 tipos de cáncer estudiados en el TCGA. Aunado a esto, se presentan diversos patrones de pérdidas o ganancias en el número de copias de los genes que las codifican. Aparentemente no parece existir un efecto directo entre los cambios en el número de copias y los niveles de expresión. En la mayoría de los casos, la pérdida en el número de copias no involucra ambas copias del gen (Deleción superficial), en los casos donde hay ganancia en las copias no parecer haber una mayor expresión a nivel de transcrito. Tal es el caso de GBM donde efexina 3 tiene ganancias a nivel de copias del gen, pero el nivel de expresión del transcrito está en un nivel inferior al resto de las efexinas. En ACC, aunque efexina 5 y 2 presentan mayoritariamente deleciones superficiales, la expresión de sus transcritos es mayor al resto de las efexinas.

Tabla 1 Tipos de cáncer que conforman el estudio del TCGA, abreviaciones, número de pacientes estudiados y transcritos con un valor de correlación con las efexinas

Tipo de Cáncer	Abreviatura	Pacientes	Transcritos con un valor de correlación con las efexinas (positivo o negativo)
Adenocarcinoma Pancreático	PAAD	177	19839
Adenocarcinoma Pulmonar	LUAD	510	19986
Adenocarcinoma de próstata	PRAD	493	19998
Adenocarcinoma de estómago	STAD	412	18889
Adenocarcinoma de Colon	COAD	592	19878
Adenocarcinoma Esofágico	ESCA	181	18889
Carcinosarcoma Uterino	UCS	57	19745
Carcinoma Adrenocortical	ACC	78	19575
Carcinoma testicular de célula germinal	TGCT	149	19958
Carcinoma de Tiroides	THCA	498	19954
Carcinoma de Vejiga urotelial	BLCA	407	20038
Carcinoma de célula escamosa de pulmón	LUSC	484	20040
Carcinoma de célula clara de riñón	KIRC	510	20030
Carcinoma de célula cromófoba de riñón	KC	65	19577
Carcinoma de célula papilar de riñón	KRPC	283	19997
Colangiocarcinoma	CHOL	36	19446
Carcinoma cervical de célula escamosa	CESC	294	19917
Carcinoma Ovárico	OV	300	18879
Carcinoma de cuerpo endometrial uterino	UCEC	527	19941
Carcinoma de célula escamosa de cabeza y cuello	HNSC	515	20057
Carcinoma de Mama	BRCA	1082	20043
Glioma de Bajo Grado	LGG	514	20020
Glioblastoma Multiforme	GBM	160	19775
Hepatocarcinoma Celular	LICH	366	19943
Linfoma difuso de célula B	DLBC	48	19887
Leucemia mieloide aguda	LAML	173	16615
Melanoma Cutáneo de Piel	SKCM	443	20003
Melanoma Uveal	UVM	80	19340
Mesotelioma	MESO	87	19766
Paraganglioma y Feocromocitoma	PCPG	178	19812
Sarcoma	SRC	253	20017
Timoma	THYM	119	19794



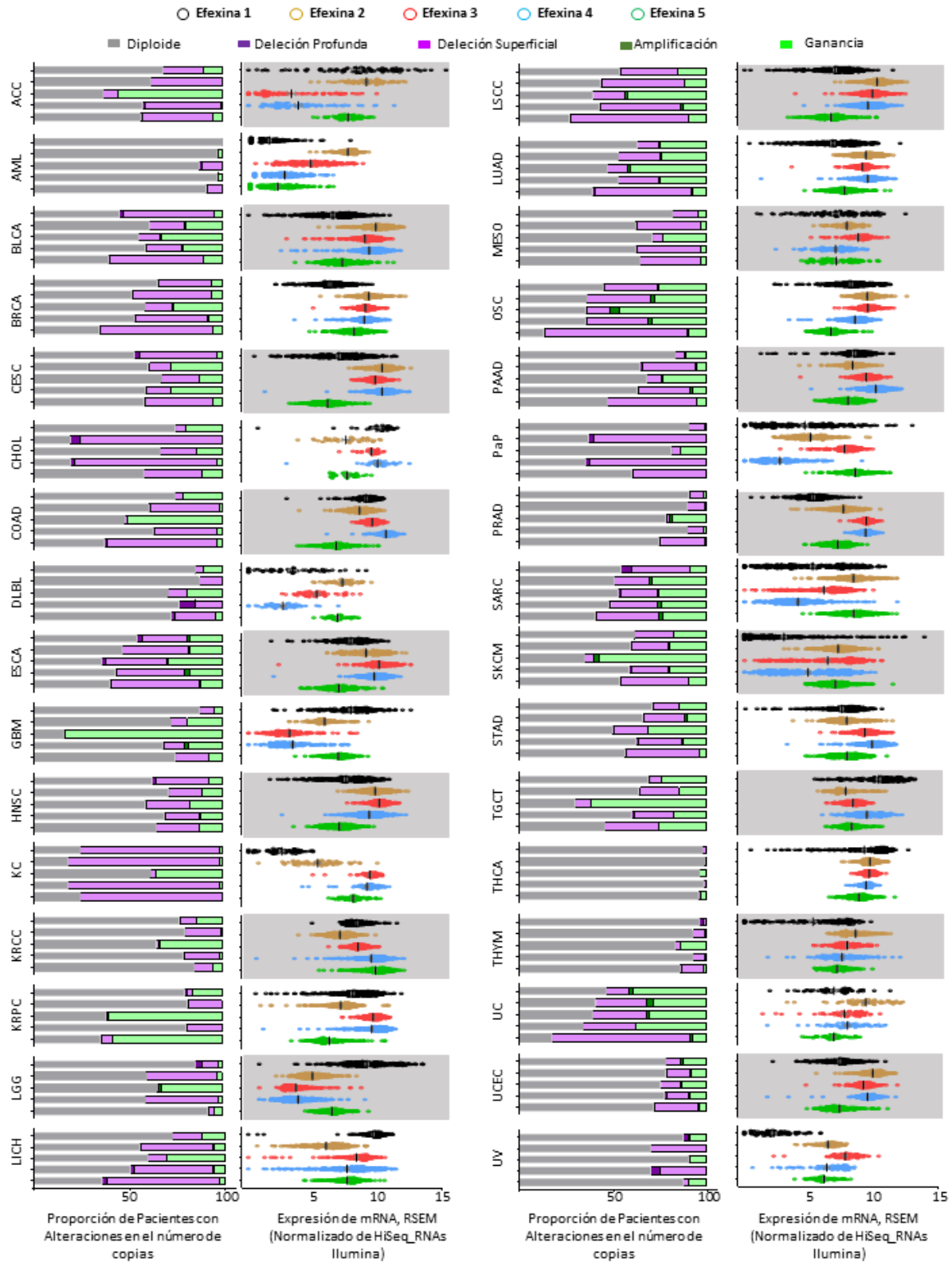


Figura 8 Las efexinas se expresan en diversos tipos de cáncer. Algunos pacientes tienen alteración en el número de copias de los genes que las codifican. Se muestra el grado de expresión de cada efexina en los gráficos de dispersión. Cada círculo representa a un paciente. En la sección de las gráficas de barras se indica el porcentaje de pacientes con alteraciones en el número de copias de cada efexina en particular. En la porción superior se muestra el código de colores que representa a cada efexina en los gráficos de dispersión.

## **8.2. Las efexinas presentan diversos patrones de correlación entre ellas y con marcadores de poblaciones celulares**

Al observar que las efexinas se expresan en los 32 tipos de cáncer estudiados en el TCGA, es posible que tengan funciones redundantes, exclusivas o complementarias, por lo que investigamos el grado de coexpresión entre ellas. Del análisis de los transcriptomas, obtuvimos el valor de correlación de Spearman entre las distintas efexinas. En la figura 9, inciso A, se presentan 5 mapas de calor que muestran el valor de correlación de cada efexina (indicada en la porción superior) respecto a las otras (indicadas en las respectivas columnas) en los 32 tipos de cáncer (Filas). Las correlaciones positivas se muestran en rojo y las negativas el azul, la intensidad del color muestra una correlación elevada, ya sea positiva o negativa. Por tanto, las efexinas 1, 2, 3 y 4 muestran un patrón de correlación positiva en la mayoría de los tipos de cáncer, mientras que efexina 5 mayoritariamente presenta un patrón de correlación negativa con el resto de las efexinas.

La figura 9 inciso B muestra un árbol filogenético obtenido a partir de un alineamiento múltiple de secuencias. Aquellas con mayor grado de homología quedan más cercanas. En caso de existir redundancia en sus funciones, es de esperarse que las efexinas más cercanas filogenéticamente sean las que pudieran ser funcionalmente equivalentes. En el árbol filogenético se aprecia que las efexinas 1, 2 y 3 son los miembros más parecidos de la familia, mientras que efexinas 4 y 5 resultaron las menos conservadas. En las representaciones estructurales de las efexinas, mostradas a la derecha del árbol filogenético, se observa que la mayor parte de sus estructuras son similares, caracterizadas por una hélice autoinhibitoria (IH), la región catalítica DH-PH y un dominio SH3 que reconoce secuencias de aminoácidos ricos en prolinas. La región amino terminal de longitud variable está poco conservada y es claramente más extensa en la efexina 3. En la región carboxilo difiere la efexina 5 que carece del dominio SH3.

Debido a que encontramos que las cinco efexinas se expresan en los 32 tipos de cáncer y presentan diversos patrones de correlación entre ellas, investigamos en qué poblaciones celulares del estroma tumoral prevalece su expresión. Las distintas efexinas correlacionaron con marcadores de diversas poblaciones celulares, tal como se muestra en la Figura 3, inciso C. Es apreciable que las efexinas 1, 2, 3 y 4 presentaron un patrón de correlación positiva

con el marcador de células epiteliales EPCAM. Por otro lado, la Efexina 5 correlacionó positivamente con marcadores de células endoteliales, linfoides, mieloides y fibroblastos.

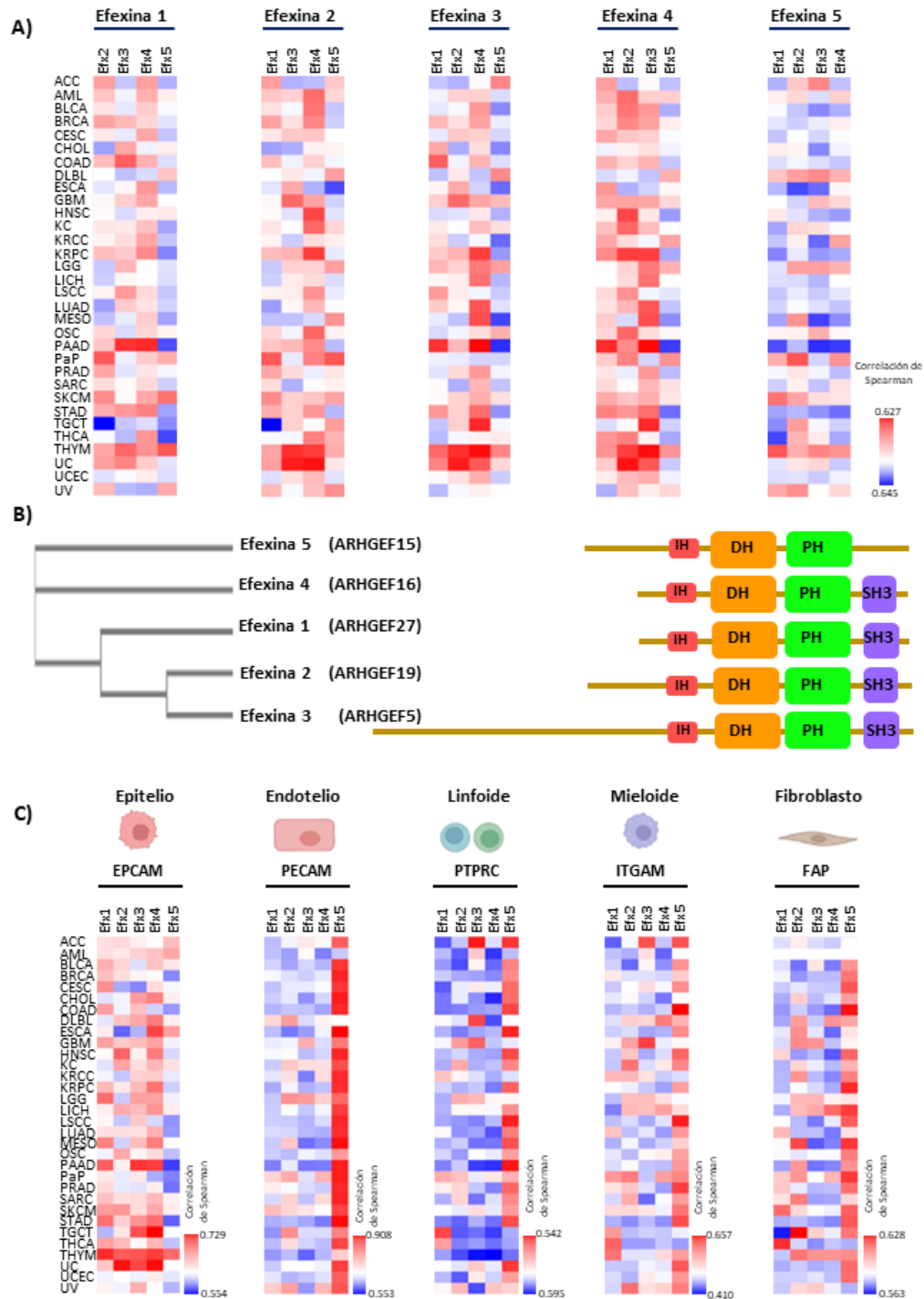


Figura 9 Las efexinas presentan patrones diferenciales de coexpresión entre ellas y con marcadores de poblaciones celulares. A) Correlación entre las efexinas en los 32 tipos de cáncer que conforman el proyecto del TCGA. B) Árbol filogenético basado en las homología entre las efexinas y representaciones de sus estructuras. C) Correlación de cada efexina con marcadores de diferentes poblaciones celulares del microambiente tumoral.

### 8.3. Líneas celulares cancerosas sensibles al knock-out de efexina 3

La plataforma DepMap alberga información de la sensibilidad de líneas celulares de cáncer a ensayos masivos de *Knock-Out*, *Knock-Down* e inhibición farmacológica (<https://depmap.org/portal/>). Ya que observamos que las efexinas se expresan en diversos tipos de cáncer y que correlacionaron positivamente con marcadores de poblaciones celulares del microambiente tumoral, surge la posibilidad de que participen en cascadas de señalización oncogénicas necesarias para la viabilidad celular. Las mutaciones oncogénicas suelen generar dependencias en las células cancerosas que requieren de determinadas vías de señalización para mantener su viabilidad. La pérdida de la viabilidad celular al intervenir experimentalmente para bloquear a proteínas efectoras de las vías oncogénicas es aprovechable para identificar blancos farmacológicos y desarrollar nuevas terapias. En la Figura 10, inciso A se muestra que el *Knock-Out* de los genes que codifican para las efexinas 3 y 4 resulta en una pérdida de la viabilidad en varias líneas celulares, con un estadístico T menor o igual a -0.5.

Ya que el *Knock-Out* de efexina 3 resultó en la pérdida de viabilidad de diversos tipos de células cancerosas, identificamos el tejido de origen al que pertenecen, esto, con la intención de posteriormente integrar estos datos con los análisis de los transcriptomas de pacientes de TCGA. En la Figura 10, inciso B, se muestra que las líneas celulares sensibles a la pérdida de efexina 3 corresponden a líneas cancerosas que provienen de 27 tejidos diferentes. Aunado a esto, no todas las líneas celulares de un tejido en particular resultan en la pérdida de la viabilidad celular, lo que indica que la efexina 3 es esencial dependiendo del contexto celular y molecular.

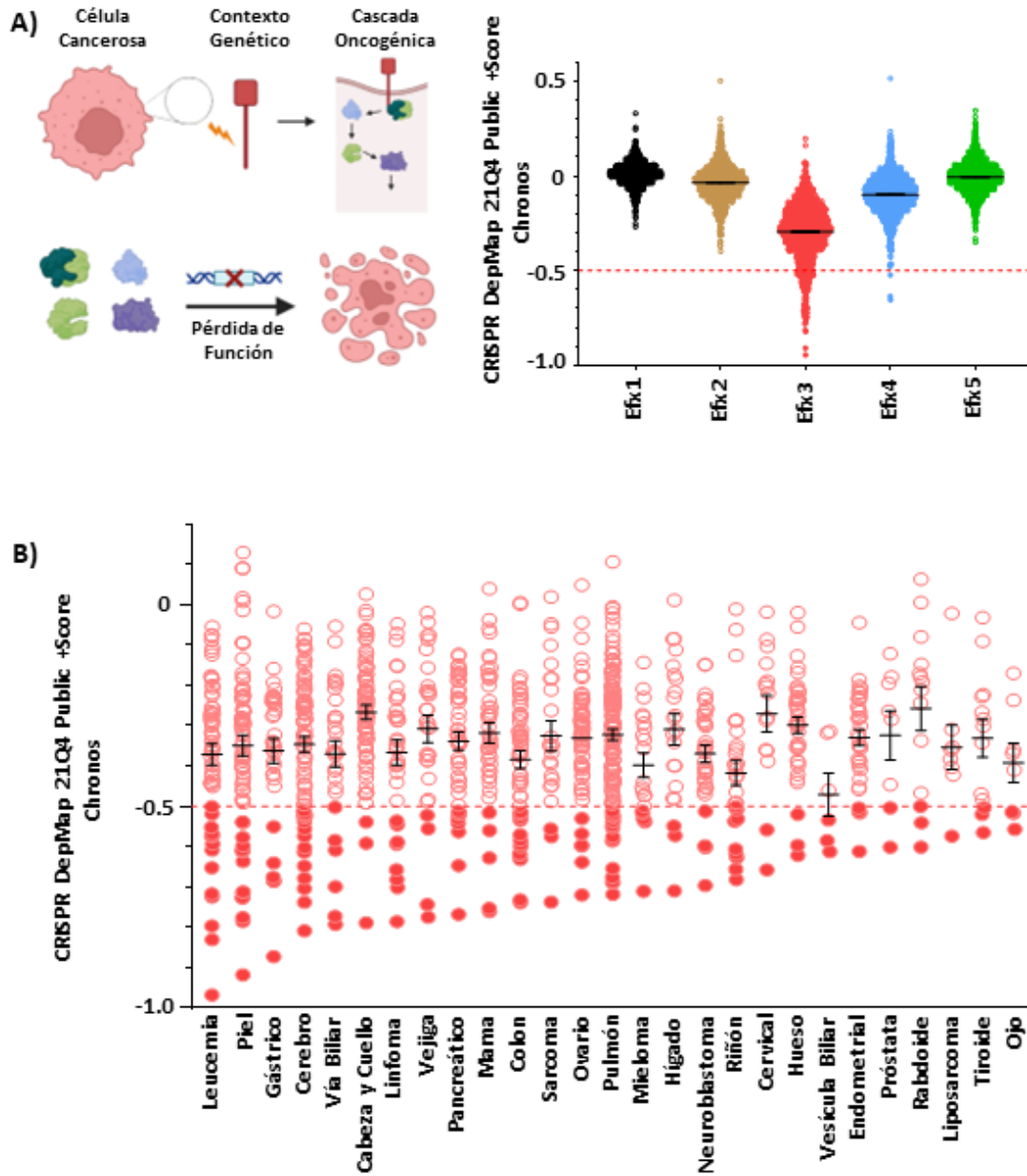


Figura 10 Sensibilidad de líneas celulares de cáncer a la pérdida de función de los genes que codifican a las efexinas. A) Dependencia de líneas celulares de cáncer a cascadas de señalización empleadas por oncogenes o supresores tumorales. El gráfico de dispersión muestra el grado de sensibilidad que genera la pérdida de función del gen de cada efexina, esto es, con un estadístico T menor a -0.5. B) Tejidos de origen de las líneas celulares que son sensibles a la pérdida de función del gen para efexina 3. Cada punto representa a una línea celular diferente. Aquellas con valores de estadístico T menores o iguales a -0.5 se consideraron dependientes de efexina 3.

#### **8.4. Acompañantes de señalización de efexina 3 en diversos tipos de cáncer**

Al identificar que la efexina 3 se encuentra expresada en 32 tipos de cáncer y que la pérdida de función del gen que la codifica generó vulnerabilidad en diversas líneas cancerosas, consideramos que esta efexina podría ser un componente de señalización de cascadas oncogénicas. Por ello nos enfocamos en la identificación de los acompañantes de señalización de efexina 3 en el transcriptoma de pacientes del TCGA.

En la Figura 11 inciso A, se muestra que para cada tipo de cáncer obtuvimos alrededor de 19664 valores de correlación de Spearman de transcritos según su coexpresión con Efexina 3. Para extraer los transcritos que codifican para proteínas de señalización celular, con base en criterios SMART, empleamos nuestra base de datos SPIM-YY, obteniendo en promedio 4030 transcritos por cada tipo de cáncer. La selección de los transcritos con mayor grado de coexpresión, mismos que tendrían mayores posibilidades de formar junto con efexina 3 cascadas de señalización oncogénicas se realizó tomando el 10% de los transcritos de mayor correlación. Es decir, de 4030 seleccionamos 403 transcritos. Para algunos tipos de cáncer el 10% contenía transcritos con valores de correlación negativos o cercanos a 0. En estos casos, sólo seleccionamos los transcritos con un valor de correlación de Spearman igual o mayor a 0.2. De esta forma identificamos alrededor de 330 “Acompañantes de Señalización” (ACS-efx3) de la efexina 3 en cada tipo de cáncer.

En la Figura 11, inciso B, mostramos los 32 tipos de cáncer del TCGA ordenados de acuerdo con el número de ACS-efx3 identificados. El gráfico de dispersión presenta los valores de correlación de Spearman de los ACS en cada tipo de cáncer.

En total identificamos 3060 ACS para efexina 3 los cuales se presentan en el mapa de calor de la Figura 11, inciso C. En las columnas se encuentran los 32 tipos de cáncer en los que se expresa efexina 3 y en las filas los ACS coexpresados. Los tipos de cáncer se encuentran acomodados de acuerdo con el acumulado de la correlación de Spearman positivo ( $\geq 0.2$ ) y los ACS de acuerdo con el número de tipos de cáncer en el que están coexpresados. En el mapa de calor es apreciable la presencia de zonas rojas continuas o semicontinuas que sugiere la existencia de ACS PanCancer o PanGlobales y regiones azules que indican que existen ACS exclusivos para uno o más tipos de cáncer.

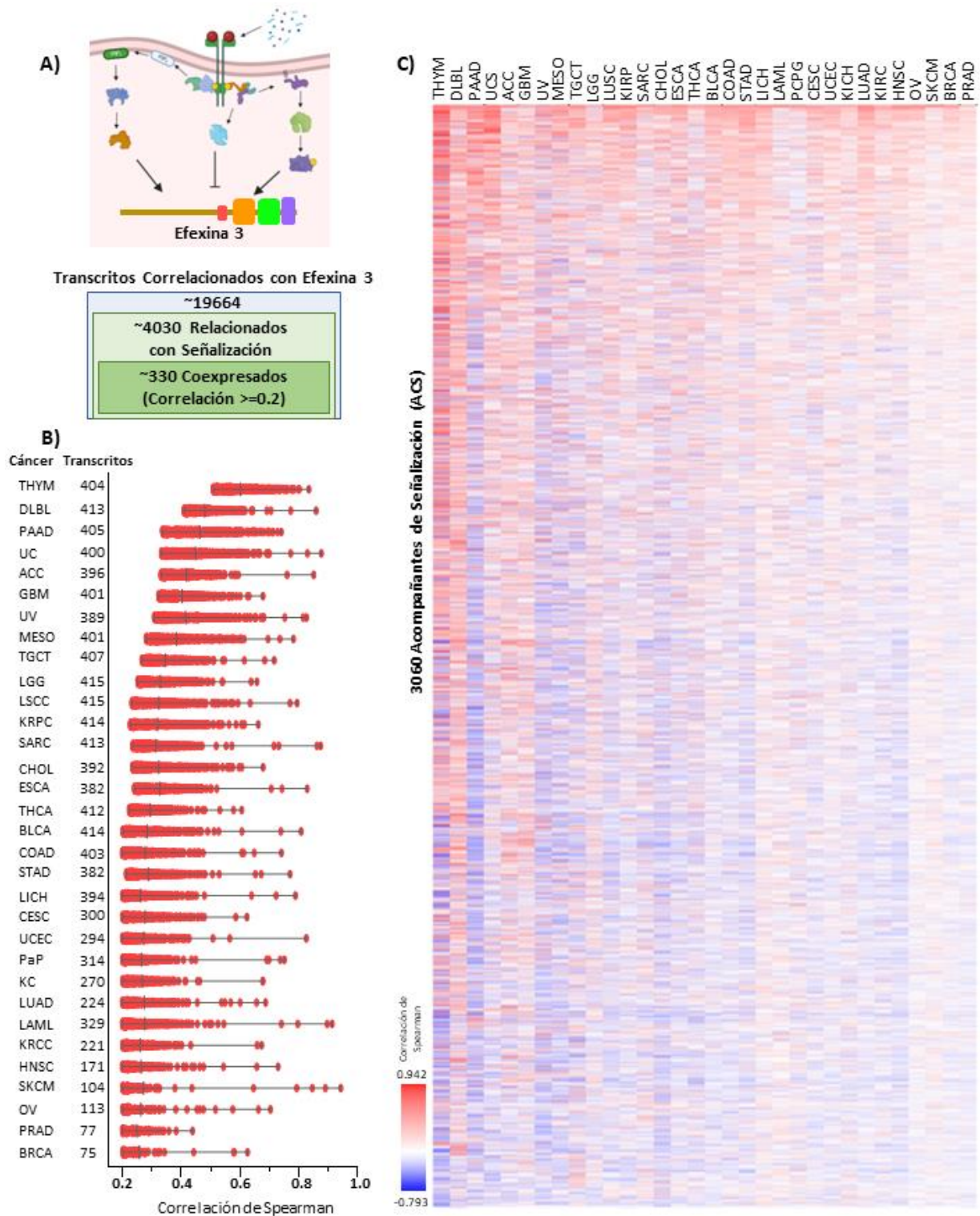


Figura 11 Repertorio de Acompañantes de Señalización (ACS) para Efectina 3. A) Potencial cascada de señalización oncogénica integrada por efectina 3 y selección de transcritos que codifican para sus posibles acompañantes de señalización. B) Repertorio de ACS y los valores de correlación de Spearman de cada acompañante en los 32 tipos de cáncer. C) Mapa de calor que ilustra la distribución de los ACS de efectina 3 en los 32 tipos de cáncer.

## 8.5. Extracción ACS asociados a la reorganización del citoesqueleto

Las proteínas involucradas en procesos de señalización integran respuestas celulares ante la presencia de estímulos que culminan en procesos celulares como proliferación, sobrevivencia, crecimiento, muerte o migración, entre otros. Debido a que la efexina 3 es una proteína que regula la actividad de GTPasas de la familia de Rho, quienes a su vez activan a proteínas efectoras que controlan la remodelación del citoesqueleto, optamos por identificar a los ACS que están asociados a migración celular y reorganización del citoesqueleto. Tal funcionalidad la etiquetamos en nuestra base de datos usando criterios GO (*Gene Ontology*), plataforma que pretende establecer la funcionalidad de las proteínas codificadas en el genoma humano con base en tres criterios: Localización Celular, Proceso Biológico y Función Molecular, con base en hallazgos reportados en la literatura científica.

Empleando la plataforma Panther que asigna las etiquetas GO según el criterio seleccionado, seleccionamos a los ACS que pertenecen a una etiqueta relacionada con migración celular. Con este enfoque extrajimos 1555 ACS-efx3 asociados a la migración celular. La tabla 2 muestra las Etiquetas GO, su descripción y el número de ACS etiquetados.

Tabla 2 Etiquetas GO y ACS identificados para la selección de acompañantes involucrados en migración celular

Descripción y Etiqueta GO	Acompañantes de señalización Etiquetados	Acumulado de Acompañantes de señalización etiquetados
Cell Motility GO:0048870	300	300
Regulation of Cell Motility GO:2000145	209	509
Cellular Component Organization or Biogenesis GO:0071840	862	1371
Movement of Cell or Subcellular Component GO:0006928	30	1401
Regulation of Actin Filament Based Process GO:0032970	13	1414
Regulation of Cytoskeleton Organization GO:0051493	10	1424
Positive Regulation Cell Component Biogenesis GO:0051130	39	1463
Regulation of Cellular Component Biogenesis GO:0044087	18	1481
Cell Adhesion GO:0007155	22	1503
Negative Regulation of Cellular Component Organization GO:0051129	16	1519
Regulation of Cell Adhesion GO:0030155	32	1551
Lamellipodium GO:0030027	4	1555



Del grupo de 1555 ACS-efx3 seleccionados de acuerdo con criterios GO referentes a migración celular, extrajimos aquellos que integran cascadas de señalización que culminan en la reorganización del citoesqueleto. El set de ACS fue reingresado a la plataforma Panther para extraer aquellos asociados a la formación de estructuras migratorias. La tabla 3 muestra la descripción de las etiquetas GO empleadas, su código y los ACS etiquetados para un grupo de procesos celulares. De esta forma seleccionamos 1100 ACS asociados a la reorganización del citoesqueleto. Mediante una inspección manual, eliminamos a algunos ACS que podrían estar directamente asociados a otros procesos celulares que no consideramos centrales en los procesos de migración celular y metástasis, tales como aquellos que de acuerdo con los criterios GO tienen relación con histonas deacetilasas. Esto nos llevó a quedarnos con 1076 ACS-efx3 asociados a la reorganización del citoesqueleto.

Tabla 3 Etiquetas GO y ACS identificados para procesos asociados a la reorganización del citoesqueleto

Descripción y Etiqueta GO	Acompañantes de señalización Etiquetados	Acumulado de Acompañantes de señalización etiquetados
Regulation of Stress Fiber Assembly GO:0051492 Regulation of Lamellipodium Assembly GO:0010591 Regulation of Filopodium Assembly GO:0051489 Regulation of Podosome Assembly GO:0071801	99	99
Stress Fiber Assembly GO:0043149 Lamellipodium Assembly GO:000032 Filopodium Assembly GO:0046847 Ruffle Organization GO:0031529 Focal Adhesion Assembly GO:0048041	46	145
Actin Filament Capping GO:0051693 Actin Filament Polymerization GO:0030041 Actin Filament Depolymerization GO:0030042	29	174
Actin Polymerization or Depolymerization GO: 0008064	36	210
Actin Filament Based Process GO:0030029	177	387
Regulation of Cell Adhesion GO:0030155 Cell Adhesion GO:0007155	233	620
Cell Junction Organization GO:0034330	62	682
Chemotaxis GO:0006935 Regulation of Cell Chemotaxis GO:0050920	87	769
Microtubule Polymerization or Depolymerization GO:0031109 Microtubule Bundle Formation GO:0001578 Microtubule-Based Movement GO:0007018 Microtubule Cytoskeleton Organization GO: 0000226	136	905
Cell Projection GO:0031344 Cell Projection Organization GO:0030030 Regulation of Locomotion GO:0040012	195	1100

Para validar la extracción de los ACS-efx3 asociados a la reorganización del citoesqueleto, empleamos como estrategia confirmatoria, la plataforma *Metascape*. En ésta introdujimos el set de 1076 ACS-efx3. En la Figura 12. inciso B, mostramos las etiquetas GO más enriquecidas de acuerdo con *Metascape*. Es apreciable que entre las etiquetas GO más enriquecidas se encuentran procesos de migración y reorganización del citoesqueleto como: Quimiotaxis, regulación de la migración celular, organización del citoesqueleto y regulación de procesos basados en Actina-F, lo que concuerda con nuestro análisis en *Panther* seguido de selección manual.

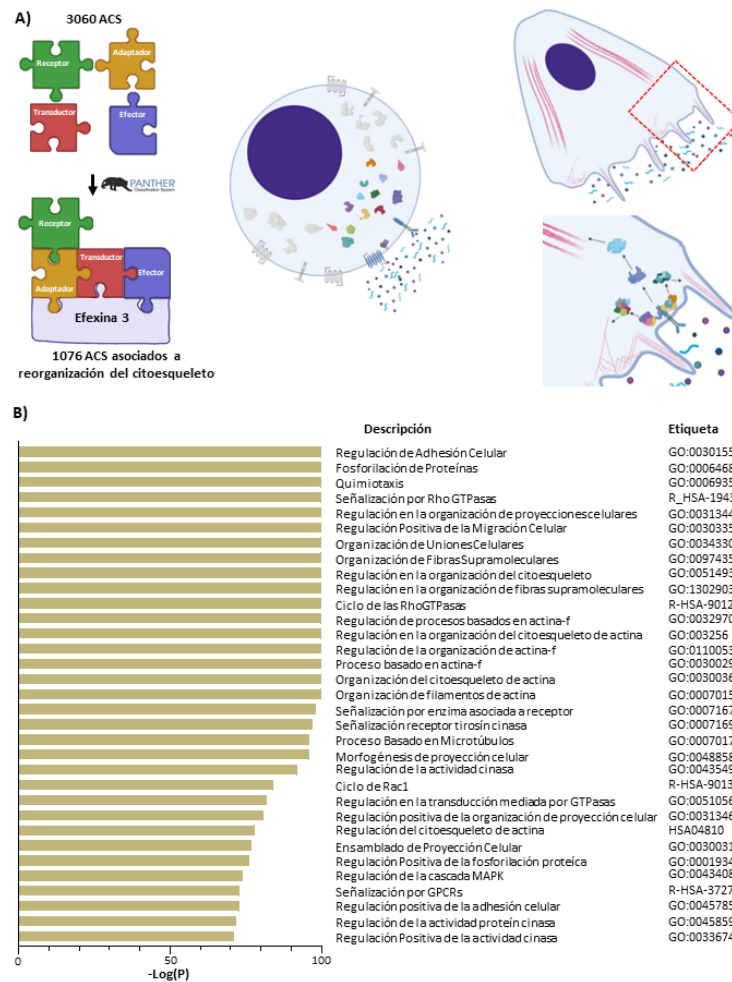


Figura 12 ACS de efxina 3 que participan en la reorganización del citoesqueleto. A) Selección de ACS asociados a la reorganización del citoesqueleto y que potencialmente están involucrados en migración celular. B) Etiquetas GO, KEGG y Reactome enriquecidas para los 1076 ACS extraídos manualmente asociados a la reorganización del citoesqueleto.

## **8.6. Organización de los ACS-efx3 con base en criterios estructurales**

Para integrar los 1076 ACS-efx3 asociados a la reorganización del citoesqueleto en potenciales cascadas de señalización, empleando la base de datos SPIM-YY, los criterios SMART y las descripciones de los dominios de señalización, usamos 5 categorías estructurales de acuerdo con la funcionalidad de las proteínas. Los 1076 ACS quedaron organizados de la siguiente forma: 213 Agonistas y Receptores, 208 con Actividad Catalítica, 310 adaptadores, 139 involucrados en ciclos de GTPasas y 206 interactúan con el citoesqueleto. La Figura 13, inciso A, muestra un mapa de calor de la distribución de los ACS organizados de acuerdo con los criterios estructurales indicados.

Las categorías estructurales empleadas fueron segmentadas de acuerdo con características estructurales o funcionales específicas. Aunado a esto, se presentaron mapas binarios. En estos, las correlaciones mayores o iguales a 0.2 se representan en negro, caso contrario, en blanco. Como se muestra en la Figura 13, inciso B, de los Agonistas y Receptores resaltan los RTKs debido a que presentan una línea negra semicontinua. Para las proteínas con actividad catalítica, destacan las cinasas con especificidad por residuos de serina/treonina que presentan una línea negra semicontinua. Para los que participan en el ciclo de GTPasas, destacan aquellas involucradas en el ciclo de las Rho GTPasas. De aquellos con interacción con el citoesqueleto, los de unión a actina resultan de interés particular.

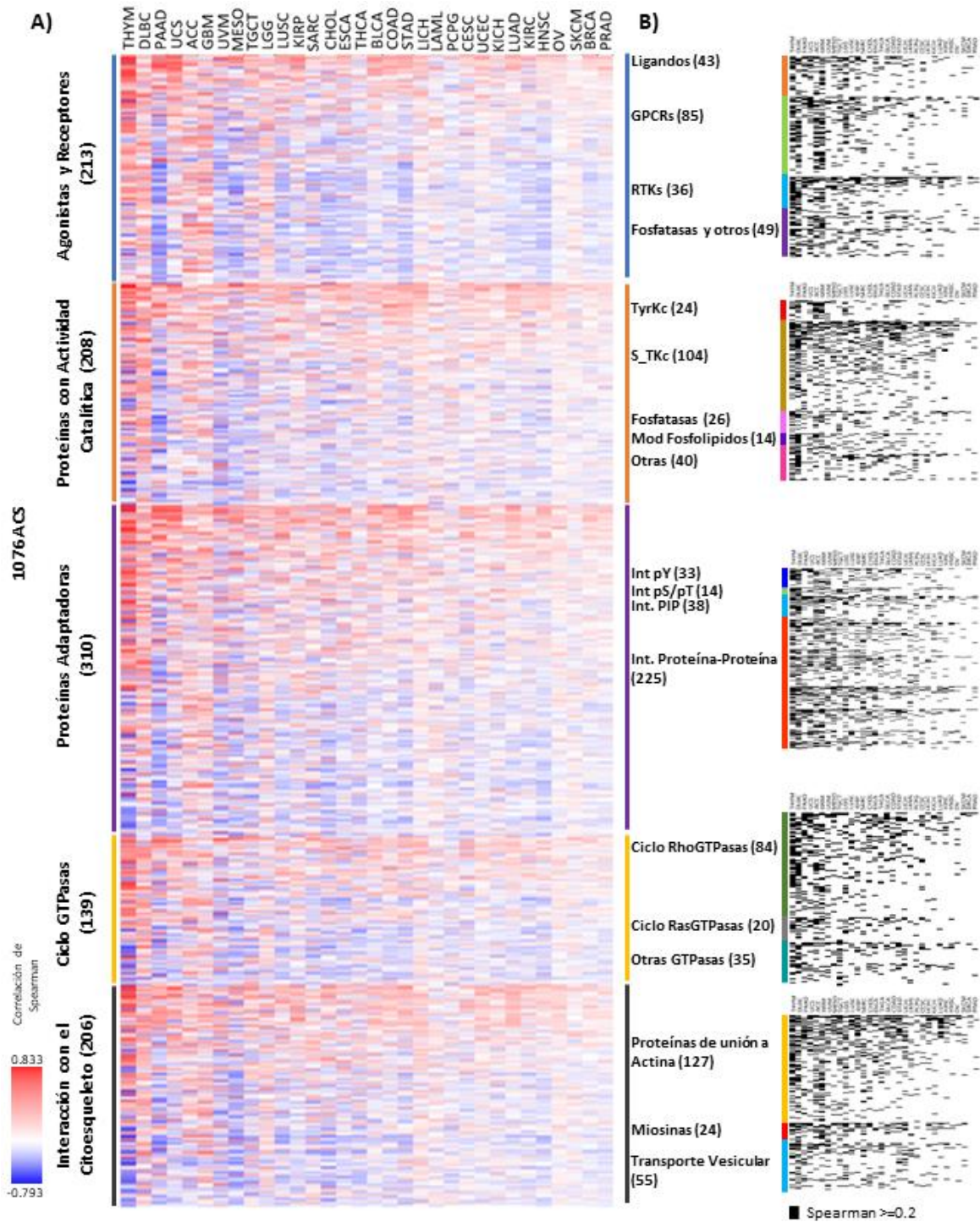


Figura 13 Organización de ACS en base a criterios estructurales y funcionales asociados a la reorganización del citoesqueleto. A) Mapa de calor en gradiente para los ACS de efexina 3 segmentados por criterios estructurales. B) Subgrupos de ACS presentados en mapas binarios.

### **8.7. Acompañantes de señalización PanCancer que definen firmas transcripcionales con posible valor pronóstico**

En la organización estructural de ACS-efx3, los mapas de calor en gradiente y binarios muestran líneas rojas y negras aparentemente continuas. Esto sugiere la existencia de ACS PanCancer o PanGlobales. Dada esta posibilidad, analizamos a los ACS de cada categoría estructural identificados en diversos tipos de cáncer. De los 1076 ACS asociados a la reorganización del citoesqueleto seleccionamos a los 5 ACS presentes en un mayor número de tipos de cáncer (Correlación de Spearman mayor o igual a 0.2). En la figura 14, inciso B, se muestra un mapa de calor con los 25 ACS PanCancer, mismos que de forma individual analizamos su expresión y correlación con la supervivencia de pacientes en los 32 tipos de cáncer (Fig. 14 C). Aquellos cuya mayor expresión correlacionó significativamente con una menor supervivencia de los pacientes pasaron a formar parte de una firma transcripcional. Evaluamos si las firmas transcripcionales, a las que les integramos los datos de expresión de efexina 3, mostraban un riesgo acumulado significativo en relación con la supervivencia de los pacientes.

En la figura 14, inciso D, mostramos en un mapa binario a los ACS que formaron parte de firmas transcripcionales que correlacionaron con un pronóstico menos favorable en 13 tipos de cáncer. Los ACS están ordenados según criterios estructurales. Todos los marcados con un cuadro negro forman parte de firmas transcripcionales para el tipo de cáncer que corresponde a cada columna. De particular interés surgen algunos ACS como MET y PTPRF que forman parte de 4 y 3 firmas transcripcionales, respectivamente.

En la figura 15, inciso A, mostramos las 13 curvas de supervivencia de las firmas transcripcionales que correlacionaron con un pronóstico menos favorable. En el inciso B de la misma figura mostramos a los ACS que conforman dichas firmas y el criterio estructural al que pertenecen.

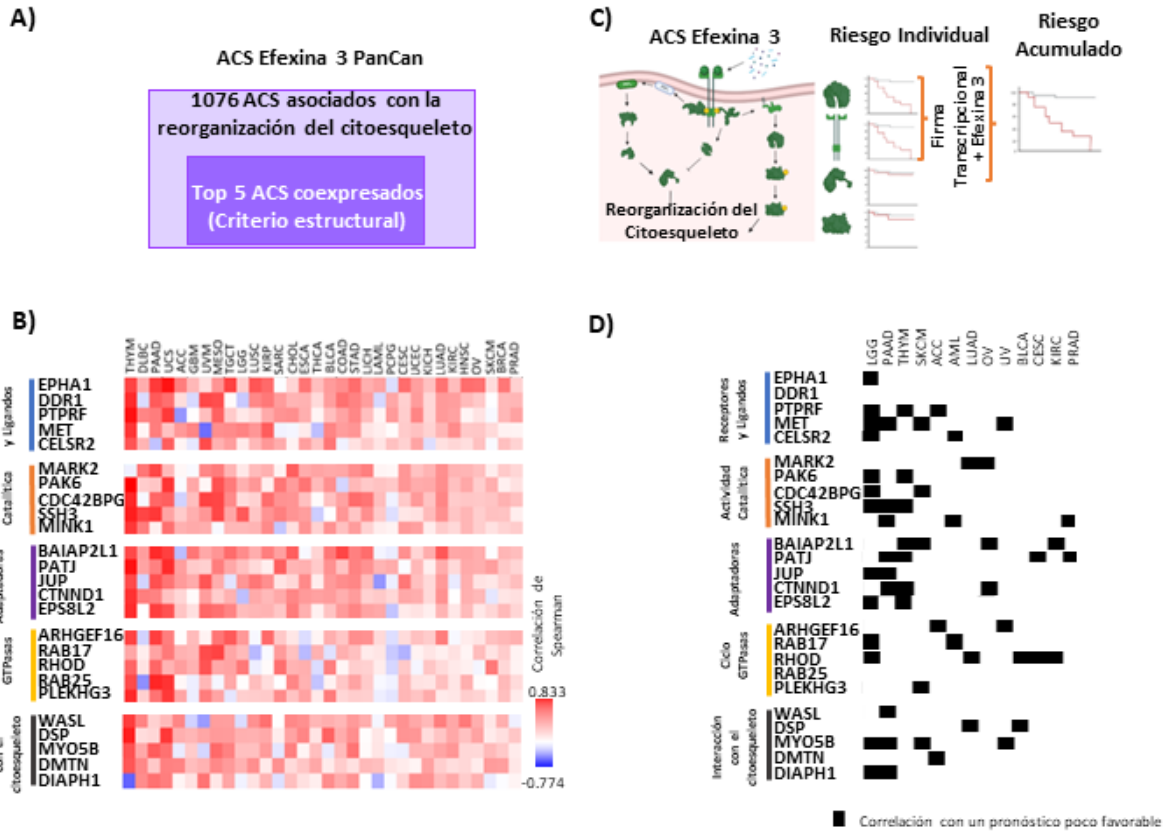


Figura 14 ACS PanCancer y obtención de firmas transcripcionales que correlacionan con un pronóstico menos favorable. A) Criterio de selección de los ACS PanCancer. B) Mapa de calor en gradiente de los ACS PanCancer con base en los criterios estructurales. C) Selección de ACS que conformaron las firmas transcripcionales. Se evaluó la correlación con la supervivencia de cada ACS en cada tipo de cáncer, aquellos que correlacionaron con un pronóstico menos favorable conformaron firmas transcripcionales. D) Mapa binario que muestra las firmas transcripcionales que correlacionaron con un pronóstico menos favorable para 13 tipos de cáncer.

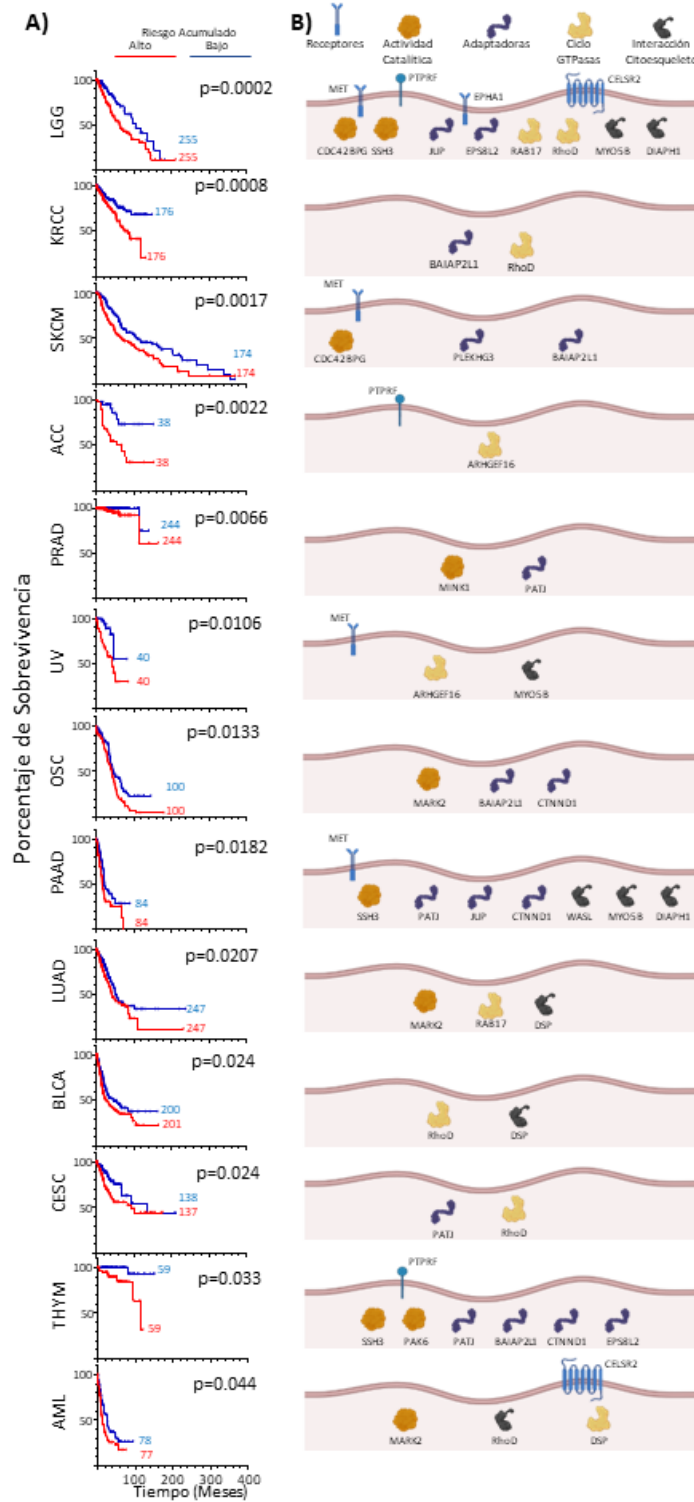


Figura 15 Curvas de Supervivencia de las firmas transcripcionales PanCancer. A) Las curvas de supervivencia de las firmas transcripcionales están ordenadas según su significado estadístico con la supervivencia. B) ACS que conforman firmas transcripcionales organizados según criterios estructurales y funcionales.

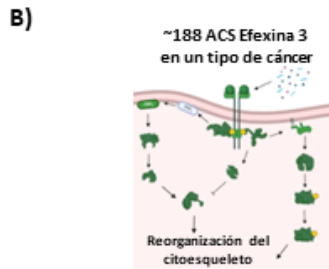
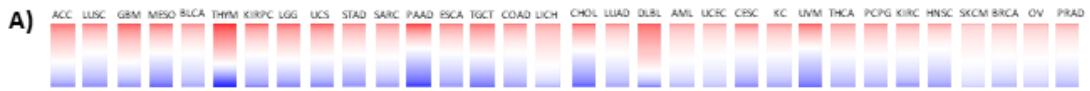
## **8.8. Acompañantes de señalización particulares que definen posibles firmas transcripcionales**

Así como en los mapas de calor de las figuras 11 y 13 se observaron líneas rojas o negras semicontinuas, también se apreciaron líneas rojas intensas o negras exclusivas para uno o dos tipos de cáncer. Inclusive tipos de cáncer con un repertorio ACS limitados como OV, SKCM, BRCA y PRAD resultaron con estas líneas. Derivado de estas observaciones, nos enfocamos en ACS particulares para cada tipo de cáncer. Como se muestra en la figura 16, inciso A, los mapas de calor particulares muestran repertorios e intensidades variables entre los 32 tipos de cáncer. En promedio, 188 ACS-efx3 asociados a la reorganización del citoesqueleto constituye el repertorio particular de cada tipo de cáncer. Siguiendo con el criterio empleado en el apartado anterior, se extrajeron los 5 ACS con mayor valor de correlación de cada categoría estructural para cada tipo de cáncer. La figura 16, inciso B, muestra el mapa de calor para estos ACS y su correlación en los demás tipos de cáncer. La porción superior del mapa de calor muestra acompañantes de señalización altamente correlacionados para tipos particulares de cáncer, apreciable por patrones en mosaicos. En la región inferior se muestran ACS que, aunque fueron identificados como ACS particulares, son compartidos por varios tipos de cáncer.

La figura 16, inciso C, muestra el repertorio de ACS particulares organizados según categorías estructurales. Tras evaluar la correlación con la supervivencia de los 25 ACS de cada tipo de cáncer, seleccionar aquellos que por sí solos correlacionaron con un pronóstico menos favorable y que, junto con efexina 3, representan un riesgo acumulado significativo, resultaron en firmas transcripcionales representadas en la figura 16, inciso D. Con esta estrategia, obtuvimos firmas transcripcionales que correlacionaron con un pronóstico menos favorable en 11 tipos de cáncer.

La figura 17, inciso A, muestra las curvas de supervivencia obtenidas con las firmas transcripcionales que resultaron significativas en 11 tipos de cáncer. Los ACS que conforman tales firmas transcripcionales se muestran ordenados por su categoría estructural en la figura 17, inciso B.





**C)**

5 ACS de cada criterio estructural de mayor correlación

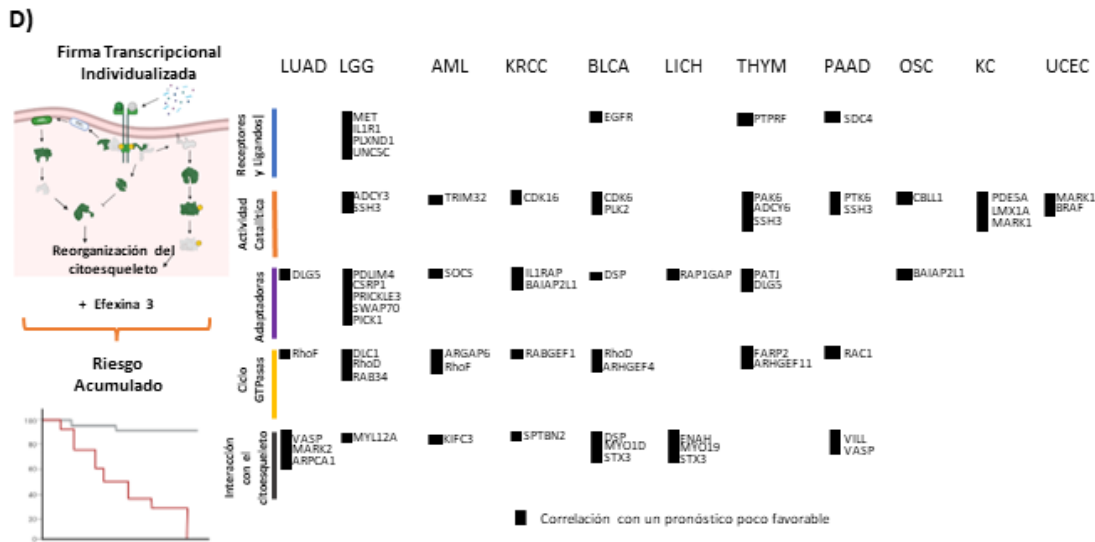
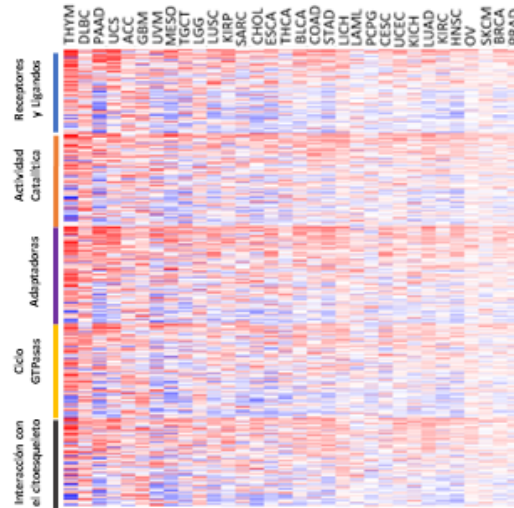
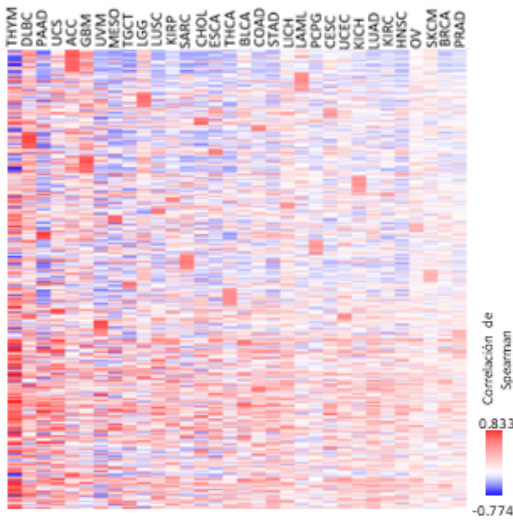


Figura 16 ACS particulares que conforman firmas transcripcionales. A) Repertorio de ACS para cada tipo de cáncer en mapas de calor en gradiente. B) Los ACS de efexina 3 particulares para cada tipo de cáncer. C) Organización de ACS particulares según criterios estructurales y funcionales. D) Firmas transcripcionales integradas por ACS particulares que correlacionaron con un pronóstico menos favorable en 11 tipos de cáncer.

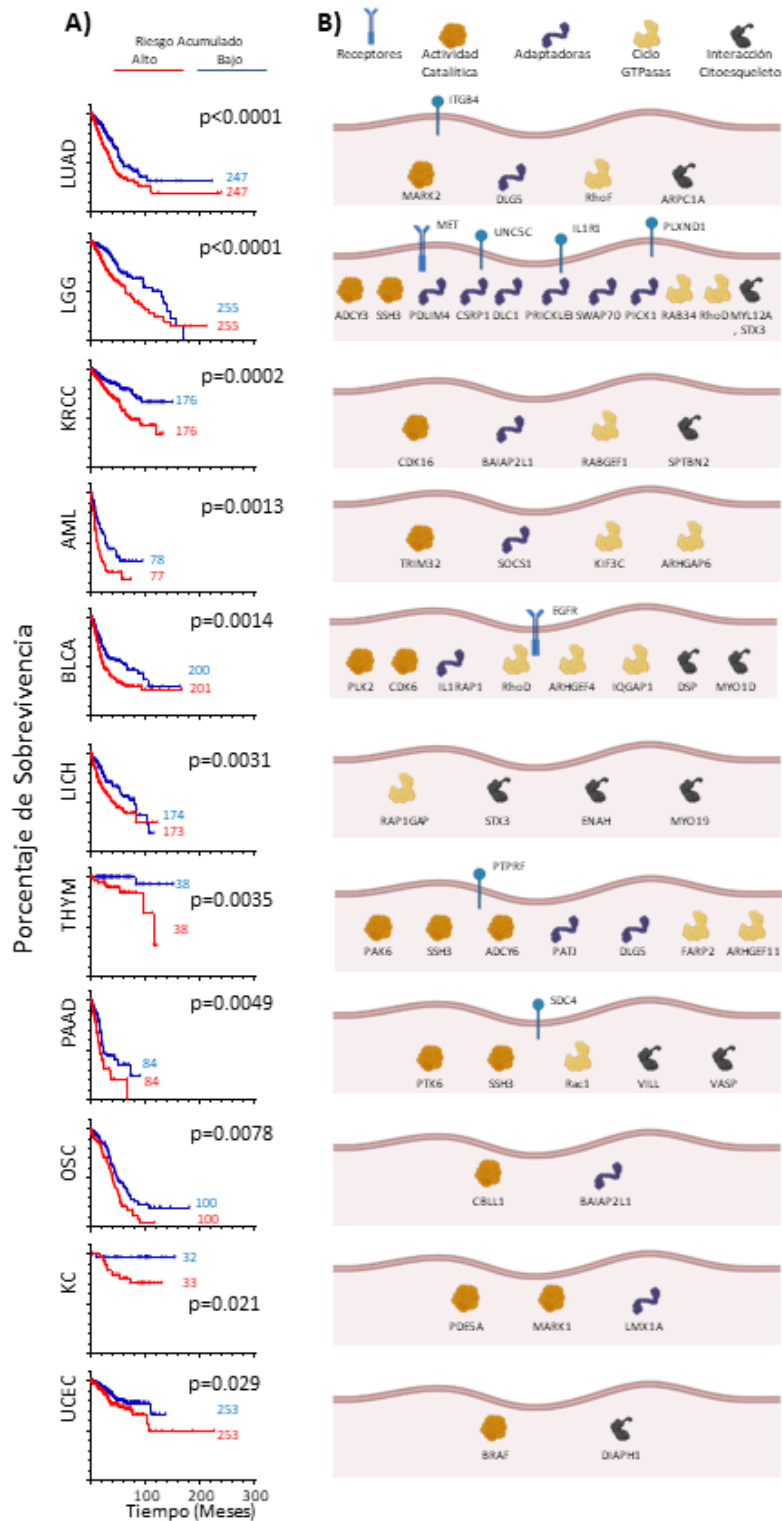


Figura 17 Curvas de supervivencia y ACS particulares que constituyen firmas transcripcionales significativas. A) Curvas de supervivencia obtenidas con firmas transcripcionales de ACS particulares. Están ordenadas según su significado estadístico con la supervivencia. B) ACS particulares que conforman firmas transcripcionales significativas, organizados de acuerdo a sus estructuras.

### **8.9. Acompañantes de señalización esenciales en líneas cancerosas vulnerables al K.O de efexina 3 que conforman firmas transcripcionales con posible valor pronóstico**

Con la finalidad de explorar las posibles cascadas oncogénicas en las que participa la efexina 3 y que son requeridas para la viabilidad de células cancerosas, investigamos a sus acompañantes de señalización esenciales. Derivado de las observaciones de la figura 3, donde la pérdida de función del gen que codifica para efexina 3, empleando CRISPR, genera sensibilidad en líneas celulares de cáncer de diversos orígenes, investigamos las sensibilidades globales de señalización de estas líneas celulares, definidas como Covulnerabilidades.

En la figura 18, inciso A, mostramos que 129 líneas celulares cancerosas fueron identificadas como sensibles al *Knock-Out* de efexina 3. En promedio, identificamos 1752 covulnerabilidades (CV) en estas líneas celulares, de las cuales 468 quedaron clasificadas como involucradas en señalización celular (CES). Con base en el tejido de origen de las líneas cancerosas, determinamos el tipo de cáncer al que corresponden, según datos del TCGA. Esto derivó en 20 tipos de cáncer del TCGA representados por líneas celulares sensibles. En la figura 18, inciso B, a la izquierda enlistamos estos 20 tipos de cáncer y el número de covulnerabilidades identificadas, de las cuales, el porcentaje que corresponde a CES se muestra en la gráfica. En el gráfico de la derecha (Fig. 18 B) se muestra el número de Covulnerabilidades de Señalización para los 20 tipos de cáncer y el número de CES asociadas a la reorganización del citoesqueleto y que están coexpresadas con efexina 3 en pacientes del TCGA.

En la Figura 18, inciso C, mostramos un mapa de calor que incluye 184 Covulnerabilidades de Señalización Asociadas a la reorganización del citoesqueleto con un valor de correlación en pacientes del TCGA. El mapa de calor sólo muestra los valores de correlación para covulnerabilidades. Es decir, los espacios blancos no representan vulnerabilidades. El mapa está organizado en dos regiones, la primera incluye a 157 CES presentes en 2 o más tipos de cáncer y la segunda a 27 CES identificadas sólo en un tipo de cáncer. En un mapa de calor adyacente se muestran las 184 CES ordenadas de acuerdo con su categoría estructural.

Para identificar a los ACS que cumplieran criterios de covulnerabilidad y coexpresión en datos del TCGA, seleccionamos a las 20 Covulnerabilidades de mayor coexpresión para cada tipo de cáncer, los llamamos ACS TCGA-DepMap. Posterior a evaluar la correlación con la supervivencia de cada uno de los ACS TCGA-DepMap y seleccionar aquellos que correlacionaron con un pronóstico menos favorable, obtuvimos 7 firmas transcripcionales, a las que les incluimos los datos de expresión de la efexina 3, que correlacionaron con un pronóstico menos favorable por el riesgo acumulado de su expresión. Los resultados están mostrados en la Figura 19, inciso A, donde el mapa binario de la derecha muestra a los ACS organizados por su categoría estructural. Cada renglón corresponde a un tipo de cáncer con una firma transcripcional TCGA-DepMap significativa constituida por los transcritos marcados en negro. La Figura 19, inciso B, muestra las líneas celulares y los valores de sensibilidad que genera la pérdida de función de los genes indicados en la gráfica. Las gráficas de supervivencia obtenidas analizando las firmas transcripcionales TCGA-DepMap se muestran ordenadas de acuerdo con el significado estadístico. Los dibujos adyacentes muestran las categorías estructurales de los componentes de las firmas TCGA-DepMap.

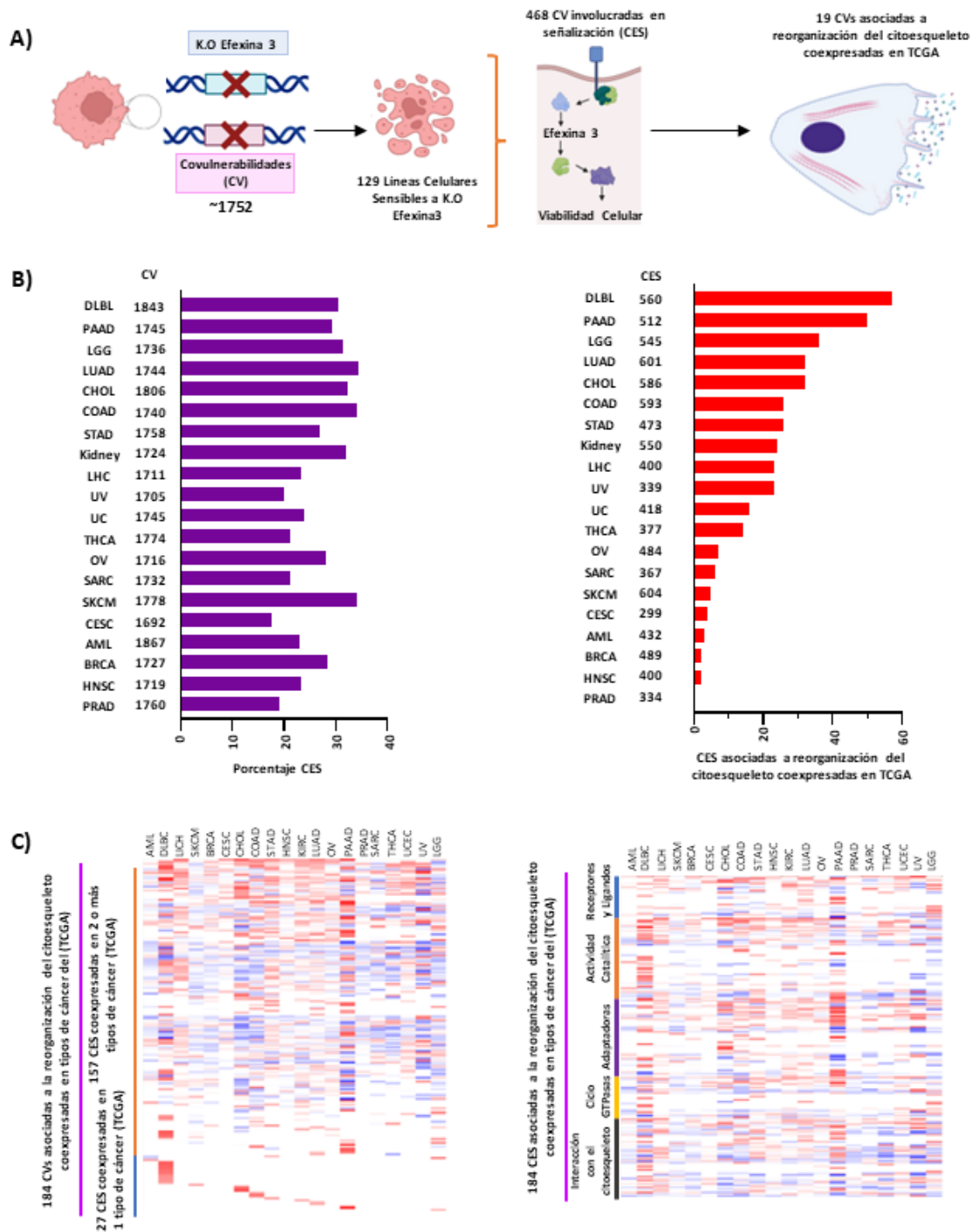


Figura 18 Covulnerabilidades en líneas celulares sensibles a efexina 3 definen ACS en pacientes del TCGA A) Selección de las Coesencialidades en líneas celulares de cáncer sensibles al K.O de efexina 3 y la integración de cascadas de señalización oncogénicas vitales. B) Selección de Coesencialidades involucradas en señalización empleando SPIM-YY en la gráfica de barras moradas, mientras que la gráfica de barras rojas muestra las covulnerabilidades de señalización que se coexpresan en pacientes del TCGA ( $SPM >= 0.2$ ) asociadas a migración. C) Mapas de calor en gradiente de la coexpresión de las CES y su segmentación estructural. El color blanco indica que un gen no es coesencial en los tipos de cáncer correspondientes.

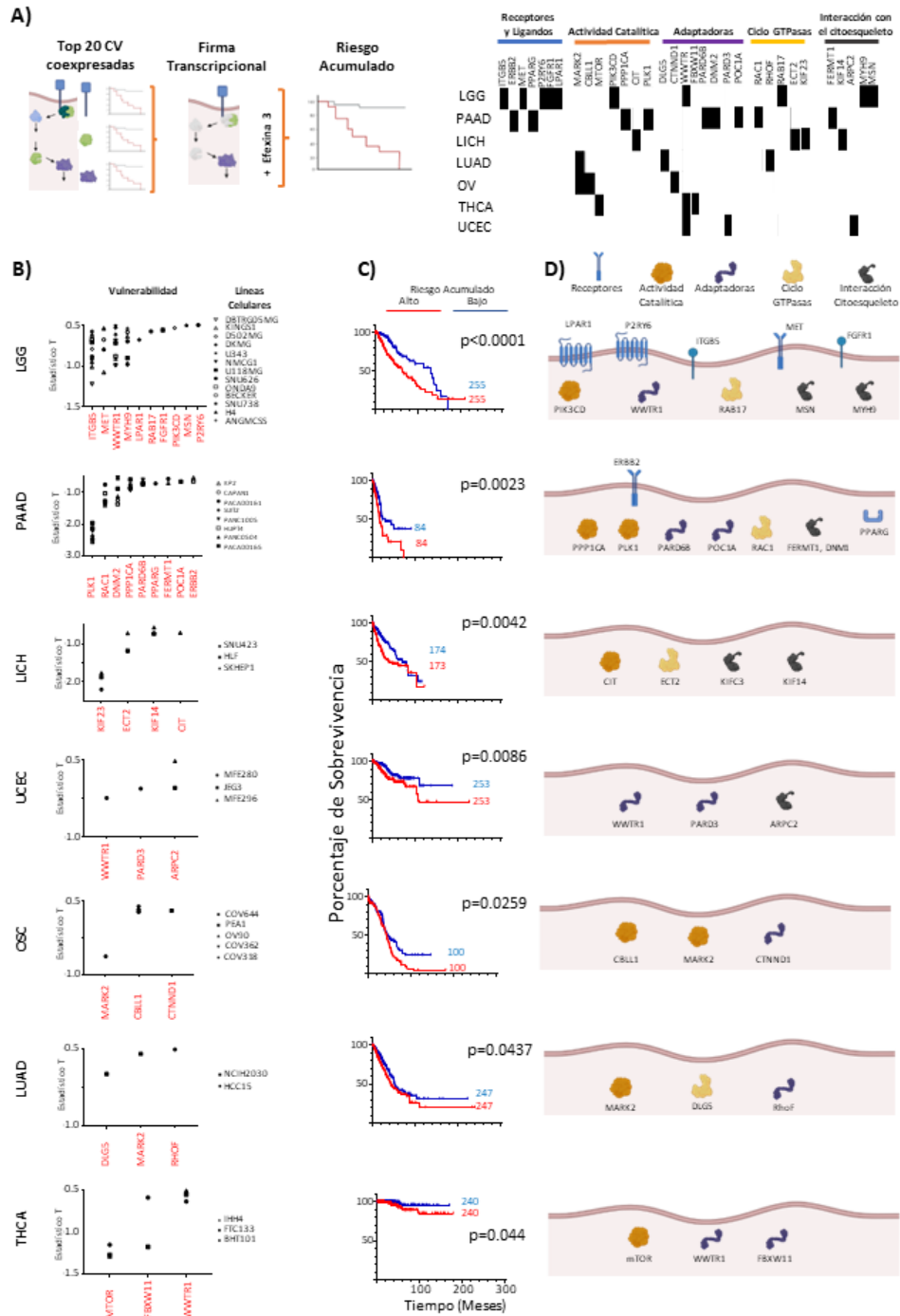


Figura 19 Firmas transcripcionales obtenidas de las CES asociadas a la reorganización del citoesqueleto A) Selección de las CES que conformaron firmas transcripcionales y mapa binario de las firmas transcripcionales indicando en la parte superior las características estructurales de sus componentes. B) Líneas celulares sensibles a la pérdida de función de las CES. C) Curvas de supervivencia obtenidas de acuerdo con el riesgo acumulado representado por las firmas transcripcionales y su valor estadístico con la supervivencia de pacientes. D) CES de las firmas transcripcionales clasificados por características estructurales.

### **8.10. Tipos de cáncer con firmas transcripcionales y acompañantes de señalización**

Los 3 criterios empleados para la selección de ACS que derivaron en potenciales firmas transcripcionales se indican en la tabla 3. Empleando el criterio PanCan obtuvimos 13 firmas transcripcionales que correlacionaron estadísticamente con un pronóstico menos favorable. Empleando el criterio particular caracterizamos 11 firmas transcripcionales que correlacionaron con un pronóstico menos favorable y mediante el criterio TCGA-DepMap reconocimos 7 firmas transcripcionales que correlacionaron con un pronóstico menos favorable. Cabe resaltar que los 3 criterios dieron lugar a la caracterización de firmas transcripcionales significativas en 4 tipos de cáncer que fueron: glioma de bajo grado, carcinosarcoma ovárico, adenocarcinoma pancreático y adenocarcinoma pulmonar. Con dos criterios resultaron firmas transcripcionales significativas en 6 tipos de cáncer: timoma, hepatocarcinoma celular, carcinosarcoma de cuerpo uterino endometrial, leucemia mieloide aguda, carcinoma de célula clara de riñón y carcinoma de vejiga. Finalmente, con un criterio se definieron firmas transcripcionales que resultaron significativas en 7 tipos de cáncer: carcinoma adrenocortical, melanoma cutáneo de piel, adenocarcinoma prostático, melanoma uveal, carcinoma de célula escamosa cervical, carcinoma de célula cromófoba de riñón y carcinoma de tiroides. En total, 17 tipos de cáncer resultaron con firmas transcripcionales que correlacionan con un pronóstico menos favorable.

En cuanto a los ACS que identificamos de forma consistente como parte de varias firmas transcripcionales, estos los destacamos en la Tabla 4. Los ACS están organizados por criterios estructurales y la estrategia que llevó a su identificación como ACS. En esta tabla destacan dos genes que forman parte de al menos una firma transcripcional empleando los 3 criterios; MET y MARK2, pertenecientes a las categorías Ligandos y Receptores y Actividad Catalítica respectivamente. Además, resultaron particularmente interesantes los ACS que forman parte de al menos una firma transcripcional empleando dos criterios de selección, para ligandos y receptores: PTPRF, con Actividad Catalítica: SSH3, PAK6 y CBLL1, para proteínas Adaptadoras: BAIAP2L1, CTNND1, PATJ y DLG5; para el Ciclo de las GTPasas: RhoD, Rab17 y Rac1 y para la reorganización del citoesqueleto: DIAPH1 y DSP.

Tabla 4 Tipos de cáncer con firmas transcripcionales según el criterio empleado

Firma Transcripcional	Tipos de cáncer
13 Tipos de Cáncer con Firma Transcripcional PanCan	<b>LGG (12), OSC (3), PAAD (8), LUAD (3), KRCC (2), THYM (7), AML (4), BLCA (2), SKCM (4), ACC (2), PRAD (2), LUV (3), CESC (2).</b>
11 Tipos de Cáncer con Firma Transcripcional Individual	<b>LUAD (5), LGG (15), PAAD (6), OSC (2), KRCC (4), AML (4), BLCA (9), LICH (4), THYM (8), UCEC (2), KC (3)</b>
7 Tipos de Cáncer con Firma Transcripcional TCGA-DepMap	<b>LGG (10), PAAD (9), OSC (3), LUAD (3), LICH (4), UCEC (3), THCA (3)</b>

Tipo de Cáncer (ACS presentes en una firma transcripcional). **Tipo de Cáncer con Firma Transcripcional empleando 3 criterios.** Tipo de Cáncer con Firma Transcripcional empleando 2 criterios. Tipo de Cáncer con Firma Transcripcional empleando 1 criterio

Tabla 5 ACS que conforman firmas transcripcionales con Efexina 3 que correlacionan con un pronóstico menos favorable en pacientes del TCGA

Criterio Estructural	PanCan	Individual	TCGA-DepMap
Ligandos y Receptores	<b>MET (4), PTPRF (3), EPHA1 (1), CELSR2 (2)</b>	<b>MET (1), PTPRF (1), ITGB4 (1), IL1R1 (1), PLXND1 (1), UNC5C (1), EGFR (1), SDC4 (1)</b>	<b>MET (1), ITGB5 (1), FGFR1 (1), LPAR1 (1), P2RY6 (1), ERBB2 (1), PPAR6 (1)</b>
Actividad Catalítica	<b>MARK2 (2), SSH3 (3), PAK6 (1), CDC42BPG (2), MINK1 (2)</b>	<b>MARK2 (1), CBLL1 (1), PAK6 (1), SSH3 (3), BRAF (1), MARK1 (1), PTK6 (1), PDESA (1), ADCY6 (1), CDK6 (1), PLK2 (1), CDK16 (1), ADCY3 (1), TRIM32 (1),</b>	<b>MARK2 (2), CBLL1 (1), PIK3CD (1), PLK1 (1), PPP1CA (1), MTOR1 (1), CIT (1)</b>
Adaptadoras	<b>BAIAP2L1 (4), CTNND1 (3), PATJ (3), EPS8L2 (2), JUP (2),</b>	<b>BAIAP2L1 (2), DLG5 (2), PATJ (1), PDLIM4 (1), CSRP1 (1), PRICKL3 (1), SWAP70 (1), PICK1 (1), IL1RAP (1), SOCS1 (1), FARP2 (1), LMX1A (1)</b>	<b>DLG5 (1), CTNND1 (1), WWTR1 (3), PARD3 (1), FBXW11 (1), PARD6B (1), POC1A (1), DNM2 (1)</b>
Ciclo de las GTPasas	<b>RhoD (5), RAB17 (2), ARHGEF16 (2)</b>	<b>RhoD (2), RhoF (2), Rac1 (1), ARHGEF4 (1), IQGAP1 (1), RAPIGAP (1), ARHGEF11 (1), RABGEF1 (1), ARHGAP6 (1), DLC1 (1), RAB34 (1)</b>	<b>RhoF (1), Rac1 (1), RAB17 (1), ECT2 (1)</b>
Reorganización del citoesqueleto	<b>DIAPH1 (2), DSP (1), MYO5B (3), WASL (1), PLEKHG3 (1)</b>	<b>DIAPH1 (1), DSP (2), VILL (1), VASP (1), MYO1D (1), ARPC1A (1), MYL12A (1), STX3 (3), KIF3C (1), ENAH (1), SPTBN2 (1)</b>	<b>ARPC2 (1), MYH9 (1), MSN (1), FERMT1 (1), KIF23 (1), KIF14 (1)</b>

Gen(Número de veces repetido en un criterio. **Gen presente en firma(s) transcripcional(es) empleando 3 criterios.** Gen presente en firma(s) transcripcional(es) empleando 2 criterios. Gen presente en firma(s) transcripcional(es) empleando 1 criterio



## 9. Discusión

La metástasis es un evento mortal en el cual la migración celular es empleada por células cancerosas para diseminarse de un tumor primario a tejidos distantes. Es necesario que las células cancerosas reconozcan estímulos que integran cascadas de señalización que culminan en la reorganización del citoesqueleto y formación de estructuras migratorias. Las Rho GTPasas son esenciales en los procesos de migración celular al regular la actividad de proteínas que remodelan el citoesqueleto. Los Rho GEFs son proteínas multidominio que promueven la activación de las Rho GTPasas. Los múltiples dominios de señalización que se extienden a las regiones carboxilo y amino terminal permiten que los Rho GEFs integren complejos de señalización que potencialmente favorecen procesos oncogénicos. Las efexinas, un grupo de Rho GEFs que interactúan con receptores de tipo RTK de la familia Eph se han reportado como participantes en cascadas de señalización oncogénicas. Por tanto, planteamos que las efexinas están involucradas en vías de señalización que culminan en la metástasis. Con base en los resultados obtenidos sería posible proponer a las efexinas como potenciales blancos farmacológicos o biomarcadores asociados con la agresividad tumoral.

La expresión de las efexinas 1, 2, 4 y 5 se ha delimitado a tejidos específicos, mientras que la efexina 3 se considera ubicua (*ARHGEF16 Protein Expression Summary - The Human Protein Atlas*, n.d.; Ogita et al., 2003; Rodrigues et al., 2000; Y. Wang et al., 2004; X. Xie et al., 2005). Por tanto, planteamos que, si su expresión se encuentra desregulada en tipos de cáncer de diferentes orígenes, esto podría sugerir su participación en procesos oncogénicos. Partiendo del análisis de expresión, identificamos que los 5 miembros de las efexinas se expresan en niveles comparables en los 32 tipos de cáncer que conforman el proyecto del TCGA. Al evaluar las alteraciones en el número de copias en los genes que las codifican, aparentemente no existe una relación entre la expresión y deleciones o amplificaciones de los genes. Aunque se presenten deleciones en una de las copias de los genes que codifican a las efexinas, como en colangiocarcinoma, carcinoma de célula escamosa de pulmón y carcinoma de célula cromófoba de riñón, la expresión de éstas no se ve disminuida. Por otro lado, las ganancias en el número de copias, como en glioblastoma multiforme, adenocarcinoma cortical y melanoma cutáneo de piel, no dieron lugar a un aumento significativo en la expresión de las efexinas. La expresión de las 5 efexinas en neoplasias de

diferentes orígenes podría sugerir que integran cascadas de señalización que promueven procesos tumorales en diversos contextos oncogénicos. El aumento en la expresión de las efexinas podría deberse a desregulación de factores de crecimiento, citocinas, factores transcripcionales o reguladores postraduccionales. Tal es el caso de efexina 4, cuya expresión aumenta por acción del factor transcripcional GLI2 en líneas celulares de glioma (Huang et al., 2018); efexina 2, regulada negativamente por miR503 y miR-29a (Y. Li et al., 2018; Zhou et al., 2014); y efexina 3 que aumenta su expresión al estimular células mesenquimales y endoteliales con el TGF- $\beta$ 2 (Komiya et al., 2016; Mihira et al., 2012). Tomando en cuenta tales observaciones, sería interesante comparar la expresión de efexinas en muestras tumorales respecto a tejido sano, aunado a explorar la presencia de factores solubles que potencialmente promuevan su expresión.

Las efexinas activan a las GTPasas RhoA, Rac1 y Cdc42, además de integrar complejos de señalización compuestos por cinasas, RTKs y proteínas de interacción con el citoesqueleto relacionados con proliferación, sobrevivencia y migración celular (Harada et al., 2011; J. Kim et al., 2022; Kuroiwa et al., 2011; Y. Li et al., 2018; Yu et al., 2020). Partiendo de la expresión de las 5 efexinas en las neoplasias analizadas, nos planteamos si se coexpresan entre ellas, lo que sería un indicio de funciones redundantes, complementarias o específicas. El patrón de correlación positivo entre las efexinas 1, 2, 3 y 4 sugiere la posibilidad de funciones redundantes o complementarias, mientras que el patrón de correlación negativo de efexina 5 con el resto sugiere funciones específicas para esta efexina. El alineamiento múltiple de secuencias indicó que las efexinas 1, 2 y 3 se encuentran más cercanas filogenéticamente, lo que sustentaría una posible redundancia de función entre ellas. Mientras que las efexinas 4 y 5, al encontrarse menos conservadas, podrían ejercer funciones complementarias y exclusivas respectivamente. Las efexinas en su región carboxilo terminal son muy similares estructuralmente. Sin embargo, la región amino terminal es de longitud variable y poco conservada. Esta región podría ser reconocida por dominios de interacción proteína-proteína, con actividad de cinasa que conduzcan a la fosforilación y reclutamiento de proteínas con dominios que reconozcan residuos de serina, treonina o tirosina fosforilados. Se ha reportado una conformación autoinhibitoria de las efexinas en la que el dominio SH3 interactúa con una secuencia rica en prolina de la región amino terminal (Zhang et al., 2021). Es así como la región amino terminal de las efexinas podría interactuar con proteínas de

señalización particulares que complementen su función, además de poder formar parte de interacciones intramoleculares. Caracterizar estructural y experimentalmente la región amino terminal permitiría identificar interactores novedosos y posiblemente específicos de las efexinas que pudieran relacionarse con cascadas de señalización oncogénicas.

Se ha reportado la expresión de las 5 efexinas en células epiteliales, sin embargo, efexina 1 se considera principalmente neuronal y efexina 5 endotelial (Ogita et al., 2003; Zhang et al., 2021). Es así que al identificar que las efexinas se expresan en diversos tipos de cáncer y presentan patrones diferenciales de coexpresión, nos planteamos identificar, con base a la coexpresión con marcadores, las poblaciones celulares del microambiente tumoral que expresaran a las efexinas. Las efexinas 1, 2, 3 y 4 correlacionaron con EPCAM, considerado como un marcador de células epiteliales. Teniendo en cuenta que la mayoría de los cánceres son de origen epitelial, en este caso consideramos que la coexpresión con EPCAM es indicativa de la presencia de tales efexinas en las células cancerosas. Mientras que efexina 5 coexpresa con marcadores de células linfoides, mieloides, fibroblastos y endoteliales. Debido a que las efexinas 1, 2, 3 y 4 presentan un patrón de correlación positivo entre ellas y con un marcador de células cancerosas, planteamos que tales efexinas podrían participar en procesos oncogénicos específicos de células cancerosas, por lo que podrían tener funciones complementarias. Con algunas excepciones en el caso de la efexina 3, misma que, como se mostró en resultados, es esencial en distintos tipos de células cancerosas. Entre las cascadas oncogénicas en las que la participación de efexinas está documentada tenemos, como ejemplos, que efexina 1 interactúa con Ras oncogénica, EphA1 y EGFR para promover la proliferación (J. Kim et al., 2022); efexina 2 interactúa con BRAF para promover la fosforilación de MEK (Y. Li et al., 2018; Yu et al., 2020); efexina 3 integra un complejo con Src, PI3K y Akt que promueve la formación de podosomas (Kuroiwa et al., 2011) y efexina 4 impide la anoikis mediante un complejo conformado por EphA1, RhoG y PI3K (Harada et al., 2011). Mientras que efexina 5 podría favorecer el desarrollo tumoral a través de la angiogénesis tumoral ya que se ha reportado su participación en la regulación de este proceso (Kusuhara et al., 2012). Partiendo de estas observaciones, sería posible estudiar a efexinas 1, 2, 3 y 4 como posibles blancos farmacológicos de células cancerosas, y efexina 5 al impedir la angiogénesis tumoral que evite la formación de nuevas rutas de tráfico celular, comunicación y fuente de nutrientes.

Las efexinas participan en cascadas de señalización relacionadas con proliferación y supervivencia de células cancerosas (Harada et al., 2011; J. Kim et al., 2022; Y. Li et al., 2018; Yu et al., 2020). Por tanto, exploramos la vulnerabilidad que genera la pérdida de función de los genes que codifican a las efexinas en líneas celulares cancerosas mediante la plataforma DepMap. Solo el *Knock-out* de efexina 3 generó vulnerabilidad en diversas líneas celulares de cáncer. Lo más llamativo es que la pérdida de expresión de efexina 3 no generó sensibilidad en todas las líneas celulares de un tejido particular de origen. Con base en estas observaciones planteamos que efexina 3 participa en cascadas de señalización esenciales para la viabilidad de diferentes líneas celulares cancerosas. En la región amino terminal de efexina 3, que a pesar de tener mayor longitud entre los miembros de esta familia ha sido pobremente caracterizada, podría servir como plataforma de señalización mediante la unión de diversos dominios de señalización que integre nodos de mayor complejidad. Las regiones de interacción entre efexina 1 y 4 con BRAF, EphA1 y EGFR se han mapeado a la región catalítica DH-PH (Harada et al., 2011; J. Kim et al., 2022). En modelos *in vitro*, se han identificado acompañantes de señalización de efexina 3: TGF- $\beta$ , SMAD, PI3K, Src, EphA4 y cortactina, con algunos de ellos integra complejos funcionales relacionados con la capacidad invasiva de células cancerosas (Kuroiwa et al., 2011; Mihira et al., 2012). Por lo que efexina 3, dada su homología, podría compartir algunas de estas interacciones y enriquecer estos complejos con su región amino terminal. La información disponible en DepMap permite conocer los contextos mutacionales y moleculares de las líneas celulares estudiadas. Partiendo de esto, se podrían definir los contextos mutacionales específicos en los que efexina 3 es esencial para la viabilidad.

Dada la esencialidad de efexina 3 en múltiples líneas cancerosas, nos planteamos que, en el microambiente tumoral, esta efexina integra cascadas de señalización relacionadas con procesos metastásicos. Obtuvimos miles de transcritos con un valor de correlación con efexina 3 en diversos tipos de cáncer. Aplicamos criterios para seleccionar aquellos transcritos con los que efexina 3 potencialmente participa en cascadas de señalización mediante una correlación de Spearman igual o mayor a 0.2. Esto nos llevó a obtener repertorios de ACS amplios o limitados para efexina 3 según el tipo de cáncer. Los repertorios de ACS limitados podrían ser de gran importancia para los tipos de cáncer en que se presentan, ya que podría formar parte de cascadas de señalización funcionales en contextos

patológicos restringidos, lo que resulta ideal cuando se buscan proteínas que se pretendan inhibir con fines terapéuticos.

Aunque se han identificado ACS de efexina 3, no se ha establecido una cascada de señalización canónica. En el repertorio de ACS obtenido y visualizado en mapas de calor, se aprecian regiones rojas continuas y semicontinuas que sugieren el acompañamiento PanCancer de efexina 3 con ACS particulares. Con esta observación, surge la posibilidad de establecer potenciales ejes de señalización conservados para efexina 3 en diferentes contextos oncogénicos relacionados con la progresión tumoral. Sin embargo, también es posible que estos ACS PanCancer se encuentren regulados por los mismos estímulos y factores transcripcionales que explique su relación lineal en la expresión.

Puesto que el cáncer metastásico requiere de la migración celular y, en el caso concreto de la efexina 3, ésta interactúa con Src y cortactina, además de participar en la reorganización del citoesqueleto vía RhoA, que conduce a la activación de ROCK1 y formación de fibras de estrés (X. Xie et al., 2005). Por lo que planteamos que sus ACS, relevantes en un contexto oncogénico, serían aquellos involucrados en la migración celular. De 3060 ACS, seleccionamos 1076 asociados a la formación de estructuras migratorias. Al representarlos en mapas de calor en los que conjuntamos la información de los distintos tipos de cáncer, los ACS más frecuentes se aprecian como líneas rojas, aparentemente continuas. Entre los grupos organizados por criterios estructurales y transformados a imágenes binarias, se observan líneas negras semicontinuas que resaltan la importancia de grupos de señalización particulares. Entre ligandos y receptores, los GPCRs y RTKs resultaron los más frecuentes; entre las proteínas con actividad catalítica, las cinasas con especificidad por residuos de serina/treonina resultaron de interés por su frecuencia; entre las proteínas adaptadoras, aquellas de interacción proteína-proteína resultaron frecuentes; en cuanto a las proteínas del ciclo de las GTPasas, éstas son de interés particular y para las proteínas de interacción con el citoesqueleto, resultaron aquellas que interactúan con el citoesqueleto de actina. La participación de GPCRs y RTKs en la migración celular se ha establecido; mientras que, entre las proteínas con actividad catalítica activadas por Rho GTPasas, se encuentran aquellas con especificidad por residuos de Serina/Treonina (Zhao & Manser, 2005). Receptores y proteínas efectoras que forman parte de las cascadas virtuales que identificamos en torno a

la efexina 3 pudieran conectarse mediante la participación de proteínas especializadas en la interacción proteína-proteína, de especial importancia en el ensamblado de complejos de señalización. Ya que las Rho GTPasas regulan la migración celular, al enriquecer las proteínas de interacción con el citoesqueleto, este grupo resultó como el de mayor importancia. Es posible proponer mecanismos de señalización conservados en contextos oncogénicos relacionados con la migración celular con base en nuestros resultados, lo que nos permitiría proponer y explorar ACS que sugieran nuevos mecanismos de señalización para efexina 3.

En cuanto a la posible importancia de estas cascadas de señalización integradas por la efexina 3, el análisis del riesgo acumulado de las firmas transcripcionales reveló su potencial importancia en ciertos tipos de cáncer. Empleando 3 criterios de selección de ACS con firmas transcripcionales que correlacionan con un pronóstico menos favorable se encuentran: glioma de bajo grado, carcinosarcoma ovárico, adenocarcinoma pancreático y adenocarcinoma pulmonar, empleando 2 criterios de selección: carcinoma renal de célula clara, timoma, leucemia mieloide aguda, adenocarcinoma de vejiga, hepatocarcinoma celular y carcinoma de cuerpo uterino. Empleando solo 1 criterio de selección: adenocarcinoma cortical, adenocarcinoma prostático, melanoma uveal, carcinoma de célula escamosa cervical, carcinoma de tiroides y carcinoma renal de célula cromófila. Cabe destacar que las firmas transcripcionales con un valor estadístico más significativo son las particulares, seguidas de las TCGA-DepMap y las PanCan. Eso nos permite resaltar la importancia que, aunque existen ACS conservados en diversas neoplasias para efexina 3 relacionadas con la progresión tumoral, existen acompañantes diferenciales o particulares para ciertos tipos de cáncer que correlacionan con una menor supervivencia. Las firmas TCGA-DepMap generan un interés particular al provenir de covulnerabilidades en líneas celulares cancerosas que corresponden a proteínas de señalización que se coexpresan con efexina 3 en pacientes del TCGA y correlacionaron con una menor supervivencia. Esto indicaría que estas cascadas de señalización además de ser esenciales promueven agresividad tumoral y potencialmente metástasis en pacientes. Entre nuestros hallazgos destaca la identificación de firmas transcripcionales que correlacionan con la supervivencia de pacientes con tipos de cáncer agresivos, con opciones terapéuticas limitadas, como carcinoma de riñón, adenocarcinoma cortical, adenocarcinoma pancreático, hepatocarcinoma celular y leucemia mieloide aguda.

Hubo ACS-efx3 que desde una perspectiva funcional resultan particularmente interesantes, aun cuando no todos cumplieron el criterio de correlacionar con la sobrevivencia de pacientes. Estos se muestran en la figura 14. Su identificación abre múltiples oportunidades de investigación basadas en estudiar su posible participación en procesos oncogénicos en el contexto de la participación de la efexina 3 como un efector precisamente de cascadas oncogénicas. Entre ellos se encuentran receptores para factores de crecimiento, EGFR y ERBB2 y MET, de quienes se sabe que se encuentran alterados en diversas neoplasias (Chong & Jänne, 2013; Ciardiello & Tortora, 2008; Z. Wang, 2017; Zambelli et al., 2021). Entre las terapias ampliamente usadas en pacientes con neoplasias que presentan alteraciones de estos receptores, se encuentra el tratamiento con inhibidores tirosín cinasa o anticuerpos monoclonales que impiden su dimerización y transactivación (Chong & Jänne, 2013). Las neoplasias generan mecanismos de resistencia a los tratamientos al sobreexpresar otros RTKs para promover la heterodimerización (Fu et al., 2021; Trusolino et al., 2010; Zambelli et al., 2021). Es posible que efexina 3 al igual que efexina 1 y 4, establezca la formación de heterodímeros de RTK y el ensamblado de complejos de señalización. Puesto que en términos generales las efexinas son activadas por fosforilación en tirosinas conservadas en una región adyacente al dominio DH, nuestras observaciones sugieren que para el caso de la efexina 3, ésta podría ser efectora de EGFR, ERBB2 y MET promoviendo la activación de GTPasas de la familia de Rho.

Entre los acompañantes de señalización de la efexina 3 encontramos receptores de adhesión, por lo que este GEF pudiera ser un efector en el proceso de diseminación metastásica. La pérdida de adhesiones celulares para promover la diseminación de células cancerosas es un evento crítico. Sin embargo, se han identificado mecanismos de migración colectiva en los que es necesario mantener las uniones célula-célula que permiten la diseminación de grupos celulares. Además, durante la migración celular se establecen puntos de adhesión con la matriz que brindan la fuerza necesaria para el movimiento. Los receptores DDR1 y CELSR2, identificados como ACS-efx3, establecen interacciones con colágeno (Gadiya & Chakraborty, 2018; Vizurraga et al., 2020), mientras que PTPRF y EphA1 (también ACS-efx3) se han asociado al reconocimiento homofílico y de proteínas de superficie, respectivamente (Cornejo et al., 2021; Dunah et al., 2005; Sarhan et al., 2016; Wu et al., 2022; Young et al., 2021). DDR1 y EphA1 pertenecen a la familia de los RTK, por lo que

podrían activar a efexina 3 a través de su fosforilación. PTPRF es un receptor de tipo fosfatasa que se ha identificado como regulador de la actividad de EphA1. La actividad de PTPRF podría regular negativamente las cascadas de señalización en las que participe efexina 3 a través de los RTK. CELSR2 y DDR1 reconocen colágeno de la matriz extracelular, por lo que efexina 3 participaría en procesos de señalización una vez reconocidos sustratos de la ECM, participando en la formación y maduración de adhesiones focales. Entre estos acompañantes se han establecido roles oncogénicos y antitumorales para DDR1 (Koh et al., 2015; R. Xie et al., 2016; Zhong et al., 2019) y EphA1 (Dong et al., 2009; Y. Wang et al., 2016; Wu et al., 2022). Intracelularmente los receptores de adhesión interactúan con el citoesqueleto a través de complejos proteicos. Entre las proteínas que conforman estos complejos se encuentran PATJ, CTNND1, JUP y DSP, mismas que resultaron ACS-efx3 y componentes de firmas transcripcionales. Aunque el aumento en la expresión de estas proteínas se asocia con la pérdida del fenotipo mesenquimal en modelos celulares, también se han identificado como participantes de procesos oncogénicos al promover la transcripción de genes y localización de complejos involucrados en migración a la membrana plasmática (Janiszewska et al., 2020; Reynolds, 2007; Shin et al., 2005; Soto et al., 2008). Con base en esto y el antecedente que efexina 3 integra un complejo de señalización con Src. Sugerimos que efexina 3 promueve el desensamble de adhesiones celulares al relocalizar a la cinasa Src a la membrana y promover la fosforilación de E-cadherina o CTNND1. Este último, se ha identificado como estabilizador de N-cadherina en la membrana (Soto et al., 2008) y represor de la actividad de Kaiso que a su vez reprime la expresión de genes mesenquimales (Park et al., 2005; Soto et al., 2008; Spring et al., 2005). Por otro lado, efexina 3 podría promover la formación de adhesiones que permitan la extravasación de células cancerosas. Por tanto, se podría evaluar la localización de efexina 3 durante el inicio de procesos migratorios para determinar si se localiza en las uniones celulares y promueve su desensamble.

Entre las proteínas efectoras de las Rho GTPasas se encuentran cinasas con especificidad por residuos de serina/teonina como PAKs (activada por Rac1 y Cdc42), ROCK (activada por RhoA) y Cdc42BPs (activada por Cdc42). Al ser efexina 3 un RhoGEF, se espera que coexpresione bien con algunas de estas proteínas, particularmente con ROCK. Nuestros hallazgos mostraron a PAK6 y Cdc42BPG como ACS-efx3 e integrantes de firmas transcripcionales. Estas observaciones podrían sugerir que efexina 3 regula la actividad de



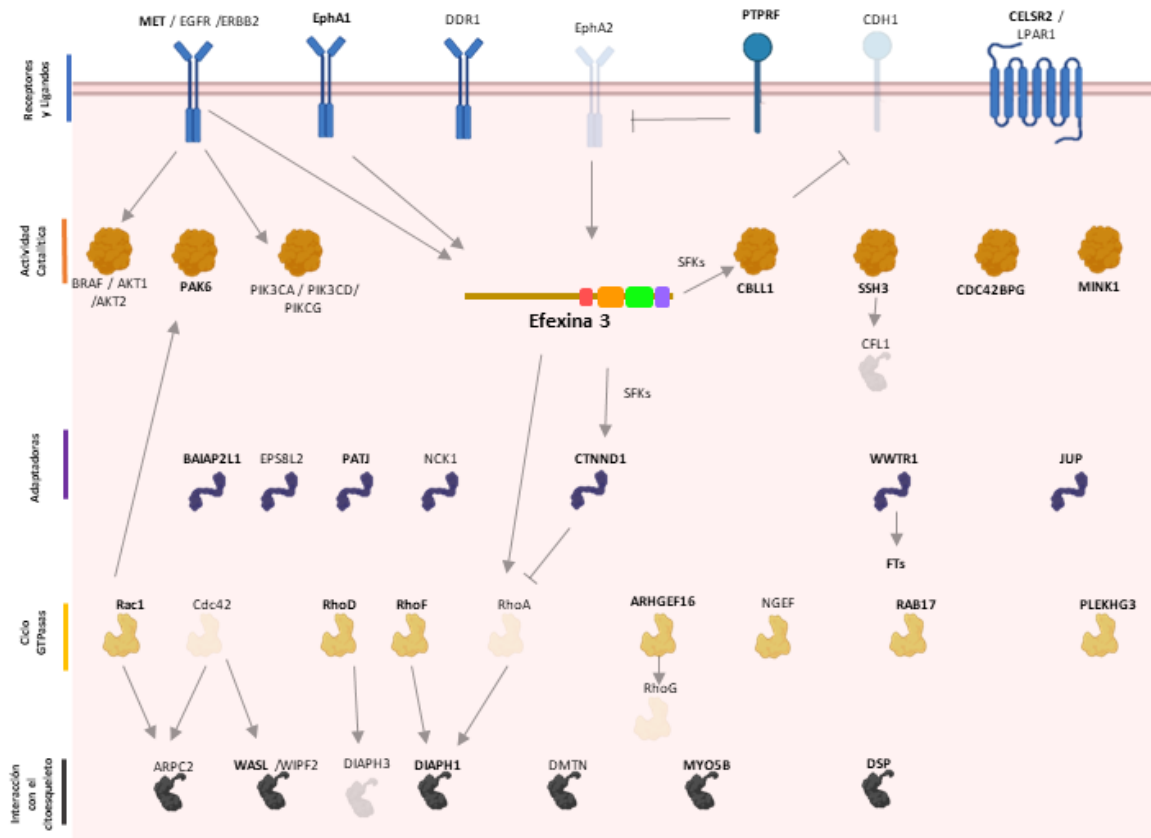
efectores de Rac1 y Cdc42 en procesos oncogénicos. En la migración celular es necesario que exista una regulación espacio temporal de la actividad de las Rho GTPasas, por lo que efexina 3 promovería la activación de RhoA para generar fibras de estrés. Entre Los Rho GEFs identificados como ACS se encuentran ARHGEF16 (Efexina 4) que formó parte de firmas transcripcionales y NGEF (Efexina 1) como ACS. Estos datos sugieren la posible existencia de cascadas entre efexinas. La secuencia rica en prolina, que interactúa con el dominio SH3 para promover una conformación autoinhibitoria, podría ser reconocida por los dominios SH3 de otras efexinas. De forma tal que efexina 3 interactúe con efexina 4 y 1 para promover la transactivación de Rac1 y Cdc42. Cabe resaltar que como ACS se encontraron proteínas promotoras de la nucleación de actina (WASL y WIPF) y un nucleador de actina (ARPC2), lo que sugiere la integración de señales hacia la regulación en la actividad de Cdc42.

Interesantemente entre los ACS de efexina 3 se encontraron proteínas involucradas en la formación de filopodios al ser activadas por RhoD y RhoF. Entre ellas, se encuentran DIAPH1, BAIAP2L1 y EPS8L2 (Blom et al., 2017; G. Chen et al., 2011; Goh et al., 2011; Koizumi et al., 2012; Pellegrin & Mellor, 2005; Postema et al., 2018). Además de Cdc42, la formación de filopodios es promovida por RhoD y RhoF, quienes son consideradas como RhoGTPasas atípicas, debido a que su actividad intercambiadora de nucleótidos de guanina es elevada, por lo que constantemente se encuentran activas (Aspenström, 2014; Jaiswal et al., 2013). Por la naturaleza de estas GTPasas, surge la posibilidad que efexina 3 sea efectora de las mismas o contribuya a su localización. DIAPH1 también promueve la formación de filopodios y fibras de estrés en mecanismos independientes a Cdc42 y RhoA, ambos mediados por RhoF (Fan et al., 2010; Goh et al., 2012). Con lo que surge un interés por explorar a efexina 3 como un regulador de GTPasas atípicas, ya sea en su expresión o activación de proteínas efectoras.

La degradación de E-cadherina para promover el desensamble de las adhesiones célula-célula es necesario para la migración celular y un evento de la transición epitelial mesenquimal. CBLL1, un ACS que forma parte de firmas transcripcionales codifica para una proteína E3 que participa en la ubiquitinación de E-cadherina cuando se encuentra fosforilada en residuos de tirosina (Fujita et al., 2002). Se identificó que esta proteína es activada por cinasas de

la familia de Src y participa en procesos oncogénicos (Castosa et al., 2018; Figueroa et al., 2009; Rodríguez-Rigueiro et al., 2011). Es así que existe la posibilidad que efexina 3 interactúe con Src y CBLL1 para promover su localización a la membrana y la degradación de E-cadherina. Entre algunos de los ACS que podrían oponerse a estos eventos es PTPRF, que se ha identificado como un estabilizador de E-cadherina al desfosforilarla y evitar su degradación.

Entre las cascadas de señalización canónicas comúnmente desreguladas en cáncer se encuentran las MAPK-cinasas, PI3K/Akt/mTOR e Hippo, ya que promueven la proliferación, sobrevivencia y migración de células cancerosas (Clayton & Ridley, 2020; Dupont et al., 2011; Fu et al., 2021; Lamar et al., 2019). Entre los ACS de efexina 3 particulares y TCGA-DepMap se encuentran WWTR1, subunidades A, D y G de PI3K, Akt1, Akt2 y BRAF. Las cascadas de las MAPK y PI3K/Akt son activadas por la estimulación de receptores para factores de crecimiento, es así que, una hipótesis de trabajo interesante es que efexina 3 actúa como una plataforma de señalización que favorezca el ensamble de complejos de estas vías de señalización y las localice a la membrana. Las adhesiones celulares promueven la actividad de la vía Hippo que culmina en la fosforilación del complejo YAP/WWTR1, lo que impide su traslocación al núcleo y la promoción de la proliferación celular. Con los ACS identificados hasta el momento, efexina 3 podría promover el desensamble de las adhesiones célula-célula para desregular la vía de Hippo, promoviendo la proliferación y migración celular. Además, se ha identificado que la fosforilación de YAP/WWTR1 por la cinasa Src en residuos de tirosina promueve su actividad en el núcleo. Una estrategia global para investigar a los ACS -efx3 sería evaluar sus estados de fosforilación en modelos celulares en los que se altere la expresión de efexina 3, así como investigar interacciones y formación de complejos en los que la efexina 3 sea el elemento unificador. Con estas estrategias, se abre la posibilidad de avanzar en la identificación de cascadas de señalización esenciales en contextos oncogénicos en las que participa la efexina 3.



ACS que conforman firmas transcripcionales con un pronóstico menos favorable con efexina 3. ACS de efexina 3 que no forman parte de firmas transcripcionales correlacionadas con un pronóstico menos favorable. Los iconos transparentes representan proteínas efectoras o reguladas por ACS de efexina 3

Figura 20 Acompañantes de Señalización para efexina 3 con los que potencialmente integra cascadas de señalización

## 10. Conclusiones

Se caracterizó a la efexina 3 como un integrante clave de cascadas de señalización esenciales en contextos oncogénicos y se identificaron acompañantes de señalización que formaron parte de firmas transcripcionales que correlacionan con un pronóstico menos favorable en pacientes con distintos tipos de cáncer.

Se identificaron acompañantes de señalización de efexina 3 en base a datos de expresión en el microambiente tumoral. Estos integran potenciales complejos funcionales involucrados en procesos de migración celular.

Se identificaron líneas celulares de cáncer sensibles al *Knock-out* de efexina 3 así como covulnerabilidades que correspondieron a acompañantes de señalización coexpresados en pacientes del TCGA con quienes integran ejes de señalización con potencial valor pronóstico.

Las estrategias de minería de datos del transcriptoma de pacientes con cáncer y de vulnerabilidad sintética en líneas cancerosas, siguiendo la expresión y esencialidad de efexina 3, nos llevaron a identificar acompañantes de señalización que conformaron 3 grupos de firmas transcripcionales que, al ser analizadas en el contexto de la sobrevivencia de los pacientes, tuvieron una correlación significativa. Dado que los acompañantes de señalización fueron seleccionados aplicando filtros para la identificación de proteínas con participación en la dinámica del citoesqueleto, éstos potencialmente integran complejos de señalización que promueven la diseminación de células cancerosas.

## 11. Referencias

- Alečković, M., McAllister, S. S., & Polyak, K. (2019). Metastasis as a systemic disease: molecular insights and clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, 1872(1), 89–102. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2019.06.002>
- Anderson, N. M., & Simon, M. C. (2020). The tumor microenvironment. *Current Biology: CB*, 30(16), R921–R925. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2020.06.081>
- ARHGEF16 protein expression summary - The Human Protein Atlas*. (n.d.). Retrieved December 6, 2022, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000130762-ARHGEF16>
- Aspenström, P. (2014). Atypical Rho GTPases RhoD and Rif integrate cytoskeletal dynamics and membrane trafficking. *Biological Chemistry*, 395(5), 477–484. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0296>
- Barnum, K. J., & O'Connell, M. J. (2014). Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods in Molecular Biology*, 1170, 29–40. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2\\_2/COVER](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2/COVER)
- Bejarano, L., Jordão, M. J. C., & Joyce, J. A. (2021). Therapeutic Targeting of the Tumor Microenvironment. *Cancer Discovery*, 11(4), 933–959. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1808>

- Binnewies, M., Roberts, E. W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D. F., Merad, M., Coussens, L. M., Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., Hedrick, C. C., Vonderheide, R. H., Pittet, M. J., Jain, R. K., Zou, W., Howcroft, T. K., Woodhouse, E. C., Weinberg, R. A., & Krummel, M. F. (2018). Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature Medicine*, *24*(5), 541–550. <https://doi.org/10.1038/S41591-018-0014-X>
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., & Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological Reviews*, *94*(1), 235–263. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00018.2013>
- Blom, M., Reis, K., Heldin, J., Kreuger, J., & Aspenström, P. (2017). The atypical Rho GTPase RhoD is a regulator of actin cytoskeleton dynamics and directed cell migration. *Experimental Cell Research*, *352*(2), 255–264. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.02.013>
- Burridge, K., & Guilluy, C. (2016). Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Experimental Cell Research*, *343*(1), 14. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2015.10.029>
- Castosa, R., Martinez-Iglesias, O., Roca-Lema, D., Casas-Pais, A., Díaz-Díaz, A., Iglesias, P., Santamarina, I., Graña, B., Calvo, L., Valladares-Ayerbes, M., Concha, Á., & Figueroa, A. (2018). Hakai overexpression effectively induces tumour progression and metastasis in vivo. *Scientific Reports*, *8*(1), 3466. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21808-w>
- Cervantes-Villagrana, R. D., Color-Aparicio, V. M., Reyes-Cruz, G., & Vázquez-Prado, J. (2019). Protumoral bone marrow-derived cells migrate via Gβγ-dependent signaling pathways and exhibit a complex repertoire of RhoGEFs. *Journal of Cell Communication and Signaling*, *13*(2), 179–191. <https://doi.org/10.1007/S12079-018-00502-6>
- Chan, A. M. L., McGovern, E. S., Catalano, G., Fleming, T. P., & Miki, T. (1994). Expression cDNA cloning of a novel oncogene with sequence similarity to regulators of small GTP-binding proteins. *Oncogene*, *9*(4), 1057–1063. <https://europepmc.org/article/med/8134109?fromsearch=singleresult#data>
- Chen, G., Li, T., Zhang, L., Yi, M., Chen, F., Wang, Z., & Zhang, X. (2011). Src-stimulated IRTKS phosphorylation enhances cell migration. *FEBS Letters*, *585*(19), 2972–2978. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.08.005>
- Chen, P., & Dey, P. (2022). Co-dependencies in the tumor immune microenvironment. *Oncogene*, *41*(31), 3821–3829. <https://doi.org/10.1038/S41388-022-02406-7>
- Cherfils, J., & Zeghouf, M. (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological Reviews*, *93*(1), 269–309. [https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00003.2012/SUPPL\\_FILE/TABLES1.PDF](https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00003.2012/SUPPL_FILE/TABLES1.PDF)
- Choi, H., & Moon, A. (2018). Crosstalk between cancer cells and endothelial cells: implications for tumor progression and intervention. *Archives of Pharmacal Research* *2018 41:7*, *41*(7), 711–724. <https://doi.org/10.1007/S12272-018-1051-1>
- Chong, C. R., & Jänne, P. A. (2013). The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nature Medicine*, *19*(11), 1389–1400. <https://doi.org/10.1038/nm.3388>
- Ciardello, F., & Tortora, G. (2008). EGFR Antagonists in Cancer Treatment. *New England Journal of Medicine*, *358*(11), 1160–1174. <https://doi.org/10.1056/NEJMr0707704>
- Clayton, N. S., & Ridley, A. J. (2020). Targeting Rho GTPase Signaling Networks in Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00222>
- Cornejo, F., Cortés, B. I., Findlay, G. M., & Cancino, G. I. (2021). LAR Receptor Tyrosine Phosphatase Family in Healthy and Diseased Brain. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.659951>
- Debily, M. A., Camarca, A., Ciullo, M., Mayer, C., el Marhomy, S., Ba, I., Jalil, A., Anzisi, A., Guardiola, J., & Piatier-Tonneau, D. (2004). Expression and molecular characterization of alternative transcripts of the ARHGEF5/TIM oncogene specific for human breast cancer. *Human Molecular Genetics*, *13*(3), 323–334. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDH024>
- DepMap: The Cancer Dependency Map Project at Broad Institute. (n.d.). Retrieved November 14, 2022, from <https://depmap.org/portal/depmap/>
- Devreotes, P., & Horwitz, A. R. (2015). Signaling Networks that Regulate Cell Migration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005959>

- Dong, Y., Wang, J., Sheng, Z., Li, G., Ma, H., Wang, X., Zhang, R., Lu, G., Hu, Q., Sugimura, H., & Zhou, X. (2009). Downregulation of EphA1 in colorectal carcinomas correlates with invasion and metastasis. *Modern Pathology*, 22(1), 151–160. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.188>
- Dunah, A. W., Hueske, E., Wyszynski, M., Hoogenraad, C. C., Jaworski, J., Pak, D. T., Simonetta, A., Liu, G., & Sheng, M. (2005). LAR receptor protein tyrosine phosphatases in the development and maintenance of excitatory synapses. *Nature Neuroscience*, 8(4), 458–467. <https://doi.org/10.1038/nn1416>
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., & Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474(7350), 179–183. <https://doi.org/10.1038/nature10137>
- Fan, L., Pellegrin, S., Scott, A., & Mellor, H. (2010). The small GTPase Rif is an alternative trigger for the formation of actin stress fibers in epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 123(8), 1247–1252. <https://doi.org/10.1242/jcs.061754>
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 28. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Figuroa, A., Kotani, H., Toda, Y., Mazan-Mamczarz, K., Mueller, E.-C., Otto, A., Disch, L., Norman, M., Ramdasi, R. M., Keshtgar, M., Gorospe, M., & Fujita, Y. (2009). Novel Roles of Hakai in Cell Proliferation and Oncogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 20(15), 3533–3542. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-08-0845>
- Fu, J., Su, X., Li, Z., Deng, L., Liu, X., Feng, X., & Peng, J. (2021). HGF/c-MET pathway in cancer: from molecular characterization to clinical evidence. *Oncogene*, 40(28), 4625–4651. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01863-w>
- Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H. E. M., Behrens, J., Sommer, T., & Birchmeier, W. (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nature Cell Biology*, 4(3), 222–231. <https://doi.org/10.1038/ncb758>
- Fukushima, H., Yasumoto, M., Ogasawara, S., Akiba, J., Kitasato, Y., Nakayama, M., Naito, Y., Ishida, Y., Okabe, Y., Yasunaga, M., Horiuchi, H., Sakamoto, E., Itadani, H., Mizuarai, S., Oie, S., & Yano, H. (2016). ARHGEF15 overexpression worsens the prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma through enhancing the motility and proliferative activity of the cancer cells. *Molecular Cancer*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12943-016-0516-4/FIGURES/7>
- Gadiya, M., & Chakraborty, G. (2018). Signaling by discoidin domain receptor 1 in cancer metastasis. *Cell Adhesion & Migration*, 1–9. <https://doi.org/10.1080/19336918.2018.1520556>
- Ganesh, K., & Massagué, J. (2021). Targeting metastatic cancer. *Nature Medicine*, 27(1), 34. <https://doi.org/10.1038/S41591-020-01195-4>
- Ganini, C., Amelio, I., Bertolo, R., Bove, P., Buonomo, O. C., Candi, E., Cipriani, C., di Daniele, N., Juhl, H., Mauriello, A., Marani, C., Marshall, J., Melino, S., Marchetti, P., Montanaro, M., Natale, M. E., Novelli, F., Palmieri, G., Piacentini, M., ... Melino, G. (2021). Global mapping of cancers: The Cancer Genome Atlas and beyond. *Molecular Oncology*, 15(11), 2823–2840. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13056>
- Goh, W. I., Lim, K. B., Sudhakaran, T., Sem, K. P., Bu, W., Chou, A. M., & Ahmed, S. (2012). mDia1 and WAVE2 Proteins Interact Directly with IRSp53 in Filopodia and Are Involved in Filopodium Formation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(7), 4702–4714. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.305102>
- Goh, W. I., Sudhakaran, T., Lim, K. B., Sem, K. P., Lau, C. L., & Ahmed, S. (2011). Rif-mDia1 Interaction Is Involved in Filopodium Formation Independent of Cdc42 and Rac Effectors. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 13681–13694. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.182683>
- Goicoechea, S. M., Awadia, S., & Garcia-Mata, R. (2014). I'm coming to GEF you: Regulation of RhoGEFs during cell migration. *Cell Adhesion & Migration*, 8(6). <https://doi.org/10.4161/cam.28721>
- Guan, X., Guan, X., Dong, C., & Jiao, Z. (2020). Rho GTPases and related signaling complexes in cell migration and invasion. *Experimental Cell Research*, 388(1). <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2020.111824>

- Haga, R. B., & Ridley, A. J. (2016). Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. *https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1232583*, 7(4), 207–221. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1232583>
- Harada, K., Hiramoto-Yamaki, N., Negishi, M., & Katoh, H. (2011). Ephexin4 and EphA2 mediate resistance to anoikis through RhoG and phosphatidylinositol 3-kinase. *Experimental Cell Research*, 317(12), 1701–1713. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.05.014>
- Henke, E., Nandigama, R., & Ergün, S. (2020). Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6, 160. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2019.00160/BIBTEX>
- Hernández-García, R., Iruela-Arispe, M. L., Reyes-Cruz, G., & Vázquez-Prado, J. (2015). Endothelial RhoGEFs: A systematic analysis of their expression profiles in VEGF-stimulated and tumor endothelial cells. *Vascular Pharmacology*, 74, 60–72. <https://doi.org/10.1016/J.VPH.2015.10.003>
- Hida, K., Maishi, N., Torii, C., & Hida, Y. (2016). Tumor angiogenesis--characteristics of tumor endothelial cells. *International Journal of Clinical Oncology*, 21(2), 206–212. <https://doi.org/10.1007/S10147-016-0957-1>
- Hinshaw, D. C., & Shevde, L. A. (2019). The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Research*, 79(18), 4557. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962>
- Hiramoto-Yamaki, N., Takeuchi, S., Ueda, S., Harada, K., Fujimoto, S., Negishi, M., & Katoh, H. (2010). Ephexin4 and EphA2 mediate cell migration through a RhoG-dependent mechanism. *Journal of Cell Biology*, 190(3), 461–477. <https://doi.org/10.1083/JCB.201005141>
- Hirata, E., & Sahai, E. (2017). Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026781>
- Hodge, R. G., & Ridley, A. J. (2016). Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2016 17:8, 17(8), 496–510. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.67>
- Huang, D., Wang, Y., Xu, L., Chen, L., Cheng, M., Shi, W., Xiong, H., Zalli, D., & Luo, S. (2018). GLI2 promotes cell proliferation and migration through transcriptional activation of ARHGEF16 in human glioma cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37(1), 247. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0917-x>
- IARC. (2020). *Cancer Tomorrow, Estimated number of deaths from 2020 to 2040, Both sexes, age [0-85+]*. <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype>
- Jaiswal, M., Fansa, E. K., Dvorsky, R., & Ahmadian, M. R. (2013). New insight into the molecular switch mechanism of human Rho family proteins: shifting a paradigm. *Bchm*, 394(1), 89–95. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0207>
- Janiszewska, M., Primi, M. C., & Izard, T. (2020). Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *Journal of Biological Chemistry*, 295(8), 2495–2505. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.007759>
- Kim, J., Chang, I. Y., & You, H. J. (2022). Interactions between EGFR and EphA2 promote tumorigenesis through the action of Ephexin1. *Cell Death & Disease* 2022 13:6, 13(6), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04984-6>
- Kim, J., Jeon, Y. J., Lim, S. C., Ryu, J., Lee, J. H., Chang, I. Y., & You, H. J. (2021). Akt-mediated Ephexin1–Ras interaction promotes oncogenic Ras signaling and colorectal and lung cancer cell proliferation. *Cell Death & Disease* 2021 12:11, 12(11), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04332-0>
- Kim, K., Lee, S. A., & Park, D. (2019). Emerging Roles of Ephexins in Physiology and Disease. *Cells* 2019, Vol. 8, Page 87, 8(2), 87. <https://doi.org/10.3390/CELLS8020087>
- Kocarnik, J. M., Compton, K., Dean, F. E., Fu, W., Gaw, B. L., Harvey, J. D., Henrikson, H. J., Lu, D., Pennini, A., Xu, R., Ababneh, E., Abbasi-Kangevari, M., abbastabar, H., Abd-Elsalam, S. M., Abdoli, A., Abedi, A., Abidi, H., Abolhassani, H., Adedeji, I. A., ... Force, L. M. (2022). Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life Years for 29 Cancer Groups From 2010 to 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *JAMA Oncology*, 8(3), 420–444. <https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2021.6987>
- Koh, M., Woo, Y., Valiathan, R. R., Jung, H. Y., Park, S. Y., Kim, Y. N., Kim, H.-R. C., Fridman, R., & Moon, A. (2015). Discoidin domain receptor 1 is a novel transcriptional target of ZEB1 in breast epithelial cells undergoing H-Ras-

- induced epithelial to mesenchymal transition. *International Journal of Cancer*, 136(6), E508–E520. <https://doi.org/10.1002/ijc.29154>
- Koizumi, K., Takano, K., Kaneyasu, A., Watanabe-Takano, H., Tokuda, E., Abe, T., Watanabe, N., Takenawa, T., & Endo, T. (2012). RhoD activated by fibroblast growth factor induces cytoneme-like cellular protrusions through mDia3C. *Molecular Biology of the Cell*, 23(23), 4647–4661. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-04-0315>
- Komiya, Y., Onodera, Y., Kuroiwa, M., Nomimura, S., Kubo, Y., Nam, J. M., Kajiwara, K., Nada, S., Oneyama, C., Sabe, H., & Okada, M. (2016). The Rho guanine nucleotide exchange factor ARHGEF5 promotes tumor malignancy via epithelial–mesenchymal transition. *Oncogenesis* 2016 5:9, 5(9), e258–e258. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2016.59>
- Kuroiwa, M., Oneyama, C., Nada, S., & Okada, M. (2011). The guanine nucleotide exchange factor Arhgef5 plays crucial roles in Src-induced podosome formation. *Journal of Cell Science*, 124(10), 1726–1738. <https://doi.org/10.1242/JCS.080291>
- Kusuhara, S., Fukushima, Y., Fukuhara, S., Jakt, L. M., Okada, M., Shimizu, Y., Hata, M., Nishida, K., Negi, A., Hirashima, M., Mochizuki, N., Nishikawa, S. I., & Uemura, A. (2012). Arhgef15 promotes retinal angiogenesis by mediating VEGF-induced Cdc42 activation and potentiating RhoJ inactivation in endothelial cells. *PLoS One*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0045858>
- Lamar, J. M., Xiao, Y., Norton, E., Jiang, Z.-G., Gerhard, G. M., Kooner, S., Warren, J. S. A., & Hynes, R. O. (2019). SRC tyrosine kinase activates the YAP/TAZ axis and thereby drives tumor growth and metastasis. *Journal of Biological Chemistry*, 294(7), 2302–2317. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004364>
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, 168(4), 670–691. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.11.037>
- Lehtimäki, J., Hakala, M., & Lappalainen, P. (2017). Actin filament structures in migrating cells. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 235, 123–152. [https://doi.org/10.1007/164\\_2016\\_28/FIGURES/2](https://doi.org/10.1007/164_2016_28/FIGURES/2)
- Lei, X., Lei, Y., Li, J. K., Du, W. X., Li, R. G., Yang, J., Li, J., Li, F., & Tan, H. B. (2020). Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy. *Cancer Letters*, 470, 126–133. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2019.11.009>
- Li, T., Kang, G., Wang, T., & Huang, H. (2018). Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer. *Oncology Letters*, 16(1), 687. <https://doi.org/10.3892/OL.2018.8733>
- Li, Y., Ye, Z., Chen, S., Pan, Z., Zhou, Q., Li, Y. Z., Shuai, W. di, Kuang, C. M., Peng, Q. H., Shi, W., Mao, X., Liu, R. Y., & Huang, W. (2018). ARHGEF19 interacts with BRAF to activate MAPK signaling during the tumorigenesis of non-small cell lung cancer. *International Journal of Cancer*, 142(7), 1379–1391. <https://doi.org/10.1002/IJC.31169>
- Liao, Z., Tan, Z. W., Zhu, P., & Tan, N. S. (2019). Cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment – Accomplices in tumor malignancy. *Cellular Immunology*, 343, 103729. <https://doi.org/10.1016/J.CELLIMM.2017.12.003>
- Luo, J., Solimini, N. L., & Elledge, S. J. (2009). Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell*, 138(4), 807. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.08.006>
- Majidpoor, J., & Mortezaee, · Keywan. (2021). *Steps in metastasis: an updated review*. 38, 3. <https://doi.org/10.1007/s12032-020-01447-w>
- Massagué, J., & Obenauf, A. C. (2016). Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*, 529(7586), 298–306. <https://doi.org/10.1038/NATURE17038>
- Mihira, H., Suzuki, H. I., Akatsu, Y., Yoshimatsu, Y., Igarashi, T., Miyazono, K., & Watabe, T. (2012). TGF- $\beta$ -induced mesenchymal transition of MS-1 endothelial cells requires Smad-dependent cooperative activation of Rho signals and MRTF-A. *The Journal of Biochemistry*, 151(2), 145–156. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr121>
- Nallanthighal, S., Heiserman, J. P., & Cheon, D. J. (2019). The Role of the Extracellular Matrix in Cancer Stemness. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 86. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2019.00086>
- Ogita, H., Kunimoto, S., Kamioka, Y., Sawa, H., Masuda, M., & Mochizuki, N. (2003). EphA4-Mediated Rho Activation via Vsm-RhoGEF Expressed Specifically in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*, 93(1), 23–31. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000079310.81429.C8>



- Park, J., Kim, S. W., Lyons, J. P., Ji, H., Nguyen, T. T., Cho, K., Barton, M. C., Deroo, T., Vleminckx, K., & McCrea, P. D. (2005). Kaiso/p120-Catenin and TCF/ $\beta$ -Catenin Complexes Coordinately Regulate Canonical Wnt Gene Targets. *Developmental Cell*, 8(6), 843–854. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.04.010>
- Pellegrin, S., & Mellor, H. (2005). The Rho Family GTPase Rif Induces Filopodia through mDia2. *Current Biology*, 15(2), 129–133. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.011>
- Petroni, G., Buqué, A., Coussens, L. M., & Galluzzi, L. (2022). Targeting oncogene and non-oncogene addiction to inflame the tumour microenvironment. *Nature Reviews Drug Discovery* 2022 21:6, 21(6), 440–462. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00415-5>
- Ping, Q., Yan, R., Cheng, X., Wang, W., Zhong, Y., Hou, Z., Shi, Y., Wang, C., & Li, R. (2021). Cancer-associated fibroblasts: overview, progress, challenges, and directions. *Cancer Gene Therapy* 2021 28:9, 28(9), 984–999. <https://doi.org/10.1038/s41417-021-00318-4>
- Postema, M. M., Grega-Larson, N. E., Neining, A. C., & Tyska, M. J. (2018). IRTKS (BAIAP2L1) Elongates Epithelial Microvilli Using EPS8-Dependent and Independent Mechanisms. *Current Biology*, 28(18), 2876–2888.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.022>
- Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, 19(11), 1423–1437. <https://doi.org/10.1038/NM.3394>
- Reynolds, A. B. (2007). p120-catenin: Past and present. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(1), 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.09.019>
- Rodrigues, N. R., Theodosiou, A. M., Nesbit, M. A., Campbell, L., Tandle, A. T., Saranath, D., & Davies, K. E. (2000). Characterization of Ngef, a Novel Member of the Dbl Family of Genes Expressed Predominantly in the Caudate Nucleus. *Genomics*, 65(1), 53–61. <https://doi.org/10.1006/GENO.2000.6138>
- Rodríguez-Rigueiro, T., Valladares-Ayerbes, M., Haz-Conde, M., Aparicio, L. A., & Figueroa, A. (2011). Hakai reduces cell-substratum adhesion and increases epithelial cell invasion. *BMC Cancer*, 11(1), 474. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-474>
- Sadok, A., & Marshall, C. J. (2014). Rho GTPases: masters of cell migration. *Small GTPases*, 5(4). <https://doi.org/10.4161/SGTP.29710>
- Sahin, M., Greer, P. L., Lin, M. Z., Poucher, H., Eberhart, J., Schmidt, S., Wright, T. M., Shamah, S. M., O’Connell, S., Cowan, C. W., Hu, L., Goldberg, J. L., Debant, A., Corfas, G., Krull, C. E., & Greenberg, M. E. (2005). Eph-Dependent Tyrosine Phosphorylation of Ephexin1 Modulates Growth Cone Collapse. *Neuron*, 46(2), 191–204. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2005.01.030>
- Sarhan, A. R., Patel, T. R., Creese, A. J., Tomlinson, M. G., Hellberg, C., Heath, J. K., Hotchin, N. A., & Cunningham, D. L. (2016). Regulation of Platelet Derived Growth Factor Signaling by Leukocyte Common Antigen-related (LAR) Protein Tyrosine Phosphatase: A Quantitative Phosphoproteomics Study. *Molecular & Cellular Proteomics*, 15(6), 1823–1836. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.053652>
- Sasaki, S., Takei, Y., Ito, M., Nakagawara, A., Fujiwara, T., Takahashi, E., Muto, T., Tokino, T., & Nakamura, Y. (1996, November). Isolation and characterization of a candidate gene for human neuroblastoma mapped to 1p36.3, NBR: a new member of the Rho/Rac GEF family. EMBL/GenBank/DDBJ. <https://www.uniprot.org/citations/CI-IT18KKM1VLAE>
- Schaks, M., Giannone, G., & Rottner, K. (2019). Actin dynamics in cell migration. *Essays in Biochemistry*, 63(5), 483–495. <https://doi.org/10.1042/EBC20190015>
- SenGupta, S., Parent, C. A., & Bear, J. E. (2021). The principles of directed cell migration. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 22(8), 529–547. <https://doi.org/10.1038/S41580-021-00366-6>
- Shellard, A., & Mayor, R. (2020). All Roads Lead to Directional Cell Migration. *Trends in Cell Biology*, 30(11), 852–868. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2020.08.002>
- Shin, K., Straight, S., & Margolis, B. (2005). PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells. *Journal of Cell Biology*, 168(5), 705–711. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408064>

- Sobierajska, K., Ciszewski, W. M., Sacewicz-Hofman, I., & Niewiarowska, J. (2020). Endothelial Cells in the Tumor Microenvironment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1234, 71–86. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-37184-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-37184-5_6)
- Soto, E., Yanagisawa, M., Marlow, L. A., Copland, J. A., Perez, E. A., & Anastasiadis, P. Z. (2008). p120 catenin induces opposing effects on tumor cell growth depending on E-cadherin expression. *Journal of Cell Biology*, 183(4), 737–749. <https://doi.org/10.1083/jcb.200805113>
- Spring, C. M., Kelly, K. F., O’Kelly, I., Graham, M., Crawford, H. C., & Daniel, J. M. (2005). The catenin p120ctn inhibits Kaiso-mediated transcriptional repression of the  $\beta$ -catenin/TCF target gene matrilysin. *Experimental Cell Research*, 305(2), 253–265. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.01.007>
- Svensmark, J. H., & Brakebusch, C. (2019). Rho GTPases in cancer: friend or foe? *Oncogene*, 38(50), 7447–7456. <https://doi.org/10.1038/S41388-019-0963-7>
- Svitkina, T. (2018). The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(1). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A018267>
- Tabassum, D. P., & Polyak, K. (2015). Tumorigenesis: it takes a village. *Nature Reviews Cancer* 2015 15:8, 15(8), 473–483. <https://doi.org/10.1038/nrc3971>
- Tao, L., Huang, G., Song, H., Chen, Y., & Chen, L. (2017). Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment (review). *Oncology Letters*, 14(3), 2611–2620. <https://doi.org/10.3892/OL.2017.6497/HTML>
- Tomczak, K., Czerwińska, P., & Wiznerowicz, M. (2015). The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemporary Oncology (Poznan, Poland)*, 19(1A), A68–A77. <https://doi.org/10.5114/WO.2014.47136>
- Torti, D., & Trusolino, L. (2011). Oncogene addiction as a foundational rationale for targeted anti-cancer therapy: promises and perils. *EMBO Molecular Medicine*, 3(11), 623–636. <https://doi.org/10.1002/EMMM.201100176>
- Trusolino, L., Bertotti, A., & Comoglio, P. M. (2010). MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010 11:12, 11(12), 834–848. <https://doi.org/10.1038/nrm3012>
- Tsherniak, A., Vazquez, F., Montgomery, P. G., Weir, B. A., Kryukov, G., Cowley, G. S., Gill, S., Harrington, W. F., Pantel, S., Krill-Burger, J. M., Meyers, R. M., Ali, L., Goodale, A., Lee, Y., Jiang, G., Hsiao, J., Gerath, W. F. J., Howell, S., Merkel, E., ... Hahn, W. C. (2017). Defining a Cancer Dependency Map. *Cell*, 170(3), 564. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.06.010>
- Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell*, 147(2), 275–292. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.09.024>
- van Zijl, F., Krupitza, G., & Mikulits, W. (2011). Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation Research*, 728(1–2), 23–34. <https://doi.org/10.1016/J.MRREV.2011.05.002>
- Viallard, C., & Larrivé, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, 20(4), 409–426. <https://doi.org/10.1007/S10456-017-9562-9>
- Vizurraga, A., Adhikari, R., Yeung, J., Yu, M., & Tall, G. G. (2020). Mechanisms of adhesion G protein-coupled receptor activation. *Journal of Biological Chemistry*, 295(41). <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.007423>
- Walston, H., Iness, A. N., & Litovchick, L. (2021). DREAM On: Cell Cycle Control in Development and Disease. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Genet-071819-103836>, 55, 309–329. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-071819-103836>
- Wang, Y., Suzuki, H., Yokoo, T., Tada-Iida, K., Kihara, R., Miura, M., Watanabe, K., Sone, H., Shimano, H., Toyoshima, H., & Yamada, N. (2004). WGEF is a novel RhoGEF expressed in intestine, liver, heart, and kidney. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(3), 1053–1058. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2004.09.153>
- Wang, Y., Yu, H., Shan, Y., Tao, C., Wu, F., Yu, Z., Guo, P., Huang, J., Li, J., Zhu, Q., Yu, F., Song, Q., Shi, H., Zhou, M., & Chen, G. (2016). EphA1 activation promotes the homing of endothelial progenitor cells to hepatocellular carcinoma for tumor neovascularization through the SDF-1/CXCR4 signaling pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0339-6>

- Wang, Z. (2017). *ErbB Receptors and Cancer* (pp. 3–35). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7219-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7219-7_1)
- Wang, Z., Kan, G., Sheng, C., Yao, C., Mao, Y., & Chen, S. (2020). ARHGEF19 regulates MAPK/ERK signaling and promotes the progression of small cell lung cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 533(4), 792–799. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2020.09.085>
- Weinstein, I. B., & Joe, A. K. (2006). Mechanisms of Disease: oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nature Clinical Practice Oncology* 2006 3:8, 3(8), 448–457. <https://doi.org/10.1038/ncponc0558>
- Weinstein, J. N., Collisson, E. A., Mills, G. B., Mills Shaw, K. R., Ozenberger, B. A., Ellrott, K., Shmulevich, I., Sander, C., & Stuart, J. M. (2013). The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/ng.2764>
- Welch, D. R., & Hurst, D. R. (2019). Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Research*, 79(12), 3011. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0458>
- Wenzel, E. S., & Singh, A. T. K. (2018). Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer. *In Vivo*, 32(1).
- Williams, G. H., & Stoeber, K. (2012). The cell cycle and cancer. *The Journal of Pathology*, 226(2), 352–364. <https://doi.org/10.1002/PATH.3022>
- Wu, Y., Du, Z., Mou, J., Qiu, X., Chen, J., Cai, S., Ren, D., Xiao, F., Zhou, G., & Yuan, C. (2022). The Functions of EphA1 receptor tyrosine kinase in Several Tumors. *Current Medicinal Chemistry*, 29. <https://doi.org/10.2174/0929867329666220820125638>
- Xie, R., Wang, X., Qi, G., Wu, Z., Wei, R., Li, P., & Zhang, D. (2016). DDR1 enhances invasion and metastasis of gastric cancer via epithelial-mesenchymal transition. *Tumor Biology*, 37(9), 12049–12059. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5070-6>
- Xie, X., Chang, S. W., Tatsumoto, T., Chan, A. M. L., & Miki, T. (2005). TIM, a Dbl-related protein, regulates cell shape and cytoskeletal organization in a Rho-dependent manner. *Cellular Signalling*, 17(4), 461–471. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2004.09.012>
- Young, K. A., Biggins, L., & Sharpe, H. J. (2021). Protein tyrosine phosphatases in cell adhesion. *Biochemical Journal*, 478(5), 1061–1083. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200511>
- Yu, B., Xu, L., Chen, L., Wang, Y., Jiang, H., Wang, Y., Yan, Y., Luo, S., & Zhai, Z. (2020). FYN is required for ARHGEF16 to promote proliferation and migration in colon cancer cells. *Cell Death & Disease* 2020 11:8, 11(8), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02830-1>
- Zambelli, A., Biamonti, G., & Amato, A. (2021). *HGF/c-Met Signalling in the Tumor Microenvironment* (pp. 31–44). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-47189-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-47189-7_2)
- Zhang, M., Lin, L., Wang, C., & Zhu, J. (2021). Double inhibition and activation mechanisms of Ephexin family RhoGEFs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(8). <https://doi.org/10.1073/pnas.2024465118>
- Zhao, Z., & Manser, E. (2005). PAK and other Rho-associated kinases – effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochemical Journal*, 386(2), 201–214. <https://doi.org/10.1042/BJ20041638>
- Zhong, X., Zhang, W., & Sun, T. (2019). DDR1 promotes breast tumor growth by suppressing antitumor immunity. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7338>
- Zhou, J., Tao, Y., Peng, C., Gu, P., & Wang, W. (2014). miR-503 regulates metastatic function through Rho guanine nucleotide exchanger factor 19 in hepatocellular carcinoma. *Journal of Surgical Research*, 188(1), 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.12.006>