



PRINCIPE FELIPE  
CENTRO DE INVESTIGACION



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
MADRID

**Programa Oficial de Postgrado en Biotecnología**

Departamento de Bioquímica i Biología Molecular. Facultad de Biología.  
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRÍNCIPE FELIPE

Departamento de Microbiología II  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

---

## **CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MUTACIONES ONCOGÉNICAS DE PI3K**

---

Tesis Doctoral presentada por:

**María Dolores Oliver Guillén**

Director de la Tesis Doctoral: Dr. Rafael Pulido Murillo.

Director de la Tesis Doctoral: Dr. Víctor Jiménez Cid.

Valencia, 2015.



El **Dr. Rafael Pulido Murillo**, profesor de investigación Ikerbasque y el **Dr. Víctor Jiménez Cid**, profesor titular de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada "**Caracterización funcional de mutaciones oncogénicas de PI3K**", realizada por la Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universitat de València **María Dolores Oliver Guillén**, ha sido llevada a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia, y en el Departamento de Microbiología II de la Universidad Complutense de Madrid.

Revisado el presente trabajo, autorizamos su presentación ante el Tribunal constituido al efecto, para la obtención del grado de doctor.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado.

Valencia, 2015.

Dr. Rafael Pulido Murillo

Dr. Víctor Jiménez Cid





*A la meua família,  
per estar sempre amb mi*



## AGRAÏMENTS / AGRADECIMIENTOS

Tot va començar una tardor a València.....

La idea de començar aquest viatge va sorgir al departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Biologia, a on vaig descobrir el món de la ciència i a meravelloses persones com Inma, Elena Z., Elena J., Lore, Jordi... que feren que el temps que vaig passar allí fóra inoblidable. El vertader camí s'inicià amb l'etapa "CIPFera", gracias a la oportunitat que me concedió mi director de tesis, Rafa Pulido, para embarcarme en esta tesis doctoral. Gracias Rafa por ello y por el tiempo que has invertido en mí. Les aventures i desventures al laboratori I-01 no hagueren transcorregut igual sense tots els meus companys amb qui en algun moment al llarg dels tres anys vaig compartir laboratori, als quals he de agrair tota la seua ajuda prestada i en especial a Laura, Judith, Rocío i Celine per compartir una amistat amb mi. Agrair a la gent "CIPFera", David, Lucía, Lorena, Pilar, Mara... totes les quedades pre-durant-post ERE en les quals compartirem rialles. I com no, als meus amics valencians, que m'han recolzat i animat constantment al llarg d'aquest viatge que pareixia no tindre fi.

I arriba un nou hivern, y nueva etapa, "La madrileña". El inicio de esta etapa fue posible gracias a María Molina, a la que he de agradecer que me acogiera tan bien en su laboratorio y que me facilitara tanto el camino. Gracias María. Y de aquí surge mi otro director de tesis, Víctor, al que tengo agradecerle muchísimas cosas, pero en particular, por escucharme, por guiarme entre el océano de gotas infinito y por contagiarme su curiosidad e ilusión por la ciencia, ha sido muy gratificante y una gran suerte tenerte como director de tesis. Muchas gracias por todo, Víctor. Y si esta etapa la recuerdo con ilusión, se debe sobre todo a mis compañeros y amigos del laboratorio U3 y allegados de otras unidades. Especialmente a Tere, ha sido una suerte poder compartir contigo la interfase, amistad y a la PI3K, gracias por todo. A Esme "tantas gracias" por ser mi compañera de bancada, compañía vuelta a casa, mi anfitriona (junto a Jorge) en tu chozita y sobre todo por ser como eres. Y a todos los madrileños de adopción con los que compartí Madrid,

en particular a Héctor, por enseñarme pacientemente el mundo de la estructura de proteínas, por su ayuda y por sus continuos ánimos.

I arriba una nova primavera, i de nou tornada a València amb l'inici de l'etapa "Fibrostatina". He d'agrair a tots els meus companys, en especial a Rober i Marcos que recorde aquesta etapa com una bona etapa.

I per fi, amb l'arribada d'un nou hivern, comença l'etapa "escriptora". A Silvia T. gràcies per les hores de biblio tan divertides, de sopars i de xarrades tan reconfortants. A Laura i Ana per tots els bons moments dels dinars a la biblio de la facultat i de sopars de caps de setmana.

I com no a María S., Encarna i Diana per estar sempre al meu costat tot i la distancia des de València a Boston, a Londres i a Valladolid, per ajudar-me, aconsellar-me, animar-me i per compartir les bones i males etapes. Gràcies de tot cor.

Per últim a la meua família, al meu germà major, Jose, per cuidar-me sempre i per tot el que m'has ensenyat des de xicoteta fins ara, al meu germà Juanma per créixer al meu costat, per recolzar-me i per mimar-me constantment, i a Bea per estar sempre disposada a ajudar-me i animar-me i com no a la meua neboda Cristina, per fer-me oblidar de tot quan estic amb tu. Als meus pares per estar sempre al meu costat, per voler-me, per donar-me l'oportunitat d'arribar fins ací i fins a on jo em propose, i per ser persones tan lluitadores i valentes enfront de la vida.

El viatge aplega al seu fi amb l'arribada de l'hivern 2015 a València..... ahora que es comença a preparar un nou viatge.

**María D. Oliver**

La realización de la presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de las siguientes ayudas:

➤ **PROYECTOS**

- BIO2010-22369-C02-01: *S. cerevisiae* como modelo para el estudio de la señalización eucariótica y su aplicación al diseño de bioensayos de cribado farmacológico (Ministerio de Ciencia e Innovación).
- SAF2009-10226: Implicación de nuevas familias de fosfatasas y quinasas en cáncer y neurodegeneración (Ministerio de Ciencia e Innovación).
- Fundación de Investigación Mutua Madrileña: Análisis funcional *in vivo* de la ruta oncogénica de mamíferos PI3K/PTEN/AKT mediante un sistema heterólogo de la levadura.

➤ **BECAS**

- Beca pre-doctoral del programa nacional de Formación del Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación.
- Ayuda para la realización de Estancias Breves dentro del programa FPI, concedida para la estancia en el laboratorio del Dr. Víctor J. Cid y de la Dra. María Molina (Universidad Complutense de Madrid).

El trabajo descrito ha sido realizado en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) y el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia en la Universidad Complutense de Madrid (UCM).



<b>ÍNDICE GENERAL.....</b>	<b>I</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>V</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>VII</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>1.- Las fosfatidil-inositol 3-quinasas.....</b>	<b>3</b>
1.1.-Clasificación de la PI3K.....	4
1.2.- Caracterización de la PI3K de clase I.....	7
1.2.1.- PI3K de clase IA.....	7
1.2.2.- PI3K de clase IB.....	12
<b>2.-La ruta PI3K/PTEN/AKT en mamíferos.....</b>	<b>12</b>
<b>3.-Implicación de la PI3K en enfermedades humanas: alteraciones oncológicas en la ruta PI3K/PTEN/AKT.....</b>	<b>15</b>
<b>4.-Mecanismo fisiológico de activación del heterodímero p110<math>\alpha</math>/p85<math>\alpha</math>.....</b>	<b>18</b>
<b>5.-Mutaciones de la subunidad catalítica p110<math>\alpha</math> en cáncer.....</b>	<b>20</b>
<b>6.-Mutaciones de la subunidad reguladora p85<math>\alpha</math> en cáncer.....</b>	<b>25</b>
<b>7.-p65<math>\alpha</math>, la truncación oncológica de p85<math>\alpha</math>.....</b>	<b>28</b>
<b>8.-Papel funcional de p85<math>\alpha</math> en la regulación del tráfico celular.....</b>	<b>29</b>
<b>9.-Reconstitución de la ruta PI3K/PTEN/AKT en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
<b>1.-Técnicas de biología molecular.....</b>	<b>41</b>
1.1.-Manipulación de ácidos nucleicos.....	41
1.2.- Purificación del DNA plasmídico.....	41
1.3.- Mutagénesis dirigida.....	42
1.4.-Plásmidos.....	44
<b>2.- Métodos de trabajo en el modelo experimental de levadura.....</b>	<b>48</b>
2.1.- Cepa de levadura y medios de cultivo.....	48

2.2.- Transformación de la levadura y condiciones de crecimiento.....	48
2.3.- Obtención de extractos proteicos de levadura.....	48
2.4.- Ensayo de crecimiento en gota mediante diluciones seriadas decimales.....	49
<b>3.- Cultivos de células de mamíferos.....</b>	<b>50</b>
3.1.- Líneas celulares.....	50
3.2.- Método de transfección.....	50
3.3.- Lisis de cultivos celulares.....	50
<b>4.- Detección de proteínas mediante <i>Western blotting</i>.....</b>	<b>51</b>
4.1.- Electroforesis de proteínas.....	51
4.2.- Transferencia e hibridación.....	51
4.3.- Revelado.....	52
<b>5.- Inmunofluorescencia.....</b>	<b>52</b>
<b>6.- Anticuerpos.....</b>	<b>53</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
<b>1.- Expresión heteróloga de las subunidades catalíticas (p110) de la PI3K de clase I en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....</b>	<b>57</b>
1.1.- Actividad <i>in vivo</i> de las subunidades catalíticas (p110) de la PI3K de clase I en la levadura.....	57
1.2.- Dominios necesarios para la actividad de p110 en la levadura.....	59
1.3.- Estudio funcional de los dominios de unión a RAS (RBD) y C2 de p110 en la levadura.....	61
<b>2.- Expresión y estudio de las subunidades reguladoras de la PI3K de clase I en <i>S. cerevisiae</i>.....</b>	<b>63</b>
2.1.- Co-expresión de las subunidades reguladoras y las subunidades catalíticas de la PI3K de clase I en la levadura.....	63
2.2.- Efecto de las subunidades reguladoras sobre versiones mutantes de p110 $\alpha$ en la levadura.....	65
2.3.- Anclaje artificial a la membrana de p85 $\alpha$ y p65 $\alpha$ mediante la introducción de un motivo de prenilación C-terminal.....	66



2.3.1.- p65 $\alpha$ -CAAX activa a p110 en la levadura.....	66
2.3.2.- La activación de p110 $\alpha$ por p65 $\alpha$ -CAAX es dependiente de su actividad catalítica y su efecto es revertido por PTEN.....	68
2.3.3.- La activación de p110 $\alpha$ por p65 $\alpha$ -CAAX requiere el dominio ABD.....	68
2.4.- Estudio de la interacción funcional de p85 $\alpha$ -CAAX y p65 $\alpha$ -CAAX con p110 $\alpha$ .....	70
2.4.1.- Influencia de mutaciones en p110 $\alpha$ en su interacción funcional con p85 $\alpha$ -CAAX y p65 $\alpha$ -CAAX.....	70
2.4.2.- Análisis de la posible influencia de la fosforilación en la Ser608 de p85 $\alpha$ en la regulación de p110 $\alpha$ .....	73
2.5.- Caracterización funcional de mutaciones del gen de p85 $\alpha$ halladas en tumores humanos.....	74
<b>3.- Estudio de las subunidades reguladoras de la PI3K de clase I mediante su sobre-expresión en células de mamíferos.....</b>	<b>79</b>
3.1.- Localización subcelular de las subunidades reguladoras de la PI3K de clase I en células COS-7.....	79
3.2.- Caracterización de la localización subcelular de p65 $\alpha$ .....	82
3.2.1.- Estudio comparativo de la localización subcelular de p65 $\alpha$ ....	82
3.2.2.- La sobre-expresión de p65 $\alpha$ induce la formación de endosomas tempranos de mayor tamaño.....	83
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>91</b>
<b>1.- <i>S. cerevisiae</i> como sistema heterólogo para el estudio funcional de la PI3K de clase IA.....</b>	<b>93</b>
<b>2.- La modulación de las subunidades catalíticas por las subunidades reguladoras de la PI3K de clase IA es reproducible en <i>S. cerevisiae</i>.....</b>	<b>95</b>
<b>3.- La prenilación de p85<math>\alpha</math> y p65<math>\alpha</math> en la levadura mimetiza la modulación de la actividad de p110.....</b>	<b>96</b>
<b>4.- Distintas mutaciones de p85<math>\alpha</math> halladas en tumores humanos muestran diferentes mecanismos de activación de p110.....</b>	<b>101</b>

**5.- La sobre-expresión de p65 $\alpha$  altera la regulación del tráfico vesicular... 104**

**CONCLUSIONES..... 111**

**BIBLIOGRAFÍA..... 115**

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ATP:** trifosfato de adenosina

**DO:** densidad óptica

**DTT:** ditioneitol

**EEA1:** marcador de endosomas tempranos (*Early Endosome Antigen 1*)

**EDTA:** ácido etilendiaminotetracético

**EGF:** factor de crecimiento epidérmico

**EGFR:** receptor del factor de crecimiento epidérmico

**FBS:** suero fetal bovino

**GAP:** proteína activadora de GTPasa (*GTPase Activating Protein*)

**GDP:** guanosín difosfato

**GFP:** proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

**GPCR:** receptor acoplado a proteínas G

**GTP:** guanosín trifosfato

**GTPasa:** guanosina trifosfatasa

**HA:** hemaglutinina

**IRS:** sustrato del receptor de insulina (*Insulin Receptor Substrate*)

**mRNA:** RNA mensajero

**LB:** medio de Luria-Bertani

**PBS:** tampón fosfato salino

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

**PEG:** polietilenglicol

**PH:** dominio de homología con pleckstrina (*Pleckstrin Homology*)

**PI3K:** fosfatidil-inositol 3-quinasa (*Phosphatidy Inositol-3 Kinase*)

**PMSF:** p-metil sulfonil fluoruro

**PtdIns:** fosfatidilinositol

**Rab:** proteínas RAS asociada al cerebro (*Ras-related in Brain*)

**RTK:** receptor quinasas de tirosinas

**SD:** medio sintético de crecimiento de levaduras con glucosa

**SDS:** dodecil sulfato sódico

**SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

## ABREVIATURAS

---

**SG:** medio sintético de crecimiento de levaduras con galactosa

**SR:** medio sintético de crecimiento de levaduras con rafinosa

**TAE:** solución Tris-acetato EDTA

**TE:** solución Tris EDTA

**TEMED:** tetrametiletilenodiamina

**Tris:** tris(hidroximetil)aminometano

**WT:** tipo silvestre (*wild-type*)

**YPD:** medio rico de crecimiento de levaduras (Yeast Extract Peptone Dextrose)

El cáncer es una enfermedad compleja originada por alteraciones genéticas en proto-oncogenes y/o supresores tumorales. El proto-oncogén PI3K se encuentra alterado en numerosos cánceres. La PI3K de clase I son quinasas, formadas por una subunidad catalítica (p110) y una reguladora (p85), que catalizan la conversión de PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> en PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> en las membranas celulares. Este último es un segundo mensajero que recluta a la quinasa de Ser/Thr AKT, la cual activa a numerosos efectores y desencadena una respuesta proliferativa y de supervivencia celular, por lo que mutaciones que causen la hiperactivación de esta ruta conllevan la transformación de células normales en células tumorales. El supresor tumoral PTEN es el regulador negativo de esta ruta ya que desfosforila el PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, contrarrestando la acción de la PI3K.

Hemos generado un modelo heterólogo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que expresa los principales elementos de la ruta PI3K/AKT de mamíferos, ya que este organismo carece de la señalización a través de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. En el presente estudio hemos determinado que, entre las diversas isoformas de la subunidad catalítica de PI3K, solo p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  son lo suficientemente activas *per se* para eliminar el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, que es esencial para la viabilidad de la levadura, cuando son artificialmente dirigidas a la membrana plasmática mediante prenilación (p110 $\alpha$ -CAAX y p110 $\beta$ -CAAX). En este modelo, demostramos que el dominio ABD (dominio de unión a la subunidad reguladora) de ambas p110 es prescindible para su actividad quinasa de lípidos, mientras que la integridad del dominio C2 (dominio de unión a membranas) es necesaria. Este sistema heterólogo también nos permite estudiar la regulación que ejercen las subunidades reguladoras de la PI3K sobre las catalíticas. Así, hemos observado el efecto activador que las versiones truncadas de las subunidades reguladoras p85 $\alpha$  y p85 $\beta$  (p65 $\alpha$  y p65 $\beta$ ) ejercen sobre la subunidad catalítica p110 $\beta$ -CAAX, así como la función inhibidora de p85 $\alpha$  sobre p110 $\alpha$ , lo que se observa sobre una versión miristoilada de esta última. La expresión de p85 $\alpha$ -CAAX inhibe la actividad de p110 $\beta$ -CAAX y p110 $\alpha$  miristoilado, pero no contrarresta el efecto activador por reclutamiento a la membrana de p110 $\alpha$  prenilado, ni de la mutación oncogénica

H1047R en p110 $\alpha$ . Al contrario, p65 $\alpha$ -CAAX ejerce un efecto activador sobre p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  y p110 $\delta$ , pero no sobre p110 $\gamma$ . Este efecto activador requiere de la interacción de p65 $\alpha$  con el dominio ABD de p110 $\alpha$  mientras que es independiente de la presencia de mutaciones oncogénicas en los dominios helical y quinasa en la misma p110. Además, el efecto activador producido por p65 $\alpha$ -CAAX sobre p110 $\alpha$  es debido a la actividad quinasa de la PI3K, ya que PTEN revierte su efecto tóxico en la levadura. Por otra parte, la expresión de una serie de mutaciones en p85 $\alpha$ , encontradas en tumores, en el modelo de levadura resulta útil para elucidar si el mecanismo por el cual causan la hiperactivación de la subunidad catalítica es análogo al de p65 $\alpha$  o divergente, ofreciendo una plataforma para el análisis funcional de mutaciones halladas en la clínica.

Por último, en células de mamífero, hemos observado que la sobre-expresión de p65 $\alpha$  difiere de la de p85 $\alpha$  y de la del resto de subunidades reguladoras en lo referente a su localización subcelular: p65 $\alpha$  se acumula en la periferia de endosomas tempranos anormalmente grandes. Esto sugiere que las regiones ausentes en el extremo C-terminal de esta versión truncada son importantes para el control ejercido por p85 $\alpha$  sobre procesos de tráfico vesicular.

INTRODUCCIÓN

GENERAL

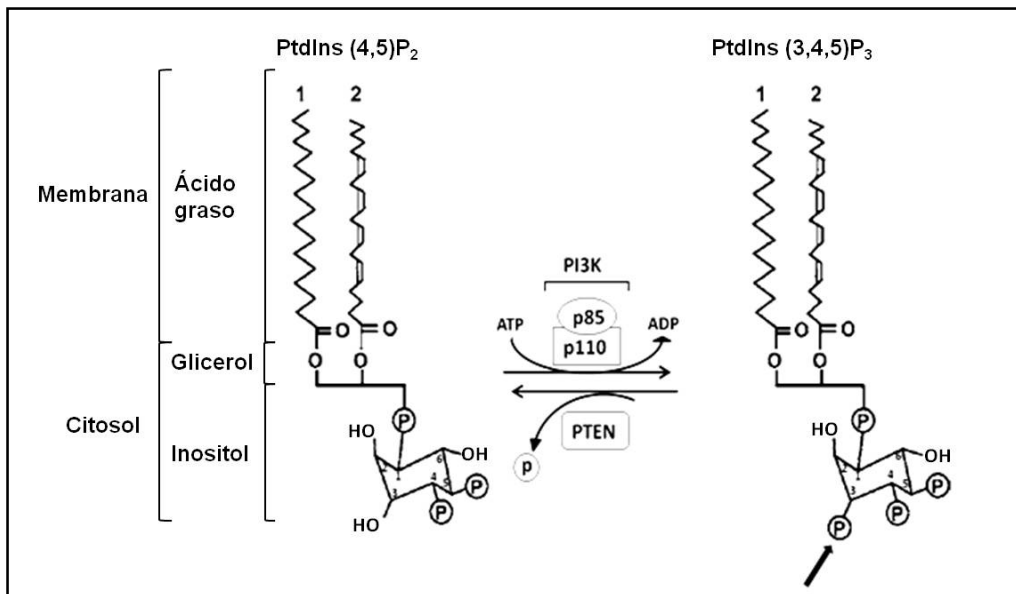




## 1. Las fosfatidil-inositol 3-quinasas (PI3K)

Los fosfoinosítidos se generan a partir del fosfatidilinositol (PtdIns), que es un fosfolípido constituido por un anillo de inositol que contiene en posición 1 un grupo fosfato al cual se une una molécula de glicerol esterificada con dos moléculas de ácidos grasos. Los grupos OH libres en las posiciones 3, 4 y 5 del anillo de inositol pueden ser fosforilados generando diversas especies de fosfoinosítidos. Los fosfoinosítidos se localizan en las membranas celulares, funcionan como segundos mensajeros lipídicos para la transducción de señales intracelulares y participan en el tráfico de membranas mediante el reclutamiento de efectores.

La PI3K es una familia de quinazas de lípidos que catalizan la fosforilación de los PtdIns en la posición 3 del anillo inositol (Vanhaesebroeck *et al.*, 2010) (**Figura 1**). La actividad PI3K está involucrada en muchas vías de señalización intracelular que regulan funciones tan diversas como la proliferación, migración, supervivencia celular, el tráfico vesicular, la respuesta inflamatoria y el metabolismo (Engelman *et al.*, 2006).



**Figura 1. Actividad catalítica de la PI3K de clase I sobre PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>.** La PI3K de clase I fosforilan la posición 3 del anillo inositol bis-fosforilado (marcado con la flecha). La reacción inversa es catalizada por la fosfatidilinositol 3-fosfatasa PTEN. Modificada de Vivanco y Sawyers. (2002).

### 1.1. Clasificación de la PI3K

La PI3K se clasifica en tres clases según sus características estructurales y su especificidad de sustrato (Engelman *et al.*, 2006; Vanhaesebroeck *et al.*, 2001) (**Figura 2 A**):

**CLASE I:** Está formada por heterodímeros compuestos por una subunidad catalítica (p110) y una reguladora. El sustrato utilizado *in vivo* por esta PI3K es el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, que es convertido en PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, el cual puede ser desfosforilado de nuevo a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> por la fosfatasa PTEN (*Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10*) (**Figura 1**). Esta clase se divide en la subclase IA, cuyos miembros son activados por receptores con actividad quinasa de tirosinas (RTKs), y la subclase IB, que son estimulados por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Katso *et al.*, 2001).

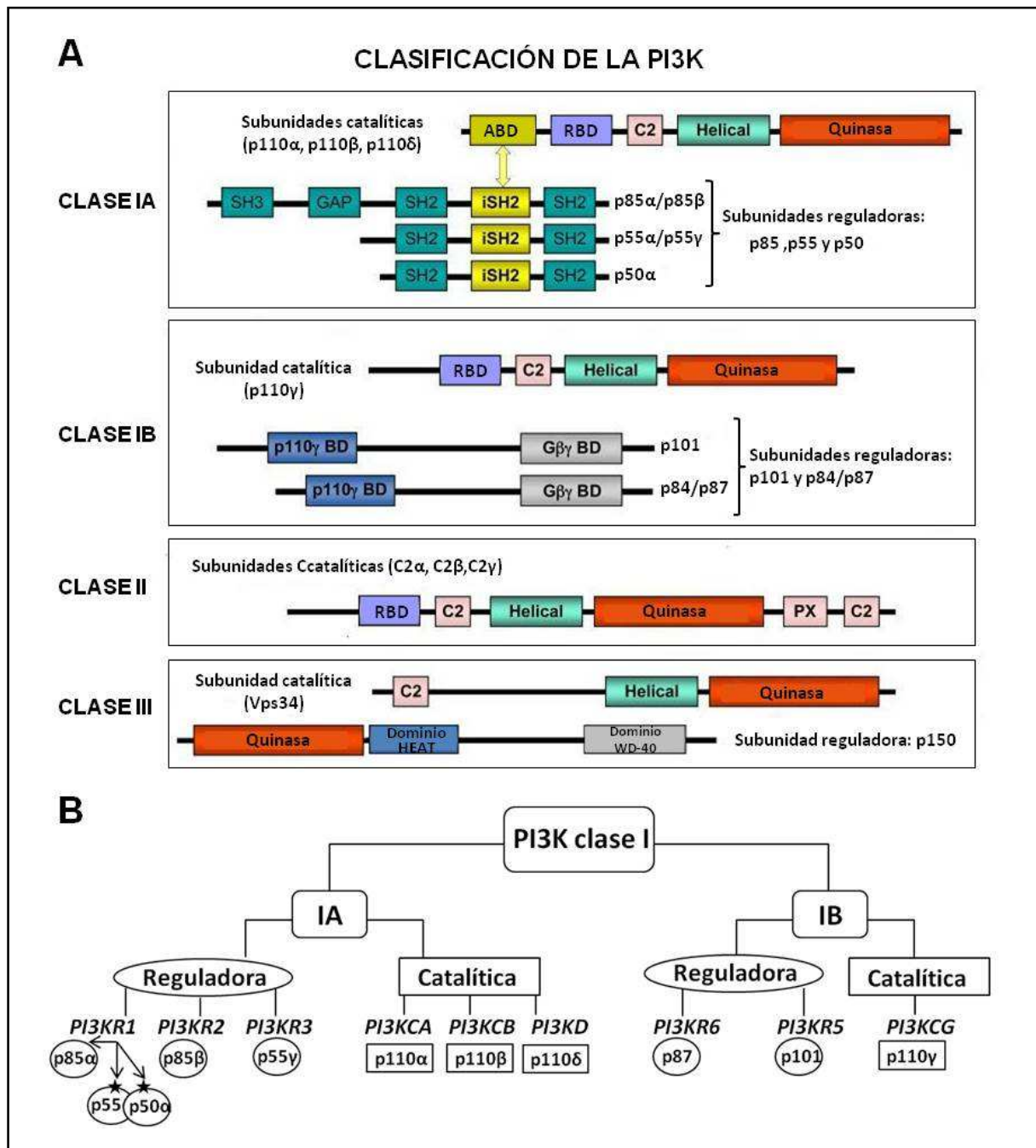
- **PI3K de clase IA.** En mamíferos, las subunidades catalíticas de clase IA están codificadas por tres genes: *PIK3CA* (p110 $\alpha$ ), *PIK3CB* (p110 $\beta$ ) y *PIK3CD* (p110 $\delta$ ). A su vez, las subunidades reguladoras están codificadas por tres genes: *PIK3R1*, que da lugar a tres isoformas que se generan por procesamiento alternativo del mRNA precursor: p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , p50 $\alpha$  (Hallmann *et al.*, 2003); *PIK3R2* que codifica p85 $\beta$ ; y *PIK3R3* que codifica p55 $\gamma$  (Bader *et al.*, 2005; Fruman *et al.*, 1998) (**Figura 2**). Cada una de las subunidades catalíticas de esta clase se puede asociar con las cinco variantes de la subunidad reguladora. Mientras que p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  presentan una expresión tisular ubicua en mamíferos, p110 $\delta$  se expresa predominantemente en linfocitos. Las subunidades reguladoras p85 $\alpha$  y p85 $\beta$  se expresan en diversos tejidos. Sin embargo, la expresión de las isoformas p50 $\alpha$  y p55 $\alpha$  está restringida a tejidos sensibles a insulina (tejido adiposo, esquelético, muscular e hígado). La isoforma p55 $\gamma$ , por el contrario, se expresa fundamentalmente en el cerebro (Kok *et al.*, 2009).

- **PI3K de clase IB.** En mamíferos, el gen *PIK3CG* codifica la única subunidad catalítica de esta clase, p110 $\gamma$ , la cual se asocia con las subunidades reguladoras p101 y p84/87, codificadas por *PIK3R5* y *PIK3R6*, respectivamente

(Wymann *et al.*, 2003) (**Figura 2**). p110 $\gamma$  se expresa mayoritariamente en el sistema hematopoyético y está relacionada, junto con p110 $\delta$ , con la inflamación y el asma (Hawkins *et al.*, 2006; Katso *et al.*, 2001). Aunque la clase IB es la que característicamente se acopla a los receptores GPCRs, los heterodímeros que contienen p110 $\beta$  también pueden ser activados por este tipo de receptores de forma directa o a través de la activación de las GTPasas Rac1 y Cdc42 (Dbouk *et al.*, 2012; Fritsch *et al.*, 2013; Guillermet-Guibert *et al.*, 2008).

**CLASE II:** La PI3K de clase II son proteínas de elevado peso molecular asociadas a la membrana que carecen de subunidad reguladora. Se diferencian de otras clases de PI3K por poseer un dominio C2 de unión a lípidos en el extremo C-terminal (**Figura 2 A**). En mamíferos, los genes *PIK3C2 $\alpha$* , *PIK3C2 $\beta$*  y *PIK3C2 $\gamma$*  codifican las subunidades catalíticas C2 $\alpha$ , C2 $\beta$  y C2 $\gamma$ , respectivamente. *In vitro*, fosforilan preferentemente PtdIns para generar PtdIns(3)P, pero existe controversia en cuanto a su sustrato *in vivo*. Podrían estar implicadas en la regulación del tráfico de membranas, la internalización de receptores, en la contracción del músculo liso vascular (C2 $\alpha$ ) y en la migración celular (C2 $\beta$ ) (Domin *et al.*, 2000; Domin *et al.*, 2005; Gaidarov *et al.*, 2001). Mientras que C2 $\alpha$  y C2 $\beta$  presentan una expresión ubicua, C2 $\gamma$  se expresa principalmente en el tejido hepático.

**CLASE III:** La PI3K de clase III son ortólogas a Vps34 (*vacuolar protein sorting*) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y tanto en levaduras como en mamíferos forma un complejo con una Ser/Thr quinasa (Vps15 y p150, respectivamente) (**Figura 2 A**). *In vivo*, utiliza como sustrato PtdIns, para generar PtdIns(3)P. Vps34 está presente en todos los eucariotas estudiados y ha sido relacionada con procesos como la autofagia, la fagocitosis, el tráfico de vesículas y la señalización (Backer, 2008; Yan y Backer, 2007). Además de su actividad quinasa de lípidos, la PI3K de clase III, al igual que la de clase I, pueden actuar como quinasas de proteínas (Dhand *et al.*, 1994).



**Figura 2. Clasificación de la PI3K.** **A.** Representación esquemática de los dominios estructurales de las subunidades catalíticas y reguladoras de las diferentes clases de PI3K. Modificada de Liu *et al.* (2009). **B.** Clasificación de la PI3K de clase I. Se indica, de arriba a abajo, la clase, subclase, tipo de subunidad, nombre del gen y proteínas que codifica el gen. Las proteínas marcadas con estrella indican que han sido generadas a partir del procesamiento alternativo del mRNA del gen *PI3KR1*.

## 1.2. Caracterización de la PI3K de clase I

### 1.2.1. PI3K de clase IA

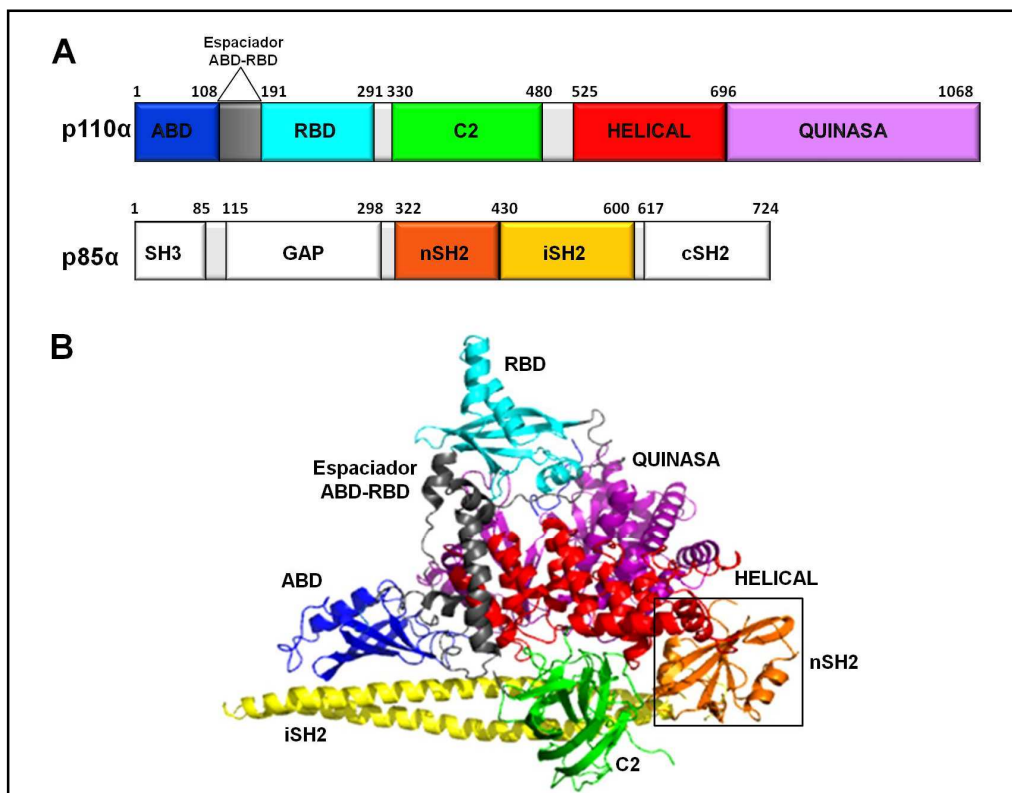
#### **Estructura y función de las subunidades catalíticas de clase IA**

La proteína p110 $\alpha$  humana tiene 1068 aminoácidos y una masa molecular de 110 kDa. Se obtuvo la estructura cristalina de todos los dominios de p110 $\alpha$  formando un complejo con los dominios nSH2 y iSH2 (niSH2) de p85 $\alpha$  (Huang *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2007; Miled *et al.*, 2007), pero no se pudo resolver el dominio nSH2. Posteriormente, se obtuvo la estructura del mutante p110 $\alpha$  H1047R/p85niSH2, lo que permitió resolver la localización espacial del dominio nSH2 (Mandelker *et al.*, 2009) (**Figura 3**).

Estructuralmente, p110 $\alpha$  posee los siguientes dominios funcionales, de N-terminal a C-terminal (la numeración de aminoácidos corresponde a la proteína humana):

- **Dominio ABD** (dominio de unión a la subunidad reguladora o adaptadora; aminoácidos 1-108), está formado por hélices alfa y láminas beta e interacciona tanto con el dominio quinasa como con la subunidad reguladora, además de interactuar con el espaciador ABD-RBD.
- **Espaciador ABD-RBD** (aminoácidos 109-190), formado por dos hélices- $\alpha$  que conectan los dominios ABD y RBD. Interacciona con el dominio ABD.
- **Dominio RBD** (dominio de unión a RAS; aminoácidos 191-291): media la interacción de p110 con RAS e interacciona con el dominio quinasa. Está unido al dominio C2 mediante el espaciador RBD-C2 (aminoácidos 292-329).
- **Dominio C2** (dominio de unión a membranas; aminoácidos 330-480): favorece la interacción de la proteína con membranas por uniones electrostáticas, al tiempo que interacciona con los dominios helical, quinasa y con la subunidad reguladora. El espaciador C2-helical (aminoácidos 481-524) conecta este dominio con el dominio helical.

- **Dominio helical** (aminoácidos 525-696): está formado por una hélice alfa que contacta directamente con los dominios C2 y quinasa además de interactuar con la subunidad reguladora.
- **Dominio quinasa** (aminoácidos 696-1068): formado por un lóbulo catalítico N-terminal (912-920) que une ATP y por un lóbulo de activación C-terminal (933-957) que es el responsable de la unión al sustrato. Los aminoácidos 941-950 y los que configuran el extremo C-terminal no están presentes en el cristal. Interacciona con los dominios helical, RBD y ABD, además de con la subunidad reguladora.



**Figura 3. Estructura del heterodímero p110α/p85α(niSH2).** **A.** Representación esquemática de los dominios de p110α y p85α. Las regiones grises son zonas de separación entre dominios. Los límites entre dominios se han tomado de Huang *et al.*, 2007. El mismo código de color de los dominios es utilizado en la representación de la estructura del apartado B. **B.** Diagrama de la estructura terciaria de p110α en complejo con los dominios nSH2 e iSH2 de la subunidad reguladora p85α, realizado con PyMOL. El dominio nSH2, indicado con un recuadro negro, es el observado en la estructura del mutante p110αH1047R/p85α (niSH2) (PDB 3HHM) (Mandelker *et al.*, 2009) pero no está trazado en la estructura del heterodímero silvestre p110α/p85α (niSH2) (PDB 2RD0) (Huang *et al.*, 2007).

A nivel funcional, la inactivación genética simultánea de las subunidades p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  provoca letalidad en las primeras etapas del desarrollo embrionario de los ratones debido a defectos en la capacidad proliferativa de las células (Bi *et al.*, 2002; Bi *et al.*, 1999), mientras que ratones con las subunidades p110 $\gamma$  y p110 $\delta$  inactivas resultan viables pero presentaban defectos en la respuesta inmune (Ali *et al.*, 2004; Laffargue *et al.*, 2002; Zhao y Vogt, 2008a).

### **Estructura y función de las subunidades reguladoras de clase IA**

La proteína p85 $\alpha$  es la subunidad reguladora de la PI3K de clase IA más estudiada. Los diferentes dominios de esta proteína se han cristalizado individualmente, pero no se han obtenido estructuras cristalinas que definan cómo estos dominios están relacionados entre sí en el espacio (Hoedemaeker *et al.*, 1999; Musacchio *et al.*, 1996; Nolte *et al.*, 1996).

En humanos, **p85 $\alpha$**  y **p85 $\beta$**  tienen 724 y 728 aminoácidos, respectivamente, y están formadas por los siguientes dominios funcionales (**Figura 3 y 4**):

- **Dominio SH3** (aminoácidos 1-85): el dominio SH3 se une a secuencias ricas en prolina que contengan el motivo PXXP (donde P es una prolina y X cualquier aminoácido). La proteína p85 $\alpha$  puede formar homodímeros a través de interacciones intermoleculares entre el dominio SH3 y la región rica en prolinas, situada entre el dominio SH3 y el dominio GAP, de una segunda proteína p85 $\alpha$ . Se especula que la función de la homodimerización de p85 es enmascarar los dominios SH3, GAP y las regiones ricas en prolinas en células no estimuladas (Batra-Safferling *et al.*, 2010). El dominio SH3 también se puede unir a regiones ricas en prolinas de otras proteínas, como por ejemplo FAK (Focal Adhesion Kinase), CAS (Crk-Associated Substrate) o apoptina (proteína que induce apoptosis en células tumorales), las cuales podrían regular la actividad PI3K (Gout *et al.*, 1993; Maddika *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2005).

- **Dominio GAP** (aminoácidos 115-298): está flanqueado por dos regiones ricas en prolina que se unen a dominios SH3 de otras proteínas con potencial

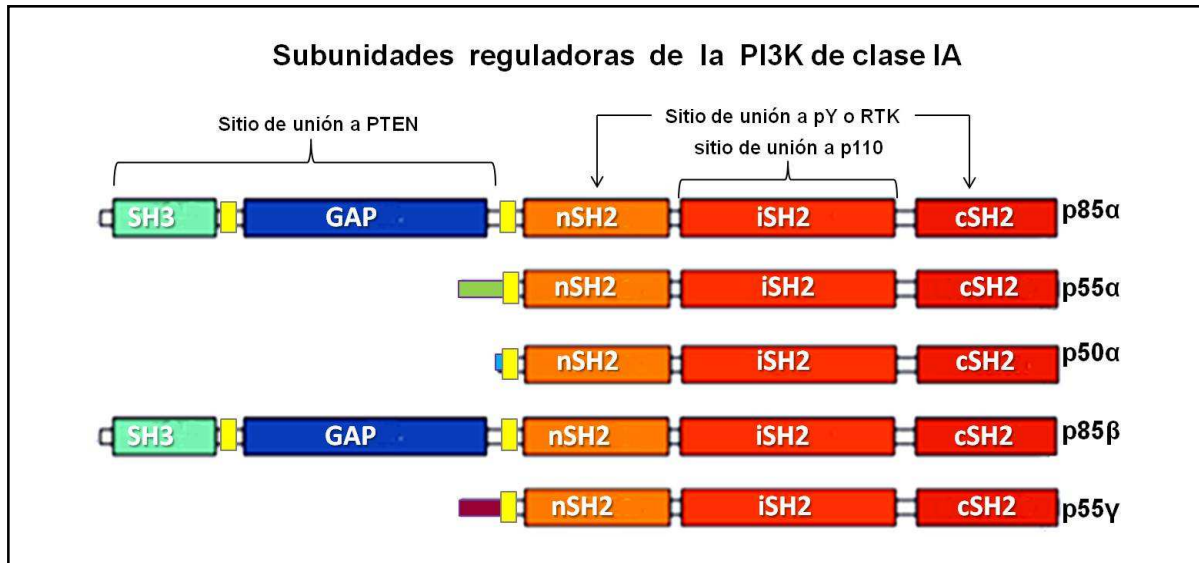
regulador, como, por ejemplo, quinasas de tirosinas citoplasmáticas (Pleiman *et al.*, 1994). Este dominio tiene actividad GAP (proteína activadora de GTPasas) sobre proteínas Rab (GTPasas implicadas en la regulación del tráfico de los RTKs) (Chamberlain *et al.*, 2004; Chamberlain *et al.*, 2010; Fidyk y Cerione, 2002). También está implicado en la regulación del citoesqueleto de actina mediante la interacción con las GTPasas Rac y Cdc42 (Jiménez *et al.*, 2000). Por otro lado, este dominio, junto con el dominio SH3, es responsable de la interacción con PTEN (Chagpar *et al.*, 2010).

- **Dominios nSH2 y cSH2** (dominios SH2 N- y C-terminal, formados por los aminoácidos 322-430 y 617-724, respectivamente): son dominios muy conservados en todas las isoformas y son los responsables de interactuar con la tirosina fosforilada de los motivos pYXXM (donde pY es una tirosina fosforilada, X cualquier aminoácido y M una metionina) que se encuentran en los receptores RTKs activados. También es capaz de interactuar de forma indirecta con los receptores RTKs, a través de fosfoproteínas adaptadoras como IRS-1/2 (sustratos del receptor de insulina) (Sun *et al.*, 2010). El dominio nSH2 interactúa con los dominios helical, C2 y quinasa de p110 $\alpha$  (Huang *et al.*, 2007; Mandelker *et al.*, 2009).

- **Dominios iSH2** (dominio inter SH2; aminoácidos 430-600): este dominio está formado por dos hélices alfa antiparalelas. Además, en su secuencia posee un motivo de aminoácidos básicos que es similar al motivo de unión a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> de la gelsolina, por lo que se ha propuesto que puede participar en la unión del heterodímero a la membrana (Yu *et al.*, 1992). Interactúa con p110 $\alpha$  a través del dominio ABD y C2 (Huang *et al.*, 2007; Miled *et al.*, 2007).

Las subunidades reguladoras **p50 $\alpha$** , **p55 $\alpha$**  y **p55 $\gamma$**  sólo contienen los dominios nSH2, iSH2 y cSH2. En la región N-terminal presentan una secuencia específica de seis aminoácidos (p50 $\alpha$ ) o 34 aminoácidos (p55 $\alpha$  y p55 $\gamma$ ) (**Figura 4**).





**Figura 4. Representación esquemática de los dominios funcionales de las subunidades reguladoras de la PI3K de clase IA.** Se indica la distribución de los dominios SH2, SH3 y GAP, así como los sitios de interacción con otras proteínas. Los rectángulos amarillos representan regiones ricas en prolina y las regiones verde, celeste y fucsia representan los aminoácidos específicos de cada subunidad reguladora. Las isoformas p55α y p50α se generan por procesamiento alternativo del mRNA de la isoforma p85α. Modificada de <http://atlasgeneticsoncology.org>.

A nivel funcional, se ha descrito que los ratones con p85α, p55α y p50α delecionadas simultáneamente muestran letalidad perinatal (Fruman *et al.*, 2000). No obstante, los ratones que sólo carecen de la forma p85α son viables y presentan un aumento de la expresión de p55α y p50α, las cuales parecen compensar parcialmente la ausencia de p85α (Terauchi *et al.*, 1999). Los ratones que carecen de la isoforma p85β son viables pero de menor tamaño (Ueki *et al.*, 2002), mientras que la deleción simultánea de p85α y p85β resulta en letalidad embrionaria (Brachmann *et al.*, 2005).

### **Activación de la PI3K de clase IA**

En líneas generales, este proceso se inicia a través de la activación de los receptores RTKs por la unión de factores de crecimiento. Dicha activación conduce a la autofosforilación de tirosinas en sus regiones intracelulares, a las que se une p85, la cual a su vez recluta a la subunidad catalítica p110 a la membrana, donde está su sustrato. La interacción p85-p110 induce un cambio conformacional

que produce la activación de la enzima (Blume-Jensen y Hunter, 2001) (**Figura 5**). El reclutamiento de p110 $\alpha$  a la membrana por p85 $\alpha$  es esencial para su activación, de hecho, la adición de un sitio de farnesilación a p110 $\alpha$  resulta en una activación constitutiva de la enzima (Jiménez *et al.*, 1998).

### 1.2.2. PI3K de clase IB

**La estructura de la subunidad catalítica** p110 $\gamma$ , es similar a la de p110 $\alpha$ . Está formada por los dominios RBD, C2, helical y quinasa, pero su región N-terminal carece del dominio ABD (Walker *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 1999) (**Figura 2**).

**Estructura de las subunidades reguladoras** p101 y p84/87 presentan un dominio de unión a la subunidad catalítica (p110 $\gamma$  BD) y otro de unión a subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas G heterotriméricas (G  $\beta\gamma$  BD) (Brock *et al.*, 2003; Marone *et al.*, 2008; Suire *et al.*, 2005) (**Figura 2**).

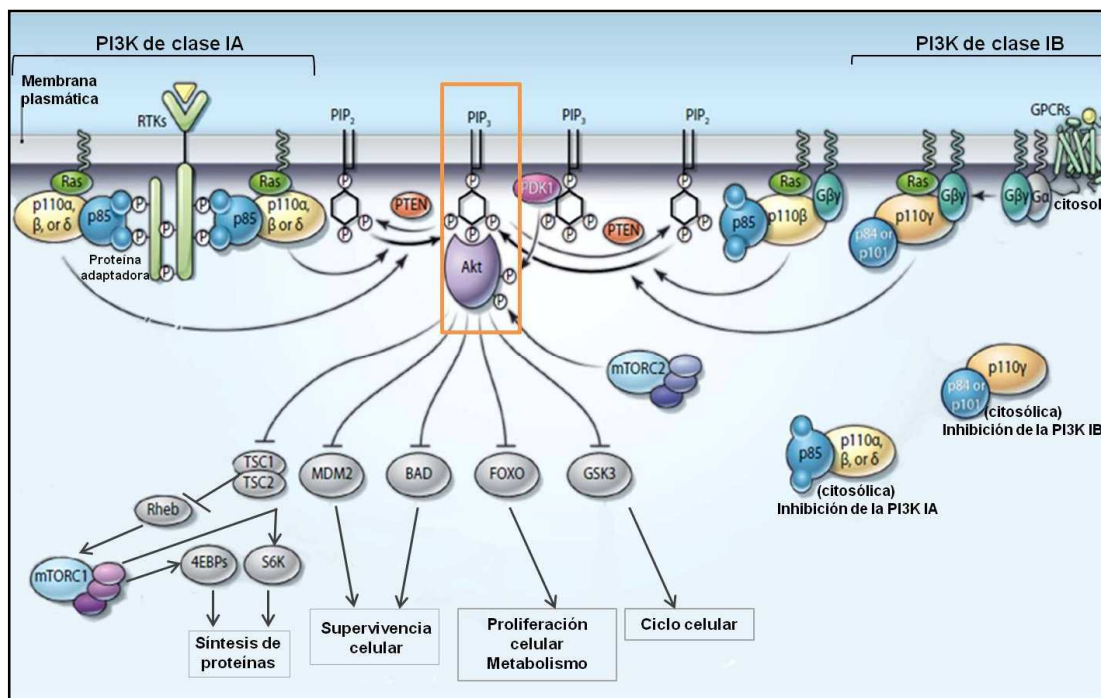
**Activación de la PI3K de clase IB**, se inicia a través de la interacción de p110 $\gamma$  con las subunidades reguladoras p101 o p84 y con las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas G heterotriméricas acopladas a los receptores GPCRs, lo que permite que p110 $\gamma$  se una a la membrana (Guillemet-Guibert *et al.*, 2008; Kurosu *et al.*, 1997; Maier *et al.*, 1999) (**Figura 5**).

## 2. La ruta PI3K/PTEN/AKT en mamíferos

Esta ruta se inicia a través de la activación de los receptores RTKs o GPCRs, los cuales a su vez activan a la PI3K de clase I. Además, se ha demostrado que para la óptima activación de la PI3K se requiere la unión de RAS-GTP (forma activa de la GTPasa RAS) a través del dominio RBD de p110, estimulando su actividad quinasa de lípidos mediante un cambio conformacional en el sitio de unión al sustrato u optimizando su interacción con la membrana (Castellano y Downward, 2011; Denley *et al.*, 2008; Jiménez *et al.*, 2002; Pacold *et al.*, 2000; Rodríguez-Viciano *et al.*, 1994). En mamíferos, existen tres proteínas RAS: H-RAS, K-RAS y

N-RAS. La estructura de RAS comprende una región N-terminal muy conservada en las tres, en la cual se sitúa el dominio efector que interacciona con la PI3K, seguida de una región C-terminal divergente (región hipervariable; HVR) que contiene las secuencias de anclaje a la membrana seguidas de un motivo CAAX (donde C es una cisteína, A cualquier aminoácido alifático y X es cualquier aminoácido). La cisteína del motivo CAAX de RAS es prenilada mediante las enzimas farnesil-transferasa o geranil-transferasa, lo que facilita el anclaje a la membrana. En el caso de K-RAS, la secuencia de anclaje posee un dominio polibásico rico en lisinas, que permite la interacción con la membrana a través de interacciones iónicas (Hancock, 2003). Las tres proteínas RAS tienen capacidad de unir nucleótidos de guanina (GTP o GDP), poseen actividad GTPasa intrínseca y necesitan estar unidas a la membrana para realizar su función. La PI3K ya activa en la membrana produce PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, lo que permite el reclutamiento de proteínas con dominios PH específicos para este fosfoinosítido, entre las que destacan las quinasas de Ser/Thr PDK1 (*Phosphoinositide-Dependent Kinase 1*) y PKB/AKT (Alessi *et al.*, 1997; Stephens *et al.*, 1998). AKT es uno de los efectores más importantes de esta ruta y el que está más directamente implicado en cáncer. La familia de AKT consta de tres isoformas: AKT1/PKB $\alpha$ , AKT2/PKB $\beta$  y AKT3/PKB $\gamma$ . Están constituidas por tres dominios principales: un dominio PH N-terminal que une específicamente PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> y PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> (James *et al.*, 1996; Stephens *et al.*, 1998), un dominio catalítico central con actividad Ser/Thr quinasa y un dominio regulador C-terminal que incluye un dominio hidrofóbico y rico en prolinas. La activación de AKT se inicia con su translocación desde el citosol a la membrana mediante su unión a PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, lo que causa un cambio conformacional que expone los aminoácidos Thr308 y Ser473, cuyas fosforilaciones son necesarias para completar su activación (Bellacosa *et al.*, 1998). La Thr308 (situada en el lazo de activación) es fosforilada por PDK1 y la Ser473 (situada en el motivo hidrofóbico) es fosforilada por mTORC2 (*Mammalian Target Of Rapamycin Complex 2*) (Sarbasov *et al.*, 2005). Una vez activa, AKT fosforila un elenco de proteínas implicadas en diversos procesos biológicos. Entre otros procesos, AKT promueve: la supervivencia celular mediante la inhibición de

la ubiquitina E3 ligasa MDM2 (*Murine Doble Minute 2*) y del factor apoptótico BAD (*B cell lymphom 2 (BCL-2) Antagonist of cell Death*) (Manning y Cantley, 2007), la proliferación celular y el metabolismo mediante la inhibición de los factores de transcripción FOXO (*FOrkhead boX O*) (Brunet *et al.*, 1999), y la progresión del ciclo celular mediante la inhibición de GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*) (Foukas *et al.*, 2006). Además, AKT fosforila al complejo TSC1/2 (*Tuberous Sclerosis Complex 1/2*) inhibiéndolo, lo que permite que la GTPasa Rheb (*Ras Homolog Enriched in Brain*) active a la quinasa mTORC1 (*Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1*). El complejo mTORC1 fosforila y activa a S6K (*p70 ribosomal protein S6 Kinase*) y a las proteínas de unión al factor de iniciación 4EBP1 (*inhibitory 4E-Binding Protein 1*), promoviendo la síntesis de proteínas y favoreciendo el crecimiento celular (Ma y Blenis, 2009) (**Figura 5**).



**Figura 5:** Ruta de señalización de la PI3K de clase I y los principales sustratos fisiológicos de AKT en mamíferos. Modificada de Vadas *et al.* (2011).

El principal regulador negativo de la ruta PI3K/AKT es el supresor tumoral **PTEN**. Esta proteína es una fosfatasa de lípidos que desfosforila la posición 3 del anillo de inositol del PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> producido por PI3K, generando PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>

(Maehama y Dixon, 1998; Maehama *et al.*, 2001; Salmena *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2012b; Song *et al.*, 2012). También presenta una baja actividad fosfatasa de proteínas, desfosforilando residuos de Tyr, Ser y Thr (Li *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2012). La célula posee otra forma de desfosforilar el PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> mediante la acción de SHIP1 y SHIP2 (*Src-Homology-2-containing-Inositol 5-Phosphatase*), unas fosfatasas que actúan sobre la posición 5 del anillo de inositol, generando PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, lo que puede derivar la señalización iniciada por la PI3K hacia otras rutas diferentes (Harris *et al.*, 2008; Jiang y Liu, 2009).

### **3. Implicación de la PI3K en enfermedades humanas: alteraciones oncogénicas en la ruta PI3K/PTEN/AKT**

En mamíferos, como ya se ha mencionado, la actividad PI3K regula el crecimiento y la proliferación celular, así como la migración celular y la homeostasis de la glucosa, entre otras funciones fisiológicas (Cantley, 2002). Por ello, la desregulación de sus funciones está implicada en el desarrollo de diversas patologías en humanos. En general, se ha descrito la implicación de la PI3K de clase I en enfermedades neurodegenerativas (Gross y Bassell, 2014; Jansen *et al.*, 2015; Karam *et al.*, 2010; Krueger *et al.*, 2013), cardiovasculares (Aoyagi y Matsui, 2011), o metabólicas como la diabetes (Lee *et al.*, 2012), así como en la aparición de cáncer (Gutierrez *et al.*, 2009; Martini *et al.*, 2013). Concretamente, se ha relacionado a las isoformas p110 $\gamma$  y p110 $\delta$ , mayoritariamente expresadas en linfocitos, con la alergia, enfermedades inflamatorias y artritis reumatoide (Rommel *et al.*, 2007), y en particular se han descrito mutaciones de la isoforma p110 $\delta$  implicadas en el desarrollo de enfermedades respiratorias (Angulo *et al.*, 2013).

Las alteraciones oncogénicas que se dan en la ruta PI3K/PTEN/AKT confieren a las células tumorales ventajas para su proliferación y supervivencia. La hiperactivación de esta ruta puede producirse como consecuencia de:

- **Mutaciones de ganancia de función o sobre-expresión de los RTKs.**

Por ejemplo mutaciones somáticas de ganancia de función en el receptor EGFR

en cáncer de pulmón (Nakajima *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2007; Sordella *et al.*, 2004). También se observa amplificación de los RTKs, EGFR y PDGFRA (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha*) en el 50% de los glioblastomas (Snuderl *et al.*, 2011).

- **Mutaciones oncogénicas o sobre-expresión de la PI3K.** La subunidad catalítica p110 $\alpha$  es la que más implicada esta en cáncer mediante amplificaciones (Shayesteh *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2012a; Vivanco y Sawyers, 2002; Wu *et al.*, 2005a; Wu *et al.*, 2005b) o mutaciones del gen que la codifica, *PIK3CA* (Lawrence *et al.*, 2014; Myers *et al.*, 2012; Samuels *et al.*, 2004). En el caso del gen que codifica a p110 $\beta$ , *PIK3CB*, su amplificación/sobre-expresión induce transformación oncogénica (Kang *et al.*, 2006) y esta alteración se ha hallado en cáncer de colon, de endometrio y en glioblastomas (An *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2006; Karakas *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010; Samuels *et al.*, 2004; Vogt *et al.*, 2007). Además, se ha descrito una mutación oncogénica en el dominio helical, E633K, en cáncer de mama (Dbouk *et al.*, 2013) y en cáncer de pulmón la mutación D1067V en el dominio quinasa (Pazarentzos *et al.*, 2015). Por lo que respecta a las isoformas p110 $\delta$  y p110 $\gamma$ , se ha comprobado que tienen un potencial oncogénico mediado por su sobre-expresión (Kang *et al.*, 2006). La expresión de la isoforma p110 $\delta$  se encuentra incrementada en patologías del sistema hematopoyético tales como linfomas no Hodgkin (Kreisel *et al.*, 2011) o en leucemia linfocítica crónica (Herman y Johnson, 2012); y moderadamente incrementada en melanoma o cáncer de mama (Tzenaki *et al.*, 2012). En esta isoforma también se han encontrado mutaciones oncogénicas en el dominio quinasa, como E1021K (Burke y Williams, 2015; Zhang *et al.*, 2013). Por último, se ha establecido una relación entre el nivel de expresión de p110 $\gamma$  y el desarrollo de DLBCL (*Diffuse Large B-cell Lymphoma*) (Zhang *et al.*, 2007).

Con menor frecuencia también se han hallado en tumores mutaciones o truncaciones en la subunidad reguladora p85 $\alpha$  (Bourgon *et al.*, 2014; Cheung *et al.*, 2014; Jaiswal *et al.*, 2009), y todavía en menor proporción mutaciones o amplificaciones en la subunidad reguladora p85 $\beta$  (Cheung *et al.*, 2011). Por otro

lado, se ha descrito que en cáncer hepático y de mama se produce una disminución de la expresión del gen *PIK3R1*, lo que posiblemente da lugar al desarrollo de estos tumores (Cizkova *et al.*, 2013; Taniguchi *et al.*, 2010).

- **Mutaciones oncogénicas en RAS.** La proteína K-RAS puede ser activada por mutaciones que la bloquean en su estado activo (RAS-GTP) causando la activación constitutiva de la señalización que modula. Las mutaciones oncogénicas de K-RAS que más frecuentemente aparecen en tumores humanos son G12V y G12D (Bos, 1989; Buhrman *et al.*, 2010; Hilgers y Kern, 1999; Scheffzek *et al.*, 1997; Vandal *et al.*, 2014). Siendo uno de sus principales efectores p110 $\alpha$ , la cual está directamente relacionada con la capacidad transformante que ejercen estas mutaciones (Castellano y Downward, 2010).

- **Mutaciones oncogénicas o sobre-expresión de AKT.** Se han identificado mutaciones oncogénicas de AKT1 y AKT3 en cáncer de mama, colon, ovario, pulmón y en melanomas (Carpten *et al.*, 2007; Martini *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2014; Shoji *et al.*, 2009). También se han descrito amplificaciones de AKT2 y AKT3 en diversos tipos de cáncer como el de ovario o mama (Altomare y Testa, 2005; Dobashi *et al.*, 2014; Nakatani *et al.*, 1999).

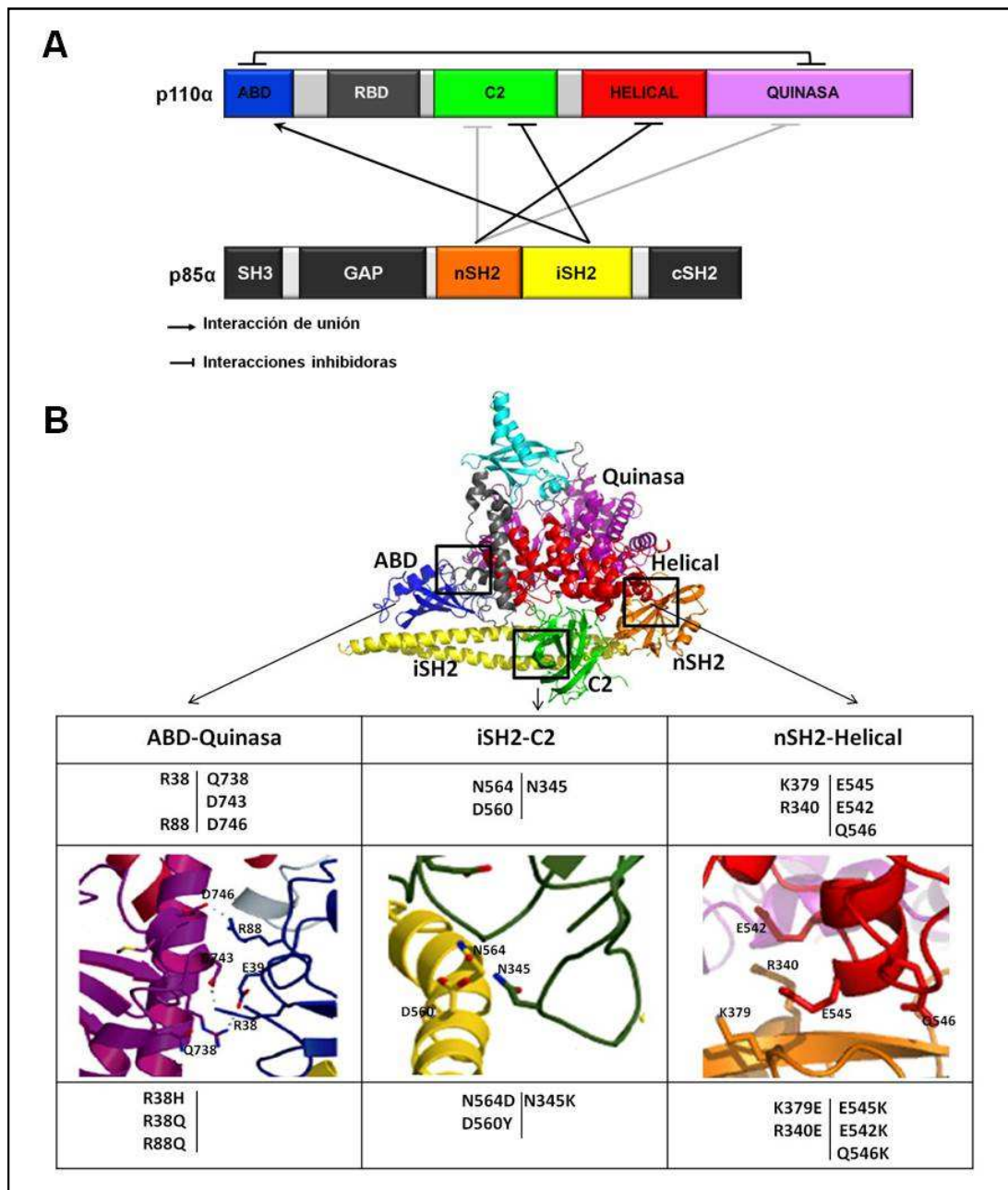
- **Inactivación del gen de PTEN** debido a: (i) mutaciones germinales, que han sido observadas en un grupo de síndromes autosómicos dominantes denominados *PHTS* (*PTEN Hamartoma Tumor Syndrome*) que se caracterizan por problemas neurológicos y susceptibilidad a desarrollar cáncer (Hobert y Eng, 2009); (ii) mutaciones somáticas en tumores esporádicos, que se han hallado en un gran número de tumores humanos como glioblastoma, cáncer de endometrio o cáncer de próstata, por lo que se considera a PTEN uno de los supresores tumorales más frecuentemente mutados en cáncer (Chalhoub y Baker, 2009); (iii) pérdida de uno de los alelos, ya que PTEN parece ser haploinsuficiente (Kwon *et al.*, 2008); (iv) mutaciones o hipermetilación del promotor del gen, que conllevan la disminución de la expresión de PTEN (Zysman *et al.*, 2002).

#### 4. Mecanismo fisiológico de activación del heterodímero p110 $\alpha$ /p85 $\alpha$

En condiciones basales, el heterodímero p85 $\alpha$ /p110 $\alpha$  se sitúa en el citosol. La unión de p85 $\alpha$  a p110 $\alpha$  controla tres funciones clave del heterodímero: p85 $\alpha$  estabiliza a p110 $\alpha$ , la mantiene en un estado de actividad bajo (conformación inactiva) y actúa como proteína adaptadora para posicionar a p110 $\alpha$  en la membrana, donde está su sustrato (Backer, 2010; Cuevas *et al.*, 2001). De todas las interacciones que se dan entre los dominios de p85 $\alpha$  y p110 $\alpha$ , las más relevantes son la interacción responsable de la formación del heterodímero, dominio iSH2 de p85 $\alpha$  con dominio ABD de p110 $\alpha$  (Holt *et al.*, 1994) y las interacciones con efecto inhibidor que mantienen a la PI3K en estado de conformación inactiva: 1) dominio nSH2 de p85 $\alpha$  con dominio helical de p110 $\alpha$ ; 2) dominio iSH2 de p85 $\alpha$  con dominio C2 de p110 $\alpha$ ; 3) dominio ABD de p110 $\alpha$  con su propio dominio quinasa (Huang *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2007; Miled *et al.*, 2007) (**Figura 6**)

En condiciones fisiológicas la estimulación de los RTKs, desencadena el paso de la conformación inactiva a la conformación activa de la PI3K, ya que los dominios nSH2 y cSH2 de p85 $\alpha$  se unen a los RTKs activados, aproximando el heterodímero a la membrana y generando un cambio de conformación que elimina las interacciones inhibitoras: 1) se rompe la interacción de los dominios nSH2-helical, puesto que el dominio nSH2 interacciona tanto con el dominio helical como con el dominio quinasa de p110 $\alpha$  posiblemente afecte también al dominio quinasa (Huang *et al.*, 2007); 2) se elimina la interacción entre los dominios iSH2-C2; 3) como consecuencia de la pérdida de la interacción anterior varía la orientación del dominio ABD con respecto al dominio catalítico, lo que permite al dominio quinasa aproximarse a la membrana (Burke *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2007; Miled *et al.*, 2007). Este cambio de conformación no afecta a la interacción iSH2-ABD, ya que la región de unión de iSH2 con ABD es diferente a la región implicada en su interacción con C2, y además permite que el dominio iSH2 exponga su dominio rico en aminoácidos básicos con posible capacidad de unión a la membrana (End *et al.*, 1993; Miled *et al.*, 2007).





**Figura 6: Esquema de las interacciones del dímero p110α/p85α.** **A.** Representación de las interacciones más relevantes entre los propios dominios de p110α y entre p85α y p110α. Las líneas en negro y los dominios en color representan las interacciones y los dominios más importantes para la regulación del heterodímero (Pacold *et al.*, 2000; Shekar *et al.*, 2005; Vadas *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2000; Zhao y Vogt, 2008a). **B.** Zonas de contacto entre dominios que están implicados directamente en la regulación de la actividad de la PI3K. Diagrama de la estructura del heterodímero p110α/p85α (nSH2) (PDB 3HMM), realizada con PyMOL. Los recuadros negros indican las zonas de contacto entre los diferentes dominios a través de los cuales se dan las interacciones representadas por una línea negra en el apartado A. Se muestran en los paneles situados sobre las estructuras ampliadas los aminoácidos implicados en la interacción de los dominios, y en los paneles situados debajo de las estructuras algunos de los mutantes que se han identificado en tumores. Modificado de Gabelli *et al.* (2010)

## 5. Mutaciones de la subunidad catalítica p110 $\alpha$ en cáncer

El gen *PIK3CA* se encuentra frecuentemente mutado en diversos tipos de cáncer, como cáncer de mama, próstata, colon o endometrio (Arsenic *et al.*, 2014; Bader *et al.*, 2006; Bourgon *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2005; Mukohara, 2015; Rudd *et al.*, 2011; Samuels *et al.*, 2004) por lo que la oncoproteína que codifica se considera una diana de inhibidores con aplicación terapéutica (Samuels *et al.*, 2004; Vogt *et al.*, 2006). La mayoría de las mutaciones puntuales se concentran en dos “hot spots”: en el dominio helical, en concreto en los aminoácidos Glu542 y Glu545, que se encuentran conservados en la PI3K de clase IA; y en el dominio catalítico, en la His1047, que es específica de p110 $\alpha$ . Las mutaciones más frecuentes en p110 $\alpha$  son E542K, E545K y H1047R (**Figura 7 A**) (Myers *et al.*, 2012; Samuels *et al.*, 2004; Vogt *et al.*, 2007). Estas mutaciones aumentan la actividad de la PI3K *in vitro* y en células de mamífero, promueven la activación de AKT en ausencia de estimulación por factores de crecimiento (Bader *et al.*, 2006; Carson *et al.*, 2008; Ikenoue *et al.*, 2005; Isakoff *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005).

A continuación, se reseñan tanto las mutaciones en estos “hot spots” como otras que aparecen con menor frecuencia en tumores y que también, aunque en menor medida, parecen inducir ganancia de función (**Figura 7 B**):

- **Mutaciones en el dominio ABD:** Las mutaciones oncogénicas más comunes en el dominio ABD son R38H, R38Q y R88Q, las cuales probablemente rompen los enlaces de hidrógeno formados con aminoácidos del dominio quinasa: Arg38 con Gln738 y/o Glu743 y Arg88 con Asp746. La ausencia de estas interacciones debe generar un cambio conformacional en el dominio quinasa que modifica la orientación de p110 $\alpha$  con respecto a la membrana. También se ha observado que estas mutaciones incrementan la actividad de p110 $\alpha$  debilitando la interacción inhibidora entre el dominio nSH2 y el helical (Echeverria *et al.*, 2015). Se ha descrito que, al menos la mutación R38H, posee un débil potencial oncogénico comparado con las mutaciones localizadas en otros dominios (Gymnopoulos *et al.*, 2007). Por otro lado, no se han encontrado mutaciones en la interfaz del dominio ABD con el dominio iSH2 de p85 (Huang *et al.*, 2007). Un

mutante de delección del dominio ABD de p110 $\alpha$  presenta un aumento de su actividad quinasa comparado p110 $\alpha$  silvestre. Este incremento de actividad puede ser debido tanto a la pérdida de la interacción inhibitora entre los dominios ABD y quinasa, como a la pérdida del efecto inhibitor de p85 $\alpha$  (Zhao *et al.*, 2005; Zhao y Vogt, 2008b).

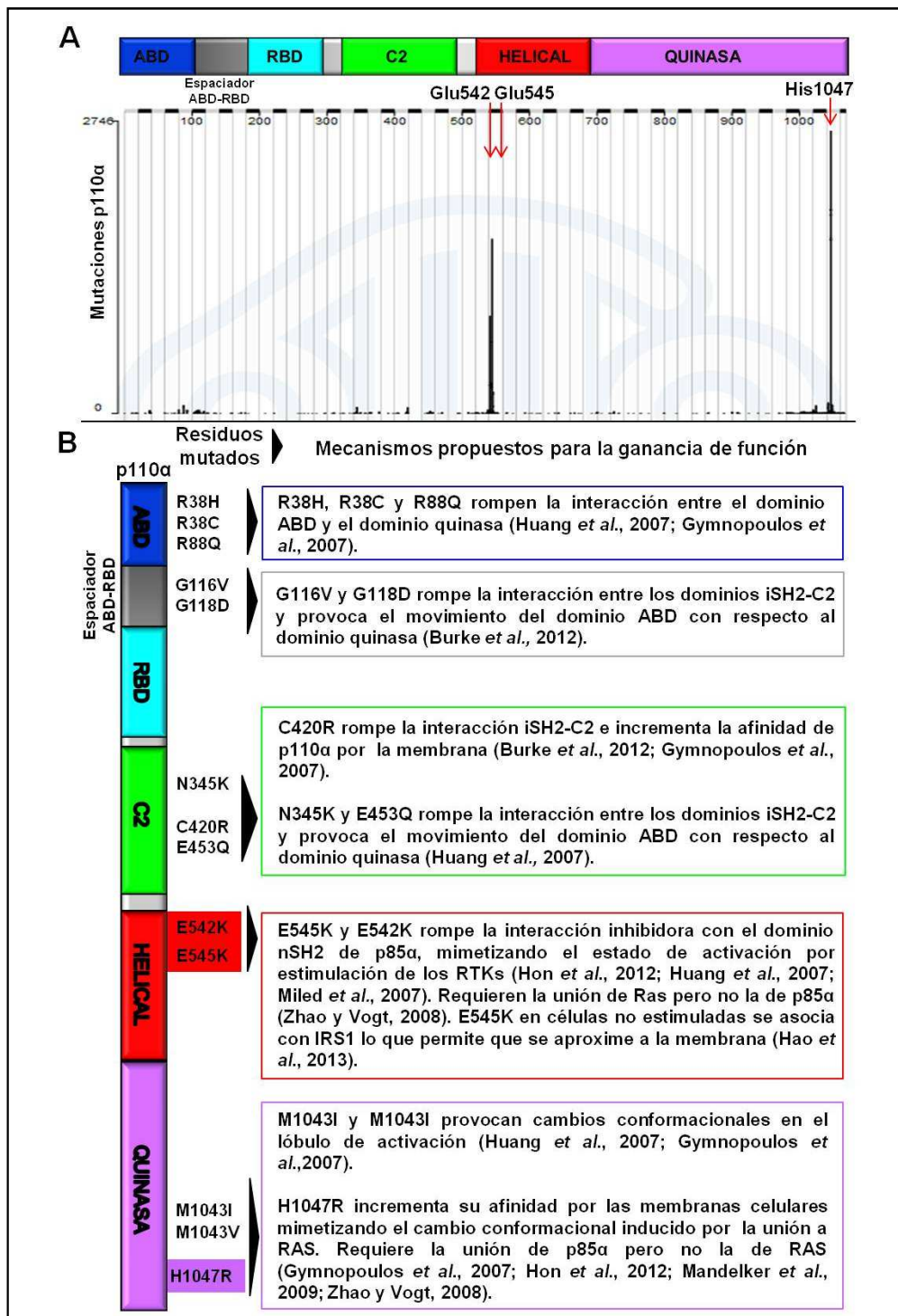
- **Mutaciones en el espaciador entre los dominios ABD y RBD:** Las mutaciones en esta zona son comunes en cáncer de endometrio (Rudd *et al.*, 2011). Las más estudiadas son G106V y G118D. Estas mutaciones incrementan la actividad quinasa debido a que provocan dos sucesos que se dan en la activación normal: la disrupción de la zona de contacto de los dominios iSH2-C2 y el movimiento del dominio ABD con respecto al dominio quinasa (Burke *et al.*, 2012).

- **Mutaciones en el dominio C2:** El aminoácido Asn345 de este dominio interacciona con los aminoácidos Asp560 y Asn564 del dominio iSH2 de p85 $\alpha$  (Huang *et al.*, 2007). En tumores aparece frecuentemente la mutación N345K en p110 $\alpha$ , probablemente elimine la interacción inhibitora con el dominio iSH2 de p85 $\alpha$  además debilitar la interacción inhibitora entre los dominios nSH2 y helical (Echeverria *et al.*, 2015), lo que conlleva la activación de p110 $\alpha$  y conduce a la transformación celular. También se han identificado en cánceres las mutaciones C420R y E453Q que se localizan en la zona de contacto iSH2-C2 y en la región adyacente, respectivamente. Ambas mutaciones generan el mismo efecto que N345K (Burke *et al.*, 2012; Hon *et al.*, 2012; Rudd *et al.*, 2011). En el caso de la mutación C420R también debe de incrementar la afinidad de p110 $\alpha$  por la membrana (Gymnopoulos *et al.*, 2007).

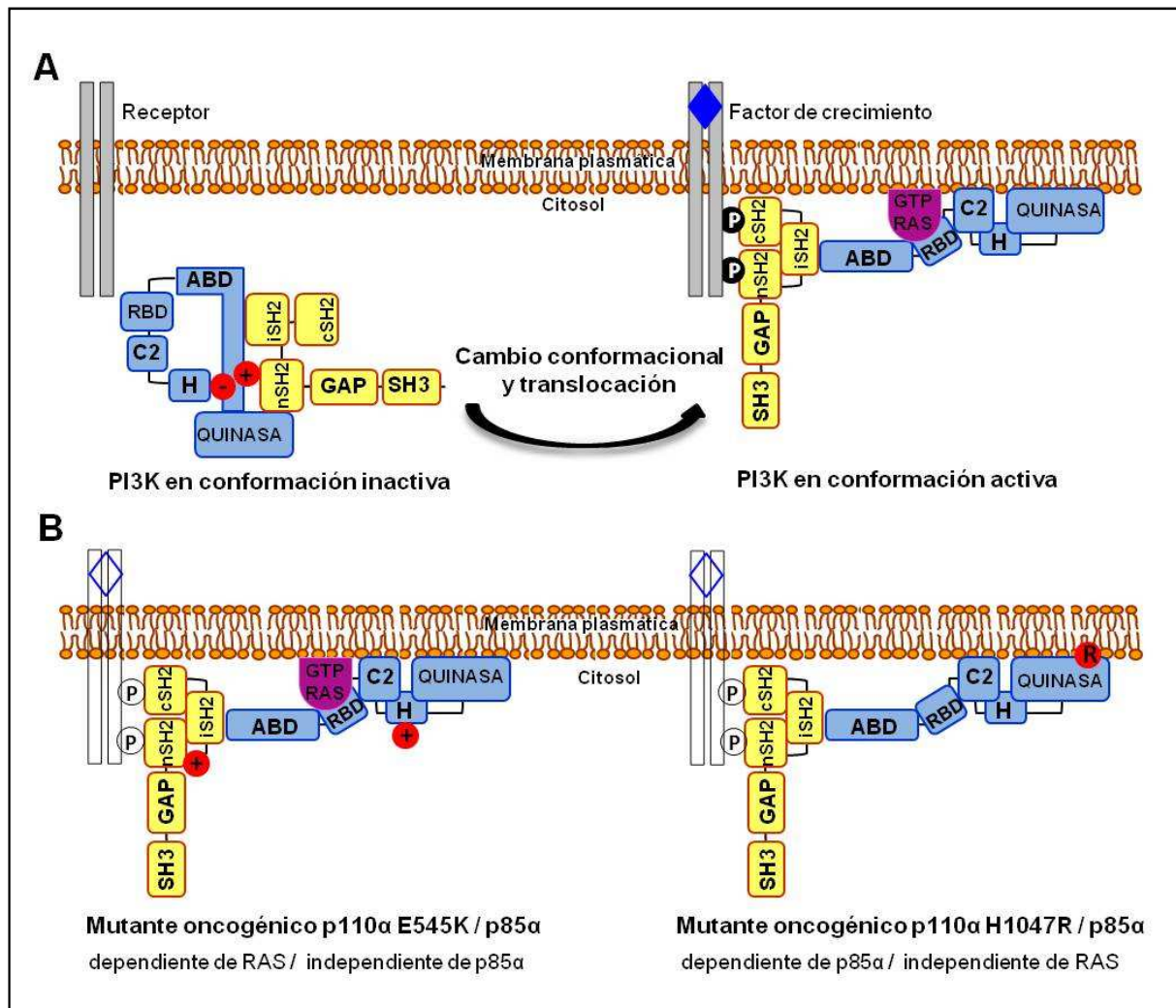
- **Mutaciones en el dominio helical y quinasa:** La activación producida por las mutaciones más frecuentes del dominio helical, E542K y E545K, depende de la interacción con RAS-GTP pero no de la que se produce con p85 $\alpha$  (Chaussade *et al.*, 2009; Zhao y Vogt, 2008b; 2010). Estas mutaciones rompen la interacción inhibitora con el dominio nSH2, lo que constituiría una forma de activación similar a la que ocurre en condiciones fisiológicas por unión de p85 $\alpha$  a

los RTKs activos, por tanto, la actividad catalítica no se incrementará tras la estimulación de los RTKs (Burke *et al.*, 2012; Carson *et al.*, 2008; Hon *et al.*, 2012) (**Figura 8**). Por el contrario, la mutación H1047R en el dominio quinasa es independiente de la interacción con RAS-GTP pero probablemente es dependiente de un cambio conformacional mediado por p85 $\alpha$  a través de la interacción entre los dominios ABD-quinasa (Burke *et al.*, 2012; Zhao y Vogt, 2008b; 2010). Esta mutación, al estar cerca del extremo del lóbulo de activación, hace que tanto la orientación de este lóbulo como la del catalítico, asuman conformaciones que favorecen la interacción directa de otros aminoácidos con la membrana, permitiendo un mejor acceso a su sustrato, el PtdIns(3,4,5)P<sub>2</sub> (**Figura 8**). Por tanto, el mutante H1047R debe mimetizar el estado de activación por unión a RAS-GTP, que incrementa la unión a membrana de p110 $\alpha$  (Burke *et al.*, 2012; Gabelli *et al.*, 2010; Hon *et al.*, 2012; Mandelker *et al.*, 2009). También se ha observado que el mutante E545K (pero no el H1047R) en ausencia de estímulos se asocia con IRS1 independientemente de p85 $\alpha$ , lo que posiblemente permitiría su aproximación a la membrana y su estabilización (Hao *et al.*, 2013). Un doble mutante en las posiciones Glu542 (o Glu545) e His1047 se regula de forma independiente de RAS y p85 $\alpha$ , activando a AKT y promoviendo la transformación de fibroblastos de pollo (Zhao y Vogt, 2008b). Estos datos refuerzan la idea de que las mutaciones en estos dominios actúan mediante dos mecanismos diferentes e independientes. En el dominio quinasa aparecen también con menor frecuencia las mutaciones M1043I y M1043V, que deben de ejercer un efecto activador mediante cambios conformacionales en el lóbulo de activación (Gymnopoulos *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2007).

De todas las mutaciones de p110 $\alpha$  descritas en los apartados anteriores, H1047R es la que posee el efecto activador más potente (Burke *et al.*, 2012; Gymnopoulos *et al.*, 2007)



**Figura 7: A. Histograma representativo de la frecuencia de las mutaciones somáticas encontradas en el gen *PIK3CA*. En la parte superior se muestra un esquema de los dominios funcionales de p110 $\alpha$  y las barras del histograma indican el número y la localización de las mutaciones dentro de los distintos dominios. Modificado a partir de la base de datos COSMIC (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*) B. Esquema de la localización y mecanismo de ganancia de función de las mutaciones más estudiadas en el gen *PIK3CA*. Las tres mutaciones de los “hot spots” se indican mediante rectángulos de color rojo (dominio helical) y morado (dominio quinasa).**



**Figura 8: Representación esquemática del mecanismo de activación de los heterodímeros p110α E545K/p85α y p110α H1047R/p85α.** **A.** Mecanismo fisiológico de activación del heterodímero p110α/p85α silvestre. La inhibición de la PI3K (p110α se muestra en azul y p85α en amarillo) está mediada, en parte, por la interacción electrostática (representada la carga positiva como (+) y la negativa como (-)) entre los dominios helical y nSH2. Para simplificar, algunas interacciones descritas en el texto no están representadas en este esquema. **B.** Mecanismo de activación de los mutantes de p110α E545K y H1047R junto a p85α. El mutante E545K contiene una carga de signo contrario, por lo que se rompe la interacción inhibitoria resultando en la activación de p110α. El mutante H1047R aumenta su contacto con la membrana de manera independiente a la interacción con RAS dando lugar a la activación de la p110α. La Arg1047 está representada mediante un círculo rojo con una R.



## 6. Mutaciones de la subunidad reguladora p85 $\alpha$ en cáncer

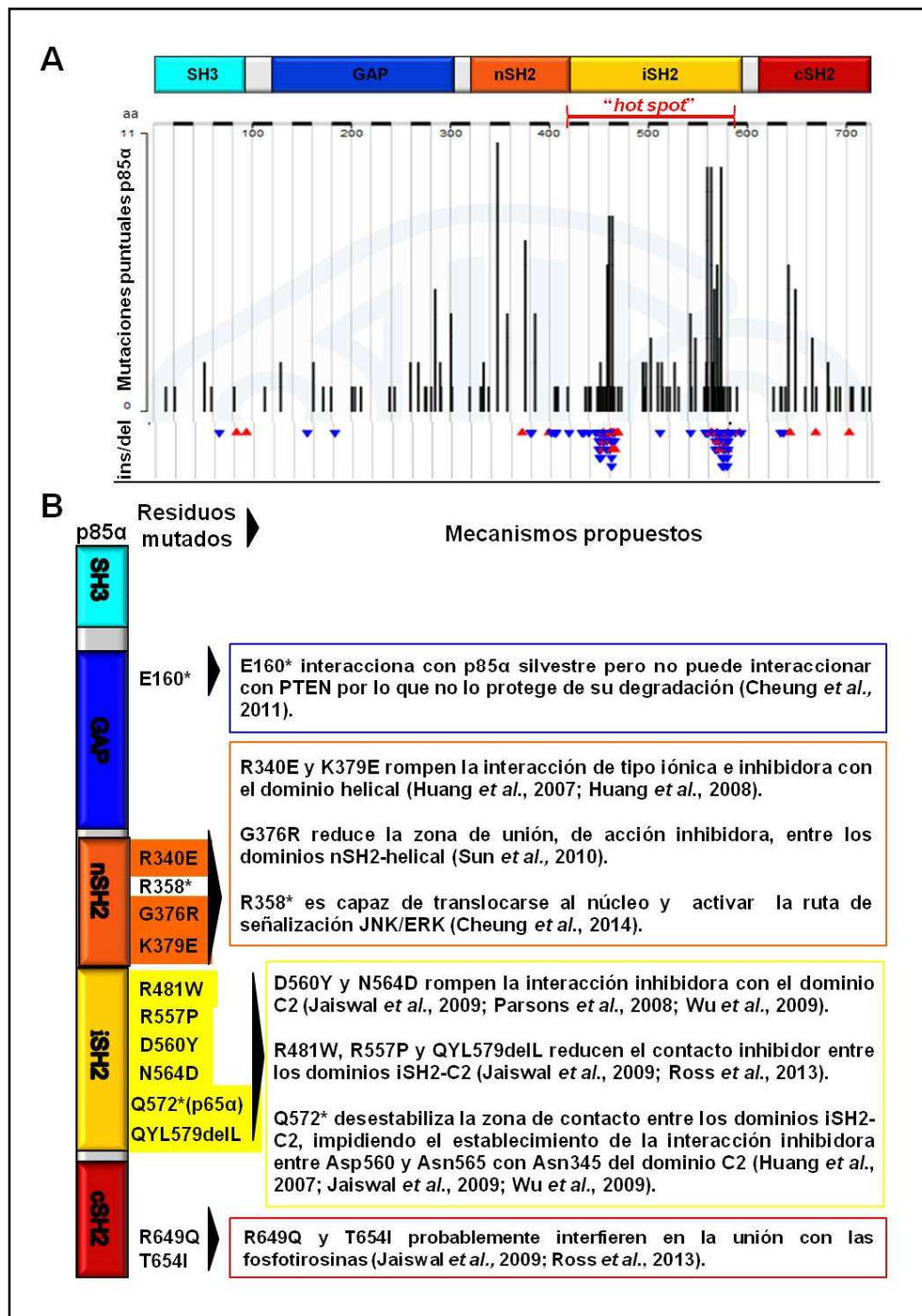
Las mutaciones en el gen *PI3KR1* son menos comunes que las del gen *PIK3CA* y se han encontrado en glioblastoma (*Cancer Genome Atlas Research Network*, 2008), cáncer colorrectal (Jaiswal *et al.*, 2009), de endometrio (Bourgon *et al.*, 2014; Cheung *et al.*, 2011; Urick *et al.*, 2011), o urotelial (Ross *et al.*, 2013), entre otros. En cáncer colorrectal las mutaciones del gen *PI3KR1* suelen coexistir con mutaciones en los genes *PIK3CA* o *PTEN* (Jaiswal *et al.*, 2009), al contrario que en el caso de los glioblastomas, donde suelen ser únicas (Wang *et al.*, 2004). En el cáncer de endometrio coexisten con mutaciones de *PTEN* y *K-RAS*, pero no con mutaciones en el gen *PIK3CA* (Urick *et al.*, 2011). Las mutaciones oncogénicas de p85 $\alpha$  se localizan predominantemente en la región C-terminal, que comprende los dominios nSH2, iSH2 y cSH2, sobre todo en el “hot spot” del dominio iSH2 (**Figura 9 A**). No obstante, también se han hallado mutaciones implicadas en cáncer en otros dominios, como es el caso de la truncación E160\* del dominio GAP, que no interacciona con *PTEN* por lo que no lo protege de su degradación y no podrá contrarrestar la actividad de la PI3K (Cheung *et al.*, 2011). Las mutaciones halladas en el dominio cSH2, como R649Q o T654I, que forman parte o están próximas a la secuencia de unión a fosfotirosinas, posiblemente interfieren negativamente en la unión a las mismas (Jaiswal *et al.*, 2009; Ross *et al.*, 2013) (**Figura 9 B**). En general, la mayoría de las mutaciones de p85 $\alpha$  situadas en los dominios nSH2 e iSH2 incrementan la actividad catalítica de p110 $\alpha$ , promoviendo la supervivencia celular, la activación de *AKT*, la proliferación celular y la transformación celular oncogénica (Sun *et al.*, 2010).

A pesar de que p85 $\alpha$  se puede unir a todas las isoformas de p110, su papel oncogénico parece mediado exclusivamente a través de p110 $\alpha$  (Jaiswal *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2010). A continuación, se resumen las mutaciones en los dominios nSH2 e iSH2 de p85 $\alpha$  que están implicadas directamente en la regulación del efecto inhibitor que ejerce p85 $\alpha$  sobre p110 $\alpha$  y que han sido encontradas en tumores de distintos orígenes (**Figura 9 B**):

- **Mutaciones en el dominio nSH2.** Entre los aminoácidos básicos Lys379 y Arg340 de este dominio y la región ácida del dominio helical, Glu542, Glu545 y Gln546, se produce una interacción inhibitoria de tipo iónico (Huang *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2007). Así pues, se ha observado que el diseño de mutantes con carga de signo contrario simultáneamente en el dominio helical de p110 $\alpha$  (E542K, E545K y Q546K) y en el dominio nSH2 de p85 $\alpha$  (K379E y R340E) da lugar al restablecimiento de la interacción inhibitoria. La mutación K379E corrobora los datos de cristalografía que apuntaban a una interacción directa entre la carga positiva de la Lys379 con la carga negativa del Glu545 del dominio helical de p110 $\alpha$  (Miled *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2010). La mutación G376R, en el dominio nSH2, probablemente también reduce el contacto inhibitorio con el dominio helical de p110 $\alpha$  (Sun *et al.*, 2010). Otras mutaciones en este dominio, como N377K, también deben de afectar a la actividad de p110 $\alpha$  (Ross *et al.*, 2013). Además, se han hallado mutaciones que actúan independientemente de p110 $\alpha$ , como la truncación R358\* que activa la ruta de señalización JNK/ERK (Costa y Engelman, 2014; Cheung *et al.*, 2014).

- **Mutaciones en el dominio iSH2.** Como se mencionó anteriormente, se establece una interacción inhibitoria mediante un enlace de hidrógeno entre los aminoácidos Asn560 y Asp564 del dominio iSH2 en p85 $\alpha$  y el aminoácido Asn345 del dominio C2 de p110 $\alpha$ . En glioblastoma y cáncer de colon se han detectado en este dominio las mutaciones N564D, D560Y, N564D/D560Y y QYL579delL, que retienen la capacidad de unirse a p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  y p110 $\delta$  estabilizándolas, pero no las inhiben (Sun *et al.*, 2010). Estos efectos se deben a la pérdida de la interacción inhibitoria entre los dominios iSH2-C2, por lo que el dominio iSH2 es un potencial “hot spot” de mutaciones que confieren una ventaja para el crecimiento celular (Jaiswal *et al.*, 2009; Parsons *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009). Además, se demostró el potencial oncogénico *in vivo* de estas mutaciones en células hematopoyéticas (Jaiswal *et al.*, 2009). Se han hallado otras mutaciones en este dominio, como R557P o R481W, que también podrían afectar a la actividad de p110 $\alpha$  por reducir la superficie de contacto entre los dominios iSH2-C2 (Ross *et al.*, 2013).





**Figura 9: A. Histograma representativo de la frecuencia de las mutaciones puntuales, inserciones y deleciones encontradas en el gen *PIK3R1*.** Modificado a partir de la base de datos COSMIC (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*). En la parte superior se muestra un esquema de los dominios funcionales de p110α y las barras del histograma indican el número y la localización de las mutaciones puntuales dentro de los distintos dominios. Los triángulos rojos indican inserciones y los azules deleciones. **B. Esquema de la localización y mecanismo de acción de las mutaciones halladas en el gen *PIK3R1*.** Las mutaciones de los “hot spots” que están implicadas directamente en la regulación de p110α se indican mediante rectángulos de color naranja (dominio nSH2) y amarillo (dominio iSH2).

### 7. p65 $\alpha$ , la truncación oncogénica de p85 $\alpha$

Una forma oncogénica truncada de p85 $\alpha$ , llamada p65 $\alpha$ , fue aislada en linfomas tímicos murinos inducidos por rayos X (Jiménez *et al.*, 1998). Este mutante carecía del dominio cSH2 y parte de la región iSH2 (aminoácidos del 572 al 724), los cuales habían sido sustituidos por una región conservada de la familia de receptores ephrina. La actividad quinasa de lípidos del complejo p65 $\alpha$ /p110 $\alpha$  fue mayor y más prolongada que la descrita para la forma silvestre, tanto en presencia como en ausencia de estímulo (Chan *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 1998; Shekar *et al.*, 2005). Estos hallazgos indican que la región C-terminal de p85 $\alpha$  está implicada tanto en la inhibición de la actividad de p110 $\alpha$  de forma independiente a la activación de los receptores RTKs, como en el control de la terminación de la señalización de la PI3K. En general, el mutante p65 $\alpha$  mantiene su capacidad de unirse y de estabilizar a p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  y p110 $\delta$ , y es capaz de incrementar la actividad catalítica de estos heterodímeros en comparación con los heterodímeros silvestres (Jaiswal *et al.*, 2009).

Discernir el mecanismo mediante el cual p65 $\alpha$  controla la activación de p110 $\alpha$  reviste un especial interés debido a que se han detectado truncaciones en el dominio iSH2 de p85 $\alpha$ , similares al mutante p65 $\alpha$  murino, en tumores humanos de colon, ovario y linfomas (Jucker *et al.*, 2002; Philp *et al.*, 2001). Una de las primeras hipótesis sobre el posible mecanismo de activación se basaba en que la región C-terminal de p85 $\alpha$  (y ausente en p65 $\alpha$ ) ejerce una función inhibitoria sobre la activación de p110 $\alpha$  por RAS y la unión a residuos fosforilados de tirosinas libera a p110 $\alpha$  de esta inhibición (Chan *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2002). Alternativamente, también se planteó la hipótesis de que la fosforilación de la Ser608 de p85 $\alpha$  (ausente en p65 $\alpha$ ) por la actividad quinasa de proteínas de p110 $\alpha$  inhibe la actividad PI3K (Dhand *et al.*, 1994; Foukas *et al.*, 2004; Philp *et al.*, 2001). Por último, la hipótesis más aceptada actualmente es que la pérdida de los aminoácidos 572-724 del mutante p65 $\alpha$  debe desestabilizar la zona de contacto entre los dominios iSH2-C2 (Asp560/Asn565-Asn345) descrita por Huang *et al.* (2007) (**Figura 9**). Esta hipótesis fue avalada por los datos de Wu *et al.* (2009)

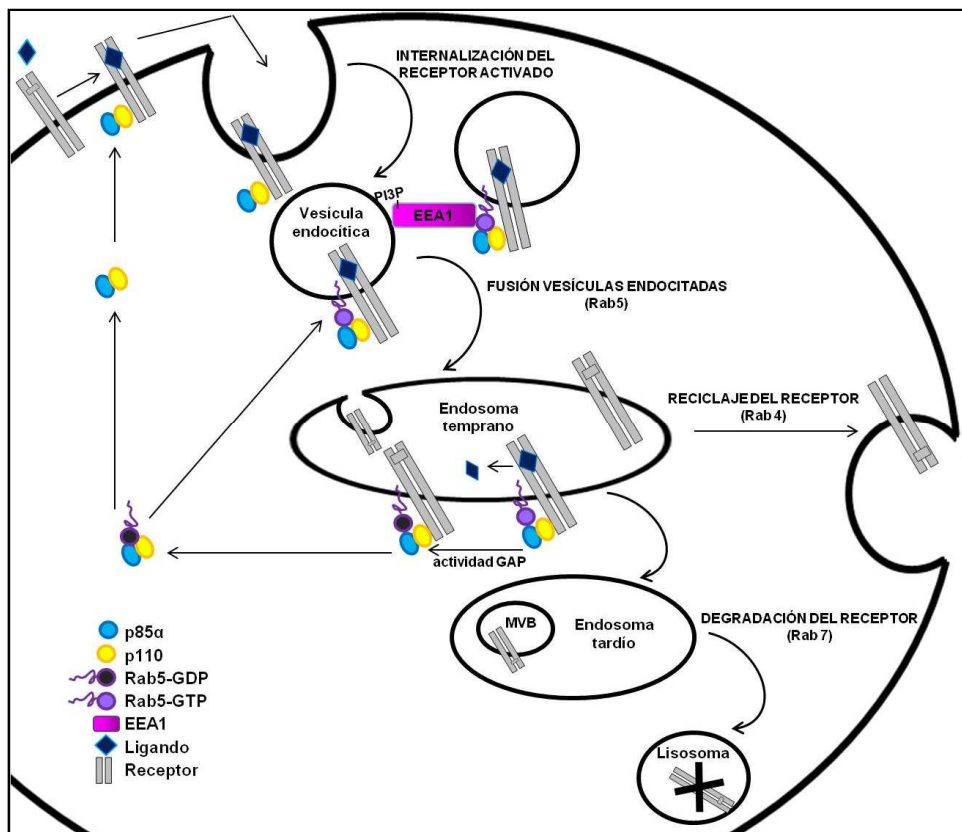
quienes mostraron que la construcción p85ni (formada sólo por los dominios nSH2 y iSH2) inhibía a p110 $\alpha$ , mientras que los mutantes p85ni-572 (fragmento p85ni que carece de los aminoácidos 572 al 600) y p85ni D560K/N564K no la inhibían (Huang *et al.*, 2007; Jaiswal *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). Posteriormente, se ha propuesto que la eliminación de esta zona de contacto, iSH2-C2, produce un cambio conformacional que se transmite al dominio nSH2, disminuyendo su afinidad por el dominio helical, lo que podría provocar la exposición de regiones adicionales con afinidad por la membrana (Hon *et al.*, 2012).

## 8. Papel funcional de p85 $\alpha$ en la regulación del tráfico celular

La función de p85 $\alpha$  más estudiada es la regulación de la actividad de la PI3K a través de p110, pero también desempeña funciones independientes de p110, tales como la regulación de la señalización de AKT a través de su interacción con PTEN (Chagpar *et al.*, 2010) o la del control de la citoquinesis (García *et al.*, 2006). Además participa en la regulación de la respuesta a proteínas mal plegadas mediante su interacción con el factor transcripcional XBP1 (*X-Box Binding Protein 1*) (Park *et al.*, 2010), o mediando la formación del complejo FRAP-p70/S6K, que es necesario para la activación de p70/S6K (González-García *et al.*, 2002).

Una de las funciones de p85 $\alpha$  independientes de p110 más estudiada es la de su participación en la regulación del tráfico de receptores a través de su interacción con Rab5. Las proteínas Rab, al igual que RAS y Rho, son GTPasas de bajo peso molecular que se encuentran en su forma activa cuando están unidas a GTP e inactivas tras la hidrólisis de éste a GDP. Las proteínas Rab están implicadas en la endocitosis y el tráfico celular de los RTKs. Rab5 es la responsable de la regulación de la fusión de las vesículas endocíticas que contienen los receptores activados procedentes de la membrana con endosomas tempranos o de distribución, llamados así porque funcionan como estaciones de clasificación y reparto del contenido de las vesículas endocíticas hacia diferentes compartimentos. Rab5-GTP realiza esta función uniéndose simultáneamente al complejo p85 $\alpha$ /p110/RTKs endocitados y a la proteína EEA1, la cual a su vez se

une a los PtdIns(3)P de otra vesícula, funcionando así de puente entre ambas vesículas (Christoforidis *et al.*, 1999). Tras la fusión de las vesículas, el complejo Rab5-GTP/p85α/p110 es liberado del receptor y p85α ejerce su actividad GAP hacia Rab5 dando lugar a la forma Rab5-GDP (Chamberlain *et al.*, 2004). La mayoría de los RTKs son inactivados mediante la liberación de su ligando y su desfosforilación, y reciclados a la membrana mediante un proceso rápido regulado por Rab4 o lento regulado por Rab4 y Rab11. Una fracción de los RTKs son monoubiquitinados e introducidos en cuerpos multivesiculares dentro de endosomas tardíos, los cuales se fusionarán con lisosomas mediante la participación de Rab7, dando lugar a la degradación de los receptores (Barr y Lambright, 2010) (Figura 10).



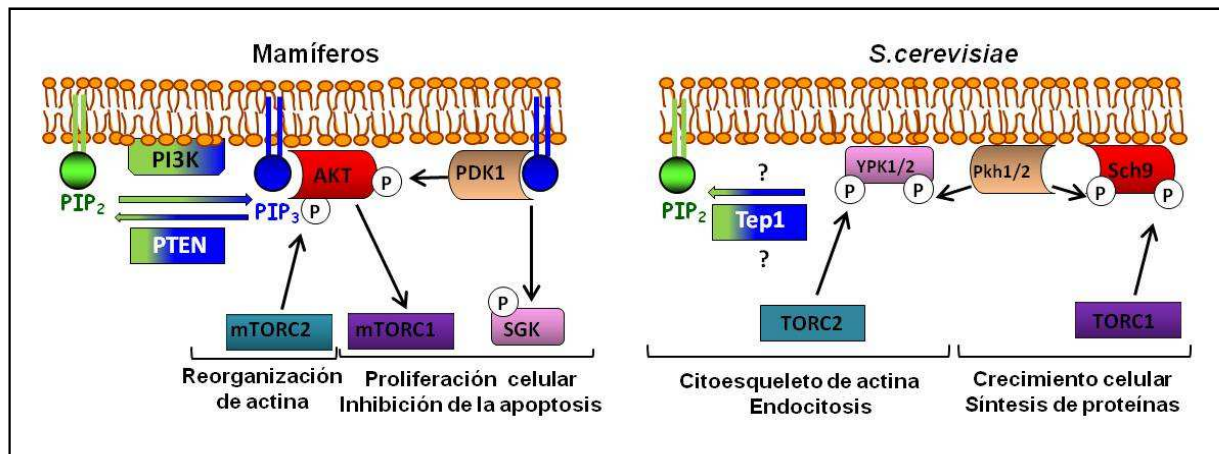
**Figura 10: Las GTPasas Rab regulan el proceso de endocitosis y tráfico de los RTKs.** Los RTKs activados de la membrana son endocitados mediante vesículas endocíticas que se fusionan con endosomas tempranos. Rab5 regula estos procesos de fusión de vesículas. En el endosoma temprano los RTKs pueden ser, bien inactivados y reciclados a la membrana, proceso regulado por Rab4, o bien introducidos en cuerpos multivesiculares (MVB) para su posterior degradación en el lisosoma, proceso regulado por Rab7. PI3P: PtdIns(3)P; GAP: proteína activadora de la actividad GTPasa.

## **9. Reconstitución de la ruta PI3K/PTEN/AKT en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.**

La levadura *S. cerevisiae* es considerada como el organismo unicelular eucariótico modelo por excelencia en el campo de la investigación básica en biología. Este organismo presenta muchas ventajas técnicas, como un cultivo sencillo y económico, con un tiempo de generación corto y una manipulación genética fácil y, además, la secuenciación pionera de su genoma, que contiene algo más de 6000 genes (Goffeau *et al.*, 1996), ha permitido el desarrollo de herramientas post-genómicas (Giaever *et al.*, 2002). Para el estudio de genes implicados en enfermedades humanas en la levadura existen dos aproximaciones. Por un lado, cuando existe un homólogo en la levadura del gen, se puede estudiar mediante experimentos de complementación de la delección del gen de la levadura. Por otro lado, cuando los genes implicados en patologías no están representados en el genoma de la levadura, el gen humano puede ser expresado heterológamente y medir su efecto mediante la detección de un cambio en su fenotipo. En ambos casos estas estrategias se les ha denominado “humanización” de la levadura (Mager y Winderickx, 2005). Si la función del gen humano ya es conocida, los modelos de levadura son de gran importancia para el estudio de las bases moleculares de mutaciones asociadas a la enfermedad. Las levaduras “humanizadas” se han empleado para estudios moleculares de enfermedades, como los síndromes relacionados con la pérdida del ADN mitocondrial (Qian *et al.*, 2014), pero sobre todo para el estudio de las enfermedades neurodegenerativas (Tenreiro *et al.*, 2013). Asimismo nuestro equipo de investigación desarrolló una levadura “humanizada” para el estudio del cáncer mediante la expresión heteróloga de la ruta oncogénica integrada por las proteínas PI3K, PTEN y AKT (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005).

Nuestro modelo se basa en que en la levadura *S. cerevisiae* la señalización a través de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> no tiene lugar, ya que este organismo carece del ortólogo de la PI3K de clase I presente en mamíferos. A pesar de ello, *S. cerevisiae* codifica algunas proteínas equivalentes a las de la ruta PI3K/PTEN/AKT

en mamíferos (**Figura 11**): (i) dos ortólogos funcionales de PDK1 (Pkh1 y Pkh2), implicados en la integridad celular y en la endocitosis (Casamayor *et al.*, 1999; Roelants *et al.*, 2002); (ii) un ortólogo de PTEN (Tep1), implicado en la esporulación (Heymont *et al.*, 2000; Li y Sun, 1997); (iii) una quinasa de la familia AGC (Sch9), que carece del dominio PH y está implicada en la sensibilidad de nutrientes, biogénesis de ribosomas, iniciación de la traducción y control del tamaño celular, y que ha sido propuesta como ortólogo tanto de AKT (Sobko, 2006) como de S6K (Urban *et al.*, 2007); y (iv) ortólogos de mTORC (TORC) (Lorberg y Hall, 2004) y de SGK (Serum y Glucocorticoid-regulated Kinase) (Ypk1 y Ypk2) (Roelants *et al.*, 2002). Además, *S. cerevisiae* codifica dos proteínas RAS, Ras1 y Ras2, muy parecidas a las proteínas RAS de mamíferos en la región N-terminal, si bien presentan una región C-terminal hipervariable más larga. Las proteínas Ras de levadura activan a la adenilato ciclasa, la cual regula el crecimiento. La doble disrupción *ras1/ras2* es letal en la levadura, y la expresión heteróloga de la proteína RAS de mamíferos previene dicha letalidad lo que indica que su función está conservada (Tamanoi, 2011; Weeks y Spiegelman, 2003).

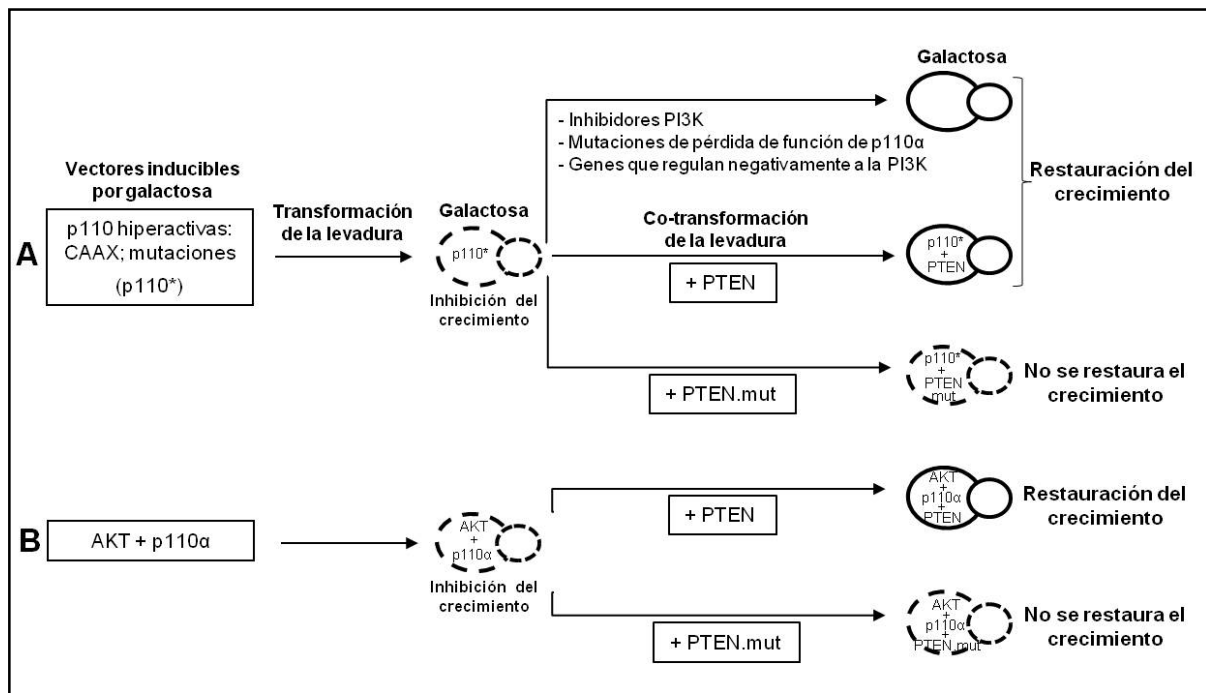


**Figura 11: Representación esquemática de la vía PI3K/PTEN/AKT en mamíferos y sus ortólogos en *S. cerevisiae*.** En la levadura de gemación no hay ortólogos de la clase I de PI3K y no se ha detectado PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Sin embargo se ha detectado un ortólogo de PTEN (Tep1), de función desconocida. Además hay ortólogos de PDK1 (Pkh1/2), de los complejos mTORC 1/2 (TORC 1/2), y de AKT y S6K (Sch9).

La expresión en la levadura de las subunidades catalíticas de la PI3K, p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  silvestres no ejerce ningún efecto aparente. No obstante, si son artificialmente dirigidas a las membranas celulares mediante la secuencia de prenilación de H-RAS fusionada en su región C-terminal (p110 $\alpha$ -CAAX y p110 $\beta$ -CAAX), aumentan los niveles de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> a expensas del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, lo que detiene el crecimiento de la levadura (Andrés-Pons *et al.*, 2007; Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005). El efecto de p110 $\beta$ -CAAX es más moderado que el de p110 $\alpha$ -CAAX. La inhibición del crecimiento se debe a la eliminación de los niveles de PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, que son esenciales para la supervivencia de la levadura, ya que regulan el ensamblaje del citoesqueleto de actina y los anillos de septinas (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005). Este defecto en el crecimiento depende de la actividad quinasa de p110, ya que no se observa cuando se expresa una versión de p110 $\alpha$ -CAAX catalíticamente inactiva y es recuperado por inhibidores competitivos de la PI3K como LY294002 y PI-103 (Fernández-Acero *et al.*, 2012). El crecimiento en presencia de p110 $\alpha$ -CAAX es totalmente recuperado mediante la co-expresión con PTEN silvestre, pero no si se expresa un mutante de PTEN catalíticamente inactivo (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005; Cid *et al.*, 2008; Rodríguez-Escudero *et al.*, 2015). Además, la expresión del mutante oncogénico de ganancia de función p110 $\alpha$  H1047R acentúa la toxicidad para la levadura incluso en ausencia de señal de prenilación, lo que corrobora que la levadura es sensible a cambios en la actividad catalítica de p110 $\alpha$  producidos por mutaciones patológicas relevantes en la clínica (Andrés-Pons *et al.*, 2007; Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005). Por otra parte, la expresión en la levadura de AKT no ejerce ningún efecto aparente sobre la levadura *per se*, mientras que si se co-expresa junto con p110 $\alpha$  silvestre, ésta ejerce un efecto activador sobre AKT1, AKT2 y AKT3. En el caso de AKT1 se observa su relocalización en la membrana celular y su activación, lo que produce la inhibición del crecimiento. Este fenotipo se potencia cuando se co-expresa con p110 $\alpha$  la mutación oncogénica de AKT1, E17K, mientras que con un mutante catalíticamente inactivo de AKT1 que contiene la mutación K179M, o con mutantes en residuos esenciales en su dominio PH, no se observa ningún efecto en la levadura. La toxicidad que genera AKT1 sobre la

levadura puede ser revertida también mediante la co-expresión de PTEN que convierte el  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  de nuevo en  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2009).

Este sistema heterólogo, además de haber sido empleado para monitorizar *in vivo* la actividad de mutantes de PI3K, PTEN y AKT encontrados en tumores humanos (Andrés-Pons *et al.*, 2007; Rodríguez-Escudero *et al.*, 2009; Rodríguez-Escudero *et al.*, 2011) también se ha utilizado para la identificación y caracterización de inhibidores de la PI3K con potencial interés farmacológico (Fernández-Acero *et al.*, 2012) (Figura 12).



**Figura 12. Potencial del modelo de levadura “humanizada” para el estudio de la ruta oncogénica PI3K/PTEN/AKT.** **A.** La expresión de p110 de mamíferos hiperactiva (p110\*) provoca la pérdida de la viabilidad de la levadura. Esta viabilidad se puede recuperar mediante inhibidores de la PI3K o con la expresión de mutantes de pérdida de función de p110 o de genes que regulen negativamente a la PI3K. **B.** La co-expresión de p110α y AKT inhibe el crecimiento de la levadura. La unión a membranas de GFP-AKT sirve como marcador *in vivo* de la producción de  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ . La presencia de PTEN silvestre revierte la toxicidad generada por las p110 hiperactivas (apartado A) o por p110α junto a AKT (apartado B), no obstante no se revierte con mutantes de pérdida de función de PTEN (PTEN.mut). En estos estudios, todos los cDNAs heterólogos se expresan bajo el control del promotor inducible *GAL1*.



# OBJETIVOS



Los objetivos planteados para la realización de la presente Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Utilización del modelo de la levadura humanizada que expresa la ruta PI3K para el estudio de:

- la relación estructura-actividad de la subunidad catalítica, p110.
- la regulación de las p110 mediada por las subunidades reguladoras de la PI3K de clase I.
- implicación funcional de las mutaciones de la subunidad reguladora p85 $\alpha$ , encontradas en tumores humanos.

2. Estudio de la localización subcelular y de las consecuencias funcionales de la sobre-expresión de p85 $\alpha$  y, de forma comparativa, de su versión truncada oncogénica, p65 $\alpha$ , en células de mamíferos.



MATERIALES  
Y MÉTODOS



## 1. Técnicas de biología molecular

### 1.1. Manipulación de ácidos nucleicos

Las reacciones de PCR se realizaron con la DNA polimerasa termoestable *Pwo* (*Roche Diagnostics*), que posee actividad correctora exonucleasa 3'→5'. Los productos de la reacción se visualizaron en geles de agarosa al 1% en tampón TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA). Posteriormente los geles fueron teñidos con bromuro de etidio o con el agente intercalante Gel-Red para ser observados en un transiluminador de luz UV. Para la elución de los fragmentos de DNA se utilizó el kit comercial *Gene-Clean* (*Q-BIOgene-BIO101*). Las enzimas de restricción, la DNA ligasa y la fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) proceden de *Roche Diagnostics*. Para la realización de estas técnicas de biología molecular básicas se utilizaron protocolos estándar (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1993).

### 1.2. Purificación del DNA plasmídico

Para la obtención de los plásmidos se transformaron bacterias de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (competentes por tratamiento con CaCl<sub>2</sub>) mediante el protocolo de Hanahan (Hanahan, 1983), es decir, 1  $\mu$ l de DNA plasmídico o bien 10  $\mu$ l de DNA procedentes de una reacción de ligación o de una mutagénesis dirigida se incubaron con 100  $\mu$ l de células competentes a las cuales se les aplicó un choque térmico. Posteriormente se sembraron en medio selectivo LB (Luria-Bertani) (1% bacto triptona, 0,5% extracto de levadura, 0,5% NaCl) con ampicilina 100  $\mu$ g/ml a 37°C durante 24 horas. El DNA plasmídico de las colonias obtenidas fue extraído por dos métodos en función de nuestros requerimientos:

-Purificación a pequeña escala (miniprep): las colonias de *E. coli* transformadas se incubaron en 3 ml de LB+ampicilina 100  $\mu$ g/ml en agitación a 37°C durante toda la noche. A partir de estos cultivos se llevó a cabo el protocolo de lisis alcalina y precipitación del DNA. En ocasiones se empleó el kit comercial *QIAquick Plasmid Mini-Kit* (*Qiagen*).

-Purificación a gran escala (maxiprep) utilizando el kit *Plasmid DNA purification* (*Machery-Nagel*). Este método se empleó cuando se precisaba mayores cantidades de DNA y se realizó a partir de las colonias de *E. coli* crecidas en 250-500 ml de LB+ampicilina con agitación a 37°C durante todo la noche.

### 1.3. Mutagénesis dirigida

Para introducir mutaciones puntuales sobre una secuencia de DNA presente en un plásmido, se utilizó el kit para mutagénesis dirigida *QuikChange* (*Stratagene*). La reacción de PCR mutagénica se realizó con la polimerasa de alta procesividad, *Pfu Turbo* (*Stratagene*), con oligonucleótidos diseñados específicamente para cada mutación y con el plásmido sin la mutación como molde. Para eliminar de la mezcla de PCR final el plásmido molde, se incubó esta mezcla con la enzima *DpnI*, así se consiguió digerir exclusivamente las cadenas de DNA metiladas procedentes del DNA molde dejando intactas las de nueva síntesis no metiladas que contienen la mutación (*Weiner et al.*, 1994). Todas las mutaciones generadas fueron comprobadas mediante secuenciación de DNA, llevada a cabo por la Unidad de Genómica de la UCM o por el servicio de secuenciación del CIPF. Los oligonucleótidos empleados para PCR y secuenciación de DNA están descritos en la **Tabla 1**.

**Tabla 1. Oligonucleótidos**

<i>PLÁSMIDO</i>	<i>SECUENCIA</i>
<b>• Oligonucleótidos para mutagénesis</b>	
<b>p85α D548G</b>	Fw: GGTGGGAAGAAGGCTTGAAGAAGCAG Rv: CTGCTTCTTCAAGCCTTCTTCCAACC
<b>p85α N564D</b>	Fw: CAAACGCATGGACAGTATTAAGCCG Rv: CGGCTTAATACTGTCCATGCGTTTG
<b>p85α-CAAX D13V</b>	Fw: CAGAGCACTGTACGTGTACAAGAAGGAG Rv: CTCCTTCTTGTACACGTACAGTGCTCTG
<b>p85α-CAAX N260S</b>	Fw: CAAAAACCTTTTGTCTGCAAGAGTCC Rv: GGACTCTTGCAGACAAAAGGTTTTTG
<b>p85α-CAAX G376R</b>	Fw: CCTAGGAAAGGACGGAATAACAAATTA Rv: TTAATTTGTTATTCCGTCCTTTCCTAGG
<b>p85α-CAAX K379E</b>	Fw:AGGAGGAAATAACGAGTTAATCAAATCT Rv:AGATTTTGATTAACGTTATTTCTCCT



p85 $\alpha$ -CAAX $\Delta$ K459	Fw: CAATTTCAAGAA-AGTCGGGAATATGA Rv: TCATATTCCCAGACT-TTCTTGAAATTG
p85 $\alpha$ -CAAX D560Y	Fw: CCGAGAGATCT <b>ACAAACGCATGAAC</b> Rv: TTCATGCGTTTT <b>G</b> TAGATCTCTCGG
p85 $\alpha$ -CAAX N564D	Fw: CAAACGCAT <b>GGACAGTATTAAGCCG</b> Rv: CGGCTTAATACTGT <b>CCATGCGTTTTG</b>
p85 $\alpha$ -CAAX R574T	Fw: CTCATCCAGTTG <b>ACTAAGACAAGAGAC</b> Rv: GTCTCTTGCTT <b>AGTCAACTGGATGAG</b>
p85 $\alpha$ -CAAX E666K	Fw: GTAGTGGTAGACGG <b>CAAAGTCAAGCATTGC</b> Rv: GCAATGCTTGACTTTG <b>CCGTCTACCACTAC</b>
p85 $\alpha$ -CAAX S608A	Fw: GAAGATCAATAC <b>GCCCTGGTAGAAGAT</b> Rv: ATCTTCTACCAG <b>GGCGTATTGATCTTC</b>
p85 $\alpha$ -CAAX S608E	Fw: GAAGATCAATAC <b>GAACTGGTAGAAGAT</b> Rv: ATCTTCTACCAG <b>TTCGTATTGATCTTC</b>
Myr-p110 $\alpha$ E545K	Fw: CCTCTATCTGAAATCACTAAG <b>CAAGAGAAAGATTTT</b> Rv: CCACAGAAAATCTTTCTCTTGCTTAGTGATTT <b>CAGA</b>
<b>• Oligonucleótidos para truncaciones y para la adición de la caja -CAAX</b>	
p110 $\alpha$ $\Delta$ 1-107 con/sin CAAX	Fw: CGCCA <b>AAGCTT</b> CGTGAAGAAAAGATCCTCAAT
p110 $\alpha$ $\Delta$ 1-154-CAAX	Fw: CGCCA <b>AAGCTT</b> GATCTTAATTCACCTCATAGTAG
p110 $\alpha$ $\Delta$ 1-186 con/sin CAAX	Fw: CGCCA <b>AAGCTT</b> AAAGGGCAAATAATAGTGGTGAT
p110 $\beta$ $\Delta$ 1-117 con/sin CAAX	Fw: CGCCA <b>AAGCTT</b> CCAGGGGAAAATTAGACTCAA
p110 $\beta$ $\Delta$ 1-190 con/sin CAAX	Fw: CGCCA <b>AAGCTT</b> AAACTTTATGGGGGAAAGCTCAT
p85 $\alpha$ Y463*	Rv: CCG <b>GTCTGACT</b> CATTCCCAGACTTTTTTCTTGAAATT
p85 $\alpha$ R301*	Rv: CCG <b>GTCTGACT</b> CACTCATTCCATTCCGTTGAGATTAA
p85 $\alpha$ -CAAX R301*	Rv: CCG <b>CTCTGAGT</b> CAAGAGAGCACACACTTACACTCATTCCATTCCGTTGAGATTAAA
p85 $\alpha$ -CAAX	Rv: CCG <b>GTCTGACT</b> CAAGAGAGCACACACTTACATCGCCTCTGTTGEGCATATAC
p65 $\alpha$ -CAAX	Rv: CCG <b>GTCTGACT</b> CAAGAGAGCACACACTTACAGATGAGGTCCGGCTTAAACT
p65 $\beta$	Rv: CCG <b>GTCTGACT</b> CACATGAGGTCCGGCTTGAGGC
<b>• Oligonucleótidos para la secuenciación</b>	
YCpLG	Fw: TAAGTTGGGTAACGCCAGGG Rv: CAGGCTTTACACTTTATGCTTC
pYES3	Fw: CGGTTTGTACTTCTTATTCAA Rv: GCGGCCCTCTAGGATCAGC
pRK5	Fw: CGATTTAGGTGACACTATAGAATA Rw: GATGCTATTGCTTTATTTGTAAC

Los nucleótidos sustituidos para mutagénesis y la secuencia reconocida por las enzimas de restricción están marcados en negrita. Todas las secuencias se representan en dirección 5' a 3'.

## 1.4. Plásmidos

Los plásmidos utilizados y desarrollados en este trabajo se describen en la **Tabla 2**. Todas las construcciones de las subunidades catalíticas de PI3K llevan un epítipo Myc N-terminal. Las construcciones de las subunidades reguladoras de PI3K llevan en la región N-terminal un epítipo HA

**Tabla 2. Plásmidos**

<b>CONSTRUCCIÓN</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>FUENTE</b>
<b>• Subunidades catalíticas de PI3K (p110) en YCpLG</b>		
YCpLG	Vector de expresión centromérico en levaduras que contiene la secuencia del promotor <i>GAL1</i> y el marcador auxotrófico <i>LEU2</i>	L. Bardwell y J. Thorner (Univ. de California)
YCpLG-p110 $\alpha$	Subunidad catalítica p110 $\alpha$ bovina	(Andrés-Pons <i>et al.</i> , 2007)
YCpLG-p110 $\alpha$ -CAAX	Subunidad catalítica p110 $\alpha$ bovina fusionada en 3' con la secuencia de la señal de prenilación de RAS	(Rodríguez-Escudero <i>et al.</i> , 2005)
YCpLG-p110 $\alpha$ -CAAX K802R	p110 $\alpha$ -CAAX con la mutación K802R que elimina su actividad catalítica	(Rodríguez-Escudero <i>et al.</i> , 2005)
YCpLG-p110 $\alpha$ C2	p110 $\alpha$ con las mutaciones K410A, R412A, K413A y K416A en el dominio C2	Teresa Fernández-Acero. Tesis Doctoral
YCpLG-p110 $\alpha$ K227E	p110 $\alpha$ portadora de la mutación K227E en el dominio RBD	Teresa Fernández-Acero. Tesis Doctoral
YCpLG-p110 $\alpha$ -CAAX K227E	p110 $\alpha$ -CAAX portadora de la mutación K227E en el dominio RBD	Teresa Fernández-Acero. Tesis Doctoral
YCpLG-p110 $\alpha$ H1047R	p110 $\alpha$ con la mutación oncogénica H1047R en el dominio quinasa	(Andrés-Pons <i>et al.</i> , 2007)
YCpLG-p110 $\alpha$ E545K	p110 $\alpha$ con la mutación oncogénica E545K en el dominio helical	(Andrés-Pons <i>et al.</i> , 2007)
YCpLG-p110 $\alpha$ $\Delta$ 1-693	p110 $\alpha$ que contiene la secuencia correspondiente a los residuos 694-1068 (dominio quinasa)	Amparo Andrés-Pons
YCpLG-p110 $\alpha$ $\Delta$ 1-693-CAAX	p110 $\alpha$ -CAAX que contiene la secuencia correspondiente a los residuos 694-1068 (dominio quinasa)	Amparo Andrés-Pons

YCpLG-p110α Δ1-330	p110α que contiene la secuencia correspondiente a los residuos 331-1068 (dominios C2, helical y quinasa)	Amparo Andrés-Pons
YCpLG-p110α Δ1-330-CAAX	p110α que contiene la secuencia correspondiente a los residuos 331-1068 (dominios C2, helical y quinasa)	Amparo Andrés-Pons
YCpLG-p110α Δ1-186	p110α que contiene la secuencia correspondiente a los residuos 187-1068 (dominios RBD, C2, helical y quinasa)	Esta Tesis Doctoral
YCpLG-p110α Δ1-186-CAAX	p110α-CAAX que contiene la secuencia correspondiente a los residuos 187-1068 (dominios RBD, C2, helical y quinasa)	Esta Tesis Doctoral
YCpLG-p110α Δ1-154-CAAX	p110α-CAAX que contiene la secuencia correspondiente a los residuos 155-1068 (parte del espaciador ABD-RBD y los dominios RBD, C2, helical y quinasa)	Esta Tesis Doctoral
YCpLG-p110α Δ1-107	p110α que contiene la secuencia correspondiente a los residuos 108-1068 (espaciador ABD-RBD y los dominios RBD, C2, helical y quinasa)	Esta Tesis Doctoral
YCpLG-p110α Δ1-107-CAAX	p110α-CAAX que contiene la secuencia correspondiente a los residuos 108-1068 (espaciador ABD-RBD y los dominios RBD, C2, helical y quinasa)	Esta Tesis Doctoral
YCpLG-Myr-p110α	Subunidad catalítica p110α humana fusionada en 5' con una secuencia de miristoilación	Teresa Fernández Tesis Doctoral
YCpLG-Myr-p110α E545K	Myr-p110α con la mutación oncogénica E545K	Esta Tesis Doctoral
YCpLG-p110β	Subunidad catalítica p110β humana	(Andrés-Pons <i>et al.</i> , 2007)
YCpLG-p110β CAAX	Subunidad catalítica p110β humana fusionada en 3' a la secuencia de la señal de prenilación de RAS	(Andrés-Pons <i>et al.</i> , 2007)
YCpLG-p110β Δ1-700	p110β que contiene la secuencia correspondiente a los residuos 701-1070 (dominio quinasa)	Amparo Andrés-Pons
YCpLG-p110β Δ1-700-CAAX	p110β-CAAX que contiene la secuencia correspondiente a los residuos 701-1070 (dominio quinasa)	Amparo Andrés-Pons
YCpLG-p110β Δ1-329	p110β que contiene la secuencia correspondiente a los residuos 330-1070 (dominios C2, helical y quinasa)	Amparo Andrés-Pons
YCpLG-p110β Δ1-329-CAAX	p110β-CAAX que contiene la secuencia correspondiente a los residuos 330-1070 (dominios C2, helical y quinasa)	Amparo Andrés-Pons.
YCpLG-p110β Δ1-190	p110β que contiene la secuencia correspondiente a los residuos 191-1070 (dominios RBD, C2, helical y quinasa)	Esta Tesis Doctoral
YCpLG-p110β Δ1-190-CAAX	p110β-CAAX que contiene la secuencia correspondiente a los residuos 191-1070 (dominios RBD, C2, helical y quinasa)	Esta Tesis Doctoral
YCpLG-p110β Δ1-117	p110β que contiene la secuencia correspondiente a los residuos 118-1070 (dominios RBD, C2, helical y quinasa)	Esta Tesis Doctoral

YCpLG-p110 $\beta$ $\Delta$ 1-117-CAAX	p110 $\beta$ -CAAX que contiene la secuencia correspondiente a los residuos 118-1070 (dominios RBD, C2, helical y quinasa)	Esta Tesis Doctoral
YCpLG-p110 $\delta$	Subunidad catalítica p110 $\delta$ de ratón subclonada a partir del plásmido pRK5-p110 $\delta$	Esta Tesis Doctoral
YCpLG-p110 $\delta$ -CAAX	Subunidad catalítica p110 $\delta$ de ratón subclonada a partir del plásmido pRK5-p110 $\delta$ -CAAX	Esta Tesis Doctoral
YCpLG-p110 $\gamma$	Subunidad catalítica p110 $\gamma$ humana subclonada a partir del plásmido pRK5-p110 $\gamma$	Esta Tesis Doctoral
YCpLG-p110 $\gamma$ -CAAX	Subunidad catalítica p110 $\gamma$ humana subclonada a partir del plásmido pRK5-p110 $\gamma$ -CAAX	Esta Tesis Doctoral
<b>• Subunidades reguladoras de PI3K en pYES3 C/T (levadura) y pRK5 (mamíferos)</b>		
pYES3 C/T	Vector de expresión de levadura derivado del vector pYES2. Contiene el promotor inducible por galactosa <i>GAL1</i> y el marcador auxotrófico <i>TRP1</i>	<i>Invitrogen</i>
pRK5	Vector de expresión en mamíferos. Todas las construcciones en pRK5 contienen un epítipo HA en posición N-terminal	<i>Addgene</i>
pYES3-p85 $\alpha$	Subunidad reguladora p85 $\alpha$ murina obtenida por PCR y subclonada a partir de pCG HA-p85 $\alpha$ (Jiménez <i>et al.</i> , 1998)	Amparo Andrés-Pons
pYES3-p85 $\alpha$ -CAAX	Inserción del producto de PCR que contiene la secuencia de p85 $\alpha$ fusionada en 3' con la secuencia de una señal de prenilación en el vector pYES3	Esta Tesis Doctoral
pRK5-p85 $\alpha$	Subunidad reguladora de p85 $\alpha$ murina subclonada de pYES3-p85 $\alpha$	Amparo Andrés-Pons
pYES3-p65 $\alpha$	Plásmido pYES3-p85 $\alpha$ que contiene la secuencia correspondiente a los residuos 1-571 (dominios ABD, GAP, RBD, nSH2 y parte del iSH2)	Amparo Andrés-Pons
pYES3-p65 $\alpha$ -CAAX	Inserción del producto de PCR que contiene la secuencia de p65 $\alpha$ fusionada en 3' con la secuencia de una señal de prenilación en el vector pYES3	Esta Tesis Doctoral
pRK5-p65 $\alpha$	Subunidad reguladora de p65 $\alpha$ murina subclonada de pYES3-p85 $\alpha$	Amparo Andrés-Pons
pYES3-p55 $\alpha$	Contienen el cDNA de ratón de la subunidad reguladora de p55 $\alpha$ clonada en los plásmidos pYES3 y pRK5	Amparo Andrés-Pons
pRK5-p55 $\alpha$		
pYES3-p50 $\alpha$	Contienen el cDNA de ratón de la subunidad reguladora de p50 $\alpha$ clonada en los plásmidos pYES3 y pRK5	Amparo Andrés-Pons
pRK5-p50 $\alpha$		
pYES3-p85 $\beta$	Contienen el cDNA humano de la subunidad reguladora de p85 $\beta$ clonada en los plásmidos pYES3 y pRK5	Amparo Andrés-Pons
pRK5-p85 $\beta$		
pYES3-p65 $\beta$	Inserción del producto de PCR de la secuencia correspondiente a los residuos 1-568 de p85 $\beta$ en el vector pRK5 y subclonada en el vector pYES3	Esta Tesis Doctoral
pRK5-p65 $\beta$		
pYES3-p55 $\gamma$	Contienen el cDNA humano de la subunidad reguladora de p55 $\gamma$ clonada en los plásmidos pYES3 y pRK5	Amparo Andrés-Pons
pRK5-p55 $\gamma$		

pYES3- p101	Contienen el cDNA humano de la subunidad reguladora de p101 clonada en los plásmidos pYES3 y pRK5	Amparo Andrés-Pons
pRK5-p101		
pYES3-p85α D548G	Plásmido pYES3-p85α que contiene de forma individual las mutaciones encontradas en tumores humanos: D548G, N564D, Y463* y R301*; generadas por mutagénesis dirigida como se indica en el apartado 1.3	Esta Tesis Doctoral
pYES3-p85α N564D		
pYES3-p85α Y463*		
pYES3-p85α R301*		
pYES3-p85α-CAAX D13V	Plásmido pYES3-p85α-CAAX que contiene de forma individual las mutaciones D13V, N260S, G376R, K379E, delK459, D560Y, N564D, R574T, S608A, S608E, E666K y R301*. Todas ellas han sido generadas por mutagénesis dirigida como se indica en el apartado 1.3	Esta Tesis Doctoral
pYES3-p85α-CAAX N260S		
pYES3-p85α-CAAX N260Y		
pYES3-p85α-CAAX G376R		
pYES3-p85α-CAAX K379E		
pYES3-p85α-CAAX ΔK459		
pYES3-p85α-CAAX N564D		
pYES3-p85α-CAAX R574T		
pYES3-p85α-CAAX S608A		
pYES3-p85α-CAAX S608E		
pYES3-p85α-CAAX E666K		
pYES3-p85α-CAAX R301*		
pRK5-p85α N564D	Plásmido pRK5-p85α que contiene la mutación oncogénica N564D generada por mutagénesis dirigida como se indica en el apartado 1.3	Esta Tesis Doctoral
<b>• Otros plásmidos para levadura</b>		
pYES2	Vector de expresión episómico de levadura. Contiene el promotor inducible por galactosa GAL1 y el marcador auxotrófico URA3	<i>Stratagene</i>
pYES2-K-RAS G12V	Secuencia humana de K-RAS con la mutación oncogénica G12V (P. Crespo) subclonada en el vector pYES2	Esta Tesis Doctoral
pYES2-PTEN	Contiene la secuencia humana completa del supresor tumoral PTEN clonada en el vector pYES2	(Rodríguez-Escudero <i>et al.</i> , 2005)
pYES2-PTEN C124S	Plásmido pYES2-PTEN con la mutación C124S que elimina su actividad catalítica	(Andrés-Pons <i>et al.</i> , 2007)
<b>• Otros plásmidos para mamíferos</b>		
pCDNA3-Akt1(PH)-GFP	Plásmido que contiene el dominio PH de Akt1 fusionado con GFP	(Weernink <i>et al.</i> , 2000)

## **2. Métodos de trabajo en el modelo experimental de levadura**

### **2.1. Cepa de levadura y medios de cultivo**

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada fue YPH499 (*MATa ade2-101 trp1-63 leu2-1 ura3-52 his3-Δ200 lys2-801*). El medio de cultivo general no selectivo fue YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% glucosa) líquido o sólido en placas con agar (2%). El medio sintético (SD) contenía 0,17% base nitrogenada sin aminoácidos, 0,5% sulfato amónico y 2% glucosa, y fue suplementado con los aminoácidos apropiados en función de las auxotrofías de los plásmidos correspondientes. Los medios SG y SR contenían 2% galactosa o 1,5% rafinosa, en vez de glucosa, respectivamente.

### **2.2. Transformación de la levadura y condiciones de crecimiento**

Los cultivos de levadura fueron transformados siguiendo el protocolo de transformación con acetato de litio (Ito *et al.*, 1983). Para la obtención de transformantes, las levaduras se cultivaron a partir de un preinóculo y se dejaron crecer hasta una  $DO_{(600\text{ nm})}$  de 1. Se centrifugaron 10 ml de cultivo a 2500 rpm durante 1 minuto y las células recogidas fueron resuspendidas en 500  $\mu$ l de una mezcla compuesta por un 40% polietilenglicol 4000, 0,2 M acetato de litio y 1  $\mu$ l/ml de  $\beta$ -mercaptoetanol. A esta mezcla final se le añadieron 0,6 mg de DNA y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, después se incubaron en agitación a 45°C durante 30 minutos. Finalmente, se sembraron en placas de medio SD selectivo, en función del marcador auxotrófico del plásmido, y se incubaron 3 días a 30°C para la obtención de transformantes.

### **2.3. Obtención de extractos proteicos de levadura**

Para la obtención de los extractos proteicos, los transformantes se incubaron en medio de cultivo SR durante 18 horas a 30°C y luego se indujo la expresión de las proteínas ajustando los cultivos a una  $DO_{(600\text{ nm})}$  de 0,3 en nuevo medio de cultivo

SR y añadiendo galactosa a una concentración final del 2%, seguido de incubación durante 6 horas a 30°C en agitación. Las células se recogieron por centrifugación a 3000 rpm durante 3 minutos a 4°C y se resuspendieron en tampón de lisis frío (50 mM Tris-HCl pH=7,5, 10% glicerol, 1% Tritón X-100, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA); además para evitar la degradación de las proteínas se añadieron por cada 1 ml, 100 µl mezcla de inhibidores de proteasas (*Complete Mini EDTA Free, Roche*) y 100 µl PMSF 0,1 M. Los lisados de células se transfirieron a tubos que contenían bolas de vidrio de 1 mm de diámetro (*Sartorius*) que se procesaron en un agitador de células Fast Prep (FP120/BIO101 *ThermoSavant*) mediante agitación durante 30 segundos a una intensidad de 5,5. Tras la ruptura mecánica se separó el sobrenadante por centrifugación a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se cuantificó la concentración de proteína de los extractos midiendo su absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro *Beckman DV 640* (1 unidad de  $DO_{(280nm)}$  corresponde aproximadamente a una concentración de 1 mg/ml de proteína). A continuación a los extractos se añadió tampón de carga SDS-PAGE 2X (125 mM Tris-HCl pH=6,8, 5% SDS, 25% glicerol, azul de bromofenol y 200 µl de DTT 1M por cada ml de tampón de carga) y se calentaron a 99°C durante 5 minutos para su desnaturalización. Las muestras ya preparadas se cargaron en un gel de electroforesis o se conservaron a -20°C para su posterior utilización.

#### **2.4. Ensayo de crecimiento en gota mediante diluciones seriadas decimales**

Para llevar a cabo este ensayo los transformantes se incubaron durante 18 horas en medio SD que carecía de los correspondientes requerimientos auxotróficos para el mantenimiento de los plásmidos; estos cultivos se diluyeron con agua estéril hasta obtener una  $DO_{(600nm)}$  de 0,5 y se hicieron 3 diluciones seriadas 1/10. Se depositaron alícuotas de 5 µl de cada suspensión sobre placas de SD, como control de crecimiento y de SG, para inducir la expresión de los genes regulados por el promotor *GAL1*. Se incubaron a 30°C durante dos o tres días.

### 3. Cultivos de células de mamíferos

#### 3.1. Líneas celulares

Las células COS-7 (línea celular de riñón de mono) se cultivaron en DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) complementado con 5% FBS (suero bovino fetal), 1mM L-Gln, 100 U/ml penicilina y 0,1 mg/ml estreptomicina. Las células MCF-7 (células de carcinoma mamario humano) se cultivaron en RPMI (medio de Roswell Park Memorial Institute) complementado con 10% FBS, 1 mM L-Gln, 100 U/ml penicilina y 0,1 mg/ml estreptomicina.

#### 3.2. Método de transfección

Las dos líneas celulares se transfectaron con FuGENE 6™ (*Roche Diagnostics*) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células se incubaron a 37°C en una atmosfera del 5% CO<sub>2</sub> y se procesaron 48-72 horas postransfección.

#### 3.3. Lisis de cultivos celulares

Antes de proceder a lisar las células, se realizó un lavado con PBS (1,85 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl) a 4°C, posteriormente se añadió el tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1 mM PSMF, 1 mg/ml aprotinina, 100 mM NaF, 20 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) a 4°C. Los lisados se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes obtenidos se utilizaron para los distintos ensayos. Para calcular la concentración de proteínas en las muestras, se utilizó el método de Bradford (*BIO-RAD protein assay*) o midiendo la absorbancia a 280 nm de los extractos en un espectrofotómetro *Beckman DV 640*.



## 4. Detección de proteínas mediante *Western blotting*

### 4.1. Electroforesis de proteínas

Para la separación electroforética de proteínas se utilizó el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras de proteínas fueron resueltas mediante geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en condiciones reductoras. Se utilizaron marcadores de masa molecular preteñidos para estimar el tamaño de las proteínas (*Sigma-Aldrich* y *Bio-Rad*).

### 4.2. Transferencia e hibridación

Los geles de poliacrilamida fueron transferidos a membranas de difluoruro de polivinilideno (*Hybond-P Amersham, GEHealthcare*) activadas con metanol o a membranas de nitrocelulosa (*Hybond, Amersham*). El bloqueo de las membranas, los lavados y la dilución de los anticuerpos primarios y secundarios conjugados con peroxidasa se realizaron con el tampón NET-gelatina (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,05% Tritón X-100, 0,25% gelatina). Cuando el inmunoblot se procesó con el sistema *LI-COR*, se bloqueó con leche al 5% diluida en PBS, se hicieron los lavados con PBS-Tween-20 0,1%, para la dilución de los anticuerpos primarios y de los secundarios conjugados a un fluorocromo (*LI-COR*) se utilizó una solución de PBS-Tween-20 al 0,1% y 1% de leche. Cuando fue necesario deshibridar las membranas para su posterior hibridación, éstas se incubaron dos veces durante 5 min a 37°C con solución de *stripping* (0,2 N NaOH, 1% SDS).

Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa empleados fueron anti-ratón IgG, anti-conejo IgG (*Promega Corporation*). Los anticuerpos secundarios conjugados con un fluorocromo utilizados fueron anti-conejo IgG-IRDyeR 800CW y anti-ratón IgG-Alexa FluorR 680 (*LI-COR Biosciences*).

### 4.3. Revelado

La detección de los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa se realizó por quimioluminiscencia, utilizando reactivos POD de *Roche Diagnostics* o *ECL Advance (Amersham)* y realizando exposiciones en *X-ray films (Kodak BioMax MS)*. Las bandas de los *Western blots* se cuantificaron utilizando el programa *ImageJ (Rasband 1997-2011)*. La detección de los anticuerpos secundarios conjugados a un fluorocromo (*LI-COR*) se realizó mediante el escáner de membranas *Odyssey (LI-COR)*.

## 5. Inmunofluorescencia

Se utilizaron células *COS-7* crecidas sobre cubreobjetos previamente recubiertos con poli-L-Lys (10 µg/ml, *Sigma*). Las células se transfectaron y, 48 horas después, se fijaron con 4% p-formaldehído o con 4% formalina (*Sigma*) durante 20 minutos a 4°C, se permeabilizaron con PBS-Tritón X-100 al 0,2% durante 10 minutos y se bloquearon con PBS-BSA al 3% (solución de bloqueo). Se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes diluidos en solución de bloqueo durante una hora a 37°C, se lavaron con la misma solución y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con una sonda fluorescente (*Alexafluor, Invitrogen*) adecuados durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los núcleos fueron marcados con Hoescht 33258 o DAPI durante 10 minutos. Tras el montaje sobre un portaobjetos con *FA Mounting fluid (Becton Dickinson)*, las muestras se visualizaron en un microscopio de fluorescencia *Zeiss* o en un *Eclipse TE 2000U (Nikon)*, en el cual las imágenes digitales eran captadas mediante la utilización de una cámara *Orca C4742-95-12ER (Hamamatsu)* y procesadas con el software *HCIImage (Hamamatsu)*. Las imágenes de microscopía confocal fueron captadas mediante la utilización de un microscopio láser confocal y multifotón (*Leica SP-2 AOBS*) (centro de microscopía de fluorescencia de la UCM). Para análisis cuantitativos de la distribución subcelular, los experimentos fueron repetidos al menos tres veces y en cada uno se contaron al menos 100 células co-

transfectadas. Los anticuerpos secundarios empleados fueron anti-rata-Alexafluor-594, anti-conejo-Alexafluor-488 y anti-cabra-Alexafluor-594 (*Invitrogen*).

## 6. Anticuerpos

**Tabla 3: Anticuerpos primarios**

Anticuerpos	Tipo
Anti-AKT	Policlonal de conejo. <i>Cell Signaling</i> (9272)
Anti-fosfo-AKT(Ser473)*	Monoclonal de conejo. <i>Cell Signaling</i> (193412) (4058)
Anti-fosfo-AKT(Thr308)*	Policlonal de conejo. <i>Cell Signaling</i> (9275)
Anti-GAPDH	Monoclonal de ratón. <i>Santa Cruz Biotechnology</i> (6CS): sc-32233
Anti-G6PDH	Policlonal de conejo. <i>Sigma</i>
Anti-PTEN (2824)	Policlonal de conejo que reconoce la región N-terminal de PTEN. Obtenido en nuestro laboratorio. Andrés-Pons <i>et al</i> (2005).
Anti-HA (12CA5)	Monoclonal de ratón. <i>Roche Applied Science</i> (11583816001)
Anti-HA (3F10)	Monoclonal de rata. <i>Roche Applied Science</i> (11867423001)
Anti-Myc	Monoclonal de ratón. <i>Millipore</i> (4 A6)
Anti-Rab5	Policlonal de conejo. <i>Abcam</i> (ab18211)
Anti-EEA1	Policlonal de cabra. <i>Santa Cruz Biotechnology</i> (N-19) sc-6415

\*En los experimentos de *Western blot* se ha utilizado una mezcla de anti fosfo-AKT (Ser473) y anti fosfo-AKT (Thr308).



# RESULTADOS



## 1. Expresión heteróloga de las subunidades catalíticas (p110) de la PI3K de clase I en *Saccharomyces cerevisiae*

### 1.1. Actividad *in vivo* de las subunidades catalíticas (p110) de la PI3K de clase I en la levadura

Estudios previos en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto que la expresión heteróloga en *S. cerevisiae* de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  con una señal de prenilación C-terminal de H-RAS que las dirige a la membrana (p110 $\alpha$ -CAAX y p110 $\beta$ -CAAX), genera PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> de forma concomitante a la disminución de PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, un fosfoinosítido esencial para *S. cerevisiae*. Esto conlleva una inhibición del crecimiento de la levadura, lo que no se observaba mediante expresión de las formas de p110 carentes de la señal de prenilación. Además, el efecto de inhibición de crecimiento de p110 $\beta$ -CAAX resultaba más moderado que el causado por p110 $\alpha$ -CAAX (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005; Andrés-Pons *et al.*, 2007). Sobre estos antecedentes, decidimos estudiar el efecto del resto de las subunidades catalíticas de clase I en la levadura, para lo cual clonamos en vectores de expresión regulable por galactosa los cDNAs correspondientes a p110 $\delta$  y p110 $\gamma$  fusionados con un epítipo Myc en su extremo N-terminal. Observamos que tanto p110 $\delta$  y p110 $\gamma$  silvestres como sus versiones con secuencia de prenilación (p110 $\delta$ -CAAX y p110 $\gamma$ -CAAX) no muestran ningún efecto sobre el crecimiento de la levadura (**Figura 13 A**), si bien no fue posible verificar la expresión por inmunoblot de p110 $\delta$  (**Figura 13 B**). Este resultado sugiere que de entre todas las subunidades catalíticas (p110) de clase I, tienen suficiente actividad catalítica intrínseca como para eliminar de forma crítica el PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> de *S. cerevisiae* tan solo las formas preniladas de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ .

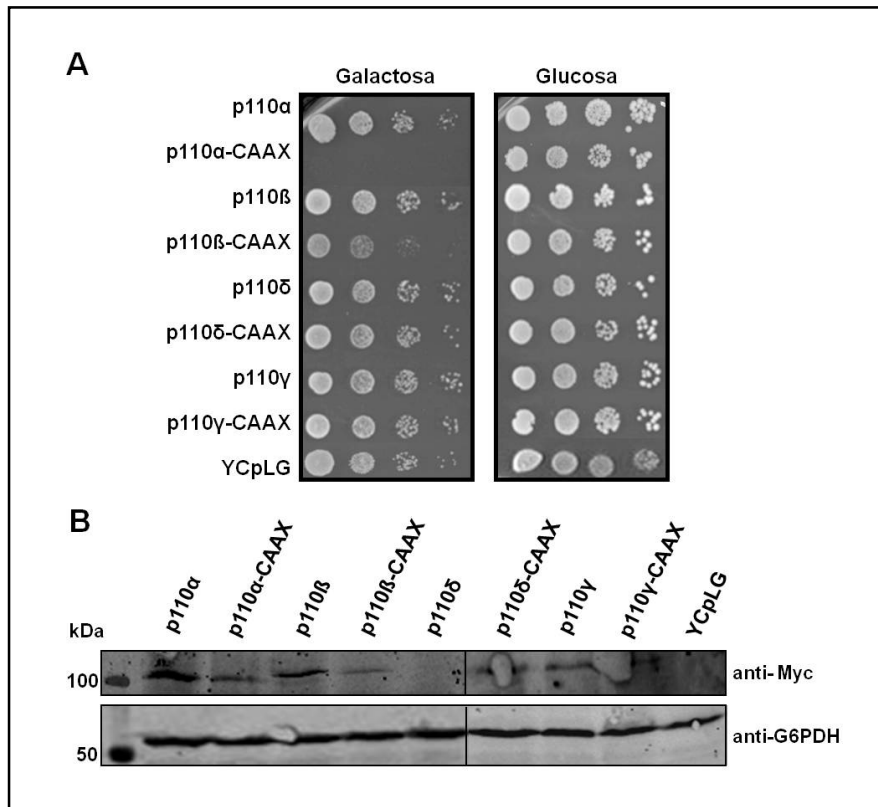
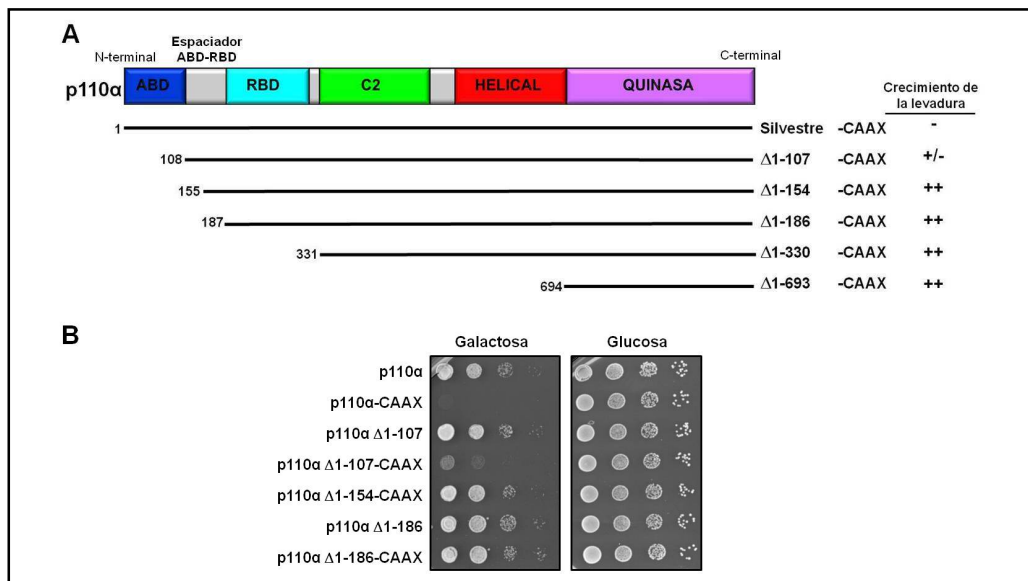


Figura 13. **Expresión en la levadura de todas las p110 de clase I.** **A.** La cepa YPH499 fue transformada con el vector YCpLG (marcador auxotrófico *LEU2*) vacío o con las subunidades catalíticas de PI3K (p110) silvestres o con la señal de prenilación de H-RAS (CAAX). Este plásmido expresa las proteínas indicadas bajo el control del promotor inducible por galactosa *GAL1*. Se incubaron diluciones seriadas de cultivos de transformantes en medios sintéticos en condiciones inductoras (galactosa) o represoras (glucosa) de la expresión de las proteínas. **B.** Expresión de las distintas formas de p110 en la levadura, determinada mediante *Western blot* de lisados celulares con anticuerpo anti-Myc (todas las construcciones de p110 en YCpLG llevan un epítipo Myc en la región N-terminal). Se utilizó un anticuerpo anti-G6PDH como control de carga.

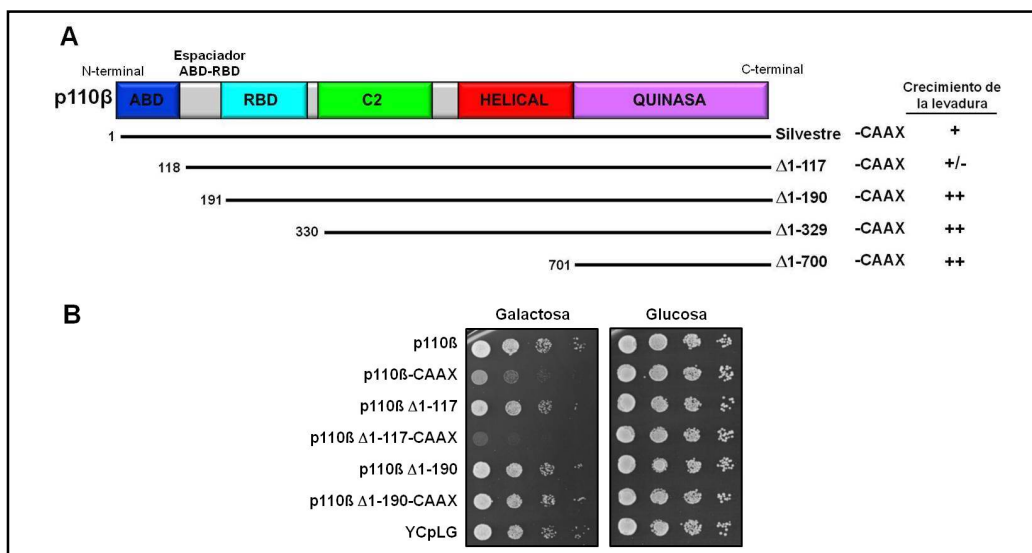


## 1.2. Dominios necesarios para la actividad de p110 en la levadura

Con el objeto de definir la mínima extensión N-terminal necesaria para la función de p110 mediante este modelo de expresión heteróloga, se generaron versiones truncadas del extremo N-terminal de p110 y se analizó su capacidad de inhibir el crecimiento de la levadura. En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación, se había demostrado que los dominios ABD y RBD son necesarios para la actividad de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  en la levadura (Amparo Andrés-Pons y Rafael Pulido, resultados no publicados). Continuando con este estudio, generamos las construcciones p110 $\alpha$   $\Delta$ 1-186 y p110 $\beta$   $\Delta$ 1-190, que carecen del dominio ABD y del espaciador ABD-RBD. Observamos que perdían la capacidad de inhibir el crecimiento de la levadura, incluso en presencia de la secuencia CAAX (**Figura 14 y 15**). A continuación, generamos las construcciones p110 $\alpha$   $\Delta$ 1-107 y p110 $\beta$   $\Delta$ 1-117, que carecen del dominio ABD, y observamos que mantenían la capacidad de inhibir el crecimiento de la levadura cuando estaban fusionadas a la secuencia CAAX (**Figura 14 y 15**). Además, el efecto de inhibición de crecimiento de p110 $\beta$   $\Delta$ 1-117-CAAX fue mayor al observado con p110 $\beta$ -CAAX, mientras que el efecto de inhibición de p110 $\alpha$   $\Delta$ 1-107-CAAX fue menor al observado con p110 $\alpha$ -CAAX. A continuación, generamos la truncación p110 $\alpha$ -CAAX  $\Delta$ 1-154, que carece del dominio ABD y de parte de la región N-terminal del espaciador ABD-RBD, y observamos que no era activa (**Figura 14**). Estos resultados permiten concluir que el dominio ABD es prescindible para la actividad catalítica de p110 *in vivo* en el sistema heterólogo, mientras que el espaciador ABD-RBD es necesario para mantener una estructura funcional.



**Figura 14. El dominio ABD es prescindible para el efecto inhibitor de p110α sobre el crecimiento de la levadura.** **A.** Esquema de las truncaciones N-terminales de p110α-CAAX y fenotipo de crecimiento causado en la levadura. Fenotipo de crecimiento de la levadura: ++, crecimiento normal de la levadura (similar al control con el vector vacío); +, crecimiento intermedio; +/-, crecimiento muy limitado; -, inhibición total de crecimiento (similar al que se da con p110α-CAAX). **B.** Las levaduras se transformaron con las versiones truncadas N-terminales indicadas e introducidas en p110α o p110α-CAAX en el vector YCpLG. Los transformantes fueron crecidos y tratados como en la Figura 13 A.



**Figura 15. El dominio ABD de p110β es dispensable para su actividad catalítica *in vivo*.** **A.** Representación esquemática y fenotipo de crecimiento de las truncaciones N-terminales de p110β-CAAX. La simbología del fenotipo de crecimiento de la levadura es como en la Figura 14. **B.** Ensayo de crecimiento en agar, de la levadura transformada con las truncaciones N-terminales del dominio ABD y de los dominios ABD y RBD introducidas en YCpLG-p110β o YCpLG-p110β-CAAX, así como con el vector YCpLG vacío como control, realizado en las mismas condiciones que en la Figura 13 A.

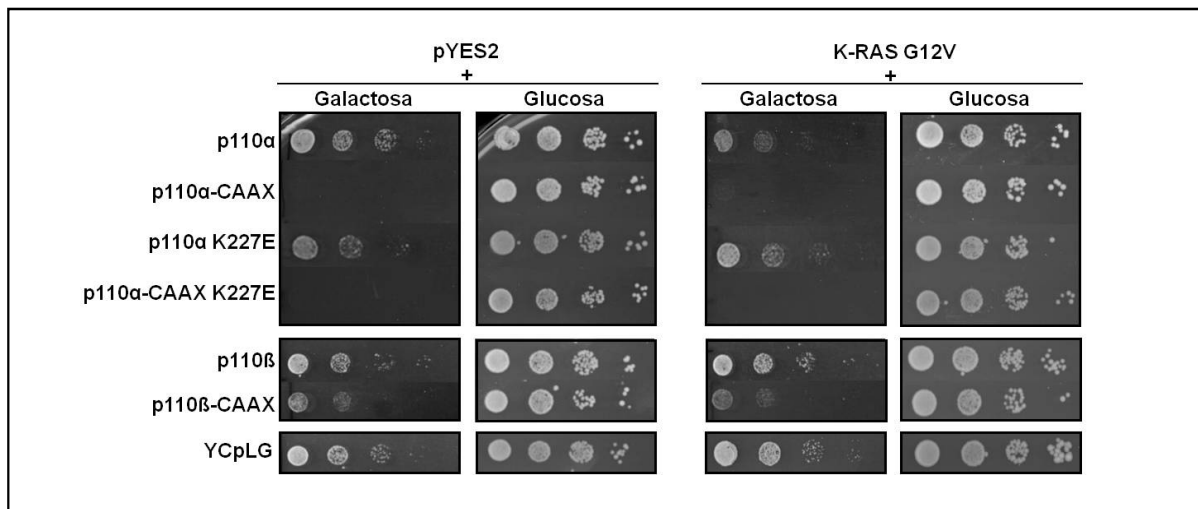
### 1.3. Estudio funcional de los dominios de unión a RAS (RBD) y C2 de p110 en la levadura

Diversos estudios indican que la interacción de p110 con RAS mediante el dominio RBD es importante para su función (Castellano y Downward, 2011). En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se observó que la mutación K227E en p110 $\alpha$ -CAAX y la equivalente K230E en p110 $\beta$ -CAAX, que eliminan la capacidad de interactuar con RAS en células de mamífero (Rodríguez-Viciano *et al.*, 1996) eran funcionales en la levadura (Teresa Fernández-Acero, María Molina y Víctor J. Cid, resultados no publicados). Ello indica que la actividad de p110 en *S. cerevisiae* es independiente de su interacción con ortólogos de RAS de esta levadura. En este contexto, deseábamos saber si la co-expresión de la forma oncogénica de K-RAS de mamíferos, K-RAS G12V, que causa una activación constitutiva de RAS, sería capaz de modular la función de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  en nuestro modelo de expresión heteróloga. Para ello, co-expresamos K-RAS G12V con las versiones de p110 silvestres e hiperactivas por prenilación, así como con el mutante p110 $\alpha$  K227E. Observamos una activación moderada de p110 $\alpha$  (atendiendo a la inhibición parcial del crecimiento de la levadura) al ser co-expresada con K-RAS G12V, efecto que no se observó sobre p110 $\alpha$  K227E. Sin embargo, no se detectó ningún efecto sobre p110 $\beta$  o p110 $\beta$ -CAAX (**Figura 16**). Estos resultados sugieren que el papel activador que ejerce RAS sobre la PI3K puede reproducirse en la levadura, al menos sobre p110 $\alpha$ .

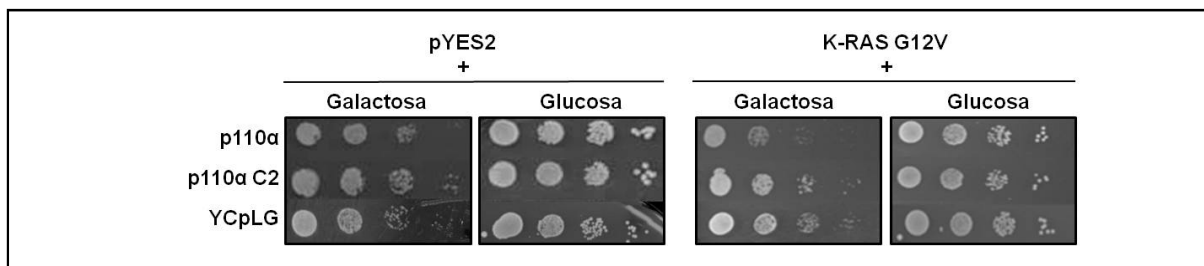
Se ha descrito que el dominio C2 de p110 $\alpha$  está involucrado en la asociación de p110 $\alpha$  con la membrana a través de un grupo de aminoácidos cargados positivamente (Gymnopoulos *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008). Previamente, mediante el estudio del mutante cuádruple p110 $\alpha$  K410A R412A K413A K416A (p110 $\alpha$  C2) generado en nuestro laboratorio, se determinó que la carga de estos cuatro aminoácidos del dominio C2 eran esenciales en conjunto para la actividad de p110 $\alpha$  en *S. cerevisiae* (Teresa Fernández-Acero, María Molina y Víctor J. Cid, resultados no publicados). Para comprobar si la activación por K-RAS G12V sería capaz de contrarrestar el efecto de las mutaciones de p110 $\alpha$  C2, co-expresamos

## RESULTADOS

K-RAS G12V con p110 $\alpha$  y p110 $\alpha$  C2. En la **Figura 17**, podemos observar que la activación moderada de p110 $\alpha$  por K-RAS G12V, no tuvo lugar sobre el mutante p110 $\alpha$  C2. Este hecho sugiere que el efecto activador de K-RAS G12V sobre p110 $\alpha$  está subordinado a una previa unión a membranas de p110 $\alpha$  a través de su dominio C2.



**Figura 16. La forma oncogénica de K-RAS, G12V, potencia el efecto de p110 $\alpha$  en la levadura.** Crecimiento en agar de *S. cerevisiae* co-expresando p110 $\alpha$  y K-RAS G12V. Se co-transformaron las levaduras con el vector pYES2 (marcador nutricional *URA3*) vacío o K-RAS G12V (en el vector pYES2) junto con YCpLG-p110 silvestres, preniladas (-CAAX) y mutadas o YCpLG vacío. Los transformantes fueron tratadas como en la Figura 13 A.

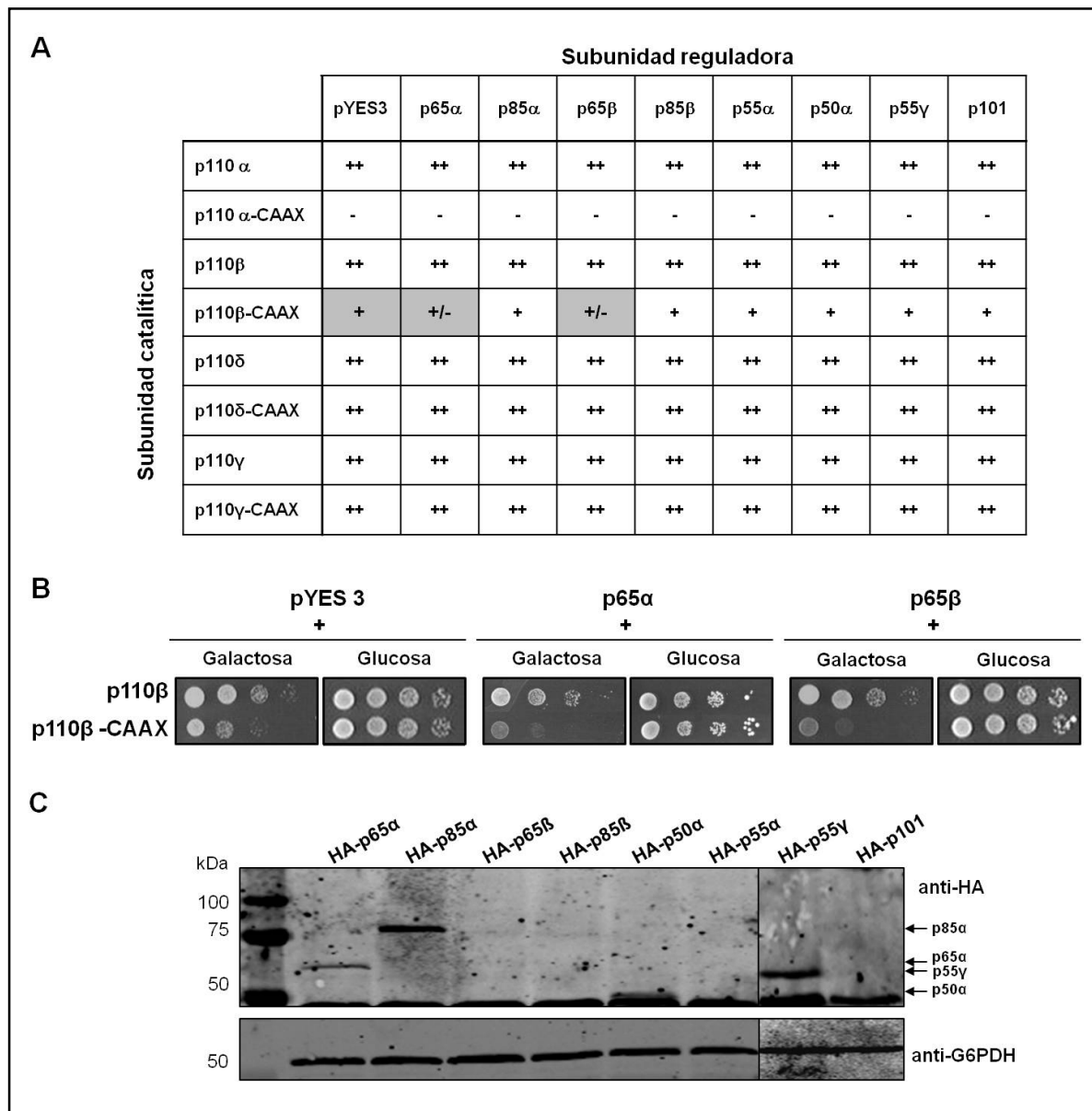


**Figura 17. El mutante oncogénico K-RAS G12V de mamíferos no compensa la pérdida de función del mutante p110 $\alpha$  C2.** Se co-transformaron levaduras con los plásmidos YCpLG-p110 $\alpha$  o YCpLG-p110 $\alpha$  C2 o YCpLG vacío junto con el vector pYES2 vacío o pYES2-K-RAS G12V. Las muestras fueron tratadas como en la Figura 13 A.

## 2. Expresión y estudio de las subunidades reguladoras de la PI3K de clase I en *S. cerevisiae*.

### 2.1. Co-expresión de las subunidades reguladoras y las subunidades catalíticas de la PI3K de clase I en la levadura

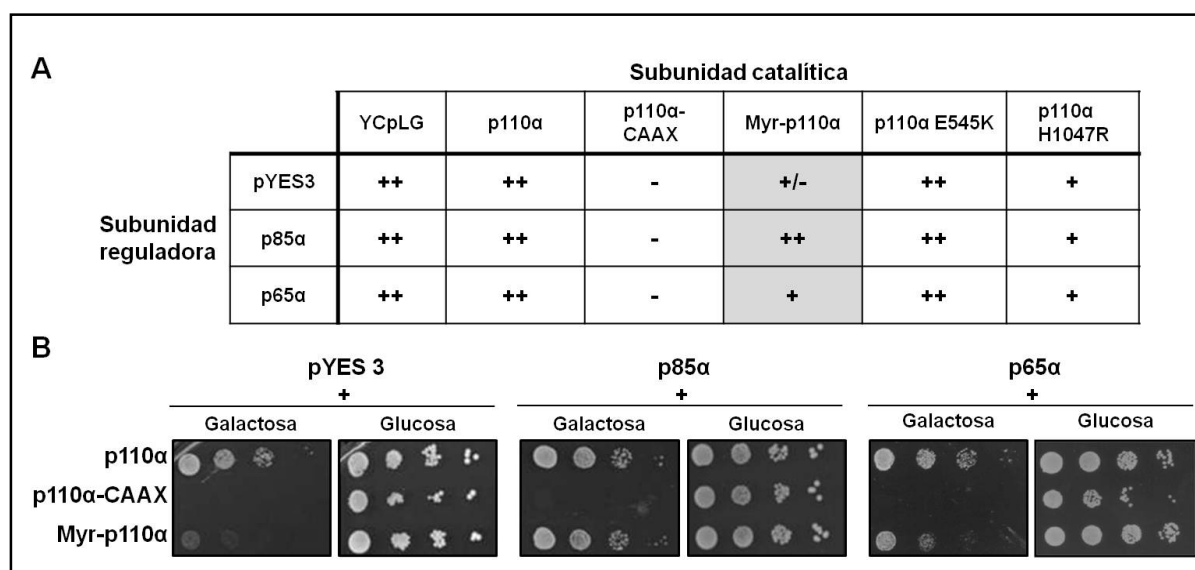
Tras el análisis de las subunidades catalíticas de la PI3K en el modelo heterólogo de levadura, decidimos estudiar la influencia de las subunidades reguladoras de clase I sobre la actividad *in vivo* de las subunidades catalíticas, incluida la truncación oncogénica p65 $\alpha$  (residuos del 1 al 571 de p85 $\alpha$ ) (Jiménez *et al.*, 1998) y una truncación equivalente en p85 $\beta$ , p65 $\beta$  (residuos del 1 al 568 de p85 $\beta$ ). Las subunidades reguladoras fueron clonadas en el vector de expresión pYES3/CT que, al igual que el vector YCpLG portador de las subunidades catalíticas, es regulable por galactosa. La expresión de las subunidades reguladoras por sí solas no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de la levadura (datos no mostrados), lo que implica que no interfieren *per se* con la fisiología de este organismo. Los resultados mostrados en la **Figura 18 A** y **B** revelaron que, de todas las subunidades reguladoras de clase I ensayadas, solo las versiones truncadas p65 $\alpha$  y p65 $\beta$ , ejercían un efecto activador moderado (mayor inhibición de crecimiento de la levadura) sobre p110 $\beta$ -CAAX. El resto de subunidades reguladoras no presentaban efecto detectable sobre ninguna de las subunidades catalíticas silvestres o preniladas. Dado que no fue posible demostrar la expresión de todas ellas por inmunoblot (**Figura 18 C**), la falta de efecto de algunas puede deberse a que no se expresen de forma estable. Estos resultados indican que, de entre todas las subunidades reguladoras de clase I ensayadas, *S. cerevisiae* solo resulta sensible a la ganancia de función de p110 $\beta$ -CAAX causada por p65 $\alpha$  y p65 $\beta$ .



**Figura 18. Efecto de las subunidades reguladoras sobre las subunidades catalíticas de clase I en la levadura.** **A.** Tabla que resume el crecimiento de las levaduras transformadas con las diferentes combinaciones de subunidad catalítica (en el vector YCpLG) y subunidad reguladora (en el vector pYES3/CT; marcador nutricional *TRP1*) tratadas igual que en la Figura 13 A. Los cuadros en gris indican una potenciación de la inhibición del crecimiento en presencia de una subunidad reguladora determinada. Para la notación del fenotipo de crecimiento de la levadura empleada, ver Figura 14. **B.** Experimentos de crecimiento sobre agar en diluciones seriadas decimales representativos del efecto activador que ejercen las subunidades reguladoras p65 $\alpha$  y p65 $\beta$  sobre p110 $\beta$ -CAAX. **C.** Detección de la expresión de las subunidades reguladoras mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-HA (todas las construcciones de las subunidades reguladoras en pYES3/CT llevan una fusión N-terminal al epítipo HA). Se verificó por secuenciación que los clones eran correctos. Se utilizó un anticuerpo anti-G6PDH como control de carga.

## 2.2. Efecto de las subunidades reguladoras sobre versiones mutantes de p110α en la levadura

La fusión de una señal de miristoilación N-terminal a p110α (Myr-p110α), que la dirige de forma artificial a la membrana, causa una inhibición de crecimiento de la levadura, aunque no fue tan agresiva como la causada por la expresión de la forma prenilada, p110α-CAAX (Teresa Fernández-Acero, María Molina y Víctor J. Cid, resultados no publicados). Asimismo, nuestro grupo describió que la mutación oncogénica p110α H1047R (dominio quinasa) inhibe parcialmente el crecimiento de la levadura incluso en ausencia de la señal de prenilación, mientras que la mutación oncogénica descrita en p110α, E545K (dominio helical), no tiene efecto (Andrés-Pons *et al.*, 2007). A continuación, estudiamos como las subunidades reguladoras p85α y p65α influyen sobre versiones de p110α hiperactivas por prenilación, miristoilación o por mutaciones oncogénicas (**Figura 19**).



**Figura 19. Efecto de las subunidades reguladoras p85α y p65α sobre versiones hiperactivas de p110α.** **A.** Tabla del fenotipo de crecimiento de las levaduras co-transformadas con las subunidades reguladoras pYES3-p85α o pYES3-p65α junto con YCpLG-p110α silvestre, prenilado, miristoilado o portador de mutaciones oncogénicas. Los transformantes fueron analizados como en la Figura 13 A. La notación empleada corresponde a la descrita en la Figura 14. Mediante un cuadro gris se indica las combinaciones donde se observó un efecto. **B.** Experimentos de crecimiento sobre agar de diluciones seriadas decimales representativos del efecto inhibitorio que ejercen p85α y p65α sobre Myr-p110α.

Los resultados muestran que p85 $\alpha$  y p65 $\alpha$  ejercen un efecto inhibitor (aumento de crecimiento de la levadura) sobre Myr-p110 $\alpha$ , más acusado en el caso de p85 $\alpha$ , mientras que no muestran ningún efecto apreciable sobre el resto de las versiones de p110 $\alpha$ . Estos datos indican que también es posible estudiar en *S. cerevisiae*, la disminución de actividad de p110 $\alpha$  por la interacción con la subunidad reguladora.

### **2.3. Anclaje artificial a la membrana de p85 $\alpha$ y p65 $\alpha$ mediante la introducción de un motivo de prenilación C-terminal**

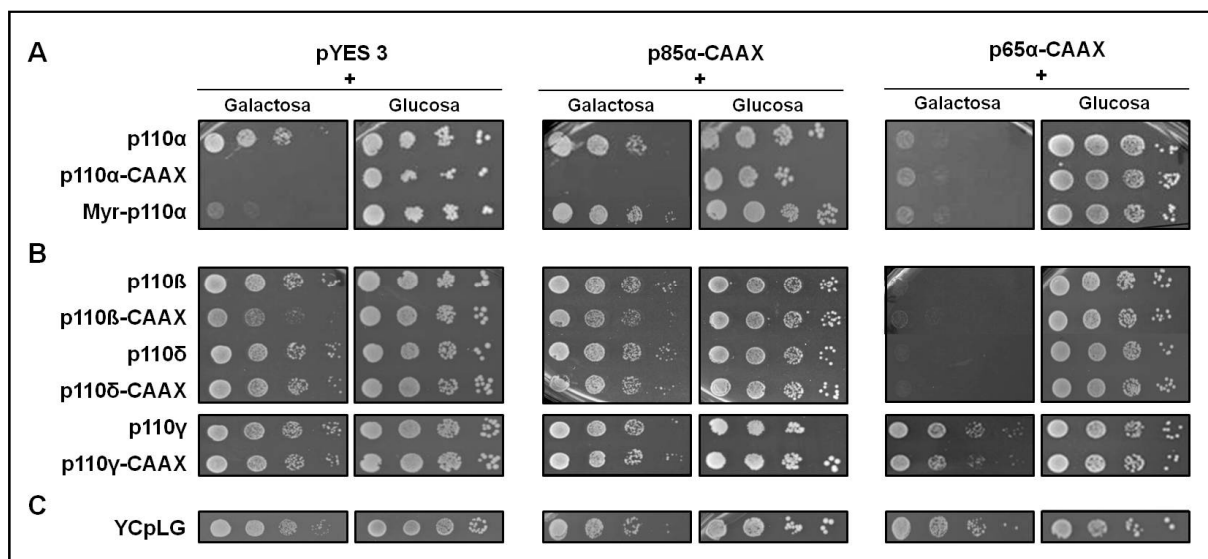
#### **2.3.1. p65 $\alpha$ -CAAX activa a p110 en la levadura**

Los resultados anteriores sugieren que el ensayo de actividad de PI3K *in vivo* en la levadura permite detectar la activación y la inhibición de la actividad catalítica de forma dependiente de ciertas mutaciones de p110 $\alpha$  o de la co-expresión con determinadas subunidades reguladoras. Sin embargo, el sistema no refleja la hipotética activación de p110 $\alpha$  promovida por la subunidad reguladora oncogénica p65 $\alpha$ , probablemente por defectos en su reclutamiento a la membrana plasmática debido a la ausencia de señales equivalentes a los receptores RTKs activados (Barberis *et al.*, 2005; Gunde y Barberis, 2005). Por ello, se generaron construcciones de p85 $\alpha$  y de p65 $\alpha$  fusionadas a una secuencia de prenilación en su región C-terminal (p85 $\alpha$ -CAAX y p65 $\alpha$ -CAAX) para dirigir las a la membrana plasmática de forma artificial, intentando reproducir en la levadura el mecanismo de activación mediado por los receptores RTKs que se da en las células de mamíferos.

Se llevaron a cabo co-transformaciones de los plásmidos pYES3/CT-p85 $\alpha$ -CAAX y pYES3/CT-p65 $\alpha$ -CAAX con los plásmidos YCpLG que contienen las subunidades catalíticas de clase IA y IB. En la **Figura 20 A** se muestra que p85 $\alpha$ -CAAX no ejerció ninguna influencia sobre el efecto de p110 $\alpha$  o p110 $\alpha$ -CAAX. Por el contrario, se observó un fuerte efecto inhibitor sobre Myr-p110 $\alpha$ , similar al obtenido con p85 $\alpha$  (apartado 2.2). Por otra parte, p65 $\alpha$ -CAAX potenció notablemente la actividad de p110 $\alpha$  silvestre carente de señales de prenilación o



miristoilación, lo que concuerda con su papel activador. En el caso de las restantes isoformas de p110 de clase I, p85 $\alpha$ -CAAX parece restaurar débilmente el crecimiento de las levaduras que expresan p110 $\beta$ -CAAX pero no ejerce ningún efecto sobre el resto de isoformas de p110 silvestres o preniladas. p65 $\alpha$ -CAAX mostró un efecto activador sobre p110 $\beta$  y p110 $\delta$  tanto silvestres como preniladas, pero no sobre p110 de clase IB, p110 $\gamma$  (**Figura 20 B**). La expresión de p85 $\alpha$ -CAAX y p65 $\alpha$ -CAAX, *per se*, no tiene efecto sobre el crecimiento de la levadura (**Figura 20 C**). Estos resultados nos permiten concluir que la adición de un motivo de prenilación a p65 $\alpha$  recapitula sus efectos activadores y potencia la actividad de p110 en la levadura, en contraste con p85 $\alpha$ -CAAX que más bien manifiesta en este sistema un efecto inhibitorio sobre p110.



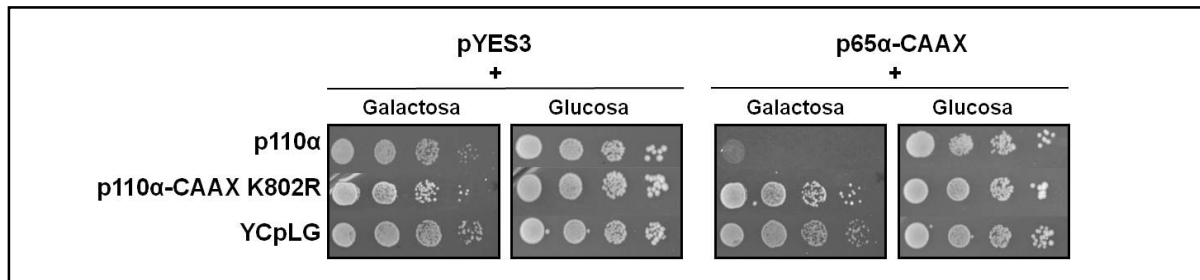
**Figura 20. Efecto de las subunidades p85 $\alpha$ -CAAX y p65 $\alpha$ -CAAX sobre las subunidades catalíticas de clase I silvestres y preniladas.** Crecimiento en agar de diluciones seriadas decimales de co-transformantes del vector pYES3/CT vacío, pYES3/CT-p85 $\alpha$ -CAAX y pYES3/CT-p65 $\alpha$ -CAAX con: **(A)** YCpLG-p110 $\alpha$  silvestre o sus formas hiperactivadas por una secuencia de anclaje a la membrana (YCpLG-Myr-p110 $\alpha$  y YCpLG-p110 $\alpha$ -CAAX); **(B)** YCpLG portador de las subunidades catalíticas de clase IA (panel superior) o de clase IB (panel inferior) silvestres o preniladas; **(C)** vector YCpLG vacío. Todos los transformantes fueron tratados como en la Figura 13 A.

### **2.3.2. La activación de p110 $\alpha$ por p65 $\alpha$ -CAAX es dependiente de su actividad catalítica y su efecto es revertido por PTEN**

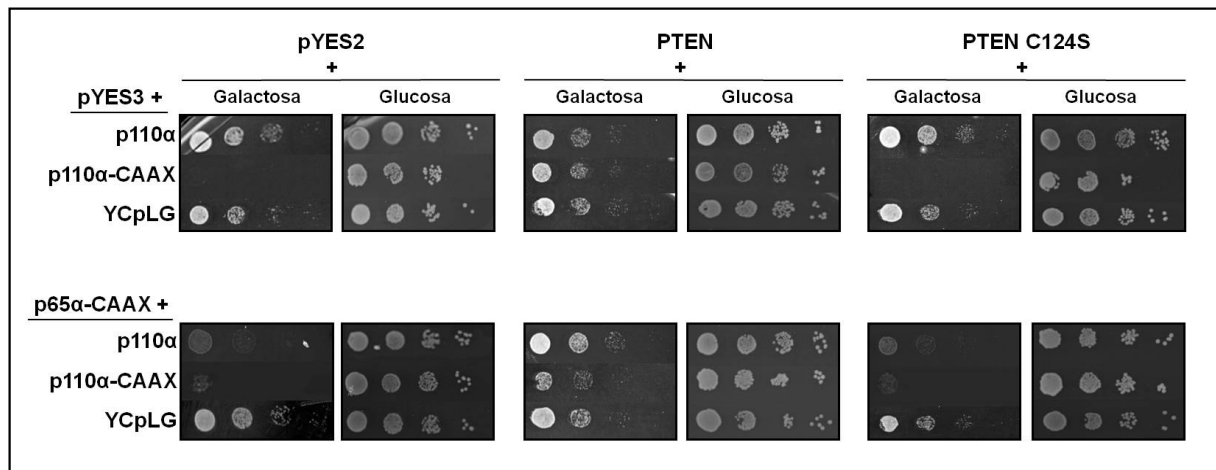
A continuación, observamos que la inhibición de crecimiento observada al co-expresar p110 $\alpha$  con p65 $\alpha$ -CAAX es dependiente de la actividad catalítica de p110 $\alpha$ , ya que la co-expresión de p65 $\alpha$ -CAAX con el mutante catalíticamente inactivo (p110 $\alpha$ -CAAX K802R) no inhibe el crecimiento (**Figura 21**). Además, se ensayó si la supresión del fenotipo de inhibición era debida directamente a la actividad catalítica de lípidos de p110. Para ello, se expresó p110 $\alpha$  o p110 $\alpha$ -CAAX junto con p65 $\alpha$ -CAAX y con la fosfatasa PTEN silvestre o catalíticamente inactiva (C124S) en un tercer plásmido, pYES2. La inhibición de crecimiento causada por la expresión de p110 $\alpha$ -CAAX, o por la co-expresión de p110 $\alpha$  con p65 $\alpha$ -CAAX, es revertida cuando se expresa adicionalmente la forma silvestre de PTEN, pero no la forma catalíticamente inactiva (**Figura 22**). Estos resultados demuestran que p65 $\alpha$ -CAAX ejerce un efecto activador sobre p110 $\alpha$  (inhibición de crecimiento) dependiente de su actividad catalítica  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2 \rightarrow \text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ .

### **2.3.3. La activación de p110 $\alpha$ por p65 $\alpha$ -CAAX requiere el dominio ABD**

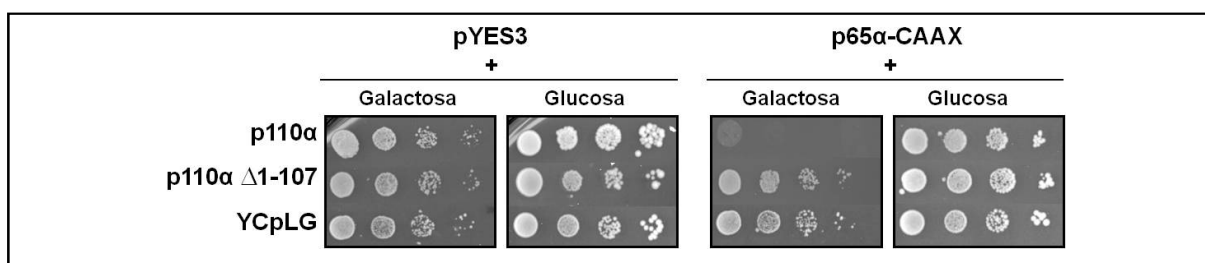
Puesto que p110 $\alpha$  interacciona primordialmente con p85 $\alpha$  por medio de su dominio ABD N-terminal, hipotetizamos que la presencia de dicho dominio sería esencial para la activación de p110 $\alpha$  por p65 $\alpha$ . Para verificarlo, co-expresamos p65 $\alpha$ -CAAX con p110 $\alpha$  y con sus versiones truncadas descritas en el apartado 1.2 (datos no mostrados). Observamos que la función activadora de p65 $\alpha$ -CAAX sobre p110 $\alpha$  depende del dominio ABD, ya que el mutante que carece solo de este dominio, p110 $\alpha$   $\Delta$ 1-107, ya no muestra inhibición del crecimiento (**Figura 23**).



**Figura 21: La inhibición de crecimiento causada por la hiperactivación de p110α a través de p65α-CAAX es dependiente de la actividad catalítica de p110α.** Se ensayaron en las mismas condiciones que en la Figura 13 A cultivos de diluciones seriadas decimales de co-transformantes de pYES3/CT-p65α-CAAX con YCpLG-p110α silvestre o con el mutante catalíticamente inactivo (K802R).



**Figura 22. La inhibición de crecimiento causada por la sobre-expresión de PI3K hiperactivas en levadura es suprimida mediante la co-expresión con PTEN catalíticamente activo.** La levadura fue transformada con el vector pYES3/CT vacío o expresando p65α-CAAX junto con el vector YCpLG vacío o portando p110α silvestre o prenilada y con el vector pYES2 vacío o expresando PTEN o PTEN C124S. Con estos transformantes se realizaron ensayos de crecimiento sobre agar en las mismas condiciones que la Figura 13 A.



**Figura 23. Análisis de los dominios de p110α involucrados en la interacción con p65α-CAAX.** La levadura se co-transformó con pYES3/CT-p65α-CAAX junto con p110α silvestre o con la truncación del dominio ABD de p110α en YCpLG. El análisis se realizó como en la Figura 13 A.

## 2.4. Estudio de la interacción funcional de p85 $\alpha$ -CAAX y p65 $\alpha$ -CAAX con p110 $\alpha$

A continuación, se estudiaron los efectos que ejercen p85 $\alpha$ -CAAX y p65 $\alpha$ -CAAX sobre diversos mutantes de p110 $\alpha$  (**Figura 24**), así como los efectos que ejercen determinadas mutaciones de p85 $\alpha$ -CAAX sobre p110 $\alpha$  (**Figura 25**).

### 2.4.1. Influencia de mutaciones en p110 $\alpha$ en su interacción funcional con p85 $\alpha$ -CAAX y p65 $\alpha$ -CAAX

- El efecto activador que ejerce p65 $\alpha$ -CAAX sobre p110 $\alpha$  es independiente de la interacción con RAS y requiere de la función del dominio C2.

Para estudiar qué actividades de p110 $\alpha$  son necesarias para su activación por p65 $\alpha$ -CAAX, seleccionamos los mutantes p110 $\alpha$  K227E (pérdida de función del dominio de unión a RAS) y p110 $\alpha$  C2 (mutante cuádruple en residuos básicos del dominio C2). Como se puede apreciar en la **Figura 24 A**, el efecto activador que ejerce p65 $\alpha$ -CAAX sobre p110 $\alpha$  se observa en el mutante p110 $\alpha$  K227E, pero no en el mutante p110 $\alpha$  C2. Estos resultados sugieren que la unión a membrana a través del dominio C2 es necesaria para la activación de p110 $\alpha$  por p65-CAAX.

- La interacción inhibidora del dominio nSH2 de p85 $\alpha$  sobre el dominio helical de p110 $\alpha$  se verifica en el modelo de levadura.

En mamíferos, existe una interacción inhibidora entre p85 $\alpha$  y p110 $\alpha$ , a través de sus dominios nSH2 y helical (Huang *et al.*, 2007; Miled *et al.*, 2007). La eliminación de esta interacción en el mutante oncogénico p110 $\alpha$  E545K, resulta en la hiperactivación de p110 $\alpha$  (Zhao y Vogt, 2008b). Como ya se ha descrito, la inclusión de esta mutación en p110 $\alpha$  no influye en el crecimiento de la levadura. A continuación, estudiamos el impacto de la mutación E545K sobre la capacidad moduladora de la actividad de p110 $\alpha$  por p85 $\alpha$ -CAAX y p65 $\alpha$ -CAAX. Para ello introdujimos esta mutación en p110 $\alpha$  y en Myr-p110 $\alpha$ . La co-expresión de p85 $\alpha$ -CAAX con p110 $\alpha$  E545K produjo un incremento en la inhibición de crecimiento, lo cual no se observó con p110 $\alpha$  silvestre (**Figura 24 B**). Por tanto, se verifica que

p85 $\alpha$ -CAAX activa a p110 $\alpha$  E545K porque se ha eliminado la interacción inhibidora p85-p110 mediada por Glu545. Myr-p110 $\alpha$  E545K, a diferencia de Myr-p110 $\alpha$ , no resulta inhibido por la co-expresión con p85-CAAX, lo que implica que este residuo está involucrado en este efecto inhibidor. Además, la inclusión en p85 $\alpha$ -CAAX de la mutación K379E, que introduce el cambio de una carga positiva por una negativa, permitiendo que el Glu379 del mutante de p85 $\alpha$  interaccione con la Lys545 del mutante de p110 $\alpha$  (Miled *et al.*, 2007), restableció la interacción inhibidora (**Figura 24 B**). En resumen, los resultados observados permiten concluir que p85 $\alpha$ -CAAX reproduce, en el modelo heterólogo, el efecto inhibidor de p85 $\alpha$  sobre p110 $\alpha$ . Cuando el mutante E545K no es dirigido artificialmente a la membrana, p85 $\alpha$ -CAAX ejerce un efecto activador sobre él, posiblemente como consecuencia del reclutamiento de p110 $\alpha$  E545K a la membrana.

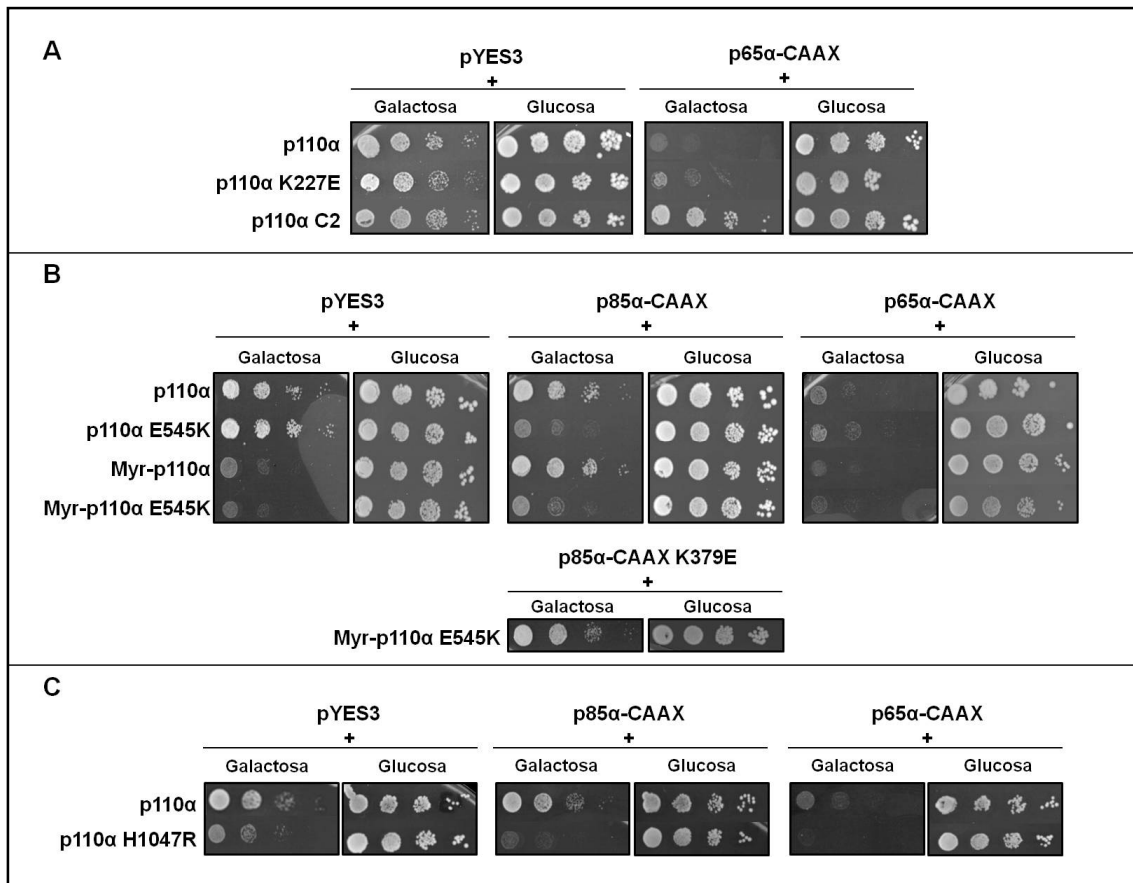
- La activación de p110 $\alpha$  causada por p65 $\alpha$ -CAAX es independiente de la presencia de mutaciones oncogénicas en el dominio helical de p110 $\alpha$ .

En paralelo, se analizó el efecto de p65 $\alpha$ -CAAX sobre p110 $\alpha$  E545K y Myr-p110 $\alpha$  E545K. La **Figura 24 B** ilustra cómo p65 $\alpha$ -CAAX induce la inhibición del crecimiento de la levadura causada por p110 $\alpha$  en presencia de la mutación E545K o Myr-p110 $\alpha$  E545K, en comparación con p110 $\alpha$  o Myr-p110 $\alpha$ . Estos resultados sugieren que el efecto activador de p65 $\alpha$ -CAAX sobre p110 $\alpha$  en la levadura es independiente de la función de su interacción con el dominio helical.

- La expresión de p85 $\alpha$ -CAAX potencia la actividad del mutante oncogénico p110 $\alpha$  H1047R en levadura.

A continuación, estudiamos el efecto de p85 $\alpha$ -CAAX y p65 $\alpha$ -CAAX sobre la mutación de p110 $\alpha$  más común en tumores, H1047R. Como hemos descrito anteriormente, la expresión de este mutante hiperactivo produce un defecto moderado en el crecimiento de la levadura incluso en ausencia de señales de anclaje a membrana. La co-expresión con p110 $\alpha$  H1047R, tanto de p85 $\alpha$ -CAAX como de p65 $\alpha$ -CAAX, produce un aumento en la inhibición de crecimiento de la levadura (**Figura 24 C**), si bien el efecto es más acusado en el caso de p65 $\alpha$ -

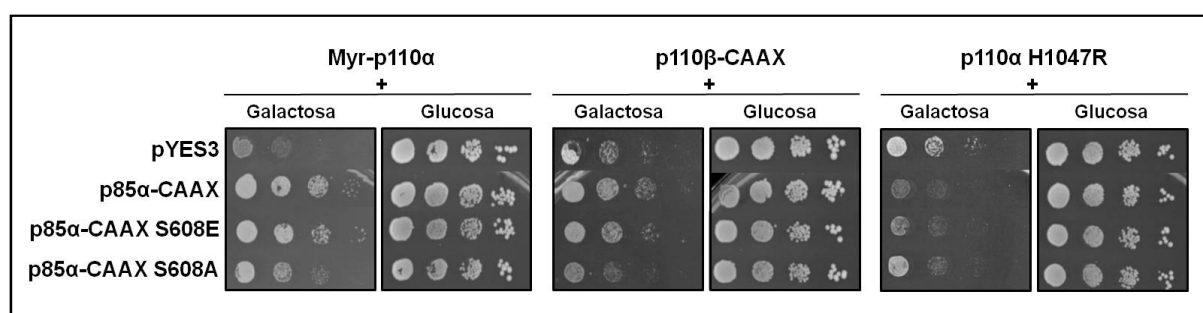
CAAX. Estos resultados muestran que p85 $\alpha$ -CAAX ejerce un efecto activador sobre p110 $\alpha$  H1047R, y sugieren que p110 $\alpha$  H1047R es insensible a la regulación negativa ejercida por p85 $\alpha$ , predominando el efecto de acercamiento al sustrato mediante las interacciones que facilitan su reclutamiento a la membrana.



**Figura 24. Análisis de la influencia de mutaciones en p110 $\alpha$  sobre el papel regulador que p85 $\alpha$ -CAAX y p65 $\alpha$ -CAAX ejercen sobre ella.** En todos los apartados se co-transformaron las levaduras con la subunidad catalítica (en el vector YCpLG) y la reguladora (en el vector pYES3/CT) indicadas y se inocularon suspensiones calibradas de dichos co-transformantes para estudiar su crecimiento en agar. **A. Co-expresión de p65 $\alpha$ -CAAX con los mutantes de p110 $\alpha$  en el dominio RBD y en el dominio C2.** La mutación K227E no interfiere en el efecto activador de p65 $\alpha$ -CAAX sobre p110 $\alpha$  mientras que el mutante p110 $\alpha$  C2 no responde a la modulación por p65 $\alpha$ -CAAX. **B. Co-expresión de p85 $\alpha$ -CAAX o p65 $\alpha$ -CAAX con p110 $\alpha$  y Myr-p110 $\alpha$  portadores de la mutación E545K.** p85 $\alpha$ -CAAX induce la inhibición del crecimiento de las levaduras que expresan p110 $\alpha$  E545K mientras que p85 $\alpha$ -CAAX K379E restaura el crecimiento de Myr-p110 $\alpha$  E545K. La mutación E545K impide la inhibición de la actividad de Myr-p110 $\alpha$  por p85 $\alpha$ -CAAX, mientras que p65 $\alpha$ -CAAX mantiene su papel activador sobre p110 $\alpha$  E545K. **C. Co-expresión de p85 $\alpha$ -CAAX o p65 $\alpha$ -CAAX junto con el mutante oncogénico de p110 $\alpha$  del dominio quinasa.** Tanto p85 $\alpha$ -CAAX como p65 $\alpha$ -CAAX agravan la inhibición de crecimiento de la levadura causada por p110 $\alpha$  H1047R.

### 2.4.2. Análisis de la posible influencia de la fosforilación en la Ser608 de p85 $\alpha$ en la regulación de p110 $\alpha$

Se ha descrito un mecanismo de retroalimentación negativa en la PI3K para asegurar su activación transitoria. Esta autorregulación se basa en la fosforilación de la Ser608 de p85 $\alpha$  por la actividad proteína quinasa de la propia p110 $\alpha$ , lo que disminuye la actividad catalítica de p110 $\alpha$  hacia sus sustratos lipídicos (Dhand *et al.*, 1994; Foukas *et al.*, 2004). Para estudiar este modelo en nuestro sistema, se generaron los mutantes p85 $\alpha$ -CAAX S608A y S608E, los cuales mimetizan, respectivamente, los estados de desfosforilación y fosforilación constitutiva de la Ser608. Cuando se co-expresaron con p110 $\alpha$ , observamos que ambos mutantes se comportaban de la misma manera que la proteína silvestre (datos no mostrados). Sin embargo, cuando se realizaron estos experimentos utilizando Myr-p110 $\alpha$ , el mutante S608A mostró una menor capacidad inhibidora (**Figura 25**). En concordancia con este resultado, p85 $\alpha$ -CAAX S608A co-expresada con p110 $\beta$ -CAAX no restauró el crecimiento, mientras que p85 $\alpha$ -CAAX S608E si que restauró el crecimiento de forma similar a p85 $\alpha$ -CAAX. La situación inversa se observó en el caso de p110 $\alpha$  H1047R, en donde p85 $\alpha$ -CAAX y p85 $\alpha$ -CAAX S608E, pero no p85 $\alpha$ -CAAX S608A, aumentaron la inhibición del crecimiento producida por este mutante de p110 $\alpha$  (**Figura 25**).



**Figura 25. Los mutantes p85 $\alpha$ -CAAX S608E y S608A regulan de forma diferente a las distintas versiones hiperactivas de p110.** Crecimiento de diluciones seriadas calibradas de las levaduras co-transformadas con las versiones mutadas de p85 $\alpha$ -CAAX en la Ser608 (en el vector pYES3/CT) y las versiones hiperactivas de p110 (en el vector YCpLG). Las muestras fueron analizadas como en la Figura 13 A.

Nuestros resultados, resumidos en la **Tabla 4**, ponen de manifiesto un efecto activador generalizado de p65 $\alpha$ -CAAX sobre p110 $\alpha$ , y sugieren un papel de la Ser608 de p85 $\alpha$  en la regulación de p110 $\alpha$ .

		Subunidad reguladora					
		pYES 3	p85 $\alpha$ -CAAX	p65 $\alpha$ -CAAX	p85 $\alpha$ -CAAX K379E	p85 $\alpha$ -CAAX S608A	p85 $\alpha$ -CAAX S608E
Subunidad catalítica	p110 $\alpha$	++	++	+/-		++	++
	p110 $\alpha$ -CAAX	-	-	+/-			
	Myr-p110 $\alpha$	+/-	++	+/-		+	++
	Myr-p110 $\alpha$ E545K	+/-	+/-	+/-	++		
	p110 $\alpha$ K227E	++		+/-			
	p110 $\alpha$ E545K	++	+/-	+/-			
	p110 $\alpha$ H1047R	+	+/-	-		+	+/-
	p110 $\alpha$ C2	++		++			
	p110 $\alpha$ -CAAX K802R	++		++			
	p110 $\beta$ -CAAX	+	++			+	++
	YCpLG	++	++	++	++	++	++

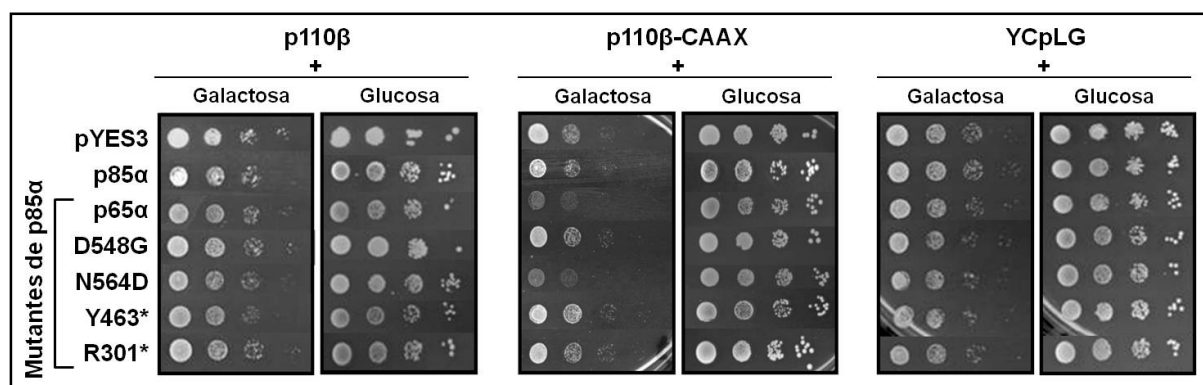
**Tabla 4: Fenotipo de crecimiento de la levadura co-transformada con p110 o mutaciones en p110 $\alpha$  junto con mutaciones de p85 $\alpha$ .** Tabla resumen que sintetiza los datos de la Figura 24 y 25. La nomenclatura del fenotipo de crecimiento de la levadura corresponde a la descrita en la Figura 14.

## 2.5. Caracterización funcional de mutaciones del gen de p85 $\alpha$ halladas en tumores humanos

Una vez demostrado que el sistema de expresión heteróloga en levadura resulta útil para estudiar la actividad *in vivo* de mutaciones de p85 $\alpha$ , decidimos ensayar una serie de mutaciones encontradas en tumores humanos mediante dos aproximaciones.



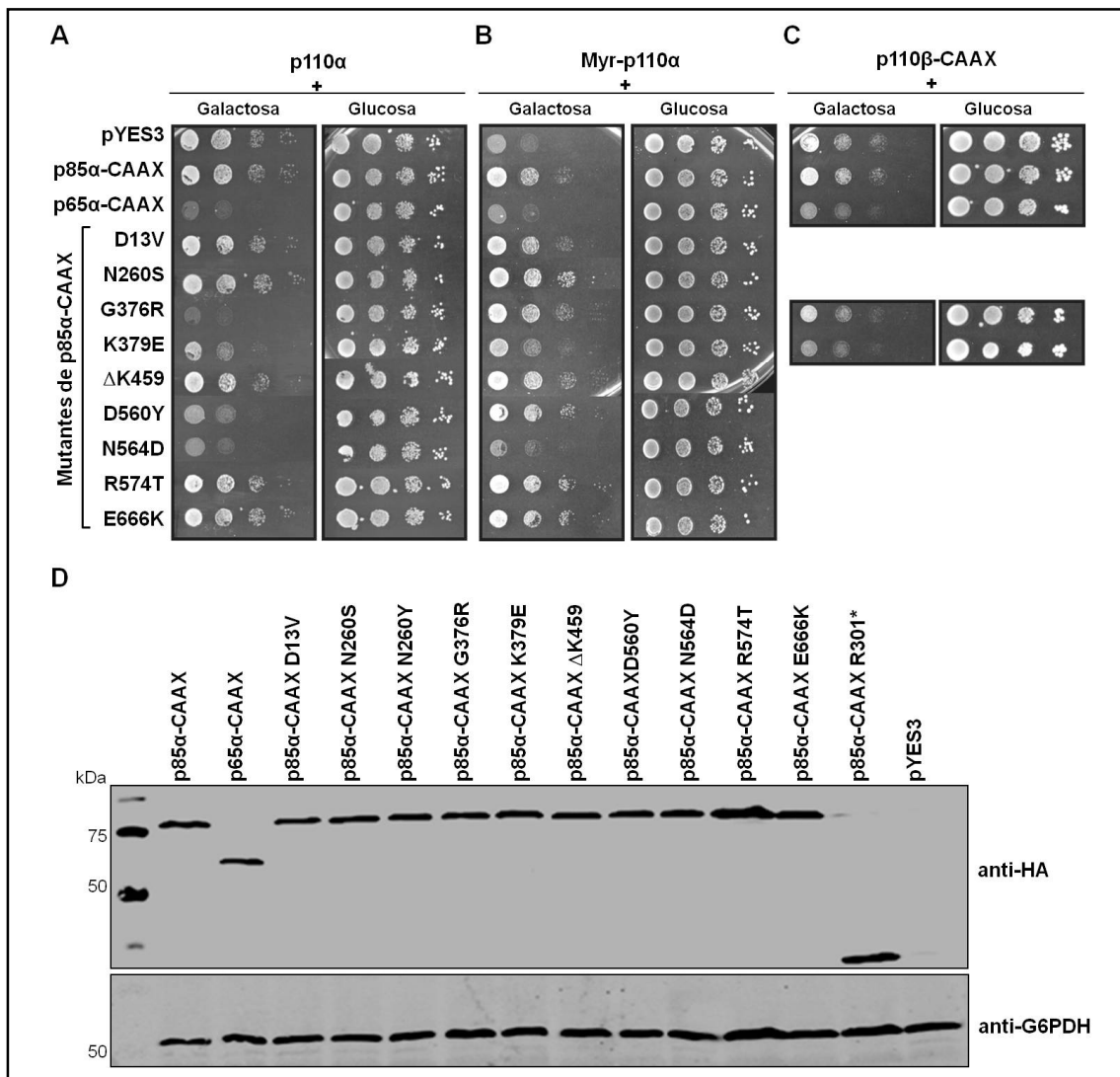
En primer lugar, se analizó la actividad de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  al ser co-expresadas con mutantes de p85 $\alpha$  hallados en tumores de endometrio (Urlick *et al.*, 2011). Concretamente, seleccionamos tres mutaciones en el dominio iSH2 (D548G, N564D y Y463\*) y una en el dominio GAP (R301\*). El efecto funcional de estas mutaciones es desconocido, a excepción de la mutación N564D, que está presente en otros tipos de tumores y de la que se ha descrito que incrementa la actividad PI3K en células de mamíferos (Jaiswal *et al.*, 2009). Ninguna de las mutaciones, incluida N564D, afectó a la actividad de p110 $\alpha$  al ser co-expresadas en la levadura (datos no mostrados). Puesto que hemos descrito que el efecto de p110 $\beta$ -CAAX sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* es potenciado por p65 $\alpha$  (apartado 2.1), analizamos la actividad de p110 $\beta$  silvestre y p110 $\beta$ -CAAX al ser co-expresados con estos mutantes de p85 $\alpha$ . En la **Figura 26**, se muestra que sólo la mutación N564D presentó un efecto activador sobre p110 $\beta$ -CAAX, similar al observado con p65 $\alpha$ , mientras que no se observó ningún efecto detectable sobre p110 $\beta$ . El resto de las mutaciones ensayadas no mostraron efecto sobre ninguna de las dos formas de p110 $\beta$ .



**Figura 26. Análisis de la actividad de p110 $\beta$ -CAAX co-expresada con mutaciones de p85 $\alpha$  halladas en tumores de endometrio.** Diluciones seriadas decimales crecidas sobre agar representativas de clones de levadura co-transformada con la subunidad catalítica p110 $\beta$  o p110 $\beta$ -CAAX (en el vector YCLG) o con el vector YCpLG vacío junto con las mutaciones de p85 $\alpha$  en pYES3/CT.

En una segunda estrategia para estudiar la modulación de la actividad de p110 $\alpha$  por mutaciones de p85 $\alpha$  halladas en tumores, co-expresamos estas mutaciones introducidas en p85 $\alpha$ -CAAX con p110 $\alpha$  o Myr-p110 $\alpha$ . El efecto funcional de la

mayoría de las mutaciones analizadas era desconocido, aunque en algunos casos hay estudios *in vitro* e *in vivo* en células de mamíferos (Hofmann y Jucker, 2012; Jaiswal *et al.*, 2009; Miled *et al.*, 2007; Urick *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2009). En función de los resultados obtenidos por la co-expresión de los mutantes de p85 $\alpha$ -CAAX con p110 $\alpha$  y Myr-p110 $\alpha$ , hemos clasificado las mutaciones en tres grupos. El primer grupo engloba a las mutaciones que presentan el mismo comportamiento que p85 $\alpha$ -CAAX: D13V, N260S,  $\Delta$ K459, R574T y E666K (distribuidas en los dominios SH3, GAP, iSH2 y cSH2). Estas mutaciones no muestran ningún efecto sobre p110 $\alpha$  pero sí un efecto inhibitor sobre Myr-p110 $\alpha$  (**Figura 27 A y B**). Estos resultados sugieren que el mecanismo mediante el cual estas mutaciones pudieran actuar en cáncer no estaría relacionado con un aumento de la actividad de p110 $\alpha$ . Por el contrario, las mutaciones del segundo grupo, K379E y N564D, (situadas en los dominios nSH2 e iSH2) presentaban un comportamiento similar al de p65 $\alpha$ -CAAX, activando a p110 $\alpha$  y sin ejercer un efecto sobre Myr-p110 $\alpha$ . Por tanto, su mecanismo de activación se puede deber a la eliminación de interacciones inhibitoras (**Figura 27 A y B**). Las mutaciones del tercer grupo (G376R (nSH2) y D560Y (iSH2)) activan a p110 $\alpha$  e inhiben a Myr-p110 $\alpha$ , lo que indica que el mecanismo mediante el cual actúan difiere de los dos grupos anteriores. Nos planteamos si estas mutaciones se comportarían igual con otra p110 unida a la membrana. Para ello, seleccionamos a p85 $\alpha$ -CAAX G376R y la co-expresamos con p110 $\beta$ -CAAX. En paralelo, se ensayó la mutación K379E representante del segundo tipo de mutaciones. Como se aprecia en la **Figura 27 C**, p85 $\alpha$ -CAAX K379E incrementó la actividad de p110 $\beta$ -CAAX, mientras que el mutante p85 $\alpha$ -CAAX G376R la inhibió a niveles similares a los de p85 $\alpha$ -CAAX. Estos resultados refuerzan la idea de que ambos tipos de mutaciones ejercen un efecto diferente. Para asegurar que la expresión y estabilidad de las formas mutantes era equivalente a la p85 $\alpha$  silvestre, se comprobaron sus niveles de expresión por inmunoblot. Todos los mutantes de p85 $\alpha$ -CAAX tenían niveles de expresión similares, por lo que el efecto observado se debía a la presencia de las mutaciones (**Figura 27 D**). La expresión de los mutantes en ausencia de p110 no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de la levadura (datos no mostrados).



**Figura 27. Efecto de mutaciones de p85α halladas en tumores humanos sobre diferentes subunidades catalíticas.** La cepa de levadura YPH499 fue co-transformada con YCpLG-p110α (**A**), o YCpLG-Myr-p110α (**B**), o YCpLG-p110β-CAAX (**C**) junto con mutaciones de p85α-CAAX en pYES3/CT. Se realizaron ensayos de crecimiento sobre agar de diluciones calibradas de los transformantes en las mismas condiciones que en la Figura 13 A. **D.** Análisis por *Western blot* de la expresión de los mutantes de p85α-CAAX transformados en la levadura. Se utilizó el anticuerpo anti-HA para detectar los mutantes de p85α-CAAX, clonados en pYES3/CT y portadores de un epítipo HA en la región N-terminal y el anticuerpo anti-G6PDH como control de carga. Se comprobó la expresión en la levaduras de los mutantes de p85α-CAAX N260Y y R301\*, pero no fueron analizados en los experimentos de diluciones seriadas presentados en este trabajo.

Todos estos resultados, resumidos en la **Tabla 5**, ilustran la existencia de una compleja regulación *in vivo* de las subunidades catalíticas p110α y p110β por la subunidad reguladora p85α, que puede ser trazada mediante el sistema heterólogo de la levadura.

## RESULTADOS

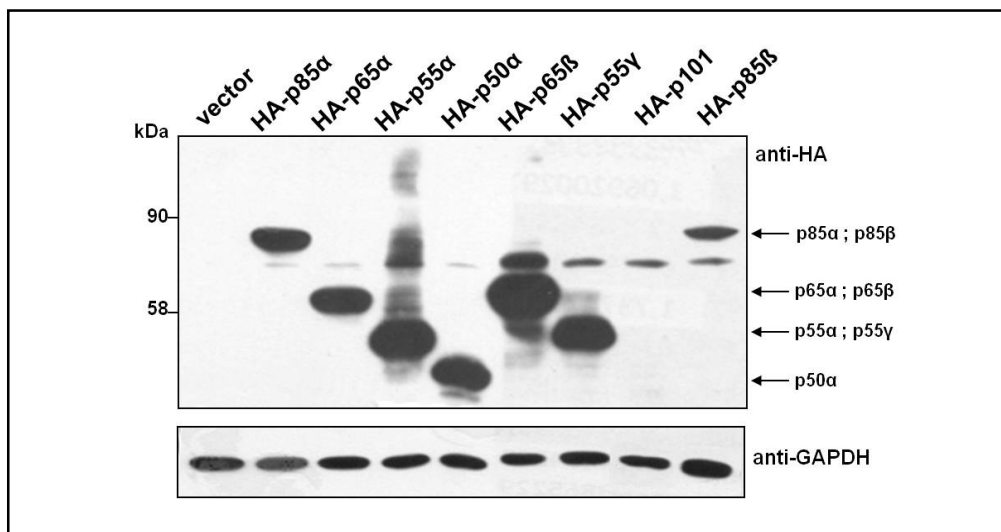
Mutaciones	Dominio	Tipo de tumor	Actividad <i>in vivo</i> en la levadura:		
			p110 $\alpha$	Myr-p110 $\alpha$	p110 $\beta$ -CAAX
Vector vacío			++	+/-	+
<b>en p85<math>\alpha</math>:</b>					
p85 $\alpha$			++	++	+
p65 $\alpha$	iSH2	Linfoma de ratón	++	+	+/-
D548G	iSH2	Endometrio	++		+
N546D	iSH2	Endometrio;SNC;intestino grueso	++		+/-
Y463*	iSH2	Endometrio	++		+
R301*	GAP	Endometrio	++		+
<b>en p85<math>\alpha</math>-CAAX:</b>					
p85 $\alpha$			++	++	++
p65 $\alpha$	iSH2	Linfoma de ratón	+/-	+/-	+/-
D13V	SH3	Mama	++	++	
N260S	GAP	Endometrio	++	++	
G376R	nSH2	Glioma	+/-	++	++
K379E	nSH2	Glioma	+/-	+/-	+/-
$\Delta$ K459	iSH2	Endometrio	++	++	
D560Y	iSH2	Mama; glioma	+/-	++	
N564D	iSH2	Endometrio;SNC;intestino grueso	+/-	+/-	
R574T	iSH2	Endometrio; mama;tracto urinario	++	++	
E666K	cSH2	Intestino grueso	++	++	

**Tabla 5: Análisis *in vivo* de la actividad de p110 $\alpha$ , Myr-p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ -CAAX co-expresadas con mutaciones de p85 $\alpha$  encontradas en tumores humanos e introducidas en p85 $\alpha$  silvestre o en p85 $\alpha$ -CAAX.** La actividad *in vivo* de los mutantes de p85 $\alpha$  se determinó por su influencia en el fenotipo de crecimiento inducido por p110 $\alpha$ , Myr-p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ -CAAX comparado con el crecimiento observado cuando estas subunidades catalíticas eran expresadas solas. Los experimentos representativos de crecimiento de diluciones seriadas sobre agar se muestran en las Figuras 26 y 27. Para la nomenclatura del fenotipo de crecimiento de la levadura, ver Figura 14. Los símbolos resaltados en negro indican las combinaciones más relevantes en las que se ha detectado algún tipo de efecto. Las mutaciones provienen de la base de datos de cáncer, COSMIC ([www.sanger.ac.uk/cosmic/gene](http://www.sanger.ac.uk/cosmic/gene)), a excepción de p65 $\alpha$  que proviene de linfomas inducidos en ratones (Jiménez *et al.*, 1998). SNC: sistema nervioso central

### 3. Estudio de las subunidades reguladoras de la PI3K de clase I mediante su sobre-expresión en células de mamíferos

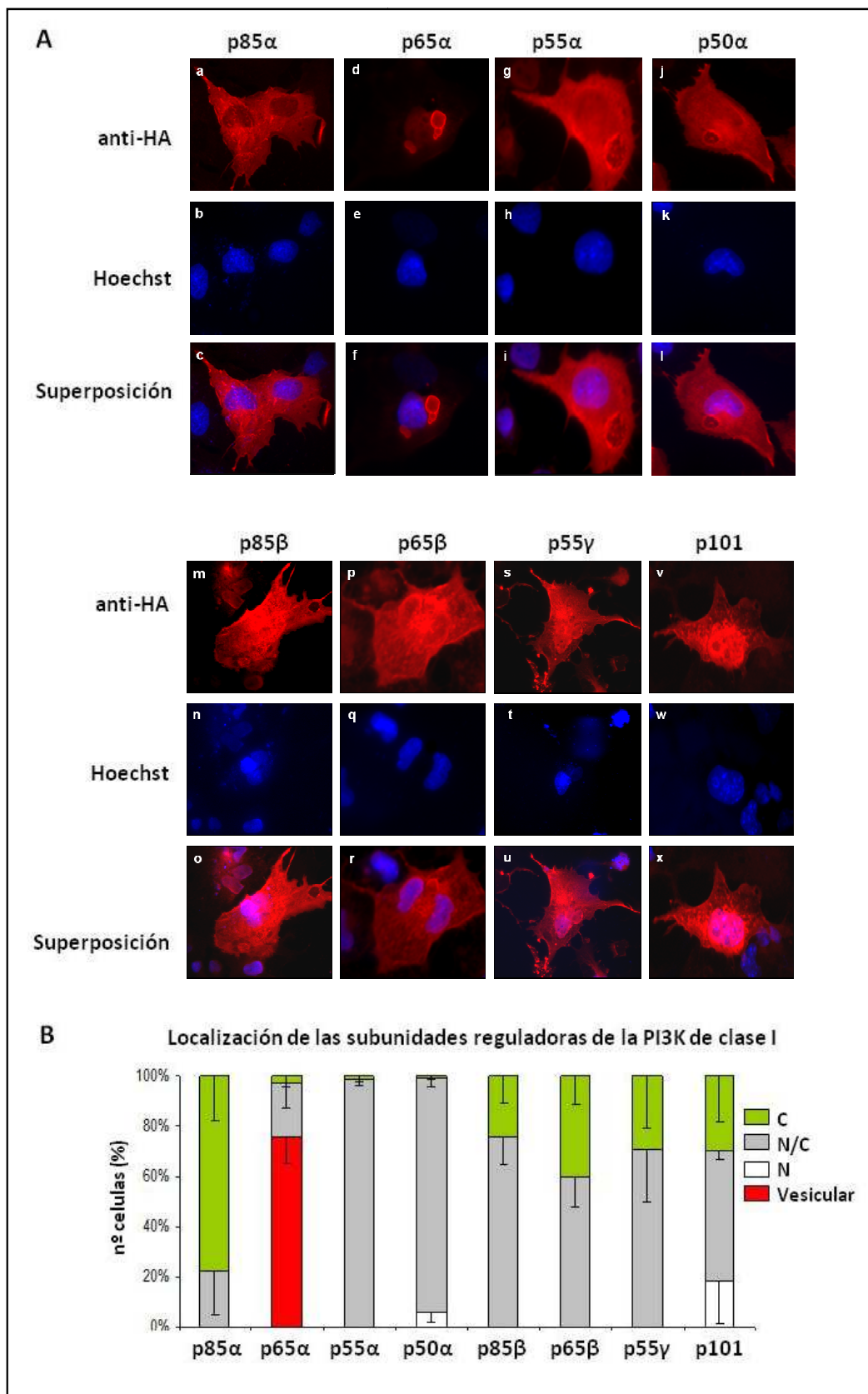
#### 3.1. Localización subcelular de las subunidades reguladoras de la PI3K de clase I en células COS-7

Los cDNAs codificantes de las subunidades reguladoras de la PI3K de clase I, incluyendo las truncaciones p65 $\alpha$  y p65 $\beta$ , fueron clonados en el vector de expresión para células de mamífero pRK5 añadiéndoles en posición N-terminal una copia del epítipo de hemaglutinina (HA) con el fin de facilitar su detección. A excepción de p101, se pudo verificar mediante inmunoblot con anticuerpos anti-HA la expresión de todas las subunidades en células COS-7 transfectadas con los correspondientes cDNAs (**Figura 28**). Para determinar la localización subcelular de las subunidades reguladoras sobre-expresadas en estas células, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia, y en todos los casos -incluida p101- se detectaron células positivas. En la **Figura 29 A** se muestran imágenes representativas del principal tipo de localización para cada una de las subunidades ensayadas. Todas las subunidades reguladoras de la PI3K, así como la versión truncada p65 $\beta$ , presentaron una localización mayoritariamente núcleo-citoplasmática, con la excepción de p85 $\alpha$ , que se localiza principalmente en el citoplasma, mostrándose a menudo enriquecida en compartimentos perinucleares. p55 $\alpha$ , p50 $\alpha$ , p85 $\beta$  y p65 $\beta$  muestran una localización relativamente uniforme en núcleo y citoplasma, mientras que p55 $\gamma$  y p101 presentan un patrón citoplasmático punteado, y en el caso de p101 también se observa marcaje en el núcleo (**Figura 29 B**). En el caso de p65 $\alpha$ , su localización difiere notablemente de las demás subunidades reguladoras, ya que se observa concentrada en la periferia de grandes estructuras de aspecto vesicular.



**Figura 28: Detección mediante inmunoblot de la expresión de las subunidades reguladoras de la PI3K de clase I en células COS-7.** Lisados de células COS-7 transfectadas con vectores de expresión portando las distintas subunidades reguladoras (con un epítipo HA) fueron analizados mediante inmunoblot con el anticuerpo anti-HA (panel superior). Se utilizó un anticuerpo anti-GAPDH como control de carga (panel inferior). Las flechas indican la migración de las diferentes subunidades reguladoras.

**Figura 29: Localización subcelular de las subunidades reguladoras de la PI3K de clase I en células COS-7.** **A.** Imágenes representativas de la localización subcelular mayoritaria de las subunidades reguladoras ensayadas. Las células COS-7 fueron transfectadas como en la Figura 28 y procesadas para inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos anti-HA (primario) y anti-mouse-Alexafluor-594 (secundario). Los paneles a, d, g, j, m, p, s, v, muestran la localización mayoritaria para cada subunidad reguladora. Los paneles b, e, h, k, n, q, t, w muestran los núcleos teñidos con Hoechst 33258 de campos equivalentes. Los paneles c, f, i, l, o, r, u, x muestran la superposición de ambas imágenes. **B.** Cuantificación de la localización subcelular de las subunidades reguladoras del apartado A. La localización subcelular se clasificó en cuatro categorías: C, predominantemente citoplasmática; N/C, nuclear y citoplasmática; N, predominantemente nuclear; Vesicular, estructuras grandes de aspecto vesicular (ver imágenes representativas en el apartado A). Los datos se muestran como el porcentaje de células que se presenta en cada una de las localizaciones subcelulares. Los valores son la media de, al menos, tres experimentos, en los que se contaron como mínimo 100 células. Las barras de error representan la desviación estándar.



## 3.2. Caracterización de la localización subcelular de p65 $\alpha$

### 3.2.1. Estudio comparativo de la localización subcelular de p65 $\alpha$ .

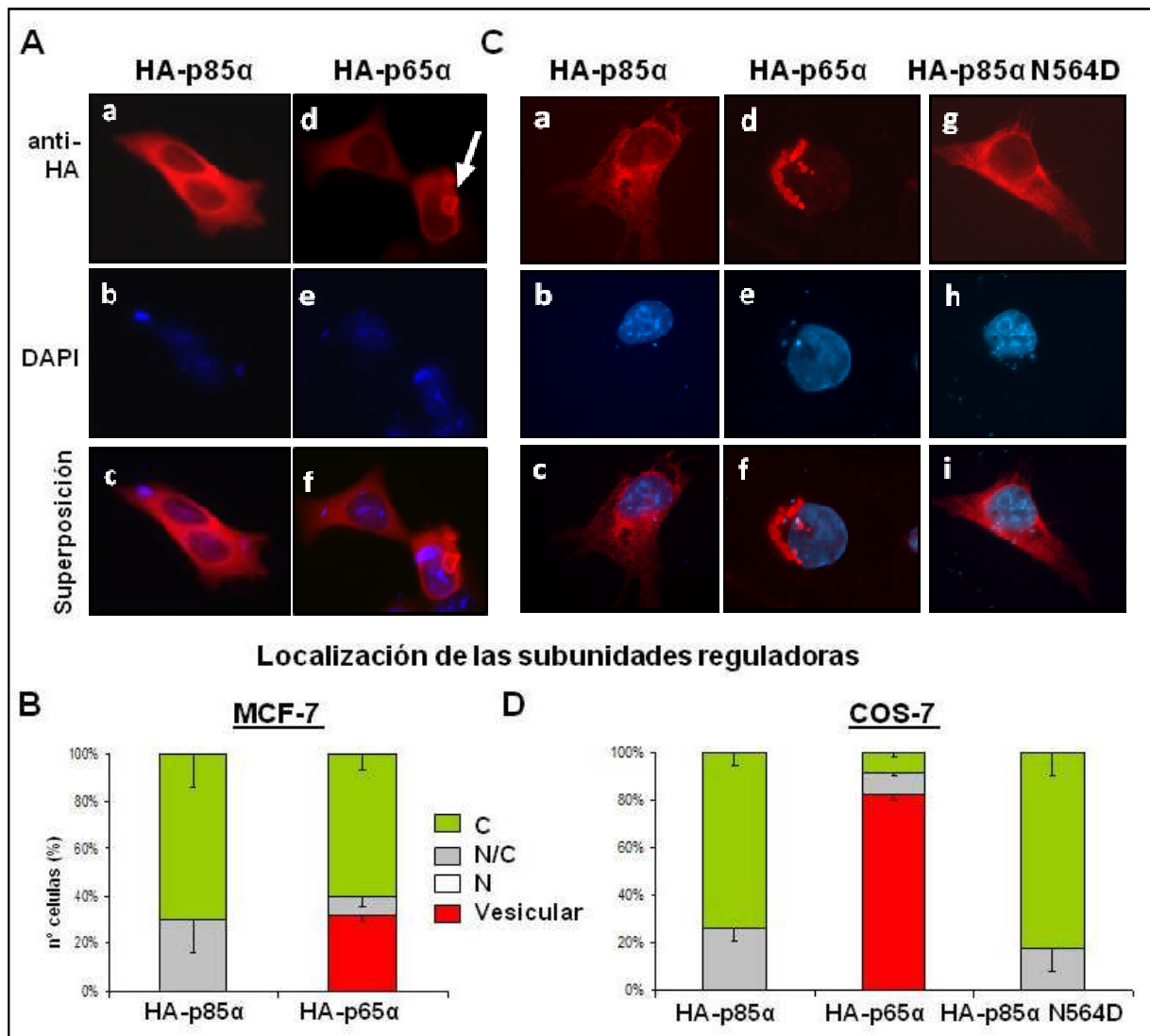
Decidimos estudiar si la localización mayoritaria de p65 $\alpha$  era específica de células COS-7 o se podía observar en otras líneas celulares. Para ello, sobre-expresamos p85 $\alpha$  y p65 $\alpha$  en la línea celular humana de carcinoma mamario MCF-7. Observamos que aproximadamente el 30% de las células que expresaban p65 $\alpha$  (pero no las que expresaban p85 $\alpha$ ) mostraba una localización en estructuras de tipo vesicular similar al patrón predominante en la línea COS-7 (**Figura 30 A y B**). Este resultado indica que la localización vesicular de p65 $\alpha$  no es exclusiva de las células COS-7.

A continuación, determinamos si el tipo de localización mayoritaria de p65 $\alpha$  se detectaba también en mutantes puntuales de p85 $\alpha$  oncogénicos. Para ello, seleccionamos al mutante p85 $\alpha$  N564D debido a que también presentaba un efecto activador similar al de p65 $\alpha$ , tanto en mamíferos (Jaiswal *et al.*, 2009) como en nuestro sistema de la levadura (ver apartado 2.5). Los experimentos de inmunofluorescencia de la **Figura 30 C y D** muestran que la localización en COS-7 del mutante p85 $\alpha$  N564D es similar a la de p85 $\alpha$  silvestre, principalmente citoplasmática, y no presenta nunca la localización en estructuras de tipo vesicular características de p65 $\alpha$ .

---

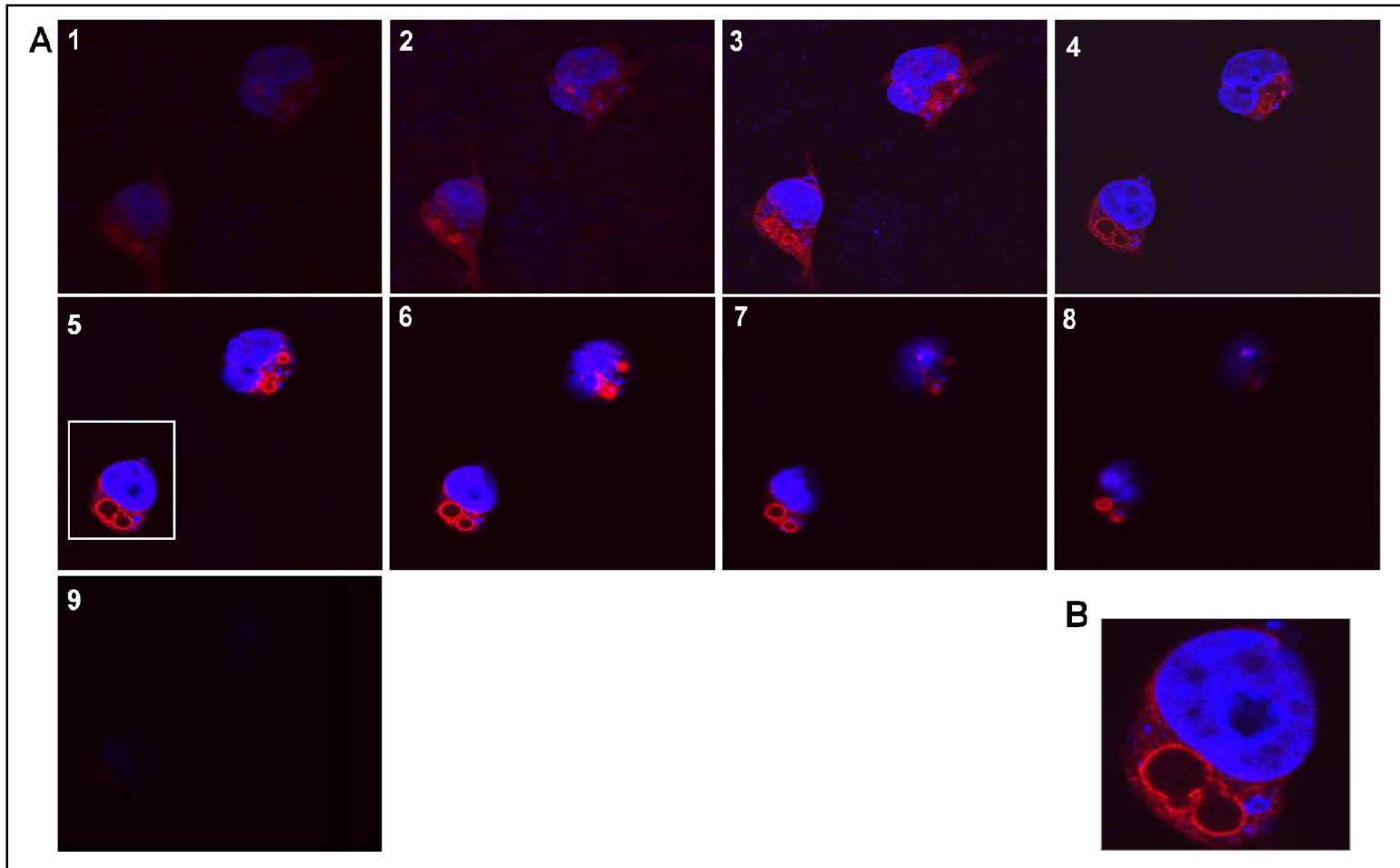
**Figura 30. Localización tipo vesicular de p65 $\alpha$ .** Imágenes representativas de la localización mayoritaria de p85 $\alpha$  y p65 $\alpha$  sobre-expresadas en la línea celular MCF-7 (**A**) y de p85 $\alpha$ , p65 $\alpha$  y p85 $\alpha$  N564D sobre-expresadas en células COS-7(**C**). Las células MCF-7 y COS-7 fueron transfectadas con las construcciones indicadas y procesadas para inmunofluorescencia como en la Figura 29. Los paneles a y d del apartado A; y a, d, g, del apartado C, muestran la localización mayoritaria para cada subunidad reguladora. La flecha en el panel d (apartado A) muestra la localización en estructuras de tipo vesicular de p65 $\alpha$ . Los paneles b, e (apartado A), y b, e, h (apartado C) muestran los núcleos teñidos con DAPI. Los paneles c, f (apartado A), y c, f, i (apartado C) muestran la superposición de las imágenes. Cuantificación de la localización subcelular de p85 $\alpha$  y p65 $\alpha$  en células MCF-7 (**B**) y de p85 $\alpha$ , p65 $\alpha$  y p85 $\alpha$  N564D en células COS-7 (**D**). Los datos se muestran como el porcentaje de células que se presenta en cada una de las localizaciones subcelulares. Los valores son la media de, al menos, tres experimentos, en los que se contaron como mínimo 100 células. Las barras de error representan la desviación estándar.





### 3.2.2. La sobre-expresión de p65 $\alpha$ induce la formación de endosomas tempranos de mayor tamaño

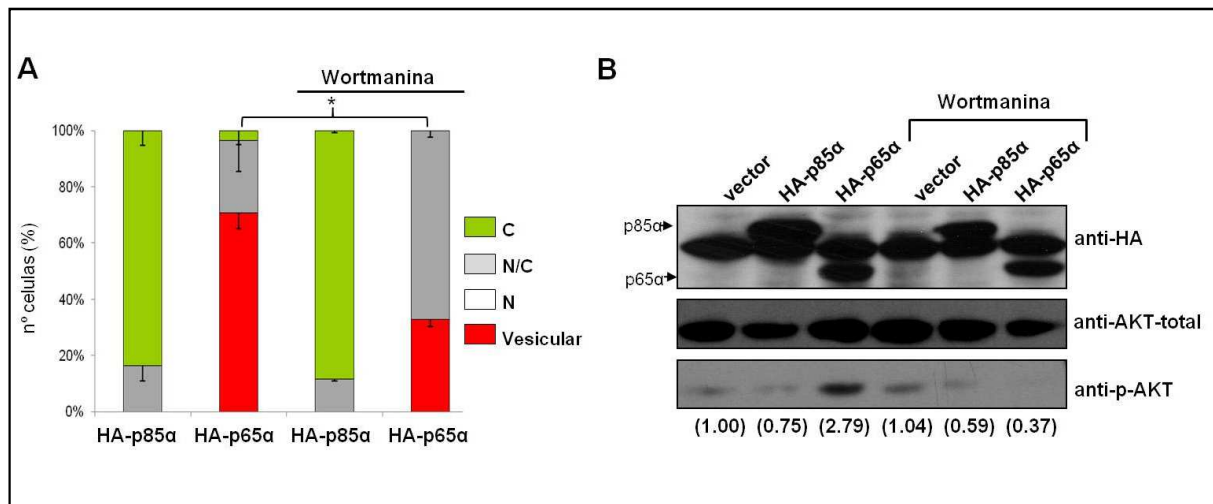
En microscopía de epifluorescencia, los compartimentos enriquecidos en p65 $\alpha$  ofrecen un aspecto vesicular, acumulándose el marcaje en la superficie de éstos. Para verificar esta observación analizamos los experimentos de inmunofluorescencia mediante microscopía confocal. En la **Figura 31** se ofrece una secuencia de planos confocales de células COS-7 transfectadas con p65 $\alpha$ . Observamos que p65 $\alpha$  se concentra alrededor de compartimentos intracelulares de aspecto vesicular de diferentes tamaños. Estos resultados indican que p65 $\alpha$  adquiere una localización subcelular que difiere claramente de la de p85 $\alpha$ .



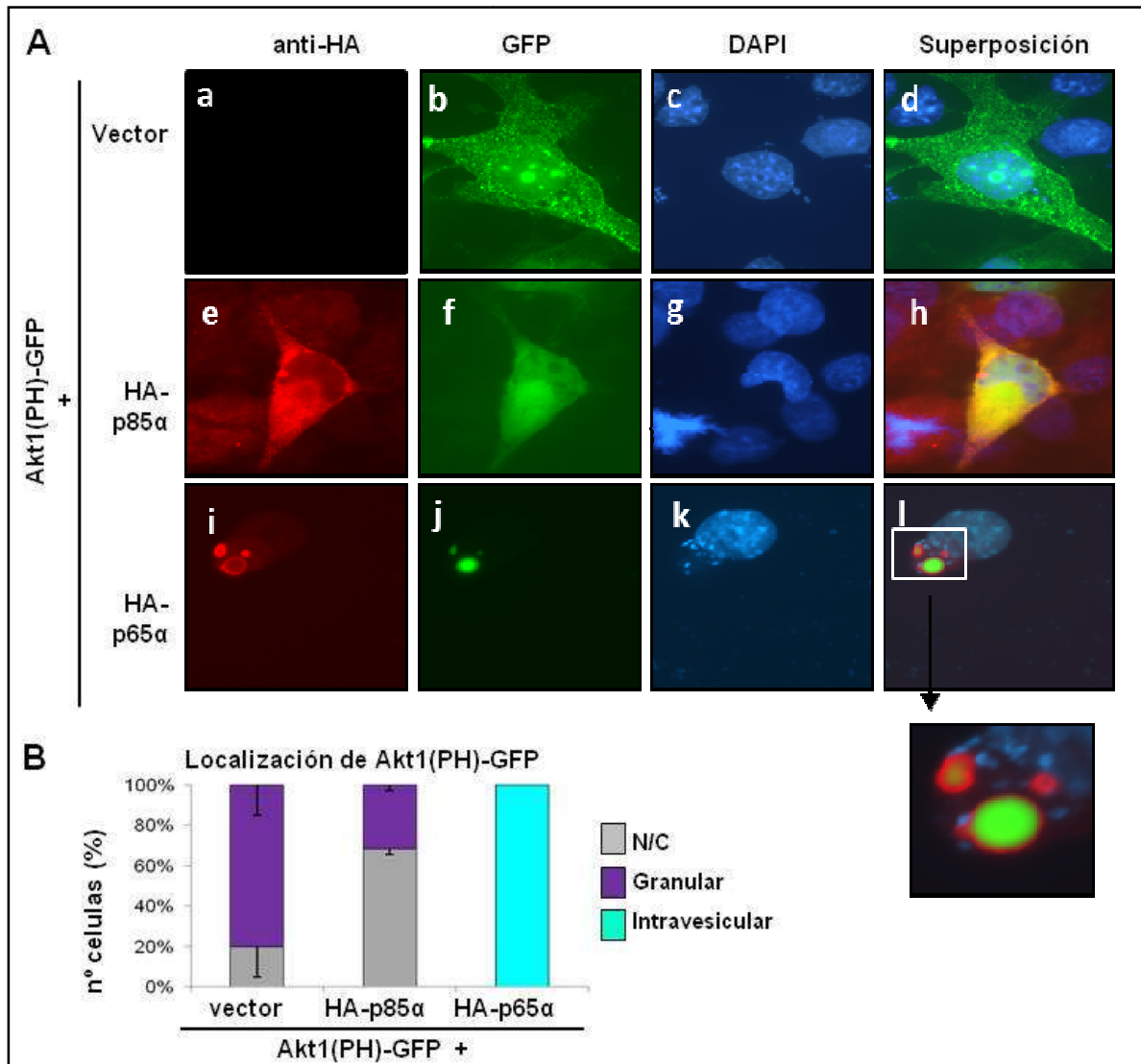
**Figura 31. Localización de p65 $\alpha$  alrededor de compartimentos intracelulares de aspecto vesicular. A.** Secuencia de imágenes representativas de diferentes planos confocales mostrando la localización de la forma oncogénica p65 $\alpha$  en células COS-7. Las imágenes se tomaron desde la zona basal (imagen 1) hasta la zona apical de la célula (imagen 9). **B.** Ampliación de la imagen 5, donde se observa la localización de p65 $\alpha$  alrededor de este tipo de estructuras en el plano de mayor diámetro.

A continuación, estudiamos si la actividad PI3K estaba implicada en la inducción de estos compartimentos intracelulares por sobre-expresión de p65 $\alpha$ . Para ello, se analizó por inmunofluorescencia la localización de p85 $\alpha$  y p65 $\alpha$  en células COS-7 en presencia de wortmanina, un inhibidor de la subunidad catalítica de la PI3K. Como se observa en la **Figura 32 A**, en células tratadas con wortmanina la localización citoplasmática de p85 $\alpha$  no varía; sin embargo, la localización de p65 $\alpha$  en las vesículas intracelulares disminuye significativamente. Para comprobar la efectividad del inhibidor se transfectaron células COS-7 con p85 $\alpha$  y p65 $\alpha$  y se midió la activación del efector de la ruta de la PI3K, AKT, mediante la detección por *Western blot* de la fosforilación de los dos residuos necesarios para su completa activación (Ser473 y Thr308). La **Figura 32 B** muestra que la co-expresión de p65 $\alpha$  aumenta la fosforilación de AKT en comparación con p85 $\alpha$ , mientras que en presencia del inhibidor de la PI3K se observa una disminución significativa de la activación de AKT. Estos datos concuerdan con la actividad oncogénica descrita para p65 $\alpha$  (Jiménez *et al.*, 1998) y sugieren que el aumento de la actividad catalítica de la PI3K puede ser determinante para la formación de las vesículas intracelulares observadas en presencia de p65 $\alpha$ .

Una vez determinado que la actividad de PI3K parece necesaria para la formación de estas vesículas, decidimos determinar la localización del producto de dicha actividad, el PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Para ello, utilizamos la proteína GFP fusionada al dominio PH de unión a PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> y PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> de AKT humano (Akt1(PH)-GFP), y realizamos experimentos de inmunofluorescencia en células COS-7. En la **Figura 33** se observa a Akt1(PH)-GFP con un patrón de tipo granular en el citoplasma y núcleo. Esta localización es alterada al ser co-expresada con p85 $\alpha$ , perdiendo el aspecto granular. Sin embargo, cuando está co-expresada con p65 $\alpha$  de localización vesicular, el marcaje de Akt1(PH)-GFP se observó únicamente en el interior de las vesículas marcadas en su periferia por p65 $\alpha$ . Las localizaciones mayoritarias de p85 $\alpha$  y p65 $\alpha$  no están alteradas por Akt1(PH)-GFP (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que p65 $\alpha$ , pero no p85 $\alpha$ , es capaz de inducir la acumulación de Akt1(PH)-GFP en el interior de estas vesículas.



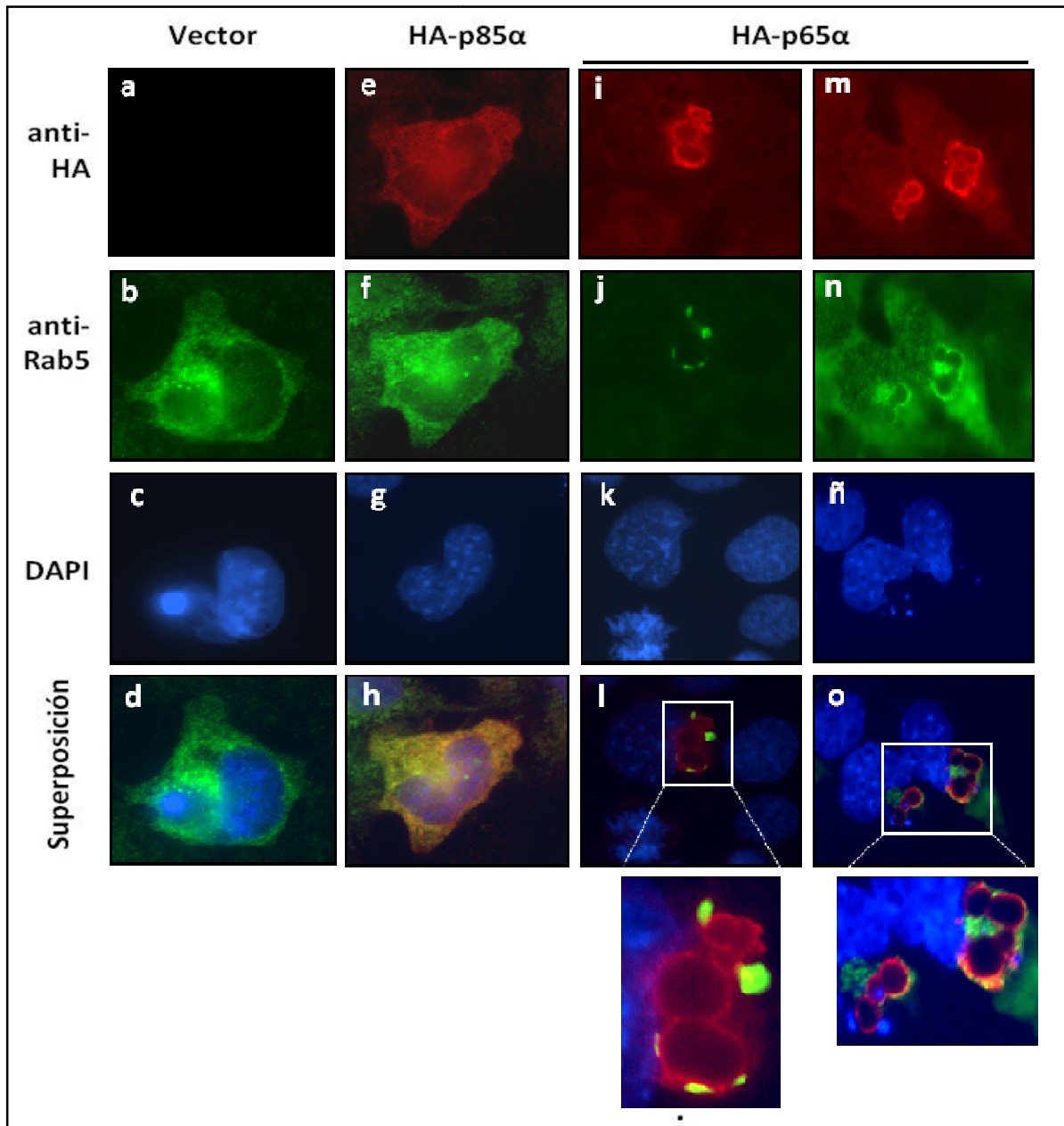
**Figura 32. La generación de estructuras tipo vesicular observadas con p65α depende de la actividad PI3K. A.** Cuantificación de la localización en células COS-7 de p85α y p65α en ausencia y presencia de wortmanina. Las células fueron transfectadas con HA-p85α y HA-p65α y tratadas con wortmanina (100μM) durante 4 horas antes de su procesamiento por inmunofluorescencia. Los datos se obtuvieron y procesaron como en la Figura 29. El asterisco (\*) indica significación estadística en la prueba de T de Student ( $p < 0.05$ ). **B.** La activación de AKT por parte de células de mamíferos que sobre-expresan p65α es inhibida por el tratamiento con wortmanina. Se transfectaron células COS-7 con pRK5 vacío (vector), con HA-p85α y con HA-p65α. Se obtuvieron lisados en los que se comprobó la activación de AKT mediante un *Western blot* con una mezcla de anticuerpos primarios anti-p-AKT Ser473 y anti-p-AKT Thr308 (panel inferior). Se comprobó la expresión de AKT (panel intermedio) y se utilizó el anticuerpo anti-HA para comprobar la expresión de las proteínas transfectadas (panel superior). Las bandas correspondientes a p-AKT y AKT total se cuantificaron con el programa ImageJ. En la parte inferior se indica entre paréntesis la relación entre la cantidad de p-AKT y AKT total, normalizada respecto al vector vacío. El experimento se repitió dos veces con resultados similares, y se muestra una imagen representativa.



**Figura 33. Las vesículas intracelulares marcadas por p65α acumulan Akt1(PH)-GFP en su interior.** **A.** Imágenes representativas de la localización mayoritaria de Akt1(PH)-GFP co-expresado con el vector vacío o HA-p65α o HA-p85α en células COS-7. Las inmunofluorescencias fueron visualizadas con los anticuerpos anti-HA (ratón) y los secundarios anti-ratón conjugados a Alexafluor-594 (rojo) para las subunidades reguladoras (paneles a,e,i), mientras que la visualización de Akt1(PH)-GFP fue directa (paneles b,f,j). Los paneles c, g, k muestran los núcleos teñidos con DAPI. Los paneles d, h, l muestran la superposición de las tres imágenes. En el panel l se incluye una ampliación donde se observa la acumulación de Akt1(PH)-GFP en el interior de los compartimentos marcados por p65α. **B.** Cuantificación de la localización de Akt1(PH)-GFP junto con vector vacío, HA-p85α y HA-p65α. Las células COS-7 fueron procesadas por inmunofluorescencia como en el apartado A, y la localización subcelular se clasificó como: N/C, nuclear y citoplasmática; Granular, se caracteriza por un patrón de fluorescencia en gránulos en todo el citoplasma; Intravesicular, donde toda la fluorescencia se detecta en el interior de las vesículas marcadas por p65α. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de, al menos, tres réplicas experimentales en los que se contaron como mínimo 100 células por experimento. Debido al reducido número de células contabilizadas con marcaje de p65α de localización núcleo-citoplasmática o citoplasmática, en los cuales Akt1(PH)-GFP presenta distribución núcleo-citoplasmática, los datos no han sido representados.

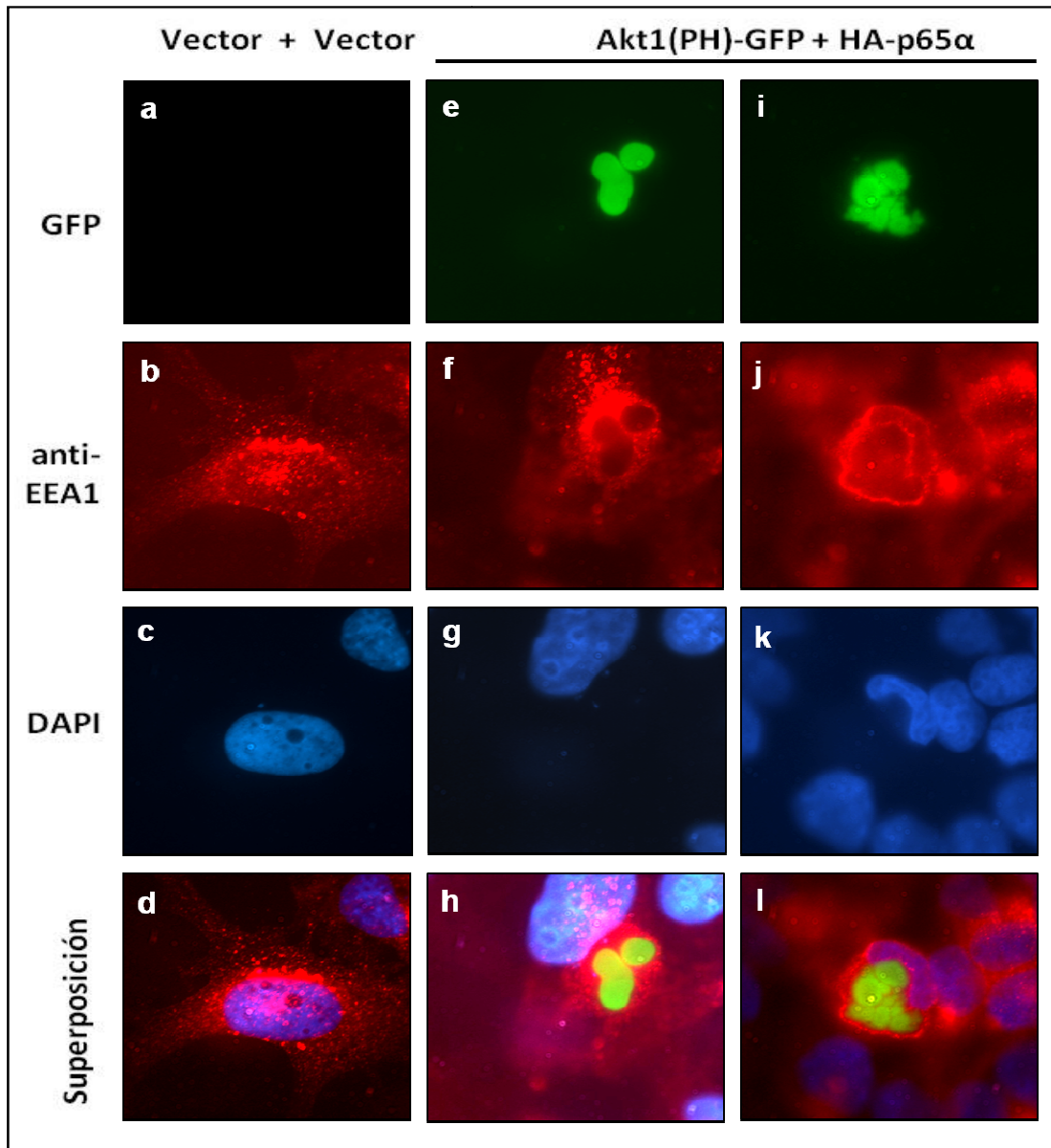
Los datos anteriores sugieren una estimulación del tráfico vesicular de las membranas ricas en PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> en condiciones de sobre-expresión de p65 $\alpha$ . Basándonos en la participación descrita de p85 $\alpha$  en la ruta endocítica de los receptores RTKs (Chamberlain *et al.*, 2004; Chamberlain *et al.*, 2010), decidimos estudiar si los compartimentos inducidos por p65 $\alpha$  estaban relacionados con el tráfico endocítico. Para ello, se realizaron estudios de inmunofluorescencia, en células COS-7 transfectadas con p85 $\alpha$  o p65 $\alpha$ , con anticuerpos específicos frente a marcadores de endosomas tempranos, como la GTPasa Rab5 y EEA1. Los experimentos de inmunofluorescencia con p85 $\alpha$  revelaron una co-localización con Rab5, lo que concuerda con la interacción descrita previamente entre ambas proteínas (Chamberlain *et al.*, 2004). En el caso de las células positivas para p65 $\alpha$  se observó co-localización parcial con Rab5, detectándose dos patrones de localización diferentes de Rab5: formando acúmulos en determinados puntos de la periferia de las vesículas marcadas con p65 $\alpha$ , o localizándose por la periferia de las mismas. En ambos casos, Rab5 co-localizó con p65 $\alpha$  sólo en determinadas zonas de dichas vesículas (**Figura 34**).

Asimismo, realizamos experimentos de inmunofluorescencia para la visualización de EEA1 en células que co-expresan p65 $\alpha$  junto con Akt1(PH)-GFP, con el objetivo de detectar las vesículas asociadas a p65 $\alpha$  mediante la visualización de la fluorescencia de Akt1(PH)-GFP en verde, y el anticuerpo anti-EEA1 en el canal rojo. Observamos que el marcador de endosomas tempranos EEA1 se localiza parcialmente en la periferia de las vacuolas asociadas a p65 $\alpha$ , marcadas con Akt1(PH)-GFP (**Figura 35**). Estos experimentos revelan que p65 $\alpha$  se asocia a componentes que exhiba en su superficie de manera parcial marcadores de endosomas tempranos como Rab5 y EEA1. En conjunto, estos datos sugieren que p65 $\alpha$  se acumula en la superficie de grandes vacuolas derivadas de fusión endosomal.



**Figura 34: Co-localización parcial de p65 $\alpha$  con el marcador de endosomas tempranos, Rab5.** Las células COS-7 fueron transfectadas con el vector vacío, o HA-p85 $\alpha$ , o HA-p65 $\alpha$  (paneles a, e, i, m) y procesadas para inmunofluorescencia como en la Figura 29. Se detectó el marcador de endosomas tempranos Rab5 mediante anticuerpos anti-Rab5 y anti-conejo conjugado a Alexafluor-488 (verde) (paneles b, f, j, n). Los núcleos teñidos con DAPI se muestran en los paneles c, g, k, ñ, mientras que las superposiciones de las tres imágenes se observan en los paneles d, h, l, o. Se muestran dos experimentos representativos de los patrones de co-localización parcial de Rab5 con HA-p65 $\alpha$  (paneles l, o). Se ha ampliado el área seleccionada con un recuadro blanco del panel l, donde se observa con mayor detalle los acúmulos de Rab5 en determinados puntos de las vesículas marcadas con p65 $\alpha$ , y del panel o, que muestra una co-localización parcial de Rab5 con p65 $\alpha$  en diferentes zonas de la periferia de dichas vesículas.





**Figura 35: Co-localización parcial de Akt1(PH)-GFP con el marcador de endosomas tempranos EEA1 en condiciones de sobre-expresión de p65 $\alpha$ .** Las células COS-7 fueron transfectadas con HA-p65 $\alpha$  junto con Akt1(PH)-GFP y procesadas por inmunofluorescencia. La visualización de Akt1(PH)-GFP fue directa (paneles a, e, i) y la detección del marcador de endosomas tempranos EEA1 fue mediante anticuerpos anti-EEA1 y anti-cabra conjugado a Alexafluor-594 (rojo) (paneles b, f, j). Los núcleos teñidos con DAPI se muestran en los paneles c, g, k. En los paneles inferiores se observan las imágenes superpuestas, y en particular los paneles h y l muestran dos experimentos representativos de la co-localización parcial de Akt1(PH)-GFP y HA-p65 $\alpha$  con EEA1.



# DISCUSIÓN



## 1. *S. cerevisiae* como sistema heterólogo para el estudio funcional de la PI3K de clase IA

La levadura *S. cerevisiae* es un modelo biológico ampliamente utilizado en investigación básica, cuya versatilidad permite la expresión y análisis funcional de proteínas heterólogas que complementan o se integran en diversos aspectos de su fisiología. En este estudio, demostramos la utilidad de *S. cerevisiae* para realizar estudios funcionales sobre las subunidades catalíticas y reguladoras de la PI3K de clase IA, así como para entender las interacciones entre ambas. Este modelo se ha utilizado previamente para realizar estudios con el supresor tumoral PTEN (Andrés-Pons *et al.*, 2007; Gil *et al.*, 2015; Rodríguez-Escudero *et al.*, 2011) y para la búsqueda de inhibidores de p110 $\alpha$  (Fernández-Acero *et al.*, 2012) sobre la base de que la toxicidad causada por la sobre-expresión heteróloga en la levadura de formas hiperactivas de p110 $\alpha$  puede ser revertida mediante la expresión de PTEN silvestre o mediante compuestos inhibidores de la actividad quinasa de la PI3K (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005). La expresión en la levadura de las subunidades catalíticas de la PI3K de clase IA p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  fusionadas artificialmente a una señal C-terminal de prenilación (p110 $\alpha$ -CAAX y p110 $\beta$ -CAAX) causa inhibición del crecimiento, más acusada en el caso de p110 $\alpha$ -CAAX (Andrés-Pons *et al.*, 2007). La menor actividad de p110 $\beta$  en la levadura, con respecto a p110 $\alpha$ , concuerda con resultados obtenidos en mamíferos (Beeton *et al.*, 2000; Funaki *et al.*, 1999). Por otro lado, aunque p110 $\delta$ , Myr-p110 $\delta$  y Myr-p110 $\gamma$  activan la señalización de AKT en mamíferos (Denley *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2006), en la levadura no detectamos actividad de p110 $\delta$  ni de p110 $\gamma$ , incluso expresando sus formas prenilables. La detección de la expresión de p110 $\delta$  por inmunoblot fue difícil, ya sea por bajos niveles de expresión o por falta de estabilidad, y la co-expresión con subunidades reguladoras –que estabilizan a las subunidades catalíticas en mamíferos (Jaiswal *et al.*, 2009) –tampoco permitió observar actividad de p110 $\delta$  o p110 $\gamma$ .

Mediante el análisis de delecciones observamos que el dominio ABD de p110, responsable de la interacción con la subunidad reguladora, es prescindible para la

actividad intrínseca de las subunidades catalíticas p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  en la levadura, ya que formas truncadas que carecen de este dominio mantienen la capacidad de inhibir su crecimiento. En el caso de p110 $\alpha$ -CAAX, la delección del dominio ABD produce una ligera pérdida de actividad. Esto podría ser debido a que la truncación desestabiliza la estructura de la proteína expresada en levadura, al igual que ocurre en mamíferos (Zhao *et al.*, 2005). Por el contrario, la forma truncada prenilada de p110 $\beta$  resulta más activa que la forma silvestre prenilada. Este aumento de actividad podría ser debido a la pérdida de la interacción inhibitoria entre los dominios ABD y quinasa. Al verificarse en ausencia de la subunidad reguladora, nuestros datos en el sistema heterólogo parecen descartar la posibilidad de que este fenómeno sea debido exclusivamente a la pérdida del efecto inhibitorio de p85 $\alpha$ , como se sugirió en experimentos en mamíferos (Zhao *et al.*, 2005; Zhao y Vogt, 2008b).

La mutación K227E, localizada en el dominio RBD de p110 $\alpha$ , impide la interacción con RAS en las células de mamíferos (Rodríguez-Viciano *et al.*, 1996), pero no compromete la inhibición del crecimiento de la levadura por p110 $\alpha$ -CAAX. Esto sugiere que la actividad de p110 $\alpha$  en la levadura no requiere la interacción con las proteínas de levadura Ras1 y Ras2, ortólogas de RAS de mamíferos. En células de mamíferos el mutante K227E presenta actividad catalítica basal *in vitro* (Gupta *et al.*, 2007; Rodríguez-Viciano *et al.*, 1996), lo que concuerda con que en la levadura la presencia de esta mutación no afecte a la actividad de p110 $\alpha$ . No obstante, está descrito que una activación óptima de p110 $\alpha$  en mamíferos requiere de la interacción con p85 $\alpha$ , unido a tirosinas fosforiladas, y con RAS (Jiménez *et al.*, 2002; Rodríguez-Viciano *et al.*, 1994; Rodríguez-Viciano *et al.*, 1996). En la levadura, observamos que el alelo constitutivamente activo K-RAS G12V ejerce un efecto activador moderado sobre p110 $\alpha$ , lo que también concuerda con el efecto activador moderado que ejerce RAS sobre p110 $\alpha$  *in vitro* (Rodríguez-Viciano *et al.*, 1997; Rodríguez-Viciano *et al.*, 1996). No obstante, aún existe controversia sobre como RAS ejerce su efecto activador sobre p110 $\alpha$ , si induciendo en ella un cambio conformacional, reclutándola a la membrana o mediante ambos mecanismos

(Castellano y Downward, 2011; Denley *et al.*, 2008; Pacold *et al.*, 2000). Por otro lado, K-RAS G12V no ejerce ninguna potenciación del efecto de p110 $\beta$ -CAAX sobre el crecimiento de la levadura, lo que está de acuerdo con datos obtenidos en mamíferos que demuestran que p110 $\beta$  no está regulado por RAS sino por las Rho GTPasas Rac1 y Cdc42 (Fritsch *et al.*, 2013; Rodríguez-Viciano *et al.*, 2004). Por último, la co-expresión de K-RAS G12V con un mutante carente de diversos residuos básicos en el dominio C2 de p110 $\alpha$  no mostró inhibición del crecimiento como en el caso de p110 $\alpha$ , lo que indica que el efecto activador que ejerce K-RAS sobre p110 $\alpha$  se encuentra subordinado a una previa interacción de p110 $\alpha$  con la membrana plasmática a través de su dominio C2.

## **2. La modulación de las subunidades catalíticas por las subunidades reguladoras de la PI3K de clase IA es reproducible en *S. cerevisiae***

Se ha postulado que p65 $\alpha$ , la forma oncogénica truncada de p85 $\alpha$ , ejerce un efecto activador sobre p110 $\alpha$  debido a la pérdida de la interacción inhibidora entre los dominios iSH2 y C2 (Jiménez *et al.*, 1998; Shekar *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Posiblemente el efecto activador de p65 $\alpha$  y p65 $\beta$  sobre p110 $\beta$ -CAAX que observamos en la levadura podría reflejar este mismo fenómeno. También a este efecto activador podría contribuir la pérdida de la interacción inhibidora entre el dominio quinasa de p110 $\beta$  y el dominio cSH2 de p65 $\alpha$  y p65 $\beta$ , ya que estas formas truncadas carecen de dicho dominio (Burke y Williams, 2013; Zhang *et al.*, 2011). El mutante p85 $\alpha$  N564D –que pierde la interacción iSH2-C2 (Jaiswal *et al.*, 2009) pero posee el dominio cSH2 intacto– muestra unos niveles de activación de p110 $\beta$ -CAAX similares a los observados con p65 $\alpha$ , lo que apoya la hipótesis de que el efecto activador de p65 $\alpha$  se deba a la pérdida de la interacción iSH2-C2 (**Figura 36**). Debe considerarse asimismo que las versiones silvestres de p85 no son capaces de inhibir a p110 $\beta$ -CAAX en la levadura, y que la localización en la membrana de p85 $\alpha$  mediante prenilación tampoco es suficiente para inhibirla completamente. Ello induce a pensar que los efectos activadores no pueden explicarse exclusivamente por la eliminación de interacciones inhibidoras.

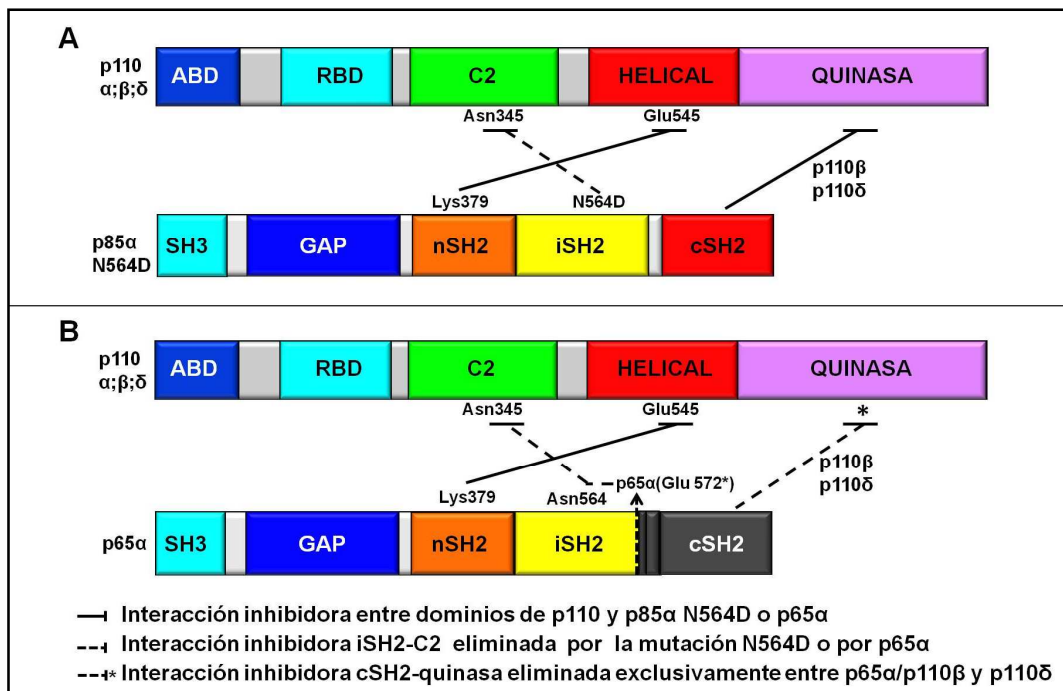
### **3. La prenilación de p85 $\alpha$ y p65 $\alpha$ en la levadura mimetiza la modulación de la actividad de p110**

Mediante la adición de una señal de prenilación a p65 $\alpha$  somos capaces de reproducir en la levadura el efecto activador de p65 $\alpha$  sobre p110 $\alpha$  descrito en mamíferos (Jiménez *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 1998). Este efecto activador de p65 $\alpha$ -CAAX en la levadura parece ser mediado por: (i) el reclutamiento de p110 $\alpha$  a la membrana, ya que la forma no prenilable de p65 $\alpha$  no ejerce este efecto activador; (ii) la eliminación de la interacción inhibidora iSH2-C2, ya que tanto p85 $\alpha$ -CAAX como p85 $\alpha$  inhiben a Myr-p110 $\alpha$ . Mediante la expresión ectópica en mamíferos, Chan *et al.* (2002) también mostraron que p65 $\alpha$ , pero no p85 $\alpha$ , era capaz de activar a p110 $\alpha$ , aunque en dicho contexto no observaron diferencias entre las formas dirigidas a la membrana mediante miristoilación y las formas solubles.

La inhibición de crecimiento causada por la hiperactivación de p110 $\alpha$  en presencia de p65 $\alpha$ -CAAX es dependiente de la actividad catalítica de lípidos de p110 $\alpha$  y es revertida por la co-expresión de PTEN silvestre, pero no por PTEN catalíticamente inactivo. Además, nuestros resultados muestran que p65 $\alpha$ -CAAX es capaz de potenciar la activación de todas las p110 de clase IA silvestres y preniladas, pero no las de clase IB. Esto es debido a que p65 $\alpha$ -CAAX interacciona directamente con p110 a través del dominio ABD, mientras que p110 $\gamma$  carece de este dominio (Krugmann *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 1999); asimismo esta interacción es imprescindible para observar el efecto activador de p65 $\alpha$  prenilado sobre p110 $\alpha$  en la levadura, lo que concuerda con los datos de mamíferos en donde se describió la interacción entre los dominios ABD de p110 de clase IA y el iSH2 de p85 $\alpha$ , que estabiliza el heterodímero (Huang *et al.*, 2007; Miled *et al.*, 2007).

Para explicar el efecto activador que ejerce p65 $\alpha$ -CAAX sobre las p110 de clase IA en levadura, nos basamos en el reclutamiento a la membrana de la mismas y en que la interacción inhibidora iSH2-C2 está conservada en las tres p110 de clase IA

(Amzel *et al.*, 2008; Dbouk *et al.*, 2010), lo que se corrobora con el efecto activador del mutante p85 $\alpha$  N564D (en el cual se elimina la interacción iSH2-C2) sobre p110 $\alpha$  (Jaiswal *et al.*, 2009), p110 $\beta$  (Zhang *et al.*, 2011) y p110 $\delta$  (Burke *et al.*, 2011). En el caso de p110 $\beta$  y p110 $\delta$ , también debe de contribuir al efecto activador el hecho que p65 $\alpha$ -CAAX carezca del dominio cSH2 ya que mediante el mismo se establecía una interacción inhibitora con el dominio quinasa de p110 (Burke *et al.*, 2011; Burke y Williams, 2013) (**Figura 36**). Asimismo, reforzando esta última idea, observamos que p85 $\alpha$ -CAAX (que contenía el dominio cSH2) era capaz de inhibir, aunque levemente, a p110 $\beta$ -CAAX.



**Figura 36: Representación de las interacciones regulatoras entre las p110 de clase IA y p85 $\alpha$  N564D o p65 $\alpha$ .** Interacciones entre los heterodímeros formados por p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  o p110 $\delta$  con p85 $\alpha$  N564D (**A**) y con p65 $\alpha$  (**B**).

La expresión de p65 $\alpha$ -CAAX, además de activar a p110 $\alpha$  por la eliminación de la interacción inhibitora iSH-C2 y a través de su reclutamiento a la membrana, requiere la integridad de un grupo de residuos básicos del dominio C2 de unión a

la membrana de p110 $\alpha$ . Sin embargo la interacción de p110 $\alpha$  con Ras de levadura es dispensable para dicho efecto activador, puesto que un mutante de p110 en el que esta interacción se pierde sigue respondiendo a p65 $\alpha$ -CAAX (**Figura 37 A**).

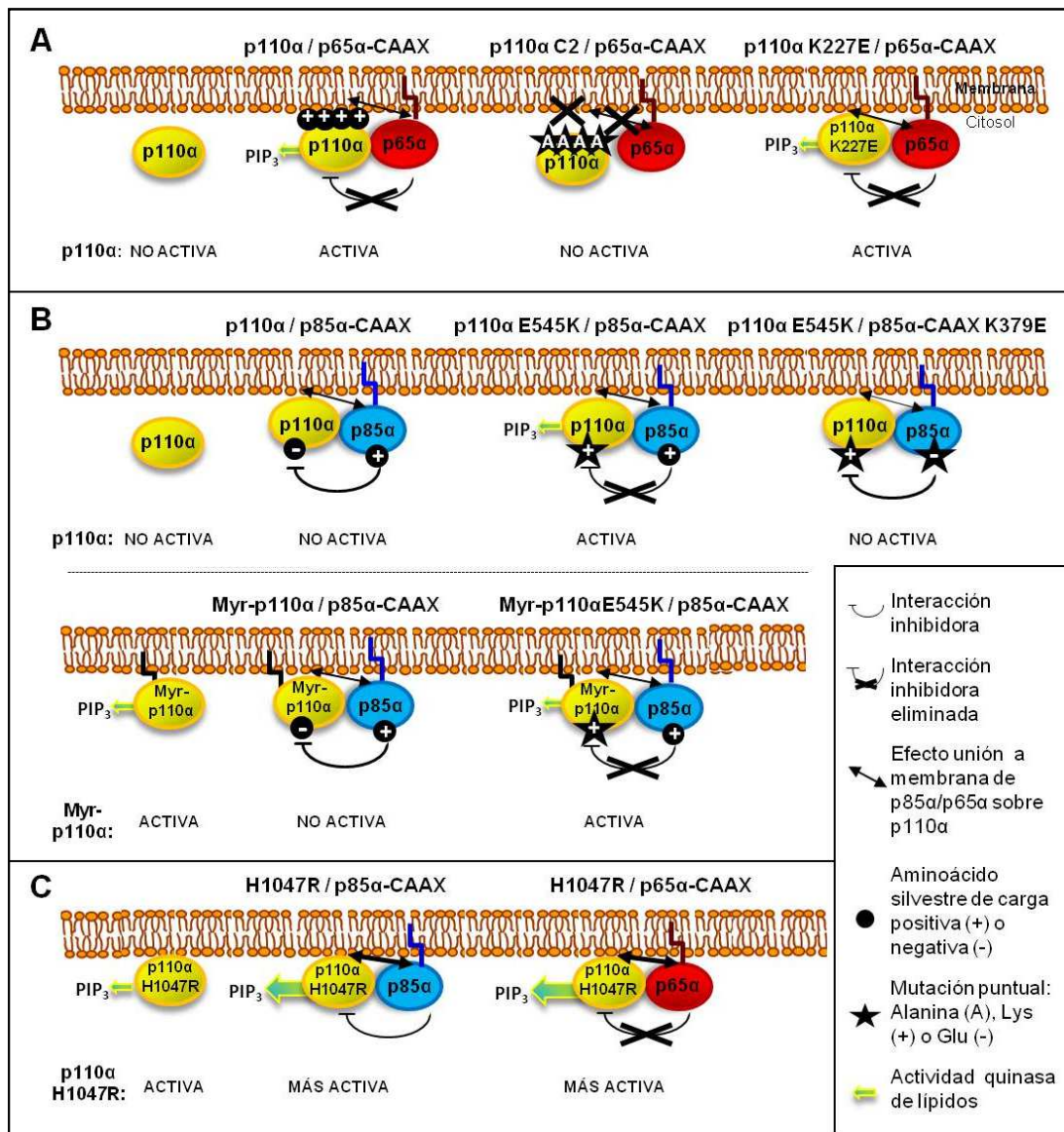
En nuestros experimentos observamos que p85 $\alpha$ -CAAX activa a p110 $\alpha$  E545K mientras que p85 $\alpha$  no. Este resultado se puede explicar postulando que p85 $\alpha$  prenilado mimetiza el reclutamiento a la membrana necesario para la activación de p110 $\alpha$ , función que en mamíferos se atribuye a las fosfotirosinas de los RTKs activados y en parte a RAS. En el caso de la levadura aunque Ras está presente, su interacción con p110 es prescindible. Además, el hecho de que p85 $\alpha$ -CAAX active a p110 $\alpha$  E545K, pero no a la versión silvestre de p110 $\alpha$ , nos indica que el efecto activador también se debe a la eliminación de la interacción inhibidora entre el dominio helical de p110 $\alpha$  con el dominio nSH2 de p85 $\alpha$ , debido a la mutación E545K (Huang *et al.*, 2007; Miled *et al.*, 2007). La expresión de la combinación p85 $\alpha$ -CAAX y el mutante p110 $\alpha$  E545K muestra el mismo fenotipo de inhibición de crecimiento de la levadura (activación de la actividad quinasa) que el mutante Myr-p110 $\alpha$  E545K expresado en ausencia de la subunidad reguladora. Este último dato coincide con los experimentos en células de mamíferos de Myr-p110 $\alpha$  E545K, el cual presentaba mayor activación de AKT en comparación con p110 $\alpha$  E545K no miristoilado (Liu y Roberts, 2006). También corroboramos que nuestro sistema reproduce la regulación negativa que ejerce p85 $\alpha$  sobre p110 $\alpha$  cuando ambas proteínas se localizan artificialmente en la membrana y la interacción entre la Lys379 (dominio nSH2) y el Glu545 (dominio C2) esté intacta. Esto queda patente en la observación de que p85 $\alpha$ -CAAX es capaz de restaurar el crecimiento (inhibir la actividad) de células expresando Myr-p110 $\alpha$ , pero no en el caso de Myr-p110 $\alpha$  E545K. Además, p85 $\alpha$ -CAAX K379E restaura el crecimiento de Myr-p110 $\alpha$  E545K mediante el restablecimiento de la interacción inhibidora, ya que el Glu de carga negativa en la posición 379 de p85 $\alpha$ -CAAX interacciona con la Lys545 de carga positiva de Myr-p110 $\alpha$  concordando con los resultados de este mutante de p85 $\alpha$  obtenidos por Miled *et al.* (2007) (**Figura 37 B**). Por otro lado, el efecto activador que observamos de p65 $\alpha$ -CAAX sobre p110 $\alpha$  en la levadura es independiente de



la mutación E545K en el dominio helical.

El hecho que el mutante p110 $\alpha$  H1047R presente actividad moderada *per se* en la levadura nos sugiere que esta mutación incrementa la unión con la membrana plasmática, ya que en este sistema resulta imprescindible la localización de p110 en la membrana para que presente actividad. Esto concuerda con la hipótesis de que esta mutación incrementa la interacción directa con la membrana mimetizando la función de RAS (Burke *et al.*, 2012; Hon *et al.*, 2012; Mandelker *et al.*, 2009) y que posee actividad en ausencia de receptores RTKs activados (Hon *et al.*, 2012). Por otra parte, en nuestros experimentos, tanto en ausencia como en presencia de p85 $\alpha$ , vemos el mismo grado de activación de este mutante. Por tanto, en la levadura este mutante ni requiere de la interacción con p85 $\alpha$ , ni es sensible al efecto inhibitor de p85 $\alpha$ , al contrario de lo que se observa en mamíferos (Hon *et al.*, 2012; Zhao y Vogt, 2008b; 2010). Sin embargo, en presencia de p85 $\alpha$  prenilado sí se observaba un incremento de la actividad de p110 $\alpha$  H1047R. Esto parece indicar que p110 $\alpha$  H1047R es insensible a la inhibición que ejerce p85 $\alpha$  sobre p110 $\alpha$  y que por tanto predomina el efecto activador ejercido por su reclutamiento a la membrana. De hecho, en células de mamíferos el mutante Myr-p110 $\alpha$  H1047R muestra una mayor activación de AKT en comparación con p110 $\alpha$  H1047R (Liu y Roberts, 2006). En resumen, la actividad de esta mutación, una vez situada en la membrana a través de p85 $\alpha$ -CAAX, prevalece sobre el posible efecto inhibitor que pueda ejercer p85 $\alpha$ , bien por hallarse en una conformación insensible a este tipo de regulación o bien porque el efecto de reclutamiento a la membrana de una quinasa más activa prevalece sobre el posible efecto de modulación negativa (**Figura 37 C**).

Finalmente observamos que el efecto activador de p65 $\alpha$ -CAAX es independiente de la mutación H1047R. Posiblemente p65 $\alpha$ -CAAX hiperactiva a p110 $\alpha$  H1047R reforzando su capacidad intrínseca de unión a la membrana, ya que con p65 $\alpha$  no se observaba dicho efecto activador (**Figura 37 C**).



**Figura 37: Influencia de las interacciones p110α/p85α en la actividad PI3K observada mediante la co-expresión de versiones mutantes en la levadura. A.** p65α-CAAX activa a p110α silvestre por la eliminación de la interacción inhibidora iSH2-C2 y a través de su reclutamiento a la membrana mediante aminoácidos del dominio C2. La mutación K227E que impide la interacción con RAS no influye en el efecto activador que ejerce p65α-CAAX sobre p110α. **B.** El efecto inhibitor que ejerce p85α-CAAX sobre p110α es más potente que su efecto activador de reclutamiento a la membrana. El efecto activador de reclutamiento de p110α a la membrana se observa mediante la eliminación de la interacción inhibidora a través del mutante p110α E545K. Dicha interacción queda restablecida mediante la introducción simultánea de la mutación K379E en p85α-CAAX. Myr-p110α se une a la membrana, por tanto, solo se observa el efecto inhibitor que ejerce p85α sobre ella, mientras que si eliminamos dicho efecto inhibitor mediante la mutación E545K, Myr-p110α vuelve a ser activa. **C.** La actividad que presenta p110α H1047R (se une por sí sola a la membrana) se ve incrementada a través del efecto activador de reclutamiento a la membrana de p85α-CAAX, y dicho efecto es más potente que su efecto inhibitor. p65α-CAAX hiperactiva a p110α H1047R reclutándola a la membrana en ausencia de la interacción inhibitor (iSH2-C2).

#### 4. Distintas mutaciones de p85 $\alpha$ halladas en tumores humanos muestran diferentes mecanismos de activación de p110

El análisis funcional de PI3K en la levadura, como ya hemos demostrado, es útil para el estudio del efecto inhibitor y activador de la subunidad reguladora p85 $\alpha$  silvestre y truncada respectivamente, sobre la subunidad catalítica p110. Hemos empleado este sistema para el estudio de la actividad de mutantes de p85 $\alpha$  hallados en tumores humanos, dentro de un contexto celular.

En función del efecto que ejercen sobre p110 $\alpha$  y Myr-p110 $\alpha$  las mutaciones oncogénicas de p85 $\alpha$ , podrían agruparse en tres categorías (**Tabla 6**):

**1/ Mutaciones que se comportan como p85 $\alpha$ -CAAX silvestre** (no ejercen ningún efecto sobre p110 $\alpha$  mientras que inhiben la actividad de Myr-p110 $\alpha$ ):

El mecanismo que utilizan estas mutaciones para actuar presuntamente en cáncer podría no estar relacionado con un incremento de la actividad de p110 $\alpha$ . Este comportamiento lo presentan tanto mutaciones en los dominios SH3 y GAP como en los dominios iSH2 y cSH2. Las mutaciones D13V (dominio SH3) y N260S (dominio GAP) no han sido previamente estudiadas en mamíferos. Posiblemente su mecanismo oncogénico pudiera ser a través de la desregulación de PTEN ya que estos dominios interactúan con esta proteína (Chagpar *et al.*, 2010). En el caso de la mutación del dominio GAP, puede que también participe en la desregulación de la degradación del receptor a través de Rab5, debido a que este dominio participa con la interacción con Rab5 (Chamberlain *et al.*, 2004).

Los aminoácidos Lys459 y Arg574 en el dominio iSH2 aparecen frecuentemente mutados en tumores (Parsons *et al.*, 2008). En la levadura no detectamos una activación de p110 $\alpha$  por la mutación  $\Delta$ K459. Esta observación no concuerda ni con los datos de activación de AKT en mamíferos debida a este mutante (Urlick *et al.* 2011), ni refuerza las hipótesis postuladas para este mutante basadas en que se altera la interacción entre los dominios iSH2-ABD (Miled *et al.*, 2007) y/o la unión

con la membrana (Huang *et al.*, 2007). Es posible que el supuesto mecanismo que emplea esta mutación no se pueda reproducir en nuestro sistema, debido a que implique a otras proteínas de mamíferos que están ausentes en la levadura. Por lo que respecta a la mutación R574T, basándonos en su posible interacción con p110 $\alpha$  (Jaiswal *et al.*, 2009) y en su localización en las proximidades del aminoácido Asn564, inicialmente especulamos que podría activar a p110 $\alpha$  mediante la desestabilización de la zona de contacto entre Asn564 (iSH2) y Asn345 (C2) como en el caso de la mutación N564D. Sin embargo, no se detectó ningún incremento de actividad de p110 $\alpha$  combinada con dicho mutante. Por tanto, este mutante parece ejercer su supuesta función oncogénica independientemente de la actividad de p110 $\alpha$ . A partir de estos dos últimos resultados, se puede inferir que quizás no todas las mutaciones descritas en clínica localizadas en el dominio iSH2 ejercen su mecanismo oncogénico a través de la eliminación del contacto inhibitor iSH2-C2. El dominio iSH2 podría desempeñar otro papel importante para la modulación de p110 $\alpha$  o bien contribuir a la oncogénesis mediante mecanismos independientes de ésta.

Esta descrito que el mutante p85 $\alpha$  E666K (dominio cSH2) mantiene la interacción con p110 $\alpha$  (Jaiswal *et al.*, 2009). Sin embargo, no potencia la actividad de p110 $\alpha$  en nuestro sistema, por lo que la supuesta acción oncogénica de este mutante también podría ser independiente de la activación de p110 $\alpha$ .

**2/ Mutaciones que se comportan como p65 $\alpha$ -CAAX hiperactivo** (activan a p110 $\alpha$  mientras que no presentan ningún efecto aditivo sobre Myr-p110 $\alpha$ ):

El mecanismo mediante el cual estas mutaciones actúan en cáncer está relacionado con un incremento de la actividad de p110 $\alpha$  a causa de la eliminación de interacciones inhibitoras. En levadura, como hemos comentado, se reproduce el mecanismo de activación descrito para mamíferos ya que detectamos:

**i/** la eliminación de la interacción inhibitora entre los dominios nSH2 y helical, lo que se deduce del comportamiento de la mutación K379E (nSH2).

ii/ la eliminación de la interacción inhibidora entre los dominios iSH2 y C2, según los resultados observados con la mutación N564D (iSH2). La inhibición de crecimiento que ocurre por la co-expresión de p110 $\alpha$  con la mutación N564D es similar a la observada con p65 $\alpha$  (truncación poco después del aminoácido 572).

**3/ Mutaciones que se comportan de manera divergente a p65 $\alpha$ -CAAX** (activan a p110 $\alpha$  e inhiben la actividad de Myr-p110 $\alpha$ ):

Los aminoácidos Gly376, Asp560 y Asn564 están conservados en las diferentes subunidades reguladoras de clase IA y aparecen frecuentemente mutados en tumores (Jiménez *et al.*, 1998; Jucker *et al.*, 2002; Parsons *et al.*, 2008; Philp *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2007). Postulamos que las mutaciones G376R y D560Y activan a p110 $\alpha$  por un mecanismo distinto a la eliminación de las interacciones con efecto inhibidor, ya que mantienen la capacidad inhibidora de p85 $\alpha$  sobre Myr-p110 $\alpha$ . Para el caso de la mutación G376R (nSH2), hipotetizamos que su efecto activador sobre p110 $\alpha$  también observado en mamíferos (Sun *et al.*, 2010), lo ejerce favoreciendo el reclutamiento de p110 $\alpha$  a la membrana. Posiblemente el cambio de una Gly a una Arg, que es un aminoácido cargado positivamente, pueda aumentar la superficie de interacción de p85 $\alpha$  con las cabezas polares de los lípidos de la membrana, facilitando posteriormente la función de unión de p110 $\alpha$  a la membrana. No hay estudios publicados que apoyen esta hipótesis, ya que las propuestas para su efecto activador observado en mamíferos se basan en que el cambio a Arg reduce la zona de contacto inhibidor con el dominio helical (Sun *et al.*, 2010; Vogt *et al.*, 2010) y/o con el dominio C2 (Gabelli *et al.*, 2010; Mandelker *et al.*, 2009; Ross *et al.*, 2013). Ninguna de estas hipótesis encajan en nuestro modelo, debido a que este mutante inhibe la actividad de las p110 que se localizan en la membrana (Myr-p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ -CAAX) siendo nuestro sistema sensible al efecto de la eliminación de la superficie de contacto nSH2-helical, como se observa con el mutante K379E.

En mamíferos se ha descrito que la mutación D560Y activa a p110 $\alpha$  eliminando la interacción inhibidora con el Asn345 del dominio C2 (Huang *et al.*, 2007). Aunque

el efecto activador del mutante D560Y sobre p110 $\alpha$  silvestre se reproduce en la levadura, este mutante mantiene la capacidad inhibidora sobre Myr-p110 $\alpha$ . Hipotetizamos un mecanismo alternativo, basándonos en la función de unión a membrana descrita para el dominio iSH2. El cambio de un aminoácido polar y cargado negativamente, como es el Asp, por un aminoácido aromático y por tanto más voluminoso como es la Tyr, puede influir en las propiedades electrostáticas y/o posición de los aminoácidos contiguos implicados en la unión a membrana (aminoácidos 447 al 544) favoreciendo dicha unión (Huang *et al.*, 2008). Por otra parte, al modificar la interacción con el Asn345 del dominio C2 podría provocar un cambio conformacional que incrementara su unión a la membrana.

Las mutaciones oncogénicas analizadas en p85 $\alpha$  silvestre también se pueden agrupar dentro de las dos primeras categorías atendiendo al efecto que ejercen sobre p110 $\beta$ -CAAX (Tabla 6).

	Categoría 1	Categoría 2	Categoría 3
p85 $\alpha$ -CAAX	D13V N260S $\Delta$ K459 R574T E666K	p65 $\alpha$ K379E N564D	G376R D560Y
p85 $\alpha$	D548G Y463* R301*	p65 $\alpha$ N564D	

**Tabla 6: Clasificación de las mutaciones en p85 $\alpha$  y p85 $\alpha$ -CAAX en función del efecto que ejercen sobre p110.** Categoría 1: mutaciones que se comportan como p85 $\alpha$  (no activan a p110); categoría 2: mutaciones que se comportan como p65 $\alpha$  (activan a p110 mediante la eliminación de interacciones inhibidoras); categoría 3: mutaciones con un comportamiento divergente al de p65 $\alpha$  (activan a p110 $\alpha$  a través de su reclutamiento a la membrana).

## 5. La sobre-expresión de p65 $\alpha$ en células de mamíferos altera la regulación del tráfico vesicular

Como complemento a los estudios en el modelo heterólogo, estudiamos la sobreproducción en células de mamíferos de las subunidades reguladoras de las

PI3K de clase I. En condiciones de sobre-expresión en células COS-7, p85 $\alpha$  fusionado al epítipo HA en posición N-terminal presentó una localización predominantemente citoplasmática, concentrándose en compartimentos perinucleares, de acuerdo con lo descrito para p85 $\alpha$  tanto endógeno como sobre-expresado con otros epítopos en posición N-terminal y utilizando otros modelos celulares (Cariaga-Martínez *et al.*, 2014; Chan *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 1998; Ko *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2005). En las mismas condiciones que p85 $\alpha$  estudiamos el resto de las subunidades reguladoras. Las isoformas p55 $\alpha$  y p50 $\alpha$  presentaron una localización mayoritariamente núcleo-citoplásmica, lo cual no concuerda con lo publicado por Luo *et al.* (2005), quienes no observaron una localización nuclear. Esto puede deberse a los diferentes epítopos y líneas celulares empleados en ambos laboratorios. La sobre-expresión de p85 $\beta$  mostró predominantemente un patrón relativamente uniforme en núcleo y citoplasma, como el observado en otro tipo de células por Kumar *et al.* (2011), sin embargo esto puede ser consecuencia de la sobre-expresión, puesto que a niveles fisiológicos de expresión su localización es nuclear (Cariaga-Martínez *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2011). Es probable que la región C-terminal de p85 $\beta$  eliminada en p65 $\beta$  participe en la localización nuclear de p85 $\beta$ , ya que p65 $\beta$  presentó una localización más desplazada hacia el citoplasma que p85 $\beta$ . La localización de p55 $\gamma$  también núcleo-citoplásmica, concuerda con lo observado con la sobre-expresión de esta proteína con otro epítipo N-terminal y en otro sistema celular (Xia *et al.*, 2003). Por último, se ha descrito que p101 sobre-expresada presenta una localización nuclear mientras que si es co-expresada con p110 $\gamma$  se transloca al citosol (Brock *et al.*, 2003; Voigt *et al.*, 2005). En nuestros experimentos p101 también presenta localización nuclear (20%) y citosólica (30%), pero domina la localización núcleo-citoplasmática.

La versión truncada de p85 $\alpha$ , p65 $\alpha$ , se concentró principalmente en la periferia de grandes estructuras de aspecto vesicular. A este respecto, Jiménez *et al.* (1998), mediante experimentos de fraccionamiento subcelular, mostraron que p65 $\alpha$ , pero no p85 $\alpha$ , se localizaba en la fracción enriquecida en membranas. Nuestros

resultados indican que la localización tipo vesicular de p65 $\alpha$  es una característica propia de este tipo de mutación en p85 $\alpha$  y que no está directamente relacionada con la ganancia de función oncogénica a través de la activación de p110 $\alpha$ , sino con otras funciones independientes.

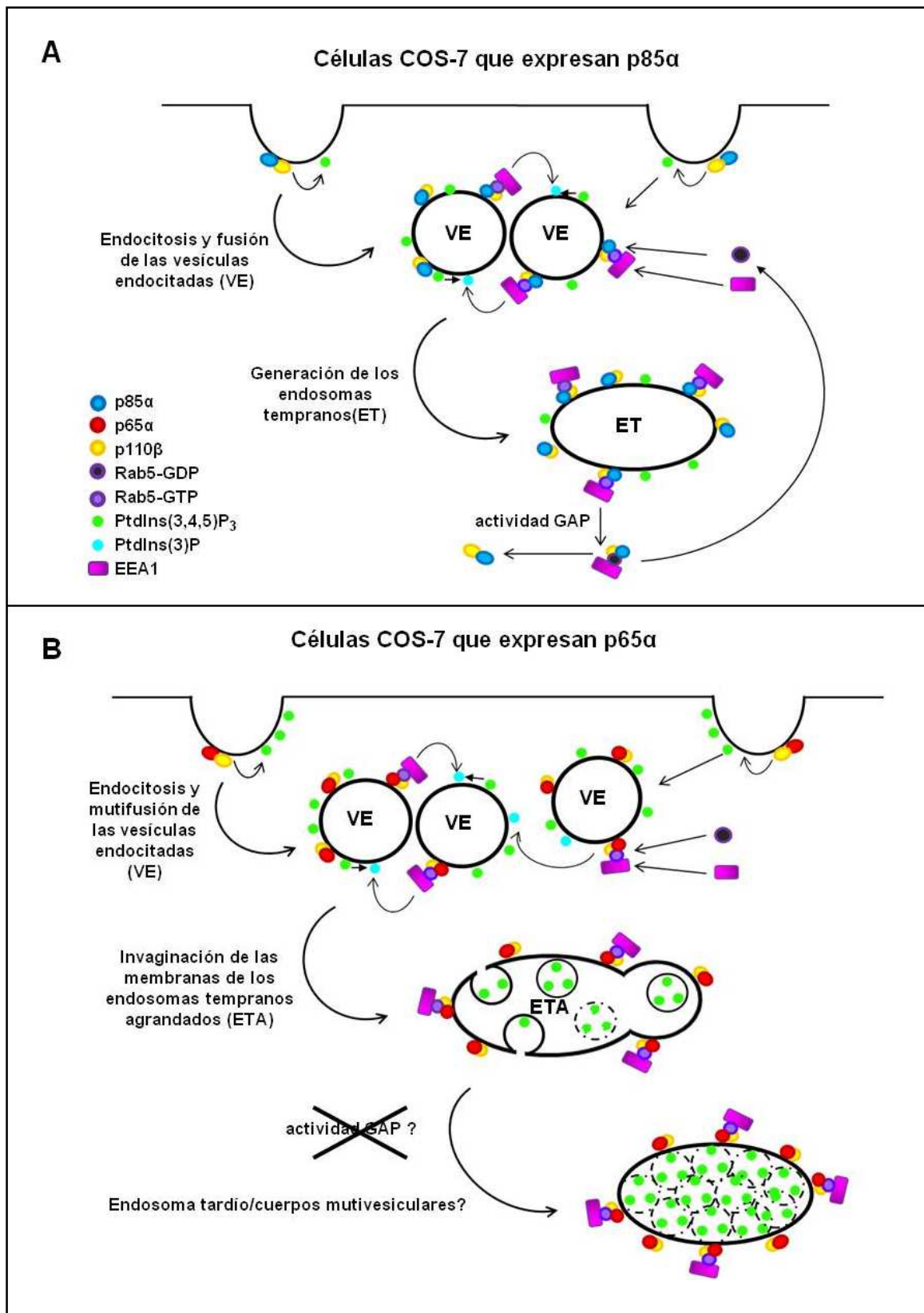
Para poder discernir la localización de p65 $\alpha$  con precisión analizamos su localización mediante microscopía confocal, lo que confirmó que HA-p65 $\alpha$  se concentraba alrededor de unos compartimentos intracelulares esféricos con aspecto vesicular de diferentes tamaños y de aspecto similar a los endosomas tempranos anormalmente grandes inducidos por el mutante constitutivamente activo de Rab5 (Rab5 Q79L) (Barbieri *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2005; Stenmark *et al.*, 1994; Volpicelli *et al.*, 2001). Por ello, nos inclinamos a pensar que la sobre-expresión de p65 $\alpha$  inducía la formación de endosomas tempranos, en cuya membrana se acumula. La co-localización parcial de p65 $\alpha$  con los marcadores de endosomas tempranos, Rab5 y EEA1 parece avalar esta hipótesis. Está descrito que p85 $\alpha$ , al interactuar con p110 $\beta$ , modifica su conformación e incrementa su afinidad por Rab5 formándose el complejo trimérico Rab5-GTP/p110 $\beta$ /p85 $\alpha$  (Christoforidis *et al.*, 1999; Dou *et al.*, 2013; Kurosu y Katada, 2001; Shin *et al.*, 2005). Sin embargo, no está descrito el dominio de p85 $\alpha$  a través del cual interacciona con Rab5, aunque sí se ha descartado que sea el dominio GAP (Chamberlain *et al.*, 2004). En tal caso, la interacción entre p85 $\alpha$  y Rab5 podría tener lugar por la región C-terminal de p85 $\alpha$ , no presente en p65 $\alpha$ , o que esta región sea imprescindible para la adquisición de la conformación óptima inducida por la interacción con p110 $\beta$ . Por tanto, inicialmente postulamos que p65 $\alpha$  genera endosomas anormalmente grandes debido a que no puede ejercer su actividad GAP hacia Rab5 al no poder interactuar directamente con él, permaneciendo Rab5 constitutivamente activo. Esta situación provocaría un aumento de los procesos de fusión de los endosomas y podría ser el mecanismo mediante el cual estos endosomas aumentan su tamaño.

En presencia de wortmanina, un inhibidor de la PI3K, observamos una disminución de la cantidad de los endosomas agrandados donde se localiza p65 $\alpha$ . Este



resultado sugiere que p65 $\alpha$ , mediante la hiperactivación de la actividad catalítica endógena de p110, contribuye a la formación de este tipo de estructuras. Esto nos llevó a estudiar, en condiciones de sobre-expresión de p65 $\alpha$ , la localización del PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> mediante la sonda Akt1(PH)-GFP, y observamos que dicha sonda se concentra exclusivamente en el lumen de estos compartimentos. Esta localización sugiere que las membranas ricas en PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> generado por la actividad de la PI3K son rápidamente procesadas por la ruta endocítica en estas células, degradándose de manera muy eficaz las proteínas de unión a PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> y arrastrando consigo al marcador GFP. Este proceso debería implicar la invaginación de la membrana de los endosomas generando posiblemente cuerpos multivesiculares en el interior. Por otro lado, el PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> también puede ser eliminado de la superficie de los endosomas mediante su desfosforilación a PtdIns(3)P, a través del reclutamiento secuencial de dos efectores de Rab5, las PtdIns 4- y 5-fosfatasas (Shin *et al.*, 2005). En tal caso, incrementaría el PtdIns(3)P susceptible de participar en el proceso de fusión de los endosomas, ya que es necesario que este fosfoinosítido se una a EEA1, que a su vez interaccionará con Rab5-GTP para que se inicie dicho proceso (**Figura 38**). Sería interesante profundizar más en la naturaleza de estos compartimentos determinando si también poseen marcadores de endosomas tardíos/cuerpos multivesiculares.

Con todos estos datos, postulamos un modelo en el que la sobreproducción de p65 $\alpha$  está implicada en la formación de vacuolas anormalmente grandes con características de compartimentos endosomales a través de dos mecanismos diferentes. Uno de forma independiente a p110, mediante la activación constitutiva de Rab5, y otro dependiente de la actividad catalítica de p110, mediante el aumento de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> como precursor de PtdIns(3)P. Un mayor tamaño de los endosomas refleja una actividad endocítica exacerbada, lo que debería incrementar el número de receptores que entran en la ruta endocítica, pudiendo desencadenar posibles alteraciones en la ruta AKT.



---

**Figura 38: Modelo propuesto de la regulación del tráfico vesicular mediante la expresión de p85α y de p65α.** **A.** En las células COS-7 que sobre-expresan p85α, se endocita la membrana plasmática que contiene al heterodímero p85α/p110 activo. A estas vesículas endocíticas se les une Rab5-GDP que se activa a Rab5-GTP. Rab5 activa se une a EEA1 que a su vez formará un puente de unión con otra vesícula que tenga en su membrana PtdIns(3)P. Una de las posibles vías de generación de los PtdIns(3)P es a partir de la desfosforilación de los PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> generados previamente por el heterodímero p85α/p110 activo. p85α ejerce su actividad GAP sobre Rab5-GTP, el cual pasa a estado inactivo y se libera de la membrana endosomal y de las proteínas del complejo p85α/p110/Rab5/EEA1. **B.** En las células que sobre-expresan p65α se observa un incremento de la producción de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> en ausencia de estímulo con respecto a p85α. Las regiones de la membrana plasmática enriquecidas con este fosfoinosítido son endocitadas. A estas vesículas endocitadas se les une Rab5-GDP que cambia a su estado activo. Rab5, una vez activa, se une a EEA1 que a su vez formará un puente de unión con otra vesícula que tenga en su membrana PtdIns(3)P. Posiblemente aumenten los eventos de fusión entre vesículas debido al incremento de este último fosfoinosítido en la membranas endosomales en presencia de grandes cantidades de uno de sus posibles precursores, el PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Hipotetizamos que p65α no ejerce su actividad GAP hacia Rab5-GTP, lo que causaría la acumulación de Rab5 activo, permaneciendo unido a p65α y EEA1, en las membranas endosomales. Por tanto, la sobre-expresión de p65α desencadenaría la hiperactivación de los procesos endocíticos dando lugar a la formación de grandes vacuolas en cuya superficie se acumularía.



# CONCLUSIONES



Las principales conclusiones derivadas del trabajo presentado en esta Tesis Doctoral son las siguientes:

1. Las subunidades catalíticas p110 $\gamma$  y p110 $\delta$  de mamíferos no son lo suficientemente activas *per se* para conferir toxicidad a la levadura *S. cerevisiae*, al contrario que las isoformas p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  preniladas (p110 $\alpha$ -CAAX, p110 $\beta$ -CAAX).
2. El dominio ABD de p110 es dispensable para su actividad quinasa de lípidos *in vivo* en el sistema heterólogo, mientras que la integridad de los residuos Lys410, Arg412, Lys413 y Lys416 del dominio C2 es necesaria.
3. p65 $\alpha$  y p65 $\beta$  activan a la subunidad catalítica p110 $\beta$  prenilada, mientras que p85 $\alpha$  inhibe la actividad de p110 $\alpha$  miristoilado en la levadura.
4. p65 $\alpha$ -CAAX activa a las isoformas de p110 de clase IA en la levadura, mientras que p85 $\alpha$ -CAAX inhibe a las p110 moderadamente activas.
5. El efecto activador de p65 $\alpha$ -CAAX sobre p110 $\alpha$  requiere la interacción con el dominio ABD, y es independiente de las mutaciones oncogénicas en los dominios helical y quinasa y de la interacción con RAS.
6. La interacción inhibitoria entre los dominios helical (p110 $\alpha$ )-nSH2 (p85 $\alpha$ ) se verifica en el modelo de levadura. Dicha interacción inhibitoria no contrarresta el efecto activador por reclutamiento a la membrana de p110 $\alpha$  H1047R.
7. La levadura *S. cerevisiae* es un modelo adecuado para monitorizar el efecto activador sobre p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  de algunas mutaciones en p85 $\alpha$  halladas en tumores humanos.

## CONCLUSIONES

---

8. p65 $\alpha$  sobre-expresado en células de mamíferos presenta una localización subcelular en la periferia de vacuolas anormalmente grandes con características de compartimentos endosomales, que difiere de la del resto de subunidades reguladoras de la PI3K de clase I. Además, p65 $\alpha$ , al contrario que p85 $\alpha$ , está implicada en la formación de este tipo de vacuolas.



# BIBLIOGRAFÍA



- Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B. y Cohen, P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Current Biology*, **7**:261-269
- Ali K, Bilancio A, Thomas M, Pearce W, Gilfillan AM, Tkaczyk C, Kuehn N, Gray A, Giddings J, Peskett E, Fox R, Bruce I, Walker C, Sawyer C, Okkenhaug K, Finan P y Vanhaesebroeck B (2004) Essential role for the p110delta phosphoinositide 3-kinase in the allergic response. *Nature* **431**:1007-1011.
- Altomare DA y Testa JR (2005) Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* **24**:7455-7464.
- Amzel LM, Huang CH, Mandelker D, Lengauer C, Gabelli SB y Vogelstein B (2008) Structural comparisons of class I phosphoinositide 3-kinases. *Nature reviews Cancer* **8**:665-669.
- An HJ, Cho NH, Yang HS, Kwak KB, Kim NK, Oh DY, Lee SW, Kim HO y Koh JJ (2007) Targeted RNA interference of phosphatidylinositol 3-kinase p110-beta induces apoptosis and proliferation arrest in endometrial carcinoma cells. *The Journal of pathology* **212**:161-169.
- Andrés-Pons A, Rodríguez-Escudero I, Gil A, Blanco A, Vega A, Molina M, Pulido R y Cid VJ (2007) In vivo functional analysis of the counterbalance of hyperactive phosphatidylinositol 3-kinase p110 catalytic oncoproteins by the tumor suppressor PTEN. *Cancer research* **67**:9731-9739.
- Angulo I, Vadas O, Garçon F, Banham-Hall E, Plagnol V, Leahy TR, Baxendale H, Coulter T, Curtis J, Wu C, Blake-Palmer K, Perisic O, Smyth D, Maes M, Fiddler C, Juss J, Cilliers D, Markelj G, Chandra A, Farmer G, Kielkowska A, Clark J, Kracker S, Debre M, Picard C, Pellier I, Jabado N, Morris JA, Barcenas-Morales G, Fischer A, Stephens L, Hawkins P, Barrett JC, Abinun M, Clatworthy M, Durandy A, Doffinger R, Chilvers ER, Cant AJ, Kumararatne D, Okkenhaug K, Williams RL, Condliffe A y Nejentsev S (2013) Phosphoinositide 3-kinase delta gene mutation predisposes to respiratory infection and airway damage. *Science* **342**:866-871.
- Aoyagi T y Matsui T (2011) Phosphoinositide-3 kinase signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Current pharmaceutical design* **17**:1818-1824.
- Arsenic R, Lehmann A, Budczies J, Koch I, Prinzler J, Kleine-Tebbe A, Schewe C, Loibl S, Dietel M y Denkert C (2014) Analysis of

- PIK3CA mutations in breast cancer subtypes. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry* **22**:50-56.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1993). *Current protocols in Molecular Biology*
- Backer JM (2008) The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *The Biochemical journal* **410**:1-17.
- Backer JM (2010) The regulation of class IA PI 3-kinases by inter-subunit interactions. *Current topics in microbiology and immunology* **346**:87-114.
- Bader AG, Kang S y Vogt PK (2006) Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:1475-1479.
- Bader AG, Kang S, Zhao L y Vogt PK (2005) Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nature reviews Cancer* **5**:921-929.
- Bar-Sagi D (2001) A Ras by any other name. *Molecular and cellular biology* **21**:1441-1443.
- Barberis A, Gunde T, Berset C, Audetat S y Luthi U (2005) Yeast as a screening tool. *Drug discovery today Technologies* **2**:187-192.
- Barbieri MA, Roberts RL, Mukhopadhyay A y Stahl PD (1996) Rab5 regulates the dynamics of early endosome fusion. *Biocell : official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica et al* **20**:331-338.
- Barr F y Lambright DG (2010) Rab GEFs y GAPs. *Current opinion in cell biology* **22**:461-470.
- Batra-Safferling R, Granzin J, Modder S, Hoffmann S y Willbold D (2010) Structural studies of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) SH3 domain in complex with a peptide ligand: role of the anchor residue in ligand binding. *Biological chemistry* **391**:33-42.
- Beeton CA, Chance EM, Foukas LC y Shepherd PR (2000) Comparison of the kinetic properties of the lipid- and protein-kinase activities of the p110alpha and p110beta catalytic subunits of class-Ia phosphoinositide 3-kinases. *The Biochemical journal* **350 Pt 2**:353-359.
- Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, Datta K, Malstrom S, Stokoe D, McCormick F, Feng J y Tsichlis P (1998) Akt activation by growth

- factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* **17**:313-325.
- Bi L, Okabe I, Bernard DJ y Nussbaum RL (2002) Early embryonic lethality in mice deficient in the p110beta catalytic subunit of PI 3-kinase. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **13**:169-172.
- Bi L, Okabe I, Bernard DJ, Wynshaw-Boris A y Nussbaum RL (1999) Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* **274**:10963-10968.
- Blume-Jensen P y Hunter T (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**:355-365.
- Bos JL (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer research* **49**:4682-4689.
- Bourgon R, Lu S, Yan Y, Lackner MR, Wang W, Weigman V, Wang D, Guan Y, Ryner L, Koeppen H, Patel R, Hampton GM, Amler LC y Wang Y (2014) High-throughput detection of clinically relevant mutations in archived tumor samples by multiplexed PCR and next-generation sequencing. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**:2080-2091.
- Brachmann SM, Yballe CM, Innocenti M, Deane JA, Fruman DA, Thomas SM y Cantley LC (2005) Role of phosphoinositide 3-kinase regulatory isoforms in development and actin rearrangement. *Molecular and cellular biology* **25**:2593-2606.
- Brock C, Schaefer M, Reusch HP, Czupalla C, Michalke M, Spicher K, Schultz G y Nurnberg B (2003) Roles of G beta gamma in membrane recruitment and activation of p110 gamma/p101 phosphoinositide 3-kinase gamma. *The Journal of cell biology* **160**:89-99.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J y Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**:857-868.
- Buhrman G, Holzapfel G, Fetis S y Mattos C (2010) Allosteric modulation of Ras positions Q61 for a direct role in catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:4931-4936.
- Burke JE, Perisic O, Masson GR, Vadas O y Williams RL (2012) Oncogenic mutations mimic and enhance dynamic events in the

- natural activation of phosphoinositide 3-kinase p110alpha (PIK3CA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**:15259-15264.
- Burke JE, Vadas O, Berndt A, Finegan T, Perisic O y Williams RL (2011) Dynamics of the phosphoinositide 3-kinase p110delta interaction with p85alpha and membranes reveals aspects of regulation distinct from p110alpha. *Structure* **19**:1127-1137.
- Burke JE y Williams RL (2013) Dynamic steps in receptor tyrosine kinase mediated activation of class IA phosphoinositide 3-kinases (PI3K) captured by H/D exchange (HDX-MS). *Advances in biological regulation* **53**:97-110.
- Burke JE y Williams RL (2015) Synergy in activating class I PI3Ks. *Trends in biochemical sciences* **40**:88-100.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**:1061-1068
- Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**:1655-1657.
- Cariaga-Martínez AE, Cortes I, García E, Perez-García V, Pajares MJ, Idoate MA, Redondo-Munoz J, Anton IM y Carrera AC (2014) Phosphoinositide 3-kinase p85beta regulates invadopodium formation. *Biology open* **3**:924-936.
- Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, Hostetter G, Boguslawski S, Moses TY, Savage S, Uhlik M, Lin A, Du J, Qian YW, Zeckner DJ, Tucker-Kellogg G, Touchman J, Patel K, Mousses S, Bittner M, Schevitz R, Lai MH, Blanchard KL y Thomas JE (2007) A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* **448**:439-444.
- Carson JD, Van Aller G, Lehr R, Sinnamon RH, Kirkpatrick RB, Auger KR, Dhanak D, Copeland RA, Gontarek RR, Tummino PJ y Luo L (2008) Effects of oncogenic p110alpha subunit mutations on the lipid kinase activity of phosphoinositide 3-kinase. *The Biochemical journal* **409**:519-524.
- Casamayor A, Torrance PD, Kobayashi T, Thorner J y Alessi DR (1999) Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Current biology : CB* **9**:186-197.
- Castellano E y Downward J (2010) Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase. *Current topics in microbiology and immunology* **346**:143-169.

- Castellano E y Downward J (2011) RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes & cancer* **2**:261-274.
- Cid VJ, Rodríguez-Escudero I, Andrés-Pons A, Roma-Mateo C, Gil A, den Hertog J, Molina M y Pulido R (2008) Assessment of PTEN tumor suppressor activity in nonmammalian models: the year of the yeast. *Oncogene* **27**:5431-5442.
- Cizkova M, Vacher S, Meseure D, Trassard M, Susini A, Mlcuchova D, Callens C, Rouleau E, Spyrtos F, Lidereau R y Bieche I (2013) PIK3R1 underexpression is an independent prognostic marker in breast cancer. *BMC cancer* **13**:545.
- Costa C y Engelman JA (2014) The double life of p85. *Cancer cell* **26**:445-447.
- Cuevas BD, Lu Y, Mao M, Zhang J, LaPushin R, Siminovitch K y Mills GB (2001) Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* **276**:27455-27461.
- Chagpar RB, Links PH, Pastor MC, Furber LA, Hawrysh AD, Chamberlain MD y Anderson DH (2010) Direct positive regulation of PTEN by the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:5471-5476.
- Chalhoub N y Baker SJ (2009) PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annual review of pathology* **4**:127-150.
- Chamberlain MD, Berry TR, Pastor MC y Anderson DH (2004) The p85 $\alpha$  subunit of phosphatidylinositol 3'-kinase binds to and stimulates the GTPase activity of Rab proteins. *The Journal of biological chemistry* **279**:48607-48614.
- Chamberlain MD, Oberg JC, Furber LA, Poland SF, Hawrysh AD, Knafelc SM, McBride HM y Anderson DH (2010) Deregulation of Rab5 and Rab4 proteins in p85<sup>R274A</sup>-expressing cells alters PDGFR trafficking. *Cellular signalling* **22**:1562-1575.
- Chan TO, Rodeck U, Chan AM, Kimmelman AC, Rittenhouse SE, Panayotou G y Tsichlis PN (2002) Small GTPases and tyrosine kinases coregulate a molecular switch in the phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit. *Cancer cell* **1**:181-191.
- Chaussade C, Cho K, Mawson C, Rewcastle GW y Shepherd PR (2009) Functional differences between two classes of oncogenic mutation in the PIK3CA gene. *Biochemical and biophysical research communications* **381**:577-581.

- Cheung LW, Hennessy BT, Li J, Yu S, Myers AP, Djordjevic B, Lu Y, Stemke-Hale K, Dyer MD, Zhang F, Ju Z, Cantley LC, Scherer SE, Liang H, Lu KH, Broaddus RR y Mills GB (2011) High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. *Cancer discovery* **1**:170-185.
- Cheung LW, Yu S, Zhang D, Li J, Ng PK, Panupinthu N, Mitra S, Ju Z, Yu Q, Liang H, Hawke DH, Lu Y, Broaddus RR y Mills GB (2014) Naturally Occurring Neomorphic PIK3R1 Mutations Activate the MAPK Pathway, Dictating Therapeutic Response to MAPK Pathway Inhibitors. *Cancer cell* **26**:479-494.
- Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD y Zerial M (1999) The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* **397**:621-625.
- Dbouk HA, Khalil BD, Wu H, Shymanets A, Nurnberg B y Backer JM (2013) Characterization of a tumor-associated activating mutation of the p110beta PI 3-kinase. *PloS one* **8**:e63833.
- Dbouk HA, Pang H, Fiser A y Backer JM (2010) A biochemical mechanism for the oncogenic potential of the p110beta catalytic subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:19897-19902.
- Dbouk HA, Vadas O, Shymanets A, Burke JE, Salamon RS, Khalil BD, Barrett MO, Waldo GL, Surve C, Hsueh C, Perisic O, Harteneck C, Shepherd PR, Harden TK, Smrcka AV, Taussig R, Bresnick AR, Nurnberg B, Williams RL y Backer JM (2012) G protein-coupled receptor-mediated activation of p110beta by Gbetagamma is required for cellular transformation and invasiveness. *Science signaling* **5**:ra89.
- Denley A, Kang S, Karst U y Vogt PK (2008) Oncogenic signaling of class I PI3K isoforms. *Oncogene* **27**:2561-2574.
- Dhand R, Hiles I, Panayotou G, Roche S, Fry MJ, Gout I, Totty NF, Truong O, Vicendo P, Yonezawa K y *et al.* (1994) PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *The EMBO journal* **13**:522-533.
- Dobashi Y, Sato E, Oda Y, Inazawa J y Ooi A (2014) Significance of Akt activation and AKT gene increases in soft tissue tumors. *Human pathology* **45**:127-136.
- Domin J, Gaidarov I, Smith ME, Keen JH y Waterfield MD (2000) The class II phosphoinositide 3-kinase PI3K-C2alpha is concentrated in



- the trans-Golgi network and present in clathrin-coated vesicles. *The Journal of biological chemistry* **275**:11943-11950.
- Domin J, Harper L, Aubyn D, Wheeler M, Florey O, Haskard D, Yuan M y Zicha D (2005) The class II phosphoinositide 3-kinase PI3K-C2beta regulates cell migration by a PtdIns3P dependent mechanism. *Journal of cellular physiology* **205**:452-462.
- Dou Z, Pan JA, Dbouk HA, Ballou LM, DeLeon JL, Fan Y, Chen JS, Liang Z, Li G, Backer JM, Lin RZ y Zong WX (2013) Class IA PI3K p110beta subunit promotes autophagy through Rab5 small GTPase in response to growth factor limitation. *Molecular cell* **50**:29-42.
- Echeverria I, Liu Y, Gabelli SB y Amzel LM (2015) PI3Kalpha oncogenic mutations weaken the interactions that stabilize the p110alpha/p85alpha heterodimer. *The FEBS journal*
- End P, Gout I, Fry MJ, Panayotou G, Dhand R, Yonezawa K, Kasuga M y Waterfield MD (1993) A biosensor approach to probe the structure and function of the p85 alpha subunit of the phosphatidylinositol 3-kinase complex. *The Journal of biological chemistry* **268**:10066-10075.
- Engelman JA, Luo J y Cantley LC (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature reviews Genetics* **7**:606-619.
- Fernández-Acero T, Rodríguez-Escudero I, Vicente F, Monteiro MC, Tormo JR, Cantizani J, Molina M y Cid VJ (2012) A yeast-based in vivo bioassay to screen for class I phosphatidylinositol 3-kinase specific inhibitors. *Journal of biomolecular screening* **17**:1018-1029.
- Fidyk NJ y Cerione RA (2002) Understanding the catalytic mechanism of GTPase-activating proteins: demonstration of the importance of switch domain stabilization in the stimulation of GTP hydrolysis. *Biochemistry* **41**:15644-15653.
- Foukas LC, Beeton CA, Jensen J, Phillips WA y Shepherd PR (2004) Regulation of phosphoinositide 3-kinase by its intrinsic serine kinase activity in vivo. *Molecular and cellular biology* **24**:966-975.
- Foukas LC, Claret M, Pearce W, Okkenhaug K, Meek S, Peskett E, Sancho S, Smith AJ, Withers DJ y Vanhaesebroeck B (2006) Critical role for the p110alpha phosphoinositide-3-OH kinase in growth and metabolic regulation. *Nature* **441**:366-370.
- Fritsch R, de Krijger I, Fritsch K, George R, Reason B, Kumar MS, Diefenbacher M, Stamp G y Downward J (2013) RAS and RHO

- families of GTPases directly regulate distinct phosphoinositide 3-kinase isoforms. *Cell* **153**:1050-1063.
- Fruman DA, Mauvais-Jarvis F, Pollard DA, Yballe CM, Brazil D, Bronson RT, Kahn CR y Cantley LC (2000) Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha. *Nature genetics* **26**:379-382.
- Fruman DA, Meyers RE y Cantley LC (1998) Phosphoinositide kinases. *Annual review of biochemistry* **67**:481-507.
- Funaki M, Katagiri H, Kanda A, Anai M, Nawano M, Ogihara T, Inukai K, Fukushima Y, Ono H, Yazaki Y, Kikuchi M, Oka Y y Asano T (1999) p85/p110-type phosphatidylinositol kinase phosphorylates not only the D-3, but also the D-4 position of the inositol ring. *The Journal of biological chemistry* **274**:22019-22024.
- Gabelli SB, Huang CH, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Vogelstein B y Amzel LM (2010) Structural effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. *Current topics in microbiology and immunology* **347**:43-53.
- Gaidarov I, Smith ME, Domin J y Keen JH (2001) The class II phosphoinositide 3-kinase C2alpha is activated by clathrin and regulates clathrin-mediated membrane trafficking. *Molecular cell* **7**:443-449.
- García Z, Silio V, Marques M, Cortes I, Kumar A, Hernandez C, Checa AI, Serrano A y Carrera AC (2006) A PI3K activity-independent function of p85 regulatory subunit in control of mammalian cytokinesis. *The EMBO journal* **25**:4740-4751.
- Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Veronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, Andre B, Arkin AP, Astromoff A, El-Bakkoury M, Bangham R, Benito R, Brachat S, Campanaro S, Curtiss M, Davis K, Deutschbauer A, Entian KD, Flaherty P, Foury F, Garfinkel DJ, Gerstein M, Gotte D, Guldener U, Hegemann JH, Hempel S, Herman Z, Jaramillo DF, Kelly DE, Kelly SL, Kotter P, LaBonte D, Lamb DC, Lan N, Liang H, Liao H, Liu L, Luo C, Lussier M, Mao R, Menard P, Ooi SL, Revuelta JL, Roberts CJ, Rose M, Ross-Macdonald P, Scherens B, Schimmack G, Shafer B, Shoemaker DD, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Strathern JN, Valle G, Voet M, Volckaert G, Wang CY, Ward TR, Wilhelmy J, Winzeler EA, Yang Y, Yen G, Youngman E, Yu K, Bussey H, Boeke JD, Snyder M, Philippsen P, Davis RW y Johnston M (2002)

- Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**:387-391.
- Gil A, Rodríguez-Escudero I, Stumpf M, Molina M, Cid VJ y Pulido R (2015) A functional dissection of PTEN N-terminus: implications in PTEN subcellular targeting and tumor suppressor activity. *PloS one* **10**:e0119287.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H y Oliver SG (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**:546, 563-547.
- González-García A, Garrido E, Hernandez C, Alvarez B, Jiménez C, Cantrell DA, Pullen N y Carrera AC (2002) A new role for the p85-phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit linking FRAP to p70 S6 kinase activation. *The Journal of biological chemistry* **277**:1500-1508.
- Gout I, Dhand R, Hiles ID, Fry MJ, Panayotou G, Das P, Truong O, Totty NF, Hsuan J, Booker GW y *et al.* (1993) The GTPase dynamin binds to and is activated by a subset of SH3 domains. *Cell* **75**:25-36.
- Gross C y Bassell GJ (2014) Neuron-specific regulation of class I PI3K catalytic subunits and their dysfunction in brain disorders. *Frontiers in molecular neuroscience* **7**:12.
- Guillermet-Guibert J, Bjorklof K, Salpekar A, Gonella C, Ramadani F, Bilancio A, Meek S, Smith AJ, Okkenhaug K y Vanhaesebroeck B (2008) The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors y is functionally redundant with p110gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:8292-8297.
- Gunde T y Barberis A (2005) Yeast growth selection system for detecting activity and inhibition of dimerization-dependent receptor tyrosine kinase. *BioTechniques* **39**:541-549.
- Gupta S, Ramjaun AR, Haiko P, Wang Y, Warne PH, Nicke B, Nye E, Stamp G, Alitalo K y Downward J (2007) Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice. *Cell* **129**:957-968.
- Gutierrez A, Sanda T, Grebliunaite R, Carracedo A, Salmena L, Ahn Y, Dahlberg S, Neubergh D, Moreau LA, Winter SS, Larson R, Zhang J, Protopopov A, Chin L, Pandolfi PP, Silverman LB, Hunger SP, Sallan SE y Look AT (2009) High frequency of PTEN, PI3K, and

- AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **114**:647-650.
- Gymnopoulos M, Elsliger MA y Vogt PK (2007) Rare cancer-specific mutations in PIK3CA show gain of function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:5569-5574.
- Hallmann D, Trumper K, Trusheim H, Ueki K, Kahn CR, Cantley LC, Fruman DA y Horsch D (2003) Altered signaling and cell cycle regulation in embryonal stem cells with a disruption of the gene for phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit p85alpha. *The Journal of biological chemistry* **278**:5099-5108.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**:557-580.
- Hancock JF (2003) Ras proteins: different signals from different locations. *Nature reviews Molecular cell biology* **4**:373-384.
- Hao Y, Wang C, Cao B, Hirsch BM, Song J, Markowitz SD, Ewing RM, Sedwick D, Liu L, Zheng W y Wang Z (2013) Gain of interaction with IRS1 by p110alpha-helical domain mutants is crucial for their oncogenic functions. *Cancer cell* **23**:583-593.
- Harris SJ, Parry RV, Westwick J y Ward SG (2008) Phosphoinositide lipid phosphatases: natural regulators of phosphoinositide 3-kinase signaling in T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* **283**:2465-2469.
- Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K y Stephens LR (2006) Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochemical Society transactions* **34**:647-662.
- Herman SE y Johnson AJ (2012) Molecular pathways: targeting phosphoinositide 3-kinase p110-delta in chronic lymphocytic leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**:4013-4018.
- Heymont J, Berenfeld L, Collins J, Kaganovich A, Maynes B, Moulin A, Ratskovskaya I, Poon PP, Johnston GC, Kamenetsky M, DeSilva J, Sun H, Petsko GA y Engebrecht J (2000) TEP1, the yeast homolog of the human tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1, is linked to the phosphatidylinositol pathway and plays a role in the developmental process of sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:12672-12677.

- Hilgers W y Kern SE (1999) Molecular genetic basis of pancreatic adenocarcinoma. *Genes, chromosomes & cancer* **26**:1-12.
- Hobert JA y Eng C (2009) PTEN hamartoma tumor syndrome: an overview. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* **11**:687-694.
- Hoedemaeker FJ, Siegal G, Roe SM, Driscoll PC y Abrahams JP (1999) Crystal structure of the C-terminal SH2 domain of the p85alpha regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase: an SH2 domain mimicking its own substrate. *Journal of molecular biology* **292**:763-770.
- Hofmann BT y Jucker M (2012) Activation of PI3K/Akt signaling by n-terminal SH2 domain mutants of the p85alpha regulatory subunit of PI3K is enhanced by deletion of its c-terminal SH2 domain. *Cellular signalling* **24**:1950-1954.
- Holt KH, Olson L, Moye-Rowley WS y Pessin JE (1994) Phosphatidylinositol 3-kinase activation is mediated by high-affinity interactions between distinct domains within the p110 and p85 subunits. *Molecular and cellular biology* **14**:42-49.
- Hon WC, Berndt A y Williams RL (2012) Regulation of lipid binding underlies the activation mechanism of class IA PI3-kinases. *Oncogene* **31**:3655-3666.
- Huang CH, Mandelker D, Gabelli SB y Amzel LM (2008) Insights into the oncogenic effects of PIK3CA mutations from the structure of p110alpha/p85alpha. *Cell Cycle* **7**:1151-1156.
- Huang CH, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Samuels Y, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Gabelli SB y Amzel LM (2007) The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. *Science* **318**:1744-1748.
- Ikenoue T, Kanai F, Hikiba Y, Obata T, Tanaka Y, Imamura J, Ohta M, Jazag A, Guleng B, Tateishi K, Asaoka Y, Matsumura M, Kawabe T y Omata M (2005) Functional analysis of PIK3CA gene mutations in human colorectal cancer. *Cancer research* **65**:4562-4567.
- Isakoff SJ, Engelman JA, Irie HY, Luo J, Brachmann SM, Pearlman RV, Cantley LC y Brugge JS (2005) Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells. *Cancer research* **65**:10992-11000.
- Ito H, Fukuda Y, Murata K y Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of bacteriology* **153**:163-168.

- Jaiswal BS, Janakiraman V, Kljavin NM, Chaudhuri S, Stern HM, Wang W, Kan Z, Dbouk HA, Peters BA, Waring P, Dela Vega T, Kenski DM, Bowman KK, Lorenzo M, Li H, Wu J, Modrusan Z, Stinson J, Eby M, Yue P, Kaminker JS, de Sauvage FJ, Backer JM y Seshagiri S (2009) Somatic mutations in p85alpha promote tumorigenesis through class IA PI3K activation. *Cancer cell* **16**:463-474.
- James SR, Downes CP, Gigg R, Grove SJ, Holmes AB y Alessi DR (1996) Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *The Biochemical journal* **315 ( Pt 3)**:709-713.
- Jansen LA, Mirzaa GM, Ishak GE, O'Roak BJ, Hiatt JB, Roden WH, Gunter SA, Christian SL, Collins S, Adams C, Riviere JB, St-Onge J, Ojemann JG, Shendure J, Hevner RF y Dobyns WB (2015) PI3K/AKT pathway mutations cause a spectrum of brain malformations from megalencephaly to focal cortical dysplasia. *Brain : a journal of neurology*.
- Jiang BH y Liu LZ (2009) PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Advances in cancer research* **102**:19-65.
- Jiménez C, Hernandez C, Pimentel B y Carrera AC (2002) The p85 regulatory subunit controls sequential activation of phosphoinositide 3-kinase by Tyr kinases and Ras. *The Journal of biological chemistry* **277**:41556-41562.
- Jiménez C, Jones DR, Rodríguez-Viciana P, González-García A, Leonardo E, Wennstrom S, von Kobbe C, Toran JL, L RB, Calvo V, Copin SG, Albar JP, Gaspar ML, Diez E, Marcos MA, Downward J, Martínez AC, Merida I y Carrera AC (1998) Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *The EMBO journal* **17**:743-753.
- Jiménez C, Portela RA, Mellado M, Rodríguez-Frade JM, Collard J, Serrano A, Martínez AC, Avila J y Carrera AC (2000) Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. *The Journal of cell biology* **151**:249-262.
- Jucker M, Sudel K, Horn S, Sickel M, Wegner W, Fiedler W y Feldman RA (2002) Expression of a mutated form of the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in a Hodgkin's lymphoma-derived cell line (CO). *Leukemia* **16**:894-901.
- Kang S, Bader AG y Vogt PK (2005) Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:802-807.
- Kang S, Denley A, Vanhaesebroeck B y Vogt PK (2006) Oncogenic transformation induced by the p110beta, -gamma, and -delta isoforms of class I phosphoinositide 3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:1289-1294.
- Karakas B, Bachman KE y Park BH (2006) Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *British journal of cancer* **94**:455-459.
- Karam CS, Ballon JS, Bivens NM, Freyberg Z, Girgis RR, Lizardi-Ortiz JE, Markx S, Lieberman JA y Javitch JA (2010) Signaling pathways in schizophrenia: emerging targets and therapeutic strategies. *Trends in pharmacological sciences* **31**:381-390.
- Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J y Waterfield MD (2001) Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annual review of cell and developmental biology* **17**:615-675.
- Ko HR, Kim CK, Lee SB, Song J, Lee KH, Kim KK, Park KW, Cho SW y Ahn JY (2014) P42 Ebp1 regulates the proteasomal degradation of the p85 regulatory subunit of PI3K by recruiting a chaperone-E3 ligase complex HSP70/CHIP. *Cell death & disease* **5**:e1131.
- Kok K, Geering B y Vanhaesebroeck B (2009) Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends in biochemical sciences* **34**:115-127.
- Kreisel F, Kulkarni S, Kerns RT, Hassan A, Deshmukh H, Nagarajan R, Frater JL y Cashen A (2011) High resolution array comparative genomic hybridization identifies copy number alterations in diffuse large B-cell lymphoma that predict response to immuno-chemotherapy. *Cancer genetics* **204**:129-137.
- Krueger DA, Wilfong AA, Holland-Bouley K, Anderson AE, Agricola K, Tudor C, Mays M, Lopez CM, Kim MO y Franz DN (2013) Everolimus treatment of refractory epilepsy in tuberous sclerosis complex. *Annals of neurology* **74**:679-687.
- Krugmann S, Hawkins PT, Pryer N y Braselmann S (1999) Characterizing the interactions between the two subunits of the p101/p110gamma phosphoinositide 3-kinase and their role in the activation of this enzyme by G beta gamma subunits. *The Journal of biological chemistry* **274**:17152-17158.

- Kumar A, Redondo-Munoz J, Perez-García V, Cortes I, Chagoyen M y Carrera AC (2011) Nuclear but not cytosolic phosphoinositide 3-kinase beta has an essential function in cell survival. *Molecular and cellular biology* **31**:2122-2133.
- Kurosu H y Katada T (2001) Association of phosphatidylinositol 3-kinase composed of p110beta-catalytic and p85-regulatory subunits with the small GTPase Rab5. *Journal of biochemistry* **130**:73-78.
- Kurosu H, Maehama T, Okada T, Yamamoto T, Hoshino S, Fukui Y, Ui M, Hazeki O y Katada T (1997) Heterodimeric phosphoinositide 3-kinase consisting of p85 and p110beta is synergistically activated by the betagamma subunits of G proteins and phosphotyrosyl peptide. *The Journal of biological chemistry* **272**:24252-24256.
- Kwon CH, Zhao D, Chen J, Alcantara S, Li Y, Burns DK, Mason RP, Lee EY, Wu H y Parada LF (2008) Pten haploinsufficiency accelerates formation of high-grade astrocytomas. *Cancer research* **68**:3286-3294.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Laffargue M, Calvez R, Finan P, Trifilieff A, Barbier M, Altruda F, Hirsch E y Wymann MP (2002) Phosphoinositide 3-kinase gamma is an essential amplifier of mast cell function. *Immunity* **16**:441-451.
- Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, Meyerson M, Gabriel SB, Lander ES y Getz G (2014) Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* **505**:495-501.
- Lee JW, Soung YH, Kim SY, Lee HW, Park WS, Nam SW, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ y Lee SH (2005) PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene* **24**:1477-1480.
- Lee JY, Kim YR, Park J y Kim S (2012) Inositol polyphosphate multikinase signaling in the regulation of metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1271**:68-74.
- Lee SH, Poulogiannis G, Pyne S, Jia S, Zou L, Signoretti S, Loda M, Cantley LC y Roberts TM (2010) A constitutively activated form of the p110beta isoform of PI3-kinase induces prostatic intraepithelial neoplasia in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:11002-11007.



- Li DM y Sun H (1997) TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer research* **57**:2124-2129.
- Li L, Ernstring BR, Wishart MJ, Lohse DL y Dixon JE (1997) A family of putative tumor suppressors is structurally and functionally conserved in humans and yeast. *The Journal of biological chemistry* **272**:29403-29406.
- Liu P, Cheng H, Roberts TM and Zhao JJ (2009) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature reviews Drug discovery* **8**:627-644
- Liu Z y Roberts TM (2006) Human tumor mutants in the p110alpha subunit of PI3K. *Cell Cycle* **5**:675-677.
- Lorberg A y Hall MN (2004) TOR: the first 10 years. *Current topics in microbiology and immunology* **279**:1-18.
- Luo J, Field SJ, Lee JY, Engelman JA y Cantley LC (2005) The p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase down-regulates IRS-1 signaling via the formation of a sequestration complex. *The Journal of cell biology* **170**:455-464.
- Ma XM y Blenis J (2009) Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature reviews Molecular cell biology* **10**:307-318.
- Maddika S, Wiechec E, Ande SR, Poon IK, Fischer U, Wesselborg S, Jans DA, Schulze-Osthoff K y Los M (2008) Interaction with PI3-kinase contributes to the cytotoxic activity of apoptin. *Oncogene* **27**:3060-3065.
- Maehama T y Dixon JE (1998) The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *The Journal of biological chemistry* **273**:13375-13378.
- Maehama T, Taylor GS y Dixon JE (2001) PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. *Annual review of biochemistry* **70**:247-279.
- Mager WH y Winderickx J (2005) Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends in pharmacological sciences* **26**:265-273.
- Maier U, Babich A y Nurnberg B (1999) Roles of non-catalytic subunits in gbetagamma-induced activation of class I phosphoinositide 3-kinase isoforms beta and gamma. *The Journal of biological chemistry* **274**:29311-29317.

- Mandelker D, Gabelli SB, Schmidt-Kittler O, Zhu J, Cheong I, Huang CH, Kinzler KW, Vogelstein B y Amzel LM (2009) A frequent kinase domain mutation that changes the interaction between PI3K $\alpha$  and the membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:16996-17001.
- Manning, B.D. y Cantley, L.C. (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**: 1261-1274.
- Marone R, Cmiljanovic V, Giese B y Wymann MP (2008) Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochimica et biophysica acta* **1784**:159-185.
- Martini M, Ciruolo E, Gulluni F y Hirsch E (2013) Targeting PI3K in Cancer: Any Good News? *Frontiers in oncology* **3**:108.
- Martini M, De Santis MC, Braccini L, Gulluni F y Hirsch E (2014) PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Annals of medicine* **46**:372-383.
- Miled N, Yan Y, Hon WC, Perisic O, Zvelebil M, Inbar Y, Schneidman-Duhovny D, Wolfson HJ, Backer JM y Williams RL (2007) Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. *Science* **317**:239-242.
- Mukohara T (2015) PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Breast Cancer (Dove Med Press)* **7**:111-123.
- Musacchio A, Cantley LC y Harrison SC (1996) Crystal structure of the breakpoint cluster region-homology domain from phosphoinositide 3-kinase p85  $\alpha$  subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:14373-14378.
- Myers MB, Wang Y, McKim KL y Parsons BL (2012) Hotspot oncomutations: implications for personalized cancer treatment. *Expert review of molecular diagnostics* **12**:603-620.
- Nakajima H, Ishikawa Y, Furuya M, Sano T, Ohno Y, Horiguchi J y Oyama T (2014) Protein expression, gene amplification, and mutational analysis of EGFR in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer* **21**:66-74.
- Nakatani K, Thompson DA, Barthel A, Sakaue H, Liu W, Weigel RJ y Roth RA (1999) Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *The Journal of biological chemistry* **274**:21528-21532.
- Nolte RT, Eck MJ, Schlessinger J, Shoelson SE y Harrison SC (1996) Crystal structure of the PI 3-kinase p85 amino-terminal SH2 domain

- and its phosphopeptide complexes. *Nature structural biology* **3**:364-374.
- Pacold ME, Suire S, Perisic O, Lara-González S, Davis CT, Walker EH, Hawkins PT, Stephens L, Eccleston JF y Williams RL (2000) Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell* **103**:931-943.
- Park SW, Zhou Y, Lee J, Lu A, Sun C, Chung J, Ueki K y Ozcan U (2010) The regulatory subunits of PI3K, p85alpha and p85beta, interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation. *Nature medicine* **16**:429-437.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA, Jr., Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE y Kinzler KW (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**:1807-1812.
- Pazarentzos E, Giannikopoulos P, Hrutanovic G, St John J, Olivas VR, Gubens MA, Balassanian R, Weissman J, Polkinghorn W y Bivona TG (2015) Oncogenic activation of the PI3-kinase p110beta isoform via the tumor-derived PIK3Cbeta kinase domain mutation. *Oncogene*.
- Philp AJ, Campbell IG, Leet C, Vincan E, Rockman SP, Whitehead RH, Thomas RJ y Phillips WA (2001) The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer research* **61**:7426-7429.
- Pleiman CM, Hertz WM y Cambier JC (1994) Activation of phosphatidylinositol-3' kinase by Src-family kinase SH3 binding to the p85 subunit. *Science* **263**:1609-1612.
- Qian Y, Kachroo AH, Yellman CM, Marcotte EM y Johnson KA (2014) Yeast cells expressing the human mitochondrial DNA polymerase reveal correlations between polymerase fidelity and human disease progression. *The Journal of biological chemistry* **289**:5970-5985.
- Rasband WS (1997-2011). ImageJ In: Health USNIo (ed), 1.44p edn: Bethesda, Maryland, USA. p Image Processing and Analysis in Java
- Ren SY, Bolton E, Mohi MG, Morrione A, Neel BG y Skorski T (2005) Phosphatidylinositol 3-kinase p85{alpha} subunit-dependent interaction with BCR/ABL-related fusion tyrosine kinases:

- molecular mechanisms and biological consequences. *Molecular and cellular biology* **25**:8001-8008.
- Roberts RL, Barbieri MA, Ullrich J y Stahl PD (2000) Dynamics of rab5 activation in endocytosis and phagocytosis. *Journal of leukocyte biology* **68**:627-632.
- Rodríguez-Escudero I, Andrés-Pons A, Pulido R, Molina M y Cid VJ (2009) Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of mammalian protein kinase B/Akt in *Saccharomyces cerevisiae*, an in vivo model for the functional study of Akt mutations. *The Journal of biological chemistry* **284**:13373-13383.
- Rodríguez-Escudero I, Fernández-Acero T, Bravo I, Leslie NR, Pulido R, Molina M y Cid VJ (2015) Yeast-based methods to assess PTEN phosphoinositide phosphatase activity in vivo. *Methods* **77-78**:172-179.
- Rodríguez-Escudero I, Oliver MD, Andrés-Pons A, Molina M, Cid VJ y Pulido R (2011) A comprehensive functional analysis of PTEN mutations: implications in tumor- and autism-related syndromes. *Human molecular genetics* **20**:4132-4142.
- Rodríguez-Escudero I, Roelants FM, Thorner J, Nombela C, Molina M y Cid VJ (2005) Reconstitution of the mammalian PI3K/PTEN/Akt pathway in yeast. *The Biochemical journal* **390**:613-623.
- Rodríguez-Viciano P, Sabatier C y McCormick F (2004) Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Molecular and cellular biology* **24**:4943-4954.
- Rodríguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD y Downward J (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* **370**:527-532.
- Rodríguez-Viciano P, Warne PH, Khwaja A, Marte BM, Pappin D, Das P, Waterfield MD, Ridley A y Downward J (1997) Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* **89**:457-467.
- Rodríguez-Viciano P, Warne PH, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD y Downward J (1996) Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *The EMBO journal* **15**:2442-2451.
- Roelants FM, Torrance PD, Bezman N y Thorner J (2002) Pkh1 and Pkh2 differentially phosphorylate and activate Ypk1 and Ykr2 and define

- protein kinase modules required for maintenance of cell wall integrity. *Molecular biology of the cell* **13**:3005-3028.
- Rommel C, Camps M y Ji H (2007) PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? *Nature reviews Immunology* **7**:191-201.
- Ross RL, Burns JE, Taylor CF, Mellor P, Anderson DH y Knowles MA (2013) Identification of mutations in distinct regions of p85 alpha in urothelial cancer. *PloS one* **8**:e84411.
- Rudd ML, Price JC, Fogoros S, Godwin AK, Sgroi DC, Merino MJ y Bell DW (2011) A unique spectrum of somatic PIK3CA (p110alpha) mutations within primary endometrial carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**:1331-1340.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory Manual*
- Salmena L, Carracedo A y Pandolfi PP (2008) Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* **133**:403-414.
- Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B y Velculescu VE (2004) High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* **304**:554.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM y Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**:1098-1101.
- Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmuller L, Lautwein A, Schmitz F y Wittinghofer A (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* **277**:333-338.
- Sharma SV, Bell DW, Settleman J y Haber DA (2007) Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature reviews Cancer* **7**:169-181.
- Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, Pinkel D, Powell B, Mills GB y Gray JW (1999) PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nature genetics* **21**:99-102.
- Shekar SC, Wu H, Fu Z, Yip SC, Nagajyothi, Cahill SM, Girvin ME y Backer JM (2005) Mechanism of constitutive phosphoinositide 3-kinase activation by oncogenic mutants of the p85 regulatory subunit. *The Journal of biological chemistry* **280**:27850-27855.

- Shi H, Hong A, Kong X, Koya RC, Song C, Moriceau G, Hugo W, Yu CC, Ng C, Chodon T, Scolyer RA, Kefford RF, Ribas A, Long GV y Lo RS (2014) A novel AKT1 mutant amplifies an adaptive melanoma response to BRAF inhibition. *Cancer discovery* **4**:69-79.
- Shi J, Yao D, Liu W, Wang N, Lv H, Zhang G, Ji M, Xu L, He N, Shi B y Hou P (2012a) Highly frequent PIK3CA amplification is associated with poor prognosis in gastric cancer. *BMC cancer* **12**:50.
- Shi Y, Paluch BE, Wang X y Jiang X (2012b) PTEN at a glance. *Journal of cell science* **125**:4687-4692.
- Shin HW, Hayashi M, Christoforidis S, Lacas-Gervais S, Hoepfner S, Wenk MR, Modregger J, Uttenweiler-Joseph S, Wilm M, Nystuen A, Frankel WN, Solimena M, De Camilli P y Zerial M (2005) An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *The Journal of cell biology* **170**:607-618.
- Shoji K, Oda K, Nakagawa S, Hosokawa S, Nagae G, Uehara Y, Sone K, Miyamoto Y, Hiraike H, Hiraike-Wada O, Nei T, Kawana K, Kuramoto H, Aburatani H, Yano T y Taketani Y (2009) The oncogenic mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in endometrial carcinomas. *British journal of cancer* **101**:145-148.
- Snuderl M, Fazlollahi L, Le LP, Nitta M, Zhelyazkova BH, Davidson CJ, Akhavanfard S, Cahill DP, Aldape KD, Betensky RA, Louis DN and Iafrate AJ (2011) Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer cell* **20**:810-817.
- Sobko A (2006) Systems biology of AGC kinases in fungi. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2006**:re9.
- Song MS, Salmena L y Pandolfi PP (2012) The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature reviews Molecular cell biology* **13**:283-296.
- Sordella R, Bell DW, Haber DA y Settleman J (2004) Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* **305**:1163-1167.
- Stenmark H, Parton RG, Steele-Mortimer O, Lutcke A, Gruenberg J y Zerial M (1994) Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *The EMBO journal* **13**:1287-1296.
- Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, McCormick F, Tempst P, Coadwell J y Hawkins PT (1998) Protein kinase B kinases that

- mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* **279**:710-714.
- Suire S, Coadwell J, Ferguson GJ, Davidson K, Hawkins P y Stephens L (2005) p84, a new Gbetagamma-activated regulatory subunit of the type IB phosphoinositide 3-kinase p110gamma. *Current biology : CB* **15**:566-570.
- Sun M, Hillmann P, Hofmann BT, Hart JR y Vogt PK (2010) Cancer-derived mutations in the regulatory subunit p85alpha of phosphoinositide 3-kinase function through the catalytic subunit p110alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:15547-15552.
- Tamanai F (2011) Ras signaling in yeast. *Genes & cancer* **2**:210-215.
- Taniguchi CM, Winnay J, Kondo T, Bronson RT, Guimaraes AR, Aleman JO, Luo J, Stephanopoulos G, Weissleder R, Cantley LC y Kahn CR (2010) The phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit p85alpha can exert tumor suppressor properties through negative regulation of growth factor signaling. *Cancer research* **70**:5305-5315.
- Tenreiro S, Munder MC, Alberti S y Outeiro TF (2013) Harnessing the power of yeast to unravel the molecular basis of neurodegeneration. *Journal of neurochemistry* **127**:438-452.
- Terauchi Y, Tsuji Y, Satoh S, Minoura H, Murakami K, Okuno A, Inukai K, Asano T, Kaburagi Y, Ueki K, Nakajima H, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Sekihara H, Yin Y, Barrett JC, Oda H, Ishikawa T, Akanuma Y, Komuro I, Suzuki M, Yamamura K, Kodama T, Suzuki H, Koyasu S, Aizawa S, Tobe K, Fukui Y, Yazaki Y y Kadowaki T (1999) Increased insulin sensitivity y hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nature genetics* **21**:230-235.
- Tzenaki N, Andreou M, Stratigi K, Vergetaki A, Makrigiannakis A, Vanhaesebroeck B y Papakonstanti EA (2012) High levels of p110delta PI3K expression in solid tumor cells suppress PTEN activity, generating cellular sensitivity to p110delta inhibitors through PTEN activation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**:2498-2508.
- Ueki K, Yballe CM, Brachmann SM, Vicent D, Watt JM, Kahn CR y Cantley LC (2002) Increased insulin sensitivity in mice lacking p85beta subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:419-424.
- Urban J, Soulard A, Huber A, Lippman S, Mukhopadhyay D, Deloche O, Wanke V, Anrather D, Ammerer G, Riezman H, Broach JR, De Virgilio C, Hall MN y Loewith R (2007) Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell* **26**:663-674.
- Urick ME, Rudd ML, Godwin AK, Sgroi D, Merino M y Bell DW (2011) PIK3R1 (p85alpha) is somatically mutated at high frequency in primary endometrial cancer. *Cancer research* **71**:4061-4067.
- Vadas O, Burke JE, Zhang X, Berndt A y Williams RL (2011) Structural basis for activation y inhibition of class I phosphoinositide 3-kinases. *Science signaling* **4**:re2.
- Vandal G, Geiling B y Dankort D (2014) Ras effector mutant expression suggest a negative regulator inhibits lung tumor formation. *PloS one* **9**:e84745.
- Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M y Bilanges B (2010) The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**:329-341.
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ y Waterfield MD (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annual review of biochemistry* **70**:535-602.
- Vivanco I y Sawyers CL (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews Cancer* **2**:489-501.
- Vogt PK, Bader AG y Kang S (2006) Phosphoinositide 3-kinase: from viral oncoprotein to drug target. *Virology* **344**:131-138.
- Vogt PK, Hart JR, Gymnopoulos M, Jiang H, Kang S, Bader AG, Zhao L y Denley A (2010) Phosphatidylinositol 3-kinase: the oncoprotein. *Current topics in microbiology and immunology* **347**:79-104.
- Vogt PK, Kang S, Elsliger MA y Gymnopoulos M (2007) Cancer-specific mutations in phosphatidylinositol 3-kinase. *Trends in biochemical sciences* **32**:342-349.
- Voigt P, Brock C, Nurnberg B y Schaefer M (2005) Assigning functional domains within the p101 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma. *The Journal of biological chemistry* **280**:5121-5127.
- Volpicelli LA, Lah JJ y Levey AI (2001) Rab5-dependent trafficking of the m4 muscarinic acetylcholine receptor to the plasma membrane, early endosomes, and multivesicular bodies. *The Journal of biological chemistry* **276**:47590-47598.



- Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wymann MP y Williams RL (2000) Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Molecular cell* **6**:909-919.
- Walker EH, Perisic O, Ried C, Stephens L y Williams RL (1999) Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature* **402**:313-320.
- Wang Z, Shen D, Parsons DW, Bardelli A, Sager J, Szabo S, Ptak J, Silliman N, Peters BA, van der Heijden MS, Parmigiani G, Yan H, Wang TL, Riggins G, Powell SM, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B y Velculescu VE (2004) Mutational analysis of the tyrosine phosphatome in colorectal cancers. *Science* **304**:1164-1166.
- Weeks G y Spiegelman GB (2003) Roles played by Ras subfamily proteins in the cell and developmental biology of microorganisms. *Cellular signalling* **15**:901-909.
- Weernink PA, Guo Y, Zhang C, Schmidt M, Von Eichel-Streiber C y Jakobs KH (2000) Control of cellular phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels by adhesion signals and rho GTPases in NIH 3T3 fibroblasts involvement of both phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase and phospholipase C. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**:5237-5246.
- Weiner MP, Costa GL, Schoettlin W, Cline J, Mathur E y Bauer JC (1994) Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* **151**:119-123.
- Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezso Z, Ustyanksky V, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Karchin R, Wilson PA, Kaminker JS, Zhang Z, Croshaw R, Willis J, Dawson D, Shipitsin M, Willson JK, Sukumar S, Polyak K, Park BH, Pethiyagoda CL, Pant PV, Ballinger DG, Sparks AB, Hartigan J, Smith DR, Suh E, Papadopoulos N, Buckhaults P, Markowitz SD, Parmigiani G, Kinzler KW, Velculescu VE y Vogelstein B (2007) The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* **318**:1108-1113.
- Wu G, Mambo E, Guo Z, Hu S, Huang X, Gollin SM, Trink B, Ladenson PW, Sidransky D y Xing M (2005a) Uncommon mutation, but common amplifications, of the PIK3CA gene in thyroid tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **90**:4688-4693.

- Wu G, Xing M, Mambo E, Huang X, Liu J, Guo Z, Chatterjee A, Goldenberg D, Gollin SM, Sukumar S, Trink B y Sidransky D (2005b) Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast cancer research : BCR* **7**:R609-616.
- Wu H, Shekar SC, Flinn RJ, El-Sibai M, Jaiswal BS, Sen KI, Janakiraman V, Seshagiri S, Gerfen GJ, Girvin ME y Backer JM (2009) Regulation of Class IA PI 3-kinases: C2 domain-iSH2 domain contacts inhibit p85/p110alpha and are disrupted in oncogenic p85 mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:20258-20263.
- Wymann MP, Bjorklof K, Calvez R, Finan P, Thomast M, Trifilieff A, Barbier M, Altruda F, Hirsch E y Laffargue M (2003) Phosphoinositide 3-kinase gamma: a key modulator in inflammation and allergy. *Biochemical Society transactions* **31**:275-280.
- Xia X, Cheng A, Akinmade D y Hamburger AW (2003) The N-terminal 24 amino acids of the p55 gamma regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase binds Rb and induces cell cycle arrest. *Molecular and cellular biology* **23**:1717-1725.
- Yan Y y Backer JM (2007) Regulation of class III (Vps34) PI3Ks. *Biochemical Society transactions* **35**:239-241.
- Yu FX, Sun HQ, Janmey PA y Yin HL (1992) Identification of a polyphosphoinositide-binding sequence in an actin monomer-binding domain of gelsolin. *The Journal of biological chemistry* **267**:14616-14621.
- Zhang J, Grubor V, Love CL, Banerjee A, Richards KL, Mieczkowski PA, Dunphy C, Choi W, Au WY, Srivastava G, Lugar PL, Rizzieri DA, Lagoo AS, Bernal-Mizrachi L, Mann KP, Flowers C, Naresh K, Evens A, Gordon LI, Czader M, Gill JI, Hsi ED, Liu Q, Fan A, Walsh K, Jima D, Smith LL, Johnson AJ, Byrd JC, Luftig MA, Ni T, Zhu J, Chadburn A, Levy S, Dunson D y Dave SS (2013) Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**:1398-1403.
- Zhang W, Li L, Li X, Jiang W, Huo J, Wang Y, Lin M y Rao S (2007) Unravelling the hidden heterogeneities of diffuse large B-cell lymphoma based on coupled two-way clustering. *BMC genomics* **8**:332.
- Zhang X, Vadas O, Perisic O, Anderson KE, Clark J, Hawkins PT, Stephens LR y Williams RL (2011) Structure of lipid kinase p110beta/p85beta

- elucidates an unusual SH2-domain-mediated inhibitory mechanism. *Molecular cell* **41**:567-578.
- Zhang XC, Piccini A, Myers MP, Van Aelst L y Tonks NK (2012) Functional analysis of the protein phosphatase activity of PTEN. *The Biochemical journal* **444**:457-464.
- Zhao JJ, Liu Z, Wang L, Shin E, Loda MF y Roberts TM (2005) The oncogenic properties of mutant p110alpha and p110beta phosphatidylinositol 3-kinases in human mammary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:18443-18448.
- Zhao L y Vogt PK (2008a) Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* **27**:5486-5496.
- Zhao L y Vogt PK (2008b) Helical domain and kinase domain mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:2652-2657.
- Zhao L y Vogt PK (2010) Hot-spot mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase (pI3K): differential interactions with the regulatory subunit p85 and with RAS. *Cell Cycle* **9**:596-600.
- Zysman MA, Chapman WB y Bapat B (2002) Considerations when analyzing the methylation status of PTEN tumor suppressor gene. *The American journal of pathology* **160**:795-800.



