



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**Papel de la oligomerización de las  
PI3K de Clase IA p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  en  
la regulación de la actividad de PTEN**

**Tesis Doctoral**  
**Vicente Pérez García**

Madrid, 2014





Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Programa de Doctorado del  
Departamento de Biología Molecular

# **Papel de la oligomerización de las PI3K de Clase IA p110 $\alpha$ y p110 $\beta$ en la regulación de la actividad de PTEN**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Vicente Pérez García**

Bajo la dirección de la doctora

Ana Clara Carrera Ramírez

**Madrid, 2014**





*Al meu Iaio*



*“Vint duros? Escolteu!! que el xiquet em demana vint duros per a papes!!! Tu saps molt són vint duros? En vint duros jo comprava mig poble...”*

***Salvador “el Pont”***

*“On estàs? Alacant encara? Vols rostidora de peix o de carn? Afanya’t no tardes...”*

***Manolita***





# ÍNDICE



# Índice

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>7</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>17</b>
1. La señalización celular por enzimas modificadoras de lípidos	19
2. La familia de la PI3K	21
3. Clasificación de la PI3K	21
3.1 Clase I	22
3.1.1 Estructura de la subunidad catalítica p110	22
3.1.2 Estructura de las subunidades reguladoras de clase I	24
3.2 Clase II	26
3.3 Clase III	27
3.4 Clase IV	27
4. Funciones específicas de las isoformas de clase I	28
4.1 p110 $\alpha$	28
4.2 p110 $\beta$	28
4.3 p110 $\delta$	30
4.4 p110 $\gamma$	30
5. PTEN (fosfatasa homóloga de la tensina deletada en el cromosoma 10)	31
5.1 Estructura de PTEN	31
5.2 Regulación de PTEN	32
5.2.1 Regulación epigenética	33
5.2.2 Regulación transcripcional de PTEN	33
5.2.3 Regulación post-transcripcional por microARN	33
5.2.4 Regulación post-traducciona de PTEN	34
5.2.4.1 Fosforilación de PTEN	34
5.2.4.2 Acetilación y oxidación de PTEN	35

5.2.4.3 Regulación de PTEN por ubiquitinación	36
5.2.4.4 Sumoilación	36
5.2.5 Regulación de PTEN por interacción proteína-proteína	36
5.2.6 Complejo de alto peso molecular asociado a PTEN	38
6. Alteraciones del eje PI3K/PTEN en cáncer	38
6.1 Alteraciones de p110 $\alpha$	39
6.2 Alteraciones de p110 $\beta$	39
6.3 Alteraciones de p110 $\delta$	39
6.4 Alteraciones de p110 $\gamma$	39
6.5 Otras alteraciones de la vía PI3K/PTEN	40
6.6 Alteraciones de PTEN	40
7. Aproximación terapéutica del cáncer en el eje PI3K/PTEN	40
<b>OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>47</b>
1. Anticuerpos	49
2. Cultivos celulares	50
2.1 Líneas celulares	50
2.2 Métodos de transfección y vectores empleados	50
2.3 Análisis de ciclo celular (sincronización y tinción de ADN)	51
2.4 Tratamientos con inhibidores	51
3. Bioquímica	52
3.1 Lisis celulares	52
3.2 Fraccionamiento subcelular	52
3.3 Inmunoprecipitación	53
3.4 Filtración en gel (columna de exclusión molecular Superdex 200)	53
3.5 Ensayo lípido quinasa	53
3.6 Inmunoprecipitación tras Transcripción-traducción <i>in vitro</i>	54

3.7 Ensayo de la actividad fosfatasa de PTEN	54
3.8 Inmunofluorescencia	54
4. Análisis estadístico y cuantificaciones	55
<b>RESULTADOS</b>	<b>57</b>
1. Asociación de las formas endógenas de p110 $\alpha$ y p110 $\beta$	59
2. La asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ es específica	60
2.1 Los anticuerpos usados en la inmunoprecipitaciones endógenas no reaccionan de forma cruzada	60
2.2 La depleción de p110 $\alpha$ o p110 $\beta$ disminuye la formación del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$	61
2.3 Análisis del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ en fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) deficientes para la isoforma p110 $\alpha$ o p110 $\beta$	62
3. La asociación de p110 $\alpha$ y p110 $\beta$ recombinantes confirma la asociación de p110 $\alpha$ y p110 $\beta$ <i>in vivo</i>	64
4. La activación celular induce la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$	65
5. La asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ se correlaciona con la actividad de PI3K a lo largo del ciclo celular.	68
6. p110 $\alpha$ y p110 $\beta$ se asocian a través de las subunidades reguladoras p85	69
7. p110 $\alpha$ regula la activación de p110 $\beta$	72
7.1 El mutante inactivo K802R de p110 $\alpha$ disminuye la actividad de p110 $\beta$	72
7.2 La depleción de p110 $\alpha$ impide la correcta activación de p110 $\beta$	73
7.3 La activación óptima de p110 $\beta$ se produce cuando se encuentra asociada a p110 $\alpha$	74
8. La rotura del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ inhibe funciones específicas de p110 $\beta$	77
9. PTEN no es esencial para la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$	82

10. La asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ regula la actividad de PTEN	85
10.1 Cinética de activación de PTEN en el PAC	85
10.2 La interferencia del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ reduce la actividad fosfatasa de PTEN	87
10.3 Efecto de dominantes negativos del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ sobre la actividad de PTEN	92
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>97</b>
La isoformas p110 $\alpha$ y p110 $\beta$ se asocian <i>in vivo</i> tras activación celular	100
La dimerización p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ se produce a través de p85	102
El complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ completa la activación de p110 $\beta$	103
El complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ regula funciones específicas de p110 $\beta$	105
PTEN no es esencial para el complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$	106
El complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ regula la actividad de PTEN en el PAC	106
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>111</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO</b>	<b>137</b>







# ABREVIATURAS



**ABREVIATURAS**

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosina 5' trifosfato
ATR	<i>ATM- and Rad3-related</i>
BcR	<i>Break Cluster Region homology</i>
Ca <sup>++</sup>	Ión Calcio
Cdc42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
Dominio ABD	Dominio <i>Adaptor Binding Domain</i>
Dominio RBD	Dominio <i>Ras Binding Domain</i>
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino- tetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Etilenglicol bis
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FTK	<i>Fusion tyrosine kinase</i>
GFP	Proteína verde fluorescente
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
Hepes	Hidroxietil piperazina etanosulfato
Lys	Lisina
NP40	Igepal CA-630
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
PMSF	Fluoruro de para-metilsulfato

PTEN	Fosfatasa de homología a tensina delecionada en el cromosoma 10
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil-sulfato sódico
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
shARN	<i>Small hairpin</i> ARN
PDB	<i>PI(4,5)P<sub>2</sub>-binding domain</i>
p130Cas	<i>p130 Crk-associated substrate</i>
PI	<i>Phosphatidylinositol</i>
PIK	<i>PI kinase homology domain</i>
Ser	Serina
SH2	Dominio 2 de homología con la quinasa src
SH3	Dominio 3 de homología con la quinasa src
SEM	Error estándar de la media
SMG-1	<i>Suppressor with morphogenetic effect on genitalia-1</i>
Thr	Treonina
TOR	<i>Target of rapamycin</i>
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TRRAP	<i>Transformation/transcription domain-associated protein</i>
TX100	TritónX-100
Tyr	Tirosina
VEGF-A	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>
VPS34	<i>Vacuolar-protein-sorting-protein</i>





# SUMMARY





**SUMMARY**

One of the central pathways that enhances cell survival, division and migration, and is frequently deregulated in cancer is that of PI3K/PTEN (phosphoinositide 3-kinase/phosphatase and tensin homolog). Although four genes encode PI3K p110 catalytic subunits and there are seven regulatory subunits, only the p110 $\alpha$  and p110 $\beta$  isoforms and the p85 regulatory subunits are expressed ubiquitously in body tissues. When cells are activated to enter the cell cycle, the PI3K catalyze formation of the phosphatidylinositol (PI)(3,4,5)P<sub>3</sub>, a second messenger that triggers a number of important signaling cascades; PTEN subsequently reduces PI(3,4,5)P<sub>3</sub> to basal levels. Activation of p110 $\alpha$  precedes that of p110 $\beta$  at several points in the cell cycle, during G0/G1 and G1/S transitions and at mitosis entry; nonetheless, it is not known whether p110 $\alpha$  and p110 $\beta$  activation are linked. In addition, PI3K activation precedes that of PTEN, but its ability to regulate PTEN activation has not been studied.

We explored the potential connections between p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  and PTEN activation, and found that serum stimulation of cells promotes p110 $\alpha$  and p110 $\beta$  association, which demonstrates oligomerization of PI3K catalytic subunits within the cells. Moreover, p110 $\alpha$  regulates optimal p110 $\beta$  activation by direct association of the two isoforms. p85 dimerization through N-terminal SH3-BcR domains is necessary for p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  complex formation. PTEN is also incorporated into the p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  complex, and its activation depends on its association to this oligomer. Our results show that PI3K and PTEN activities regulate one other within a multimolecular complex that controls cell PI(3,4,5)P<sub>3</sub> levels.



# INTRODUCCIÓN



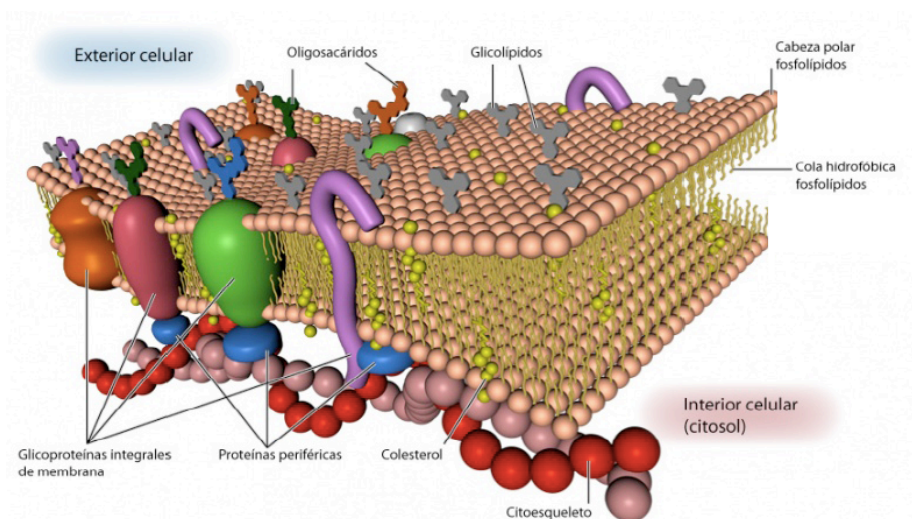
## INTRODUCCIÓN

### 1. La señalización celular por enzimas modificadoras de lípidos

El modelo en Mosaico Fluido de la membrana plasmática planteado por Singer y Nicolson (Singer y Nicolson, 1972) completó la teoría de Gorter y Grendel por la cual todas las células están delimitadas por bicapas lipídicas (Gorter y Grendel, 1925). Dichas bicapas, al mismo tiempo que delimitan y aíslan a la células del ambiente externo, ofrecen la posibilidad de comunicación constante y continua entre el exterior y el interior celular. Por tanto, la membrana lipídica posibilita la transducción de una señal externa al interior de la célula traduciéndose en nuevas respuestas y adaptaciones celulares al nuevo escenario molecular y/o ambiental (FIG. 1).

La célula emplea múltiples mediadores intracelulares que facilitan que el estímulo recibido en los receptores de la membrana sea transmitido y amplificado para generar una respuesta celular compleja y completa. Entre estos mediadores destacan mayoritariamente proteínas quinasas y proteínas adaptadoras que facilitan el ensamblaje de otras moléculas de señalización. Por otro lado, existen segundos mensajeros como el ión  $\text{Ca}^{++}$  o AMPc que ayudan a amplificar la señal (Downward, 2001).

En este sentido, los lípidos son considerados como potentes segundos mensajeros en transducción de la señal debido a su gran versatilidad estructural y organización en la membrana (Hurley y Misra, 2000).



**Figura 1. Esquema del modelo del mosaico fluido de Singer y Nicholson (1972).** Figura adaptada de [www.biologiasynapsis.com](http://www.biologiasynapsis.com).

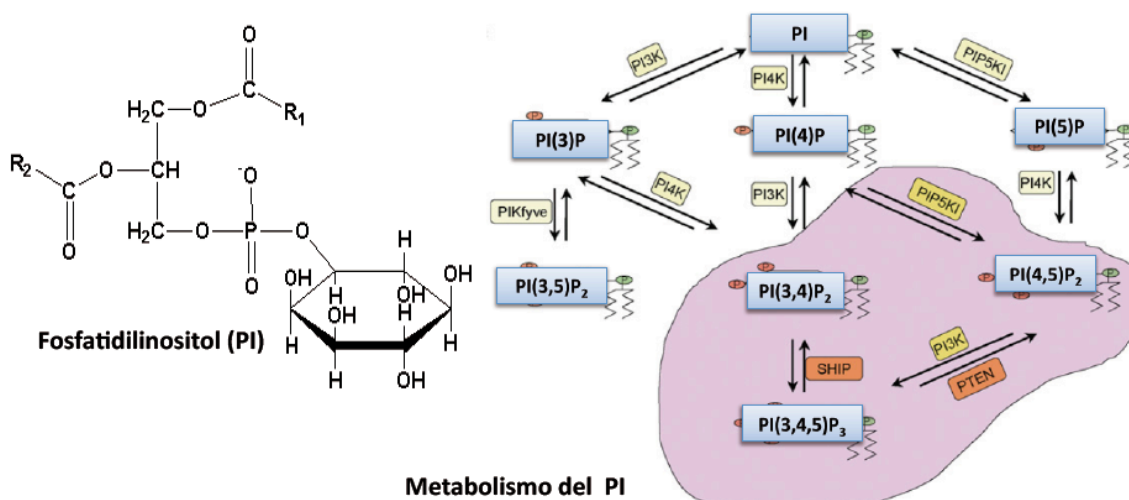
Los fosfolípidos son los componentes mayoritarios de las membranas. De entre ellos, el fosfatidilinositol es el principal precursor del resto de segundos mensajeros lipídicos. Posee la capacidad de ser fosforilado en cualquiera de los cinco grupos OH- que posee generándose los distintos fosfoinosítidos posibles.

Tres tipos de fosfoinosítidos se han descrito en células de mamífero:

Monofosfoinosítidos: PI(3)P, PI(4)P y PI(5)P

Bifosfoinosítidos: PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(4,5)P<sub>2</sub>

Trifosfoinosítidos: PI(3,4,5)P<sub>3</sub>.



**Figura 2. Estructura y metabolismo del fosfatidilinositol (PI).** Figura adaptada de Min y Abrams, 2009.

En general, las funciones biológicas asociadas a los fosfoinosítidos en la célula se pueden resumir en:

- 1) Servir como puntos de anclaje para proteínas con capacidad de unión a lípidos, provocando un cambio de localización y en ocasiones de actividad.
- 2) Crear nuevos sustratos para fosfolipasas a partir de los cuales puedan generarse otros segundos mensajeros como el diacilglicerol y otros inosítidos solubles.
- 3) Modificar la estructura de la membrana por interacciones electroestáticas (Divecha, 2010; Fruman et al., 1998).

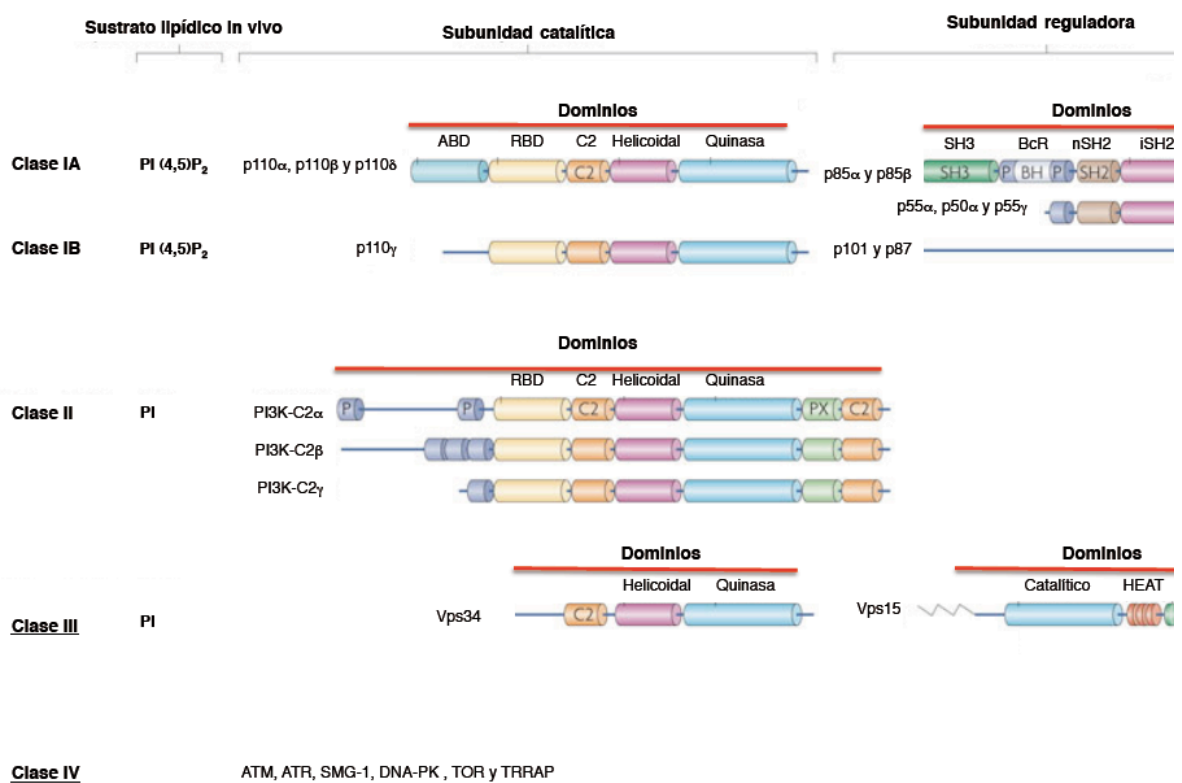
## 2. La familia de las PI3K

Las fosfatidilinositol-3 quinazas son enzimas pertenecientes a una familia conservada de quinazas intracelulares capaces de fosforilar la posición 3'-OH del anillo inositol del fosfatidilinositol (PI, del inglés *phosphatidylinositol*). El producto de esta reacción permite la activación de numerosas respuestas celulares, actuando por tanto, como segundos mensajeros intracelulares (Engelman et al., 2006).

Dichas enzimas se caracterizan por poseer un dominio catalítico y un dominio PIK (del inglés *PI kinase homology domain*). Los productos generados por dicha familia de enzimas son PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, PI(3,4)P<sub>2</sub> y PI(3)P.

## 3. Clasificación de la PI3K

La familia de la PI3K se agrupa en 4 grandes clases dependiendo de la homología en su secuencia y la especificidad de sustrato (FIG. 3).



**Figura 3. Clasificación de la familia de PI3K.** Figura adaptada de Vanhaesebroeck y Guillermet-Guibert, 2010.

### 3.1 Clase I

Son enzimas capaces de generar PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, PI(3,4)P<sub>2</sub> y PI(3)P *in vitro*, aunque *in vivo* su sustrato preferente es PI(4,5)P<sub>2</sub> convirtiéndose en las principales responsables de la generación de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> en la célula (Hawkins et al., 1992; Miled et al., 2007).

La clase I se subdivide a su vez en Clase IA y Clase IB dependiendo del receptor que inicialmente se vinculó a su activación. Las PI3K de clase IA se activan por receptores Tyr-quinasas mientras que la clase IB se activan preferentemente por receptores acoplados a proteína G (GPCR, del inglés *G protein-coupled receptors*).

Las PI3K de clase IA se caracterizan por ser heterodímeros compuestos por una subunidad reguladora (p85) y una subunidad catalítica p110. Tres isoformas pertenecen a esta subclase: p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  y p110 $\delta$ . La clase IB está compuesta por solo una isoforma p110 $\gamma$  que se une a dos posibles subunidades reguladoras (p101 y p84/p87).

Por lo que se refiere a la expresión de las PI3K de clase I, p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  se expresan de forma ubicua en todos los tejidos, mientras que p110 $\delta$  y p110 $\gamma$  se expresan mayoritariamente en el linaje hematopoyético (Engelman et al., 2006).

#### 3.1.1 Estructura de la subunidad catalítica p110

En la estructura de la subunidad catalítica p110 (FIG. 4) se pueden distinguir cinco dominios:

Dominio ABD (del inglés *Adaptor Binding Domain*): Se trata de un pequeño dominio globular que se une con gran afinidad al dominio iSH2 de la subunidad reguladora p85 (Miled et al., 2007). Además se ha descrito otro contacto del dominio ABD con el dominio quinasa del propio p110 (Huang et al., 2007).

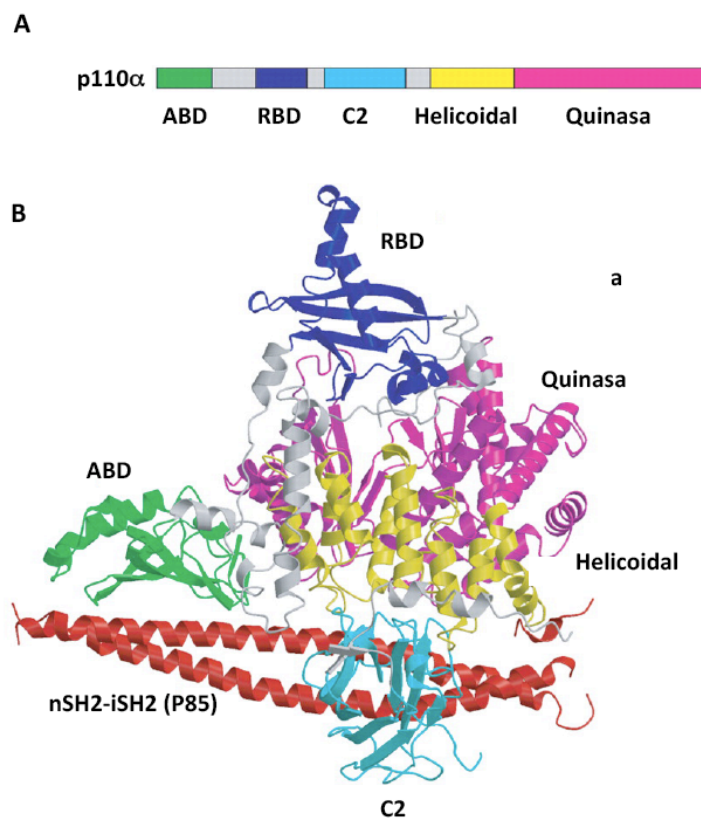
Dominio de unión a RAS (RBD, del inglés *RAS binding domain*): Al igual que el dominio ABD, RBD presenta una estructura globular. Se trata de un dominio que colabora en la activación completa de p110 por unión directa a RAS (Walker et al., 1999).

Dominio C2: Dominio enriquecido en aminoácidos básicos y asociado a la interacción con membranas (Pacold et al., 2000). También se ha descrito una interacción entre el dominio C2 y el iSH2 de p85 (Huang et al., 2007). Una característica específica del dominio C2 de p110 $\beta$  es la presencia de una señal de localización nuclear (NLS, del inglés *nuclear localization sequence*) que le facilita su entrada al núcleo (Kumar et al., 2011).



**Dominio Helicoidal:** Dominio con estructura de  $\alpha$ -hélices antiparalelas. Su principal función es hacer de puente entre los dominios C2 y dominio quinasa. Se ha descrito una interacción entre este dominio y el dominio nSH2 de p85 (Huang et al., 2007).

**Dominio Quinasa:** En este dominio reside la actividad catalítica de la PI3K. Es decir, es el dominio que une ATP para proporcionar el grupo fosfato utilizado para convertir  $PI(4,5)P_2$  en  $PIP(3,4,5)P_3$ . Se trata de una estructura formada por dos lóbulos (N- y C-terminal) flanqueando una hendidura donde se une el ATP, una arquitectura típica de proteínas y lípidos quinasas. La estructura de este dominio está altamente conservada entre las PI3K de clase I, en particular para los residuos del sitio de unión al sustrato situados entre los lóbulos N- y C-terminal del dominio quinasa (Huang et al., 2007).



**Figura 4. Estructura de la subunidad catalítica p110.** (A) Estructura de la subunidad p110 con los dominios ABD( de unión a p85), RBD ( de unión a Ras), C2( unión a membranas), Helicoidal (puente entre dominio C2 y quinasa), quinasa ( actividad catalítica). (B) Estructura tridimensional de p110 uniéndose al segmento nSH2-iSH2 de p85. Figura adaptada de Huang et al., 2007.

### 3.1.2 Estructura de las subunidades reguladoras de clase I

Las enzimas de clase IA (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  y p110 $\delta$ ) se unen a cinco posibles subunidades reguladoras (p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , p50 $\alpha$ , p85 $\beta$  y p55 $\gamma$ ). Dichas subunidades están codificadas por 3 genes:

- *PIK3R1*, codifica p85 $\alpha$  y sus variantes de procesamiento alternativo p55 $\alpha$  y p50 $\alpha$ .
- *PIK3R2*, codifica la subunidad reguladora p85 $\beta$ .
- *PIK3R3*, codifica para p55 $\gamma$ .

p110 $\gamma$ , perteneciente a la subclase IB, se une a dos subunidades reguladoras: p101 (codificada por *PIK3R5*) y p84/87 (codificada codificadas por *PIK3R6*). Por otro lado, el gen *PIK3R4*, también codifica una subunidad reguladora de PI3K, pero en este caso es la subunidad reguladora de PI3K de clase III (descrita más adelante).

Las subunidades reguladoras de clase IA, al igual que las catalíticas, poseen también una estructura modular (FIG. 5). Cada subunidad consta de dos grandes porciones (N-terminal y C-terminal) con varios dominios que explicamos a continuación comenzando desde el extremo N-terminal hacia el extremo C-terminal:

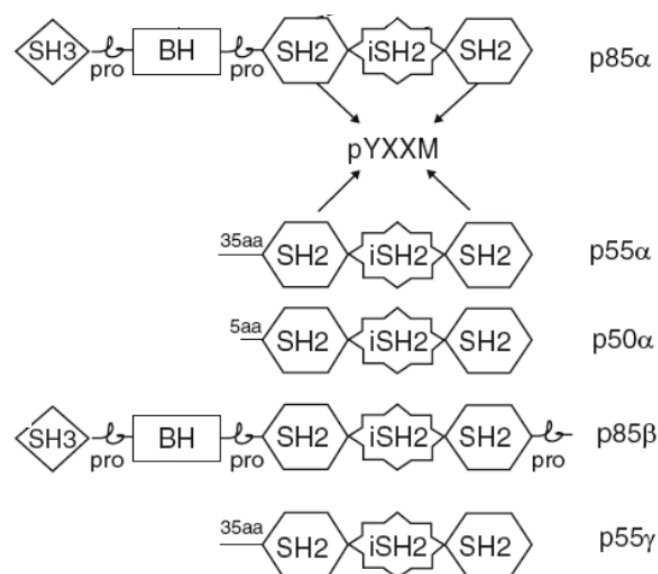
**Porción N-terminal (dominios SH3-BCR):** La porción N-terminal de p85 $\alpha$  y p85 $\beta$ , posee un dominio SH3 y dos regiones ricas en prolinas flanqueando un dominio BcR (del inglés *Break Cluster Region homology*).

**Dominio SH3:** El dominio SH3 se une con gran afinidad a los motivos PPXP y RXLPPRPXX (Yu et al., 1994). Este dominio facilita la interacción de p85 con diversas proteínas como dinamina, Src, Cbl, Shc y FTK (del inglés *fusion tyrosine kinases*) (Booker et al., 1993; Harrison-Findik et al., 1995; Liu et al., 1993; Ren et al., 2005a). Por otro lado se ha descrito la capacidad de dicho dominio de interactuar con las regiones ricas en prolina de otras subunidades reguladoras p85, mediando así una dimerización intermolecular p85-p85 (Harpur et al., 1999).

**Dominio BcR:** El dominio BcR también colabora en la interacción entre dos subunidades reguladoras p85 pues se ha descrito la capacidad de interacción homotípica BcR-BcR (Harpur et al., 1999). Por otro lado, el dominio BcR tiene la capacidad de unir las formas Rac-GTP (Tolias et al., 1995), Cdc42-GTP (Garcia et al., 2006), Rab4 y Rab5 (Chamberlain et al., 2010). Por ello diversas funciones se han asociado con el dominio BcR:

- Prolongar la activación de proteínas GTPasas por competición con los GAPs.
- Posicionar pequeñas proteínas G cerca de la membranas.
- Posicionar el enzima de PI3K cerca de la membrana activando la subunidad catalítica.
- Reorganización del citoesqueleto a través de sus proteínas asociadas.

Recientemente se ha descrito que esta porción N-terminal (incluyendo los dominios SH3-BcR) se une directamente a PTEN y provoca, *in vitro*, un incremento en su actividad fosfatasa (Chagpar et al., 2010).



**Figura 5. Estructura de la subunidad reguladora p85 y sus formas de procesamiento alternativo.**  
Figura adaptada de Fruman D.A., 2010.

**Porción C-terminal (Dominios –nSH2-iSH2-cSH2):** p85 posee 2 dominios SH2 (del inglés *Src homology domain 2*): N-terminal (nSH2) y C-terminal (cSH2); flanqueando la región inter-SH2 (iSH2). Los dominios n y cSH2 tienen afinidad por tirosinas fosforiladas que se encuentran a 2 aminoácidos de una metionina (motivo pYXXM). Por tanto los dominios SH2 median la translocación de PI3K a los receptores fosforilados tras su activación.

**Dominio nSH2:** el dominio nSH2 contacta con el dominio helicoidal de p110 y colabora en el mantenimiento del estado de baja actividad de PI3K previamente a su activación (Miled et al., 2007). Se han descrito mutaciones puntuales frecuentes activadoras

en los residuos del dominio helicoidal de p110 $\alpha$  que contacta con el nSH2 de p85 las cuales inducen activación constitutiva de p110 $\alpha$  y de los efectores Akt y TOR (Gymnopoulos et al., 2007; Kang et al., 2005). Se trata de mutaciones frecuentes en mama y colon ([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)).

Dominio iSH2: Por lo que se refiere a la región iSH2 su función principal es mediar la formación estable del dímero p85/p110 a través de su interacción con el dominio ABD de p110. Además, se ha observado un punto de contacto entre el iSH2 y el dominio C2 de p110 $\alpha$  (Huang et al., 2007). Dicha interacción también contribuye a la estabilización de p110. Mutaciones que interrumpen este contacto también han sido descritas (Parsons et al., 2008). Por último, también se produce un contacto intramolecular entre el nSH2 y el iSH2 aunque su función se desconoce pues su alteración no afecta la actividad de p110 (Wu et al., 2009).

Dominio cSH2: Este dominio es esencial para la correcta regulación de p85 sobre p110. De hecho se han descrito formas truncadas p85 en este dominio que producen la desinhibición de la subunidad catalítica derivando en transformación oncogénica: p65 aislada de timoma de ratón (Jimenez et al., 1998), y p76 identificada en células aisladas de linfoma de Hodgkin (Jucker et al., 2002).

Las formas de procesamiento alternativo de p85 y la subunidad reguladora p55 $\gamma$  no poseen la región N-terminal. p55 $\alpha$  tiene 35 aminoácidos en su N-terminal homólogos a la subunidad p55 $\gamma$  mientras que p50 $\alpha$  solo posee 5 aminoácidos en su N-terminal. Por lo que se refiere a su expresión, mientras que p85 $\alpha$  y p85 $\beta$  se expresan en todos los tejidos, p55 $\gamma$  ve restringida su localización al cerebro, testículo de ratón y tejidos embrionarios (Pons et al., 1995). Por último, p50 $\alpha$  se expresa mayoritariamente en el hígado y de forma moderada en riñón y cerebro (Kok et al., 2009).

### 3.2 Clase II

Las PI3K de clase II fueron descubiertas por su homología de secuencia con las PI3K de clase I y III (MacDougall et al., 1995). Se caracterizan por poseer un gran dominio catalítico (>170 kDa), la presencia en su estructura de un dominio C2 en su carboxi-terminal y por carecer del dominio de unión a Ras. Las PI3K de clase II no unen de manera constitutiva subunidades reguladoras.

Tres diferentes isoformas de PI3K de clase II han sido descritas en mamíferos: PI3K-C2 $\alpha$ , PI3K-C2 $\beta$  y PI3K-C2 $\gamma$ . Son capaces de fosforilar PI, PI(4)P y PI(5)P *in vitro*.

A pesar de que su función sigue siendo bastante desconocida, se cree que generan PI(3)P *in vivo* y se han relacionado con procesos de endocitosis, exocitosis y autofagia (Devereaux et al., 2013; Falasca y Maffucci, 2012).

Por lo que se refiere a su expresión, PI3K-C2 $\alpha$  y PI3K-C2 $\beta$  se expresan de forma ubicua en todos los tejidos mientras que PI3K-C2 $\gamma$  restringe su expresión al hígado, próstata y testículo (Falasca y Maffucci, 2007; Maffucci et al., 2005).

### 3.3 Clase III

Hasta el momento solo se ha identificado una única PI3K de clase III. Se trata de VPS34 (del inglés *vacuolar-protein-sorting-protein*) descubierta en *Sacharomyces cerevisiae* e identificada en mamíferos como *PIK3C3*. Esta enzima forma de manera constitutiva un heterodímero con la proteína reguladora miristoilada Vps15 en levaduras (p150 en mamíferos y codificada por el gen *PIK3R4*).

Su función está asociada con la producción del PI(3)P celular y el tráfico vesicular. Concretamente actúa en autofagia, tráfico endosomal y fagocitosis (Devereaux et al., 2013; Vanhaesebroeck et al., 2010).

### 3.4 Clase IV

En dicha clase se engloban proteínas Ser/Thr quinasas con estructura única, donde su dominio catalítico comparte homología con la familia PI3K pero sin actividad lípido quinasa. En la actualidad se conocen seis: ATM (del inglés *ataxia telangiectasia mutated*) ATR (del inglés *ATM- and Rad3-related*), SMG-1 (del inglés *suppressor with morphogenetic effect on genitalia-1*), DNA-PK (del inglés *DNA-dependent protein kinase*), TOR (del inglés *target of rapamycin*, también llamado FRAP) y TRRAP (del inglés *transformation/transcription domain-associated protein*) (Abraham, 2001).

En general se trata de proteínas con funciones nucleares, a excepción de TOR. Así por ejemplo, DNA-PK, ATM y ATR participan en procesos de reparación del ADN (Durocher y Jackson, 2001). Las proteínas TOR controlan el crecimiento celular integrando señales de factores de crecimiento, disponibilidad de nutrientes, estrés y niveles de energía celular (Inoki et al., 2005; Laplante y Sabatini, 2012). SMG-1 regula el control de la estabilidad de algunos ARNm (Yamashita, 2013). Y por último, TRRAP forma parte esencial de diferentes complejos con función histona acetiltransferasa relacionados con transcripción, replicación y reparación del ADN (Murr et al., 2007).

## 4. Funciones específicas de las isoformas de clase I

### 4.1 p110 $\alpha$

La delección del gen *pik3ca* es letal durante el desarrollo embrionario del ratón. Concretamente los embriones mueren entre el estadio embrionario E9.5 y E10.5 (Bi et al., 1999). p110 $\alpha$  es esencial en metabolismo y crecimiento celular (Foukas et al., 2006). De hecho ratones generados con mutación inactivadora de p110 $\alpha$  (D933A), muestran en heterocigosis (letalidad embrionaria en homocigosis) defectos en señalización a través de las proteínas IRS (del inglés *insulin receptor substrate*) por estimulación con insulina, IGF-1 (del inglés *insulin-like growth factor-1*) y leptina. Este defecto provoca un retardo en el crecimiento, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hiperfagia e incremento de la adiposidad (Foukas et al., 2006).

Por otro lado, se ha demostrado que p110 $\alpha$  es esencial en respuestas celulares a otros factores de crecimiento como EGF (del inglés *epidermal growth factor*) y PDGF (del inglés *platelet derived growth factor*), y además es necesario para transformación oncogénica y la diferenciación de MEFs a adipositos (Zhao et al., 2006). En otro estudio, la inactivación específica del gen *pik3ca* en el hígado muestra de nuevo un papel fundamental en la señalización por insulina, el control de la glucosa hepática y el metabolismo lipídico (Sopasakis et al., 2010). También, p110 $\alpha$  juega un papel único en la entrada en ciclo celular así como también un papel importante en la entrada en fase S y M (Kumaretal., 2006; Marqués et al., 2008; Silio et al., 2012). Finalmente, la actividad de p110 $\alpha$  es esencial para el proceso de angiogénesis *in vivo*. Concretamente, se ha descrito que la inactivación de p110 $\alpha$  afecta en las primeras etapas del proceso pero su actividad es estrictamente necesaria para el posterior brote angiogénico y remodelación vascular; p110 $\alpha$  tiene un papel importante en la migración de las células endoteliales dependiente de la señalización por VEGF-A (del inglés *vascular endothelial growth factor A*) (Graupera et al., 2008).

### 4.2 p110 $\beta$

Al igual que p110 $\alpha$ , los ratones deficientes en p110 $\beta$  presentan letalidad embrionaria. En este caso, mucho más temprana en torno al estadio de desarrollo embrionario E3.5, previo a la formación del blastocisto (Bi et al., 2002). La letalidad de los animales deficientes en p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  demuestra que ambas isoformas presentan funciones no redundantes durante el desarrollo embrionario. De hecho se han descrito funciones

específicas en la homeostasis de las células madre embrionarias de ratón. Mientras p110 $\alpha$  actuaría a nivel de control de la proliferación, p110 $\beta$  regularía más directamente los circuitos de pluripotencia de dichas células (Kingham y Welham, 2009).

Al contrario que p110 $\alpha$  (de localización mayoritaria en citoplasma), p110 $\beta$  se localiza en el citoplasma y en el núcleo (Kumar et al., 2011). Existen una serie de funciones específicas para p110 $\beta$  en el núcleo relacionadas con la homeostasis del ADN:

- Tiene un papel esencial en entrada y progresión de la fase S (reclutamiento de PCNA a la cromatina) (Marqués et al., 2008; Marqués et al., 2009).
- Regula la respuesta celular a daño en el ADN (Kumar et al., 2010).
- Juega un papel importante la secreción de los cromosomas durante la mitosis (Silio et al., 2012).
- Controla el ensamblaje del factor de replicación C (RFC) y su función (Redondo-Muñoz et al., 2013).

Por otro lado se ha publicado que p110 $\beta$  se asocia a vesículas de clatrina estando por tanto implicada en la formación de endosomas y el proceso de endocitosis (Ciraolo et al., 2008; Shin et al., 2005). Relacionado con el ensamblaje y tráfico de vesículas, p110 $\beta$  tiene un papel muy importante en autofagia. Se ha observado que bajo condiciones limitantes de factores de crecimiento, p110 $\beta$  se disocia de los receptores para dichos factores de crecimiento y aumenta su interacción con la GTPasa Rab5. Esta asociación mantiene activa la proteína Rab5 favoreciendo la estabilidad del complejo Rab5-Vps34, el cual promueve autofagia en la célula (Dou et al., 2013). Se ha descrito un papel fundamental en la regulación de la formación y estabilidad de la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , necesaria para la activación de las plaquetas. De hecho, la inhibición de p110 $\beta$  *in vivo* evita la formación de trombos plaquetarios convirtiéndose p110 $\beta$  en diana para la terapia antitrombótica (Jackson et al., 2005).

Recientemente se ha publicado que p110 $\beta$  regula la migración de las células precursoras neurales durante el desarrollo del sistema nervioso. p110 $\beta$  se activa en respuesta a CXCL12 y su actividad es necesaria para la correcta migración de las interneuronas inmaduras hacia el córtex cerebral (Holgado et al., 2013). Por último, p110 $\beta$  tiene un papel central durante la espermatogénesis, concretamente la activación de p110 $\beta$  es necesaria para el proceso de expansión de las espermatogonias dependiente de c-Kit (Ciraolo et al., 2010).

### 4.3 p110 $\delta$

El gen *pik3cd* es altamente expresado por los leucocitos, aunque también se expresa de forma moderada en neuronas (Eickholt et al., 2007; Kok et al., 2009). Con respecto a su función, el análisis de los ratones deficientes de p110 $\delta$  indica que son viables, fértiles y aparentemente sanos. Sin embargo, tanto los ratones generados por la eliminación total del gen *pik3cd* –ratones p110 $\delta$  KO (del inglés *knock-out*)– o por mutación inactivadora del dominio quinasa –ratones PI3K $\delta$  (Asp910Ala)– muestran una respuesta inmune alterada (Clayton et al., 2002; Hirsch et al., 2000; Jou et al., 2002; Okkenhaug et al., 2002; Sasaki et al., 2000).

Los ratones mutantes para PI3K $\delta$ , tanto los ratones KO como los mutantes inactivos, muestran defectos específicos en el desarrollo de células B y deterioro en la generación de anticuerpos T-dependientes y T-independientes tras estimulación antigénica *in vivo*. Curiosamente, sólo los ratones con mutación inactiva PI3K $\delta$  (Asp910Ala), y no los ratones KO, exhiben actividad alterada de células T *in vitro* e *in vivo*. Por el contrario, tanto los ratones KO como los mutantes inactivos de p110 $\delta$  muestran deterioro en las respuestas alérgicas mediadas por mastocitos y anafilaxia pasiva atenuada *in vivo* (Clayton et al., 2002; Jou et al., 2002; Okkenhaug et al., 2002; Puri y Gold, 2012). Finalmente, se ha descrito que p110 $\delta$  tienen una función específica en células T reguladoras (Patton et al., 2006) y en macrófagos (Papakonstanti et al., 2008).

### 4.4 p110 $\gamma$

Al igual que ocurre con p110 $\delta$ , el gen *pik3cg* tiene una alta expresión en los leucocitos. De hecho, los ratones deficientes en p110 $\gamma$  son viables y fértiles pero presentan un inmunofenotipo específico asociado (Hirsch et al., 2000). La deficiencia en PI3K $\gamma$  conduce al deterioro, *in vitro* e *in vivo*, en el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos a los focos de inflamación (Hirsch et al., 2000; Hayer et al., 2009; Randis et al., 2008). Frente a estímulos inflamatorios, se produce un “*burst*” oxidativo defectuoso de los neutrófilos, una migración alterada de las células dendríticas, y una peor activación de las células T (Alcázar et al., 2007; Del Prete et al., 2004; Hirsch et al., 2000; Sasaki et al., 2000).

PI3K $\gamma$  se expresa también en cardiomiocitos (revisado por Redondo-Muñoz et al., 2014). El ratón generado con una mutación inactivadora de PI3K $\gamma$  muestra los mismos defectos a nivel de sistema inmune pero además presenta un fenotipo cardíaco diferente al del animal deficiente en PI3K $\gamma$  (Patrucco et al., 2004). Los ratones deficientes no presentan



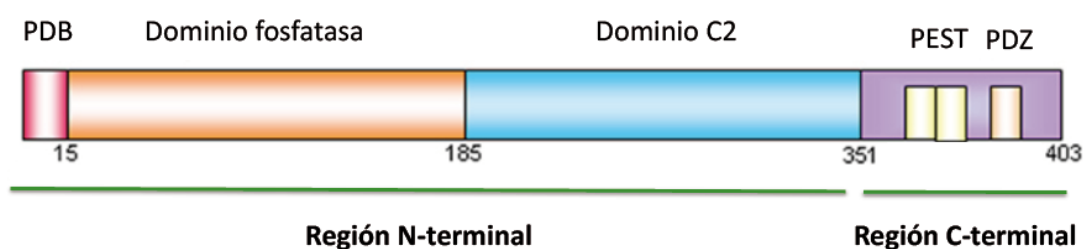
alteraciones estructurales en el corazón pero si muestran un incremento en la contractibilidad basal de sus cardiomiocitos debido a un incremento de sus niveles basales de AMPc (Crackower et al., 2002; Patrucco et al., 2004). Sin embargo, los cardiomiocitos de los ratones con mutación inactivadora de p110 $\gamma$  presentan niveles normales de AMPc y contractibilidad normal. Esto pone de manifiesto una función quinasa independiente para p110 $\gamma$  al igual que ocurre con p110 $\beta$  (revisado por Redondo-Muñoz et al., 2014).

## 5. PTEN (fosfatasa homóloga de la tensina deletada en el cromosoma 10)

PTEN es una enzima fosfatasa con función de supresor tumoral que actúa sobre sustratos lipídicos y polipeptídicos. PTEN cataliza la conversión de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> a PI(4,5)P<sub>2</sub> en membranas (Maehama y Dixon, 1998; Shi et al., 2012) y se considera como el principal antagonista de la señalización lipídica celular vía PI3K. También se ha demostrado que PTEN posee actividad proteína fosfatasa frente a si misma o frente a otras proteínas como FAK (del inglés *focal adhesion kinase*) o p130Cas (del inglés *p130 Crk-associated substrate*) (Gu et al., 1999; Mahimainathan y Choudhury, 2004; Raftopoulou et al., 2004; Tamura et al., 1998).

### 5.1 Estructura de PTEN

PTEN está formado por 403 aminoácidos y se caracteriza por poseer 5 dominios funcionales agrupados en dos grandes regiones: región N-terminal (aminoácidos 1-351) y región C-terminal (aminoácidos 352-403) (FIG. 6). A continuación describimos con más detalle su estructura.



**Figura 6. Estructura de PTEN.** La estructura de PTEN está formada por los dominios PDB (unión a membranas), fosfatasa (actividad catalítica), dominio C2 (unión a membranas y regulación de PTEN), dominio PEST (modificación y regulación de PTEN) y dominio PDZ (interacción con otras proteínas y regulación de PTEN). Figura adaptada de Molinari y Frattini, 2014.

**Región N-terminal:** Engloba los dominios funcionales PDB (del inglés *PI(4,5)P<sub>2</sub>-binding domain*) (aminoácidos 6-15), dominio fosfatasa (aminoácidos 16-184) y el dominio C2 (aminoácidos 185-351).

**Dominio PDB:** Dominio que regula la asociación de PTEN con membranas.

**Dominio Fosfatasa:** Este dominio de PTEN defosforila con gran afinidad el grupo fosfato en la posición D3 del anillo inositol. Se caracteriza por poseer el motivo catalítico HCXXGXXR (dónde X es cualquier aminoácido) presente en otras tirosina fosfatasas. Sin embargo PTEN es capaz de defosforilar sustratos altamente ácidos fosforilados en Tyr, Ser y Thr *in vitro*.

**Dominio C2:** Se trata de un dominio capaz de unir membranas fosfolipídicas *in vitro*, lo cual permite a PTEN inhibir la migración celular (Lee et al., 1999; Raftopoulou et al., 2004).

**Región C-terminal de PTEN:** Se trata de un fragmento largo de 170 aminoácidos muy flexible e involucrado principalmente en la regulación de PTEN. En él se pueden distinguir dos dominios:

**Dominio PEST** (Prolina, ácido Glutámico, Serina, Treonina): Consta de dos motivos PEST con varios residuos serina y treonina implicados en la fosforilación de PTEN y relacionados con la regulación de su actividad y estabilidad.

**Dominio PDZ** (del inglés *post-synaptic density 95, discs large, zonula occludens-1*): Se trata de un dominio que asocia proteínas incluyen en su estructura dominios PDZ como MAST205 (del inglés *microtubule-associated serine-threonine kinase 205 kDa*) o MAGI-2 (Song et al., 2012; Wang y Jiang, 2008).

## 5.2 Regulación de PTEN

La regulación de PTEN, tanto a nivel de expresión, estabilidad, localización intracelular y/o actividad, es un proceso altamente controlado. Su desregulación por mutaciones o deleciones (en heterocigosis o homocigosis) causa diferentes procesos tumorigénicos y síndromes hereditarios. En este sentido se han descrito mecanismos de regulación epigenética, de represión transcripcional, regulación por microARN (miARN) y modificaciones post-traduccionales (FIG. 7).

### 5.2.1 Regulación epigenética

PTEN se expresa de manera constitutiva en todos los tejidos. Sin embargo, en muchos tumores se ha observado una metilación aberrante del promotor de PTEN causando su silenciamiento (Hollander et al., 2011). Concretamente se ha observado hipermetilación en el 48% de los casos de cáncer esporádico de mama (Garcia et al., 2004), 16% en carcinoma hepatocelular (Kawaguchi et al., 2005), 50% cáncer de tiroides (Alvarez-Nuñez et al., 2006), y en el 20 % de los casos de leucemias linfoblásticas (Roman-Gómez et al., 2004). Por otro lado, la acetilación de las histonas también puede controlar la transcripción del gen de PTEN (Lu et al., 2009).

### 5.2.2 Regulación transcripcional de PTEN.

Hasta el momento se han descrito diversos factores de transcripción que regulan la expresión de PTEN tanto de forma positiva (p53, CBF1, PPAR $\gamma$ , EGR1), como negativa (SALL4, SNAIL, IDI1, EVI1, MYC, BMI1, c-JUN, NF-kB). La alteración de las vías en las cuales actúan estos factores de transcripción desencadena diferentes procesos de transformación tumorogénica (revisado por Song et al., 2012).

### 5.2.3 Regulación post-transcripcional por microARN

Recientemente se han descrito diferentes microARN (miARN) implicados en tumorogénesis y/o enfermedades metabólicas. La desregulación de estos miARN causa una disminución en los niveles de PTEN y por tanto una activación de la vía PI3K (revisado por Correia et al., 2014; Song et al., 2012). En la siguiente tabla se describen algunos de los miARN que regulan PTEN y cuya alteración se ha relacionado con algunas enfermedades.

miARN	Enfermedad
miR-17	Enfermedades linfoproliferativas, autoinmunidad
miR-19	Enfermedad de Cowden, leucemia
miR-21	Cáncer gástrico, inflamación, enfermedades metabólicas
miR-22	Cáncer de próstata
miR-26 <sup>a</sup>	Glioma

miR-29b	Cáncer de mama
miR-106b	Cáncer de próstata
miR-155	HCC
miR-214	Cáncer de ovario
miR-216a y miR-217	Enfermedad diabética renal
miR-221 y miR-222	HCC, cáncer gástrico
miR-301	Cáncer de mama
miR-486	Atrofia muscular
miR-494	Daño cardíaco

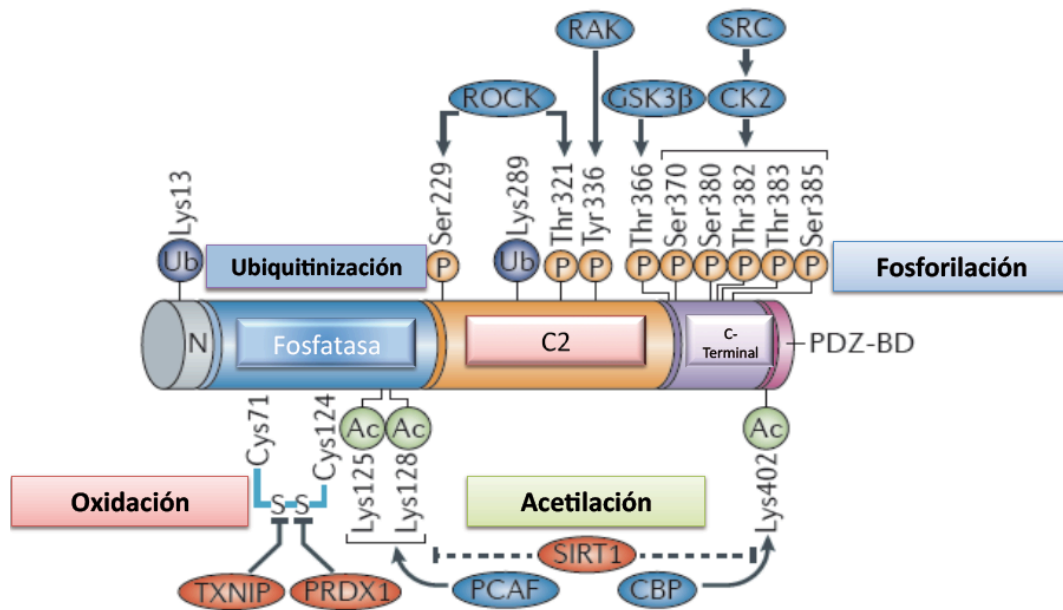
**Tabla 1. MicroARN implicados en la regulación de PTEN y cuya alteración está asociada a distintas enfermedades.**

## 5.2.4 Regulación post-traducciona de PTEN

### 5.2.4.1 Fosforilación de PTEN

Se han descrito distintas fosforilaciones capaces de alterar la estabilidad y la actividad catalítica de PTEN. Así por ejemplo, las fosforilaciones en la región C-terminal Ser 380, Thr382, Thr383 y Ser385 inhiben la actividad fosfatasa de PTEN favoreciendo al mismo tiempo un estado más estable y cerrado de la proteína. Estas fosforilaciones se asocian a la acción de CK2 (del inglés *casein kinase 2*) (Vázquez et al., 2001; Liang et al., 2010). CK2 además también es capaz de fosforilar a PTEN en el residuo Ser370 pero las consecuencias de esta modificación sobre la actividad PTEN se desconocen. Sin embargo, se ha observado que, previamente a la fosforilación de Ser370 por CK2, se produce un aumento en la fosforilación de Thr366 mediado por GSK3 $\beta$ . Dicha fosforilación está asociada a una disminución de la estabilidad de PTEN en líneas celulares de glioblastoma (Maccario et al., 2007).

En el dominio C2, PTEN es fosforilado por la quinasa ROCK (del inglés *Rho-associated protein kinase*) en la Ser229 y Thr321 activando PTEN (Li et al., 2005). Por otro lado RAK (palabra rusa que significa cáncer) estabiliza PTEN fosforilándolo en su Tyr336 (Yim et al., 2009).



**Figura 7. Modificaciones post-traduccionales de PTEN.** Se muestra un esquema con las distintas modificaciones post-traduccionales que regulan la actividad y estabilidad de PTEN. Figura adaptada de Song et al., 2012.

#### 5.2.4.2 Acetilación y oxidación de PTEN

Otras modificaciones sobre PTEN descritas hasta el momento incluyen procesos de acetilación. La acetilación de PTEN inhibe su actividad catalítica y aumenta su capacidad de interacción con otras proteínas a través de su dominio PDZ. Dicha acetilación se produce en la Lys125 y Lys128 por PCAF. Esta acetilación promueve la transición G1/S en ciclo celular y activación de PI3K. PTEN también se acetila en la Lys402 por CBP (Okumura et al., 2006). Por otro lado, Sirtuina1 (Sirt1) puede deacetilar a PTEN en este mismo residuo (Chae y Broxmeyer, 2011).

Al igual que otras fosfatasa PTEN posee cisteínas nucleófilas susceptibles de oxidación. Se han observado como el estrés oxidativo induce oxidación de las Cys71 y Cys124 reduciendo su actividad catalítica (Kwon et al., 2004; Lee et al., 2002). Sin embargo, se han descrito dos proteínas, peroxiredoxina 1(Prdx1) (Cao et al., 2009) y la proteína de interacción con tioredoxina (Txnip) (Hui et al., 2008), cuya función es capaz de contrarrestar la oxidación de PTEN.

### 5.2.4.3 Regulación de PTEN por ubiquitinación

PTEN se localiza principalmente en el citoplasma donde regula los niveles de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> en la membrana plasmática. Sin embargo, es capaz de translocarse al núcleo donde ejerce un papel más directo en estabilidad cromosómica, reparación del ADN y parada de ciclo celular (Planchon et al., 2008; Shen et al., 2007; Song et al., 2012). Uno de los mecanismos involucrado en el importe de PTEN al núcleo es su monoubiquitinación en las lisinas Lys13 y Lys289. Dicho proceso promueve la retención de PTEN en el núcleo y su función como supresor tumoral (Trotman et al., 2007). Por el contrario la poliubiquitinación está relacionada con retención de PTEN en el citoplasma y su degradación en el proteosoma (Ciechanover, 2005). La monoubiquitinación está vinculada a la acción de la E3 ligasa NEDD4-1 (Fouladkou et al., 2008). Su acción es antagonizada por la deubiquitilasa HAUSP (Song et al., 2008).

### 5.2.4.4 Sumoilación

Finalmente, otra modificación postraducciona observada en PTEN es la sumoilación. La proteína SUMO1 modifica covalentemente PTEN en sus lisinas Lys254 y Lys266 por adición de otra proteína de pequeño peso molecular (11kDa) llamada SUMO (del inglés *small ubiquitin-related modifier*). Ambos residuos modificados facilitan la unión de PTEN a la membrana plasmática por interacciones electroestáticas, mejorando su eficiencia a la hora de reducir los niveles de PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. La sumoilación de PTEN en Lys266 es esencial para su función como supresor tumoral, mientras que la sumoilación de la Lys254 es solo requerida parcialmente (Huang et al., 2012).

### 5.2.5 Regulación de PTEN por interacción proteína-proteína

Se han descrito varias proteínas capaces de interaccionar con PTEN y modificar su conformación, estabilidad, potencial de unión a membranas y distribución subcelular. En la siguiente tabla se describen la interacción y su efecto sobre la actividad de PTEN (revisado por Song et al., 2012).

Proteína	Región de unión a PTEN	Efecto sobre la actividad catalítica de PTEN
$\beta$ -arrestinas	Dominio C2	↑ actividad PPasa
SIPL1 ( <i>“Shank-interacting protein-like 1”</i> )	Región amino y carboxi terminal	↓ Actividad PPasa
ROCK ( <i>“Rho-associated protein kinase”</i> )	Dominio C2	↑ Estabilidad
PREX2a ( <i>Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 2</i> )	Región Carboxi-terminal	↓ Actividad PPasa
PICT1 ( <i>Protein interacting with carboxyl terminus 1</i> )	Dominio C2	↑ Estabilidad
PARK7 ( <i>Parkinson disease protein 7</i> )	Se desconoce	↓ Actividad PPasa
p85	Región N-terminal	↑ Actividad PPasa
NHERF ( <i>Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Regulatory Factor</i> )	Dominio de unión PDZ	↑ Actividad PPasa
Miosina V	Región Carboxi-terminal	↑ Actividad PPasa
MSP58 ( <i>58-kDa microspherule proteína</i> )	Región carboxi-terminal	↓ Actividad supresora de crecimiento (independiente de actividad PPasa)
MAN2C1 ( <i>Mannosidase, Alpha, Class 2C, Member 1</i> )	Se desconoce	↓ Actividad PPasa
MAGI2 ( <i>Membrane-associated guanylate kinase inverted 2</i> )	Dominio de unión PDZ	↑ Actividad PPasa
DLG1 ( <i>Disks large homolog 1</i> )	Se desconoce	↑ Estabilidad ↑ Actividad PPasa

**Tabla 2. Proteínas que interaccionan con PTEN a través de distintos dominios y regulan su actividad.**

### **5.2.6 Complejo de alto peso molecular asociado a PTEN (PAC, del inglés *PTEN associated complex*)**

Tal y cómo se ha mencionado anteriormente, PTEN presenta diferentes estados y formas de fosforilación. En general, PTEN fosforilado existe como monómero con conformación cerrada (inactivo) y con baja afinidad para interactuar con proteínas con dominio PDZ. La defosforilación de PTEN provoca un cambio conformacional hacia un estado más abierto e inestable. Dicha forma de PTEN es reclutada a un complejo de alto peso molecular (>600 kDa, PAC) (Vázquez et al., 2001). La subunidad reguladora p85 de PI3K se asocia directamente a PTEN defosforilado, estimulando su activación y el reclutamiento a este complejo de alto peso molecular (Chagpar et al., 2010; Rabinovsky et al., 2009). Por otro lado, se ha observado que la capacidad catalítica de PTEN no es esencial para el reclutamiento al complejo, pues los mutantes inactivos de PTEN son capaces de detectarse en el PAC. Sin embargo, el estado de fosforilación de PTEN sí que tiene un mayor impacto en el ensamblaje del complejo ya que en células PTEN<sup>-/-</sup> transfectadas con ADNc mimetizando a PTEN no fosforilado o fosforilado, se observa un enriquecimiento en el PAC de las formas de PTEN no fosforilado (Mosessian et al., 2009).

## **6. Alteraciones del eje PI3K/PTEN en cáncer**

El término cáncer designa un amplio grupo de enfermedades que se caracteriza por una multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer. En la actualidad se acepta que se trata de una enfermedad genética de múltiples pasos que conlleva la activación de oncogenes específicos, inactivación de genes supresores de tumores y una acumulación de eventos estocásticos que facilitan en último término la transformación y progresión tumoral (Vogelstein y Kinzler, 2004).

La señalización intracelular a través del eje PI3K/PTEN de manera general regula el crecimiento, supervivencia y proliferación celular. Por otro lado, se trata de una de las vías que aparece más frecuentemente mutada en cáncer. En alrededor del 50% de los procesos tumorigénicos existen amplificaciones génicas o mutaciones de alguno de los componentes de la vía (revisado por Chalhoub y Baker, 2009).



### 6.1 Alteraciones de p110 $\alpha$

*PIK3CA* aparece frecuentemente amplificado en tumores de cabeza y cuello, cervicales, gástricos y de pulmón. Por lo que se refiere a mutaciones puntuales, *PIK3CA* acumula el 80% de sus mutaciones en tres puntos calientes (“*hot-spots*”); dominio helicoidal (E542K, E545K) y en dominio quinasa (H1047R). Se trata de mutaciones activadoras de la enzima las cuales tienen alta incidencia en cáncer de próstata, mama, endometrio y colon (Chalhoub y Baker, 2009).

### 6.2 Alteraciones de p110 $\beta$

También se ha observado la amplificación del gen *PIK3CB* en algunos tipos de cáncer como por ejemplo tumores primarios de ovario y cáncer de tiroides. Además también ha sido registrado un aumento de ARNm de *PIK3CB* en cáncer de próstata, vejiga y neuroblastoma (Kok et al., 2009). Recientemente se ha descrito la primera mutación somática de p110 $\beta$  en tumores de mama HER2<sup>+</sup> (Kan et al., 2010). Su caracterización muestra una mutación E633K en el dominio helicoidal con un incremento basal de la actividad y un mayor potencial de transformación *in vitro* (Dbouk et al., 2013).

### 6.3 Alteraciones de p110 $\delta$

En el caso de p110 $\delta$ , se ha observado una sobreexpresión en leucemias mieloides agudas. Por otro lado, se expresa de manera consistente en algunos cánceres de piel, mama y colon. También se ha descrito un incremento en el ARNm de p110 $\delta$  en glioblastomas en ausencia de amplificación génica y en neuroblastomas; en este último caso, también se observa un aumento a nivel de proteína (Kok et al., 2009). Muy recientemente han sido publicados dos trabajos donde se describen por primera vez mutaciones del gen *PIK3CD* en la línea germinal. Dichas alteraciones provocan síndrome de inmunodeficiencia primario con aumento de la actividad PI3K, incremento de la fosforilación de Akt y alteraciones funcionales de las células B y T (Angulo et al., 2013; Lucas et al., 2014).

### 6.4 Alteraciones de p110 $\gamma$

Recientemente se ha descrito la primera mutación en el gen *PIK3CG*. Se trata de una mutación en el RBD de p110 $\gamma$  que cursa con problemas crónicos para el paciente a la hora de resolver enfermedades fúngicas (Bojarski et al., 2013). A nivel de ARN, se ha documentado un aumento en el número de copias del gen en cáncer de ovario (Zhang et al., 2007) y un aumento de expresión en leucemia crónica mieloide (Hickey y Cotter, 2006).

### 6.5 Otras alteraciones de la vía PI3K/PTEN

Se han descrito amplificaciones y mutaciones a nivel de receptores tirosina quinasa (EGFR, HER2, KIT, PDGFR $\alpha$ , MET) que alteran la señalización a través de la ruta PI3K/PTEN (Yuan y Cantley, 2008). También se han descrito varias amplificaciones de las isoformas de Akt (efector principal de la vía) en cánceres de ovario, páncreas y cuello (Engelman et al., 2006). Además, se ha descrito una mutación activadora en Akt1 (E17K) en cáncer de mama, colon y ovario (Carpten et al., 2007).

Por otro lado, tanto *PI3KR1* como *PI3KR2* (subunidades reguladoras p85) tienen potencial oncogénico. Se han observado varias mutaciones puntuales de ganancia de función tanto en p85 $\alpha$  como p85 $\beta$  en cáncer de endometrio (Cheung et al., 2011). Existen asimismo mutaciones de truncamiento del C-terminal o deleciones de secuencias en el dominio iSH2 que producen activación constitutiva de las isoformas p110 unidas (Jiménez et al., 1998). También se han identificado mutaciones de formas truncadas de p85 $\alpha$  en la región N-terminal (mutante E160) en cáncer de endometrio (Cheung et al., 2011).

### 6.6 Alteraciones de PTEN

PTEN aparece mutado o es delecionado tanto en cánceres espontáneos como hereditarios. Mutaciones en la línea germinal causan síndromes hereditarios autosómicos dominantes (hamartomas). Se han descrito mutaciones puntuales frecuentes en tumores del sistema nervioso central (20%), cáncer de endometrio (39%), colorrectal (9%), piel (17%), próstata (14%) y mama (6%) (<http://sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>). Por otro lado, la deleción del gen PTEN ocurre en el 70% de los glioblastomas y marca la transición hacia la transformación más agresiva de los astrocitos. PTEN es haploinsuficiente ya que la pérdida monoalélica de PTEN promueve el crecimiento tumoral y los niveles de la proteína se correlacionan de modo inverso con la agresividad de la enfermedad (Yuan y Cantley, 2008).

## 7. Aproximación terapéutica del cáncer en el eje PI3K/PTEN

El PI(3,4,5)P<sub>3</sub> generado por las PI3K está constitutivamente elevado en la gran mayoría de las células cancerosas pues tal y como hemos mencionado anteriormente, la vía PI3K está frecuentemente alterada en procesos tumorigénicos. Todas estas evidencias genéticas y la posibilidad de usar inhibidores farmacológicos en la ruta PI3K-Akt-mTOR/PTEN justifican el esfuerzo en la generación de fármacos antitumorales dirigidos al bloqueo de la vía.

Se han generado seis tipos de inhibidores: Inhibidores pan-clase I PI3K, inhibidores específicos de las isoformas PI3K, análogos de la rapamicina (rapálogos), inhibidores de mTOR, inhibidores pan-PI3K-mTOR y inhibidores de Akt (Fruman y Rommel, 2014).

Los resultados preliminares de este tipo de sustancias muestran multitud de efectos secundarios, entre ellos citotoxicidad general. Sorprendentemente, los mejores resultados han sido ofrecidos por un inhibidor específico de p110 $\delta$  (GS-1101) en el tratamiento leucemia crónica linfocítica. Los análogos de la rapamicina son usados en cánceres avanzados y como adyuvantes a la terapia hormonal en cáncer de mama. El campo de la terapia oncológica gira hacia la terapia combinada de inhibidores PI3K-Akt-mTOR/PTEN con otros compuestos con el fin de mejorar la especificidad y la multitud de resistencias que se han descubierto debido sobretodo al descubrimiento de “feed-backs” de señalización dentro de la ruta (Fruman y Rommel, 2014).

Para el desarrollo de una terapia oncológica con éxito dirigida a la ruta PI3K-Akt-mTOR/PTEN, es de suma importancia conocer el fondo genético del grupo de pacientes a ser tratados, entender los posibles efectos cruzados entre las moléculas de señalización a bloquear y los posibles bucles de retroalimentación que pueden derivarse al alterar la vía. En este sentido, en nuestro trabajo pretendemos profundizar en los mecanismos moleculares y las respuestas celulares reguladas por las isoformas de PI3K p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ , las cuales son expresadas en todos los tejidos y son diana de diversos fármacos, con el fin de conocer y diseñar una terapia oncológica optimizada. Esta tesis describe la existencia de una relación física y funcional entre las isoformas p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ . Su asociación y activación secuencial en complejo con PTEN (modulando su actividad fosfatasa) pone de manifiesto un nuevo mecanismo de regulación en la producción PI(3,4,5)P<sub>3</sub> por parte del eje de señalización PI3K/PTEN.



# OBJETIVOS



**OBJETIVOS**

- 1) Analizar y caracterizar la posible interacción entre las isoformas PI3K de clase IA p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ .
  
- 2) Determinar la función fisiológica del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ :
  - a) Estudio de la regulación de la actividad lípido quinasa de ambas isoformas en complejo.
  - b) Análisis de funciones específicas asociadas a p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  tras interferir en la formación del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ .
  
- 3) Estudiar la cinética de activación y asociación de PTEN con el complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ .
  
- 4) Caracterizar la regulación de la actividad fosfatasa de PTEN por el complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ .





# MATERIAL Y MÉTODOS



## 1. Anticuerpos

A continuación se adjunta una tabla que incluye los anticuerpos usados a lo largo de este trabajo.

<b>ANTICUERPO</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>
P110 $\alpha$ (C73F8)	Cell signaling
P110 $\beta$ (C33D4)	Cell signaling
P110 $\beta$ (S-19)	Santa Cruz Biotechnology
P85 pan	Millipore
P85 $\alpha$	Millipore
P85 $\beta$	Producido en nuestro laboratorio
HA-tag	Covance
Myc-tag (9B11)	Cell Signaling
6His-tag	Santa Cruz Biotechnology
p-Akt (Ser473)	Cell Signaling
p-Akt (Thre308)	Cell Signaling
PCNA	Transduction Labs
Akt	Cell Signaling
PTEN (6H2.1)	Millipore
PTEN (N-19)	Santa Cruz Biotechnology
PTEN (138G6)	Cell Signaling
$\beta$ -Actina	Sigma
P400	Abcam
Histonas	Millipore
Tubulina	Oncogene research
Sin-1	Bethyl Laboratories
Anticuerpos secundarios conjugados a HRP	Dako Cytomations

## 2. Cultivos celulares

### 2.1 Líneas celulares

Se han empleado distintas líneas celulares que fueron mantenidas con medios de cultivo óptimos para su crecimiento. Se utilizó medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS), L-Glutamina 2 mM, Penicilina/estreptomicina 100 U/ml y HEPES 10 mM para el crecimiento de:

Células U2OS: línea de osteosarcoma humano.

Células HEK 293T : células embrionarias humanas del riñón.

Células PC3: línea celular de cáncer de próstata.

Para el crecimiento de células NIH3T3 (línea de fibroblastos de ratón) usamos DMEM suplementado con 10% de suero de ternera, L-Glutamina 4 mM, y Penicilina/estreptomicina 100 U/ml.

Por último se han usado diferentes tipos de MEF (del inglés *mouse embryonic fibroblasts*). Estas células fueron mantenidas en el mismo medio que las células HEK 293T pero incluyendo  $\beta$ -mercaptoetanol 50  $\mu$ M. Concretamente MEF p110 $\alpha^{\text{flox/flox}}$  y MEF inmortalizadas deficientes en p110 $\beta$  donadas por JJ Zhao y TM Roberts (Dana-Farber Cancer Institute, Boston MA) (Jia et al., 2008; Zhao et al., 2006). También se han empleado MEF WT control (del inglés *Wild Type*), p85 $\beta^{-/-}$  y p85 $\alpha^{-/-}$  obtenidas de ratones WT, p85 $\beta^{-/-}$  y p85 $\alpha^{+/-}$  donados por D. Fruman (University of California, Irvine, CA). Los MEF se prepararon a partir de embriones murinos en estadio 13,5 de gestación como se ha descrito anteriormente (Marqués et al., 2008).

### 2.2 Métodos de transfección y vectores empleados

Los experimentos que incluyeron transfecciones celulares se realizaron con Lipofectamina Plus (Invitrogen) o bien con Jet Pei (Genycell). En el caso de las transfecciones de ARNi se empleó Lipofectamina RNAiMAX ( Invitrogen).

En este trabajo se han empleado los siguientes vectores: pSG5-p110 $\alpha$ , -myc-p110 $\alpha$ , -myc-p110 $\beta$ , -p85 $\alpha$  y -p85 $\beta$  descritos anteriormente (Marqués et al., 2008), His-WT-hp110 $\beta$  fue donado por B. Vanhaesebroeck (Barts Cancer Institute, Cancer Research UK, Londres, UK), V12-Ras donado por J. Downward (London Research Institute, Londres, UK), rHA-p85 $\alpha$ , rHA-p85 $\beta$  y rHA-SH3-BcR (SH3, del inglés *Src-homology domain 3*; *BcR*, *breakpoint cluster region homology domain*) se generaron en

nuestro laboratorio (Alcázar et al., 2009). Preparamos el vector pSG5-HA-p50 $\alpha$  a partir de p50 $\alpha$  (Alcázar et al., 2009). El plásmido pEGF-PH-Btk codificando el dominio PH de la tirosina quinasa de Bruton fue donado por T. Balla (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Los vectores lentivirales pLenti-7.3 codificando LacZ y E160-p85 $\alpha$  fueron donados por G. Mills (MD Anderson Cancer Center, Houston TX). Se empleó shARN murino para p110 $\beta$  (Origene), y shARN para p110 $\alpha$  descrito anteriormente (Marqués et al., 2008). Los ARNi para p85 $\alpha$  o  $\beta$ , isoformas p110 humanas, PTEN y los controles fueron adquiridos de Invitrogen.

### 2.3 Análisis de ciclo celular (sincronización y tinción de ADN)

Tinción de yoduro de propidio. Para el análisis de ciclo celular, las células NIH3T3 se sincronizaron en G0 por incubación en medio sin suero durante 19h. Posteriormente fueron estimuladas con medio suplementado con 10% de suero de ternera y se analizaron a diferentes tiempos. Las células se recogieron, contaron en PBS frío y se resuspendieron 50  $\mu$ l de solución de detergente (DNA-Prep, Beckmann Coulter) por cada millón de células. A continuación, añadimos 500  $\mu$ l de yoduro de propidio con ARNasa (DNA-prep, Beckmann Coulter) e incubamos a 37° durante 30 minutos. Posteriormente, las muestras se analizaron por citometría de flujo.

### 2.4 Tratamientos con inhibidores

En varios experimentos se usaron los inhibidores PIK75 que inhibe de manera específica a p110 $\alpha$  (Knight et al. 2006) y el inhibidor TGX221, específico para p110 $\beta$  (Jackson et al. 2005). Por otro lado, en algunos ensayos se empleó el inhibidor específico de PTEN bVpic obtenido de Calbiochem y ácido okadaico (Sigma) para inhibir PP2A.

Inhibidores de PI3K. Tal y como se ha especificado anteriormente los inhibidores de PI3K que se usaron fueron PIK75 como inhibidor de p110 $\alpha$  y TGX221 como inhibidor de p110 $\beta$ . Estos inhibidores se añadieron 30 minutos antes de las estimulaciones con suero y a dosis ya establecidas como específicas en nuestro laboratorio; PIK75 0,08  $\mu$ M y TGX221 30  $\mu$ M (Marqués et al., 2009).

Inhibidor de PTEN. Para testar si la actividad registrada en los ensayos fosfatasa es específica de PTEN se usó el inhibidor de PTEN bVpic a una dosis de 100 nM. Se añadió dicho inhibidor 15 minutos antes de la realización del ensayo fosfatasa. En el caso de los ensayos de fluorescencia para ver translocación de la sonda GFP-BTK-PH el inhibidor se añadió 1h antes de la fijación (30 minutos tras la estimulación con suero).

Inhibidor de PP2A. Para testar la influencia de PP2A sobre la actividad de PTEN, se añadió ácido okadaico 1h antes de la recogida de las muestras, a la dosis específica para inhibir PP2A (100 nM).

### 3. Bioquímica

#### 3.1 Lisis celulares

Los extractos celulares fueron obtenidos con diferentes soluciones dependiendo de su uso posterior:

Extractos celulares totales: **Tampón RIPA**. Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 137 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, glicerol 10%, NP-40 1%, Deoxicolato sódico 0,5% y SDS 0,1%.

Extractos celulares para filtración en columna, inmunoprecipitaciones y ensayo fosfatasa: **Tampón IP**. Tris-HCl 10mM pH 7.4, KCl 10 mM, NaCl 150 mM, NP-40 0,5%.

Todos los tampones de lisis fueron suplementados con inhibidores de proteasas y fosfatasas ( PMSF 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, Leupeptina 10 µg/ml, Aprotinina 10 µg/ml, NaF 5 mM, ácido Okadaico 10 nM y EDTA 1 mM).

#### 3.2 Fraccionamiento subcelular

Para el análisis del reclutamiento de PCNA en cromatina se usó un protocolo capaz de discriminar fracción citoplásmica, nuclear soluble y fracción de cromatina (Méndez y Stillman, 2000). Básicamente el proceso se resume en tres fases:

*Extracción fracción citosólica*: Tras centrifugar las células, el pellet celular se lisa con Tampón A (5 minutos en hielo): Hepes 10 mM pH 7.9, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, sacarosa 0.34 M, glicerol 10%, DTT 1mM, Tritón X-100 0.1%. con inhibidores de proteasas y fosfatasas ( Leupeptina 5µg/ml, aprotinina 5 µg/ml, pepstatina A 0.5 µg/ml, PMSF 0.1 mM). A continuación se centrifuga 5 minutos a 1300 g. El sobrenadante constituye la fracción citosólica y el precipitado se utiliza para obtener la fracción nuclear.

*Fracción nuclear soluble*: A continuación el pellet generado en el paso anterior se lava con el mismo tampón A pero sin TX-100. Se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones. Tras descartar el sobrenadante, dichos núcleos celulares son lisados durante 30 minutos con el tampón B que contiene EDTA 3 mM, EGTA 0.2 mM más los inhibidores de proteasas y fosfatasas. Estos extractos se centrifugan a 1700g durante 5 minutos y el

sobrenadante constituyen la fracción nuclear soluble. El precipitado generado se utiliza para obtener la fracción de cromatina.

*Fracción de cromatina:* El precipitado resultante de obtener la fracción nuclear soluble se resuspende en tampón de carga de electroforesis (tampón Laemli) y se hierve durante 5 minutos. A continuación las muestras son sometidas a sonicación durante 5 minutos.

### 3.3 Inmunoprecipitación

Las células fueron lisadas con **Tampón IP:** Tris-HCl 10 mM, KCl 10 mM, NaCl 150 mM, NP-40 0,5% más inhibidores de proteasas y fosfatasas. Los extractos celulares fueron pre-lavados (“pre-clearing”) durante 30 minutos en agitación a 4°C con Proteína A o proteína G (Amersham, Biosciences) según el anticuerpo de uso. Se incubaron los extractos celulares con el anticuerpo de interés durante toda la noche a 4°. Seguidamente añadimos proteína A o proteína G durante 1 hora en agitación a 4°. A continuación se realizaron 4 lavados: 2 con tampón IP y 2 con Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. Por último, las muestras fueron hervidas con tampón de carga Laemli y resueltas por WB.

### 3.4 Filtración en gel ( columna de exclusión molecular Superdex 200)

Células 293T, PC3 y NIH3T3 fueron lisadas con tampón IP. Los extractos resultantes fueron aplicados a una columna de filtración en gel Superdex 200 (Amersham Pharmacia) y lavada con tampón IP (0.5 ml/min, 4°C). Las muestras se recogieron en fracciones de 0.5 ml y fueron empleadas para WB, inmunoprecipitaciones, ensayo lípido quinasa y ensayo PTEN fosfatasa.

### 3.5 Ensayo lípido quinasa

Células NIH3T3 fueron lisadas con tampón IP, RIPA o con tampón Hepes 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tx-100 1%, glicerol 10% más inhibidores de proteasas y fosfatasas. Se inmunoprecipitaron p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  según la isoforma PI3K a testar. Los inmunoprecipitados se resuspendieron en 45 $\mu$ l de tampón Hepes conteniendo PI (0.5 mg/ml; Avanti Polar Lipids). La reacción se inició añadiendo 5 $\mu$ l de una mezcla que contiene ATP frío 200  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 100 mM y 10  $\mu$ Ci de [<sup>32</sup>P]ATP. Tras 15 minutos se detuvo la reacción añadiendo 100 $\mu$ l de HCl 1N. Los lípidos se extrajeron añadiendo 200 $\mu$ l de metanol/cloroformo (1:1 v/v) y a continuación se resolvieron en cromatografía en capa fina (Sílica Gel 60, Merck) en tanque básico (cloroformo/metanol/amoníaco 9:7:2 v/v/v). Los productos finales de la reacción se visualizaron por autorradiografía. En los ensayos PI3K realizados a partir de fracciones obtenidas por columna de exclusión molecular, la señal del

PI(3)P fue normalizada a la cantidad de p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  inmunoprecipitadas. Para comparar la actividad de p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  en diferentes ensayos y condiciones, las distintas señales obtenidas de PI(3)P se normalizaron a la máxima actividad de p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  en cada experimento (considerada como 100%).

### **3.6 Inmunoprecipitación en condiciones de transcripción-traducción *in vitro***

El análisis de la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  también se realizó con proteínas sintetizadas *in vitro*. Los ADNc específicos se transcribieron y tradujeron *in vitro* en presencia de S<sup>35</sup>-metionina usando el sistema de lisado de reticulocitos acoplado a TNT T7 (Promega) según las instrucciones de la compañía. La reacción se llevó a cabo durante 2h a 30°C en agitación. A continuación los productos traducidos se inmunoprecipitaron con el anticuerpo específico durante 3h en tampón IP más 1h de proteína A o proteína G según las características del anticuerpo. Se realizaron 4 lavados con tampón IP y las muestras fueron resueltas por WB y visualizadas por autorradiografía.

### **3.7 Ensayo de la actividad fosfatasa de PTEN**

Para el análisis de la actividad de PTEN lisamos las células con tampón IP e inmunoprecipitamos PTEN. A continuación, se lavaron los inmunoprecipitados y se resuspendieron en tampón de reacción (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 50 mM, DTT 10 mM, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) con PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (3 $\mu$ M) (Echelon Biosciences) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente la reacción se detuvo añadiendo 100 $\mu$ l del reactivo verde de malaquita (15 minutos) (Echelon Biosciences). Finalmente, los niveles de fosfato libre se midieron mediante lector de ELISA (620nm). Con el fin de comparar diferentes experimentos, la actividad de PTEN se normalizó respecto a la cantidad de PTEN inmunoprecipitado en cada condición y se calculó como el porcentaje referido a la actividad máxima intraexperimental (considerada como el 100%).

### **3.8 Inmunofluorescencia**

Las células fueron fijadas en formaldehído al 4% durante 5 minutos. A continuación se permeabilizaron con PBS con TX-100 0.3% durante 5 minutos. Posteriormente las células fueron bloqueadas con PBS 3% BSA, TX-100 0.1% 30 minutos a temperatura ambiente. Se incubó el anticuerpo primario en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente seguido de tres lavados con PBS, previo a la incubación del anticuerpo secundario 1 hora en oscuridad y a temperatura ambiente en tampón de bloqueo. Por último, previamente al montaje se realizaron 3 lavados con PBS. Las muestras se



montaron en VectaShield (incluyendo DAPI) o en PBS:glicerol 1:1 más Hoechst 33588 (1:1000).

#### **4. Análisis estadístico y cuantificaciones**

Tanto la señal de la fluorescencia en las imágenes como la intensidad de la señal de las bandas obtenidas en el análisis por WB fueron medidas con el programa ImageJ (NIH). Para cuantificar las señales de p110 en WB obtenidas en las coimmunoprecipitaciones, se midió la intensidad de la señal y ésta fue dividida por el valor de la señal correspondiente a la señal de p85 obtenida en la misma inmunoprecipitación. Este número fue expresado como porcentaje relativo al máximo valor en cada experimento (100 %). En el caso de protocolos que inducen una reducción de los niveles de p110 en comparación al control, como ocurre al transfectar ARNi de p85, el WB de p110 $\beta$  obtenido tras inmunoprecipitar p110 $\alpha$ , fue normalizado con respecto a la cantidad de p110 $\alpha$  inmunoprecipitada y a continuación normalizado respecto a la cantidad total de p110 $\beta$  observada en la célula tras el tratamiento específico (estimada por el WB de los extractos totales). La significación estadística fue analizada usando el programa Prism5V.5.0.



# RESULTADOS



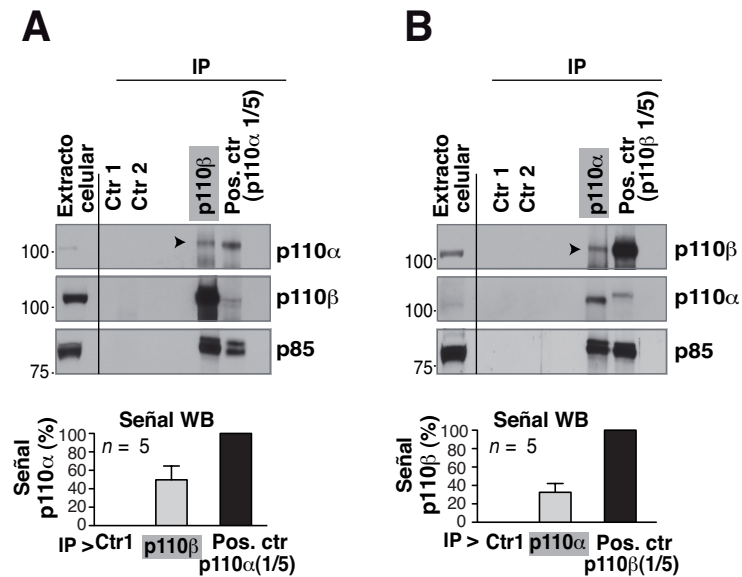
## RESULTADOS

### 1. Asociación de las formas endógenas de p110 $\alpha$ y p110 $\beta$

La entrada y progresión en ciclo celular requiere de la activación de diferentes rutas de señalización celular como son la de PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa) o la de Ras/MAPK (del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*) (Jones y Kazlauskas 2000). Dicha activación, produce dos grandes oleadas de señalización intracelular; primero, en fase G1 temprana (en la primera hora de activación) y otra posterior, en fase G1 tardía cerca de la entrada en fase S (7-9 horas). En nuestro laboratorio se ha descrito que la PI3K de clase IA (p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ ) se activa en diferentes fases del ciclo celular. Estos resultados previos muestran que la activación de p110 $\alpha$  siempre precede a la activación de p110 $\beta$  en momentos específicos de activación de PI3K. Concretamente, en las transiciones G0>G1 (entrada en ciclo celular), G1>S (entrada en fase S) y G2/M (entrada en mitosis) (Marqués et al., 2008; Marqués et al., 2009; Silio et al., 2012). Esta cinética de activación secuencial nos llevó a plantearnos una posible relación entre la activación de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ . Primero analizamos si ambas isoformas (p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ ) son capaces de interactuar. Para ello, lisamos células HEK 293T en crecimiento exponencial e inmunoprecipitamos p110 $\beta$  (de 1mg de extracto celular) detectando p110 $\alpha$  por Western Blot (WB) (FIG. 1A). Realizamos al mismo tiempo una inmunoprecipitación de p110 $\alpha$  utilizando una cantidad menor de extracto proteico (200 $\mu$ g) como control positivo. En paralelo y de forma recíproca, inmunoprecipitamos p110 $\alpha$  (1mg de extracto celular) y testamos la presencia de p110 $\beta$  por WB (FIG. 1B).

Aunque la proporción de las isoformas coimmunoprecipitadas no se puede calcular exactamente ya que los anticuerpos usados para las inmunoprecipitaciones (control y test) son diferentes, para cuantificar el complejo, normalizamos (en el caso de la figura 1A) la señal densiométrica de p110 $\alpha$ , en complejo con p110 $\beta$ , respecto a la señal de la inmunoprecipitación en el control positivo (p110 $\alpha$ ); y respecto a la cantidad de p85 inmunoprecipitada. Teniendo en cuenta que la mayor parte del p110 existe en forma de heterodímero con p85 (Geering et al., 2007), la cantidad de p85 detectada en las inmunoprecipitaciones nos permite estimar la cantidad real de enzima PI3K que existe en cada condición utilizando en el WB un mismo anticuerpo (anti pan-p85). Los resultados indican que la cantidad de p110 $\alpha$  coimmunoprecipitada con p110 $\beta$ , comparado con el control positivo de inmunoprecipitación, está en torno al 40 % mientras que el experimento recíproco (p110 $\beta$  con p110 $\alpha$ ) muestra un 25% de complejo.

Estos resultados sugieren que una fracción de p110 $\alpha$  se encuentra asociada a p110 $\beta$  (y viceversa) formando un complejo que incluiría ambas isoformas.



**Figura 1. p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  endógenas forman un complejo.** (A, B) p110 $\beta$  o p110 $\alpha$  fueron inmunoprecipitadas de células 293T (1mg) con anticuerpos (Ab) específicos. La asociación entre p110 fue revelada por WB. Como control positivo inmunoprecipitamos p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  de 200  $\mu$ g de extracto total. Los controles negativos incluyen proteína A +Ab (Ctr 1) y extracto + proteína A (Ctr 2). Los gráficos muestran el % de p110 $\alpha$  en los inmunoprecipitados de p110 $\beta$  y en el control positivo, normalizados a la señal de p85. Las señales normalizadas son expresadas como % de la señal máxima (control positivo p110 $\alpha$ , 100%  $\pm$  SEM  $n = 5$ ). El % de p110 $\beta$  en los inmunoprecipitados de p110 $\alpha$  se calculó de forma similar. Las flechas indican las isoforma (p110 $\alpha$  o p110 $\beta$ ) en complejo con la otra.

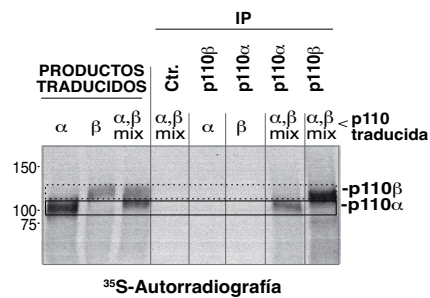
## 2. La asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ es específica.

Con el fin de descartar posibles reacciones cruzadas entre los anticuerpos usados para las inmunoprecipitaciones confirmamos la especificidad de la asociación mediante diferentes aproximaciones.

### 2.1 Los anticuerpos usados en la inmunoprecipitaciones endógenas no reaccionan de forma cruzada

En primer lugar transcribimos y traducimos *in vitro* ADNc codificando p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  en presencia de metionina marcada con S<sup>35</sup>. Tanto el anticuerpo anti-p110 $\alpha$  como el anti-p110 $\beta$  no reconocieron los productos de la reacción de manera cruzada (FIG. 2). Por otro lado, la inmunoprecipitación de p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  en presencia de ambas p110 transcritas y traducidas conjuntamente, fue incapaz de detectar asociación entre p110 $\alpha$  y p110 $\beta$

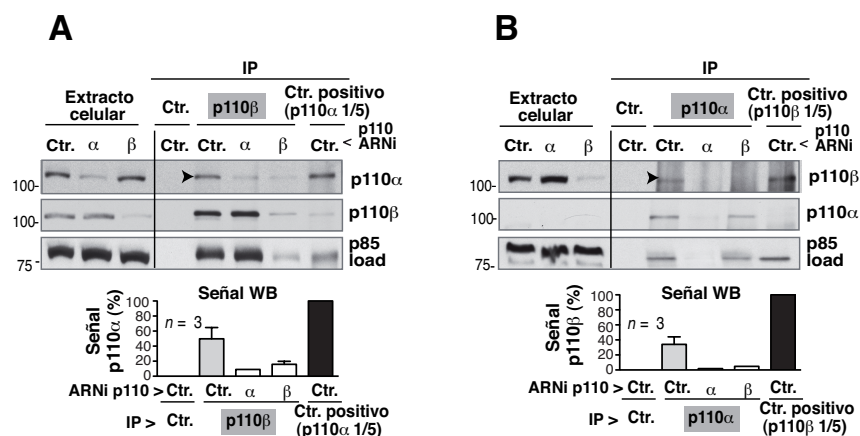
sugiriendo que dichas isoformas no interaccionan de forma directa purificadas *in vitro* (FIG. 2).



**Figura 2. Especificidad de los anticuerpos.** ADNc codificando p110α, p110β o ambos fueron transcritos y traducidos en presencia de Metionina-S<sup>35</sup>. Los productos traducidos y los inmunoprecipitados fueron visualizados por autorradiografía.

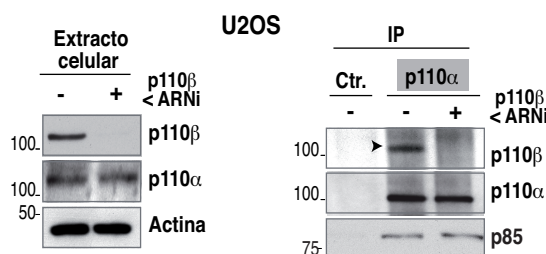
## 2.2 La depleción de p110α o p110β disminuye la formación del complejo p110α/p110β

En segundo lugar testamos la especificidad de la interacción *in vivo*. Para ello transfectamos células HEK 293T con ARN de interferencia (ARNi) de p110α o p110β. Tras 72h de transfección, analizamos por inmunoprecipitación y WB la asociación p110α/p110β. La reducción de los niveles de p110α o de los niveles de p110β se tradujo en una disminución de la asociación de p110α/p110β en cada uno de los experimentos, confirmando así que las proteínas detectadas son de hecho p110α y p110β (FIG. 3A, 3B) ya que su señal disminuye al disminuir su cantidad. En las muestras silenciadas para p110β, el anticuerpo anti-p110β no fue capaz de inmunoprecipitar p110α (FIG. 3A) y al contrario, cuando p110α fue silenciado, el anticuerpo anti-p110α no inmunoprecipitó p110β (FIG. 3B).



**Figura 3. El ARNi de p110 reduce la cantidad del complejo p110α/p110β.** Transfectamos células 293T con ARNi control, p110α o p110β (72h). Tanto los extractos como las inmunoprecipitaciones (desde 1mg de extracto) se examinaron por WB. Se realizaron controles positivos como en la figura 1. Los controles negativos incluyen lisado + proteína A. Los gráficos muestran los % de asociación entre las p110 expresados como en la figura 1 (n = 3). Las flechas indican las isoforma (p110α o p110β) en complejo con la otra.

Este mismo experimento fue reproducido en células U2OS (FIG. 4) confirmando la existencia de un complejo p110α/p110β en diferentes tipos celulares, la especificidad de las bandas detectadas y que no existe, en las condiciones de ensayo, reacción cruzada entre los anticuerpos usados para inmunoprecipitación y WB.



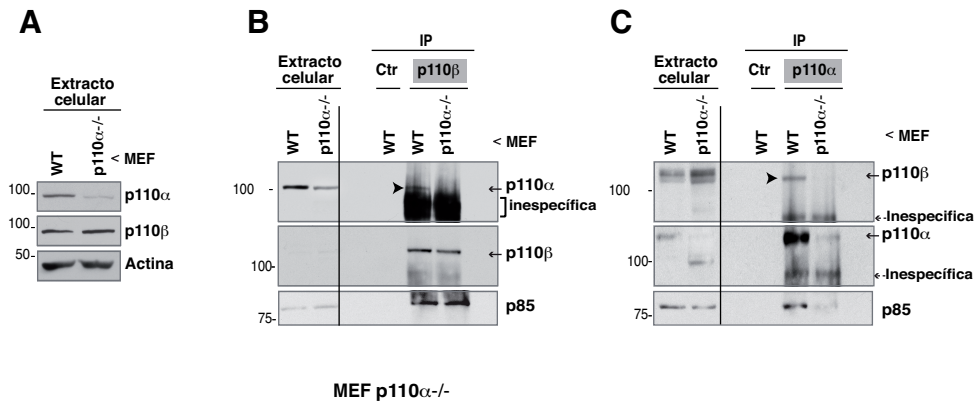
**Figura 4. El ARNi de p110β reduce la cantidad del complejo p110α/p110β.** Células U2OS fueron transfectadas con ARNi de p110β durante 72h. La eficiencia de la transfección así como las inmunoprecipitaciones indicadas (partiendo de 1mg de extracto celular) se analizaron por WB. La flecha indica las isoforma p110β en complejo con p110α.

### 2.3 Análisis del complejo p110α/p110β en fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) deficientes para la isoforma p110α o p110β

A continuación también analizamos la asociación p110α/p110β en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, del inglés *murine embryonic fibroblasts*) deficientes para p110α o p110β. Para la generación de las MEF p110α<sup>-/-</sup> infectamos MEF p110α<sup>flox/flox</sup> con

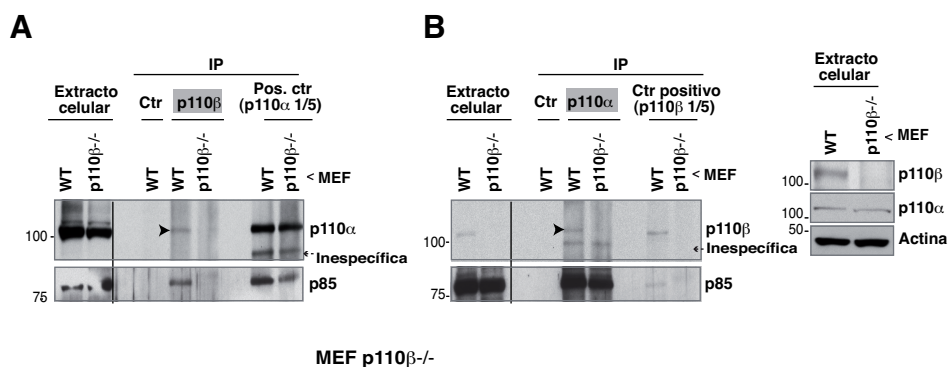


adenovirus Cre-GFP dos veces (72 horas) y analizamos la eficiencia de la delección del gen por WB (FIG. 5A).



**Figura 5: Análisis de la asociación p110α/p110β en MEFs deficientes en p110α.** MEFs p110α<sup>flox/flox</sup> fueron infectadas con adenovirus que expresa la recombinasa Cre (72h); (A) la eficiencia de la delección fue de un 80%. (B, C) MEFs control o infectadas fueron lisadas y examinadas como en las figuras 1,3, 4. La figura muestra un experimento representativo (n=3). Las flechas indican las isoforma p110α en complejo con p110β y viceversa.

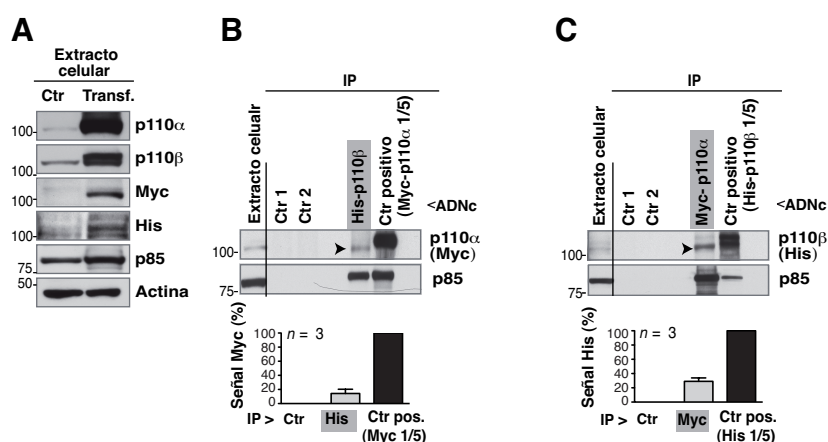
Los resultados indican que la delección no fue total (aproximadamente un 80%) pero suficiente para impedir la detección de p110α en complejo con p110β (FIG. 5B) y viceversa (FIG. 5C). En paralelo, analizamos MEF immortalizadas deficientes en p110β (Jia et al., 2008). Tanto inmunoprecipitando con el anticuerpo anti-p110β (FIG. 6A) como con el anticuerpo anti-p110α (FIG. 6B), fuimos incapaces de detectar p110α en complejo con p110β confirmando que el complejo detectado es específico.



**Figura 6. Análisis de la asociación p110α/p110β en MEFs deficientes en p110β.** Se analizaron por WB, inmunoprecipitados (1mg) de p110β (A) o de p110α (B) de MEFs deficientes en p110β o reconstituidas con p110β WT. Como control positivo inmunoprecipitamos p110α (A) o p110β (B) de 200 µg de extracto. El control negativo incluye extracto celular + proteína A. Las flechas indican las isoforma p110α en complejo con p110β y viceversa.

### 3. La asociación de p110 $\alpha$ y p110 $\beta$ recombinantes confirma la asociación de p110 $\alpha$ y p110 $\beta$ *in vivo*

Debido a la baja proporción de complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  endógeno detectado, quisimos confirmar si tras la expresión de dichas proteínas de forma recombinante se producía esta asociación. Para ello transfectamos células HEK 293T con los ADNc His-p110 $\beta$ , Myc-p110 $\alpha$  y las subunidades reguladoras p85 fusionadas a HA (del inglés *human influenza hemagglutinin*). Se lisaron las células en crecimiento exponencial y tras la comprobación de los niveles de expresión de dichas proteínas (FIG. 7A), inmunoprecipitamos p110 $\beta$  con el anticuerpo anti-His y analizamos la asociación de p110 $\alpha$  con el anticuerpo anti-Myc-tag (p110 $\alpha$ ) por WB (FIG. 7B). En paralelo, también realizamos el mismo experimento de forma recíproca, inmunoprecipitando p110 $\alpha$  con el anticuerpo anti-Myc-tag y revelando p110 $\beta$  por WB con el anticuerpo anti-His (FIG. 7C). Por tanto, en ambas aproximaciones detectamos asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  utilizando los anticuerpos anti-His y anti-Myc.

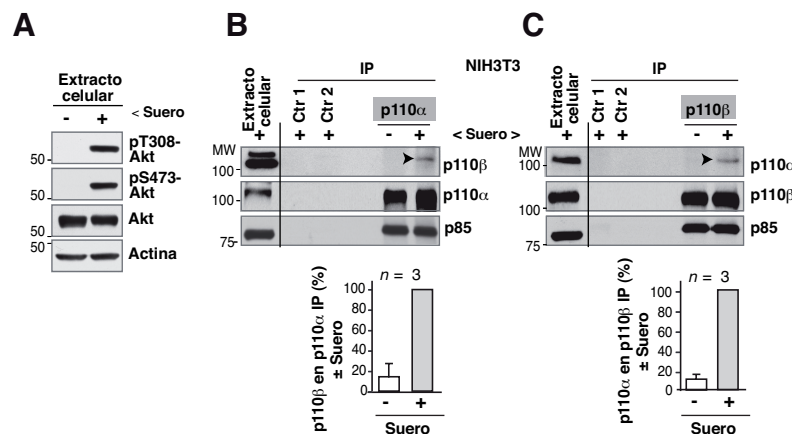


**Figura 7. p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  recombinantes coinmunoprecipitan.** (A) Células 293T fueron transfectadas con ADNc que codifica Myc-p110 $\alpha$ , His-p110 $\beta$ , HA-p85 $\alpha$  y HA-p85 $\beta$ ; y tras 48h se analizó su expresión por WB. (B) Se inmunoprecipitó p110 $\beta$  con anticuerpo (Ac) anti-His y se examinó la presencia de p110 $\alpha$  por WB (Myc). También realizamos el experimento recíproco (C). Se usaron 200 $\mu$ g de extracto total para inmunoprecipitar con anti-Myc como control positivo en (B) y con anti-p110 $\alpha$  en (C). Los controles negativos de inmunoprecipitación (IP) incluyen proteína A + extracto celular + Ac inespecífico (Ctr1 y Ctr2). Los gráficos muestran el porcentaje de señal de Myc-tag (p110 $\alpha$ ) en la inmunoprecipitación de His-tag (p110 $\beta$ ) relativa al máximo (Myc-tag inmunoprecipitado en el control positivo y normalizado a 100%). El porcentaje de His en la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-Myc también se calculó (media  $\pm$  SEM, n = 3). Las flechas indican las isoforma p110 $\alpha$  en complejo con p110 $\beta$  y viceversa.

La densitometría de los diferentes experimentos confirmó que al igual que ocurre con las proteínas endógenas solo una pequeña proporción del total de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  se asocian en complejo. Estos resultados indican de nuevo que una fracción de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  se asocian *in vivo*.

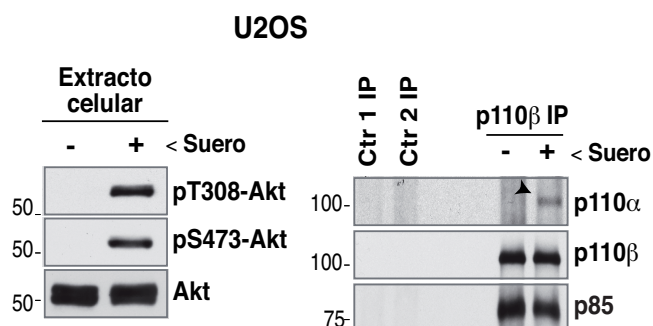
#### 4. La activación celular induce la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$

p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  se activan de forma secuencial tras la estimulación de receptores durante la entrada en ciclo celular (Marqués et al., 2008). Una de nuestras hipótesis de partida es que el complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  podría regular la activación de p110 $\beta$ . Ello implicaría que la asociación sería inducida por activación celular. Para testar esta hipótesis sincronizamos células NIH3T3 (sin suero 19h) e indujimos la entrada en ciclo (G1) estimulando las células en medio de cultivo suplementado con suero al 10% (1h). Tras la estimulación, lisamos las células, verificamos por WB la correcta activación celular (FIG. 8A) e inmunoprecipitamos p110 $\alpha$ , detectando la isoforma p110 $\beta$  asociada por WB.



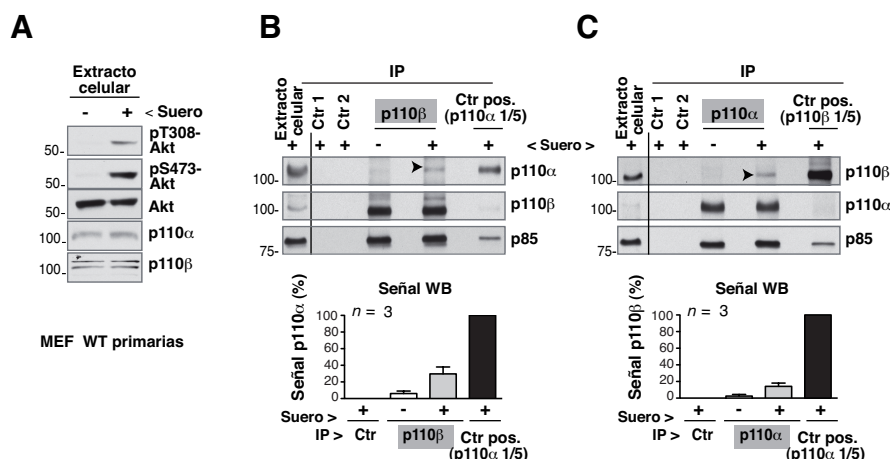
**Figura 8. La activación celular induce la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ .** (A) Se sincronizaron células NIH3T3 en G0 (sin suero 19h) y se activaron por la adición de suero (10%, 1h). La activación celular fue confirmada analizando los niveles de p-Akt por WB. (B-C) 1mg de extracto fue inmunoprecipitado con anticuerpo (Ac) anti-p110 $\alpha$  (B) o anti-p110 $\beta$  (C) y la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  examinada por WB. Los controles negativos de inmunoprecipitación incluyen proteína A + extracto celular + Ac inespecífico (Ctr1 y Ctr2). Los gráficos indican el porcentaje de la señal de p110 $\beta$  en la inmunoprecipitación de p110 $\alpha$  en células quiescentes comparadas con células estimuladas (consideradas el 100%) y viceversa (media  $\pm$  SEM, n = 3). Las flechas indican las isoforma p110 $\beta$  en complejo con p110 $\alpha$  y viceversa.

Los resultados de este ensayo muestran que la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  incrementa de manera significativa tras la activación celular, comparado con el complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  presente en células quiescentes (FIG. 8B). En paralelo realizamos el mismo experimento de forma recíproca obteniendo resultados similares (FIG. 8C). Este mismo fenómeno de inducción del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  por activación celular, fue confirmado en otros tipos celulares, como por ejemplo en células U2OS (FIG. 9).



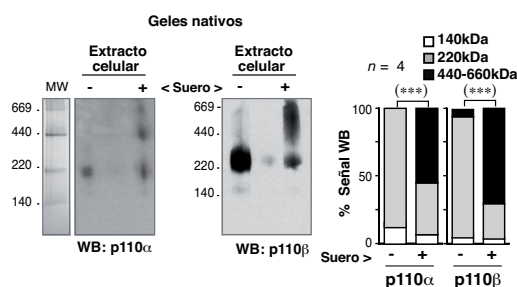
**Figura 9. Efecto de la activación celular sobre la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  en células U2OS.** Células U2OS fueron sincronizadas (sin suero 24h) y activadas con suero (20%, 1h). La activación celular fue confirmada analizando los niveles de p-Akt por WB. Se inmunoprecipitó p110 $\beta$  desde 1mg de extracto celular y la asociación con p110 $\alpha$  fue testada por WB. La flecha indican la isoforma p110 $\alpha$  en complejo con p110 $\beta$ .

Por último analizamos si la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  también existe en células normales. Aislamos MEF primarias, se sincronizaron 19h sin suero y se estimularon con medio de cultivo suplementado con suero (10%) durante 1h. A continuación se lisaron, comprobamos su activación (FIG. 10A) e inmunoprecipitamos con anti-p110 $\beta$  para testar la asociación con p110 $\alpha$  por WB (FIG. 10B). En paralelo realizamos el mismo experimento pero de forma recíproca (FIG. 10C). Ambas aproximaciones indican que la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  se induce en células primarias tras activación celular (FIG. 10). Todos estos resultados muestran que el complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  existe de manera fisiológica en diferentes tipos celulares (incluyendo células primarias) y que su formación es inducida por activación celular con suero.



**Figura 10. Análisis de la asociación p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  en MEFs primarias.** MEFs primarias fueron cultivadas sin suero (19h) y estimuladas 1h (suero 10%). (A) Confirmamos la activación celular analizando pAkt por WB. 1mg de extracto celular fue inmunoprecipitado con anti-p110 $\beta$  (B) o anti-p110 $\alpha$  (C) detectando la coimmunoprecipitación endógena de p110 correspondiente por WB. Como control positivo inmunoprecipitamos p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  de 200  $\mu$ g de extracto. Los controles negativos incluyen proteína A + Ac (Ctr. 1 ) y extracto + proteína A (Ctr. 2). Los gráficos muestran el % de p110 $\alpha$  en la inmunoprecipitación de p110 $\beta$  normalizado a los niveles de p85 y relativos al máximo (p110 $\alpha$  inmunoprecipitado en el control positivo, 100%). Igual para la representación de la señal de p110 $\beta$  en la inmunoprecipitación de p110 $\alpha$  (media  $\pm$  SEM, n = 3). Las flechas indican las isoforma p110 $\alpha$  en complejo con p110 $\beta$  y viceversa.

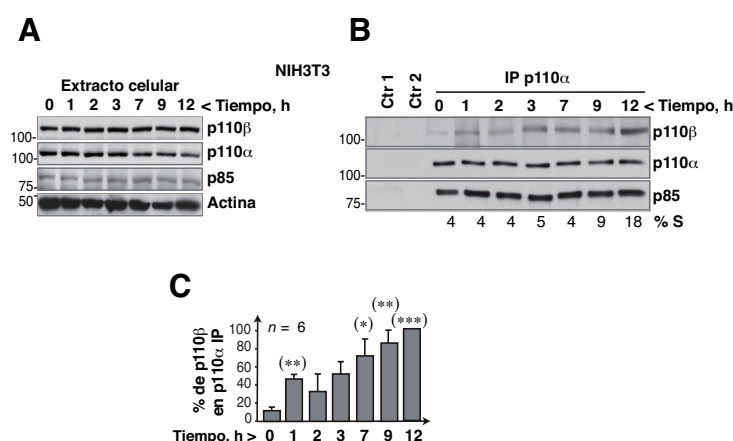
Como método alternativo a la inmunoprecipitación, realizamos una separación de complejos en geles nativos. Para ello utilizamos células HEK 293T mantenidas en quiescencia (incubadas sin suero 19h) o estimuladas durante 1h con medio suplementado con suero al 10% y resolvimos los extractos celulares en geles nativos (*blue native gels*). Los WB de p110 $\alpha$  y de p110 $\beta$  muestran que, en células quiescentes, ambas isoformas son detectadas mayoritariamente a 220 kDa, es decir en forma heterodimérica (p85/p110); sin embargo, tras activación celular, estas subunidades catalíticas se encuentran en complejos de peso molecular de >440 kDa, presumiblemente formando tetrámeros o formando parte de otros complejos de mayor peso molecular. La proporción de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  (aproximadamente el 50% del total de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ ) identificada en la región de >440 kDa tras estimulación celular indica que puede que las inmunoprecipitaciones subestimen la cantidad de complejo PI3K detectado. Estos datos sugieren de nuevo una posible oligomerización in vivo de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  (FIG. 11).



**Figura 11. Análisis de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  en condiciones nativas “blue native gels”.** Examinamos extractos celulares de células HEK 293T en quiescencia y estimuladas (1h, 10% suero) en “blue native gels electrophoresis” 4-16%. La línea que contiene los marcadores de peso molecular fue teñida con azul Coomassie; el resto de los geles fue analizado por WB con anticuerpo anti-p110 $\alpha$  o anti-p110 $\beta$ . El gráfico muestra la proporción de p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  en la fracción correspondiente comparada con la señal total de la línea entera (media  $\pm$  SEM,  $n = 4$ ). \*\*\* Test de Chi-cuadrado de Pearson,  $P < 0.001$ .

### 5. La asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ se correlaciona con la actividad de PI3K a lo largo del ciclo celular.

La actividad catalítica de las isoformas p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  también varía a lo largo del ciclo celular. Mientras que en fase G1 temprana la actividad PI3K principalmente se asocia a la activación de p110 $\alpha$ , en entrada en fase S, p110 $\beta$  es la isoforma que registra un mayor pico activación (Marqués, Kumar et al. 2008; Marqués et al., 2009).

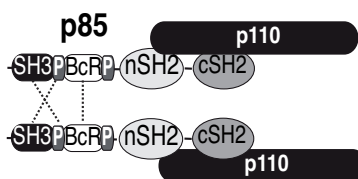


**Figura 12. Análisis de la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  a lo largo del ciclo celular.** Células NIH 3T3 fueron sincronizadas (19h sin suero), activadas con suero (10%) y analizadas a distintos tiempos. (A) Se analizaron los niveles de expresión de las distintas isoformas a lo largo del ciclo celular por WB. (B) 1mg de extracto total fue inmunoprecipitado con anticuerpo (Ac) anti-p110 $\alpha$  a distintos tiempos y la coimmunoprecipitación de p110 $\beta$  testada por WB. Los controles negativos de inmunoprecipitación incluyen proteína A + extracto total + Ac inespecífico (Ctr. 1 y Ctr. 2). (C) El gráfico indica el porcentaje de señal de p110 $\beta$  en la inmunoprecipitación de p110 $\alpha$  normalizada al máximo de señal (100%, punto de 12h). Test t de Student (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

Teniendo en cuenta que la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  podría modular la activación de p110 $\beta$ , decidimos analizar la cinética de asociación de ambas isoformas a lo largo del ciclo celular. Por ello sincronizamos células NIH3T3 en G0 (19h sin suero) y las estimulamos con medio suplementado con suero (10%). Analizamos a diferentes tiempos del ciclo celular la asociación entre p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  inmunoprecipitando p110 $\alpha$  y detectando la presencia de p110 $\beta$  por WB. A pesar de no haber cambios de expresión apreciables de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  a lo largo del ciclo (FIG. 12A), la formación del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  fue inducida tras activación celular (fase G1) y alcanzó un máximo de asociación en entrada en Fase S (FIG. 12B, 12C), coincidiendo con el máximo de activación de p110 $\beta$  (Marqués et al., 2008). Por tanto, nuestros resultados indican que la formación del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  se produce paralelamente a la activación de PI3K durante el ciclo celular, siendo máxima la asociación en fase S donde se activa principalmente p110 $\beta$ , sugiriendo que p110 $\alpha$  podría regular la activación óptima de p110 $\beta$ .

### 6. p110 $\alpha$ y p110 $\beta$ se asocian a través de las subunidades reguladoras p85

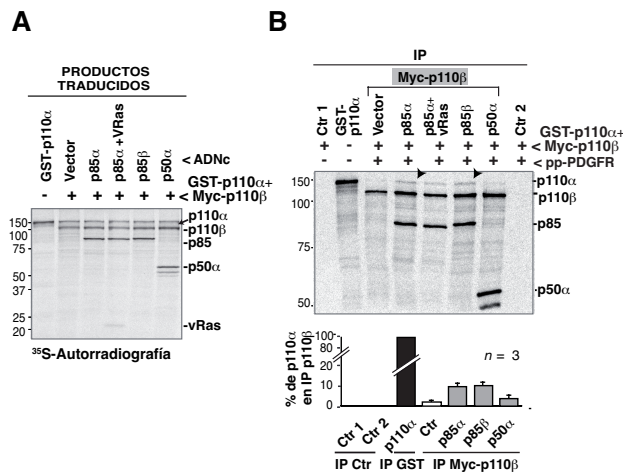
Se ha descrito que las subunidades reguladoras p85 $\alpha$  son capaces de interaccionar entre ellas a través de su N-terminal (dominios SH3-BCR) (Harpur et al., 1999) y que la presencia de fosfopéptidos que mimetizan el receptor de PDGF activo son capaces de inducir la oligomerización de heterodímeros p85/p110 *in vitro* (Layton et al., 1998). Por tanto hipotetizamos que en la asociación de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ , estarían implicadas dos subunidades p85 que dimerizarían aportando cada una, una subunidad catalítica p110 distinta (FIG. 13).



**Figura 13. Modelo de la interacción entre dos heterodímeros p85-p110/p85-p110.**

Para confirmar este modelo, en primer lugar determinamos si existe una asociación directa entre los p110. Como hemos comentado anteriormente, transcribimos y traducimos *in vitro* conjuntamente, ADNc codificantes para p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ . Realizamos inmunoprecipitaciones con anticuerpos anti-p110 $\alpha$  y anti-p110 $\beta$  en dichos extractos sin observarse co-inmunoprecipitación de ambas isoformas (FIG. 2).

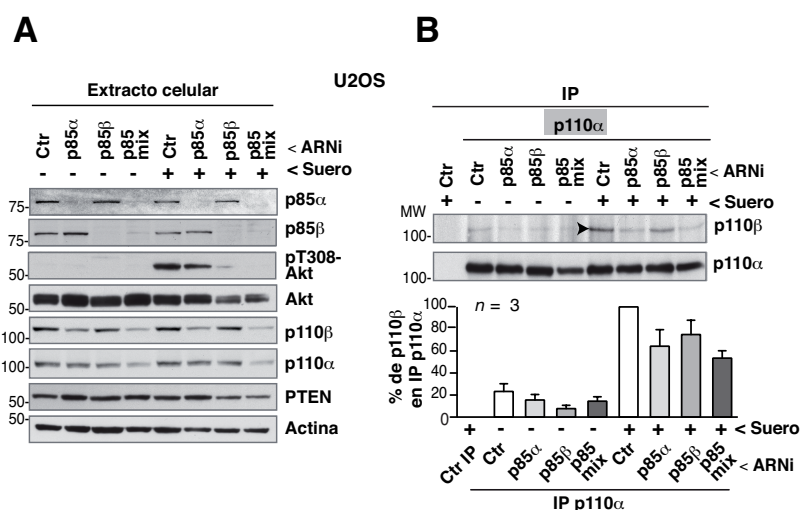
Posteriormente, teniendo en cuenta que no detectamos asociación directa entre p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ , testamos si dicha asociación podría inducirse en presencia de p85. Transcribimos y traducimos *in vitro* ADNc codificante para GST-p110 $\alpha$  (135kDa), myc-p110 $\beta$  en presencia o ausencia de subunidades p85( $\alpha$  o  $\beta$ ) o p50 $\alpha$  (forma de procesamiento alternativo de p85 que carece de porción N-terminal) en presencia de metionina marcada con S<sup>35</sup>. En el caso de p110 $\alpha$  utilizamos una construcción que genera un p110 $\alpha$  fusionado a GST para distinguir mejor el peso molecular de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ . En todas las condiciones incluimos difosfopéptidos simulando la activación de receptores PDGF. Las PI3K de clase IA tienen un dominio de unión a Ras y se ha descrito que Ras colabora en la activación óptima de p110 $\alpha$  (Gupta et al., 2007). Por ello también traducimos v-Ras en una de las condiciones y analizamos su acción sobre el complejo (FIG. 14A). Los productos de la reacciones se inmunoprecipitaron con los anticuerpos anti-GST (p110 $\alpha$ ) (Control) o anti-Myc (p110 $\beta$ ). Posteriormente detectamos la formación del complejo por autorradiografía. Los resultados mostraron que la formación del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  se produce en presencia de subunidades reguladoras presumiblemente por dimerización de p85 a través de su región N-terminal, dado que en presencia de p50 $\alpha$ , la cual carece de esta región, no se produce interacción entre p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  (FIG. 14B).



**Figura 14. p85 media la interacción entre p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ .** (A) ADNc codificantes para GST-p110 $\alpha$  y Myc-p110 $\beta$  fueron transcritos y traducidos *in vitro* en combinación con otros (indicados) en presencia de metionina-S<sup>35</sup>. 1 $\mu$ l de las muestras se resolvió por SDS-PAGE y se reveló por autorradiografía. (B) Los productos de la reacción fueron incubados con difosfopéptidos PDGFR o V-Ras durante 30min. Se inmunoprecipitó con anticuerpo anti Myc-tag (p110 $\beta$ ). Los complejos fueron evaluados como en (A). El gráfico muestra el porcentaje de la señal de p110 $\alpha$  en la inmunoprecipitación de p110 $\beta$  relativo al máximo (100%; GST-p110 $\alpha$  inmunoprecipitado de una cantidad de reacción de traducción similar, n = 3).



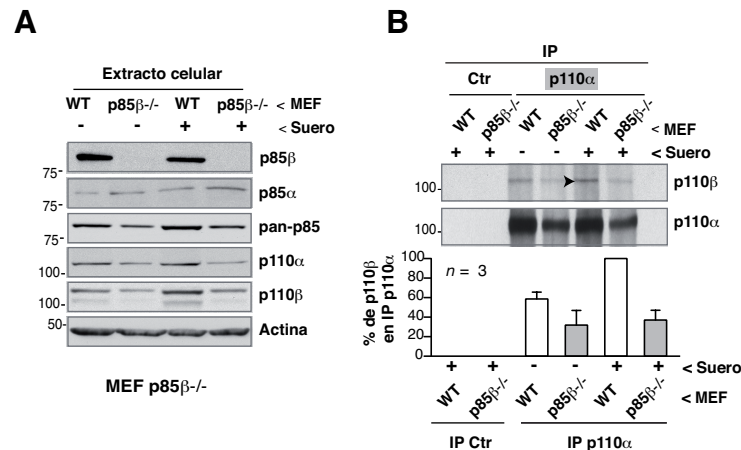
Para confirmar la implicación de p85 en la formación del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  en un contexto celular, transfectamos células U2OS con ARNi para p85 $\alpha$ , p85 $\beta$  o ambos. Las células fueron sincronizadas (19h sin suero) y fueron estimuladas con medio completo (incluyendo suero al 10%) durante 1 hora (FIG. 15A). Posteriormente inmunoprecipitamos con el anticuerpo anti-p110 $\alpha$  y analizamos la presencia de p110 $\beta$  en complejo por WB. Se ha descrito que la depleción de p85 reduce la estabilidad de p110 (Beltran et al., 2011; Yu et al., 1998b). Con el fin de distinguir entre el efecto de reducir los niveles de p85 sobre la estabilidad de p110 y sobre la formación del complejo, medimos la señal de p110 $\beta$  en complejo con p110 $\alpha$  normalizando a la cantidad de p110 $\alpha$  inmunoprecipitada y a los niveles de expresión de p110 $\beta$  en la célula. Los resultados muestran de nuevo que la asociación de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  se induce por activación celular en células control, y que la formación del complejo se ve comprometida en ausencia de alguna de las dos subunidades reguladoras, siendo más significativa la reducción de complejo en ausencia de las dos (FIG. 15B).



**Figura 15. Efecto del ARNi de p85 sobre la generación del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ .** Se transfectaron células U2OS con ARNi control, p85 $\alpha$ , p85 $\beta$  o ambos durante 48h. Se cultivaron sin suero durante 20h y fueron estimuladas con medio completo (10% de suero). Tanto los extractos totales (A) como las inmunoprecipitaciones de p110 $\alpha$  analizando la asociación de p110 $\beta$  en las condiciones indicadas (B), fueron examinadas por WB. El gráfico muestra el porcentaje de la señal de p110 $\beta$  en la inmunoprecipitación de p110 $\alpha$  relativo al máximo (100%; p110 $\beta$  inmunoprecipitado y normalizado (teniendo en cuenta niveles totales de p110 tras ARNi) en la condición de control estimulado con suero,  $n = 3$ ).

También analizamos la formación del complejo en MEF deficientes en p85. En el caso de las MEF p85 $\alpha$ <sup>-/-</sup>, los resultados fueron difíciles de interpretar debido a la poca cantidad de p110 que presentan (no se muestran). Cuando comparamos MEF p85 $\beta$ <sup>-/-</sup> con MEF control

(WT), observamos que a pesar de mostrar una reducción en los niveles proteicos de p110 (FIG. 16A), la cantidad de p110 $\beta$  en complejo con p110 $\alpha$  es menor en las MEF deficientes para p85 $\beta$ . Para el cálculo de la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  normalizamos la señal densiométrica de p110 $\beta$  respecto al p110 $\alpha$  inmunoprecipitado y respecto a los niveles de p110 $\beta$  en la célula (FIG. 16B).



**Figura 16. Análisis de la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  en MEFs p85 $\beta$ <sup>-/-</sup>.** (A,B) MEFs WT y deficientes en p85 $\beta$  fueron procesadas como en la figura 10. El estímulo con suero (10%) de las células en quiescencia (sin suero 19h) indujo la coimmunoprecipitación del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  analizado por WB. El gráfico muestra el porcentaje de la señal de p110 $\beta$  en la inmunoprecipitación de p110 $\alpha$  relativo al máximo (100%; p110 $\beta$  inmunoprecipitado y normalizado en la condición MEFs WT estimuladas con suero,  $n = 3$ ).

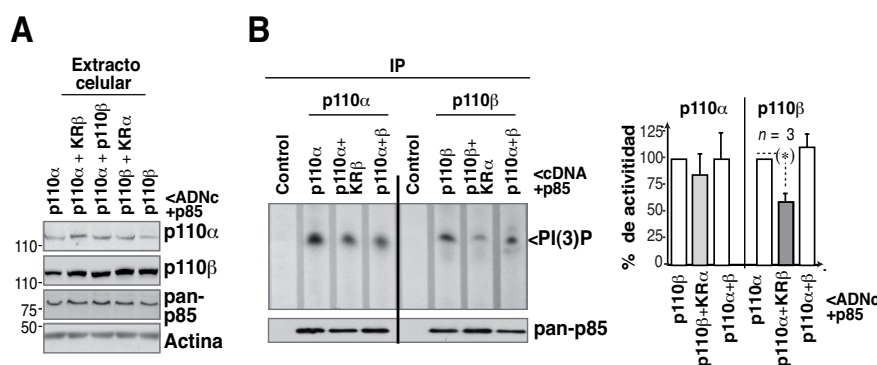
Todos estos resultados demuestran que p110 $\alpha$  asocia p110 $\beta$  tras activación celular en células humanas y en células de ratón (incluyendo células primarias); y que esta asociación está mediada, al menos en parte, por las subunidades reguladoras p85.

## 7. p110 $\alpha$ regula la activación de p110 $\beta$

### 7.1 El mutante inactivo K802R de p110 $\alpha$ disminuye la actividad de p110 $\beta$

Para analizar la influencia de p110 $\alpha$  sobre la activación de p110 $\beta$ , transfectamos células NIH3T3 (48h) con diferentes combinaciones de un mutante inactivo de p110 $\alpha$  (K802R-p110 $\alpha$ ), un mutante inactivo de p110 $\beta$  (K805R-p110 $\beta$ ), WT-p110 $\alpha$  y WT-p110 $\beta$  (FIG. 17A). A continuación inmunoprecipitamos utilizando un anticuerpo anti-p110 $\alpha$  o anti-p110 $\beta$  y analizamos la actividad de la proteína inmunoprecipitada mediante un ensayo de actividad PI3K *in vitro*. Para los ensayos quinasa usamos fosfatidilinositol (PI) como sustrato de la reacción pues el producto PI(3)P es resistente a la acción de PTEN (McConnachie et al., 2003), el cual puede formar complejos con PI3K (comentado más

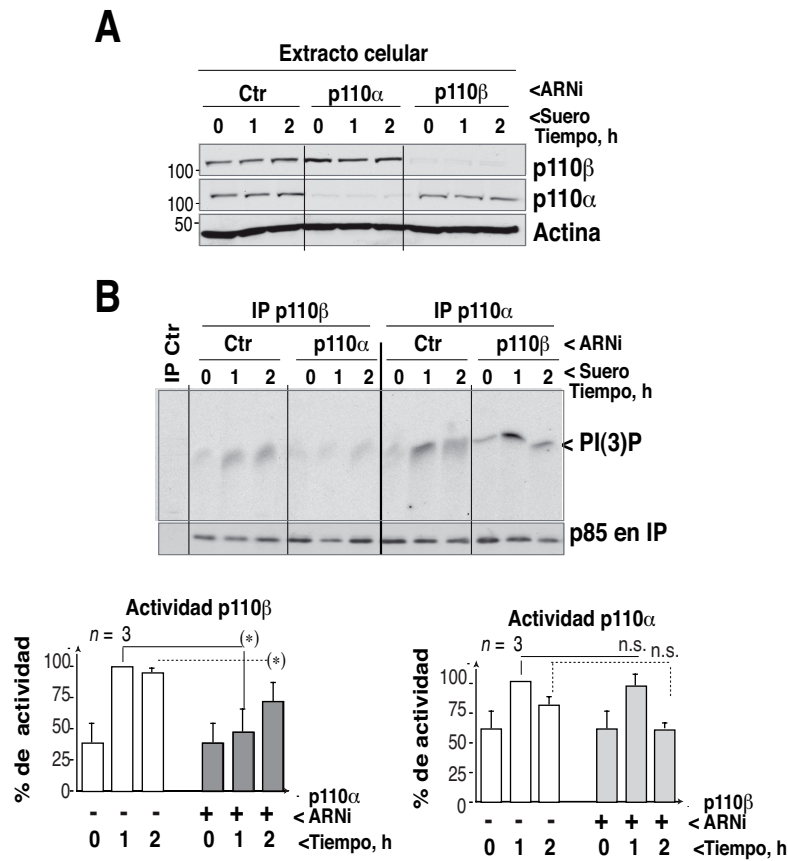
adelante). Mientras el mutante inactivo de p110 $\beta$  no afectó a la activación de p110 $\alpha$ , el mutante inactivo de p110 $\alpha$  redujo de manera significativa la activación de p110 $\beta$  (FIG. 17B). Estos resultados sugieren que p110 $\alpha$  regula la actividad de p110 $\beta$ , pero no al contrario.



**Figura 17. El mutante inactivo de p110 $\alpha$  disminuye la actividad de p110 $\beta$ .** Se transfectaron células NIH3T3 con ADNc control, K802R-p110 $\alpha$  y/o K805R-p110 $\beta$  combinados con ADNc HA-p85 $\alpha$  1:1 (36 h). (A) Se usaron extractos de células en crecimiento exponencial para analizar los niveles de transfección por WB. (B) 500  $\mu$ g de extracto fueron inmunoprecipitados con anti-p110 $\alpha$  y anti-p110 $\beta$ . Posteriormente la actividad lípido quinasa de los inmunoprecipitados fue ensayada *in vitro*. Se utilizó PI como sustrato de las PI3K inmupurificadas ya que el producto de la reacción PI(3)P es resistente a la acción de PTEN (potencialmente en los inmunoprecipitados). Los controles negativos incluyen proteína A + extracto celular. El gráfico muestra la intensidad de la señal PI3P relativa al máximo de la señal para p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  (100%, n = 3). Test t de Student (\*) p<0.05.

## 7.2 La depleción de p110 $\alpha$ impide la correcta activación de p110 $\beta$

También hemos analizado la influencia de la depleción de una de las isoformas sobre la actividad PI3K de la otra. Para ello transfectamos células U2OS con ARN de interferencia (ARNi) control y, ARNi específico para p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  durante 48h. A continuación las células fueron sincronizadas por privación de suero durante 20 h y se estimularon en medio con 10% de suero durante 1h o 2h. La eficiencia de la transfección se analizó por WB (FIG. 18A). Los resultados de los ensayos lípido quinasa muestran como la reducción de p110 $\beta$  no afectó a la actividad de p110 $\alpha$  tras estimulación con suero; sin embargo, la depleción de p110 $\alpha$  en la células redujo de manera significativa la activación de p110 $\beta$  endógena a 1h y 2h tras estimulación con suero (FIG. 18B).

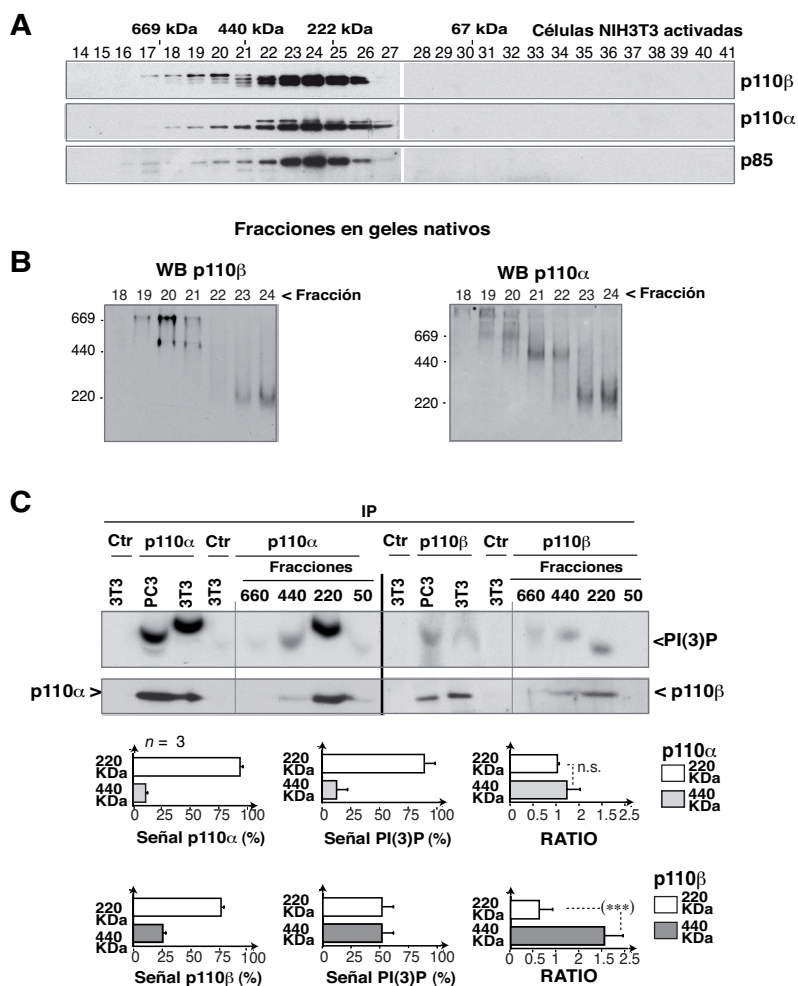


**Figura 18. La interferencia de p110 $\alpha$  afecta a la correcta activación de p110 $\beta$ .** Células U2OS fueron transfectadas con ARNi control, p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  (48h). Se incubaron las células sin suero 19h y posteriormente fueron activadas con suero al 10% 1h y 2h. Examinamos la eficiencia de la transfección por WB (A). 1mg de extracto total fue inmunoprecipitado en las distintas condiciones (indicadas) con anticuerpo anti-p110 $\alpha$  o anti-p110 $\beta$ . Finalmente la actividad lípido quinasa fue analizada *in vitro* en los inmunoprecipitados. El gráfico muestra la intensidad de la señal PI(3)P relativa al máximo de la señal para p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  (100%, n = 3 ). Test t de Student (\*) p<0.05.

### 7.3 La activación óptima de p110 $\beta$ se produce cuando se encuentra asociada a p110 $\alpha$

Hasta el momento nuestros datos indican que la activación óptima de p110 $\beta$  requiere la asociación con p110 $\alpha$  tras la activación celular. Para confirmar que la actividad de p110 $\beta$  es mayor cuando está en complejo con p110 $\alpha$ , activamos células NIH3T3 durante una hora y sus extractos se fraccionaron por columna de exclusión molecular. Esta aproximación nos permitió distinguir entre heterodímeros p85/p110 (~220 kDa), tetrámeros de ~440 kDa y una fracción de alto peso molecular (~660 kDa) que también contiene p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  (FIG. 19A). Esta fracción se corresponde con la fracción que engloba un complejo

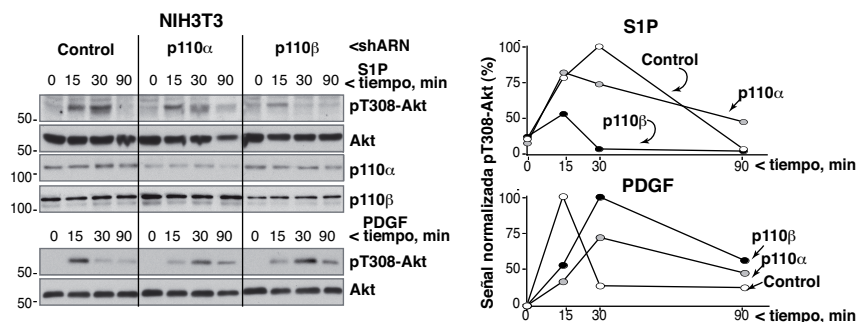
macromolecular asociado a PTEN y que además contiene p110 $\beta$  y p85 (Rabinovsky et al., 2009). Paralelamente, resolvimos las fracciones en geles nativos para determinar si estas contenían complejos de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  demostrando así la presencia de las isoformas p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  en diferentes complejos de alto peso molecular (~440kDa y ~660 kDa) (FIG. 19B).



**Figura 19. La actividad de p110 $\beta$  es mayor en complejo (fracción de ~440 kDa)** (A) Células NIH3T3 arrestadas (sin suero 19h), fueron estimuladas (suero 10%, 1h), lisadas y separadas mediante filtración en gel. Las fracciones fueron examinadas en WB. (B) En paralelo las fracciones indicadas fueron separadas por electroforesis en geles nativos 6% e inmunobloteadas para p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ . (C) Extractos de células NIH3T3, PC3 (PTEN<sup>-/-</sup>) y extractos de las fracciones de 669, 440 y 220 kDa, fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-p110 $\alpha$  o anti-p110 $\beta$ , y la actividad lípido quinasa examinada *in vitro*. Los gráficos muestran la proporción de p110 en cada fracción comparada con el total (100 %) (izquierda), la cantidad de señal de PI(3)P en cada fracción (relativa al total de la señal de PI(3)P, 100%) (en medio) y el ratio de estos valores (derecha). Test t de Student (\*) p<0.05, (\*\*) p<0.01, (\*\*\*)p<0.001; n.s. = no significativo.

A continuación, examinamos la actividad PI3K de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  inmunoprecipitándolas de las fracciones correspondientes a ~220 kDa, ~440 kDa y ~660 kDa. Detectamos muy baja actividad de ambas isoformas a ~660 kDa pues su presencia es casi indetectable tras la inmunoprecipitación. La actividad lípido quinasa de p110 $\alpha$  se concentró en la fracción de ~220 kDa (heterodímeros p85/p110). En el caso de la actividad de p110 $\beta$  fue similar en ~220 kDa (heterodímeros) y ~440 kDa (tetrameros). Sin embargo, teniendo en cuenta que la cantidad de p110 $\beta$  inmunoprecipitada de las fracciones de ~440 kDa es menor que de la de ~220 kDa, la actividad específica de p110 $\beta$  es significativamente mayor en la fracción de ~440 kDa, en forma tetramérica (FIG. 19C). Por tanto nuestros resultados muestran que p110 $\beta$  tiene una mayor actividad específica en el complejo que se detecta a ~440 kDa y sugieren que la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  es necesaria para la activación óptima de p110 $\beta$ .

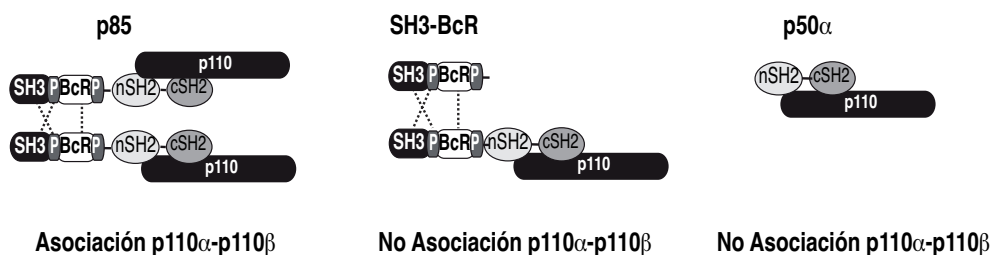
En la literatura se ha descrito que p110 $\beta$  también puede ser activada por estimulación con esfingosina-1-fosfato (S1P) o ácido lisofosfatídico (LPA) a través de señalización por receptores acoplados a proteínas G (del inglés *G protein-coupled receptors*, GPCR). Pero a diferencia del PDGF o el suero, S1P y LPA no son capaces de estimular la entrada en ciclo celular de manera óptima (Guillermet-Guibert et al., 2008; Marqués et al., 2008; Nagata et al., 2006). Para determinar si la actividad de p110 $\beta$  está vinculada la activación de p110 $\alpha$  tras activación por GPCR, comparamos la activación de Akt por estimulación con PDGF o S1P en condiciones de silenciamiento de p110 $\alpha$  o p110 $\beta$ , respecto a las condiciones control. Mientras que la estimulación por PDGF fue sensible al silenciamiento de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ , la estimulación por S1P fue reducida mayoritariamente en el caso del silenciamiento de p110 $\beta$  (FIG. 20). Todos estos datos sugieren que la activación óptima de p110 $\beta$  por suero, está regulada por p110 $\alpha$ . Sin embargo, p110 $\beta$  puede ser activada por GPCR independientemente de p110 $\alpha$ .



**Figura 20. Análisis de la cinética de activación de Akt en células NIH3T3 silenciadas en p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ .** Transfectamos células NIH3T3 con shARN control, p110 $\alpha$  o de p110 $\beta$  (72h). Posteriormente las células fueron sincronizadas en medio sin suero (2h) y activadas con S1P (10mM) o PDGF (50 nM) a distintos tiempos. Analizamos los niveles de pAkt en WB. La imagen muestra una exposición de 2 minutos para el estímulo del PDGF y 20 minutos de exposición para el S1P. El gráfico muestra el % de la señal pAkt normalizada a los niveles de Akt y relativo a la señal máxima para cada estímulo (100%; mean  $\pm$  SEM, n=3).

### 8. La rotura del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ inhibe funciones específicas de p110 $\beta$ .

En este apartado se presentan las tres posibilidades que barajamos a la hora de establecer la asociación de p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  y su potencial rotura creando dominantes negativos con dominios específicos (SH3-BCR) o formas de procesamiento alternativo como p50 $\alpha$  (FIG. 21).

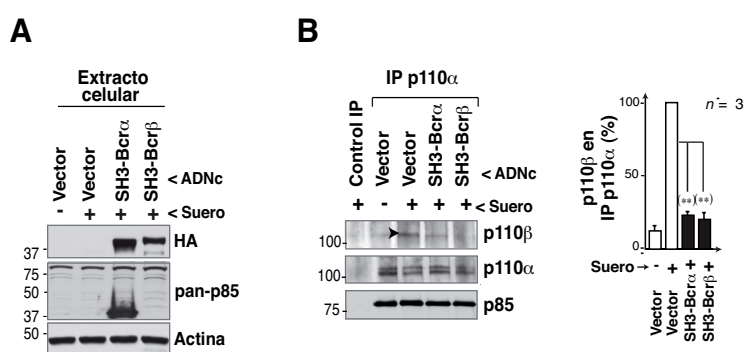


**Figura 21. Esquema de la formación del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  y sus posibilidades de interferencia por dominantes negativos.**

La depleción de p110 $\beta$  no altera significativamente los eventos regulados por p110 $\alpha$  (por ejemplo la activación p70S6K en fase G1 temprana). Sin embargo, procesos celulares regulados directamente por p110 $\beta$ , como por ejemplo el reclutamiento de PCNA a la cromatina, se ven parcialmente afectados por la depleción de p110 $\alpha$  (Marqués et al., 2009).

Todos estos datos sugieren que la asociación entre p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  y la influencia de p110 $\alpha$  sobre la activación óptima de p110 $\beta$  repercutirían en funciones específicas de p110 $\beta$ .

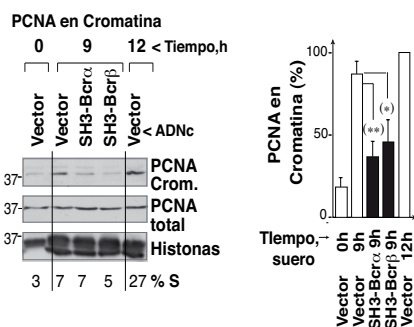
Con el objetivo de analizar a nivel celular las consecuencias de la rotura o interferencia en la generación del complejo, transfectamos células NIH3T3 con el dominio SH3-BCR de p85 $\alpha$  o p85 $\beta$  (FIG. 22A) y tras sincronizarlas en G0 (19 h), estimulamos 1h con suero al 10%. Analizamos la generación del complejo inmunoprecipitando p110 $\alpha$  y testando la asociación p110 $\beta$  por WB. Tras 1h de estimulación (transición G0>G1) observamos una reducción de la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  en células transfectadas con los dominios N-terminales de p85 en comparación con el control (FIG. 22B).



**Figura 22. Efecto de la transfección del N-terminal de p85 sobre la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ .** Se transfectaron células NIH3T3 con ADNc codificantes para control N-SH3-BcR de p85 $\alpha$  y p85 $\beta$  (24h). Las células fueron cultivadas sin suero (19h) y estimuladas con medio completo (10% suero, 1h). Los niveles de la transfección fueron analizados por WB (A). El anticuerpo anti-p85 pan no reconoce el N-terminal de p85 $\beta$ . (B) Los extractos celulares (1mg) fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-p110 $\alpha$  y la presencia de p110 $\beta$  testada por WB. El gráfico muestra el porcentaje de p110 $\beta$  en complejo con p110 $\alpha$  relativo al máximo (100% en controles estimulados). Test t de Student (\*) p<0.05, (\*\*) p<0.01.

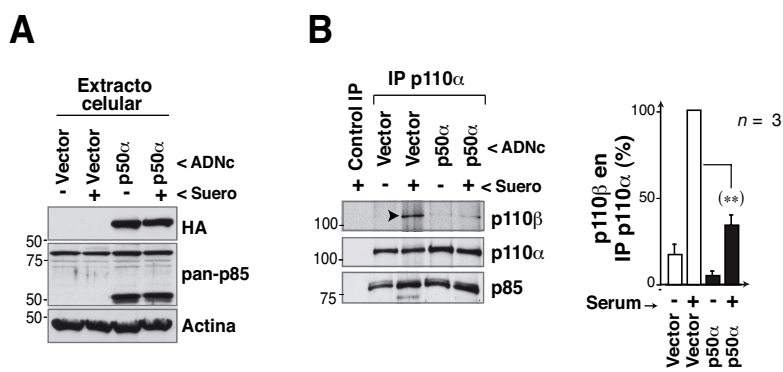
En paralelo a este experimento, testamos la influencia de romper el complejo sobre la unión de PCNA a la cromatina, evento regulado por p110 $\beta$  (Marqués et al., 2009). Para ello se sincronizaron los cultivos de células NIH3T3 transfectadas como en el experimento anterior, y a continuación se estimularon con suero 9h (entrada en fase S) (Kumar et al., 2006). Las células fueron fraccionadas obteniendo extractos correspondientes a las fracciones de citoplasma, nucleoplasma y cromatina. El análisis de la fracción de cromatina indica que la expresión de los fragmentos N-terminales de p85 reduce el reclutamiento de PCNA a la cromatina durante la transición G1>S (FIG. 23), un evento regulado por p110 $\beta$  (Marqués et al., 2009). Este dato sugiere que la interferencia del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  disminuye la activación de p110 $\beta$ .





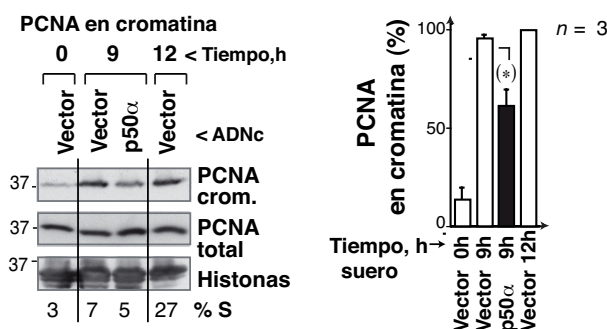
**Figura 23. Efecto de la transfección del fragmento N-terminal de p85 sobre el reclutamiento de PCNA a la cromatina.** NIH3T3 procesadas como en la figura 22 fueron recogidas a diferentes tiempos (indicados) y fraccionadas en citosol, nucleoplasma y cromatina. **(A)** La cantidad de PCNA en cromatina fue determinada por WB. **(B)** El gráfico indica el porcentaje de PCNA unido a cromatina relativo al máximo (100%, punto de 12h en células control) (media ± SEM, n = 3). Test t de Student (\*) p<0.05, (\*\*) p<0.01.

A continuación analizamos el efecto de la expresión de p50α, una forma de procesamiento alternativo de la subunidad reguladora p85α que carece del fragmento N-terminal (Fruman et al., 1996), sobre la generación del complejo p110α/p110β. De forma similar a lo descrito anteriormente, las células transfectadas con p50α o con vector vacío se inactivaron (incubadas sin suero 19 h) y se estimularon con medio suplementado con suero (10%) para inducir la formación del complejo (FIG. 24A). Seguidamente, se lisaron las células y tras inmunoprecipitar p110α, testamos la asociación p110α/p110β detectando p110β por WB. La expresión de p50α redujo de forma significativa la asociación p110α/p110β tras estimulación celular (FIG. 24B).



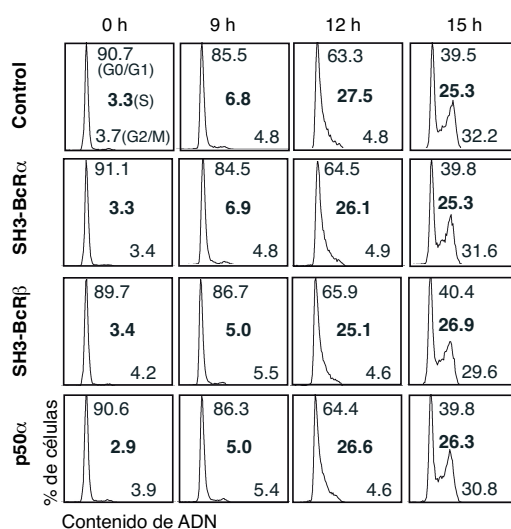
**Figura 24. Efecto de la transfección de p50α sobre la asociación p110α/p110β.** Se transfectaron células NIH3T3 con ADNc control y p50α (24h). Las células fueron arrestadas (19h) y activadas durante 1h con suero (10%). **(A)** La eficiencia de la transfección fue testada por WB. **(B)** 1mg de extracto celular fue inmunoprecipitado con anticuerpo anti-p110α y analizamos la asociación con p110β por WB. El gráfico indica el porcentaje de p110β en complejo con p110α relativo al máximo (100% en controles estimulados) (media ± SEM, n = 3). Test t de Student (\*) p<0.05, (\*\*) p<0.01.

Del mismo modo que ocurre con los dominios N-terminal de p85, la sobreexpresión de p50 $\alpha$  redujo la carga de PCNA a la cromatina durante la transición G1>S (FIG. 25), sugiriendo que la interferencia de la asociación de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  tiene un efecto inhibitorio sobre unión de PCNA a la cromatina regulada por p110 $\beta$ .



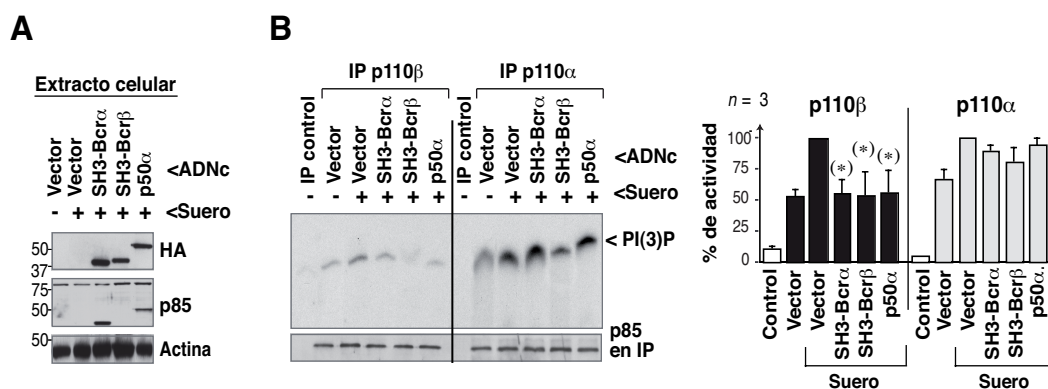
**Figura 25. Efecto de la sobreexpresión de p50 $\alpha$  sobre la unión de PCNA a cromatina.** NIH3T3 procesadas como en la figura 24 fueron recogidas a diferentes tiempos (indicados) y fraccionadas en citosol, nucleoplasma y cromatina. (A) La cantidad de PCNA en cromatina fue determinada por WB. (B) El gráfico indica el porcentaje de PCNA unido a cromatina relativo al máximo ( 100%, punto de 12h en células control) (media  $\pm$  SEM, n = 3). Test t de Student (\*) p<0.05.

Todos estos datos indican que la generación del complejo influye en la correcta funcionalidad de p110 $\beta$ . En el caso del análisis del reclutamiento de PCNA, se observa una inhibición incompleta ya que este evento es parcialmente independiente de la actividad quinasa de p110 $\beta$  (Marqués et al., 2009). El defecto parcial en el reclutamiento de PCNA a la cromatina podría ser también consecuencia de un retraso del ciclo celular en la transición G1>S, sin embargo, la interferencia del complejo, por transfección de los N-terminales de p85 o transfección de p50 $\alpha$ , no alteró de forma significativa los porcentajes de células en entrada en fase S, comparados con el control (FIG. 23, 25, 26).



**Figura 26. Efecto de la transfección de SH3-BcR $\alpha$ , SH3-BcR $\beta$  o p50 $\alpha$  en el ciclo celular.** Transfectamos células NIH3T3 con ADNc SH3-BcR $\alpha$ , SH3-BcR $\beta$  o p50 $\alpha$ . Tras 48h de transfección, las células fueron sincronizadas (sin suero 19h) y activadas con medio completo (suero al 10%) induciendo su entrada en ciclo celular. La figura muestra perfiles representativos de ciclo celular analizado midiendo su contenido en ADN por citometría de flujo a diferentes tiempos. Los números indican el porcentaje de células en cada fase.

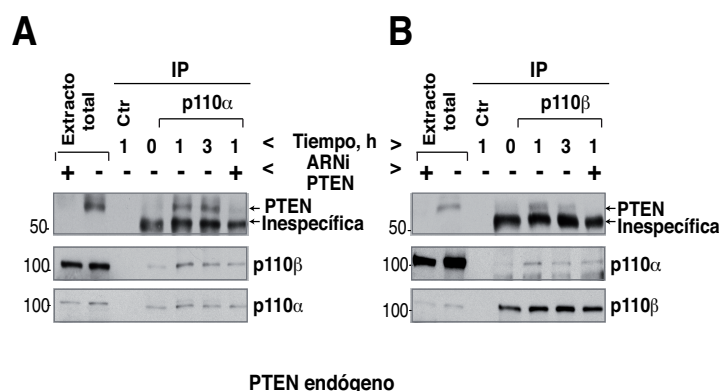
Por último, analizamos las consecuencias de interferir el complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  sobre las actividades lípido quinasa de dichas isoformas. Para ello ensayamos la actividad lípido quinasa tanto de p110 $\alpha$  como de p110 $\beta$  en células NIH3T3 transfectadas con p50 $\alpha$ , SH3-BCR $\alpha$ , SH3-BCR $\beta$  (condiciones de disminución/rotura del complejo) o control tras ser mantenidas sin suero durante 19h (quiescencia) y estimuladas con suero al 10% durante 1h (FIG. 27A). Los resultados indican que la actividad de p110 $\alpha$  no se vio afectada por la sobreexpresión de los N-terminales de p85 o p50 $\alpha$ . Sin embargo, la actividad de p110 $\beta$  se redujo de manera significativa por la expresión de dichas construcciones en comparación con el control (FIG. 27B), apoyando la hipótesis de que p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  regula la correcta activación de p110 $\beta$ .



**Figura 27. La rotura del complejo p110α/p110β reduce la actividad catalítica de p110β.** (A) Células NIH3T3 fueron transfectadas con ADNc codificantes para control, HA-SH3-BcR de p85α, HA-SH3-BcR de p85β y HA-p50α (24h). Las células fueron arrestadas (19h) y estimuladas con suero al 10% (1h). Los niveles de transfección fueron analizados por WB. El anticuerpo anti-p85 pan no reconoce el N-terminal de p85β. (B,C) p110β y p110α fueron inmunoprecipitados del extracto celular y su actividad lípido quinasa examinada *in vitro*. Los gráficos muestran la actividad PI3K relativa al máximo (Controles estimulados 1h, 100% de actividad)(media ± SEM, n = 3). Test t de Student (\*) p<0.05.

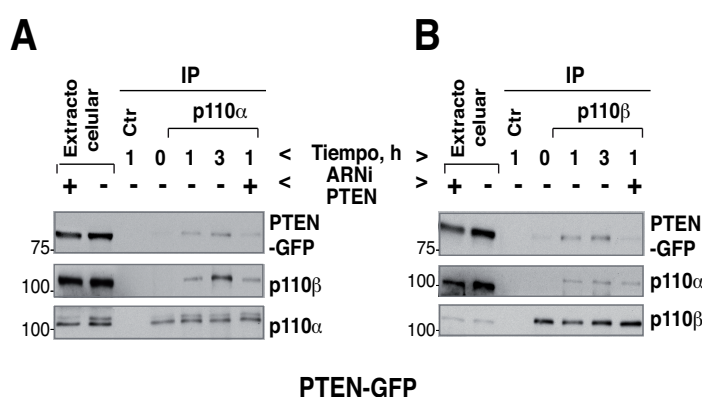
### 9. PTEN no es esencial para la asociación p110α/p110β.

Se ha descrito que PTEN forma un macrocomplejo (PAC, del inglés *PTEN associated complex*) con diferentes proteínas como hnRNPC, p85 y p110β entre otras; este complejo supera los 600 kDa de peso molecular (Mosessian et al., 2009; Rabinovsky et al., 2009; Vazquez et al., 2001). Se desconoce su función fisiológica aunque se sugiere que en él se ensambla PTEN no fosforilado y activo (Rabinovsky et al., 2009). Teniendo en cuenta que detectamos p110α y p110β en las fracciones mayores de 600 kDa (FIG. 19), decidimos analizar si p110α y p110β también se asociaba a PTEN tras activación celular. La activación con suero (10%) de células 293T quiescentes (19 h sin suero), induce la coimmunoprecipitación de PTEN con p110α (FIG. 28A) y con p110β (FIG. 28B). Ya que PTEN y la cadena pesada de las inmunoglobulinas tienen un peso y una movilidad electroforética similar, incluimos una condición con células transfectadas con ARNi de PTEN (48h) con el fin de asegurar la especificidad de las bandas detectadas (FIG. 28A, 28B).



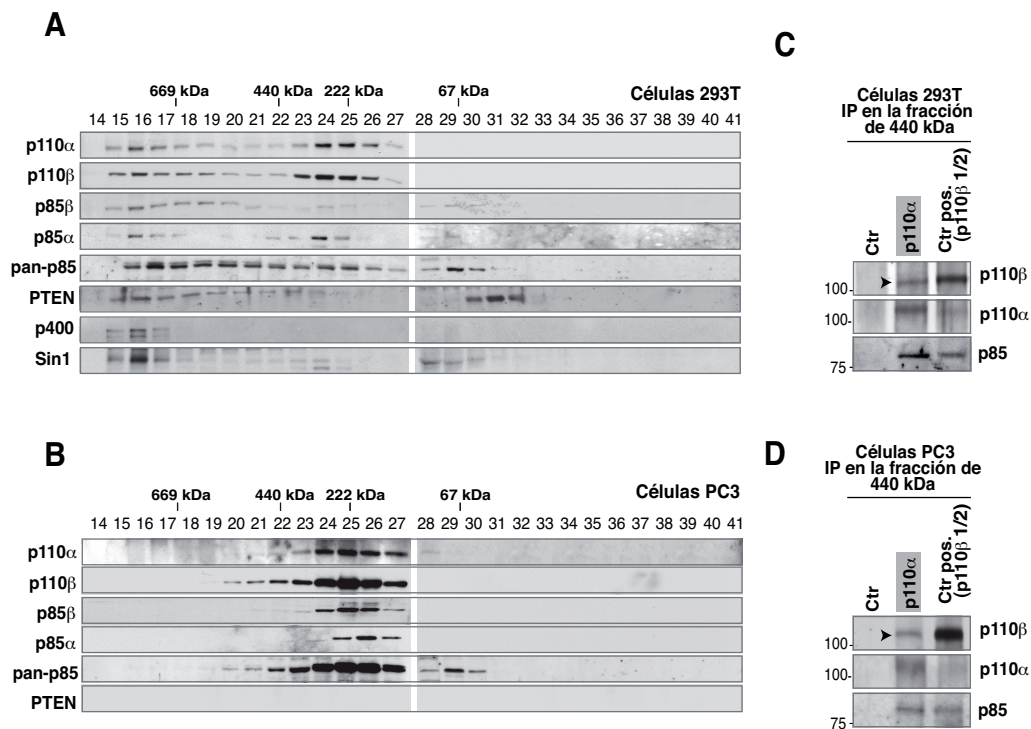
**Figura 28. La activación celular induce la asociación de PTEN endógeno con p110α y p110β.** Incubamos células 293T durante 2h sin suero para posteriormente estimularlas con medio completo (suero 10%) a 1h y 3h. En paralelo, algunas fueron transfectadas con ARNi de PTEN (48h) y cultivadas en las mismas condiciones que las anteriores. Se lisaron las células y se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-p110α (A) o anti-p110β (B) testando la presencia de PTEN por WB. Los controles negativos incluyen extracto celular + proteína A.

En paralelo realizamos otro tipo de experimento similar pero esta vez transfectando células 293T (48h) con la construcción PTEN-GFP. El ADNc PTEN-GFP genera un PTEN con un peso molecular de ~80 kDa evitando así la localización de PTEN en la zona de las IgG. PTEN-GFP es funcional pues transfectado en células Jurkat, reduce los niveles de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> y pAkt (Lacalle et al., 2004). La coninmunoprecipitación de PTEN-GFP recombinante con p110α (FIG. 29A) y p110β (FIG. 29B) se produjo de nuevo tras la estimulación suero (10%) confirmando así la asociación de PTEN con las isoformas p110α y p110β tras activación celular (FIG. 28, 29).



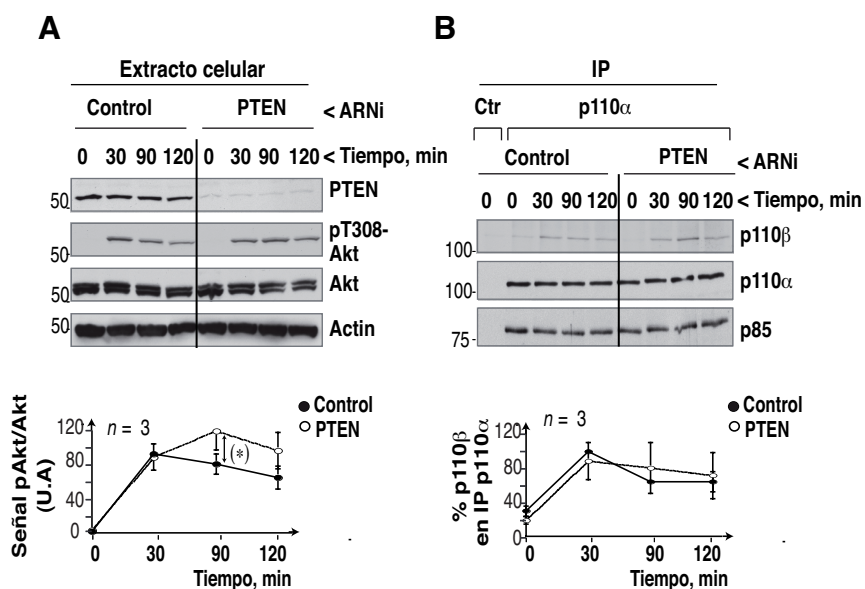
**Figura 29. La activación celular induce la asociación de PTEN recombinante con p110α y p110β.** Transfectamos células 293T con PTEN-GFP (48h) y 24h después las células fueron transfectadas ARNi control o de PTEN (48h); se incubaron las células sin suero 2 h y posteriormente fueron estimuladas a distintos tiempos (indicados); testamos la presencia de PTEN-GFP (~80 kDa) en los inmunoprecipitados de p110α (A) y p110β (B). Los controles negativos incluyen extracto celular + proteína A.

Con el objetivo de analizar si la presencia de PTEN es esencial para la formación del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ , analizamos por filtración en gel extractos de células 293T (PTEN<sup>+/+</sup>) y PC3 (PTEN<sup>-/-</sup>) en crecimiento exponencial. En el caso de las células 293T, PTEN fue detectado en el complejo PAC (>600 kDa) junto a p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  y p85; y en forma monomérica alrededor de 60 kDa. En las fracciones de ~440 kDa y ~220 kDa revelamos la presencia mayoritariamente de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  junto con p85 (FIG. 30A). Sin embargo la ausencia de PTEN ( y por tanto del PAC) solo permitió detectar p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  en los pesos correspondientes a tetrámeros (~440 kDa) y heterodímeros (~220kDa) (FIG. 30B). Estos datos sugieren que PTEN no es esencial para la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ . De hecho, confirmamos la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  en la fracción de ~440 kDa correspondiente al tetrámero p85-p110 $\alpha$ /p85-p110 $\beta$  en ambos tipos celulares, inmunoprecipitando p110 $\alpha$  y analizando la coimmunoprecipitación de p110 $\beta$  por WB (FIG. 30C, 30D).



**Figura 30. PTEN no es esencial para la formación del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ .** Extractos celulares de células 293T (A) y células PC3 (PTEN<sup>-/-</sup>) (B) fueron separados por filtración en gel y las fracciones eluidas analizadas por WB con los anticuerpos indicados. Extractos de células 293T (C) y células PC3 (PTEN<sup>-/-</sup>) (D) fueron separados por filtración en columna de gel y las fracciones correspondientes a ~440 kDa fueron inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-p110 $\alpha$  para testar la presencia de p110 $\beta$ . Una inmunoprecipitación de p110 $\beta$  partiendo de 250  $\mu$ g de extracto celular fue empleada como control positivo. La figura muestra un experimento representativo; n = 3. Las flechas indican las isoforma p110 $\beta$  en complejo con p110 $\alpha$ .

Por último para confirmar que PTEN no influye sobre la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ , reducimos los niveles de la proteína PTEN mediante ARNi lo cual causó una activación de Akt más prolongada tras activación celular (FIG. 31A) tal y como se ha descrito anteriormente (Myers et al., 1998). En paralelo inmunoprecipitamos p110 $\alpha$  y testamos la asociación de p110 $\beta$  por WB. Los resultados muestran que no existe un cambio significativo en la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  por depleción de PTEN (FIG. 31B).



**Figura 31. Efecto de la transfección de ARNi de PTEN sobre la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ .** Se transfectaron células NIH3T3 con ARNi control o ARNi de PTEN (48h), se arrestaron sin suero (19h) y a continuación fueron activadas por adición de suero (10%) y procesadas a diferentes tiempos (indicados). La eficiencia de la transfección y la capacidad de activación fue analizada por WB (A). EL gráfico muestra el porcentaje la señal de p-Akt relativa al Akt total y normalizada al máximo de la señal (100%, 30 minutos de estimulación en control). (B) 1mg de extracto total fue inmunoprecipitado en las distintas condiciones con anticuerpo anti-p110 $\alpha$  y la presencia de p110 $\beta$  se analizó por WB. El gráfico indica el porcentaje de la señal de p110 $\beta$  en la inmunoprecipitación de p110 $\alpha$  relativo al máximo (30 minutos de estimulación en control, 100 %); (media  $\pm$  SEM, n = 3). Test t de Student (\*) p<0.05.

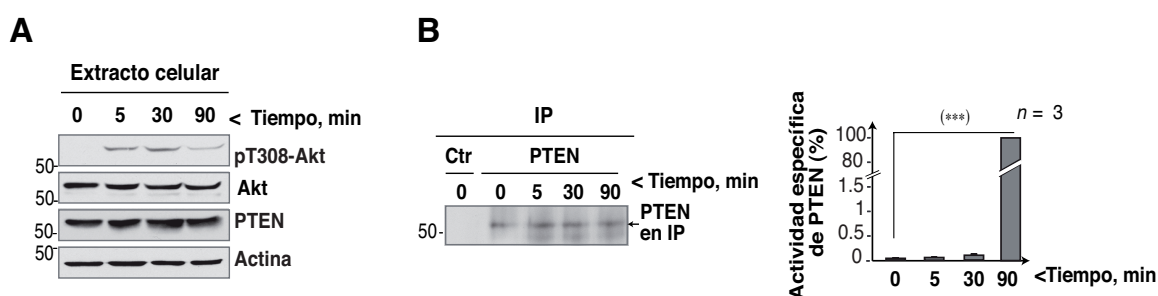
Por tanto, nuestros datos indican que la activación celular induce la incorporación de PTEN al complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ . Sin embargo, PTEN no es esencial para la asociación entre p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ .

## 10. La asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ regula la actividad de PTEN

### 10.1 Cinética de activación de PTEN en el PAC.

Recientemente se ha publicado que el macrocomplejo asociado a PTEN (PAC) está enriquecido en PTEN no fosforilado y se relaciona con un estado inestable, abierto y por

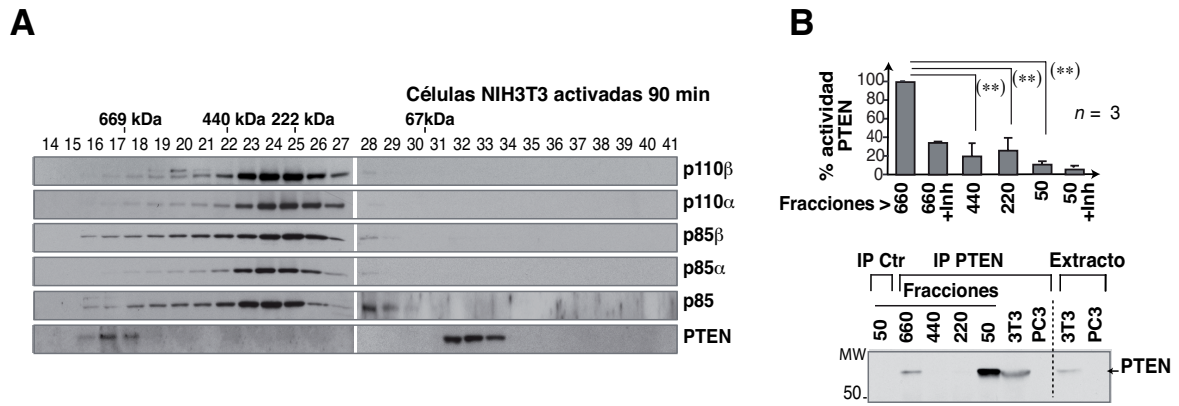
tanto activo (Chagpar et al., 2010; Rabinovsky et al., 2009; Ross y Gericke, 2009). Por ello analizamos si la incorporación de PTEN en el PAC induce su activación. En primer lugar analizamos la cinética de activación de PTEN. Se incubaron células NIH3T3 19h sin suero y a continuación se activaron en medio con 10% de suero a diferentes tiempos. Se obtuvieron distintos extractos celulares, inmunoprecipitamos PTEN y mediante un ensayo de fosfatasa examinamos su actividad fosfatasa usando como sustrato PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. PTEN mostró máxima actividad a 90 minutos tras estimulación con suero sin cambios en cuanto a sus niveles de expresión (analizados por WB) (FIG. 32A, 32B).



**Figura 32. Cinética de activación de PTEN.** (A) Células NIH3T3 fueron sincronizadas en G0 por privación de suero (19h) y activadas por su adición al 10 %. Se analizaron los niveles de p-Akt (activación celular) por WB. (B) 500 µg de extracto total fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-PTEN y su actividad fosfatasa fue analizada *in vitro* usando PI(3,4,5)P<sub>3</sub> como sustrato. El gráfico muestra la actividad de PTEN respecto a la cantidad de PTEN inmunoprecipitada y normalizada al punto de máxima actividad (90 minutos de activación, 100% de actividad) (media ± SEM, n = 3).

Con el fin de comparar la actividad de PTEN monomérico y en complejo con p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ , fraccionamos mediante columna de exclusión molecular extractos de células NIH3T3 estimuladas con suero 90 minutos y las distintas fracciones se analizaron por WB. PTEN aparece como parte del complejo PAC (~660 kDa) y como monómero en torno a ~60 kDa (FIG. 33A). Las fracciones correspondientes a ~660 kDa (PAC), ~440 kDa (tetrámeros PI3K), ~220 kDa (heterodímeros PI3K) y ~60 kDa (monómeros PTEN) se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-PTEN y realizamos ensayo fosfatasa en cada condición. Los resultados muestran que la actividad de PTEN se concentra en el macrocomplejo PAC (fracción ~660 kDa) a pesar de que su cantidad es mucho menor que la fracción monomérica inmunoprecipitada. Dicha actividad PTEN es sensible a la presencia de un inhibidor específico de PTEN (FIG. 33B). Estos resultados indican que solo una fracción pequeña del PTEN celular está activo y corresponde a la fracción ensamblada en el PAC.



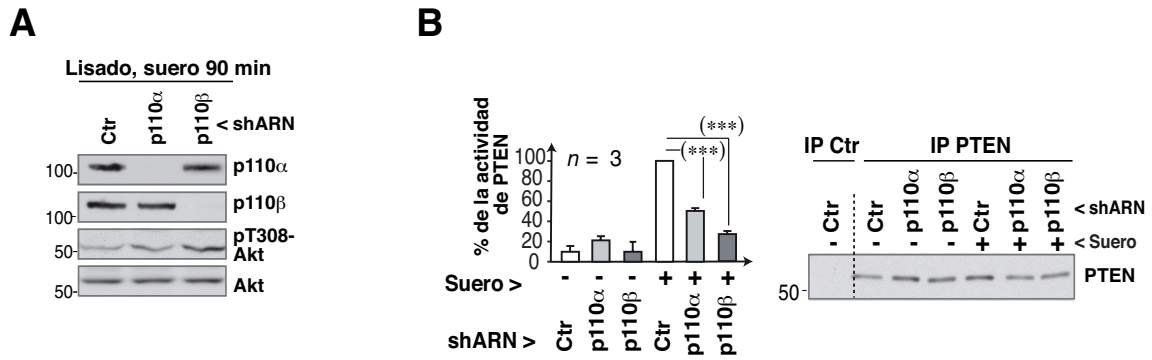


**Figura 33. PTEN muestra mayor actividad fosfatasa en el complejo asociado a PTEN( >600 kDa).**

Células NIH3T3 sincronizadas en G0 y activadas hasta 90 minutos por adición de suero (10%), fueron lisadas, separadas por filtración en gel y las distintas fracciones examinadas por WB (A). De las fracciones de interés (~660, ~440, ~220, ~50 kDa) se inmunoprecipitó PTEN y analizamos su actividad fosfatasa *in vitro*. Como control interno, en paralelo, las fracciones de ~660 y ~50 kDa fueron sujetas a un tratamiento con inhibidor específico de PTEN (bpV 100nM). El gráfico muestra el porcentaje de la actividad de PTEN normalizada a la señal máxima intraexperimental (100%, fracción de ~660 kDa) (Media±SEM, n = 3). Test t de Student (\*) p<0.05, (\*\*) p<0.01.

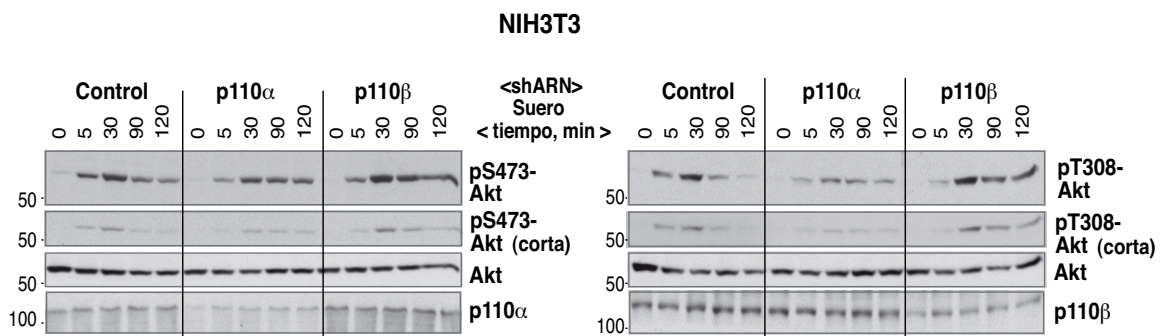
## 10.2 La interferencia del complejo p110α/p110β reduce la actividad fosfatasa de PTEN

Con el fin de analizar la influencia del complejo p110α/p110β sobre la actividad de PTEN, transfectamos células NIH3T3 con shARN específicos para p110α y p110β y comprobamos la eficiencia del silenciamiento por WB (FIG. 34A). En paralelo dichas células fueron sincronizadas en G0 y estimuladas 90 minutos con medio suplementado con suero (10%). Seguidamente, lisamos e inmunoprecipitamos PTEN para medir su actividad en ensayo fosfatasa. Tanto la depleción de p110α como la de p110β redujeron la actividad de PTEN de forma significativa, si bien, la actividad de PTEN se redujo más en ausencia de p110β (FIG. 34B).



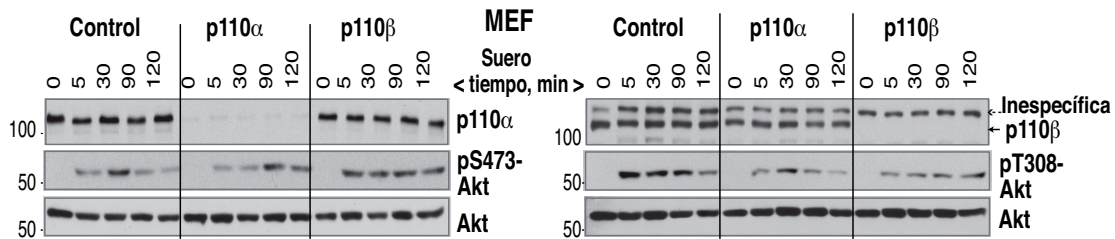
**Figura 34. Efecto del ARNi de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  sobre la actividad fosfatasa de PTEN.** Se transfectaron células NIH3T3 con shARN control, p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ . **(A)** Tras 48h examinamos la eficiencia de la transfección por WB. **(B)** En paralelo, tras 48h de transfección las células fueron sincronizadas (19h) y estimuladas con suero (10%) hasta 90 min. Se inmunoprecipitó PTEN y se testó su actividad fosfatasa *in vitro*. El gráfico muestra la actividad de PTEN respecto a la cantidad de PTEN inmunoprecipitada (analizada por WB) y normalizada al punto de máxima actividad (90 minutos de activación en control, 100% de actividad) (media  $\pm$  SEM, n = 3). Test t de Student (\*) p<0.05, (\*\*) p<0.01, (\*\*\*) p<0.001.

De acuerdo con estos datos, la desregulación de PTEN en ausencia de p110 $\alpha$  o p110 $\beta$ , debería alterar la activación de Akt. En este sentido el análisis de la cinética de Akt tras activación por suero muestra que, aunque el silenciamiento de p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  redujo el pico de activación temprana de Akt (pAkt S473 y pAkt T308), prolongó la detección de pAkt a tiempos más tardíos (FIG. 35) sugiriendo que la falta de p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  inactiva PTEN permitiendo la activación de Akt de modo mantenido.



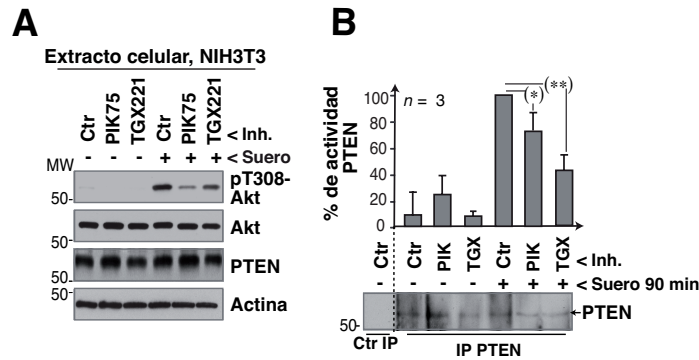
**Figura 35. Análisis de la cinética de activación de Akt en MEFs silenciadas en p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ .** Células NIH3T3 fueron transfectadas con shARN (72h), sincronizadas sin suero (19h) y estimuladas con medio completo (suero 10%) a distintos tiempos. Analizamos la eficiencia del silenciamiento y los niveles de pAkt por WB.

Este mismo fenómeno en la cinética de pAkt en respuesta a la estimulación por suero, se observó también en MEFs WT comparadas con MEFs delecionadas de p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  (FIG. 36) ya que ambas prolongan el tiempo de activación de Akt.



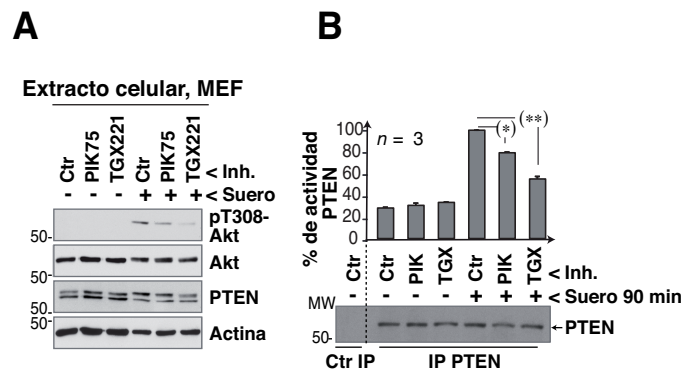
**Figura 36. Análisis de la cinética de activación de Akt en MEFs deficientes en p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ .** MEFs control (WT), deficientes en p110 $\alpha$  o deficientes en p110 $\beta$  fueron analizadas como en la figura 35.

Ante la posibilidad de que la actividad de PTEN se regule por la activación de PI3K, analizamos si los inhibidores específicos de p110 $\alpha$  (PIK75) o p110 $\beta$  (TGX221) tenían efecto inhibitorio sobre la actividad fosfatasa de PTEN. Células NIH3T3 fueron sincronizadas 19h sin suero. Posteriormente, las células fueron incubadas con DMSO o con los inhibidores correspondientes 30 minutos antes del estímulo con suero. Tanto la inhibición de p110 $\alpha$  como la inhibición de p110 $\beta$  a dosis previamente descritas como específicas (Marqués et al., 2008; Marqués et al., 2009), redujo la señal del pico de pAkt a 30 minutos tras estimulación con suero (FIG. 37A). Por otra parte, analizamos la actividad fosfatasa de PTEN a 90 minutos observando que ambos inhibidores redujeron la actividad de PTEN respecto al control (FIG. 37B); el tratamiento con el inhibidor específico de p110 $\beta$  (TGX221) redujo de manera más marcada la actividad de PTEN comparada con el efecto de PIK75 (FIG. 37).



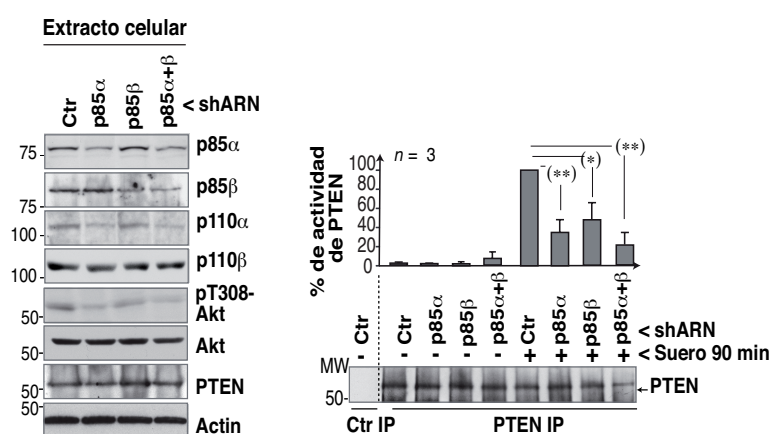
**Figura 37. Efecto de los inhibidores específicos de las isoformas de PI3K sobre la actividad de PTEN.** Células NIH3T3 fueron sincronizadas y estimuladas como en la figura 36. 30 minutos antes de la estimulación con suero, las células fueron tratadas con PIK75 (0.08  $\mu$ M) o TGX221(30  $\mu$ M) (indicado). **(A)** Examinamos el efecto de los inhibidores por WB. **(B)** Los extractos celulares fueron inmunoprecipitados e inmunobloteados con anticuerpo anti-PTEN, y su actividad fosfatasa cuantificada *in vitro*. El gráfico muestra la actividad de PTEN respecto a la cantidad de PTEN inmunoprecipitada y normalizada al punto de máxima actividad (90 minutos de activación en control, 100% de actividad) (media  $\pm$  SEM, n = 3). Test t de Student (\*) p<0.05, (\*\*) p<0.01.

Resultados similares se obtuvieron realizando el mismo tipo de experimento en MEFs primarias aisladas de ratones WT (FIG. 38A, 38B). Estos datos demuestran que tanto la activación de p110 $\alpha$  como p110 $\beta$  regulan la actividad de PTEN siendo ésta más sensible a la actividad de p110 $\beta$  tanto en líneas celulares como en células normales.



**Figura 38. Efecto de los inhibidores de las isoformas de PI3K sobre la actividad de PTEN en MEFs primarias.** Células MEFs WT primarias fueron sincronizadas y estimuladas como en la figura 37. 30 minutos antes de la estimulación con suero, las células fueron tratadas con PIK75 (0.08  $\mu$ M) o TGX221(30  $\mu$ M) (indicado). **(A)** El efecto de los inhibidores fue examinado por WB. **(B)** Los extractos celulares fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-PTEN y su actividad fosfatasa cuantificada *in vitro*. El gráfico muestra la actividad de PTEN respecto a la cantidad de PTEN inmunoprecipitada (analizada por WB) y normalizada al punto de máxima actividad (90 minutos de activación en control, 100% de actividad) (media  $\pm$  SEM, n = 3). Test t de Student (\*) p<0.05, (\*\*) p<0.01.

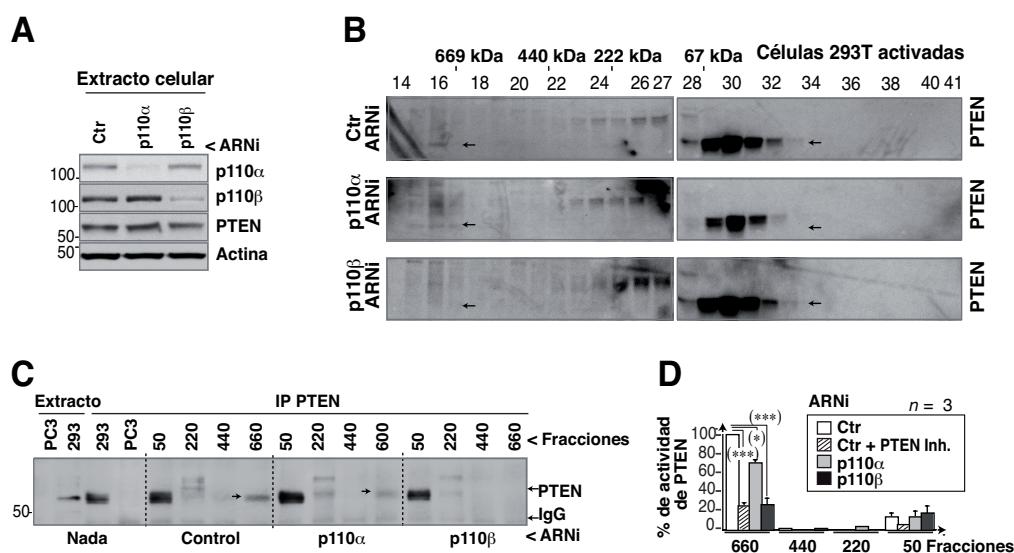
Se ha descrito que PTEN se une a p85 $\alpha$  monomérico aumentando su actividad fosfatasa (Chagpar et al., 2010). Según nuestra hipótesis la depleción de p85 $\alpha$  y/o p85 $\beta$  inhibiría también la actividad de PTEN pero a través de un mecanismo distinto ya que la reducción de p85 disminuiría la cantidad de complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  en la célula. Para demostrarlo, transfectamos células NIH3T3 con shARN para p85 $\alpha$ , p85 $\beta$  o ambas durante 48 h (FIG. 39A). Dichas células fueron sincronizadas y estimuladas con suero 90 minutos con el fin de inducir el complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  y la máxima actividad de PTEN. A continuación, se inmunoprecipitó PTEN de los extractos de estas células y se analizó su actividad fosfatasa. La depleción de las subunidades reguladoras produjo una disminución significativa de la actividad fosfatasa de PTEN (FIG. 39).



**Figura 39. Efecto de la transfección de shARN de p85 $\alpha$  y p85 $\beta$  sobre la actividad de PTEN.** Se transfectaron células NIH3T3 con shARN control, p85 $\alpha$ , p85 $\beta$  y p85 $\alpha$  + p85 $\beta$ . Tras 48h examinamos la eficiencia de la transfección por WB. En paralelo, tras 48h de transfección las células fueron sincronizadas (19h sin suero) y estimuladas con medio completo (10% suero) hasta 90 min. Se inmunoprecipitó PTEN y se testó su actividad fosfatasa *in vitro*. El gráfico muestra la actividad relativa de PTEN respecto a la cantidad de PTEN inmunoprecipitada (analizada por WB) y normalizada al punto de máxima actividad (90 minutos de activación en control, 100% de actividad) (media  $\pm$  SEM, n = 3). Test t de Student (\*) p<0.05, (\*\*) p<0.01.

Anteriormente, hemos descrito que PTEN se muestra activo en el macrocomplejo junto con las isoformas p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  (FIG. 33). La observación de que PTEN reduce su actividad cuando alguno de los componentes del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  es eliminado nos llevó a analizar si la depleción de p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  inhibe la activación de PTEN en el PAC. Para ello transfectamos células 293T con ARNi y tras 48 h de transfección las células se incubaron durante 19 horas en medio sin suero, para posteriormente ser estimuladas con suero durante 90 minutos (máxima actividad de PTEN). Las muestras fueron lisadas y la eficiencia de la transfección examinada por WB (FIG. 40A). En dichos experimentos los

extractos celulares también fueron fraccionados por columna de exclusión molecular y se analizó la presencia de PTEN en las distintas fracciones por WB (FIG. 40B). En paralelo, inmunopurificamos PTEN de las fracciones correspondientes a ~660 kDa, ~440 kDa, ~220 kDa y ~50 kDa y analizamos su actividad fosfatasa (FIG. 40C, 40D). Los resultados confirman que la actividad fosfatasa de PTEN se concentra en el macrocomplejo de ~660 kDa, Dicha actividad en el macrocomplejo (sensible a un inhibidor de PTEN) se ve reducida ante la depleción de p110 $\alpha$  y de manera muy significativa tras la reducción de los niveles de p110 $\beta$  (FIG. 40C, 40D). Estos datos sugieren que la colaboración entre las isoformas p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  es esencial para la activación de PTEN en el PAC.



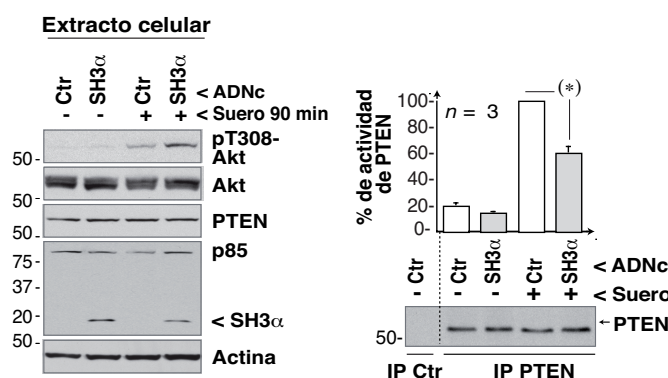
**Figura 40. Efecto del ARNi de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  sobre la actividad de PTEN en el PAC.** Células 293T fueron transfectadas con ARNi control, p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  (48h). La eficiencia de la transfección se analizó por WB (A). En paralelo las células fueron incubadas sin suero durante 19h y estimuladas con suero (10%) durante 90 min. (B) Los extractos celulares fueron fraccionados mediante filtración en gel y las fracciones analizadas por WB. (C, D) PTEN fue inmunoprecipitado de las fracciones de ~660 kDa, ~440 KDa, ~220 kDa y ~50 kDa, se examinó su presencia por WB y su actividad fosfatasa *in vitro*. La gráfica muestra la actividad fosfatasa en las distintas fracciones (media  $\pm$  SEM, n=3). Inhibidor de PTEN (100 nM) fue añadido en inmunoprecipitaciones en duplicado en las distintas fracciones y se registró su actividad fosfatasa. Test t de Student (\*) p<0.05, (\*\*) p<0.01, (\*\*\*) p<0.001

### 10.3 Efecto de dominantes negativos del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ sobre la actividad de PTEN

Como se ha mencionado anteriormente, la reducción de la actividad de PTEN tras reducir los niveles de la subunidad reguladora p85 podría ser consecuencia de la rotura del

complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  o bien de la disminución de la asociación p85-PTEN. Para analizar más específicamente el papel del oligómero de PI3K sobre la actividad de PTEN, analizamos las consecuencias de interferir el complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  con mutantes de p85 que impidan la formación del complejo y que además no unan PTEN. Se sabe que PTEN se une a p85 por el dominio BcR (Cheung, Hennessy et al. 2011; Chagpar et al., 2010), por ello examinamos el efecto de transfectar un mutante que engloba al dominio SH3 de p85 (mutante E160) o el p50 $\alpha$  (forma de procesamiento alternativo de p85 $\alpha$  que carece de N-terminal) sobre la actividad de PTEN.

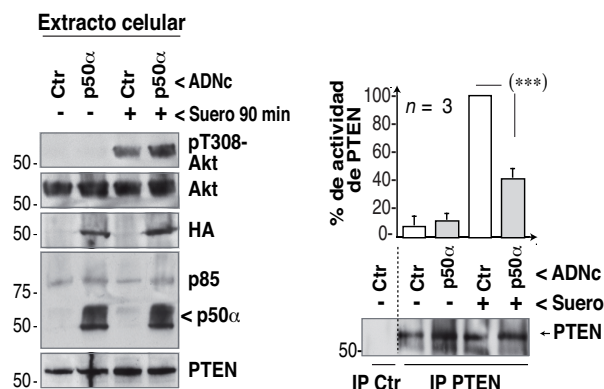
El mutante E160 es un mutante natural truncado de p85 $\alpha$ . Se ha descrito en algunos cánceres de endometrio y codifica para el dominio SH3 de p85 $\alpha$ , no une PTEN e impide la dimerización de p85 (Cheung et al., 2011). La sobreexpresión de este mutante, a niveles similares al p85 $\alpha$  endógeno, redujo la actividad de PTEN y aumentó los niveles de pAkt en comparación con el control en células estimuladas con suero a 90 minutos (FIG. 41).



**Figura 41. Efecto de la sobreexpresión del mutante E160 (SH3 $\alpha$ ) sobre la actividad fosfatasa de PTEN.** Células 293T transfectadas con ADNc control y el mutante E160 (SH3 $\alpha$ ) (48h) fueron sincronizadas en G0 (sin suero durante 19h) y activadas durante 90 minutos (medio completo con suero al 10%). Los niveles de la transfección se analizaron por WB. Inmunoprecipitamos PTEN de los extractos celulares y analizamos su actividad fosfatasa *in vitro*. El gráfico muestra la actividad relativa de PTEN respecto a la cantidad de PTEN inmunoprecipitada (examinada por WB) y normalizada al punto de máxima actividad (90 minutos de activación en control, 100% de actividad) (media  $\pm$  SEM, n = 3). Test t de Student (\*) p<0.05.

Tal y como se ha demostrado anteriormente, la expresión de p50 $\alpha$  impide la formación correcta del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  afectando a la óptima activación de p110 $\beta$  (FIG. 24, 25); p50 $\alpha$  no se une a PTEN por carecer de región N-terminal. En este sentido, analizamos si la sobreexpresión de p50 $\alpha$  también afectaba a la actividad de PTEN por rotura del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ . Para ello transfectamos p50 $\alpha$  en células NIH3T3 y tras 30 h de expresión, las células fueron sincronizadas sin suero durante 19 horas y posteriormente

activadas 90 minutos con medio completo (10% suero). Finalmente, inmunoprecipitamos PTEN y ensayamos su actividad fosfatasa a 90 minutos tras estimulación con suero. Los resultados muestran que la sobreexpresión de p50 $\alpha$  en las células, redujo de manera significativa la actividad de PTEN y mantuvo elevados los niveles de pAkt a 90 minutos en comparación con células control (FIG. 42).



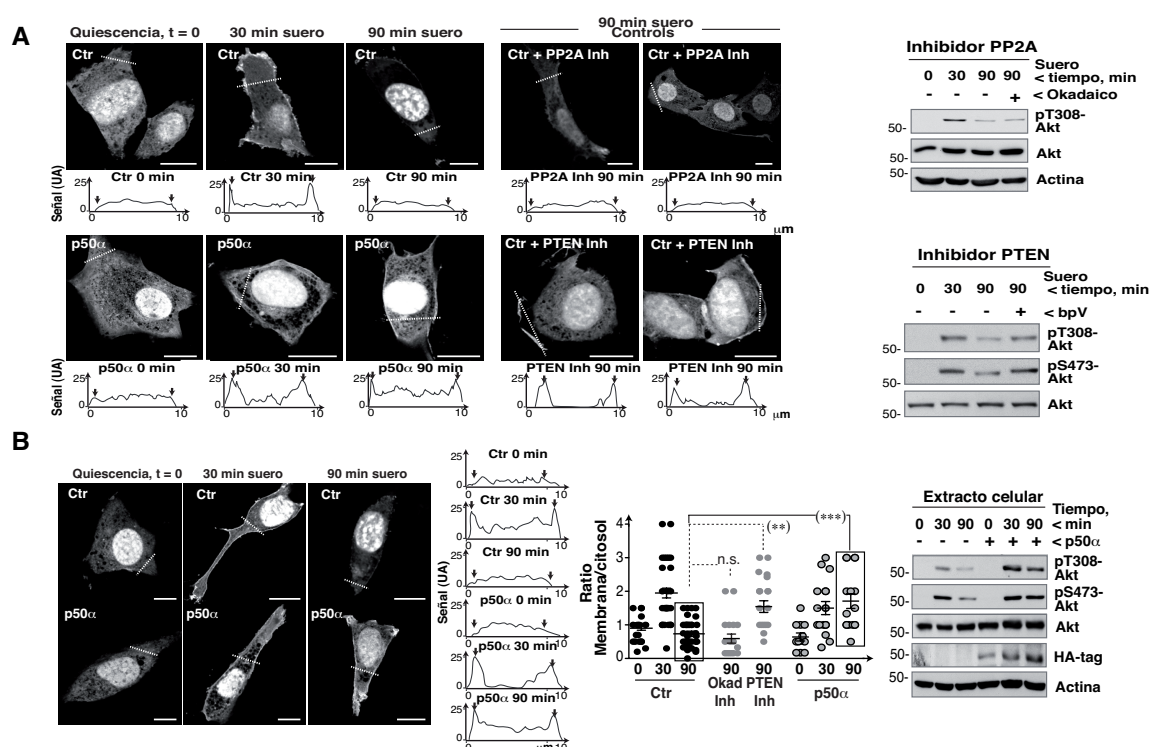
**Figura 42. Efecto de la sobreexpresión de p50 $\alpha$  sobre la actividad fosfatasa de PTEN.** Células NIH3T3 transfectadas con ADNc codificantes para control y HA-p50 $\alpha$  (48h) fueron sincronizadas en G0 (sin suero durante 19h) y activadas durante 90 minutos (suero al 10%). Los niveles de la transfección se analizaron por WB. PTEN fue inmunoprecipitado de los extractos celulares y se testó su actividad fosfatasa *in vitro*. El gráfico muestra la actividad relativa de PTEN respecto a la cantidad de PTEN inmunoprecipitada (examinada por WB) y normalizada al punto de máxima actividad (90 minutos de activación en control, 100% de actividad) (media  $\pm$ SEM, n = 3). Test t de Student (\*) p<0.05, (\*\*) p<0.01, (\*\*\*) p<0.001.

Cómo método alternativo para evaluar el efecto de p50 $\alpha$  sobre la actividad de PTEN, analizamos los niveles de pAkt y la localización de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> en la membrana a diferentes tiempos tras activación celular por suero. Para ello transfectamos células NIH3T3 con la construcción p50 $\alpha$  en combinación con la sonda verde fluorescente GFP fusionada al dominio PH de Btk (GFP-Btk-PH), la cual une selectivamente PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (Silio et al., 2012). Tras 48h de transfección las células fueron sincronizadas dos horas (0% suero) y estimuladas con suero (10%) para ser procesadas a distintos tiempos con diferentes tratamientos (FIG. 43).

En células quiescentes, la señal fue baja y GFP-Btk-PH se localizó mayoritariamente en el citoplasma; la estimulación con suero (30min) incrementó los niveles de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> en la membrana plasmática (translocación de la sonda GFP-Btk-PH a la membrana). Finalmente, a 90 minutos, su tinción disminuyó coincidiendo con la activación de PTEN y



la disminución de pAkt (FIG. 43A). La reducción en el PI(3,4,5)P<sub>3</sub> de membrana fue sensible a la adición de un inhibidor de PTEN, pero no a un inhibidor de otra fosfatasa (ácido okadaico 100nM, inhibidor de PP2A), confirmando la acción de PTEN en el control de los niveles de pAkt y GFP-Btk-PH a 90 minutos (FIG. 43A). Por lo que se refiere a p50α, su sobreexpresión (y por tanto la rotura del complejo p110α/p110β) no afectó a los niveles de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> a 30 minutos tras estimulación con suero; sin embargo, impidió la correcta disminución del PI(3,4,5)P<sub>3</sub> en la membrana y prolongó la activación de Akt a 90 minutos (FIG. 43B).



**Figura 43. La sobreexpresión de p50α altera los niveles de PIP3 en membrana regulados por PTEN. (A,B)** Células NIH3T3 fueron cotransfectadas con los ADNc GFP-Btk-PH y control o HA-p50α (48h). Las células fueron incubadas sin suero 2h y estimuladas con medio completo (suero 10%) hasta 30 o 90 min. Después de 30 minutos de estimulación, como control, algunas células fueron incubadas con inhibidor de PTEN (bpV, 100nM) o ácido okadaico en los rangos de inhibición de PP2A (100 nM) y procesadas a 90 min. Se analizaron extractos celulares por WB en paralelo al análisis por microscopia confocal para visualizar la localización de Btk-PH. El gráfico muestra la señal de la membrana dividida por la señal en un área similar en el citoplasma. Cada punto representa una célula (n =24) de 6 experimentos representativos. Test t de Student (\*) p<0.05, (\*\*) p<0.01, (\*\*\*)p<0.001; n.s. = no significativo.

Todos estos datos indican que la activación celular con suero induce la formación del complejo p110α/p110β el cual a su vez, incorpora PTEN. La rotura de este complejo afecta a la regulación de la actividad fosfatasa de PTEN.



# DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

Dentro del campo de la señalización celular y el cáncer, el eje PI3K/Akt/PTEN juega un papel central. De hecho, hasta el 50% de los tumores presenta alguna alteración en alguno de los componentes de la vía (Chalhoub y Baker, 2009). De ahí el gran esfuerzo en el desarrollo de drogas dirigidas a bloquear la ruta como potencial terapia en oncología. A pesar del diseño de hasta seis tipos de inhibidores, son muchos los efectos secundarios y resistencias que se han observado tras los primeros ensayos clínicos (Fruman y Rommel, 2014; Rodon et al., 2013). Por ello, es preciso definir específicamente las funciones de cada componente de la vía, así como sus bucles de regulación con mayor precisión para un diseño más eficaz de las drogas y de la terapia.

Hasta el momento, el estudio de las isoformas de PI3K se ha centrado en definir papeles específicos para cada una de ellas, dado que diversas funciones han sido asociadas a cada isoforma. Sin embargo, en algunos de los trabajos se han observado efectos cruzados entre las funciones adscritas a p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  (Kumar et al., 2006; Marqués et al., 2008; Marqués et al., 2009).

En este trabajo describimos y caracterizamos la asociación fisiológica de las isoformas p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  de clase IA. Ambas son capaces de asociarse a través de subunidades reguladoras p85. Esta asociación se produce como respuesta a la activación celular y regula la activación óptima de p110 $\beta$ . Además, este complejo incorpora PTEN, la fosfatasa que antagoniza el efecto de la activación de PI3K, formando un macrocomplejo con un peso superior a 600 kDa (PAC, complejo asociado a PTEN). Nuestros resultados muestran que la activación y asociación de las isoformas PI3K regula la activación de la actividad fosfatasa de PTEN en este macrocomplejo. Estos resultados sugieren que la activación secuencial de las proteínas encargadas de modificar la producción de segundos mensajeros como PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, regula de una manera muy precisa, el tiempo y la amplitud de las cascadas moleculares derivadas de estos eventos de señalización.

### La isoformas p110 $\alpha$ y p110 $\beta$ se asocian *in vivo* tras activación celular

El ciclo celular es un conjunto ordenado de eventos moleculares muy regulado que conduce al crecimiento y la división celular. Este proceso se ha conservado a lo largo de la evolución debido a su gran importancia para la homeostasis celular y el desarrollo del organismo. La ruta de señalización de PI3K está implicada en la entrada y progresión del ciclo celular (Jones y Kazlauskas, 2000). En los últimos años se ha profundizado en el papel de las isoformas de clase IA p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  durante el ciclo celular. Concretamente se ha descrito que, mientras que p110 $\alpha$  es esencial en la señalización por insulina, EGF, PDGF y IGF-1 (Foukas et al., 2006; Zhao et al., 2006) promoviendo la entrada en fase G1, S y M (Marqués et al., 2008; Marqués et al., 2009; Silio et al., 2012), p110 $\beta$  es de suma importancia durante la entrada y progresión de la fase S (Marqués et al., 2008; Marqués et al., 2009).

Durante el desarrollo de estos trabajos se observó que la activación de p110 $\alpha$  siempre precede a la activación de p110 $\beta$  en los momentos de activación de PI3K: transiciones G0/G1, G1/S y entrada en mitosis (Marqués et al., 2008; Marqués et al., 2009; Silio et al., 2012). Esta cinética secuencial de activación nos condujo a plantear la hipótesis de una posible relación entre la activación de p110 $\alpha$  y la de p110 $\beta$ .

Nuestros datos muestran la existencia de un complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  tanto en líneas celulares (FIG. 1, 3, 4) como en células primarias (FIG. 5, 6, 10) en crecimiento exponencial. Una posible crítica a la detección del complejo es que los anticuerpos empleados no sean totalmente específicos. Sin embargo, mostramos la especificidad de los reactivos utilizados para la detección del complejo testando que los anticuerpos no reaccionan de manera cruzada (FIG. 2), que la transfección de células con ARNi específico de p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  disminuía la cantidad de p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  coimmunoprecipitado y que el complejo también se genera utilizando proteínas recombinantes (FIG. 3, 4, 7). Finalmente la ausencia del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  en MEF p110 $\alpha$ <sup>-/-</sup> y p110 $\beta$ <sup>-/-</sup> demostró que la detección de la asociación entre p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  es específica (FIG. 5, 6).

La dimerización de receptores o de moléculas es una estrategia celular muy conservada a lo largo de la evolución pues permite modular la activación del receptor, la amplitud de la señal, la activación de la enzima y la especificidad del sustrato (Mellado et al., 2001; Scott y Pawson, 2009). La pequeña fracción de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  que está formando el complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  (FIG. 1, 3, 7), podría corresponder a la fracción de

enzima que se está activando en la célula. De hecho, son muchos los trabajos que muestran que solo una fracción de una enzima es reclutada y activada por los receptores de membrana; éste es el caso de Ras o Cdc42 (Stengel y Zheng, 2011; Villalonga et al., 2001). Este es también el caso de PI3K ya que varios estudios demuestran que solo una pequeña parte de la PI3K celular se localiza en la membrana plasmática tras la activación de receptores por factores de crecimiento. Así se ha descrito que la estimulación con IGF-1 provoca un aumento limitado de enzima PI3K asociado en el receptor de IGF-1 (Yamamoto et al., 1992). Por otra parte, la estimulación con PDGF induce un incremento de la actividad PI3K en la membrana plasmática en adipocitos 3T3-L1, mayor que la estimulación con insulina (Nave et al., 1996). En otro trabajo se observó que tras la estimulación con insulina, los niveles de p85 reclutados en la membrana plasmática se incrementaron 2-3 veces, aunque la mayoría de la subunidad reguladora siguió localizándose en el citoplasma (Balbis et al., 2000) sugiriendo de nuevo que, solo una fracción de la enzima PI3K es reclutada y activada en la membrana tras estimulación de los receptores por factores de crecimiento.

En nuestro trabajo describimos como la activación celular promueve la formación del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ . En condiciones de quiescencia, las células presentan cantidades indetectables de este complejo. Por el contrario, la presencia de suero induce la asociación de ambas isoformas, tanto en líneas celulares (FIG. 8, 9, 12) como en células primarias (FIG. 10). Cuando analizamos la dinámica de la interacción de p110 $\alpha$  con p110 $\beta$  a lo largo del ciclo celular, observamos que existe un aumento de asociación en fase G1 temprana y en la transición G1/S (FIG. 12). Estos datos reflejan que la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  se produce en paralelo a la activación de PI3K durante el ciclo celular descrita en la literatura (Jones y Kazlauskas, 2000; Marqués et al., 2008; Marqués et al., 2009; Silio et al., 2012). Teniendo en cuenta que el proceso de oligomerización sucede justo cuando se detecta la activación de la ruta, las enzimas PI3K podrían activarse bien debido al proceso de oligomerización o bien, como consecuencia del reclutamiento al receptor y posteriormente dimerizar. Basándonos en nuestros datos proponemos que, como paso inicial en la transducción de la señal se produciría un reclutamiento secuencial de las isoformas p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  a los receptores activados, induciéndose la activación de p110 $\alpha$  y la posterior dimerización de p110 $\beta$  completando su óptima activación.

### **La dimerización p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ se produce a través de subunidades reguladoras p85**

A lo largo del trabajo mostramos como la dimerización de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  requiere de la presencia de las subunidades reguladoras p85 *in vitro* (FIG. 14) e *in vivo* (FIG. 15, 16). En nuestro modelo postulamos que tras activación celular se producirá el reclutamiento de un heterodímero p85/p110 $\alpha$  al receptor, donde la unión del p85 a los residuos fosforilados del mismo, inducirá la activación de p110 $\alpha$  a través de un cambio conformacional, y al mismo tiempo expondrá la región N-terminal para la llegada de otro heterodímero p85/p110 $\beta$ . Este se unirá a través de su p85 a otro receptor y al heterodímero p85/p110 $\alpha$ . Así se creará un tetrámero p85-p110 $\alpha$ /p85-p110 $\beta$ . Esta hipótesis tiene a su favor estudios que muestran que las subunidades reguladoras se asocian entre si a través de la región N-terminal (dominios SH3-BcR) (Harpur et al., 1999). Por otro lado, se ha descrito que *in vitro* los heterodímeros p85 $\alpha$ /p110 $\alpha$  son capaces de oligomerizar en tetrámeros en presencia de difosfopéptidos que mimetizan la receptores de PDGF activados (Layton et al., 1998). Además la estructura resultante de la cristalización de nSH2-iSH2-p85 $\alpha$ -p110 $\alpha$  sugiere posibles contactos intermoleculares entre las propias moléculas de p110 (Huang et al., 2008; Huang et al., 2007; Mandelker et al., 2009). La valoración de la contribución de estas interacciones en la formación o estabilidad del complejo requiere estudios adicionales.

En este punto, cabría pensar que la asociación de los heterodímeros se produce o bien por cercanía en la membrana de los receptores activados o bien porque cada p85/p110 se une a un residuo fosforilado en el receptor. La literatura apunta a que el motivo de fosforilación de cada receptor se une solo a una subunidad p85 a través de sus dos dominios SH2 y por tanto por un solo heterodímero p85/p110 (Layton et al., 1998), es decir, la activación del receptor produciría la llegada de un heterodímero que ocuparía sus residuos fosforilados para dar paso a la unión de un segundo heterodímero p85/p110 $\beta$ .

En nuestro estudio mostramos como la expresión de p50 $\alpha$  interfiere en la formación del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  (FIG. 24). Estos datos descartan que la asociación de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  se deba a una dimerización por proximidad a nivel de membrana ya que se ha publicado que la señalización por insulina activa más los heterodímeros p50 $\alpha$ /p110 que los heterodímeros p85 $\alpha$ /p110, mostrando que p50 $\alpha$ /p110 se transloca correctamente a la membrana y al receptor activo (Inukai et al., 1997). La mayor actividad que presenta el



heterodímero p50 $\alpha$ /p110 se explicaría porque los dominios SH2-SH2 de p50 $\alpha$  se unen a las tirosinas fosforiladas del receptor activo con mayor eficiencia que la subunidad reguladora p85 completa (Alcázar et al., 2009). Es decir, p50 $\alpha$  respondería mejor a la activación del receptor por carecer el extremo N-terminal que enmascara la interacción de sus dominios SH2-SH2 con las Tyr fosforiladas del receptor. De acuerdo con estos datos, el mecanismo por el cual p85 media la interacción de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  implicaría que tras unión al receptor, p85 sufriría un cambio conformacional a nivel de sus dominios SH2 para una óptima asociación al receptor. La existencia de cambios conformacionales en los dominios SH2 tras interacción con fosfopéptidos que mimetizan el receptor de PDGF activo se ha demostrado (Shoelson et al., 1993). Estos cambios conformacionales de los dominios SH2 se transmiten a la subunidad p110 promoviendo también un cambio conformacional en su estructura y su activación (Nolte et al., 1996; Yu et al., 1998a). Como consecuencia de esta remodelación en el fragmento C-terminal de p85 (nSH2-iSH2-cSH2), los dominios SH3-BcR verían también alterada su conformación. Se ha descrito que la región SH3-BcR está implicada en la formación de puentes intermoleculares entre dos subunidades reguladoras p85 (Harpur et al., 1999). Los cambios en la estructura de la región N-terminal (SH3-BcR) facilitarían la formación de interacciones entre dos regiones SH3-BcR de distintas moléculas y en consecuencia la dimerización p85-p85 induciéndose la generación del tetrámero p85-p110 $\alpha$ /p85-p110 $\beta$ . Este tipo de cambios en la conformación de los dominios SH3 producidos por la unión de los dominios SH2 a residuos de tirosina fosforilados, es una estrategia común de muchas proteínas para su ensamblaje, regulación enzimática, localización celular, control del tiempo y amplitud de su ruta de señalización (revisado por Scott y Pawson, 2009).

En conjunto, la observación de que p50 $\alpha$  disminuye la formación del complejo, implicaría que la proximidad en la membrana plasmática no es suficiente para inducir la asociación entre p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ , apoyando así nuestra hipótesis de que la activación secuencial de las isoformas, debida a los cambios conformacionales de p85 y p110, es importante para la oligomerización de p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  tras activación celular.

### **El complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ completa la activación de p110 $\beta$**

Nuestro estudio muestra que p110 $\beta$  en complejo con p110 $\alpha$  posee mayor actividad quinasa (FIG. 19). De hecho, la interferencia en la formación del complejo reduce la actividad de p110 $\beta$  pero no la de p110 $\alpha$  (FIG. 27). Estos datos sugieren que la activación

de p110 $\alpha$  es esencial para la activación óptima de p110 $\beta$ . Por ello la reducción de los niveles de p110 $\alpha$  altera la activación de p110 $\beta$  y no al contrario (FIG. 18). Uno de los posibles mecanismos por el cual p110 $\alpha$  podría regular la activación de p110 $\beta$  sería la fosforilación directa pues es conocido que las isoformas de clase IA tienen actividad proteína quinasa (Czupalla et al., 2003; Foukas et al., 2004; Geltz y Augustine, 1998). Sin embargo, experimentos no mostrados de fosforilación *in vitro* utilizando p110 $\alpha$  como quinasa y una forma inactiva de p110 $\beta$  como sustrato sugieren que este no es el caso.

El mecanismo general de activación de las isoformas de clase I implica que tras la unión de los dominios nSH2 y cSH2 de la subunidad p85 al receptor activo, se induce un cambio conformacional en la subunidad catalítica que posibilita su activación (Shoelson et al., 1993; Wu et al., 2007). La cristalización de la estructura de nSH2-iSH2-p85 $\alpha$ -p110 $\alpha$ , sola o unida a un inhibidor, y el mutante activo His1047-p110 $\alpha$ , confirman el cambio conformacional que existe entre las isoformas de p110 $\alpha$  inactivas y activas (Burke et al., 2012; Huang et al., 2007; Mandelker et al., 2009). La unión de p85 al receptor también induce un cambio conformacional en la subunidad reguladora. Por un lado se produce una reorientación del c-terminal de p85 que posibilita la activación de p110, impidiendo los contactos inhibitorios del nSH2-iSH2 sobre el dominio ABD y C2 de p110 $\alpha$  (Shekar et al., 2005; Wu et al., 2009). En el caso de p110 $\beta$  o p110 $\delta$ , el cambio conformacional en el cSH2 de p85, también es importante para la desinhibición de la subunidad catalítica (Burke et al., 2011; Zhang et al., 2011). Por otra parte, la región N-terminal de p85 también juega un papel importante en la modulación de las respuestas celulares al reclutar proteínas como Rac (Beeton et al., 1999), BCR/ABL (Ren et al., 2005b) o Cdc42 (Stengel y Zheng, 2011). Tras estimulación celular y unión de p85 al receptor por sus dominios nSH2 y cSH2, la región SH3-BcR de p85 quedaría expuesta generando una nueva región de unión que en nuestro modelo podría ser ocupada por otro heterodímero p85/p110 $\beta$ . Esta unión generaría un cambio conformacional en el heterodímero p85/p110 $\beta$  que induciría su activación óptima.

La activación de p110 $\alpha$  se produce exclusivamente por la unión a receptores tirosina quinasa activos y es completada con la unión a RAS (Fritsch et al., 2013; Jimenez et al., 2002). En cambio, p110 $\beta$  puede ser reclutada y activada por receptores tirosina quinasa y GPCRs (Guillermet-Guibert et al., 2008; Vanhaesebroeck et al., 2010). La reducción de los niveles de p110 $\alpha$  en la célula (empleando ARNi ) o su actividad (utilizando mutantes

inactivos de p110 $\alpha$ ), disminuye la activación de p110 $\beta$  por suero (FIG. 17, 18). El suero es un estímulo que induce la división celular (Jones y Kazlauskas 2000). Como hemos comentado anteriormente, p110 $\beta$  también puede activarse a través de GPCRs por estímulos menos potentes como la esfingosina 1-fosfato (S1P) y el ácido lisofosfatídico (LPA). S1P y LPA contribuyen pero no son suficientes para promover la entrada en ciclo celular (Nagata et al., 2006). La activación directa de p110 $\beta$  por estimulación de los GPCRs con S1P, no se afectó al reducir los niveles de p110 $\alpha$  (FIG. 20). Esto indica que la activación de p110 $\beta$  a través de los GPCRs es menos dependiente de la activación de p110 $\alpha$ . Por tanto, la activación secuencial de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  descrita en otros estudios (Marqués et al., 2008; Marqués et al., 2009; Silio et al., 2012) induciría la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  y una óptima activación de p110 $\beta$  necesaria para una correcta entrada en las distintas fases ciclo celular por estimulación con suero.

#### **El complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ regula funciones específicas de p110 $\beta$**

Durante el desarrollo del trabajo hemos observado como la actividad de p110 $\alpha$  es necesaria para la activación de p110 $\beta$  (FIG. 17, 18). Por otro lado, la interferencia en la formación del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  reduce la actividad de p110 $\beta$  pero no la de p110 $\alpha$  (FIG. 27). Esto sugiere que el heterodímero p85/p110 $\beta$  completaría su óptima activación en complejo con p85/p110 $\alpha$ . En estudios previos se observó la depleción de p110 $\beta$  no alteraba significativamente los eventos regulados por p110 $\alpha$  (por ejemplo la activación p70S6K en fase G1 temprana) (Kumar et al., 2006; Marqués et al., 2008). Sin embargo, los procesos celulares regulados directamente por p110 $\beta$ , como por ejemplo el reclutamiento de PCNA a la cromatina, se ven parcialmente afectados por la depleción de p110 $\alpha$  (Marqués et al., 2009)

Para completar los ensayos de actividad PI3K mencionados anteriormente, describimos que la asociación entre p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  regula funciones específicas de p110 $\beta$  a nivel celular. Concretamente, mostramos como la interferencia del complejo por transfección de p50 $\alpha$  o la región SH3-BcR de p85 interfiere en la formación del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  (FIG. 22, 24) y además, impide el correcto reclutamiento de PCNA a la cromatina en la entrada en la fase S del ciclo celular (papel específico de p110 $\beta$ ) (FIG. 23, 25) demostrando así por una aproximación adicional que la activación completa de p110 $\beta$  requiere de la previa activación y asociación de p110 $\alpha$ .

### **PTEN no es esencial para el complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$**

Se ha descrito que PTEN forma parte de un complejo de alto peso molecular (PAC, >600 kDa) en el que predomina la forma de PTEN no fosforilada relacionada con un estado abierto, inestable y activo de la proteína (Rabinovsky et al., 2009; Vazquez et al., 2001). Recientemente, se han descrito algunas de las proteínas que forman parte de este complejo de alto peso molecular como por ejemplo p110 $\beta$ , p85, NHERF1 (del inglés *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor*), NEP (del inglés *neutral endopeptidase*) o la ribonucleoproteína C nuclear heterogénea (hnRNP C). La dinámica de activación, ensamblaje y funcionalidad del complejo PAC, así como otros componentes, se conoce de forma incompleta (Mosessian et al., 2009; Mosessian y Wu, 2010).

En este trabajo describimos que la activación celular también induce la incorporación de PTEN al complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  (FIG. 28, 29). Mediante columna de exclusión molecular mostramos como p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ /p85/PTEN eluyen en fracciones con un peso superior a 600 kDa probablemente formando parte de este mismo complejo (FIG. 30). De hecho en células deficientes en PTEN el complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  es detectado solamente en las fracciones correspondientes a ~440 kDa (FIG. 30) y en células transfectadas con ARNi para p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  la cantidad de PTEN detectada a ~660 kDa es menor (FIG. 40). Por otro lado, la disminución transitoria de PTEN en las células por transfección de ARNi para PTEN no alteró la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  (FIG. 31). Por tanto, nuestros datos indican que una fracción del complejo del p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  forma parte del complejo asociado a PTEN (>600 kDa). Sin embargo, la formación del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  es independiente de la presencia de PTEN.

### **El complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ regula la actividad de PTEN en el PAC**

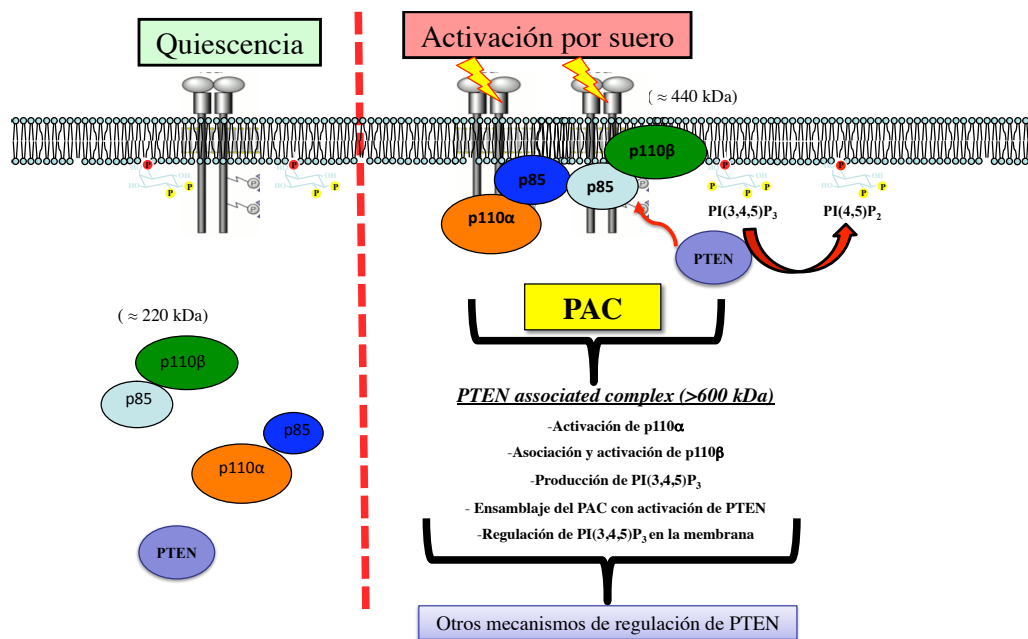
Nuestro estudio muestra que PTEN es activado y regulado en este complejo de alto peso molecular por la asociación p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ . En primer lugar, la determinación de la actividad fosfatasa de PTEN inmunoprecipitado de distintas fracciones de peso molecular indica que PTEN presenta mayor actividad en el PAC (fracción >600 kDa) en comparación a la forma monomérica (fracción ~50-60 kDa) (FIG. 33). En este sentido existen algunos estudios que corroboran este dato ya que detectan la forma no fosforilada en las fracciones con peso >600 kDa (Rabinovsky et al., 2009), la cual está asociada a estados activos de PTEN (Vazquez et al., 2001). La reducción de los niveles de p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p85 $\alpha$  y/o p85 $\beta$  por transfección de ARNi, disminuyó la activación de PTEN

(FIG. 34, 39, 40). Este hecho explica la observación de que en experimentos con transfección de shARN de p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  (FIG. 35), así como en MEFs deficientes en p110 $\alpha$  o p110 $\beta$  (FIG. 36), se observen señales prolongadas de pAkt a tiempos tardíos (90 minutos) tras estimulación de las células con PDGF o medio suplementado con suero, características de un defecto en la activación de PTEN y sugiere que la activación de p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  controla la posterior activación de PTEN.

Como forma alternativa para demostrar que el complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  regula la actividad de PTEN, interferimos su formación mediante la transfección de p50 $\alpha$ , el cual carece de la región N-terminal de p85 e impide la asociación de p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ . La observación de que p50 $\alpha$  reduce la actividad de PTEN (FIG. 42), podría explicar la ventaja que adquieren algunos tumores que sobreexpresan p55 $\gamma$ , isoforma que contiene los mismos dominios que p50 $\alpha$  (Hu et al., 2008; Zhang et al., 2007). Por otro lado, transfectamos las células con una forma truncada de p85 $\alpha$  que engloba el dominio SH3 de p85 $\alpha$  (E160-p85 $\alpha$ ). Este mutante no posee el dominio BcR, la región más directamente involucrada en la asociación de p85 a PTEN (Chagpar et al., 2010) e interfiere en la dimerización p85-p85 (Cheung et al., 2011). En este caso, la actividad de PTEN también se vio afectada (FIG. 41). Por tanto, ambas aproximaciones (transfección de p50 $\alpha$  o E160) redujeron la activación de PTEN sin interactuar directamente con PTEN, pues se sabe que la interacción de PTEN con PI3K se produce a través de la porción N-terminal de p85 (Chagpar et al., 2010) y postulamos que lo hacen interfiriendo directamente la oligomerización de PI3K y PTEN.

Recientemente, se ha descrito que PTEN se activa tras formar homodímeros. En el caso de una heterodimerización entre una forma mutada e inactiva de PTEN y una forma normal (WT), se produce una inhibición de su actividad. Esto explica por qué se produce un mayor aumento en la formación de tumores en ratones con mutaciones de PTEN (PTEN<sup>C124S/+</sup> y PTEN<sup>G129E/+</sup>) comparado con ratones PTEN<sup>+/-</sup> (Papa et al., 2014). Este estudio no contradice nuestras observaciones pues los autores de este trabajo analizaron la actividad de PTEN en conformación dimérica (~100 kDa) y monomérica (~50 kDa) sin valorar la actividad de PTEN en el PAC (~660 kDa), donde la actividad fosfatasa es máxima comparada con el resto de fracciones (FIG. 33, 40). Por tanto podría ser que PTEN se incorporara al PAC como dímero dónde su activación se regularía por el complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ .

Nuestras observaciones sobre la regulación de PTEN a través del macrocomplejo PI3K/PTEN se oponen a la visión propuesta por otros autores. Se ha descrito que los monómeros de p85 $\alpha$  interactúan con PTEN incrementando su actividad fosfatasa (Chagpar et al., 2010). Además, se ha publicado que ratones con delección específica de p85 $\alpha$  en el hígado desarrollan hepatocarcinomas muy agresivos mostrando a nivel bioquímico activación prolongada de Akt y reducción de la actividad de PTEN (Taniguchi et al., 2006; Taniguchi et al., 2010). Basándose en estos datos, los autores proponen un modelo en el que p85 $\alpha$  regula p110 $\alpha$  y PTEN. Sugieren que p85 $\alpha$  se une preferentemente a p110 $\alpha$  cuando los niveles de p85 $\alpha$  en la células son bajos. Cuando todo el p110 $\alpha$  está unido a p85 $\alpha$ , el p85 libre se asocia a PTEN y regula de forma positiva su actividad fosfatasa (Anderson, 2010; Chagpar et al., 2010). Este modelo p85 monomérico-PTEN no explica que p50 $\alpha$  o el mutante E160 sin interactuar con PTEN afecten su actividad. La demostración de que p85 incrementa la actividad de PTEN se realizó *in vitro* mezclando ambos purificados (Chagpar et al., 2010). Este escenario es difícil que se produzca *in vivo* pues la mayor parte del p85 está formando heterodímeros con p110 (Geering et al., 2007). Por tanto en este tipo de experimentos puede que en realidad se estén simulando condiciones de formación de macrocomplejos que incluyen dimerización p85-p85 y PTEN. Además, en este mismo estudio Chagpar y colaboradores describen como el dominio BcR (y no los dominios SH3 o SH2) interactúa con PTEN. Sin embargo, en un contexto celular solo el mutante con delección  $\Delta$ SH3-BcR p85 (y no el mutante con la delección de solo el dominio BcR) altera la activación de PTEN (Chagpar et al., 2010). Teniendo en cuenta que ni el mutante  $\Delta$ SH3-BcR-p85 ni el mutante  $\Delta$ BcR-p85 se asocian con PTEN, el  $\Delta$ SH3-BcR-p85 (similar a p50 $\alpha$ ) reducirá la actividad de PTEN debido a su capacidad de interferir con la formación del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ . Por último, otros datos que se oponen al modelo de regulación de PTEN por monómeros p85, son que en estudios previos de “pull down”, usando GST-PTEN purificado, se arrastran moléculas de p85 y p110 de extractos celulares (Chagpar et al., 2010; Cheung et al., 2011; Harpur et al., 1999). Por lo tanto, nuestro modelo plantea una nueva forma de regulación de PTEN en la cual, oligómeros de PI3K que incluyen p85/p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  se unen a PTEN y pasan a formar parte del complejo PAC, regulando su actividad. Otro dato que reforzaría este modelo, es el hecho de que el mutante E160-p85, el cual no une PTEN pero impide la dimerización p85-p85, también reduce la actividad de PTEN (FIG. 41). Estas observaciones apoyan de nuevo que la oligomerización de PI3K modula la activación de PTEN.



**Figura 1. Modelo de la regulación de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> por el complejo PI3K/PTEN.** La estimulación con suero de la células en quiescencia induce la activación y oligomerización secuencial de p85-p110α/p85-p110β/PTEN modulando finamente los niveles celulares de PI(3,4,5)P<sub>3</sub>.

Nuestros resultados muestran por primera vez que la estimulación celular con suero induce la formación de un complejo p110α/p110β *in vivo*. Sólo una parte de las isoformas p110 es reclutada a los receptores tras activación y, por tanto solo una pequeña fracción forma parte de este complejo. Éste será el encargado de regular la producción del PI(3,4,5)P<sub>3</sub> generado en la membrana plasmática durante un evento de señalización celular. La asociación de ambas isoformas p110α/p110β promueve la completa activación de p110β y además, la interferencia de este complejo afecta a la activación de PTEN. La oligomerización de p85/p110α/p110β/PTEN en el macrocomplejo PAC que aquí presentamos, demuestra que la activación secuencial de estas enzimas modificadores de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> es esencial para la activación ordenada de p110α, p110β y PTEN durante la activación celular (FIG. 1). Esto pone de manifiesto que la función esencial del oligómero de PI3K/PTEN es controlar finamente los niveles de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> en la membrana con el fin de modular la amplitud y el tiempo de la señal durante la activación celular.





# CONCLUSIONES



**CONCLUSIONES**

- 1) Las isoformas de PI3K de clase IA p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  se asocian *in vivo* tanto en líneas celulares como en células primarias.
- 2) La activación celular induce la asociación entre p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ . Dicha interacción es reflejo de los picos de activación de PI3K durante las distintas fases del ciclo celular.
- 3) La asociación p110 $\alpha$ / p110 $\beta$  es mediada por las subunidades reguladoras p85 tanto *in vitro* como *in vivo*. La dimerización de p85 a través de su fragmento N-terminal (dominios SH3-BcR) posibilita que tras unirse al receptor un heterodímero p85/p110 $\alpha$  este una otro heterodímero p85/p110 $\beta$ .
- 4) La formación del complejo de p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  regula la activación óptima de p110 $\beta$ .
- 5) La rotura del complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  por transfección de p50 $\alpha$  o los dominios SH3-BcR de p85 interfiere en funciones específicas adscritas a p110 $\beta$  como es el reclutamiento de PCNA a la cromatina.
- 6) PTEN es reclutado y activado al complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  tras activación celular. Esta oligomerización PI3K/PTEN forma parte del llamado PAC (*PTEN associated complex*) donde PTEN alcanza su máximo de actividad fosfatasa a noventa minutos tras estimulación.
- 7) El complejo p110 $\alpha$ /p110 $\beta$  regula la actividad fosfatasa de PTEN en este complejo. La interferencia del complejo por reducción de los niveles de alguno de sus componentes (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  o p85) o transfección de dominantes negativos (p50 $\alpha$  o mutante E160) reduce la activación de PTEN.
- 8) La oligomerización de p85/p110 $\alpha$ /p110 $\beta$ /PTEN y su activación secuencial en el PAC pone de manifiesto un nuevo mecanismo de regulación en la producción PI(3,4,5)P<sub>3</sub> por parte del eje de señalización PI3K/PTEN. Por todo ello, finalmente concluimos que, las enzimas encargadas de regular los niveles celulares de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> forman un complejo en el que se regula la activación secuencial de sus distintos componentes lo que resulta en una regulación fina de los niveles celulares del mediador de supervivencia celular PI(3,4,5)P<sub>3</sub>.



# REFERENCIAS



## REFERENCIAS

**Abraham, R.T.** (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* **15**, 2177-2196.

**Alcázar, I., Cortes, I., Zaballos, A., Hernandez, C., Fruman, D.A., Barber, D.F., and Carrera, A.C.** (2009). p85beta phosphoinositide 3-kinase regulates CD28 coreceptor function. *Blood* **113**, 3198-3208.

**Alcázar, I., Marqués, M., Kumar, A., Hirsch, E., Wymann, M., Carrera, A.C., and Barber, D.F.** (2007). Phosphoinositide 3-kinase gamma participates in T cell receptor-induced T cell activation. *J Exp Med* **204**, 2977-2987.

**Alvarez-Nunez, F., Bussaglia, E., Mauricio, D., Ybarra, J., Vilar, M., Lerma, E., de Leiva, A., and Matias-Guiu, X.** (2006). PTEN promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas. *Thyroid* **16**, 17-23.

**Anderson, D.H.** (2010). p85 plays a critical role in controlling flux through the PI3K/PTEN signaling axis through dual regulation of both p110 (PI3K) and PTEN. *Cell Cycle* **9**, 2055-2056.

**Angulo, I., Vadas, O., Garcon, F., Banham-Hall, E., Plagnol, V., Leahy, T.R., Baxendale, H., Coulter, T., Curtis, J., Wu, C., et al.** (2013). Phosphoinositide 3-kinase delta gene mutation predisposes to respiratory infection and airway damage. *Science* **342**, 866-871.

**Balbis, A., Baquiran, G., Bergeron, J.J., and Posner, B.I.** (2000). Compartmentalization and insulin-induced translocations of insulin receptor substrates, phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase B in rat liver. *Endocrinology* **141**, 4041-4049.

**Beeton, C.A., Das, P., Waterfield, M.D., and Shepherd, P.R.** (1999). The SH3 and BH domains of the p85alpha adapter subunit play a critical role in regulating class Ia phosphoinositide 3-kinase function. *Mol Cell Biol Res Commun* **1**, 153-157.

**Beltran, L., Chaussade, C., Vanhaesebroeck, B., and Cutillas, P.R.** (2011). Calpain interacts with class IA phosphoinositide 3-kinases regulating their stability and signaling activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 16217-16222.

- Bi, L., Okabe, I., Bernard, D.J., and Nussbaum, R.L.** (2002). Early embryonic lethality in mice deficient in the p110beta catalytic subunit of PI 3-kinase. *Mamm Genome* **13**, 169-172.
- Bi, L., Okabe, I., Bernard, D.J., Wynshaw-Boris, A., and Nussbaum, R.L.** (1999). Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* **274**, 10963-10968.
- Bojarski, E.F., Strauss, A.C., Fagin, A.P., Plantinga, T.S., Hoischen, A., Veltman, J., Allsop, S.A., Granadillo, V.J., William, A., Netea, M.G., et al.** (2013). Novel PI3Kgamma mutation in a 44-year-old man with chronic infections and chronic pelvic pain. *PLoS One* **8**, e68118.
- Booker, G.W., Gout, I., Downing, A.K., Driscoll, P.C., Boyd, J., Waterfield, M.D., and Campbell, I.D.** (1993). Solution structure and ligand-binding site of the SH3 domain of the p85 alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* **73**, 813-822.
- Burke, J.E., Perisic, O., Masson, G.R., Vadas, O., and Williams, R.L.** (2012). Oncogenic mutations mimic and enhance dynamic events in the natural activation of phosphoinositide 3-kinase p110alpha (PIK3CA). *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 15259-15264.
- Burke, J.E., Vadas, O., Berndt, A., Finegan, T., Perisic, O., and Williams, R.L.** (2011). Dynamics of the phosphoinositide 3-kinase p110delta interaction with p85alpha and membranes reveals aspects of regulation distinct from p110alpha. *Structure* **19**, 1127-1137.
- Cao, J., Schulte, J., Knight, A., Leslie, N.R., Zagazdzon, A., Bronson, R., Manevich, Y., Beeson, C., and Neumann, C.A.** (2009). Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity. *EMBO J* **28**, 1505-1517.
- Carpten, J.D., Faber, A.L., Horn, C., Donoho, G.P., Briggs, S.L., Robbins, C.M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T.Y., Savage, S., et al.** (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* **448**, 439-444.
- Chae, H.D., and Broxmeyer, H.E.** (2011). SIRT1 deficiency downregulates PTEN/JNK/FOXO1 pathway to block reactive oxygen species-induced apoptosis in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* **20**, 1277-1285.
- Chagpar, R.B., Links, P.H., Pastor, M.C., Furber, L.A., Hawrysh, A.D., Chamberlain, M.D., and Anderson, D.H.** (2010). Direct positive regulation of PTEN by



the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 5471-5476.

**Chalhoub, N., and Baker, S.J.** (2009). PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol* **4**, 127-150.

**Chamberlain, M.D., Oberg, J.C., Furber, L.A., Poland, S.F., Hawrysh, A.D., Knafelc, S.M., McBride, H.M., and Anderson, D.H.** (2010). Deregulation of Rab5 and Rab4 proteins in p85R274A-expressing cells alters PDGFR trafficking. *Cell Signal* **22**, 1562-1575.

**Cheung, L.W., Hennessy, B.T., Li, J., Yu, S., Myers, A.P., Djordjevic, B., Lu, Y., Stemke-Hale, K., Dyer, M.D., Zhang, F., et al.** (2011). High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. *Cancer Discov* **1**, 170-185.

**Ciechanover, A.** (2005). Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 79-87.

**Ciraolo, E., Iezzi, M., Marone, R., Marengo, S., Curcio, C., Costa, C., Azzolino, O., Gonella, C., Rubinetto, C., Wu, H., et al.** (2008). Phosphoinositide 3-kinase p110beta activity: key role in metabolism and mammary gland cancer but not development. *Sci Signal* **1**, ra3.

**Ciraolo, E., Morello, F., Hobbs, R.M., Wolf, F., Marone, R., Iezzi, M., Lu, X., Mengozzi, G., Altruda, F., Sorba, G., et al.** (2010). Essential role of the p110beta subunit of phosphoinositide 3-OH kinase in male fertility. *Mol Biol Cell* **21**, 704-711.

**Clayton, E., Bardi, G., Bell, S.E., Chantry, D., Downes, C.P., Gray, A., Humphries, L.A., Rawlings, D., Reynolds, H., Vigorito, E., et al.** (2002). A crucial role for the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. *J Exp Med* **196**, 753-763.

**Correia, N.C., Girio, A., Antunes, I., Martins, L.R., and Barata, J.T.** (2014). The multiple layers of non-genetic regulation of PTEN tumour suppressor activity. *Eur J Cancer* **50**, 216-225.

**Crackower, M.A., Oudit, G.Y., Koziaradzki, I., Sarao, R., Sun, H., Sasaki, T., Hirsch, E., Suzuki, A., Shioi, T., Irie-Sasaki, J., et al.** (2002). Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* **110**, 737-749.

- Czupalla, C., Culo, M., Muller, E.C., Brock, C., Reusch, H.P., Spicher, K., Krause, E., and Nurnberg, B.** (2003). Identification and characterization of the autophosphorylation sites of phosphoinositide 3-kinase isoforms beta and gamma. *J Biol Chem* **278**, 11536-11545.
- Dbouk, H.A., Khalil, B.D., Wu, H., Shymanets, A., Nurnberg, B., and Backer, J.M.** (2013). Characterization of a tumor-associated activating mutation of the p110beta PI 3-kinase. *PLoS One* **8**, e63833.
- Del Prete, A., Vermi, W., Dander, E., Otero, K., Barberis, L., Luini, W., Bernasconi, S., Sironi, M., Santoro, A., Garlanda, C., et al.** (2004). Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3Kgamma-deficient mice. *EMBO J* **23**, 3505-3515.
- Devereaux, K., Dall'Armi, C., Alcázar-Roman, A., Ogasawara, Y., Zhou, X., Wang, F., Yamamoto, A., De Camilli, P., and Di Paolo, G.** (2013). Regulation of mammalian autophagy by class II and III PI 3-kinases through PI3P synthesis. *PLoS One* **8**, e76405.
- Divecha, N.** (2010). Lipid kinases: charging PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> synthesis. *Curr Biol* **20**, R154-157.
- Dou, Z., Pan, J.A., Dbouk, H.A., Ballou, L.M., DeLeon, J.L., Fan, Y., Chen, J.S., Liang, Z., Li, G., Backer, J.M., et al.** (2013). Class IA PI3K p110beta subunit promotes autophagy through Rab5 small GTPase in response to growth factor limitation. *Mol Cell* **50**, 29-42.
- Downward, J.** (2001). The ins and outs of signalling. *Nature* **411**, 759-762.
- Durocher, D., and Jackson, S.P.** (2001). DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr Opin Cell Biol* **13**, 225-231.
- Eickholt, B.J., Ahmed, A.I., Davies, M., Papakonstanti, E.A., Pearce, W., Starkey, M.L., Bilancio, A., Need, A.C., Smith, A.J., Hall, S.M., et al.** (2007). Control of axonal growth and regeneration of sensory neurons by the p110delta PI 3-kinase. *PLoS One* **2**, e869.
- Engelman, J.A., Luo, J., and Cantley, L.C.** (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* **7**, 606-619.
- Falasca, M., and Maffucci, T.** (2007). Role of class II phosphoinositide 3-kinase in cell signalling. *Biochem Soc Trans* **35**, 211-214.

- Falasca, M., and Maffucci, T.** (2012). Regulation and cellular functions of class II phosphoinositide 3-kinases. *Biochem J* **443**, 587-601.
- Foukas, L.C., Beeton, C.A., Jensen, J., Phillips, W.A., and Shepherd, P.R.** (2004). Regulation of phosphoinositide 3-kinase by its intrinsic serine kinase activity in vivo. *Mol Cell Biol* **24**, 966-975.
- Foukas, L.C., Claret, M., Pearce, W., Okkenhaug, K., Meek, S., Peskett, E., Sancho, S., Smith, A.J., Withers, D.J., and Vanhaesebroeck, B.** (2006). Critical role for the p110alpha phosphoinositide-3-OH kinase in growth and metabolic regulation. *Nature* **441**, 366-370.
- Fouladkou, F., Landry, T., Kawabe, H., Neeb, A., Lu, C., Brose, N., Stambolic, V., and Rotin, D.** (2008). The ubiquitin ligase Nedd4-1 is dispensable for the regulation of PTEN stability and localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8585-8590.
- Fritsch, R., de Krijger, I., Fritsch, K., George, R., Reason, B., Kumar, M.S., Diefenbacher, M., Stamp, G., and Downward, J.** (2013). RAS and RHO families of GTPases directly regulate distinct phosphoinositide 3-kinase isoforms. *Cell* **153**, 1050-1063.
- Fruman, D.A., Cantley, L.C., and Carpenter, C.L.** (1996). Structural organization and alternative splicing of the murine phosphoinositide 3-kinase p85 alpha gene. *Genomics* **37**, 113-121.
- Fruman, D.A., Meyers, R.E., and Cantley, L.C.** (1998). Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* **67**, 481-507.
- Fruman, D.A., and Rommel, C.** (2014). PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 140-156.
- Garcia, J.M., Silva, J., Pena, C., Garcia, V., Rodriguez, R., Cruz, M.A., Cantos, B., Provencio, M., Espana, P., and Bonilla, F.** (2004). Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **41**, 117-124.
- Garcia, Z., Silio, V., Marqués, M., Cortes, I., Kumar, A., Hernandez, C., Checa, A.I., Serrano, A., and Carrera, A.C.** (2006). A PI3K activity-independent function of p85 regulatory subunit in control of mammalian cytokinesis. *EMBO J* **25**, 4740-4751.

- Geering, B., Cutillas, P.R., Nock, G., Gharbi, S.I., and Vanhaesebroeck, B.** (2007). Class IA phosphoinositide 3-kinases are obligate p85-p110 heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7809-7814.
- Geltz, N.R., and Augustine, J.A.** (1998). The p85 and p110 subunits of phosphatidylinositol 3-kinase- $\alpha$  are substrates, in vitro, for a constitutively associated protein tyrosine kinase in platelets. *Blood* **91**, 930-939.
- Gorter, E., and Grendel, F.** (1925). On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood. *J Exp Med* **41**, 439-443.
- Graupera, M., Guillermet-Guibert, J., Foukas, L.C., Phng, L.K., Cain, R.J., Salpekar, A., Pearce, W., Meek, S., Millan, J., Cutillas, P.R., et al.** (2008). Angiogenesis selectively requires the p110 $\alpha$  isoform of PI3K to control endothelial cell migration. *Nature* **453**, 662-666.
- Gu, J., Tamura, M., Pankov, R., Danen, E.H., Takino, T., Matsumoto, K., and Yamada, K.M.** (1999). Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J Cell Biol* **146**, 389-403.
- Guillermet-Guibert, J., Bjorklof, K., Salpekar, A., Gonella, C., Ramadani, F., Bilancio, A., Meek, S., Smith, A.J., Okkenhaug, K., and Vanhaesebroeck, B.** (2008). The p110 $\beta$  isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110 $\gamma$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8292-8297.
- Gupta, S., Ramjaun, A.R., Haiko, P., Wang, Y., Warne, P.H., Nicke, B., Nye, E., Stamp, G., Alitalo, K., and Downward, J.** (2007). Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110 $\alpha$  is required for ras-driven tumorigenesis in mice. *Cell* **129**, 957-968.
- Gymnopoulos, M., Elsliger, M.A., and Vogt, P.K.** (2007). Rare cancer-specific mutations in PIK3CA show gain of function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5569-5574.
- Harpur, A.G., Layton, M.J., Das, P., Bottomley, M.J., Panayotou, G., Driscoll, P.C., and Waterfield, M.D.** (1999). Intermolecular interactions of the p85 $\alpha$  regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **274**, 12323-12332.
- Harrison-Findik, D., Susa, M., and Varticovski, L.** (1995). Association of phosphatidylinositol 3-kinase with SHC in chronic myelogenous leukemia cells. *Oncogene* **10**, 1385-1391.

- Hawkins, P.T., Jackson, T.R., and Stephens, L.R.** (1992). Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P3 by activating a PtdIns(4,5)P2 3-OH kinase. *Nature* **358**, 157-159.
- Hayer, S., Pundt, N., Peters, M.A., Wunrau, C., Kuhnel, I., Neugebauer, K., Strietholt, S., Zwerina, J., Korb, A., Penninger, J., et al.** (2009). PI3Kgamma regulates cartilage damage in chronic inflammatory arthritis. *FASEB J* **23**, 4288-4298.
- Hickey, F.B., and Cotter, T.G.** (2006). BCR-ABL regulates phosphatidylinositol 3-kinase-p110gamma transcription and activation and is required for proliferation and drug resistance. *J Biol Chem* **281**, 2441-2450.
- Hirsch, E., Katanaev, V.L., Garlanda, C., Azzolino, O., Pirola, L., Silengo, L., Sozzani, S., Mantovani, A., Altruda, F., and Wymann, M.P.** (2000). Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* **287**, 1049-1053.
- Holgado, B.L., Martinez-Munoz, L., Sanchez-Alcaniz, J.A., Lucas, P., Perez-Garcia, V., Perez, G., Rodriguez-Frade, J.M., Nieto, M., Marin, O., Carrasco, Y.R., et al.** (2013). CXCL12-mediated murine neural progenitor cell movement requires PI3Kbeta activation. *Mol Neurobiol* **48**, 217-231.
- Hollander, M.C., Blumenthal, G.M., and Dennis, P.A.** (2011). PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer* **11**, 289-301.
- Hu, J., Xia, X., Cheng, A., Wang, G., Luo, X., Reed, M.F., Fojo, T., Oetting, A., Gong, J., and Yen, P.M.** (2008). A peptide inhibitor derived from p55PIK phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit: a novel cancer therapy. *Mol Cancer Ther* **7**, 3719-3728.
- Huang, C.H., Mandelker, D., Gabelli, S.B., and Amzel, L.M.** (2008). Insights into the oncogenic effects of PIK3CA mutations from the structure of p110alpha/p85alpha. *Cell Cycle* **7**, 1151-1156.
- Huang, C.H., Mandelker, D., Schmidt-Kittler, O., Samuels, Y., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Gabelli, S.B., and Amzel, L.M.** (2007). The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. *Science* **318**, 1744-1748.

- Huang, J., Yan, J., Zhang, J., Zhu, S., Wang, Y., Shi, T., Zhu, C., Chen, C., Liu, X., Cheng, J., et al.** (2012). SUMO1 modification of PTEN regulates tumorigenesis by controlling its association with the plasma membrane. *Nat Commun* **3**, 911.
- Hui, S.T., Andres, A.M., Miller, A.K., Spann, N.J., Potter, D.W., Post, N.M., Chen, A.Z., Sachithanatham, S., Jung, D.Y., Kim, J.K., et al.** (2008). Txnip balances metabolic and growth signaling via PTEN disulfide reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3921-3926.
- Hurley, J.H., and Misra, S.** (2000). Signaling and subcellular targeting by membrane-binding domains. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**, 49-79.
- Inoki, K., Ouyang, H., Li, Y., and Guan, K.L.** (2005). Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**, 79-100.
- Inukai, K., Funaki, M., Ogihara, T., Katagiri, H., Kanda, A., Anai, M., Fukushima, Y., Hosaka, T., Suzuki, M., Shin, B.C., et al.** (1997). p85alpha gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase), p50alpha, p55alpha, and p85alpha, with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin. *J Biol Chem* **272**, 7873-7882.
- Jackson, S.P., Schoenwaelder, S.M., Goncalves, I., Nesbitt, W.S., Yap, C.L., Wright, C.E., Kenche, V., Anderson, K.E., Dopheide, S.M., Yuan, Y., et al.** (2005). PI 3-kinase p110beta: a new target for antithrombotic therapy. *Nat Med* **11**, 507-514.
- Jia, S., Liu, Z., Zhang, S., Liu, P., Zhang, L., Lee, S.H., Zhang, J., Signoretti, S., Loda, M., Roberts, T.M., et al.** (2008). Essential roles of PI(3)K-p110beta in cell growth, metabolism and tumorigenesis. *Nature* **454**, 776-779.
- Jimenez, C., Hernandez, C., Pimentel, B., and Carrera, A.C.** (2002). The p85 regulatory subunit controls sequential activation of phosphoinositide 3-kinase by Tyr kinases and Ras. *J Biol Chem* **277**, 41556-41562.
- Jones, S.M., and Kazlauskas, A.** (2000). Connecting signaling and cell cycle progression in growth factor-stimulated cells. *Oncogene* **19**, 5558-5567.
- Jou, S.T., Carpino, N., Takahashi, Y., Piekorz, R., Chao, J.R., Wang, D., and Ihle, J.N.** (2002). Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex. *Mol Cell Biol* **22**, 8580-8591.

- Jucker, M., Sudel, K., Horn, S., Sickel, M., Wegner, W., Fiedler, W., and Feldman, R.A.** (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.
- Kan, Z., Jaiswal, B.S., Stinson, J., Janakiraman, V., Bhatt, D., Stern, H.M., Yue, P., Haverty, P.M., Bourgon, R., Zheng, J., et al.** (2010). Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* **466**, 869-873.
- Kang, S., Bader, A.G., Zhao, L., and Vogt, P.K.** (2005). Mutated PI 3-kinases: cancer targets on a silver platter. *Cell Cycle* **4**, 578-581.
- Kawaguchi, K., Oda, Y., Saito, T., Takahira, T., Yamamoto, H., Tamiya, S., Iwamoto, Y., and Tsuneyoshi, M.** (2005). Genetic and epigenetic alterations of the PTEN gene in soft tissue sarcomas. *Hum Pathol* **36**, 357-363.
- Kingham, E., and Welham, M.** (2009). Distinct roles for isoforms of the catalytic subunit of class-IA PI3K in the regulation of behaviour of murine embryonic stem cells. *J Cell Sci* **122**, 2311-2321.
- Kok, K., Geering, B., and Vanhaesebroeck, B.** (2009). Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends Biochem Sci* **34**, 115-127.
- Kumar, A., Fernandez-Capetillo, O., and Carrera, A.C.** (2010). Nuclear phosphoinositide 3-kinase beta controls double-strand break DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 7491-7496.
- Kumar, A., Marqués, M., and Carrera, A.C.** (2006). Phosphoinositide 3-kinase activation in late G1 is required for c-Myc stabilization and S phase entry. *Mol Cell Biol* **26**, 9116-9125.
- Kumar, A., Redondo-Munoz, J., Perez-Garcia, V., Cortes, I., Chagoyen, M., and Carrera, A.C.** (2011). Nuclear but not cytosolic phosphoinositide 3-kinase beta has an essential function in cell survival. *Mol Cell Biol* **31**, 2122-2133.
- Kwon, J., Lee, S.R., Yang, K.S., Ahn, Y., Kim, Y.J., Stadtman, E.R., and Rhee, S.G.** (2004). Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16419-16424.

- Lacalle, R.A., Gomez-Mouton, C., Barber, D.F., Jimenez-Baranda, S., Mira, E., Martinez, A.C., Carrera, A.C., and Manes, S.** (2004). PTEN regulates motility but not directionality during leukocyte chemotaxis. *J Cell Sci* **117**, 6207-6215.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M.** (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274-293.
- Layton, M.J., Harpur, A.G., Panayotou, G., Bastiaens, P.I., and Waterfield, M.D.** (1998). Binding of a diphosphotyrosine-containing peptide that mimics activated platelet-derived growth factor receptor beta induces oligomerization of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **273**, 33379-33385.
- Lee, J.O., Yang, H., Georgescu, M.M., Di Cristofano, A., Maehama, T., Shi, Y., Dixon, J.E., Pandolfi, P., and Pavletich, N.P.** (1999). Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* **99**, 323-334.
- Lee, S.R., Yang, K.S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., and Rhee, S.G.** (2002). Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Biol Chem* **277**, 20336-20342.
- Li, Z., Dong, X., Wang, Z., Liu, W., Deng, N., Ding, Y., Tang, L., Hla, T., Zeng, R., Li, L., et al.** (2005). Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat Cell Biol* **7**, 399-404.
- Liang, K., Esteva, F.J., Albarracin, C., Stemke-Hale, K., Lu, Y., Bianchini, G., Yang, C.Y., Li, Y., Li, X., Chen, C.T., et al.** (2010). Recombinant human erythropoietin antagonizes trastuzumab treatment of breast cancer cells via Jak2-mediated Src activation and PTEN inactivation. *Cancer Cell* **18**, 423-435.
- Liu, X., Marengere, L.E., Koch, C.A., and Pawson, T.** (1993). The v-Src SH3 domain binds phosphatidylinositol 3'-kinase. *Mol Cell Biol* **13**, 5225-5232.
- Lu, J., Jeong, H.W., Kong, N., Yang, Y., Carroll, J., Luo, H.R., Silberstein, L.E., Yupoma, and Chai, L.** (2009). Stem cell factor SALL4 represses the transcriptions of PTEN and SALL1 through an epigenetic repressor complex. *PLoS One* **4**, e5577.
- Lucas, C.L., Kuehn, H.S., Zhao, F., Niemela, J.E., Deenick, E.K., Palendira, U., Avery, D.T., Moens, L., Cannons, J.L., Biancalana, M., et al.** (2014). Dominant-activating germline mutations in the gene encoding the PI(3)K catalytic subunit p110delta result in T cell senescence and human immunodeficiency. *Nat Immunol* **15**, 88-97.



- Maccario, H., Perera, N.M., Davidson, L., Downes, C.P., and Leslie, N.R.** (2007). PTEN is destabilized by phosphorylation on Thr366. *Biochem J* **405**, 439-444.
- MacDougall, L.K., Domin, J., and Waterfield, M.D.** (1995). A family of phosphoinositide 3-kinases in *Drosophila* identifies a new mediator of signal transduction. *Curr Biol* **5**, 1404-1415.
- Maehama, T., and Dixon, J.E.** (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **273**, 13375-13378.
- Maffucci, T., Cooke, F.T., Foster, F.M., Traer, C.J., Fry, M.J., and Falasca, M.** (2005). Class II phosphoinositide 3-kinase defines a novel signaling pathway in cell migration. *J Cell Biol* **169**, 789-799.
- Mahimainathan, L., and Choudhury, G.G.** (2004). Inactivation of platelet-derived growth factor receptor by the tumor suppressor PTEN provides a novel mechanism of action of the phosphatase. *J Biol Chem* **279**, 15258-15268.
- Mandelker, D., Gabelli, S.B., Schmidt-Kittler, O., Zhu, J., Cheong, I., Huang, C.H., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Amzel, L.M.** (2009). A frequent kinase domain mutation that changes the interaction between PI3Kalpha and the membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16996-17001.
- Marqués, M., Kumar, A., Cortes, I., Gonzalez-Garcia, A., Hernandez, C., Moreno-Ortiz, M.C., and Carrera, A.C.** (2008). Phosphoinositide 3-kinases p110alpha and p110beta regulate cell cycle entry, exhibiting distinct activation kinetics in G1 phase. *Mol Cell Biol* **28**, 2803-2814.
- Marqués, M., Kumar, A., Poveda, A.M., Zuluaga, S., Hernandez, C., Jackson, S., Pasero, P., and Carrera, A.C.** (2009). Specific function of phosphoinositide 3-kinase beta in the control of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 7525-7530.
- McConnachie, G., Pass, I., Walker, S.M., and Downes, C.P.** (2003). Interfacial kinetic analysis of the tumour suppressor phosphatase, PTEN: evidence for activation by anionic phospholipids. *Biochem J* **371**, 947-955.
- Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., Manes, S., and Martinez, A.C.** (2001). Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu Rev Immunol* **19**, 397-421.

- Mendez, J., and Stillman, B.** (2000). Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol* **20**, 8602-8612.
- Miled, N., Yan, Y., Hon, W.C., Perisic, O., Zvelebil, M., Inbar, Y., Schneidman-Duhovny, D., Wolfson, H.J., Backer, J.M., and Williams, R.L.** (2007). Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. *Science* **317**, 239-242.
- Mosessian, S., Avliyakov, N.K., Mulholland, D.J., Boontheung, P., Loo, J.A., and Wu, H.** (2009). Analysis of PTEN complex assembly and identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C as a component of the PTEN-associated complex. *J Biol Chem* **284**, 30159-30166.
- Mosessian, S., and Wu, H.** (2010). PTEN-Associated Complexes: An Overview. *Curr Top Biochem Res* **12**, 37-42.
- Murr, R., Vaissiere, T., Sawan, C., Shukla, V., and Herceg, Z.** (2007). Orchestration of chromatin-based processes: mind the TRRAP. *Oncogene* **26**, 5358-5372.
- Myers, M.P., Pass, I., Batty, I.H., Van der Kaay, J., Stolarov, J.P., Hemmings, B.A., Wigler, M.H., Downes, C.P., and Tonks, N.K.** (1998). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13513-13518.
- Nagata, Y., Partridge, T.A., Matsuda, R., and Zammit, P.S.** (2006). Entry of muscle satellite cells into the cell cycle requires sphingolipid signaling. *J Cell Biol* **174**, 245-253.
- Nave, B.T., Haigh, R.J., Hayward, A.C., Siddle, K., and Shepherd, P.R.** (1996). Compartment-specific regulation of phosphoinositide 3-kinase by platelet-derived growth factor and insulin in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* **318** (Pt 1), 55-60.
- Nolte, R.T., Eck, M.J., Schlessinger, J., Shoelson, S.E., and Harrison, S.C.** (1996). Crystal structure of the PI 3-kinase p85 amino-terminal SH2 domain and its phosphopeptide complexes. *Nat Struct Biol* **3**, 364-374.
- Okkenhaug, K., Bilancio, A., Farjot, G., Priddle, H., Sancho, S., Peskett, E., Pearce, W., Meek, S.E., Salpekar, A., Waterfield, M.D., et al.** (2002). Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science* **297**, 1031-1034.

- Okumura, K., Mendoza, M., Bachoo, R.M., DePinho, R.A., Cavenee, W.K., and Furnari, F.B.** (2006). PCAF modulates PTEN activity. *J Biol Chem* **281**, 26562-26568.
- Papa, A., Wan, L., Bonora, M., Salmena, L., Song, M.S., Hobbs, R.M., Lunardi, A., Webster, K., Ng, C., Newton, R.H., et al.** (2014). Cancer-Associated PTEN Mutants Act in a Dominant-Negative Manner to Suppress PTEN Protein Function. *Cell* **157**, 595-610.
- Papakonstanti, E.A., Zwaenepoel, O., Bilancio, A., Burns, E., Nock, G.E., Houseman, B., Shokat, K., Ridley, A.J., and Vanhaesebroeck, B.** (2008). Distinct roles of class IA PI3K isoforms in primary and immortalised macrophages. *J Cell Sci* **121**, 4124-4133.
- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.M., Gallia, G.L., et al.** (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**, 1807-1812.
- Patrucco, E., Notte, A., Barberis, L., Selvetella, G., Maffei, A., Brancaccio, M., Marengo, S., Russo, G., Azzolino, O., Rybalkin, S.D., et al.** (2004). PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* **118**, 375-387.
- Patton, D.T., Garden, O.A., Pearce, W.P., Clough, L.E., Monk, C.R., Leung, E., Rowan, W.C., Sancho, S., Walker, L.S., Vanhaesebroeck, B., et al.** (2006). Cutting edge: the phosphoinositide 3-kinase p110 delta is critical for the function of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* **177**, 6598-6602.
- Planchon, S.M., Waite, K.A., and Eng, C.** (2008). The nuclear affairs of PTEN. *J Cell Sci* **121**, 249-253.
- Pons, S., Asano, T., Glasheen, E., Miralpeix, M., Zhang, Y., Fisher, T.L., Myers, M.G., Jr., Sun, X.J., and White, M.F.** (1995). The structure and function of p55PIK reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* **15**, 4453-4465.
- Puri, K.D., and Gold, M.R.** (2012). Selective inhibitors of phosphoinositide 3-kinase delta: modulators of B-cell function with potential for treating autoimmune inflammatory diseases and B-cell malignancies. *Front Immunol* **3**, 256.
- Rabinovsky, R., Pochanard, P., McNear, C., Brachmann, S.M., Duke-Cohan, J.S., Garraway, L.A., and Sellers, W.R.** (2009). p85 Associates with unphosphorylated PTEN and the PTEN-associated complex. *Mol Cell Biol* **29**, 5377-5388.

- Raftopoulou, M., Etienne-Manneville, S., Self, A., Nicholls, S., and Hall, A. (2004).** Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. *Science* **303**, 1179-1181.
- Randis, T.M., Puri, K.D., Zhou, H., and Diacovo, T.G. (2008).** Role of PI3Kdelta and PI3Kgamma in inflammatory arthritis and tissue localization of neutrophils. *Eur J Immunol* **38**, 1215-1224.
- Redondo-Muñoz, J., Pérez-García, V., and Carrera, A.C. (2014).** Phosphoinositide 3-kinase beta: when a kinase is more than a kinase. *Trends in Cell Mol Biol. In press*.
- Redondo-Muñoz, J., Rodríguez, M.J., Silio, V., Perez-García, V., Valpuesta, J.M., and Carrera, A.C. (2013).** Phosphoinositide 3-kinase beta controls replication factor C assembly and function. *Nucleic Acids Res* **41**, 855-868.
- Ren, S.Y., Bolton, E., Mohi, M.G., Morrione, A., Neel, B.G., and Skorski, T. (2005a).** Phosphatidylinositol 3-kinase p85 $\{\alpha\}$  subunit-dependent interaction with BCR/ABL-related fusion tyrosine kinases: molecular mechanisms and biological consequences. *Mol Cell Biol* **25**, 8001-8008.
- Ren, S.Y., Xue, F., Feng, J., and Skorski, T. (2005b).** Intrinsic regulation of the interactions between the SH3 domain of p85 subunit of phosphatidylinositol-3 kinase and the protein network of BCR/ABL oncogenic tyrosine kinase. *Exp Hematol* **33**, 1222-1228.
- Rodon, J., Dienstmann, R., Serra, V., and Tabernero, J. (2013).** Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol* **10**, 143-153.
- Roman-Gomez, J., Jimenez-Velasco, A., Castillejo, J.A., Agirre, X., Barrios, M., Navarro, G., Molina, F.J., Calasanz, M.J., Prosper, F., Heiniger, A., et al. (2004).** Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **104**, 2492-2498.
- Ross, A.H., and Gericke, A. (2009).** Phosphorylation keeps PTEN phosphatase closed for business. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1297-1298.
- Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Jones, R.G., Oliveira-dos-Santos, A.J., Stanford, W.L., Bolon, B., Wakeham, A., Itie, A., Bouchard, D., Kozieradzki, I., et al. (2000).** Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* **287**, 1040-1046.

- Scott, J.D., and Pawson, T.** (2009). Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. *Science* **326**, 1220-1224.
- Shekar, S.C., Wu, H., Fu, Z., Yip, S.C., Nagajyothi, Cahill, S.M., Girvin, M.E., and Backer, J.M.** (2005). Mechanism of constitutive phosphoinositide 3-kinase activation by oncogenic mutants of the p85 regulatory subunit. *J Biol Chem* **280**, 27850-27855.
- Shen, W.H., Balajee, A.S., Wang, J., Wu, H., Eng, C., Pandolfi, P.P., and Yin, Y.** (2007). Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* **128**, 157-170.
- Shi, Y., Paluch, B.E., Wang, X., and Jiang, X.** (2012). PTEN at a glance. *J Cell Sci* **125**, 4687-4692.
- Shin, H.W., Hayashi, M., Christoforidis, S., Lacas-Gervais, S., Hoepfner, S., Wenk, M.R., Modregger, J., Uttenweiler-Joseph, S., Wilm, M., Nystuen, A., et al.** (2005). An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *J Cell Biol* **170**, 607-618.
- Shoelson, S.E., Sivaraja, M., Williams, K.P., Hu, P., Schlessinger, J., and Weiss, M.A.** (1993). Specific phosphopeptide binding regulates a conformational change in the PI 3-kinase SH2 domain associated with enzyme activation. *EMBO J* **12**, 795-802.
- Silio, V., Redondo-Munoz, J., and Carrera, A.C.** (2012). Phosphoinositide 3-kinase beta regulates chromosome segregation in mitosis. *Mol Biol Cell* **23**, 4526-4542.
- Singer, S.J., and Nicolson, G.L.** (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731.
- Song, M.S., Salmena, L., Carracedo, A., Egia, A., Lo-Coco, F., Teruya-Feldstein, J., and Pandolfi, P.P.** (2008). The deubiquitinylation and localization of PTEN are regulated by a HAUSP-PML network. *Nature* **455**, 813-817.
- Song, M.S., Salmena, L., and Pandolfi, P.P.** (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 283-296.
- Sopasakis, V.R., Liu, P., Suzuki, R., Kondo, T., Winnay, J., Tran, T.T., Asano, T., Smyth, G., Sajan, M.P., Farese, R.V., et al.** (2010). Specific roles of the p110alpha isoform of phosphatidylinositol 3-kinase in hepatic insulin signaling and metabolic regulation. *Cell Metab* **11**, 220-230.

- Stengel, K., and Zheng, Y.** (2011). Cdc42 in oncogenic transformation, invasion, and tumorigenesis. *Cell Signal* **23**, 1415-1423.
- Tamura, M., Gu, J., Matsumoto, K., Aota, S., Parsons, R., and Yamada, K.M.** (1998). Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* **280**, 1614-1617.
- Taniguchi, C.M., Tran, T.T., Kondo, T., Luo, J., Ueki, K., Cantley, L.C., and Kahn, C.R.** (2006). Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit p85alpha suppresses insulin action via positive regulation of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12093-12097.
- Taniguchi, C.M., Winnay, J., Kondo, T., Bronson, R.T., Guimaraes, A.R., Aleman, J.O., Luo, J., Stephanopoulos, G., Weissleder, R., Cantley, L.C., et al.** (2010). The phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit p85alpha can exert tumor suppressor properties through negative regulation of growth factor signaling. *Cancer Res* **70**, 5305-5315.
- Tolias, K.F., Cantley, L.C., and Carpenter, C.L.** (1995). Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J Biol Chem* **270**, 17656-17659.
- Trotman, L.C., Wang, X., Alimonti, A., Chen, Z., Teruya-Feldstein, J., Yang, H., Pavletich, N.P., Carver, B.S., Cordon-Cardo, C., Erdjument-Bromage, H., et al.** (2007). Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell* **128**, 141-156.
- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., and Bilanges, B.** (2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 329-341.
- Vazquez, F., Grossman, S.R., Takahashi, Y., Rokas, M.V., Nakamura, N., and Sellers, W.R.** (2001). Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J Biol Chem* **276**, 48627-48630.
- Villalonga, P., Lopez-Alcala, C., Bosch, M., Chiloeches, A., Rocamora, N., Gil, J., Marais, R., Marshall, C.J., Bachs, O., and Agell, N.** (2001). Calmodulin binds to K-Ras, but not to H- or N-Ras, and modulates its downstream signaling. *Mol Cell Biol* **21**, 7345-7354.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W.** (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**, 789-799.

- Walker, E.H., Perisic, O., Ried, C., Stephens, L., and Williams, R.L.** (1999). Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature* **402**, 313-320.
- Wang, X., and Jiang, X.** (2008). PTEN: a default gate-keeping tumor suppressor with a versatile tail. *Cell Res* **18**, 807-816.
- Wu, H., Shekar, S.C., Flinn, R.J., El-Sibai, M., Jaiswal, B.S., Sen, K.I., Janakiraman, V., Seshagiri, S., Gerfen, G.J., Girvin, M.E., et al.** (2009). Regulation of Class IA PI 3-kinases: C2 domain-iSH2 domain contacts inhibit p85/p110alpha and are disrupted in oncogenic p85 mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20258-20263.
- Wu, H., Yan, Y., and Backer, J.M.** (2007). Regulation of class IA PI3Ks. *Biochem Soc Trans* **35**, 242-244.
- Yamamoto, K., Lapetina, E.G., and Moxham, C.P.** (1992). Insulin like growth factor-I induces limited association of phosphatidylinositol 3-kinase to its receptor. *Endocrinology* **130**, 1490-1498.
- Yamashita, A.** (2013). Role of SMG-1-mediated Upf1 phosphorylation in mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Cells* **18**, 161-175.
- Yim, E.K., Peng, G., Dai, H., Hu, R., Li, K., Lu, Y., Mills, G.B., Meric-Bernstam, F., Hennessy, B.T., Craven, R.J., et al.** (2009). Rak functions as a tumor suppressor by regulating PTEN protein stability and function. *Cancer Cell* **15**, 304-314.
- Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgarno, D.C., Brauer, A.W., and Schreiber, S.L.** (1994). Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* **76**, 933-945.
- Yu, J., Wjasow, C., and Backer, J.M.** (1998a). Regulation of the p85/p110alpha phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. *J Biol Chem* **273**, 30199-30203.
- Yu, J., Zhang, Y., McIlroy, J., Rordorf-Nikolic, T., Orr, G.A., and Backer, J.M.** (1998b). Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol* **18**, 1379-1387.
- Yuan, T.L., and Cantley, L.C.** (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* **27**, 5497-5510.

**Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Liang, S., Hasegawa, K., Giannakakis, A., Poulos, N., O'Brien-Jenkins, A., Katsaros, D., et al. (2007).** Integrative genomic analysis of phosphatidylinositol 3'-kinase family identifies PIK3R3 as a potential therapeutic target in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **13**, 5314-5321.

**Zhang, X., Vadas, O., Perisic, O., Anderson, K.E., Clark, J., Hawkins, P.T., Stephens, L.R., and Williams, R.L. (2011).** Structure of lipid kinase p110beta/p85beta elucidates an unusual SH2-domain-mediated inhibitory mechanism. *Mol Cell* **41**, 567-578.

**Zhao, J.J., Cheng, H., Jia, S., Wang, L., Gjoerup, O.V., Mikami, A., and Roberts, T.M. (2006).** The p110alpha isoform of PI3K is essential for proper growth factor signaling and oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16296-16300.







# ANEXO



---

Artículos publicados durante la tesis doctoral:

1. **Pérez-García V**, Redondo-Muñoz Javier, Kumar Amit, Carrera Ana C. Cell activation-induced phosphoinositide 3-kinase alpha/beta dimerization regulates PTEN activity. **Mol Cell Biol**. En revisión.

2. Redondo-Muñoz, J., **Pérez-García, V.** and Carrera A.C. "Phosphoinositide 3-kinase beta: when a kinase is more than a kinase". **Trends in Cell Mol Biol**. En revisión.

3. Cariaga-Martínez E., Cortés I., García E., **Pérez-García V.**, Pajares M.J., Idoate M.A., Redondo-Muñoz, J, Antón I., Carrera A.C. Phosphoinositide 3-kinase p85beta regulates cell invasión by promoting invadopodium formation. **Biologen**. En revisión.

4. Holgado B.L., Martínez-Muñoz L., Sánchez-Alcañiz J.A., Lucas P., **Pérez-García V.**, Pérez G., R.-Frade J.M., Nieto M., Marín O., Carrasco Y.R., Carrera A.C., Alvarez-Dolado M., Mellado M. "CXCL12-Mediated Murine Neural Progenitor cell movement requires PI3Kb activation" **Mol Neurobiol**. 48(1):217-31(2013).

5. Redondo-Muñoz, J., Josefa Rodríguez M, Silió V, **Pérez-García V**, María Valpuesta J, Carrera, A.C. "PI 3-kinase beta controls replication factor C assembly and function". **Nucleic Acids Res**. 41(2): 855-868 (2013).

6. Calvanese V, Fernández AF, Urdinguio RG, Suárez-Alvarez B, Mangas C, **Pérez-García V**, Bueno C, Montes R, Ramos-Mejía V, Martínez-Cambor P, Ferrero C, Assenov Y, Bock C, Menendez P, Carrera, A.C., Lopez-Larrea C, Fraga MF. "A promoter DNA demethylation landscape of human hematopoietic differentiation". **Nucleic Acids Res**. 40:116-131 (2012).

7. Kumar A.\*, Redondo-Muñoz J.\*, **Perez-García V.\***, Cortés I., Chagoyen M., and Carrera, A.C. Nuclear but not cytosolic phosphoinositide 3-kinase beta plays an essential function in cell survival. **Mol Cell Biol**. 31:2122-2133(2011). \* **Contribución similar**