



PARTICIPACIÓN DE P-REX1, UN NUEVO GEF PARA RAC, EN LA ACCIÓN QUIMIOTÁCTICA INDUCIDA POR IL-8.

Carretero Ortega J¹., Hernández García R¹., Reyes Cruz G.², Vázquez Prado J¹.
¹Sección Externa de Farmacología, ²Departamento de Biología Celular. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Col. San Pedro Zacatenco, C.P. 07360, Tel. 50613800 ext. 2458, Fax (52-55) 50-61-33-94 e-mail: jcarrete@mail.cinvestav.mx

RESUMEN

La migración celular es esencial para muchos procesos biológicos, en los cuales existe un rearrreglo en el ensamble y la organización del citoesqueleto de actina, que es regulado por proteínas celulares en donde destacan las GTPasas de bajo peso molecular de la familia de Rho: Cdc42, Rac y Rho. Cada una de estas GTPasas, se activan por moléculas llamadas GEFs (Factores intercambiadores de Nucleótidos de Guanina), para el caso de la GTPasa Rac se ha encontrado recientemente un nuevo GEF denominado P-Rex1, y es el único GEF conocido que es activado por la subunidad G $\beta\gamma$, que es liberada una vez que es activado algún receptor de siete hélices transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs), dicha activación del receptor puede llevarse a cabo por estímulos de quimocinas tales como interleucina-8 (IL-8), la cual activa al receptor CXCR2, que se encuentra acoplado a proteínas G α_i y participa en procesos de migración celular tales como la angiogénesis, de ahí la importancia de determinar la participación de P-Rex1 en la acción quimiotáctica inducida por IL-8.

INTRODUCCIÓN

La migración celular es esencial para muchos procesos biológicos, entre ellos se incluye a la angiogénesis, (formación de vasos sanguíneos a partir de lechos capilares preexistentes) que está involucrada en varias condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, incluyendo el desarrollo embrionario, reparación de tejidos, inflamación crónica, metastasis y crecimiento tumoral. Otro ejemplo que hace evidente la participación de la migración celular es el direccionamiento o movimiento de las células a los sitios de infección. En todos estos procesos se ha visto que existe un rearrreglo en el ensamble y la organización del citoesqueleto de actina, el cual es regulado por proteínas celulares en donde destacan las GTPasas de bajo peso molecular de la familia de Rho. (1,2)

Todas estas GTPasas actúan como switches moleculares que oscilan entre un estado inactivo (cuando su dominio catalítico está ocupado por GDP), o un estado activo (cuando unen GTP), y éste ciclo es principalmente regulado por tres grupos de proteínas. Las proteínas del primer grupo son conocidas como: Factores Intercambiadores de Nucleótidos de Guanina (**GEFs**), los cuales promueven el intercambio de GDP por GTP y consecuentemente activan a estas GTPasas. Todos los GEFs de la familia de Rho contienen un dominio homólogo a Dbl (DH) que presenta la actividad catalítica y un dominio adyacente homólogo a Pleckstrina (PH), el cual, media la localización en membrana debido a su capacidad de interaccionar con lípidos, sin embargo, evidencia estructural y bioquímica sugiere que éste dominio pudiera afectar directamente la actividad del dominio catalítico. La segunda clase de proteínas reguladoras está constituida por las **GAPs** (Proteínas Activadoras de GTPasa), que

son las responsables de incrementar la velocidad de hidrólisis del GTP a GDP, y por lo tanto su inactivación, por último se tiene a los Inhibidores de la Disociación de Nucleótidos de Guanina (**GDIs**), los cuales secuestran en el citoplasma a las GTPasas de Rho en su estado inactivo (enlazando GDP) e inhiben el intercambio GDP-GTP. (1,2)

Las GTPasas de la familia de Rho pueden ser divididas en cinco grupos, en donde los miembros más extensamente caracterizados son Rho (A, B, C), Rac (1, 2, 3) y Cdc42, que, una vez que son activadas llevan, respectivamente a la formación de fibras de estrés y complejos de adhesión focal, formación de lamelipodios y filopodios, estructuras que normalmente son observadas en la locomoción de las células en cultivo. (3)

La señalización de las GTPasas de Rho depende de la estimulación extracelular sobre receptores de membrana, entre los que destacan los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (4,5). La activación de estos receptores es mediado por la asociación de un complejo ternario formado por el agonista (estímulo extracelular), el receptor y el heterotrímero de proteína G, esta última consiste de una subunidad α la cual enlaza e hidroliza GTP, así también como una subunidad β y una γ . Las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ de las proteínas G heterotriméricas forman un complejo no disociable que representa una unidad funcional. Para poder llevar a cabo la transducción de señales desde un receptor activado hasta un efector, las proteínas G heterotriméricas sufren un ciclo de activación-inactivación que permite a la proteína G funcionar como un switch molecular. En el estado basal, el complejo $G\beta\gamma$ y la subunidad $G\alpha$ enlazada a GDP están asociados, en éste estado la proteína G puede interactuar con un receptor previamente activado, dando como resultado de dicha interacción el intercambio del GDP, por GTP en la subunidad $G\alpha$, trayendo como consecuencia un cambio conformacional y por lo tanto la disociación de la subunidad $G\alpha$ y del complejo $G\beta\gamma$. Tanto la subunidad $G\alpha$ enlazada a GTP, como el complejo $G\beta\gamma$ son capaces de interactuar con proteínas efectoras y regular sus funciones. La activación de las proteínas G termina por la hidrólisis del GTP, en donde el GDP remanente permanece unido a la subunidad $G\alpha$ permitiendo así su reasociación con el complejo $\beta\gamma$, dicho en otras palabras, la reasociación de la proteína G heterotrimérica inducida por la hidrólisis del GTP representa el mecanismo de inactivación tanto de la subunidad α como del complejo $\beta\gamma$.(5)

Como se mencionó anteriormente, la actividad de las proteínas de la familia de Rho es regulada por una gran variedad de estímulos extracelulares tales como factores de crecimiento y citocinas. Entre estas citocinas cabe mencionar al grupo quimiotáctico de la gran familia de quimocinas ELR⁺C-X-C. En diversos estudios ha sido demostrado que las quimocinas CXC que contienen el motivo ELR (ELR⁺), tal como la interleucina 8 (CXCL8) y el Oncogen Relacionado al Crecimiento ($GRO_{\alpha,\beta}$ y γ) son potentes inductores de angiogénesis in vivo, además, en los últimos años se ha demostrado que estas citocinas interactúan con la familia de receptores para quimocinas CXC (CXCR), los cuales pertenecen a la gran familia de receptores de siete hélices transmembranales acoplados a proteínas G. Actualmente se han identificado cinco receptores para quimocinas C-X-C en varias líneas celulares humanas, donde destacan las células endoteliales quienes expresan al receptor CXCR2, considerado el principal responsable de mediar quimotaxis en estas células en respuesta a IL-8. Adicionalmente

se sabe que dicho receptor es inhibido en presencia de la toxina pertussis (PTx), indicando que dicho receptor esta acoplado a proteínas G heterotriméricas de la familia $G_{i/o}$. Es bien conocido que la subunidad $G\beta\gamma$ desempeña un papel muy importante en la activación de diversos efectores, tales como, canales iónicos (Ca^{2+} y K^+), diferentes isoformas de la adenilato ciclasa, en respuesta a la activación de GPCRs acoplados a $G_{i/o}$. (6,7,8)

Actualmente existen una gran cantidad de GEFs para Rac, estos incluyen Vav (1,2,3), Tiam (1,2), Pix (α,β) y Sos. Recientemente se ha identificado un nuevo efector de $G\beta\gamma$ que actúa como un activador para Rac en neutrófilos, llamado P-Rex1, (PtdIns(3,4,5)P3-dependent-Rac-exchanger), mismo que puede detectar señales transducidas por lípidos fosfoinositidos y proteínas G heterotriméricas. Welch y colaboradores encontraron que el producto lipídico de la PI3-Cinasa, PIP_3 , activa factores intercambiadores para Rac en lisados de neutrófilos, además, una aportación particularmente significativa de P-Rex1, es que es el primer ejemplo de un factor intercambiador para GTPasas de la familia de Rho que es directamente estimulado por la subunidad $G\beta\gamma$, resaltando aquí la importancia de la participación de los GPCRs en la activación de GTPasas de la familia de Rho y en particular la activación de Rac, ya que ambos activadores de P-Rex1, PIP_3 y $G\beta\gamma$ son generados por la activación de este tipo de receptores. (4,5)

La secuencia proteica de P-Rex1 es de 1659 aminoácidos, dando lugar a una proteína de 185 kDa, que tiene un dominio en Tandem DH/PH típico de los GEFs de la familia de Rho, dos dominios DEP, y dos dominios PDZ. (Véase figura No. 1) (4). Los GPCRs no solo interactúan con proteínas G sino que también con una gran variedad de proteínas accesorias denominadas GIPs por sus siglas en inglés GPCR Interacting Proteins, entre las más abundantes se encuentran las proteínas con dominios PDZ, que generalmente, pero no siempre, interactúan con los dominios carboxilos terminales de diversos GPCRs, permitiendo a dichas proteínas localizarse cerca de la membrana plasmática donde se activan los receptores, tal y como puede ser el caso del GEF, P-Rex1, a través de sus dominios en tandem PDZ-PDZ.



Figura No. 1. Representación esquemática de los dominios de P-Rex1. El GEF para Rac, P-Rex1 presenta en su extremo amino terminal un arreglo modular conformado por diversos dominios proteicos cada uno con características específicas, entre ellos destacan el dominio catalítico DH, y el dominio PH capaz de interactuar con fosfolípidos de membrana.

Como se mencionó, muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, dependen de la migración celular polarizada y ésta a su vez de la activación de GTPasas de bajo peso de la familia de Rho por lo que resultaría de gran relevancia identificar si P-Rex1 es un mediador en la activación de Rac en células endoteliales en respuesta a IL-8, una quimocina con propiedades angiogénicas que promueve la migración de las células endoteliales dependiente del receptor CXCR2.

HIPÓTESIS: P-Rex1, es un mediador de la migración celular polarizada inducida por IL8 a través del receptor CXCR2”

Objetivo General: Determinar la participación del GEF para Rac, P-Rex1, en la acción quimiotáctica inducida por IL-8.

Objetivos particulares

- Determinar la participación de P-Rex1 en la activación de Rac y cambios en el citoesqueleto.
- Determinar la participación de P-Rex1 en la migración celular inducida por IL-8.
- Determinar una posible interacción directa entre el receptor para IL-8 y el GEF para Rac, P-Rex1.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Materiales

Los DNAs y líneas celulares fueron obtenidos de aquellos originalmente generados en el laboratorio del Dr. Silvio Gutkind (NIDCR-NIH. Bethesda EEUU). La quimocina CXCL8 fue comprada a Sigma-Aldrich. El anticuerpo anti-Rac fue comprado de Transduction Laboratories, el anticuerpo anti-ratón conjugado a Peroxidasa fue comprado de Biosciences, el anticuerpo anti-EGFP fue comprado de Cavance.

Cultivo celular y Transfección

Las células HEK 293T y PAE fueron cultivadas en medio DMEM suplementado al 10 % con suero fetal bovino a 37°C y 5% de CO₂, Para las células PAE la transfección se realizó con POLYFECT (Qiagen) y para las HEK 293T se transfectaron con Lipofectamina-Plus (Invitrogen Life Technology) de acuerdo a los protocolos del fabricante.

Ensayo de activación de la GTPasa Rac a través de métodos de precipitación por afinidad.

Los ensayos de Rac1 basados en el dominio de unión a p21 (PBD) fueron realizados como se describió por Benard y Bokoch (15). Brevemente, las células HEK 293T y PAE transfectadas con el receptor CXCR2 o cotransfectadas con la dominante negativa de P-Rex1 (N-terminal-ΔDH) o EGFP-PDZ-PDZ fueron estimuladas con IL-8 a una concentración de 3nM durante 15 minutos e inmediatamente lisándolas con un buffer conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas y MgCl₂ 10mM. Los lisados celulares obtenidos fueron incubados con esferas GST-PBD durante 45 minutos a 4°C. Los niveles de GTP unido y totales fueron detectados por Western blot usando anticuerpo contra Rac1.

Ensayo de quimiotaxis

La cámara de Boyden de 12 pozos (Neuroprobe) fue usada para los ensayos de quimiotaxis. Células PAE cotransfectadas con el receptor CXCR2 y con la dominante negativa para P-Rex1 (N-terminal-ΔDH) o bien cotransfectadas con EGFP-PDZ-PDZ. 48 horas después de la transfección fueron tripsinizadas y lavadas con DMEM libre de suero con 0.1% BSA. Los compartimentos inferiores de la cámara de Boyden fueron llenados con IL-8 3nM o bien con medio DMEM libre de suero con 0.1% de BSA como control negativo o HGF 10ng/ml como control positivo, una vez llenados los pozos inferiores, inmediatamente fue colocada una membrana de policarbonato (con un poro

de 8 μm), sin atrapar burbujas de aire. La membrana fue cubierta previamente con fibronectina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante toda la noche a 4°C. Cien microlitros de células con una densidad de 10⁶ células/ml fueron transferidos a los compartimentos superiores y la cámara fue incubada a 37°C y 5% de CO₂ durante 8 horas. La membrana fue entonces removida, y las células fijadas con metanol absoluto. Las células que no lograron atravesar la membrana fueron raspadas de la cara superior de la membrana, mientras que las células de la cara inferior de la membrana fueron teñidas con cristal violeta al 1% y lavadas extensivamente con PBS. Las células que fueron capaces de migrar a través de la membrana fueron observadas al microscopio usando un objetivo a 20X y fotografiadas.

RESULTADOS

Activación de Rac inducida por IL-8 (3nM) a través del receptor CXCR2.

En la figura No. 2 se muestra el Western blot correspondiente al curso temporal de la activación de Rac en células HEK 293T transfectadas con el receptor CXCR2 y estimuladas con IL-8 a una concentración de 3nM.

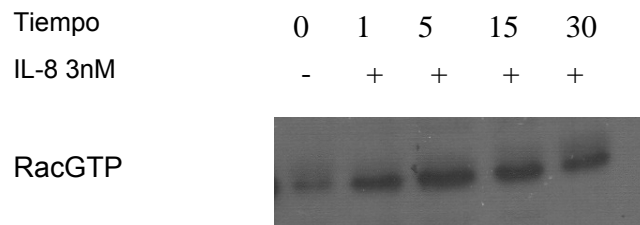


Figura No.2. Curso temporal de la activación de Rac en células HEK 293T transfectadas con el receptor CXCR2 y estimuladas con IL-8 3nM. Existe una activación de Rac dependiente de IL-8 desde el primer minuto de estimulación, siendo el máximo entre los 5 y 15 minutos de estimulación.

Quimiotaxis de células PAE en respuesta a IL-8 3nM

En la figura No.3 se muestran las fotografías de las células PAE que migraron en respuesta a IL-8 (3nM) después de un periodo de incubación de 8 horas a 37°C y 5% CO₂ en la cámara de Boyden para quimiotaxis.

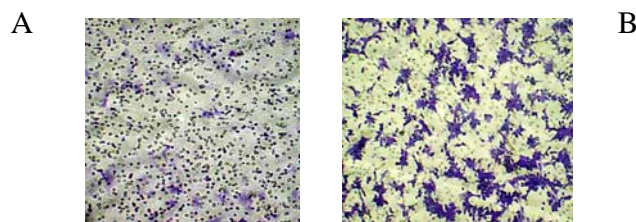


Figura No.3. Experimento de quimiotaxis en células PAE. Las células PAE capaces de haber migrado en respuesta a IL-8 fueron teñidas con cristal violeta y fotografiadas. En la figura 6B se muestra la fotografía de células PAE que migraron en respuesta a IL-8 a una concentración de 3nM, la figura 6A corresponde al control negativo.

Nuestros resultados preliminares sugieren que la cascada de señalización de activación de Rac a través de la estimulación del CXCR2 en respuesta a IL-8 involucra la participación del GEF, P.Rex1 así como las estrategias a utilizar para determinar dicha participación e incluye la interacción de los dominios PDZ-PDZ del GEF P-Rex1 con el extremo carboxilo terminal del receptor CXCR2, tal como se esquematiza en la figura No.4.

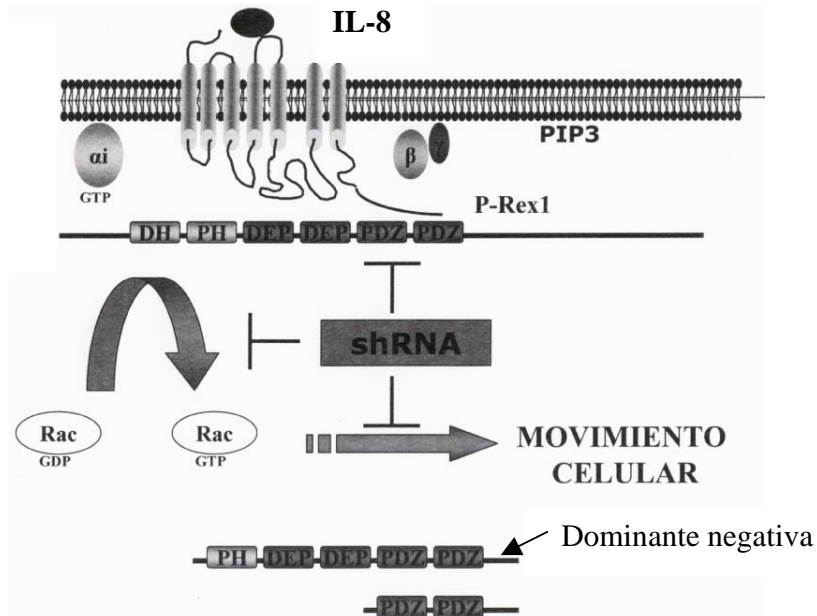


Figura No.4. Participación de P-Rex1 en la activación de Rac a través de la estimulación del receptor CXCR2 con IL-8. Silenciando a P-Rex1 por medio de RNA de interferencia o transfectando una dominante negativa del GEF se esperaría una disminución en la activación de Rac así como también un efecto inhibitorio en la migración celular.

DISCUSIÓN

La migración celular polarizada es un proceso altamente regulado, que ocurre entre otros eventos en el desarrollo de tejidos, quimotaxis y cierre de herida. Las GTPasas de la familia de Rho, incluyendo Cdc42, Rac1 y RhoA, juegan un papel central en establecer la polarización celular, la cual requiere una distribución asimétrica y ordenada de moléculas de señalización y del citoesqueleto. Avances recientes revelan que las GTPasas de Rho junto con la PI3K (cinasa que fosforila en posición 3 al fosfatidilinositol) contribuyen de manera importante en esta distribución, favoreciendo la formación y acumulación de fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato (PIP3) (12). P-Rex1 es un GEF para Rac, que responde al heterodímero G $\beta\gamma$ y a PIP3 por lo que sugiere una participación importante en eventos de activación de Rac y por lo tanto en movimiento celular polarizado en respuesta a estímulos quimiotácticos transmitidos por GPCRs. El primer paso que nosotros tomamos fue demostrar que células HEK 293T al ser transfectadas con el receptor CXCR2 fueran capaces de activar a Rac, después de un estimulación con IL-8 (3nM), como se puede observar en la figura No.2 existe un activación de Rac desde el primer minuto de estimulación, encontrando un máximo de activación entre los 5 y 15 minutos, de ahí que se eligiera el tiempo de 15 minutos para

los experimentos siguientes. También se realizó la activación de Rac a diferentes concentraciones de IL-8 que iban desde 0.01nM hasta 10nM no encontrando una diferencia clara sobre la activación de Rac (los datos no se muestran) de ahí que se decidió utilizar la concentración de 3nM. Como ya se mencionó se sabe que la estimulación del CXCR2 lleva a la activación de Rac pero lo que no se conoce aún es, que GEF es el encargado de llevar dicha activación. Nuestros resultados preliminares representados en la figura 4 indican que al silenciar a P-Rex1 por medio de RNA de interferencia o al coexpresar una dominante negativa de dicho GEF, la cual al carecer de su dominio catalítico DH no permite el intercambio de nucleótidos a la GTPasa Rac, ocurre una disminución en la activación de Rac después de un estímulo con IL-8 3nM durante 15 minutos, lo cual sugiere que el GEF para Rac, P-Rex1 participa de forma importante en la activación de Rac a través del CXCR2. El siguiente paso sería demostrar por medio de la técnica de RNA de interferencia o bien con la dominante negativa, N-terminal- Δ DH-P-Rex1, que el GEF para Rac, P-Rex1, participa de forma importante en la migración celular, todo esto a través de experimentos de quimiotaxis en células PAE. Nuestros datos muestran que, las células PAE transfectadas con el receptor CXCR2 migran en respuesta a IL-8 a una concentración de 3nM (figura No 3), en donde es clara la diferencia de migración, tanto en ausencia como presencia de IL-8 (figuras 3A y 3B). El GEF P-Rex1, presenta un arreglo modular en su extremo amino terminal en donde se observan los dominios en tandem DH/PH característico de los GEF para la familia de Rho, sin embargo, resulta interesante la presencia de dos dominios en tandem PDZ-PDZ mismos que podrían interactuar con otras proteínas con dominios PDZ o bien con el extremo carboxilo terminal de diferentes receptores, estos motivos de unión son los principales dominios de anclaje o reclutamiento de diversas proteínas capaces de interactuar con los GPCRs, tal y como es el caso de la PICK1 que es necesaria para un agrupamiento axonal del receptor mGluR7, (11). Nuestros resultados preliminares expresados en el modelo mostrado en la figura 4 indican que los dominios PDZ-PDZ del GEF, P-Rex1 al interactuar con el extremo carboxilo terminal del CXCR2, reclutan al GEF cerca de la membrana donde se está liberando el heterodímero $G\beta\gamma$ y se favorece la formación del PIP3, que como ya se había mencionado regulan la actividad de dicho GEF. En base a nuestro modelo podemos decir que P-Rex1, participa en la activación de Rac y movimiento celular polarizado a través del receptor CXCR2 al ser estimulado con IL-8.

AGRADECEMOS

A la M. en C. Ivette Hernández Negrete y M. en C. María Luisa Hernández Rodríguez por las críticas y comentarios oportunos para la realización de este trabajo. Trabajo apoyado con donativos de la fundación Miguel Alemán, CONACYT y NIH 1R01-TW006664-01

REFERENCIAS

1. Price, LS and Collard JG, (2001) *Cancer Biology*. 11, 167-173
2. Begum, S et al. (2004) *Experimental and Molecular Medicine*. 36, 358-366
3. Burridge, K and Wennerberg, K, (2004). *Cell*. 116, 167-179.
4. Welch, H.C. et al. (2002) *Cell*. 108, 809-821.
5. Offermans, Stefan (2004) *Biophysics and Molecular Biology*. 83, 101-130
6. Weiner, O.(2002) *Current Biology*. 12, R429-R431

7. Strieter, R, et al. (2004) *Seminars in Cancer Biology*. 14, 195-200
8. Addison, L et al. (2000) *The Journal of Immunology*. 165, 5269-5277
9. Ravi Iyengar and John Hildebrandt. *Methods in Enzymology*. Vol 345 part. C, 349-358.
10. Siderovski David P. *Methods in Enzymology*. Vol 390 part. B, 259-383.
11. Bockaert, J et al. (2004) *Pharmacology & Therapeutics*. 103, 203-221.
12. Fukata, M et al. (2003) *Current Opinión in Cell Biology*. 15, 590-597.
13. Keane, M, P et al. (2004) *The Journal of Immunology*
14. Schraufstatter, I, U et al. (2001) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 280, L1094-L1103
15. Benard V., Bokoch GM. *Methods in Enzymology*. Vol 345:349-359.