



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

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**“RhoGEFs como potenciales efectores de la  
transducción de señales angiogénicas: papel del grupo  
conformado por PLEKHG5, RGS-RhoGEFs, Intersectinas,  
NGEF y sus más cercanos homólogos.”**

**TESIS**

**Que presenta  
Q.F.B. ALEJANDRO CASTILLO KAUIL**

**Para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA**

**Director de la tesis:  
Dr. José Vázquez Prado**

**México, D.F.**

**Diciembre, 2013**

Agradezco a CONACyT por el otorgamiento de la beca **333656**, que fue indispensable para lograr el presente trabajo, el cual fue realizado en los Departamentos de Farmacología y Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. José Vázquez Prado.

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación titulado “Mecanismos moleculares de migración endotelial y angiogénesis” financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con clave 152434, vigencia de Enero-27-2012 a Febrero-26-2016 y el Dr. José Vázquez Prado como responsable del mismo.

*"No importa que tanto camino equivocado lleves recorrido: siempre puedes dar la vuelta y regresar"*

*"Para descubrir hay que ver lo que todos ven, pero pensar lo que nadie piensa"*

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente agradezco al Dr. José Vázquez Prado por depositar su confianza en mí al ofrecerme este proyecto, así como también por dedicar parte de su tiempo en mi formación como estudiante y persona.

También extiendo mi agradecimiento al Maestro en Ciencias Ricardo Hernández García, cuyo trabajo doctoral fue fundamental para este proyecto, además de ser el responsable de que yo adquiriera muchos de los conocimientos sobre técnicas y métodos empleados en este trabajo. Gracias por la paciencia que tuviste para conmigo.

Gracias a Jaime Estrada Trejo y Margarita Raquel Valadez Sánchez del laboratorio 19 de Biología Celular, así como a David Pérez Rangel y Estanislao Escobar Islas del laboratorio 35 de Farmacología por todo el apoyo técnico brindado durante la realización de la parte experimental de esta tesis.

A todos mis compañeros del laboratorio 19 de Biología Celular y laboratorio 35 de Farmacología les agradezco todos los consejos, ayuda, enseñanzas y demás apoyo.

A la Dra. María del Carmen García García y la Dra. Guadalupe Reyes Cruz por su valiosa asesoría y sugerencias aportadas al proyecto. Un agradecimiento especial a la Dra. Guadalupe por brindarme un espacio en su laboratorio y la confianza depositada en mí.

## DEDICATORIAS

Todo el esfuerzo y dedicación invertido en la presente tesis va dedicado con el cariño más sincero a las siguientes personas:

A mi madre, por todo el amor y apoyo que me ha brindado en cada nueva meta que me propongo, por confiar ciegamente en mí, por enseñarme grandes lecciones de vida y sobretodo por ser mi ejemplo de un gran ser humano. Gracias por tanto, perdón por tan poco, algún día espero retribuir todo lo que me has dado y enseñado.

A mis hermanos, por todo el apoyo y cariño que me han demostrado, por aceptar cada decisión que he tomado y nunca dejar de creer en mí.

A la familia Villegas Cuandón, que me abrieron las puertas de su hogar y su corazón, no puedo evitar darles las gracias por hacerme parte de su familia y todos los momentos únicos que me regalaron.

A Luis Alberto, aunque nuestra amistad comenzó hace poco más de un año y existe una gran distancia, sentimos como si nos conociéramos de toda la vida, gracias por las palabras correctas en el momento oportuno, por ser una persona de gran corazón, ser un gran cómplice y enseñarme tantas cosas en poco tiempo.

A Érika, Carolina, Ariana, Karla, Esmeralda, Liliana, Sendi, Killiam, Eduardo, Marco y Víctor, mis amigos de generación, gracias por su invaluable amistad, por la inmensa cantidad de experiencias, por el apoyo en los momentos difíciles y la compañía en los momentos felices. Lo hemos logrado.

A Tania, Marco, Diana, Misael, Ismael, Joseline, Esdras, Margarita y Jaime, mis amigos del laboratorio 19 de Biología Celular, pues a pesar de ser ajeno a su departamento me abrieron las puertas y me brindaron lo mejor de cada uno.

A Ricardo, Lydia, Magda, Daniel, Estanislao y David, mis amigos del laboratorio 35 de Farmacología, gracias por su amistad, en cada uno de ustedes descubrí grandes virtudes y grandes personas.

A todas las maravillosas personas que he conocido en estos primeros años de estancia en esta grandiosa ciudad: Víctor P., David G., Alma V., Óscar J. y Raúl A., gracias por todos esos buenos momentos.

## INDICE

INDICE .....	1
RESUMEN .....	3
ABSTRACT .....	4
1 INTRODUCCIÓN .....	5
1.1 Migración celular .....	5
1.2 GTPasas de la familia de Rho .....	6
1.3 Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) .....	8
1.4 RhoGEFs: papel en el desarrollo de enfermedades y posibles blancos terapéuticos .....	10
2 JUSTIFICACIÓN .....	12
3 HIPÓTESIS .....	13
4 OBJETIVOS .....	14
4.1 Objetivo general .....	14
4.2 Objetivos particulares .....	14
5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	15
5.1 SELECCIÓN DE RhoGEFs .....	16
5.2 GENERACIÓN DE VARIANTES CONSTITUTIVAMENTE ACTIVAS .....	17
5.2.1 Diseño de primers .....	18
5.2.2 Amplificación de los dominios DH-PH .....	19
5.2.3 Electroforesis en geles de agarosa .....	21
5.2.4 Purificación de los fragmentos amplificados .....	22
5.2.5 Digestión de los insertos y del vector pCEFL-EGFP-CAAX .....	23
5.2.6 Purificación de los insertos y vector digeridos .....	25
5.2.7 Ligación .....	26
5.2.8 Transformación de bacterias DH5 $\alpha$ ultracompetentes y obtención de ADN plasmídico .....	26
5.2.9 Digestión diagnóstica de la ligación .....	28
5.3 ASPECTOS MOLECULARES Y CELULARES LIGADOS A LA ACTIVACIÓN DE GTPasas DE LA FAMILIA DE Rho .....	29
5.3.1 Cultivo celular: Células HEK293T .....	29
5.3.2 Transfección celular .....	30

5.3.3	Expresión de las construcciones EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX y activación de las GTPasas Cdc42, Rac1 y RhoA en células HEK293T .....	31
5.3.4	Western Blot .....	32
5.3.5	Revelado .....	34
5.3.6	Microscopia de fluorescencia: Monitoreo de la expresión y localización de los EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX .....	34
5.3.7	Morfología celular: Tinción del citoesqueleto de actina .....	35
5.3.7.1	Cultivo celular: Células PAE .....	35
5.3.7.2	Transfección celular .....	36
5.3.7.3	Tinción celular .....	36
6	RESULTADOS .....	38
6.1	Generación de los EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX .....	38
6.2	Caracterización de los EGFP-RhoGEFs-DHPH-CAAX .....	39
6.2.1	EGFP-ITSN2-DHPH-CAAX .....	39
6.2.2	EGFP-AKAP13-DHPH-CAAX .....	42
6.2.3	EGFP-ARHGEF18-DHPH-CAAX .....	43
6.2.4	EGFP-ARHGEF2-DHPH-CAAX .....	45
6.2.5	EGFP-ARHGEF1-DHPH-CAAX .....	47
6.2.6	EGFP-ARHGEF11-DHPH-CAAX .....	49
6.2.7	EGFP-PLEKHG5-DHPH-CAAX .....	51
6.2.8	EGFP-ARHGEF19-DHPH-CAAX .....	53
6.2.9	EGFP-ARHGEF15-DHPH-CAAX .....	54
6.2.10	EGFP-ARHGEF16-DHPH-CAAX .....	56
7	DISCUSIÓN .....	58
8	CONCLUSIONES .....	63
9	PERSPECTIVAS .....	65
10	BIBLIOGRAFÍA .....	66

## RESUMEN

Las GTPasas de la familia de Rho son relevantes debido a su participación en la remodelación del citoesqueleto de actina, un evento celular que lleva a cambios en la morfología celular y favorece un fenotipo migratorio. La regulación de las Rho GTPasas es dependiente, por una parte, de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (RhoGEFs) que permiten su activación, mientras que proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) e inhibidores de la disociación de GDP (GDIs) regulan su inactivación. El genoma humano codifica para 22 Rho GTPasas y 63 RhoGEFs, lo que parece indicar que los RhoGEFs son reguladores muy específicos y relevantes para el control de la activación de las GTPasas. Aunque las GTPasas han sido caracterizadas con una actividad aberrante en múltiples procesos patológicos, aún resulta poco común identificar mutaciones y/o alteraciones en su expresión, por lo que las proteínas reguladoras, como son los RhoGEFs, resultan los candidatos más interesantes para explicar una actividad alterada de las GTPasas.

Este trabajo establece las bases iniciales en la caracterización del potencial angiogénico de algunos miembros de la familia de RhoGEFs. De acuerdo a estudios de expresión de RhoGEFs en células endoteliales, y usando criterios entre los que se incluyen sus características estructurales, se eligió abundar en el estudio de un grupo de 20 RhoGEFs, representados por miembros como son PLEKHG5, RGS-RhoGEFs, Intersectinas, NGEF y homólogos cercanos. Para ello generamos variantes constitutivamente activas, a partir de la amplificación por PCR del cDNA codificante de los dominios catalíticos DH-PH de cada RhoGEF y su clonación en el vector pCEFL-EGFP-CAAX que da lugar a la expresión de proteínas fluorescentes ancladas a la membrana plasmática. Se obtuvieron 12 construcciones, cuyo análisis funcional apoyó la hipótesis de que los dominios DH-PH anclados a la membrana plasmática, a través de isoprenilación, dan lugar a una variante con capacidad de activar diversas Rho GTPasas. Con los EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX se realizaron ensayos de activación de GTPasas de la familia de Rho, ensayos de captura de GEF activo, microscopia de fluorescencia y en un caso tinción del citoesqueleto. Los resultados obtenidos con el conjunto de ensayos para los EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX demostraron que se tratan de variantes constitutivamente activas que promueven con diferente especificidad la activación de Cdc42, Rac1 y RhoA, o en algunos casos favorecen un proceso contrario. El fenotipo adquirido por las células es compatible a la activación de GTPasas de Rho y un posible proceso migratorio. Estos estudios alientan a explorar con mayor profundidad el papel de diversos RhoGEFs en el proceso migratorio y angiogénico, así como a correlacionarlo con eventos patológicos como la angiogénesis tumoral y la metástasis, e incluso considerarlos como novedosos blancos terapéuticos.

## ABSTRACT

Rho family GTPases are fundamental regulators of actin cytoskeleton remodeling, a cellular event leading to changes in cellular morphology linked to a migratory phenotype. Rho guanine nucleotide exchangers factors (RhoGEFs) activate Rho GTPases, whereas GTPase activating proteins (GAPs) and inhibitors of GDP dissociation (GDIs) inactivate them, closing the cycle by which these molecular switches control cell behavior. The human genome encodes 22 Rho GTPases and 63 RhoGEFs, highlighting the existence of a complex array of possibilities by which specific stimulants activate Rho GTPases. Although GTPases have been characterized with aberrant activity in multiple pathological processes, just a few mutations and/or alterations in their expression have been detected, so regulatory proteins, such as RhoGEFs, are the most interesting candidates to explain the aberrant activities of RhoGTPases in pathological situations.

This work provides the initial approximation towards the systematic characterization of RhoGEFs in terms of their angiogenic potential. According to ongoing studies in our laboratory regarding expression of RhoGEFs in endothelial cells, and considering their structural characteristics, we decided to study a group of 20 RhoGEFs, represented by members such as PLEKHG5, RGS-RhoGEFs, Intersectin, NGEF and close homologs.. For this purpose we generated constitutively active variants. Our strategy consisted in the amplification of cDNA encoding the catalytic domains of each DH-PH RhoGEF and cloning them into the pCEFL-EGFP-CAAX vector, resulting in expression of fluorescent DH-PH constructs anchored to the plasma membrane. Twelve constructs were obtained, whose functional characterization supported the hypothesis that different RhoGEFs, represented by their DH-PH domains anchored to the plasma membrane through isoprenylation, resulting in a variant with ability to activate various Rho GTPases. We assessed the activation of different Rho GTPases, performed capture assays for active GEF, and visualized the cytoskeletal effects of the constitutively active RhoGEF constructs. We found that constitutively active variants, with different specificity, showed a differential activity towards Cdc42, RhoA and Rac1. The cells acquired phenotypes consistent with the activation of Rho GTPases and a putative migratory behavior. Our findings encourage further exploration on the role of various RhoGEFs in endothelial cell migration and angiogenesis, and their potential role in pathological events such as tumor angiogenesis and metastasis, and extend their potential as novel therapeutic targets.

# 1 INTRODUCCIÓN

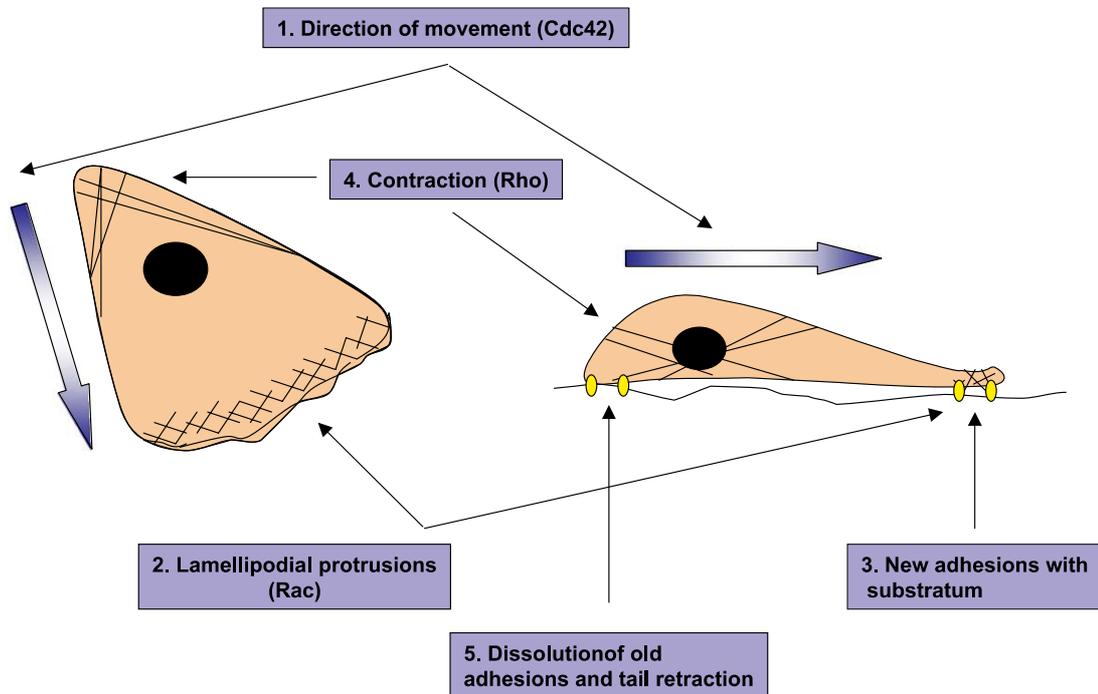
## 1.1 Migración celular

La migración celular es un proceso de gran relevancia desde el inicio de la vida de todo organismo multicelular, debido a su participación en la generación, desarrollo y localización de tejidos así como órganos (morfogénesis). Sin embargo, la migración celular es un evento que acompaña a un organismo durante toda su vida e incluso contribuye a su muerte. Puesto que el desarrollo de la vascularización, la extravasación de un neutrófilo o incluso la invasión de un cáncer a otros tejidos, requieren que las células migren tras adquirir un comportamiento mecánico (1, 2).

La migración celular ha sido estudiada desde mucho tiempo atrás, con la intención de elucidar con mayor detalle las proteínas o complejos participantes, así como los eventos de señalización que concluyen en dicho proceso, a fin de entender lo mejor posible los mecanismos de migración, lo cual ha ido en paralelo con el desarrollo de nuevas técnicas y herramientas como los cultivos celulares y de tejidos, la microscopia de fluorescencia que permite obtener imágenes más detalladas, estudios de análisis genéticos, así como los modelos animales, entre otros, que han facilitado y contribuido de manera importante en este campo (2).

El esquema general de una célula en migración muestra la generación de una extensión o frente de avance caracterizada por la formación de protuberancias de la membrana celular denominadas lamelipodios y filopodios, además de la presencia de nuevas adhesiones en este frente. Mientras que en la parte posterior de la célula ocurre una contracción promovida por la formación de fibras de estrés y la desaparición de adherencias. Todo el proceso antes descrito es consecuencia del reordenamiento que sufre el citoesqueleto de actina, evento coordinado de manera espacio-temporal que finalmente promueve un proceso migratorio eficaz. Los eventos que desencadenan la migración, son específicos y coordinados por una gran variedad de moléculas de señalización, incluyendo cinasas de lípidos, cinasas de Ser/Thr y Tyr, fosfolipasas, proteínas adaptadoras así como, en algunos casos, la cascada MAPK. Sin embargo, un grupo particular de proteínas, denominadas GTPasas de la familia de Rho, representan el punto central que conecta los eventos

iniciales de transducción de señales extracelulares con la cadena de eventos intracelulares que desencadena la migración de una célula (Figura 1) (2,3).

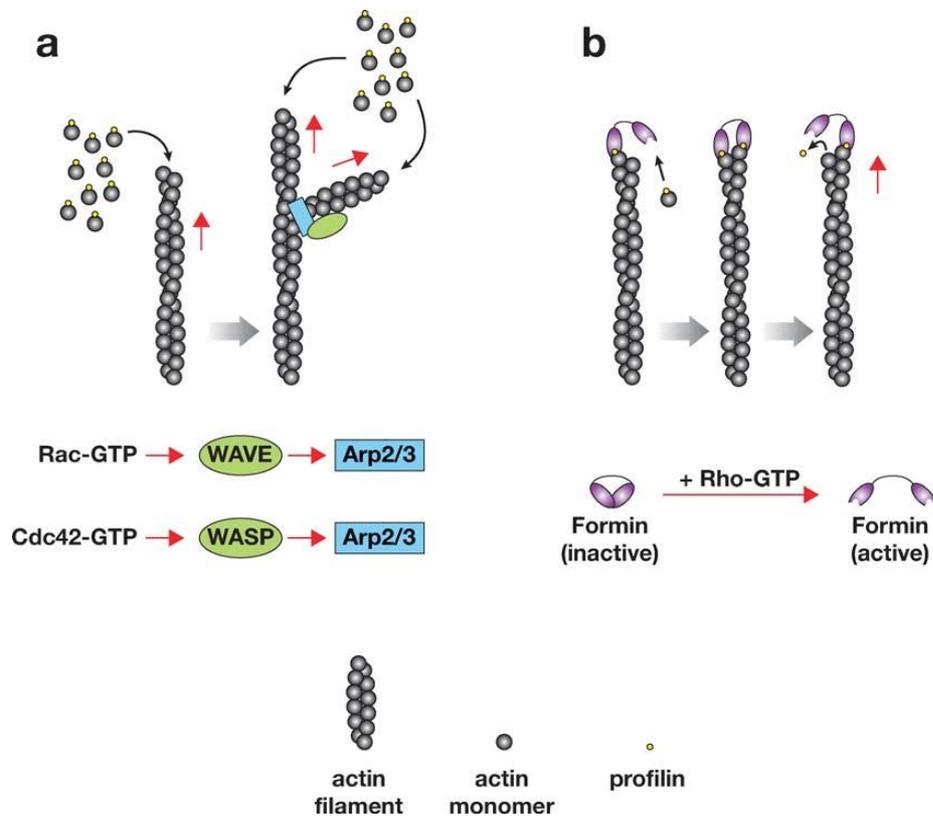


**Figura 1.** La migración es un proceso que resulta de una serie de pasos altamente coordinados, donde diferentes GTPasas son activadas de manera espacio-temporal. En particular, las GTPasas de la familia de Rho promueven cambios en el citoesqueleto de actina que dan lugar a la aparición de protuberancias de la membrana celular y la formación de fibras de estrés que permiten la contracción celular. Además, se activan mecanismos que llevan al ensamble y desensamble de adhesiones celulares. En conjunto, la integración de los cambios morfológicos y propiedades adhesivas resulta en el movimiento direccionado de la célula (Tomado de Raftopoulos & Hall, 2004) .

## 1.2 GTPasas de la familia de Rho

La familia de GTPasas de Rho (Rho GTPasas) pertenece a la superfamilia de GTPasas pequeñas representada por Ras, las cuales se encuentran expresadas en todas las células eucariotas. Las Rho GTPasas son conocidas ampliamente por su papel como reguladoras de la organización del citoesqueleto (Figura 2) y otros procesos, tales como expresión de genes, proliferación, migración, crecimiento y supervivencia celular (4,5). Estas GTPasas son reguladas mediante un ciclo en el que su activación depende de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), y su inhibición

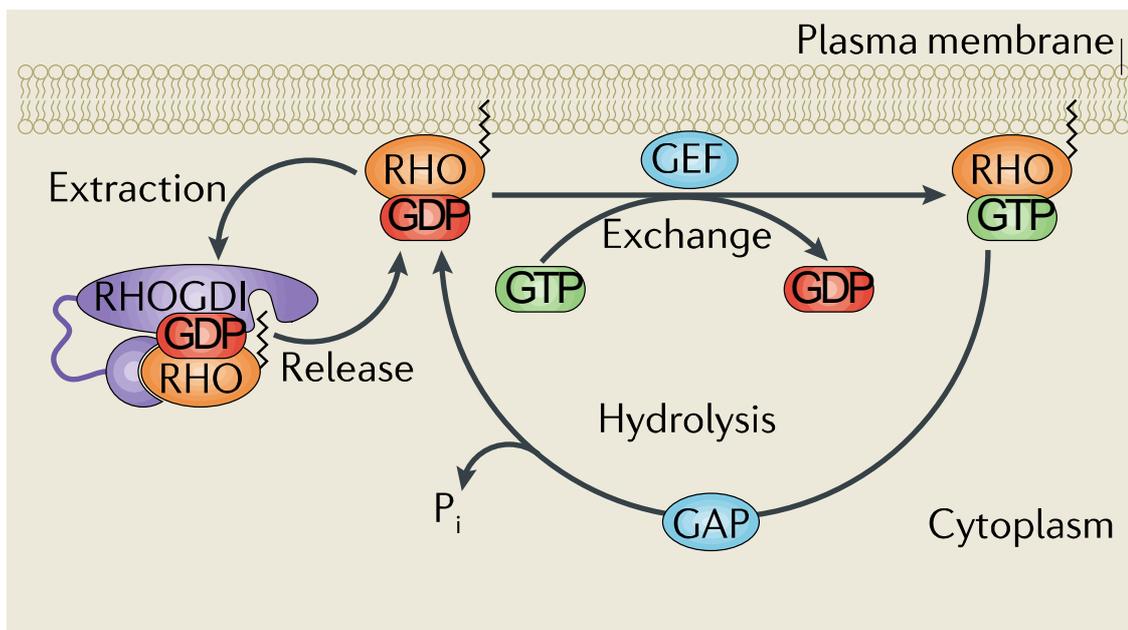
resulta de la acción de proteínas promotoras de la actividad intrínseca de GTPasas (GAPs), así como por su interacción con inhibidores de la disociación de GDP (GDIs) (6,7).



**Figura 2.** Las Rho GTPasas Cdc42, Rac1 y RhoA, miembros representativos de la familia de GTPasas de Rho, se han caracterizado gracias a su importancia como reguladoras de la polimerización de la actina. a) Cdc42 y Rac1 generan sitios de nucleación de actina a partir de su interacción con las proteínas WAVE y WASP, mismas que reclutan a Arp2/3 (proteína relacionada a la actina) quien directamente sirve de sitio de anclaje que inicia una red de filamentos ramificados, generando filopodios y lamelipodios en una célula en migración. b) RhoA activa a proteínas conocidas como forminas, mismas que promueven el alargamiento lineal de los filamentos de actina, con lo cual se producen fibras de estrés que favorecen la contracción celular (Tomado de Jaffe & Hall, 2005).

En mamíferos existen 22 miembros de GTPasas de Rho, aunque los mejor caracterizados son RhoA, Rac1 y Cdc42. Por otra parte, en el genoma humano existen codificados 63 RhoGEFs, lo que evidencía la importancia que tiene para el organismo el disponer de un amplio repertorio de opciones para controlar la fase de activación de las Rho GTPasas, permitiendo sugerir que una alteración en sus funciones pudiese dar origen a eventos celulares de

relevancia patológica. Son pocos los ejemplos de eventos patológicos en las que se han identificado mutaciones o sobreexpresión de GTPasas de la familia de Rho, por lo que se ha especulado que su participación en patologías como el cáncer, en realidad es resultado de alteraciones en las proteínas que las regulan, como los RhoGEFs (5,6).

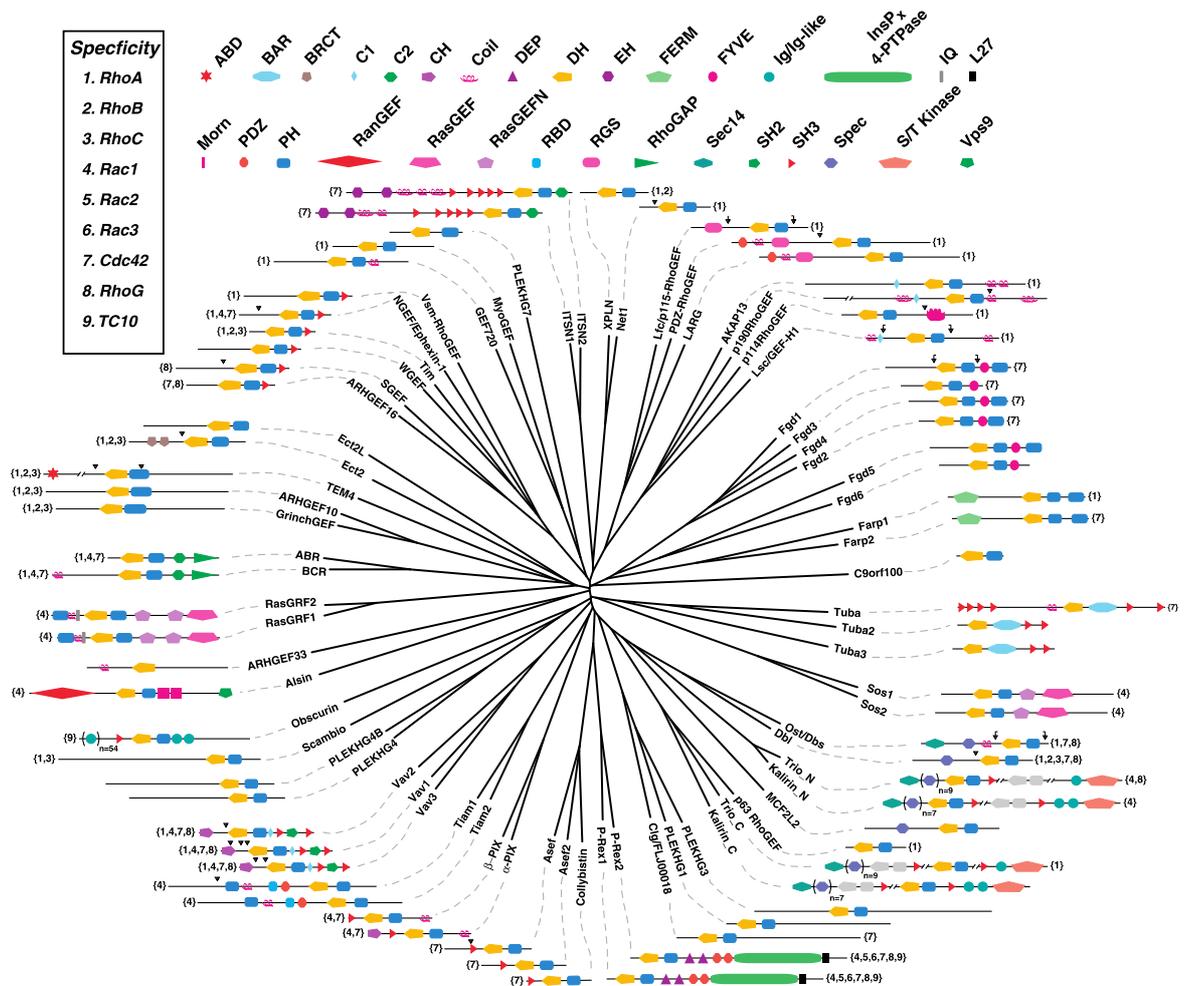


**Figura 3.** Ciclo de activación de Rho GTPasas. Las GTPasas de Rho se encuentran, en su estado inactivo, unidas a RhoGDIs y secuestradas en el citoplasma. Como resultado de un estímulo extracelular que activa a RhoGEFs, estos promueven el intercambio de GDP por GTP, en las GTPasas que además se han asociado a la membrana celular. La GTPasa que tiene incorporado GTP se encuentra en una conformación activa y puede actuar sobre sus diferentes efectores. Las proteínas conocidas como GAPs cierran el ciclo promoviendo el paso de la GTPasa a un estado inactivo. En este caso, los GAPs favorecen la actividad intrínseca de GTPasa con lo cual se hidroliza el GTP a GDP, inactivando a la Rho GTPasas para nuevamente ser secuestradas al citoplasma (Tomado de García-Mata, Boulter & et al., 2011).

### 1.3 Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs)

Los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina de la familia Dbl son proteínas estructuralmente complejas que conducen a la activación de Rho GTPasas, por lo que se considera que participan de manera obligada en las vías de señalización que desencadenan en el proceso de migración celular. El primer RhoGEF fue caracterizado como un oncogén expresado en linfoma de células B difusas (*diffuse B-cell lymphoma*), de ahí el término Dbl. Análisis

posteriores de la secuencia de aminoácidos dejaron ver una similitud entre la proteína Cdc24 del ciclo de división de las levaduras y la porción central de la proteína Dbl identificada, con lo que se abrió la posibilidad de que ambas cumplieran el papel de GEFs, estimulando el intercambio de GDP por GTP en las GTPasas, idea que fue confirmada posteriormente (9).



**Figura 4.** Familia de RhoGEFs humanos compuesto por 63 miembros que expresan el dominio de homología Dbl, se señala la estructura y la especificidad reportada para cada uno de los miembros. El árbol filogenético fue generado a partir del alineamiento de las secuencias de los dominios DH de cada RhoGEF (Tomado de Cook, Rossman & et al., 2013).

Tras la identificación del primer GEF se fueron sumando nuevos miembros a esta familia de proteínas, los cuales tienen en común la presencia de un dominio catalítico de homología a Dbl (dominio DH o dominio RhoGEF) seguido de un dominio de homología a Pleckstrina (dominio PH). El dominio DH, de aproximadamente 200 aminoácidos, es el responsable de la catalizar el

intercambio de GDP por GTP a través de interacción directa con las GTPasas, sin embargo el dominio PH, de cerca de 100 aminoácidos, parece también cumplir una función relevante en la actividad de los GEF, lo que explicaría su invariable localización adyacente al dominio DH (10). Aunque el dominio PH es más conocido por su habilidad de unirse a fosfoinosítidos, también se le atribuye una posible participación en el reconocimiento específico de un GEF con su respectiva GTPasa, así como de favorecer de una mejor interacción, o bien como un dominio regulador de la acción catalítica del GEF (11).

La familia de RhoGEFs está compuesta de 63 miembros, mismos que presentan una amplia diversidad y complejidad estructural, así como diferencias en la especificidad por las GTPasas que activan, tal y como se indica en la Figura 4. La existencia de tal multitud de RhoGEFs que pueden o no ser muy específicos en cuanto a la GTPasa que reconocen, evidencia la importancia de mantener un control preciso de la activación de GTPasa de la familia de Rho ante diversos estímulos que pueden aprovechar los diferentes mecanismos de señalización, representados por la diversidad de dominios presentes en los RhoGEFs, y que están involucrados en la activación de las GTPasas de Rho (12).

#### **1.4 RhoGEFs: papel en el desarrollo de enfermedades y posibles blancos terapéuticos.**

Aunque algunas GTPasas sufren mutaciones y alteraciones en su expresión que han sido asociadas a eventos patológicos, esto es aún un hecho poco frecuente, por lo que se ha especulado que su participación en patologías como el cáncer, en realidad es resultado de alteraciones en las proteínas que las regulan. Los RhoGEFs, al ser reguladores obligados de la activación de las GTPasas, son el sujeto de hipótesis sobre una posible alteración en su expresión o actividad, que puede llevar a una activación aberrante de las Rho GTPasas, teniendo como desenlace la aparición de patologías (6). La hipótesis anterior está apoyada por el hecho de que varios RhoGEFs fueron identificados inicialmente como oncogenes o bien se ha encontrado un aumento significativo en su expresión que se ha asociado con cáncer. En este grupo se incluyen a Dbp/Mcf2, Vav, Ect2, Tim, Net1, P-Rex 1/2, Lbc, Lfc, Tiam 1, Clg, por mencionar algunos. Además el número de RhoGEFs tres veces mayor

respecto al número de Rho GTPasas es un indicativo de su relevancia como reguladores altamente específicos, y de una idea de la existencia de cierta redundancia en las vías de señalización en las que las Rho GTPasas son partícipes (12). Aún falta mucho por elucidar sobre la verdadera contribución de los RhoGEFs en la aparición y progresión de patologías, especialmente aquellas que involucran migración celular. Las investigaciones en este terreno contribuirán a entender los mecanismos básicos que controlan la migración celular, tanto en situaciones normales como patológicas y llevarán a desarrollar terapias más específicas y eficaces, donde los RhoGEFs parecen ser interesantes blancos terapéuticos.

## 2 JUSTIFICACIÓN

El interés de nuestro grupo se enfoca en la identificación y caracterización de proteínas de transducción de señales que contribuyen de manera obligada a la respuesta angiogénica. Partiendo de la hipótesis general que establece que cambios en la forma de la célula, y en su capacidad de migración, en respuesta a estímulos angiogénicos, están vinculados a procesos patológicos como la angiogénesis tumoral. Para ello, reconocemos a las proteínas que regulan la función de las GTPasas de la familia de Rho como elementos imprescindibles de la respuesta angiogénica. Además, consideramos que la caracterización de tales proteínas dará lugar al diseño de terapias farmacológicas encaminadas a combatir procesos patológicos como el cáncer.

Los RhoGEFs son elementos de relevancia en la activación de las GTPasas de Rho, ya que son directamente responsables de llevar a la GTPasa al estado activo. Además, su número elevado y complejidad estructural son indicativos de la diversidad de posibilidades que llevan a su activación, lo que sugiere un papel relevante como reguladores de la respuesta angiogénica. Trabajos previos en el laboratorio, por parte de Ricardo Hernández García, permitieron identificar la expresión de 55 de estos GEFs en células endoteliales, encontrándonos con un número importante de estas proteínas que aún no han sido caracterizadas a profundidad y no determinada su contribución en la respuesta angiogénica. Ante este panorama creemos necesario un enfoque sistemático dirigido a una mejor caracterización de un grupo de estos RhoGEFs. Por lo que en este trabajo hemos decidido enfocarnos en la caracterización de un grupo precisamente interesante debido a sus importantes niveles de expresión en células endoteliales, su complejidad estructural y cercanía filogenética, todo lo anterior parece mantener una relación con un posible papel relevante en el proceso migratorio celular normal y/o patológico, de ahí nuestra decisión a estudiar a un grupo definido.

### **3 HIPÓTESIS**

La expresión de variantes constitutivamente activas de RhoGEFs permitirá un enfoque experimental de ganancia de función al promover un aumento de la activación de GTPasas de Rho, así como cambios moleculares y celulares compatibles con una posible respuesta angiogénica.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

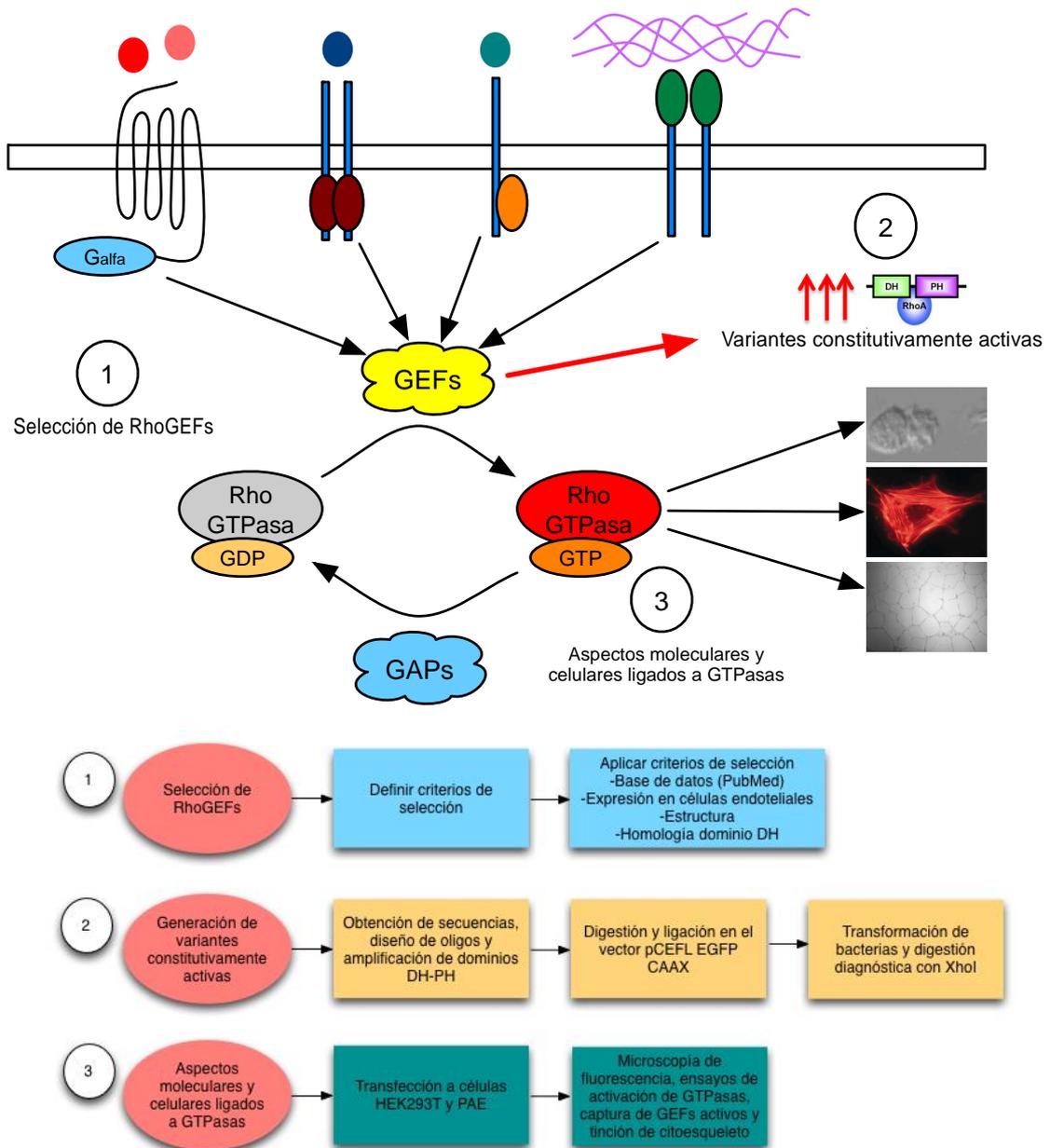
Caracterizar, mediante una estrategia de ganancia de función, el potencial y relevancia de algunos RhoGEFs humanos, más específicamente un grupo compuesto por 20 miembros representados por PLEKHG5, RGS-RhoGEFs, Intersectinas, NGEF y sus homólogos más cercanos, a partir del diseño, construcción y expresión de variantes constitutivamente activas que promuevan una activación de GTPasas de Rho, así como su repercusión sobre aspectos moleculares y celulares compatibles a una posible respuesta angiogénica.

### **4.2 Objetivos particulares**

- Diseñar y generar construcciones EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX de algunos miembros prioritarios del grupo representado por PLEKHG5, RGS-RhoGEFs, Intersectinas, NGEF y sus homólogos más cercanos, cuya expresión ha sido previamente confirmada en células endoteliales HMEC.
- Evaluar la expresión de las construcciones por medio del monitoreo con la proteína verde fluorescente que estará fusionada a cada una de las construcciones diseñadas para obtener RhoGEFs constitutivamente activos.
- Caracterizar los efectos moleculares de cada construcción, tales como determinar las GTPasas que son activadas como resultado de la expresión de la construcción, y con ayuda de GTPasas mutantes que poseen afinidad por RhoGEFs activos, monitorear si la activación es resultado de una interacción directa de la construcción y la GTPasa o una posible activación en cascada.
- Estudiar los cambios morfológicos celulares promovidos por la expresión de las construcciones y ligados a la activación de GTPasas de la familia de Rho.

## 5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Los estudios propuestos para investigar la validez de nuestra hipótesis se planearon de acuerdo a los objetivos antes señalados y se presentan en la estrategia experimental resumida de manera gráfica en la Figura 5.



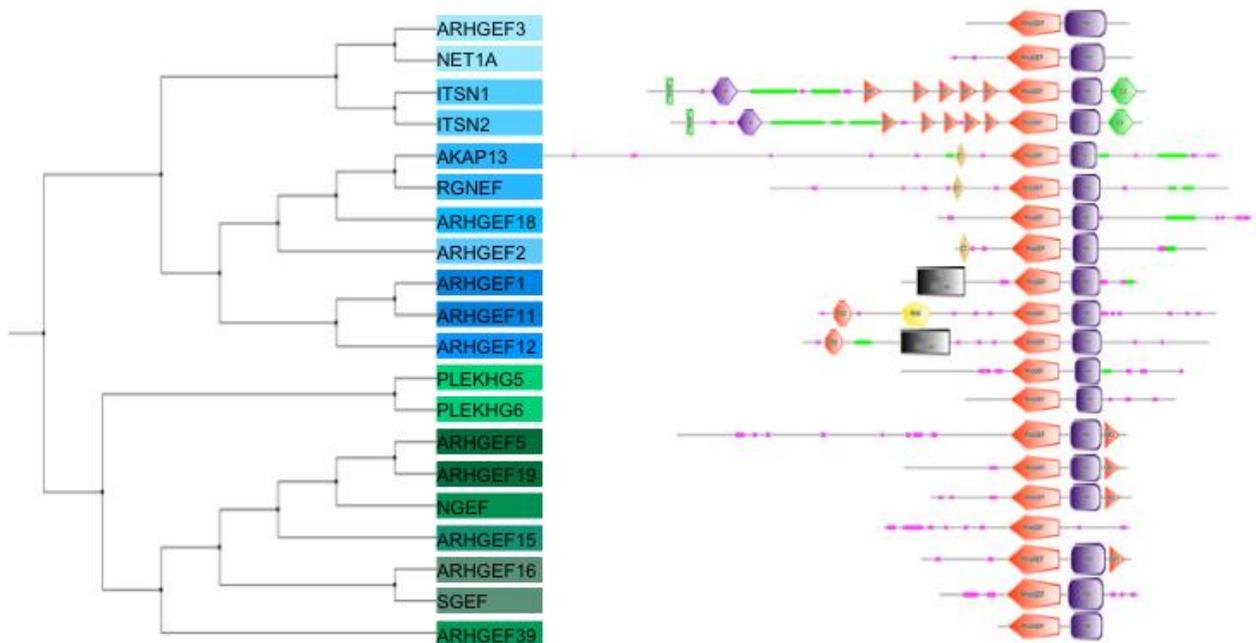
**Figura 5.** Resumen de las estrategias experimentales propuestas para alcanzar los objetivos de este proyecto, por lo que primero **(1)** se estableció una lista de criterios para definir un grupo de RhoGEFs que particularmente nos resulten interesantes, luego **(2)** se diseñaron y generaron variantes constitutivamente activas de los GEFs seleccionados para **(3)** evaluar su contribución en procesos moleculares y celulares ligados a la activación de GTPasas.

## 5.1 SELECCIÓN DE RhoGEFs

El punto inicial del proyecto fue seleccionar algunos RhoGEFs humanos del grupo de 55 que de acuerdo a los estudios de Ricardo Hernández García demostraron tener una expresión relevante en células endoteliales HMEC, por lo tanto se determinó una lista de criterios a considerar como son:

- Información disponible en bases de datos públicas como PubMed.
- Patrones de expresión en células, tanto en estado basal como en respuesta al estímulo con factores angiogénicos como el VEGF.
- Complejidad estructural considerada a partir de los dominios presentes en estas proteínas.
- Especificidad por alguna(s) GTPasa(s).
- Origen filogenético común considerando la comparación del dominio de homología a Dbl (DH).

Así pues, se decidió enfocar el interés en los miembros de una rama en concreto de un árbol filogenético de RhoGEFs generado a partir del dominio catalítico, dentro de los que encontramos a PLEKHG5, RGS-RhoGEFs, Intersectinas, NGEF y a sus más cercanos homólogos (Figura 6).

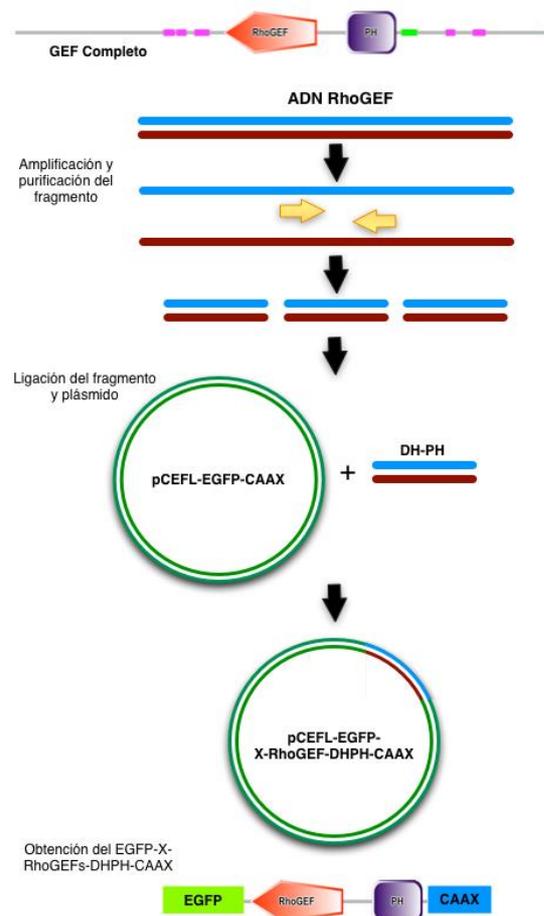


**Figura 6.** Árbol filogenético generado a partir del alineamiento de las secuencias de los dominios de homología a Dbl (DH) de los RhoGEFs seleccionados de acuerdo a los criterios descritos en este apartado. Este grupo representa una rama, constituida por 20 RhoGEFs, de

un árbol filogenético original de RhoGEFs humanos constituido por 63 proteínas (13). Los RhoGEFs indicados con colores iguales tienen una homología mayor entre sí respecto al resto del grupo.

## 5.2 GENERACIÓN DE VARIANTES CONSTITUTIVAMENTE ACTIVAS

Tras la selección de los RhoGEFs que serían objeto de estudio para este trabajo, con el fin de determinar su contribución en la activación de una o más GTPasas, así como caracterizar su contribución en aspectos moleculares y celulares ligados a su función, es que se planteó la generación de variantes constitutivamente activas para los miembros más representativos del grupo seleccionado, en las cuales se prescindiría de los dominios reguladores pero se mantendrían intactos los dominios DH y PH de cada una de estas proteínas, puesto que ambos dominios son esenciales para la actividad de GEFs.



**Figura 7.** Resumen de la estrategia experimental propuesta para la generación de variantes constitutivamente activas de los RhoGEFs representativos del grupo seleccionado. A partir de la secuencia de ADN que codifica para el GEF completo y con ayuda de primers específicos se

amplifica la secuencia correspondiente a los dominios DH-PH, el producto de la amplificación es digerido y purificado para posteriormente ser ligado al vector pCEFL-EGFP-CAAX a fin de obtener colonias de bacterias que tengan la construcción pCEFL-EGFP-X-RhoGEF-DHPH-CAAX, es decir, únicamente los dominios DH-PH fusionados a la proteína verde fluorescente (EGFP) y a la caja CAAX.

Entonces, a partir de la amplificación de los dominios DH-PH y su clonación en el vector de expresión pCEFL-EGFP-CAAX sería posible expresar en células de mamíferos las construcciones EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX, que por medio de la isoprenilación, resultado de la presencia de la caja CAAX, se anclarían a la membrana celular y que los dominios DH-PH serían suficientes para promover el intercambio de GDP por GTP en las GTPasas (Figura 7).

### 5.2.1 Diseño de primers

>AKAP13-VARIANTE1-DH-V1996-5'BamHI ataGGATCCGGTCAAAOG GCAAGAAGTA >AKAP13-VARIANTE1-PH-I2347-3'NheI ataGCTAGCAATTCCTTCATCT TCATCTCT	>ARHGEF1-DH-K394-5'NheI ataGCTAGCAAGOCAGGT GAAGCGGCAG >ARHGEF1-PH-V746-3'EcoRI ataGAATTCGACITTCAGGGA TCCGGCAGT	>ARHGEF2-VARIANTE1-DH-A213-5'NheI ataGCTAGCAGCTGACTCT TGGAGTCTT >ARHGEF2-VARIANTE1-PH-F579-3'EcoRI ataGAATTCGAAGTCTOCT GGATGGCA	>ARHGEF3-VARIANTE1-DH-S126-5'NheI ataGCTAGCTCGAGCAOGAAA CGGAGAGAT >ARHGEF3-VARIANTE1-PH-N501-3'EcoRI ataGAATTCGATTTGAACGAT CCCTCGGA
>ARHGEF5-DH-V1158-5'BamHI ataGGATCCGGTGGCGCAA CAGCACCGTG >ARHGEF5-PH-S1512-3'EcoRI ataGAATTCGGAGTTGTAACA CTOCAAGG	>ARHGEF11-VARIANTE2-DH-D752-5'BamHI ataGGATCCGATGCCAAAAT TGGCAGCAT >ARHGEF11-VARIANTE2-PH-H1124-3'EcoRI ataGAATTCGCTGCTGGTGGC ATTCCGCAC	>ARHGEF12-VARIANTE1-DH-C784-5'BamHI ataGGATCCGTGAAATCAA AGACAGGAA >ARHGEF12-VARIANTE1-PH-K1140-3'NdeI ataCATATGCTTTGTGGATTGC TCCITCAC	>ARHGEF15-VARIANTE2-DH-Q414-5'NheI ataGCTAGCCAGGAGAGGCG CATGCAGGAG >ARHGEF15-VARIANTE2-PH-G743-3'NdeI ataCAATTCGCCTGGGTTGG GAAGGCTCC
>ARHGEF16-DH-E268-5'BamHI ataGGATCCGAGGGTGTGGA ATTGGCATC >ARHGEF16-PH-L632-3'EcoRI ataGAATTCGAGTCTOCTTT GCTGGAGAG	>ARHGEF18-VARIANTE2-DH-A247-5'BamHI ataGGATCCGACGCTACGOC AAGAAGCAA >ARHGEF18-VARIANTE-PH-G606-3'EcoRI ataGAATTCOCCOCTOCTCTC GTCAGGGCA	>ARHGEF19-DH-D860-5'BamHI ataGGATCCGACGCTACGCGG CAGCGCGTC >ARHGEF19-PH-C717-3'EcoRI ataGAATTCGCAATCTOCCO CTCACTGAT	>ITSN1-VARIANTE1-DH-T1234-5'NheI ataGCTAGCACTGAAAAGAA CGACAAGGA >ITSN1-VARIANTE1-PH-K1609-3'EcoRI ataGAATTCCTTCAACTGATG CCTTCAAC
>ITSN2-VARIANTE-DH-I1206-5'NheI ataGCTAGCATTGAGAGAAA AGACAGGC >ITSN2-VARIANTE1-PH-K1585-3'EcoRI ataGAATTCITTTGAGGCTTTT AATTCGT	>NET1-VARIANTE1-DH-A148-5'NheI ataGCTAGCCCAAGAGAAG GAGCAGTGCA >NET1-VARIANTE1-PH-S508-3'NdeI ataCATATGACTGCCTGCCGA CTGGAAGGG	>NGEF-VARIANTE1-DH-E270-5'BamHI ataGGATCCGAGGAGATTAAG CTGACAGGAG >NGEF-VARIANTE1-PH-K603-3'EcoRI ataGAATTCGACAGTCCAGCAG CCGGGATGT	>PLEKHG5-VARIANTE6-DH-R369-5'BamHI ataGGATCCCGGGGCTGCG CTTCGACCAT >PLEKHG5-VARIANTE6-PH-E772-3'EcoRI ataGAATTCCTOCTGTGCAOG CAGCTGTTG
>PLEKHG6-VARIANTE1-DH-G151-5'BamHI ataGGATCCGGGCACAAGGA GATGACGAG >PLEKHG6-VARIANTE1-PH-S537-3'NdeI ataCATATCGGACTOCTGTG CTGGTCCOG	>RGNEF-ARHGEF28-VARIANTE1-DH-S838-5'NheI ataGCTAGCTCATTTTGAATA GGCAGGAG >RGNEF-ARHGEF28-VARIANTE1-PH-G1196-3'NdeI ataCATATGTCCOCCCTTTTCT TCAGGACA	>SGEF-ARHGEF26-VARIANTE2-DH-L414-5'BamHI ataGGATCCCTGAGATCCACA TGGAGOCOA >SGEF-ARHGEF26-VARIANTE2-PH-Q804-3'EcoRI ataGAATTCCTGCTTAGCAGT AAATGACCT	>ARHGEF39-DH-M15'NheI ataGCTAGCATGGAGCTCTOC TGOCCOGGT >ARHGEF39-PH-N1005-3'EcoRI ataGAATTCGTTTTTCTGGCT GCTGATAGC

**Tabla 1.** Primers diseñados para la amplificación de las regiones comprendidas por los dominios DH-PH de cada RhoGEF, esto como uno de los pasos en el proceso de generación de las variantes constitutivamente activas.

Uno de los primeros pasos en la generación de las variantes constitutivamente activas fue el diseño de primers que nos permitieran amplificar de manera específica las secuencias de los dominios DH y PH de cada RhoGEF. Se obtuvieron las secuencias codificantes para cada uno de los RhoGEFs, para lo cual se recurrió a bases de datos públicas como son <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> y <http://smart.embl-heidelberg.de/>, esto con el fin de obtener las secuencias mencionadas y definir las regiones codificantes para los dominios de interés, seguidamente se realizó el diseño de los primers con ayuda del programa BioEdit diseñado por *Tom Hall* de Ibis Bioscience. Los 20 pares de primers diseñados se muestran en la Tabla 1.

### **5.2.2 Amplificación de los dominios DH-PH**

Para la amplificación de las regiones de interés, los dominios DH-PH de cada RhoGEF, se recurrió a los primers diseñados y a plásmidos que contienen la secuencia de ADN específica del GEF, los cuales fueron proporcionados por diferentes grupos de investigación (Tabla 2). La mezcla de reacción para realizar la PCR es la que se indica en la Tabla 3.

Una vez que todos los componentes son colocados en tubos de PCR perfectamente identificados, se procede a introducir los tubos en el termociclador GeneAmp PCR System 9000, el cual es encendido con anticipación y programado de acuerdo al método requerido para la amplificación, que para este caso consistió en cuatro programas enlazados del software. El primero (programa 5) alcanza una temperatura de 94° C por 30 s; el segundo (programa 140) consta de 3 temperaturas: 94° C por 30 s, 54° C por 30 s y 75° C por 60 s, repitiendo el ciclo 25 veces; seguidamente (programa 139) una temperatura de 75° C por 5 minutos, para finalizar con una temperatura de 4° C por tiempo indefinido (programa 4).

<b>RhoGEF</b>	<b>Referencia</b>	<b>Instituto de procedencia</b>
ARHGEF3 (XPLN)	Krister Wennerberg J Biol Chem. 2002 Nov 8;277(45):42964-72. Epub 2002 Sep 6.	Department of Cell and Developmental Biology, Lineberger Comprehensive Cancer Center, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina 27599, USA.
ITSN2-L	Susana de la Luna Biochim Biophys Acta. 2001 Oct 31;1521(1- 3):1-11.	Down Syndrome Research Group, Medical and Molecular Genetics Center-IRO, Gran Via s/n Km 2.7, L'Hospitalet de Llobregat, 08907, Barcelona, Spain.
AKAP13 (AKAP-Lbc)	Dario Diviani Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jun 12;104(24):10140-5. Epub 2007 May 30.	Département de Pharmacologie et de Toxicologie, Faculté de Biologie et de Médecine, Université de Lausanne, Rue du Bugnon 27, 1005 Lausanne, Switzerland.
ARHGEF18 (p114-RhoGEF, KIAA0521)	Takuji Tanoue, J Cell Biol. 2011 Oct 17;195(2):245-61. doi: 10.1083/jcb.201104118.	Global Centers of Excellence Program for Integrative Membrane Biology, Graduate School of Medicine, Kobe University, Chuo-ku, Kobe 650- 0017, Japan.
ARHGEF5 (TIM)	John Sondek Biochemistry. 2008 Jul 1;47(26):6827-39. doi: 10.1021/bi702543p. Epub 2008 Jun 7.	Department of Pharmacology, Lineberger Comprehensive Cancer Center, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina 27599-7295, USA.
ARHGEF19 (WGEF)	Igor B. Dawid EMBO J. 2008 Feb 20;27(4):606-17. doi: 10.1038/emboj.2008.9. Epub 2008 Feb 7.	Laboratory of Molecular Genetics, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA.
ARHGEF16 (Ephexin-4)	Hironori Katoh FEBS Open Bio. 2013 Jan 21;3:78-82. doi: 10.1016/j.fob.2013.01.002. Print 2013.	Laboratory of Molecular Neurobiology, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Yoshidakonoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan.

**Tabla 2.** Referencia de los cDNA's de RhoGEFs proporcionados por diferentes grupos de investigación, a partir de los cuales se realizó la amplificación del dominio DH-PH.

Componente	Volumen ( $\mu$ l)
Cloruro de Magnesio (25 mM MgCl <sub>2</sub> ) de Invitrogen	4
Buffer 10X de Roche	5
Dimetil sulfóxido (DMSO) de SIGMA	2.5
Betaína de SIGMA	2.5
dNTPs Mix (10 mM) de Invitrogen	1
Primer 5'	2.5
Primer 3'	2.5
Oligo templado (10 ng/ $\mu$ l)	1
Enzima taq polimerasa (3.5 U/ $\mu$ l) de Roche	0.5
Agua	28.5

**Tabla 3.** Componentes y volúmenes utilizados para la reacción de PCR para amplificar los dominios DH-PH de cada RhoGEF.

### 5.2.3 Electroforesis en geles de agarosa

Para verificar que la amplificación del fragmento de cDNA de interés fue exitosa y no existieron problemas como contaminación o amplificación inespecífica, se recurrió a electroforesis en geles de agarosa. Para lo cual se siguieron los siguientes pasos:

- 1) Pesar 0.5 g de agarosa y agregar 50 ml de Buffer TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM Acetato y 2 mM EDTA), para generar un gel con dureza de 1%, la agarosa se disuelve en el buffer con ayuda del microondas.
- 2) Una vez que la agarosa se disuelva, la mezcla se deja enfriar hasta que no genere vapores, en ese punto agregar 2  $\mu$ l de bromuro de etidio, mezclar hasta incorporar por completo el bromuro de etidio, luego vaciar el contenido en un molde adecuado para la cámara de electroforesis colocando el peine para los pozos.

- 3) Cuando la agarosa al 1% esté gelificada por completo, retirar el peine y montar el gel con el molde en la cámara de electroforesis y agregar Buffer TAE 1X hasta cubrir los pozos del gel.
- 4) Con una micropipeta se toman 5  $\mu$ l del producto de PCR y se mezclan con 1  $\mu$ l de buffer de carga Clear Band de MTR Scientific, el volumen total es colocado en el pozo.
- 5) Después de cargar la última muestra, se toman 3  $\mu$ l de marcador GeneRuler 100 pb plus de Thermo Scientific con lo que se carga el primer pozo del gel.
- 6) Colocar la tapa de la cámara de electroforesis, conectar los cables correspondientes a la fuente de poder y encender para correr el gel a 70 mA por aproximadamente 30 minutos.
- 7) Concluido el tiempo o alcanzada la separación deseada, se apaga la fuente de poder, se retira el gel de la cámara de electroforesis para observar y tomar una fotografía con ayuda del transiluminador, con luz ultravioleta, esperando visualizar los fragmentos en los pesos esperados.

#### **5.2.4 Purificación de los fragmentos amplificados**

Una vez que es demostrada la amplificación del fragmento de interés, lo siguiente es proceder a la purificación del mismo, por lo cual se hace un nuevo gel de agarosa al 1% como se indica en el apartado anterior, con la diferencia de que se hace un gel con pozos con volumen suficiente para contener los 45  $\mu$ l de producto de PCR restante. Después de correr el gel y alcanzada la separación deseada se procede a los siguiente:

- 1) Cortar la banda del fragmento de interés, el cual es visualizado con ayuda del transiluminador, intentando eliminar la mayor cantidad posible de gel (utilizar guantes y una navaja exclusivos para geles con bromuro de etidio, exponer el menor tiempo posible a la UV el gel y limpiar con etanol al 70% el transiluminador y la navaja si se purifican fragmentos diferentes, para evitar alguna contaminación). El fragmento de gel

resultante es depositado en un tubo eppendorf de 1.5 ml (el cual se pesa previamente).

- 2) Determinar el peso del fragmento de gel, por lo que al peso total del tubo con el fragmento de gel se le resta el peso del tubo.
- 3) Procesar el fragmento de gel de acuerdo al protocolo de extracción de gel (QIAquick Gel Extraction Kit Protocol) contenido en el manual adjunto del kit de Qiagen, por lo que se agregan 3 volúmenes de Buffer QG por cada volumen de gel.
- 4) Incubar el gel con el buffer a 50° C por 10 minutos, haciendo uso cada 2 a 3 minutos durante la incubación, del agitador tipo vórtex para mezclar el contenido del tubo y facilitar la disolución del gel.
- 5) Una vez disuelto el gel en su totalidad, comprobar que el color de la mezcla sea amarillo, similar a la del Buffer QG. Si el color es amarillo, agregar un volumen de isopropanol por volumen de gel y mezclar.
- 6) Tomar una columna con tubo incluido en el kit y colocar en su totalidad la mezcla, centrifugar a 13 000 rpm por 1 minuto.
- 7) Eliminar el sobrenadante y agregar a la columna 0.5 ml de Buffer QG, centrifugar por un minuto a 13 000 rpm.
- 8) Descartar el sobrenadante y para lavar se agregan 0.75 ml de Buffer PE a la columna, centrifugar a 13 000 rpm por un minuto.
- 9) Eliminar nuevamente el sobrenadante y centrifugar un minuto adicional a 13 000 rpm.
- 10) Tomar un tubo eppendorf limpio donde se coloca la columna, se agregan 50 µl de agua estéril para eluir el ADN, dejar reposar por 5 minutos y centrifugar a 13 000 rpm por un minuto.
- 11) Por último, correr un gel de agarosa al 1% con los productos purificados para comprobar su correcta recuperación tras el proceso de purificación.

### **5.2.5 Digestión de los insertos y del vector pCEFL-EGFP-CAAX**

Posterior a la purificación del producto de PCR y comprobada la recuperación del ADN que comprende a las secuencias que codifica para los dominios DH-PH (insertos), lo siguiente es realizar la digestión de los insertos y del vector

(pCEFL-EGFP-CAAX), para lo cual se hace uso de diferentes enzimas de restricción que permiten cortar el ADN en regiones específicas y con esto generar extremos complementarios que permitan la ligación del inserto con el vector. La Tabla 4 indica las diferentes enzimas de restricción (Roche) empleadas de acuerdo al RhoGEF.

Una vez seleccionadas las enzimas de restricción para la digestión de cada fragmento dependiendo del RhoGEF, se procede a elegir el buffer de digestión que permita una buena eficiencia de digestión para ambas enzimas. En caso de no coincidir un buffer adecuado para una buena eficiencia de corte para ambas enzimas, se realiza la digestión secuencial, primero con una de las enzimas y posteriormente con la segunda. En un tubo eppendorf de 1.5 ml se mezclan los componentes en los volúmenes indicados en la Tabla 5. El tubo con los componentes mezclados se incuba a 37° C por 12-16 horas.

RhoGEF	Enzimas de Restricción	RhoGEF	Enzimas de Restricción
PLEKHG5	5' BamHI 3' EcoRI	ARHGEF11	5' BamHI 3' EcoRI
ARHGEF15	5' NheI 3' NdeI	ARHGEF18	5' BamHI 3' EcoRI
ARHGEF5	5' BamHI 3' EcoRI	AKAP13	5' BamHI 3' NheI
ARHGEF19	5' BamHI 3' EcoRI	ARHGEF2	5' NheI 3' EcoRI
ARHGEF16	5' BamHI 3' EcoRI	ITSN2	5' NheI 3' EcoRI
ARHGEF1	5' NheI 3' EcoRI	ARHGEF3	5' NheI 3' EcoRI

**Tabla 4.** Enzimas de restricción empleadas para digerir los diferentes fragmentos de DNA correspondientes a la secuencia que codifica para los dominios DH-PH de cada uno de los RhoGEFs indicados, con la finalidad de generar extremos complementarios entre vector y cada uno de los fragmentos a insertar, permitiendo con esto la ligación de ambos. BamHI (Roche, N° Catálogo 13467124), EcoRI (Roche, N° Catálogo 13467720), NheI (Roche, N° Catálogo 11126023) y NdeI (Roche, N° Catálogo 11315721).

<b>Componente</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>l)</b>
Buffer Digestión 10 X	2
Agua estéril	1
ADN dominios DH-PH ó vector pCEFL-EGFP-CAAX	16
Enzima restricción 5' (10 U/ $\mu$ l)	0.5
Enzima restricción 3' (10 U/ $\mu$ l)	0.5
<b>Volumen total</b>	<b>20</b>

**Tabla 5.** Componentes de la digestión de los insertos de los dominios DH-PH.

### 5.2.6 Purificación de los insertos y vector digeridos

Para la purificación de los insertos y vector digeridos se recurrió al kit QIAquick PCR Purification de Qiagen, siguiendo el protocolo de purificación de productos de PCR descrito en el manual adjunto del kit, el cual permite la purificación de ADN de 70 pb a 10 kb. Los pasos son los siguientes:

- 1) Una vez concluida la digestión, adicionar 5 volúmenes de Buffer PB por volumen de mezcla de digestión y mezclar.
- 2) Tomar una columna QIAquick junto con el tubo incluido y colocar el volumen total de la muestra, para luego centrifugar a 13 000 rpm por un minuto.
- 3) Eliminar el sobrenadante y adicionar a la columna 0.75 ml de buffer PE, centrifugar a 13 000 rpm por un minuto.
- 4) Decantar el sobrenadante y centrifugar nuevamente a 13 000 rpm por un minuto.
- 5) Tomar la columna y colocarla en un tubo eppendorf previamente marcado. Adicionar a la columna 50  $\mu$ l de agua estéril, dejar reposar 5 minutos y centrifugar a 13 000 rpm por un minuto.
- 6) Finalmente, correr un gel de agarosa al 1% con los productos purificados para comprobar su correcta recuperación tras el proceso de purificación.

### 5.2.7 Ligación

Tras la purificación de insertos y vector digeridos, lo siguiente es generar la unión de dos fragmentos de ADN (inserto y vector) a través de la formación de un enlace fosfodiéster, reacción catalizada por la enzima ligasa. Para la ligación se mezclan en un tubo eppendorf de 0.5 ml los componentes indicados en la Tabla 6, considerando de manera importante mantener una proporción mayor del inserto con respecto al vector (aproximadamente 20:1), por lo que el vector puede ser diluido en agua estéril.

Cuando todos los componentes se encuentran mezclados en el tubo, se procede a colocar los mismos en el termociclador GeneAmp PCR System 9000, seleccionando el programa 1, descendiendo a una temperatura de 16 °C por 12 h con lo que se favorece la reacción de ligación.

Componente	Volumen (µl)
Inserto	16
Vector pCEFL-EGFP-CAAX	1
Buffer de ligación 10X	2
ADN ligasa (T4 de Roche)	1
<b>Volumen total</b>	<b>20</b>

Tabla 6. Componentes de la mezcla para la ligación

### 5.2.8 Transformación de bacterias DH5α ultracompetentes y obtención de ADN plasmídico.

El producto de ligación es introducido en bacterias ultracompetentes *E. coli* DH5α con la finalidad de producir una cantidad mayor de ADN y evaluar si la ligación de inserto con vector fue eficaz. Para este procedimiento se prepararon bacterias con una eficiencia de transformación de 10<sup>8</sup> ufc/µg (unidades formadoras de colonias por µg). El proceso de transformación de las bacterias fue el siguiente:

- 1) Descongelar la bacterias (almacenadas en nitrógeno líquido) en hielo por aproximadamente 10 minutos, pasado el tiempo adicionar 60 µl de

Buffer TB por cada 200  $\mu$ l de bacterias, mezclar e incubar por 10 minutos, esto con el fin de aumentar la eficiencia de transformación.

- 2) En tubos eppendorf de 1.5 ml, previamente marcados para cada ligación, alicuotar 50  $\mu$ l de bacterias.
- 3) Adicionar 2  $\mu$ l de ligación al tubo con bacterias correspondiente e incubar en hielo por 20 minutos.
- 4) Dar un choque térmico a 42° C por un minuto.
- 5) Inmediatamente al choque térmico, incubar nuevamente en hielo por 10 minutos.
- 6) Finalizado el tiempo de incubación en hielo, agregar 300  $\mu$ l de medio S.O.C. (medio LB + glucosa) e incubar los tubos en agitación constante (200 rpm) a 37° C por una hora.
- 7) Centrifugar a 3 000 rpm por un minuto los tubos una vez concluido el tiempo de incubación.
- 8) Decantar el sobrenadante y resuspender las bacterias con 50  $\mu$ l de medio líquido súper broth con ampicilina.
- 9) Tomar el volumen total contenido en el tubo y depositar sobre la superficie de placas de cultivo (super broth con ampicilina), con ayuda de perlas de vidrio estériles distribuir homogéneamente las bacterias sobre toda la superficie del agar.
- 10) Incubar las placas de cultivo a 37° C toda la noche (aproximadamente 18 horas).
- 11) Transcurrido el tiempo de incubación, observar si existe crecimiento de colonias, seleccionar una o hasta 5 dependiendo del número de colonias que hayan crecido.
- 12) Picar las colonias seleccionadas con ayuda de asas bacteriológicas estériles y sembrar cada colonia en medio líquido super broth con ampicilina contenido en tubos estériles de 15 ml.
- 13) Incubar los tubos con agitación constante (200 rpm) a 37° C por 12 horas.
- 14) Los tubos con los cultivos son centrifugados a 2 500 rpm por 5 minutos, para posteriormente decantar el sobrenadante.

- 15) Con ayuda del kit QIAGEN QIAprep spin Miniprep de SIGMA se realiza la extracción de ADN de naturaleza plasmídica del cultivo bacteriano.
- 16) Una vez obtenido el ADN plasmídico es necesario determinar la concentración del mismo, por lo cual se requiere realizar una dilución 1:50 (2  $\mu\text{l}$  de la muestra y 98  $\mu\text{l}$  de agua estéril), con ayuda de un espectrofotómetro Beckman que mide la absorción de luz ultravioleta (280 nm) se determina la concentración de ADN.

### 5.2.9 Digestión diagnóstica de la ligación

Tras obtener el ADN plasmídico de los cultivos de bacterias es necesario realizar una digestión diagnóstica para determinar si alguna(s) colonia(s) de bacterias incorporaron vector con inserto ligado, para lo cual un volumen del producto de miniprep es puesto a digerir con la enzima de restricción XhoI (Roche), en los casos donde se encuentre vector vacío (sin inserto) la digestión con XhoI genera dos fragmentos, uno de 1014 pb y otro de 5745 pb; en caso contrario, donde el vector contenga el inserto se observa un cambio en cuanto al peso en el fragmento de 1014 pb, obteniendo un fragmento con peso superior a 2000 pb para la mayoría de los RhoGEFs o fragmentos de menor peso debido a la presencia de sitios de corte de XhoI en la secuencia de ADN que comprende los dominios DH-PH.

Componente	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
Buffer Digestión 10 X	1.5
ADN plasmídico (100-500 ng/ $\mu\text{l}$ )	13
Enzima restricción XhoI (10 U/ $\mu\text{l}$ )	0.5
<b>Volumen total</b>	<b>15</b>

**Tabla 7.** Componentes de la digestión diagnóstica del ADN plasmídico para confirmar si la ligación de vector e inserto ocurrió. XhoI (Roche, N° Catálogo 14797322)

Para la digestión diagnóstica en un tubo eppendorf de 1.5 ml se mezclan los componentes indicados en la Tabla 7, incubando a 37° C de 4 a 12 horas. Concluido el tiempo de incubación, el producto de digestión es corrido en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio, visualizando el gel con el transiluminador para conocer si los fragmentos liberados corresponde con la ligación del inserto con el vector.

### **5.3 ASPECTOS MOLECULARES Y CELULARES LIGADOS A LA ACTIVACIÓN DE GTPASAS DE LA FAMILIA DE RHO**

Tras la generación de variantes constitutivamente activas de los miembros más representativos del grupo seleccionado de RhoGEFs, lo siguiente que se propuso fue confirmar que las construcciones fueran capaces de expresarse y posteriormente monitorear su participación en la activación de las GTPasas Cdc42, Rac1 y RhoA . Junto con lo anterior, se decidió determinar los cambios en la dinámica del citoesqueleto de actina y morfología celular como resultado de la presencia de las variantes constitutivamente activas y su acción sobre las GTPasas. Con este tamizaje, a partir de la ganancia de función, se pretende identificar RhoGEFs que muestren actividad interesante en las vías de señalización promotoras de migración y angiogénesis.

#### **5.3.1 Cultivo celular: Células HEK293T**

La línea celular HEK293T fue elegida para evaluar la expresión de las construcciones, realizar ensayos de activación de GTPasas y captura de GEFs activos (14). Las células son cultivadas en cajas Petri de 100 mm de diámetro con medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> y temperatura de 37° C. El procedimiento para mantener el cultivo celular es el siguiente:

- 1) Retirar el medio DMEM de las células HEK293T.
- 2) Lavar la caja con PBS1X (Buffer salino de fosfatos).
- 3) Agregar 1 ml de tripsina-EDTA 1X (SIGMA, 0.5 g de tripsina y 0.2 g de EDTA en 100 ml). Dejar actuar la tripsina por 3 minutos en la incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C.

- 4) Neutralizar la tripsina con 9 ml de medio DMEM suplementado con 10% de SFB, resuspendiendo hasta separar los agregados celulares. Puede utilizarse menos medio dependiendo del número de cajas a sembrar, aunque la fracción de células sembradas deberá ser equivalente.
- 5) Las cajas de 100 mm utilizadas para transfectar son previamente tratadas con Poly-D-Lisina por 10 minutos y luego sembradas con 1.5 ml de la suspensión celular más 8.5 ml de medio DMEM suplementado con 10% de SFB. El stock se mantiene resemebrando las células con una dilución 1/10.

### **5.3.2 Transfección celular**

Las construcciones obtenidas son transfectadas a células HEK293T por el método de Lipofectamina-PLUS, para lo cual se lleva a cabo el siguiente procedimiento:

- 1) Preparar reactivo PLUS en un tubo de polipropileno dependiendo del número de cajas. Tomando 0.75 ml de medio DMEM sin suero más 10  $\mu$ l de PLUS por caja. Si hay algún ADN común para todas las cajas agregarlo en este punto. Agitar e incubar 15 minutos.
- 2) Preparar el reactivo lipofectamina en un tubo de polipropileno dependiendo del número de cajas. Mezclar 0.75 ml de medio DMEM sin suero más 12  $\mu$ l lipofectamina por caja. Agitar e incubar 15 minutos.
- 3) Alicuotar el medio que contiene PLUS, 760  $\mu$ l por tubo. Adicionar un máximo de 4  $\mu$ g de ADN por tubo. Agitar e incubar 15 minutos.
- 4) Agregar 762  $\mu$ l de la solución de lipofectamina a los tubos con PLUS y ADN. Agitar e incubar 15 minutos.
- 5) Preparar células. Marcar las cajas en la parte inferior, lavar con 3 ml de PBS 1X, retirar y agregar 5 ml de medio DMEM sin suero y sin antibióticos.
- 6) Agregar por decantación la mezcla de ADN, lipofectamina y PLUS a cada caja. Incubar con 5% CO<sub>2</sub> a 37° C por 5 horas.

- 7) Pasado ese tiempo, retirar la mezcla de transfección y agregar 10 ml de medio DMEM suplementado con 10% de SFB, incubar en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37° C. Las células son procesadas 48 horas después de la transfección.

### **5.3.3 Expresión de las construcciones EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX y activación de las GTPasas Cdc42, Rac1 y RhoA en células HEK293T**

Dos días después de la transfección de las diferentes construcciones a células HEK293T es que se procede a la lisis con la finalidad de evaluar la expresión de los EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX, así como su capacidad de activar GTPasas de la familia de Rho, concretamente Cdc42, Rac1 y RhoA. Para cada construcción se contemplan 3 cajas control transfectando el vector pCEFL-EGFP-CAAX, por lo que sólo expresan la proteína verde fluorescente isoprenilada (EGFP-CAAX); una cuarta caja es transfectada con la construcción EGFP-X-RhoGEF-DHPH-CAAX, con lo que las células expresan los dominios DH-PH del RhoGEF fusionado en su extremo N-terminal a EGFP y su extremo C-terminal isoprenilado. Para la lisis celular, expresión de proteína y ensayo de activación de GTPasas se contempla el siguiente procedimiento:

- 1) Colocar las cajas sobre hielo, retirar el medio y lavar con 2 ml de PBS 1X frío.
- 2) Agregar 1 ml de buffer de lisis Tritón 1X con inhibidores de proteasas (el buffer de lisis debe estar frío) y dejar reposar por 5 minutos.
- 3) Con ayuda de un gendarme raspar la superficie de las cajas, seguidamente resuspender el lisado y transferir a tubos eppendorf de 1.5 ml previamente marcados, centrifugar a 13 000 rpm por 5 minutos a 4° C.
- 4) Tomar 75 µl del sobrenadante y transferir a un tubo marcados como LT.
- 5) Dividir el sobrenadante restante en una serie de 3 tubos perfectamente identificados, de los cuales dos contienen 40 µl de una suspensión de perlas de GST-PAKN cada uno y el tercer tubo 40 µl de una suspensión de perlas de GST-Rotekina. Una vez depositado el sobrenadante en los

diferentes tubos con las perlas, estos son puestos a incubación en hielo con agitación constante y vigorosa por 45 minutos.

- 6) Finalizado el tiempo de incubación centrifugar los tubos a 6 000 rpm por 2 minutos a 4° C, el sobrenadante de los 3 tubos es recuperado para nuevamente ser dividido en 3 tubos, cada nuevo tubo contiene 40 µl de GST-Cdc42 G15A, GST-Rac1 G15A ó GST-RhoA G17A (GTPasas mutantes libres de nucleótido fusionadas a esferas de GST) (14). Los tubos son incubados en hielo con agitación constante y vigorosa por 45 minutos.
- 7) Durante el tiempo de incubación de la segunda serie de 3 tubos, proceder a realizar el lavado de las perlas de la primer serie de 3 tubos, resuspendiendo con 1 ml de buffer de lisis frío, centrifugando a 6 000 rpm por 2 minutos a 4° C y retirando el sobrenadante, repitiendo otras dos veces el paso descrito.
- 8) Finalizado el tiempo de incubación de la segunda serie de 3 tubos, centrifugar a 6 000 rpm por 2 minutos, eliminar el sobrenadante y proceder a realizar el lavado de las perlas con 1 ml de buffer de lisis frío, centrifugando nuevamente a 6 000 rpm por 2 minutos a 4° C y retirando el sobrenadante, repitiendo otras dos veces el paso descrito.
- 9) A los tubos marcados como LT se adiciona 25 µl de buffer de muestra Laemmli 4X con β-mercaptoetanol, mientras que a las dos series de 3 tubos se les adiciona a cada uno 35 µl de buffer de muestra Laemmli 1X con β-mercaptoetanol. Por último todos los tubos con muestras son hervidos por 5 minutos y centrifugados a 13 000 rpm por 5 minutos, en este punto las muestras pueden ser corridas en geles de poliacrilamida ese mismo día o congeladas a -20° C para su posterior procesamiento.

#### **5.3.4 Western Blot**

Las muestras obtenidas de la lisis de células HEK293T transfectadas son corridas en geles de poliacrilamida, transferidas a una membrana y finalmente reveladas para determinar la expresión de la proteína, esto de acuerdo al procedimiento siguiente:

- 1) Correr geles de poliacrilamida al 12% a 100 mV para todas las muestras.
- 2) Una vez que el gel haya corrido, transferir a Immobilon P Millipore, 2 horas 30 minutos a 320 mA.
- 3) Finalizado el tiempo de transferencia, tomar la membrana y lavar rápidamente con agua desionizada, agregar TBS-Tween 0.05% y lavar con agitación constante por 5 minutos.
- 4) Bloquear la membrana con leche sin grasa al 5% en TBS-Tween 0.05%, manteniendo en agitación constante por 1 hora.
- 5) Eliminar la leche y lavar rápidamente con TBS-Tween 0.05%, seguidamente realizar 3 lavados de 5 minutos con TBS-Tween 0.05% en agitación constante.
- 6) Agregar anticuerpo primario contra Cdc42 (Santa Cruz, SC-87) a una dilución de 1:10 000, Rac1 (Santa Cruz, SC-217) 1:30 000 y RhoA (Santa Cruz, SC-418) 1:20 000 para detectar la activación de GTPasas así como los lisados totales de cada una; para detectar la expresión de las construcciones agregar anticuerpo primario contra EGFP (Santa Cruz, SC-9996) a una dilución de 1:30 000. En todos los casos el anticuerpo primario se diluye en TBS-Tween 0.05%, incubando las membranas por 12 horas a 4° C.
- 7) Concluido el tiempo de incubación, recuperar el anticuerpo primario y lavar las membranas 3 veces con TBS-Tween 0.05% por 5 minutos y agitación constante para cada uno de los lavados.
- 8) Agregar anticuerpo anti-ratón diluido 1:10 000 para Cdc42, 1:20 000 para RhoA y 1:30 000 tanto para Rac1 como para EGFP. El anticuerpo secundario es diluido en leche sin grasa al 5% en TBS-Tween 0.05%. Incubar por 1 hora a temperatura ambiente.
- 9) Retirar el anticuerpo secundario, lavar rápidamente con TBS-Tween 0.05%, seguidamente realizar 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-Tween 0.05%. Mantener las membranas en TBS 1X sin tween.

### **5.3.5 Revelado**

- 1) Realizar una dilución 1:1 (vol/vol) de sustrato luminol y solución peroxidada de Immobilon Western Milipore, mezclar y bañar la membrana por 1 minuto con ayuda de una micropipeta de 1 ml.
- 2) Eliminar el exceso de mezcla de la membrana, cubrir con película plástica y colocar en un cassette para autoradiografía.
- 3) Tomar una placa para rayos X (Agfa-Gevaert) y exponer a diferentes tiempos iniciando por contacto (colocar y retirar inmediatamente la placa), 5 s, 15 s, 30 s, 1 minuto y 2 minutos.
- 4) Revelar la placa usando las mezclas para esto (revelador y fijador).
- 5) Dejar secar las placas reveladas y marcar los pesos de acuerdo al marcador de peso en kDa.

### **5.3.6 Microscopia de fluorescencia: Monitoreo de la expresión y localización de los EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX**

Además de determinar la expresión de las construcciones por medio de Western Blot, también se decidió evaluar la expresión mediante microscopía de fluorescencia, teniendo esa posibilidad gracias a que las construcciones llevan fusionada la proteína verde fluorescente (EGFP). Por el método de lipofectamina-PLUS fueron transfectadas células HEK293T con los diferentes EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX así como con vector vacío como control. Después de 48 horas de la transfección las células fueron observadas con ayuda del microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-E para comprobar si la transfección fue eficiente y por lo tanto proceder a fijar las células en cajas de cultivo celular de 60 mm con fondo de vidrio, con la finalidad de poder observarlas con el objetivo de 60X. Las células fueron fijadas con el siguiente procedimiento:

- 1) A partir de cajas de 6 pozos, eliminar el medio de DMEM, lavar con PBS 1X y agregar 300  $\mu$ l de tripsina-EDTA 1X a cada pozo, incubar por 2 minutos en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37° C.
- 2) Inactivar la tripsina con 700  $\mu$ l de medio DMEM suplementado con 10% de SFB y resuspender hasta eliminar los agregados celulares.

- 3) En cajas de cultivo celular de 60 mm con fondo de vidrio, previamente tratadas con gelatina de piel de bovino tipo B de SIGMA, sembrar de 20 a 40  $\mu$ l de la suspensión celular.
- 4) Las cajas recién sembradas se incuban en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37° C de 3 a 6.
- 5) Eliminar el medio DMEM y lavar con PBS 1X, seguidamente agregar paraformaldehído al 4% (un volumen que cubra la superficie de la caja) e incubar por 20 minutos.
- 6) Retirar el paraformaldehído y realizar 2 lavados con PBS 1X, por último agregar 1 ml de PBS 1X. En este punto las células pueden ser observadas al microscopio de fluorescencia con el objetivo de 60X o bien ser almacenadas hasta en un período de 4 días mientras se resguarden las cajas a 4° C. La fluorescencia verde es observada con el filtro de 488 nm.

### **5.3.7 Morfología celular: Tinción del citoesqueleto de actina**

Aunque con células HEK293T es posible monitorear la expresión de los EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX, por diversas razones no es considerada como la línea celular más adecuada para observar cambios en la morfología celular. Por tanto, se propuso la transfección de células endoteliales de aorta porcina (PAE) como el modelo adecuado para evaluar la capacidad de los EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX para promover una reorganización del citoesqueleto de actina acompañado de cambios en la morfología celular.

#### **5.3.7.1 Cultivo celular: Células PAE**

Las células PAE se cultivan en cajas petri de 100 mm de diámetro con medio DMEM suplementado con 10% de SFB en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C. El procedimiento para mantener el cultivo celular es el siguiente:

- 1) Retirar el medio DMEM de las células PAE.
- 2) Lavar la caja con PBS 1X.
- 3) Agregar 1 ml de tripsina-EDTA 1X (SIGMA, 0.5 g de tripsina y 0.2 g de EDTA en 100 ml). Dejar actuar la tripsina por 3 minutos en la incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C.

- 4) Neutralizar la tripsina con 9 ml de medio DMEM suplementado con 10% de SFB, resuspendiendo hasta separar los agregados celulares.
- 5) Las cajas de 100 mm utilizadas para transfectar son previamente tratadas con Poly-D-Lisina por 10 minutos y luego sembradas con 1.5 ml de la suspensión celular más 8.5 ml de medio DMEM suplementado con 10% de SFB. El stock se mantiene resemebrando las células con una dilución 1/10.

### **5.3.7.2 Transfección celular**

Las células PAE son transfectadas por el método de Polyfect con el siguiente procedimiento:

- 1) Preparar Polyfect en un tubo de polipropileno dependiendo del número de cajas, requiriendo 100  $\mu$ l de medio DMEM sin suero y 10  $\mu$ l de reactivo Polyfect por pozo de cajas de 6 pozos.
- 2) Marcar tubos, transferir 110  $\mu$ l de la mezcla DMEM con Polyfect, adicionar el ADN correspondiente (1.5  $\mu$ g como máximo), mezclar e incubar 10 minutos.
- 3) Preparar células. Lavar con PBS 1X, agregar 1.5 ml de medio DMEM suplementado con 10% de SFB.
- 4) Después de concluido el tiempo de incubación de la mezcla de DMEM con Polyfect y ADN. Añadir 0.6 ml de medio DMEM con 10% SFB al tubo, mezclar y decantar en la caja.
- 5) Incubar las cajas a 37° C en un ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>. Procesar 48 horas después de la transfección.

### **5.3.7.3 Tinción celular**

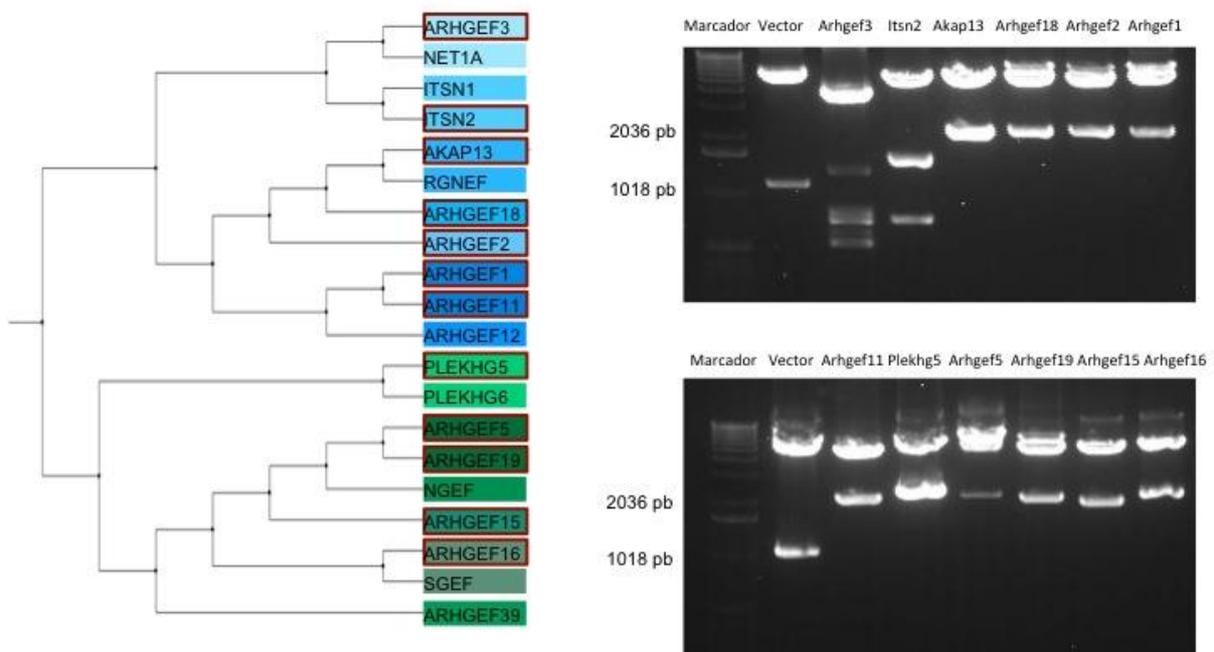
Tras 48 horas de la transfección de las células PAE, éstas son observadas al microscopio de fluorescencia para confirmar una transfección eficiente, posteriormente las células son fijadas y teñidas en cajas de cultivo celular de 60 mm con fondo de vidrio, para poder ser observadas con el objetivo de 60X. El procedimiento seguido es el siguiente:

- 1) A partir de cajas de 6 pozos, eliminar el medio de DMEM, lavar con PBS 1X y agregar 300  $\mu$ l de tripsina-EDTA 1X a cada pozo, incubar por 2 minutos en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37° C.
- 2) Inactivar la tripsina con 700  $\mu$ l de medio DMEM suplementado con 10% de SFB y resuspender hasta eliminar los agregados celulares.
- 3) En cajas de cultivo celular de 60 mm con fondo de vidrio, previamente tratadas con gelatina de piel de bovino tipo B de SIGMA, sembrar de 20 a 40  $\mu$ l de la suspensión celular.
- 4) Incubar en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37° C de 12 horas las cajas recién sembradas.
- 5) Eliminar el medio DMEM y lavar con PBS 1X, seguidamente agregar paraformaldehído al 4% (un volumen que cubra la superficie de la caja) e incubar por 20 minutos.
- 6) Retirar el paraformaldehído y realizar 2 lavados con PBS 1X.
- 7) Permeabilizar con PBS-Tritón 0.5% e incubar 10 minutos.
- 8) Lavar 3 veces con PBS-Tritón 0.1% (cada lavado con duración de 1 minuto).
- 9) Bloquear con PBS-Tritón 0.1% + BSA 2% filtrado. Incubar 10 minutos.
- 10) Lavar 2 veces con PBS-Tritón 0.1%
- 11) Teñir con faloidina e incubar 20 minutos (a partir de este punto mantener cubiertas con papel aluminio las cajas trabajando con la menos cantidad de luz posible).
- 12) Lavar 2-3 veces con PBS-Tritón 0.1%
- 13) Para la tinción del núcleo agregar DAPI e incubar un minuto.
- 14) Lavar 2-3 veces con PBS-Tritón 0.1%
- 15) Agregar 1.5 ml de PBS 1X y mantener las cajas a 4° C cubiertas con papel aluminio hasta el momento de observarlas al microscopio de fluorescencia, se cuenta con 4 días para observar las cajas.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Generación de los EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX

De los 20 RhoGEFs que componen el grupo seleccionado, se generaron 12 construcciones EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX, confirmando la obtención de dichas construcciones primero con ayuda de la digestión diagnóstica con la enzima XhoI del ADN plasmídico obtenido de las colonias que se obtuvieron al transformar bacterias DH5 $\alpha$  ultracompetentes (Figura 8). Los RhoGEFs para los cuales se consiguió generar variantes constitutivamente activas representan en buena medida al grupo seleccionado.



**Figura 8.** EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX. Las construcciones obtenidas son de aquellos miembros indicados en rojo, a la derecha del árbol filogenético se muestran los geles de agarosa donde se observan los fragmentos generados por el corte de la enzima XhoI en el ADN plasmídico. El vector pCEFL-EGFP-CAAX sin inserto genera un fragmento de aproximadamente 1014 pb y otro de 5745 pb debido a la presencia de dos sitios de corte de la enzima. En el caso de que el vector haya ligado con el inserto (dominios DH-PH) se genera un fragmento mayor a 2000 pb, ya que es resultado de la suma de los 1014 pb del vector más los correspondientes al inserto DH-PH que en todos los casos es cercano a 1000 pb. Para el caso de la ITSN2 DHPH y ARHGEF3 DHPH se genera un patrón de corte diferente con fragmentos menores a 2000 pb debido a la presencia de sitios de corte reconocidos por XhoI que se localizan en la secuencia del DH-PH.

## **6.2 Caracterización de los EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX**

Tras la obtención de los EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX, se realizó la transfección a células HEK293T, en esta línea celular se decidió evaluar la expresión a nivel de proteína de las construcciones, además de realizar ensayos de activación de GTPasas y captura de GEF activo, lo anterior para determinar la capacidad de expresión y activación de GTPasas de cada una de las construcciones. Además, ya que los dominios DH-PH expresados en las células llevan fusionada la EGFP, fue posible monitorear la expresión y localización de las construcciones con ayuda del microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-E.

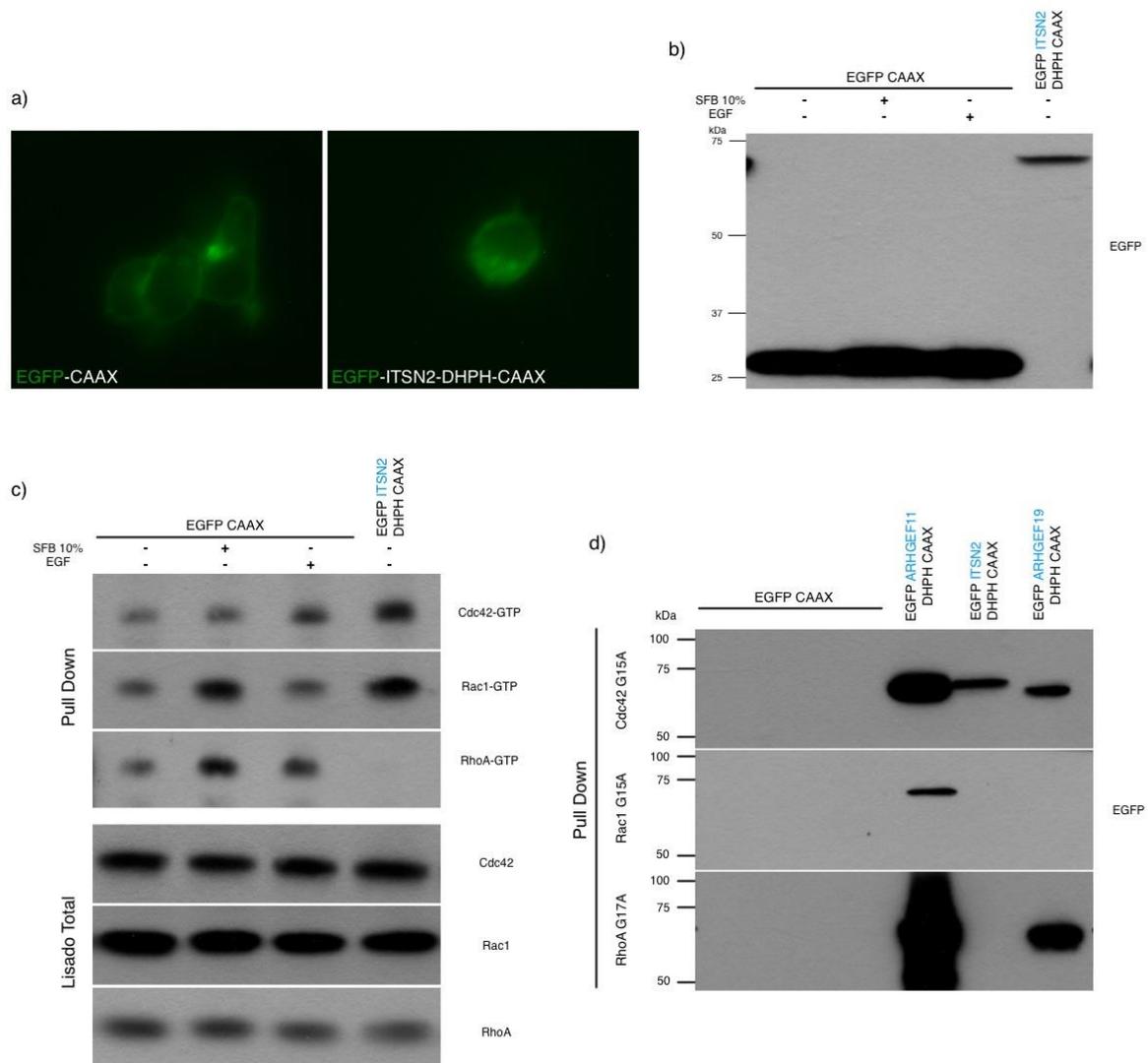
### **6.2.1 EGFP-ITSN2-DHPH-CAAX**

Las intersectinas (ITSN) son proteínas multidominios que se expresan en dos variantes de splicing: ITSN corta (ITSN-S) e ITSN larga (ITSN-L), siendo la variante larga la que presenta tres dominios adicionales a la variante corta, los cuales corresponden a un dominio de homología Dbl (DH), dominio de homología a Pleckstrina (PH) y un dominio C2, localizados en tándem en la región del extremo carboxilo. La presencia del dominio DH y el PH confiere a esta variante larga la actividad de factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF), controlando la activación de la GTPasa Cdc42, pero no la de Rac1 o RhoA. En mamíferos, la variante ITSN-L se expresa en dos isoformas, ITSN1-L expresada diferencialmente en cerebro e ITSN2-L expresada de manera ubicua (15). Como proteínas adaptadoras o andamiaje (scaffold) son reguladoras de múltiples procesos celulares como son proliferación, diferenciación, ciclo celular, sobrevivencia celular y migración. Pero como proteínas con actividad catalítica, hablando específicamente de su actividad como GEFs, se les ha atribuido una importante participación en el rearrreglo del citoesqueleto de actina como resultado de la activación de Cdc42 (16).

La Figura 9 resume los resultados obtenidos tras la transfección y expresión de EGFP-ITSN2-DHPH-CAAX en células HEK293T. La construcción se expresó adecuadamente y se localizó preferencialmente en la membrana celular, como resultado de la isoprenilación. Aunque las células HEK293T no son las más apropiadas para observar cambios morfológicos, fue posible observar variaciones en cuanto a la morfología que presentan células que

expresan únicamente la EGFP isoprenilada y aquellas en las que se expresa la construcción de los dominios DH-PH de ITSN2, incluso pudiendo apreciar extensiones de membrana que podrían coincidir con filopodios. Por western blot también se demostró la expresión de la construcción, observando una señal por debajo de 75 kDa que corresponde al peso pronosticado de 70 kDa (27 kDa EGFP + 43 kDa Dominios DHPH). Los ensayos de activación de GTPasas arrojaron los resultados esperados, teniendo un aumento de Cdc42-GTP en comparación de los controles y el basal sin estímulo. También se tuvo un aumento de Rac1-GTP, lo cual no es de sorprender dado el esquema general que señala que un aumento de la activación de Cdc42 puede llevar a un aumento en la activación de Rac1 y viceversa, caso contrario a RhoA, donde la activación de Cdc42 y Rac1 generarían una disminución de RhoA-GTP, siendo precisamente el resultado obtenido.

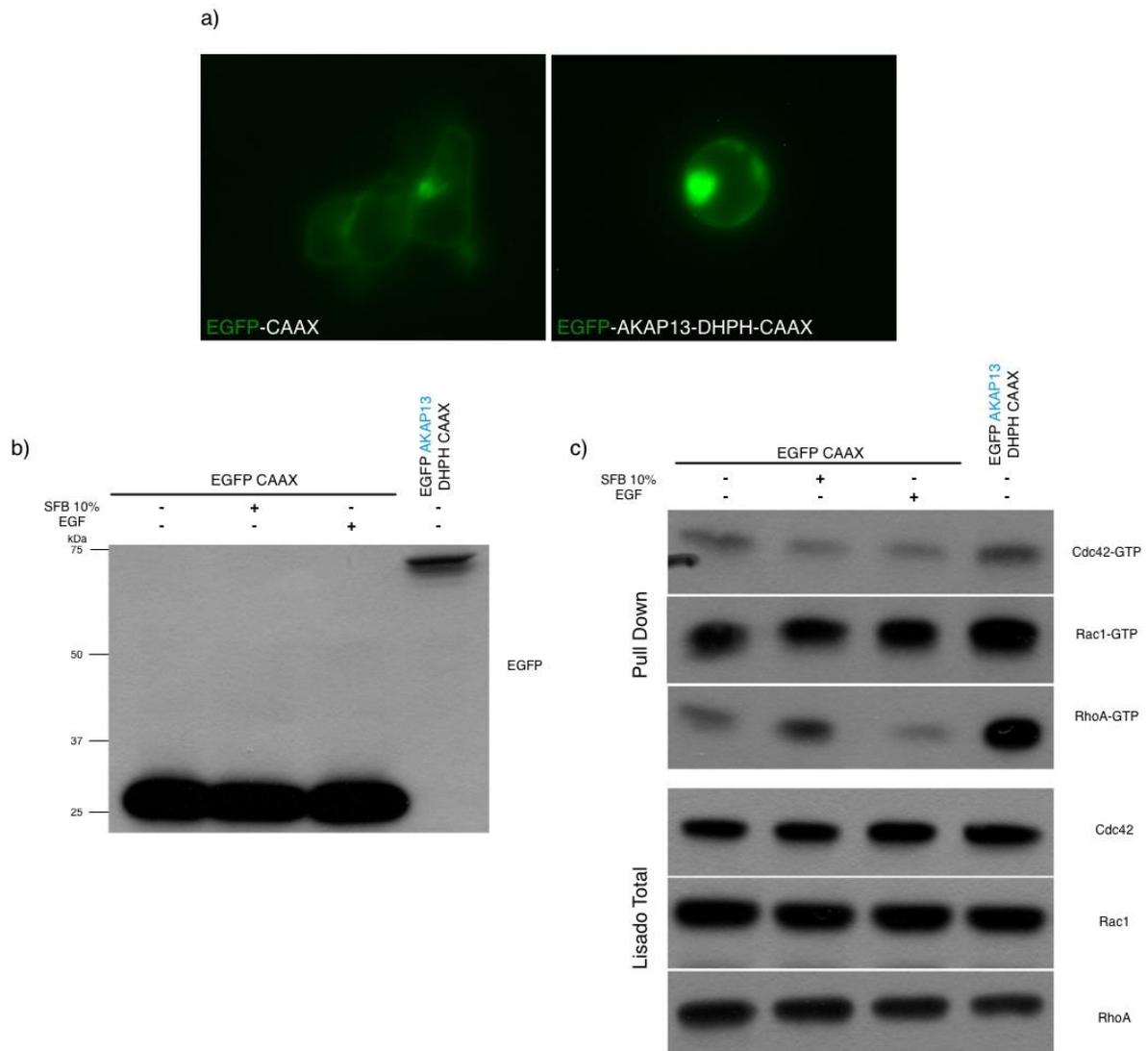
Con ayuda de GTPasas mutantes (incapaces de unir GDP o GTP) es que fue posible realizar ensayos de captura de GEF activo, con lo cual podemos por una parte confirmar la naturaleza constitutivamente activa de las construcciones, y por otra determinar si el aumento en los niveles de Cdc42-GTP y Rac1-GTP es resultado de una activación directa por interacción de EGFP-ITSN2-DHPH-CAAX con la GTPasa, o resultado de una activación en cascada. De acuerdo a la especificidad descrita de ITSN2 por Cdc42, no sorprende que únicamente Cdc42 G15A fuera capaz de precipitar la construcción; aunque se tuvo un aumento de Rac1-GTP, la activación posiblemente sea resultado de la señalización generada tras el aumento en la activación de Cdc42. En resumen, los resultados indican que la construcción EGFP-ITSN2-DHPH-CAAX se expresa eficazmente y es constitutivamente activa, capaz de estimular directamente la activación de Cdc42, y como consecuencia de esta activación, generar un aumento de Rac1-GTP y una disminución de RhoA-GTP.



**Figura 9. a)** EGFP-ITSN2-DHPH-CAAX se expresó como una proteína isoprenilada y anclada a la membrana de células HEK293T, promoviendo diferencias en la morfología celular en comparación con células que sólo expresan EGFP-CAAX. **b)** Por western blot también fue posible observar la expresión de la construcción en un peso por debajo de 75 kDa. **c)** Los ensayos de activación de GTPasas de Rho dejaron ver la capacidad de EGFP-ITSN2-DHPH-CAAX para promover una aumento de Cdc42-GTP y Rac1-GTP, pero disminuyendo RhoA-GTP. **d)** Por último, con ensayos de captura de GEFs activos se confirmó el estado constitutivamente activo de la construcción, al poder interactuar con las GTPasas mutantes fusionadas a GST; EGFP-ITSN2-DHPH-CAAX sólo puede interactuar con Cdc42 G15A, lo que indica que mantiene la especificidad por regular la activación de esta GTPasa, por lo que el aumento de Rac1-GTP y disminución de RhoA-GTP son consecuencia de la señalización promovida por Cdc42 activo y no por interacción de la construcción con Rac1 o RhoA.

## 6.2.2 EGFP-AKAP13-DHPH-CAAX

Akap13 (también conocido como Akap-Lbc, Brx-1 y proto-Lbc) es una proteína de andamiaje (scaffold) con actividad intercambiadora de nucleótidos de guanina (GEF) capaz de activar de forma específica a la GTPasa RhoA (17). Los resultados de la expresión de la construcción EGFP-AKAP13-DHPH-CAAX en células HEK293T se presentan en la Figura 10.



**Figura 10.** a) EGFP-AKAP13-DHPH-CAAX se expresó como una proteína fluorescente isoprenilada y anclada a la membrana de células HEK293T, promoviendo diferencias en la morfología celular en comparación con células que sólo expresan EGFP-CAAX. b) Por western blot es posible observar la expresión de la construcción en un peso cercano a 75 kDa. c) Los ensayos de activación de GTPasas de Rho dejaron ver la capacidad de EGFP-AKAP13-DHPH-CAAX de favorecer el aumento de RhoA-GTP, pero también de Cdc42-GTP y Rac1-

GTP, situación que resulta interesante, ya que Akap13 muestra una especificidad por RhoA, además de que el esquema general de activación de GTPasas señala que un aumento de los niveles de RhoA-GTP lleva a la disminución de Cdc42-GTP y Rac1-GTP.

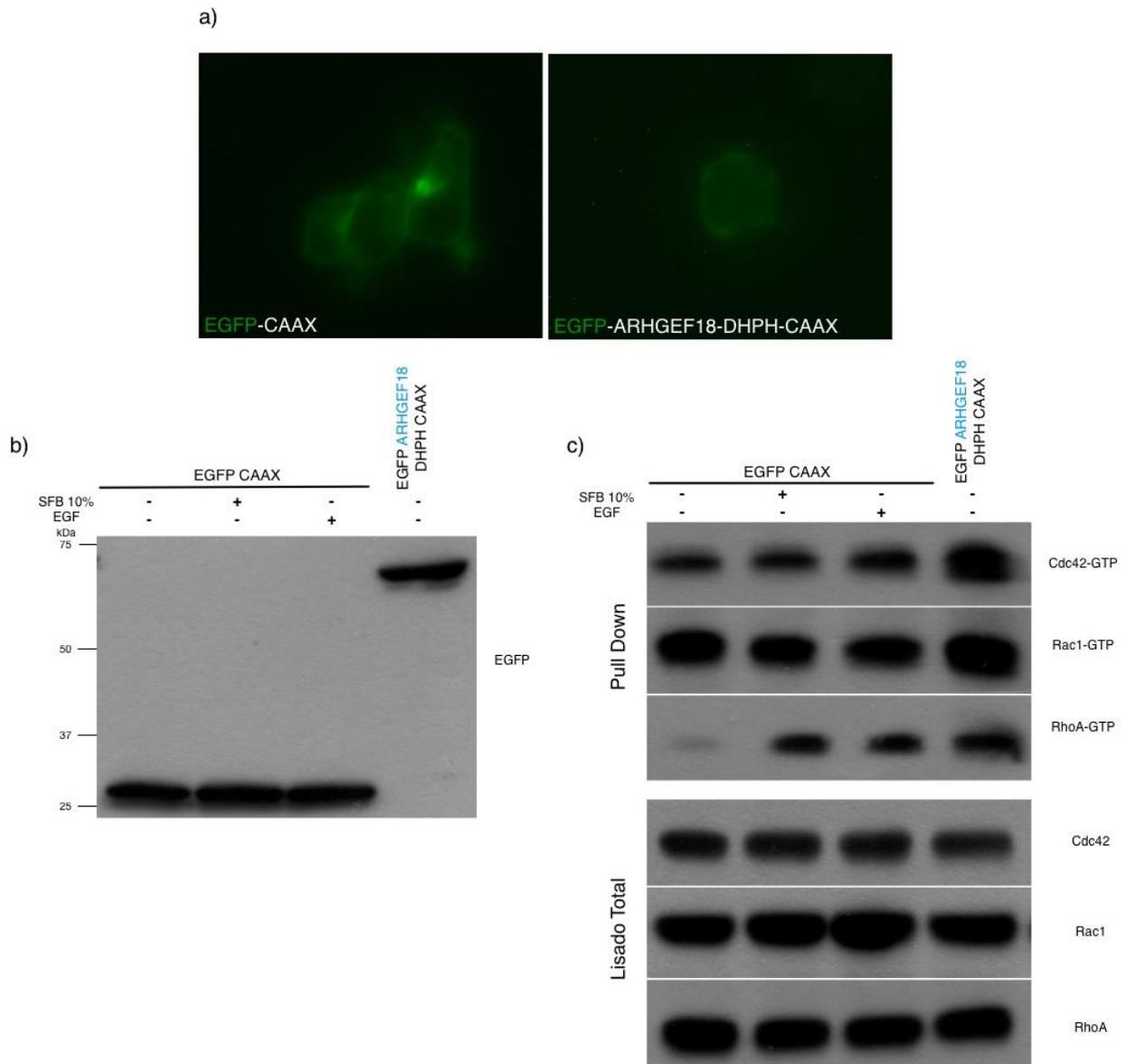
La construcción se expresó como una proteína anclada a la membrana celular e induciendo un cambio en la morfología de las células HEK293T en comparación con aquellas que sólo expresan EGFP-CAAX. Por western blot se confirmó la adecuada expresión de la construcción en un peso de 67.8 KDa. Los ensayos de activación de GTPasas mostraron un aumento de RhoA-GTP, lo cual es algo esperado de acuerdo a la capacidad descrita para este GEF de activar dicha GTPasa; sin embargo resultó interesante observar que contrario a lo que se esperaba, junto con el aumento de RhoA-GTP, también se observó un aumento de Cdc42-GTP y Rac1-GTP. Faltaría realizar ensayos de captura de GEF que permitan conocer si la activación de Cdc42 y Rac1 es resultado de la acción directa de la construcción sobre estas GTPasas, o resultado de la activación y señalización de RhoA-GTP.

### **6.2.3 EGFP-ARHGEF18-DHPH-CAAX**

Arhgef18, p114-RhoGEF o KIAA0521, es un GEF involucrado en la activación de RhoA, aunque también parece tener capacidad de actuar como un GEF para Rac1, pero no para Cdc42 (18). El heterodímero  $\beta\gamma$  de las proteínas G heterotriméricas cumple el papel de activador de Arhgef18, integrando los efectos de LPA y otros agonistas para los receptores acoplados a proteínas G, desencadenando una serie de eventos que finalmente llevan a reorganización del citoesqueleto de actina, cambios en la morfología celular y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (19).

La transfección de la construcción EGFP-ARHGEF18-DHPH-CAAX a células HEK293T, dejó ver que esta se expresa adecuadamente como una proteína anclada a la membrana celular. Es interesante notar, que a diferencia de EGFP-AKAP13-DHPH-CAAX, las células que expresaron la construcción derivada de Arhgef18 no adquieren una forma totalmente redonda y contraída, aun cuando presentaron una morfología diferente a la de células que expresaron EGFP-CAAX, pero está deja ver un fenotipo más característico de una activación de Rac1, donde destacan prolongaciones de la membrana

celular que concuerdan con la apariencia de lamelipodios. Por western blot también se confirmó la expresión de la construcción en un peso cercano a 75 kDa, habiendo pronosticando para la construcción un peso de 68.4 kDa.



**Figura 11. a)** EGFP-ARHGEF18-DHPH-CAAX se expresó como una proteína fluorescente isoprenilada y anclada a la membrana de células HEK293T, promoviendo diferencias en la morfología celular en comparación con células que sólo expresan EGFP-CAAX. La morfología de las células que expresan la construcción corresponde a lo esperado para células que presentan una activación de Rac1. **b)** Por western blot también es posible observar la expresión de la construcción en un peso cercano a 75 kDa. **c)** Los ensayos de activación de GTPasas de Rho dejaron ver la capacidad de EGFP-ARHGEF18-DHPH-CAAX de favorecer el aumento de RhoA-GTP, Rac1-GTP e incluso Cdc42-GTP, estos resultados son interesantes

puesto que Arhgef18 tiene especificidad reportada por RhoA aunque también una menor por Rac1, pero no por Cdc42.

Los ensayos de activación de GTPasas señalaron que EGFP-ARHGEF18-DHPH-CAAX promueve el aumento tanto de RhoA-GTP, Rac1-GTP y Cdc42-GTP, aunque para los primeros dos casos se esperaba dicho aumento, es interesante que también se promueva la activación de Cdc42 aunque posiblemente sea resultado de la señalización de RhoA y Rac1, falta realizar ensayos de captura de GEF activo para establecer la especificidad de la construcción.

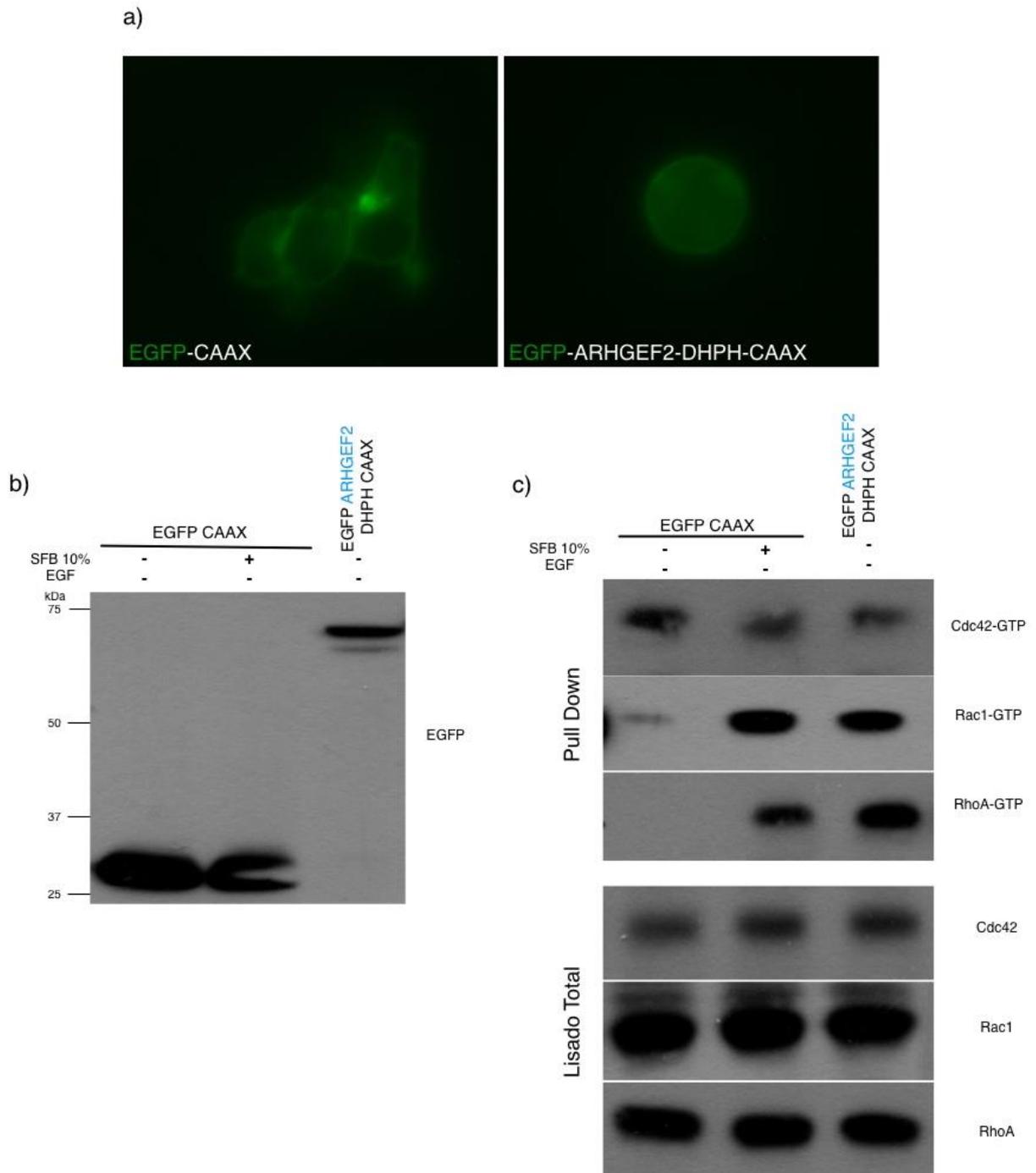
#### **6.2.4 EGFP-ARHGEF2-DHPH-CAAX**

Arhgef2, también referido como GEF-H1 o KIAA0651, es un GEF involucrado en eventos celulares como permeabilidad de la barrera epitelial, movilidad y polaridad celular, presentación de antígenos, regulación del ciclo celular y en patologías como cáncer y enfermedades neuromotoras (20). Este GEF es una proteína de unión a microtúbulos, por lo que tiene una influencia importante sobre la dinámica del citoesqueleto por inhibición de Rac1 y facilitando la actividad de RhoA (21). Sin embargo, aún existe discrepancia sobre su capacidad de unirse a Rac1 e incluso actuar con un GEF para esta GTPasa (22).

Las células HEK293T transfectadas con EGFP-ARHGEF2-DHPH-CAAX expresaron la construcción localizada preferencialmente en la membrana celular e indujeron cambio en la morfología, adquiriendo una definida redondez y contracción de la célula, a comparación de las células transfectadas con EGFP-CAAX las cuales mantuvieron la morfología característica de las HEK293T. En el lisado total de las células transfectadas fue identificada la expresión de la construcción en un peso de 69.5 kDa.

Ensayos de activación de GTPasas apoyan los trabajos previos que señalan la capacidad activadora de este GEF sobre RhoA y Rac1, pero no sobre Cdc42. Como se observa en el inciso c) de la Figura 12, encontramos que tras la transfección de la construcción se produjo un aumento de RhoA-GTP y Rac-GTP, acompañado de una disminución de Cdc42-GTP. Con ayuda de un ensayo de captura de GEF activo esperamos determinar si la activación de

Rac1 es por interacción directa del DH de la construcción con la GTPasa, puesto como se describe al inicio de este apartado, aún no se ha despejado por completo la posible especificidad de Arhgef2 por Rac1.



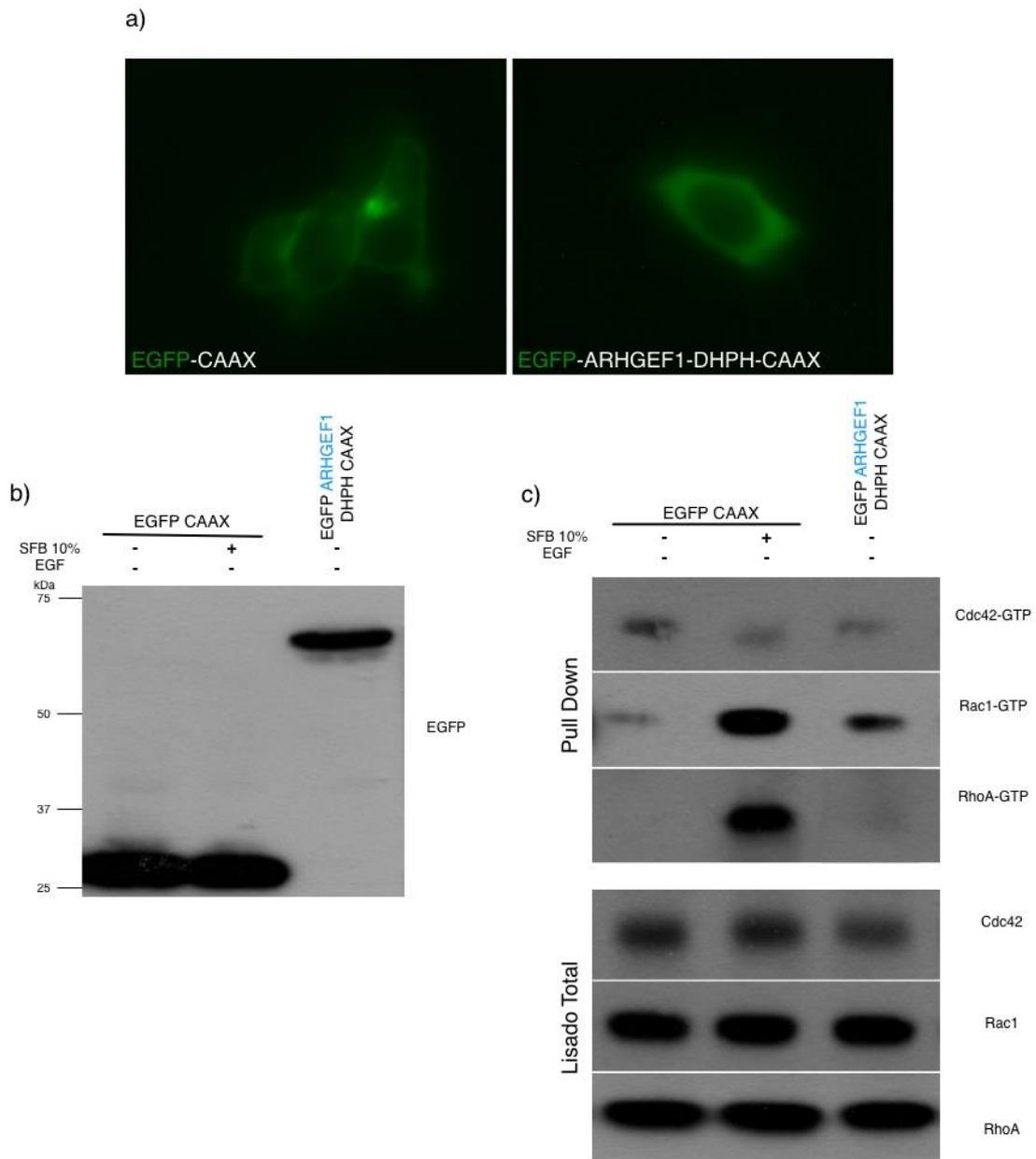
**Figura 12.** a) EGFP-ARHGEF2-DHPH-CAAX se encontró expresada como una proteína fluorescente isoprenilada y anclada a la membrana de células HEK293T, promoviendo diferencias en la morfología celular en comparación con células que sólo expresan EGFP-CAAX. b) Mediante western blot también fue posible confirmar la expresión de la construcción

en un peso cercano a 75 kDa. **c)** Ensayos de activación de GTPasas indicaron que la construcción favorece el aumento de RhoA-GTP y Rac1-GTP, pero disminuyendo Cdc42-GTP.

### **6.2.5 EGFP-ARHGEF1-DHPH-CAAX**

Arhgef1, igualmente conocido como p115-RhoGEF, es una proteína cuya actividad de GEF es modulada por G<sub>12</sub> y G<sub>13</sub> vía el dominio de homología RGS (RH) contenido en su estructura (23). Identificada en 1996, fue caracterizada su actividad catalítica para promover el intercambio de GDP por GTP de RhoA, pero no de Rac1, Cdc42 o GTPasas Ras. Arhgef1 es expresado ubicuamente siendo un regulador general de los fenotipos celulares asociados a la GTPasa RhoA (24).

La obtención de EGFP-ARHGEF1-DHPH-CAAX y posterior transfección a células HEK293T, dio como resultado la expresión de la construcción, sin embargo a diferencia de otras construcciones EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX transfectadas, no observamos una localización preferencial en membrana (inciso a Figura 13), lo que dio paso a preguntas sobre si la remoción de los dominios o regiones ajenas al DH-PH del GEF puede ser la causa de una distribución citoplasmática o existe un problema en la isoprenilación de la construcción. A través de western blot la construcción mostró expresarse correctamente y en niveles adecuados, encontrándose en un peso de 68.3 kDa, sin embargo tampoco podemos confirmar por western blot que la isoprenilación se está llevando a cabo de manera adecuada. Los ensayos de activación de GTPasas correlacionan con la falta de un cambio significativo en la morfología celular, ya que la activación de RhoA no se afectó de manera importante, aunque interesantemente se aprecia un aumento significativo de Rac1-GTP (Figura 13). Hacen falta ensayos para confirmar estos primeros datos preliminares, así como ensayos de activación de GTPasas, a fin de demostrar si la construcción es capaz de interactuar con RhoA y tal vez con Rac1.



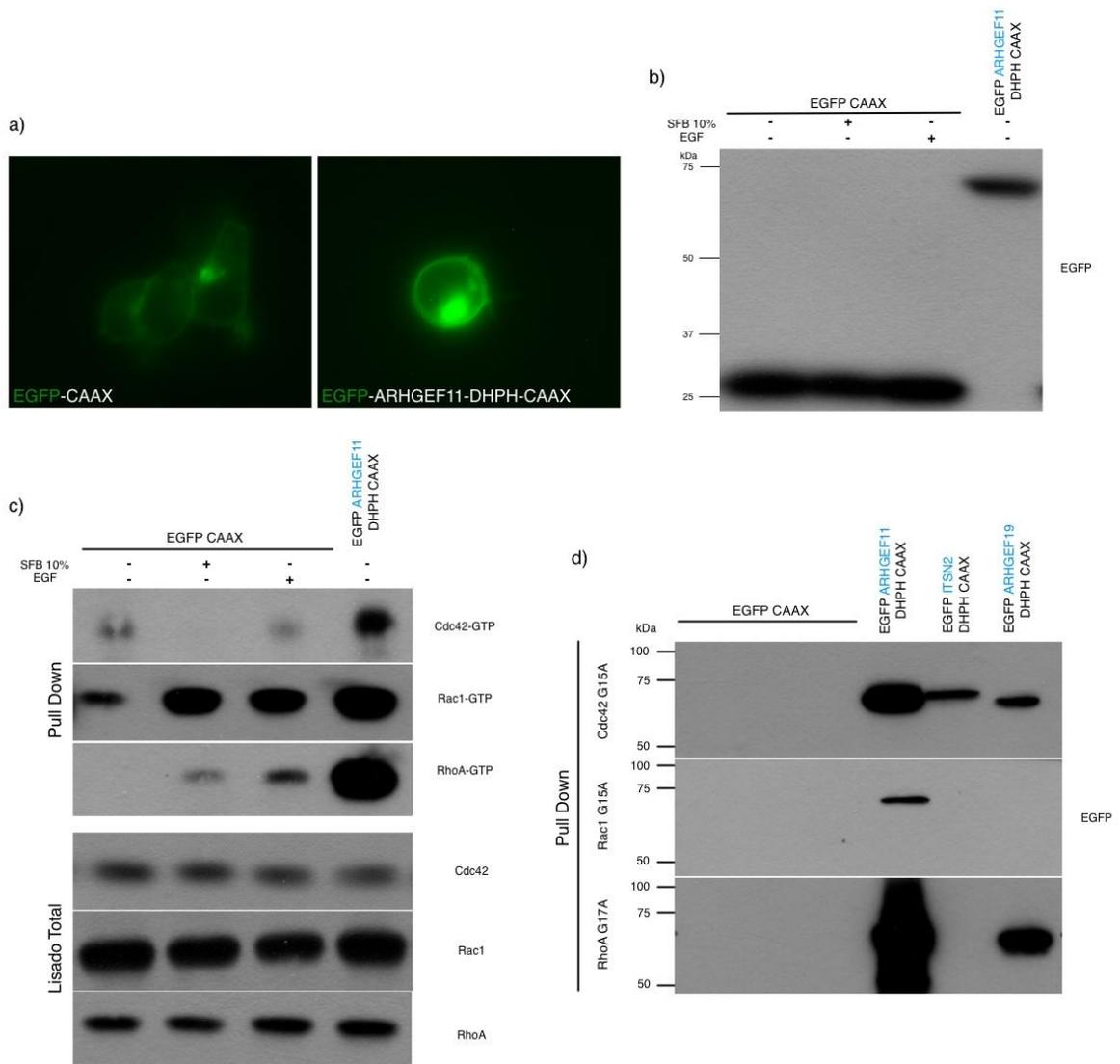
**Figura 13. a)** EGFP-ARHGEF1-DHPH-CAAX parece no localizarse en la membrana celular, sino una distribución principalmente citoplasmática y sin una clara alteración de la morfología de las células HEK293T. **b)** A través de western blot se confirma la expresión de la construcción en un peso cercano a 75 kDa. **c)** La construcción aunque parece favorecer de forma débil la activación de RhoA; sin embargo, Rac1-GTP aumenta tras la transfección de EGFP-ARHGEF1-DHPH-CAAX, un resultado poco esperado debido a la especificidad reportada para activar RhoA por parte de Arhgef1. Se requieren un mayor número de ensayos que confirmen los datos preliminares obtenidos.

### 6.2.6 EGFP-ARHGEF11-DHPH-CAAX

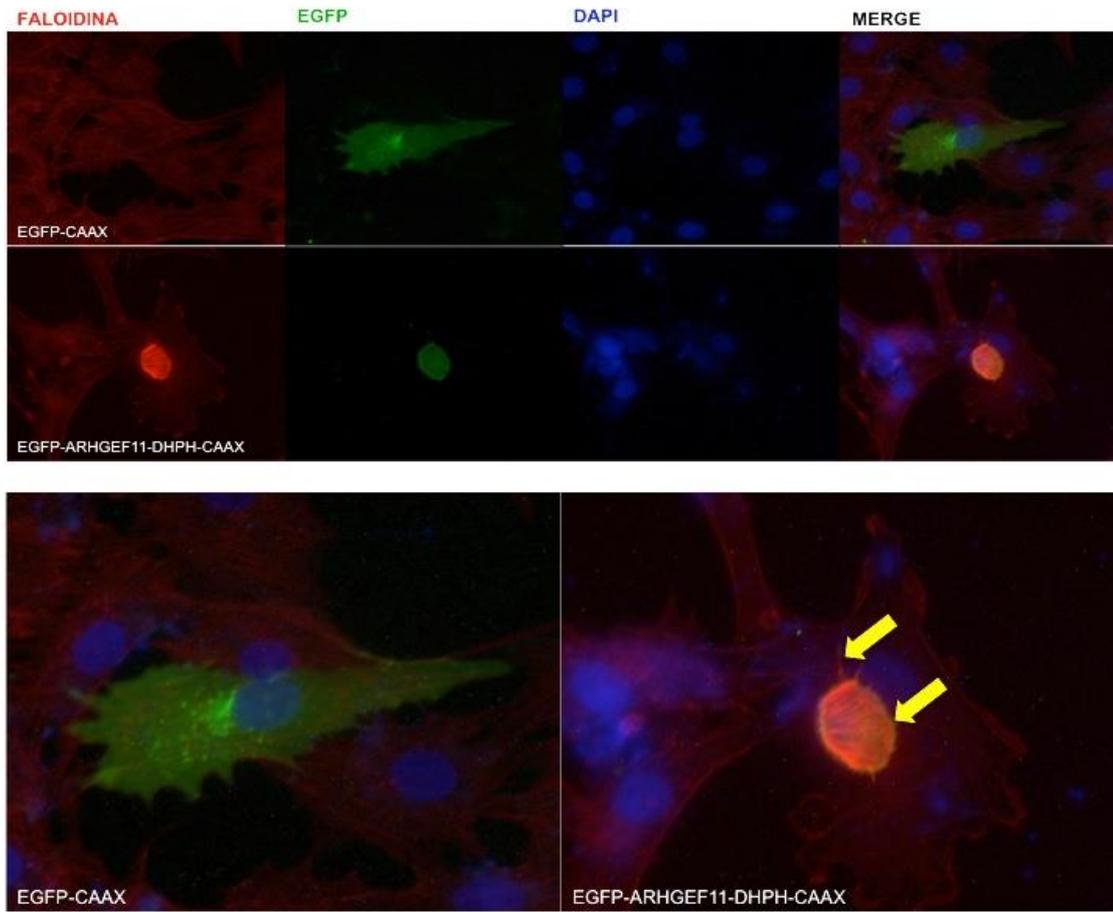
Arhgef11, igualmente denominado como PDZ-RhoGEF o KIAA0380, es un GEF cuya actividad es modulada por G<sub>12</sub> y G<sub>13</sub> a través de su dominio RGS. Desde su caracterización inicial, Arhgef11 ha sido señalado como un GEF específico para RhoA, induciendo la adquisición de un fenotipo característico de la activación de esta GTPasa (25).

EGFP-ARHGEF11-DHPH-CAAX promovió un cambio en la morfología de células HEK293T. Como se observa en el inciso (a) de la Figura 14, la construcción se localizó preferencialmente en la membrana, aunque también se consiguió observar fluorescencia acumulada en el interior de la célula, lo cual podría deberse al paso de la construcción por el aparato de Golgi como parte del proceso de isoprenilación (modificación post-traduccional) que sufre debido a la caja CAAX del extremo C-terminal. Si bien el fenotipo observado concuerda más con una importante activación de RhoA, se consigue identificar la presencia de extensiones de la membrana similares a filopodios, lo cual es indicativo de una posible activación de Cdc42. Al correlacionar el fenotipo observado por fluorescencia con los ensayos de activación de GTPasas, se encontró que efectivamente existe una activación importante de RhoA que explica la contracción y redondez adquirida por las células transfectadas con la construcción; sin embargo, también Cdc42-GTP y Rac1-GTP registran un importante aumento. Aún más interesante resultó confirmar que la construcción es capaz de interactuar de forma directa con RhoA G17A y Cdc42 G15A, e incluso con Rac1 G15A, aunque en menor medida.

Las células endoteliales PAE resultan una mejor línea celular para apreciar cambios morfológicos resultado del rearreglo del citoesqueleto de actina, por lo que se realizó en ellas la transfección de la construcción EGFP-ARHGEF11-DHPH-CAAX, a fin de observar los cambios en la morfología promovidos por la activación de Cdc42, Rac1 y RhoA (Figura 14). Similar a lo observado en células HEK293T, la expresión de EGFP-ARHGEF11-DHPH-CAAX llevó a un cambio radical en la morfología de las células, promoviendo la contracción celular, generando fibras de estrés y también proyecciones de la membrana celular que concuerdan con la apariencia de filopodios (Figura 15).



**Figura 14. a)** EGFP-ARHGEF11-DHPH-CAAX se expresó como una proteína fluorescente y localizada en la membrana de células HEK293T, mismas que sufren un cambio morfológico donde destaca la contracción de la célula y la presencia de proyecciones de membrana. **b)** Mediante western blot se confirma la expresión de la construcción en un peso por debajo de 75 kDa, después de pronosticar un peso de 70.2 kDa. **c)** EGFP-ARHGEF11-DHPH-CAAX es capaz de promover la activación de Cdc42, Rac1 y RhoA, puesto que los ensayos de activación de GTPasas mostraron un aumento de Cdc42-GTP, Rac1-GTP y RhoA-GTP. **d)** Los ensayos de captura de GEF activo demuestran que la activación de Cdc42, Rac1 y RhoA es resultado de la interacción directa de la construcción con las GTPasas; estableciendo un orden de afinidad, RhoA sería la que mejor interacción presenta con la construcción, seguida de Cdc42 y Rac1 por último.



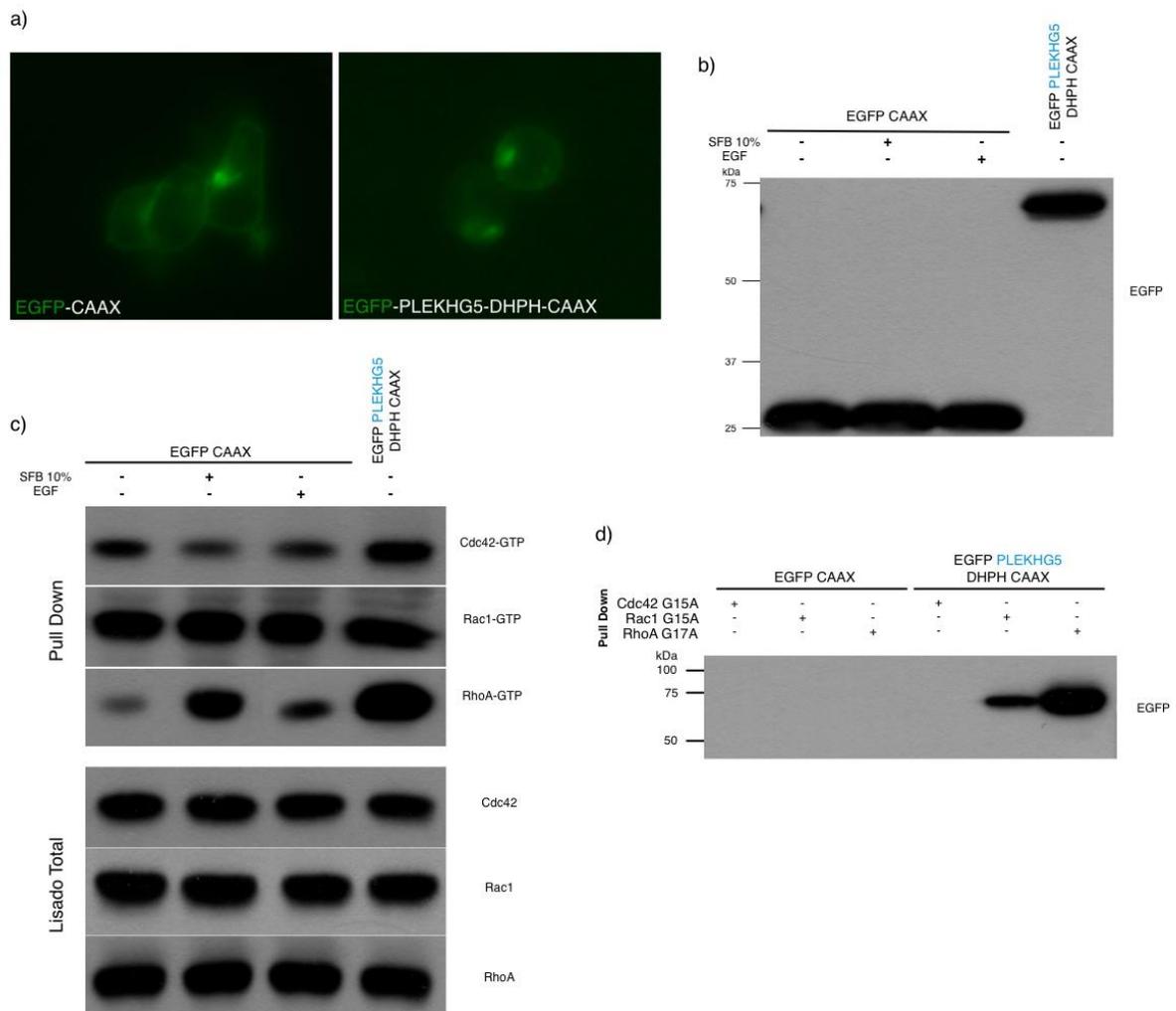
**Figura 15.** La expresión de EGFP-ARHGEF11-DHPH-CAAX en células endoteliales PAE promueve cambios morfológicos acordes a la activación de GTPasa de Rho. En el panel superior se observa las imágenes tomadas con diferentes filtros del microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-E de células endoteliales PAE que expresan EGFP-CAAX o la construcción EGFP-ARHGEF11-DHPH-CAAX; con faloidina se tiñó el citoesqueleto de actina y con DAPI el núcleo, lo que permitió observar fibras de estrés en células que expresan EGFP-ARHGEF11-DHPH-CAAX. En la parte inferior de la figura, se muestra un aumento de la sobreposición (merge) de las 3 imágenes tomadas con diferentes filtros, donde se observa que la célula que expresa EGFP-CAAX no modifica su morfología, mientras que aquella que expresa a EGFP-ARHGEF11-DHPH-CAAX se contrae, genera fibras de estrés y también extensiones de la membrana muy similares a filopodios (flechas amarillas), cambios que concuerdan a la activación de GTPasas de Rho.

### 6.2.7 EGFP-PLEKHG5-DHPH-CAAX

Plekhg5 (también llamado GEF720, KIAA0720 o Syx) es un activador de la vía de señalización de NF-kappa-B y un GEF para RhoA. Algunos trabajos han reportado que Plekhg5 es requerido para dirigir la polaridad de células

cerebrales y tumorales, mediando la reorganización de microtúbulos a través de la activación de RhoA (26, 27).

EGFP-*PLEKHG5-DHPH-CAAX*, la construcción generada para *Plekhg5*, se expresó como una proteína fluorescente con una localización preferencial en la membrana celular, esto como resultado de la transfección a células HEK293T. Un western blot anti-EGFP confirmó que la construcción se encuentra en el peso esperado de 74.1 kDa. Por otra parte, los ensayos de activación de GTPasa mostraron que la construcción es capaz de promover la activación de RhoA, así como de Cdc42 y Rac1. En los ensayos de captura de GEF activo se esperaba que RhoA G17A precipitará a la construcción, pero resultó interesante que además Rac1 G15A, aunque en menor medida, fuera capaz de precipitar a EGFP-*PLEKHG5-DHPH-CAAX*.



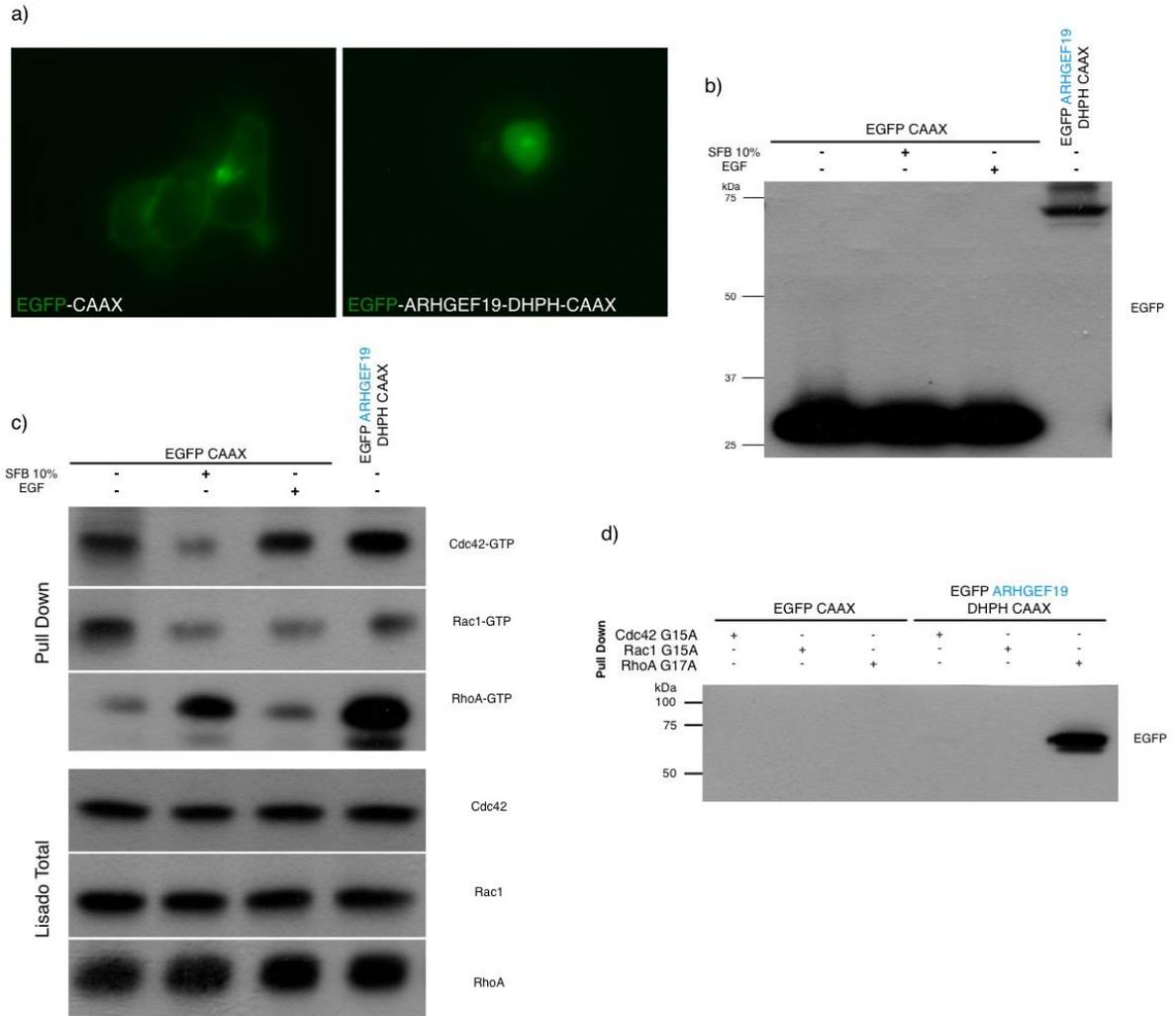
**Figura 16.** a) EGFP-*PLEKHG5-DHPH-CAAX* se expresó como una proteína fluorescente localizada en la membrana de células HEK293T, mismas que sufrieron un cambio morfológico a diferencia de células que sólo expresaban EGFP-CAAX. b) Mediante western blot se

confirma la expresión de la construcción en un peso cercano a los 75 kDa. **c)** EGFP- PLEKHG5-DHPH-CAAX fue capaz de promover la activación de Cdc42, Rac1 y RhoA, lo que queda demostrado en los ensayos de activación de GTPasas. **d)** Con ayuda de los ensayos de captura de GEF, se determinó que la construcción activa a RhoA por interacción directa, caso similar es para Rac1. Por el contrario, la construcción no activa a Cdc42 por interacción directa, ya que la mutante no precipitó a EGFP- PLEKHG5-DHPH-CAAX.

### **6.2.8 EGFP-ARHGEF19-DHPH-CAAX**

Arhgef19, igualmente denominado WGEF o Ephexin-2, es un GEF identificado inicialmente en hígado, riñón, corazón e intestino; junto con este hallazgo se reportó su capacidad de favorecer el aumento en la activación de Cdc42, Rac1 y RhoA (28). Sin embargo, aún no existe un reporte concreto acerca de la acción de este GEF sobre las GTPasas de Rho, ya que los datos sobre su especificidad se encuentran basados en estudios de similitud con homólogos cercanos, los cuales indican a RhoA como su GTPasa específica (29).

La construcción EGFP-ARHGEF19-DHPH-CAAX, transfectada a células HEK293T, es expresada pero no localizada en la membrana celular de acuerdo a las imágenes obtenidas con microscopía de fluorescencia; el western blot anti-EGFP muestra que la expresión de la construcción se encuentra en el peso esperado de 67 kDa. Los ensayos de activación de GTPasas coinciden en gran medida a los reportes sobre la capacidad de promover la activación de Cdc42, Rac1 y RhoA; puesto que se observa un aumento de Cdc42-GTP y RhoA-GTP, aunque faltaría hacer repeticiones del ensayo que confirmen estos datos preliminares. El ensayo de captura de GEF activo apoya el resultado obtenido en cuanto a la activación de RhoA, ya que RhoA G17A fue la única mutante capaz de precipitar a la construcción. Los datos preliminares indican que EGFP-ARHGEF19-DHPH-CAAX a pesar de no tener una localización preferencial en la membrana celular, es capaz de activar de manera importante a RhoA y Cdc42, pero interaccionando únicamente con RhoA, por lo que el aumento de Cdc42-GTP es una posible consecuencia de la señalización de RhoA-GTP.

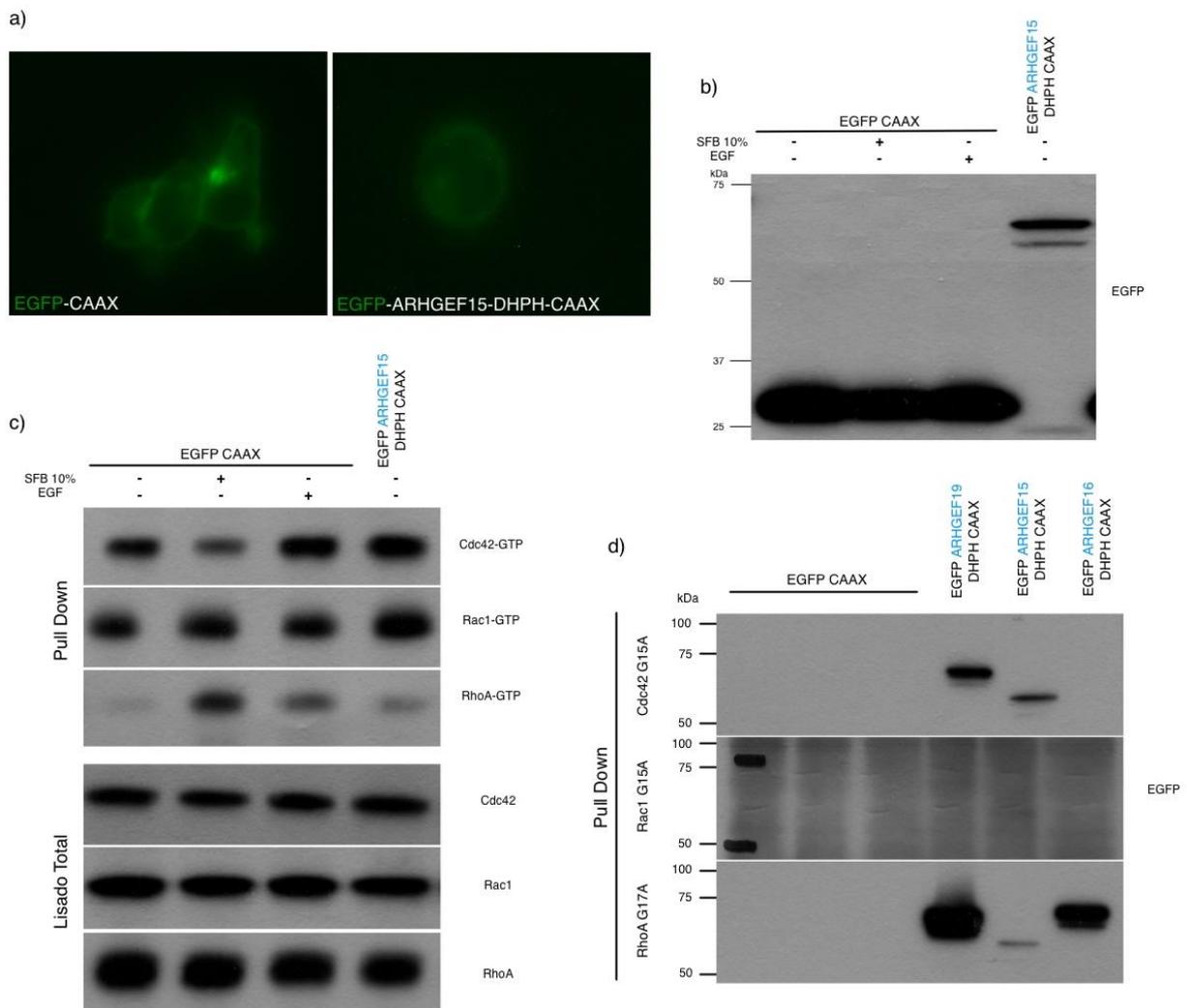


**Figura 17. a)** EGFP-ARHGEF19-DHPH-CAAX se expresó como una proteína fluorescente, aunque su localización no es propiamente en membrana celular, aún así parece inducir cambios en la morfología celular de las HEK293T. **b)** El western blot anti-EGFP confirmó la expresión de la construcción en un peso cercano a los 75 kDa. **c)** EGFP-ARHGEF19-DHPH-CAAX fue capaz de promover la activación de Cdc42 y RhoA, acompañado de una disminución de Rac1, aunque se requieren experimentos adicionales para confirmar estos datos preliminares. **d)** Ensayos de captura de GEF activo indicaron que EGFP-ARHGEF19-DHPH-CAAX presenta únicamente especificidad por RhoA.

### 6.2.9 EGFP-ARHGEF15-DHPH-CAAX

Arhgef15 (también denominado Vsm-RhoGEF, KIAA0915 o Ephexin-5) es un GEF inicialmente caracterizado en músculo liso vascular, donde se reportó que su actividad como GEF es regulada por EphA4 y está va orientada a la activación de RhoA (30). La especificidad de Arhgef15 por RhoA ha sido apoyada por otros trabajos (31, 32), sin embargo un grupo ha señalado que el

GEF tiene una capacidad específica para activar a Cdc42 en células endoteliales (33).



**Figura 18. a)** EGFP-ARHGEF15-DHPH-CAAX se expresó como una proteína fluorescente con localización en la membrana celular, generando cambios en la morfología de la células HEK293T . **b)** El western blot anti-EGFP confirmó la expresión de la construcción en un peso cercano a los 75 kDa. **c)** EGFP-ARHGEF15-DHPH-CAAX promovió la activación de Cdc42 y Rac1, pero contribuyó a la disminución de RhoA-GTP. **d)** Ensayos de captura de GEF activo indicaron que la construcción presenta una marcada especificidad por interactuar con Cdc42, pero no por Rac1 ni RhoA.

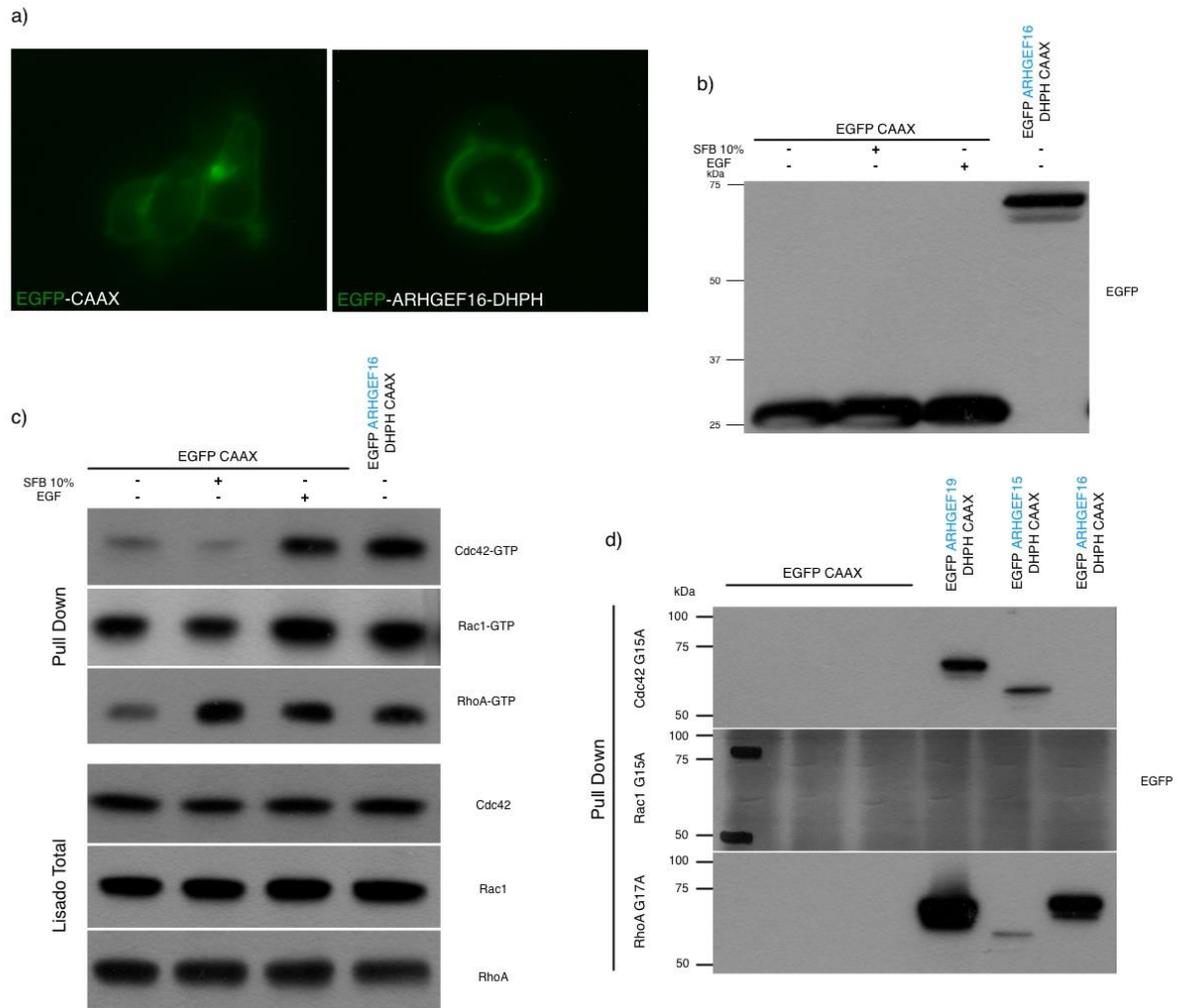
La transfección de EGFP-ARHGEF15-DHPH-CAAX a células HEK293T generó la expresión de la construcción localizada en la membrana celular, promoviendo un cambio en la morfología celular respecto a células que únicamente expresaron EGFP-CAAX; por western blot se confirmó la expresión de EGFP-ARHGEF15-DHPH-CAAX en el peso de 64.9 kDa. Los

ensayos de activación de GTPasa, mostrados en la Figura 18, apoyan los resultados de otros grupos que señalan una activación de Cdc42, ya que se obtuvo un aumento de Cdc42-GTP, así como de Rac1-GTP, pero acompañado de una disminución de RhoA-GTP. Con la información obtenida de los ensayos de captura de GEF activo, se pudo confirmar que la construcción es capaz de interactuar con Cdc42 G15A, pero no con las mutantes de Rac1 y RhoA (aunque se observa una señal, ésta puede ser despreciable). Tomando de referencia los datos de los ensayos realizados, EGFP-ARHGEF15-DHPH-CAAX es capaz de activar de manera directa a Cdc42, y como resultado de la señalización de Cdc42-GTP se produce un aumento de Rac1-GTP y una disminución de RhoA-GTP.

#### **6.2.10 EGFP-ARHGEF16-DHPH-CAAX**

Arhgef16, o Ephexin4, es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) que se ha indicado favorece la activación de RhoG, el cual participa en la migración celular quimiotáctica a través de la activación de Rac1 mediada por EPHA2 (34). Además, podría activar Cdc42 en conjunto con la proteína viral E6 del VPH16 (35).

EGFP-ARHGEF16-DHPH-CAAX fue transfectada a células HEK293T, donde esta se expresó con una localización en la membrana celular, confirmando la eficaz isoprenilación; la construcción produjo cambios en la morfología de la célula, en comparación con aquellas que sólo expresaban a EGFP isoprenilada, dentro de los cambios se observó una contracción celular y la presencia de proyecciones de la membrana. Por western blot también quedó confirmada la expresión de la construcción en un peso de 69 kDa. Ensayos de activación de GTPasas dejaron ver que la construcción promueve la activación de Cdc42, Rac1 y RhoA; aunque por otra parte, los ensayos de captura de GEF activo señalan que la construcción interactúa específicamente con la GTPasa RhoA, por lo que los aumentos en Cdc42-GTP y Rac1-GTP serían producto de la señalización de RhoA-GTP (Figura 19).



**Figura 19.** a) EGFP-ARHGEF16-DHPH-CAAX se encontró expresada como proteína fluorescente anclada a la membrana de células HEK293T, en comparación con células que únicamente expresaban EGFP-CAAX. Esta construcción indujo un cambio de la morfología celular hacia un fenotipo contraído, además de generar proyecciones de la membrana. b) El western blot anti-EGFP confirmó la expresión de la construcción en un peso cercano a los 75 kDa. c) EGFP-ARHGEF15-DHPH-CAAX favoreció la activación de Cdc42, Rac1 y RhoA. d) Los ensayos de captura de GEF activo dejan ver que la construcción es constitutivamente activa y específica para interactuar con RhoA.

## 7 DISCUSIÓN

En humanos, la familia de pequeñas GTPasas homólogas de Ras (Rho GTPasas) comprenden a un grupo de 22 proteínas que funcionan como switches moleculares. Estas regulan gran parte de las vías de transducción de señales en la célula; particularmente relacionadas con la regulación del citoesqueleto de actina, un evento que determina muchos aspectos dinámicos del comportamiento celular como son morfogénesis, migración, fagocitosis y citocinesis, por lo que la desregulación en la actividad de las Rho GTPasas ha sido asociado a un importante número de enfermedades y desordenes en el humano (36). A pesar de lo anterior, sorprende que sean pocos los hallazgos que correlacionen una alteración directa sobre la GTPasa (por ejemplo, una mutación directa que le confiera un estado constitutivamente activo) y su comportamiento aberrante; siendo la activación indirecta un mecanismo más probable para explicar la desregulación de las GTPasas de Rho en algunas enfermedades, incluyendo el cáncer. Recientemente se ha manifestado un mayor interés en explorar la desregulación de la expresión y/o actividad de los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (RhoGEFs), en busca de miembros, de cerca de 63 reportados en humanos, que pudiesen estar controlando de forma importante las vías de señalización y definiendo el comportamiento de las células en diferentes eventos patológicos (37). Como se menciona al inicio de este trabajo, nuestro grupo de investigación está interesado en identificar y caracterizar proteínas que contribuyan de manera obligada al conjunto de eventos de señalización que desencadenan y dirigen una respuesta angiogénica. Los RhoGEFs son proteínas que cumplen con las características de nuestro interés, es por eso que resulta pertinente enfocarnos en su estudio.

En este trabajo nos dimos a la tarea de generar variantes constitutivamente activas de un grupo particular de RhoGEFs que muestran una importante expresión endógena en células endoteliales HMEC. Partiendo de la premisa, de que los GEFs mejor expresados son interesantes para ser estudiados respecto a otros miembros, debido a su posible papel relevante en respuesta a procesos patológicos que promuevan un cambio en el comportamiento celular, particularmente en células endoteliales favorecer su participación en procesos

que exijan una respuesta migratoria como la angiogénesis tumoral o metástasis.

El grupo seleccionado para este trabajo estuvo constituido por 20 RhoGEFs que poseen una cercanía filogenética basada en el alineamiento de secuencias del dominio catalítico de homología a Dbl (DH) de cada GEF. Como estrategia inicial se dio prioridad a la obtención de las construcciones de los RhoGEFs de mayor expresión en condiciones basales así como estimuladas con VEGF de acuerdo al trabajo de tesis doctoral realizado en el laboratorio por Ricardo Hernández García. Además, se pretendía tener representado lo mejor posible a los 20 miembros del grupo seleccionado. El resultado final fue la obtención de 12 construcciones correspondientes a ARHGEF3, ITSN2, AKAP13, ARHGEF18, ARHGEF2, ARHGEF1, ARHGEF11, PLEKHG5, ARHGEF5, ARHGEF19, ARHGEF15 y ARHGEF16. De las 12 construcciones obtenidas, 10 fueron caracterizadas a través de la transfección a células de mamíferos. Como se indica en el apartado de resultados, la caracterización consistió en uso de microscopia de fluorescencia y western blot para evaluar la expresión de la construcción; ensayos de activación de GTPasa a fin de determinar la capacidad de las construcciones para promover la activación de Cdc42, Rac1 y RhoA; así como algunos ensayos de captura de GEF activo que validaron el estado constitutivamente activo de las construcciones y permitieron determinar la especificidad por alguna(s) de la(s) GTPasa(s).

Las 10 construcciones transfectadas a células HEK293T mostraron una expresión eficiente, misma que fue confirmada por medio de western blot. Con excepción de EGFP-ARHGEF1-DHPH-CAAX y EGFP-ARHGEF19-DHPH-CAAX, las construcciones tuvieron una localización dirigida hacia la membrana celular, favorecida por la isoprenilación sufrida debido a la presencia de la caja CAAX en el extremo C-terminal de cada construcción. Aún faltaría explorar las causas por las que las construcciones de Arhgef1 y Arhgef19 no son localizadas en la membrana celular, algunas posibles explicaciones sería algún problema con la isoprenilación o la relevancia de algún dominio ajeno a los DHPH que pudiese favorecer la localización del GEF en la membrana celular.

Tras la confirmación de que las construcciones EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX se expresan adecuadamente, se procedió a realizar ensayos de

activación de GTPasas. El objetivo inicial de realizar estos ensayos fue demostrar que expresando los dominios DHPH anclados a la membrana celular es una estrategia válida para generar una variante del GEF constitutivamente activa, es decir, que no requiera de estímulos extracelulares que promuevan su actividad intercambiadora de nucleótidos de guanina requerida para llevar a cabo la activación de GTPasas de Rho. Y como se señala en la Tabla 8, las 10 construcciones evaluadas tuvieron capacidad para promover el aumento de alguna(s) GTPasa(s), con lo cual validamos la hipótesis de que los dominios DH-PH localizados en la membrana son capaces de activar de forma constitutiva a GTPasas de Rho.

Además de haber validado la generación de variantes de RhoGEFs constitutivamente activos, los resultados de los ensayos de activación de GTPasas dieron lugar a hallazgos interesantes sobre la especificidad de algunas construcciones para llevar a cabo la activación de las GTPasas Cdc42, Rac1 y RhoA. Varios grupos de investigación y trabajos publicados han reportado la especificidad de un número importante de RhoGEFs por cierta(s) GTPasa(s), pero otro número importante de RhoGEFs no tiene un reporte concreto sobre su especificidad, o en otros casos existe discrepancia sobre los datos reportados por diferentes grupos. Con excepción de Itsn2 y Arhgef16, los restantes 8 GEFs cuyas construcciones fueron obtenidas y evaluadas, reportan una especificidad por activar a la GTPasa RhoA (37). Sin embargo, varios de nuestros resultados muestran que no solo RhoA-GTP sufre un aumento como resultado de la expresión de alguna de estas construcciones. En la Tabla 8 se puede apreciar que de manera general el grupo de construcciones obtenidas promueve la activación de las 3 GTPasas, estos datos resultan aún más interesantes tomando como referencia el esquema de regulación de la activación de Cdc42, Rac1 y RhoA, donde se indica que una activación de Cdc42 o Rac1 llevan a una disminución de RhoA, mientras que al favorecerse la activación de RhoA se produce una disminución en la activación de Cdc42 y Rac1. Sin embargo, también existe controversia sobre el esquema anterior, ya que en una célula en migración polarizada, se ha señalado que en el frente de avance no sólo es posible encontrar Cdc42 y Rac1 activos, indicando que la activación de RhoA también es requerida para que el proceso migratorio sea eficiente (3). El dominio DH parece ser

responsable de cierto grado de especificidad de los GEFs por las GTPasas, pero podría no ser el único factor determinante, ya que el dominio PH también podría contribuir a esa especificidad, así como los dominios y motivos adicionales del GEF.

Con ayuda de GTPasas mutantes, incapaces de unir GDP o GTP, fue posible realizar ensayos de captura de GEF activo. El fundamento de este sistema está basado en la fuerte interacción que se establece entre un GEF activo y una GTPasa en su estado libre de nucleótido como parte del proceso de intercambio de GDP por GTP. Estos ensayos permitieron establecer si la promoción de la activación de las GTPasas es por interacción directa de la construcción con estas, o resultado de la señalización en cascada tras la activación de una. Interesante fue encontrar que EGFP-ITSN2-DHPH-CAAX parece mantener su especificidad por unirse a Cdc42 y activarlo, por lo que la activación de Rac1 podría ser resultado de la señalización desencadenada por Cdc42-GTP. Caso contrario fue EGFP-ARHGEF11-DHPH-CAAX, aunque mantiene una importante especificidad por RhoA, también resulta capaz de interaccionar directamente con Cdc42 y en menor medida con Rac1, es decir, la especificidad parece perderse si únicamente se expresan los dominios DHPH. Resultado similar se obtuvo con EGFP-PLEKHG5-DHPH-CAAX, donde se mantiene una especificidad por interaccionar con RhoA, también se presenta una capacidad de hacerlo con Rac1 pero no con Cdc42. En tanto que EGFP-ARHGEF19-DHPH-CAAX parece ser capaz de contribuir a la activación de las 3 GTPasas, pero sólo puede interaccionar directamente con RhoA. El resultado que obtuvimos para EGFP-ARHGEF15-DHPH-CAAX apoya a los grupos que señalan que la especificidad del GEF va dirigida hacia Cdc42. La última de las construcciones evaluadas con este ensayo, EGFP-ARHGEF16-DHPH-CAAX, muestra una especificidad por RhoA, aunque algunos trabajos indican que su especificidad va dirigida hacia Cdc42 o RhoG. Aún falta confirmar estos datos preliminares haciendo un número mayor de ensayos, además de la secuenciación de las construcciones a fin de confirmar su correcta obtención.

Finalmente, los resultados presentados en este trabajo representan el principio de la caracterización de la posible contribución de los RhoGEFs en el control de la activación de GTPasas y la respuesta migratoria en células

endoteliales; ya que se plantea la realización de ensayos que permitan una mejor descripción de los procesos en los que se podrían ver implicadas estas proteínas. El objetivo final es elucidar alguna correlación entre la expresión y/o actividad de estas proteínas y su papel en eventos patológicos que exijan actividad migratoria por parte de la célula, con el fin de que en un futuro puedan considerarse interesantes blancos terapéuticos que permitan el diseño de terapias con mejor especificidad y resultados en el tratamiento de las patologías que podrían implicar su participación.

RhoGEF DHPH	Cdc42	Rac1	RhoA
ARHGEF3			
ITSN2	+	+	-
AKAP13	+	+	+
ARHGEF18	+	+	+
ARHGEF2	-	+	+
ARHGEF1	-	+	+
ARHGEF11	+	+	+
PLEKHG5	+	+?	+
ARHGEF5			
ARHGEF19	+	-?	+
ARHGEF15	+	+	+
ARHGEF16	+	+?	+

**Tabla 8.** Los EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX muestran efectos diferenciales sobre su capacidad y especificidad para activar GTPasas de la familia de Rho en células HEK293T incubadas en medio libre de estímulos extracelulares. Un (+) es indicativo de un aumento en la activación de la GTPasa y un (-) indicativo de una disminución en la activación.

## 8 CONCLUSIONES

- Se generaron 10 construcciones EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX que demostraron una expresión eficaz en células HEK293T, mismas donde se pudieron observar cambios en la morfología celular que corresponden al fenotipo adquirido como resultado de la activación de GTPasas de la familia de Rho.
- Las construcciones EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX son capaces de activar de forma constitutiva a GTPasas de la familia de Rho, con lo cual se valida la hipótesis de que la expresión en la membrana plasmática de los dominios de homología a Dbl (DH) y Pleckstrina (PH), da lugar a una variante constitutivamente activa, que sin requerir de estímulos extracelulares, estimula a GTPasas como Cdc42, Rac1 y RhoA.
- Algunas de las construcciones obtenidas, como son EGFP-ITSN2-DHPH-CAAX y EGFP-ARHGEF15-DHPH-CAAX parecen conservar su especificidad por activar una GTPasa tal y como se ha reportado para el GEF completo; sin embargo, EGFP-ARHGEF11-DHPH-CAAX y EGFP-PLEKHG5-DHPH-CAAX son ejemplos de construcciones donde la especificidad del GEF completo por activar directamente una GTPasa se ve afectada con la sola expresión de los dominios DH-PH, ya que ambas construcciones son capaces de interactuar con más de una GTPasa. Además, la activación de una GTPasa puede desencadenar la activación de otras, posiblemente como resultado de la señalización en cascada.
- La expresión de EGFP-ARHGEF11-DHPH-CAAX en células endoteliales PAE, provoca la adquisición de un fenotipo de activación de RhoA, Cdc42 y Rac1, donde destaca la formación de fibras de estrés, así como prolongaciones de la membrana celular concordantes con filopodios y lamelipodios.

- Las variantes constitutivamente activas (EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX) que se generaron, permiten un enfoque experimental dirigido a la ganancia de función de las células transfectadas, ya que son capaces de activar con diferente especificidad a GTPasas de la familia de Rho, con lo que se promueven cambios moleculares y celulares acordes a una posible respuesta angiogénica.

## 9 PERSPECTIVAS

- Obtener y evaluar las construcciones de los restantes RhoGEFs que conforman el grupo seleccionado.
- Realizar la caracterización a detalle del papel y contribución de los RhoGEFs seleccionados en el proceso migratorio y angiogénico de células endoteliales, usando como herramienta las construcciones EGFP-X-RhoGEFs-DHPH-CAAX.
- Estudiar los posibles cambios en la especificidad de los RhoGEFs por alguna(s) GTPasa(s) como consecuencia de la remoción de dominios y motivos ajenos a los DH-PH.
- Atenuar la expresión endógena de los RhoGEFs que muestren tener un importante papel en el proceso migratorio de células endoteliales, a fin de confirmar que tras la supresión de la expresión existe una pérdida de la capacidad de la célula para participar en el proceso angiogénico de manera eficiente. Para ello se propone el diseño y obtención de shRNA contra los RhoGEFs.
- Elucidar la participación de los RhoGEFs en eventos de migración y angiogénesis tumoral en modelos *in vitro* e *in vivo*.
- Identificar los patrones de expresión de los RhoGEFs en la vascularización tumoral e identificar la participación obligatoria en este proceso de algunos RhoGEFs.

## 10 BIBLIOGRAFÍA

- 1 Ridley, A.; Schwartz, M.; et al. (2003). "Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back." *Science* 302: 1704-09
- 2 Raftopoulou, M.; Hall, A. (2004) "[SEP]Cell migration: Rho GTPases lead the way." *Developmental Biology* 265: 23-32
- 3 Roca-Cusachs; P.; Sunyer, R.; et al. (2013). "Mechanical guidance of cell migration: lessons from chemotaxis." *Current Opinion in Cell Biolog* (25): 543-9
- 4 Lazer, G.; Katzav, S. (2011). "Guanine nucleotide exchange factors for RhoGTPases: Good therapeutic targets for cancer therapy?" *Cellular Signalling* 23: 969-979
- 5 Jaffe, A.; Hall, A. (2005). "Rho GTPases: Biochemistry and Biology." *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 247–69
- 6 Vigil, D.; Cherfils, J.; et al. (2010). "Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy?" *Nature Reviews Cancer* 10: 842-857
- 7 Cherfils, J.; Zeghouf, M. (2013). "Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs and GDIs." *Physiol Rev* 93: 269-309
- 8 García-Mata, R.; Boulter, E.; et al. (2011). "The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs" *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 493-504
- 9 Zheng, Y. (2001). "Dbl family guanine nucleotide Exchange factors." *TRENDS in Biochemical Sciences* (26): 724-732
- 10 Worthylake, D.; Rossman, K.; et al. (2004). "Crystal Structure of the DH/PH Fragment of Dbs without Bound GTPase" *Structure* 12: 1079-86

11 Lemmon, M.; Ferguson, K.; et al. (2002). "Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton." FEBS Letters 513: 71-76

12 Cook, D.; Rossman, K.; et al. (2013). "Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease." Oncogene 362: 1-15

13 [http://smart.embl-heidelberg.de/smart/show\\_many\\_proteins.pl](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/show_many_proteins.pl)  
Consultado 31 Octubre de 2012

14 García-Mata, R.; Wennerber, K.; et al. (2006). "Analysis of activated GAPs and GEFs in cell lysates." Methods Enzymol. 406: 425-37

15 Rodriguez-Fraticelli, A.; Martín-Belmonte, F.; et al. (2010). "The Cdc42 GEF Intersectin 2 controls mitotic spindle orientation to form the lumen during epithelial morphogenesis." JCB 189 (4): 725-38

16 Tsyba, L.; Rynditch, A.; et al. (2011). "Intersectin multidomain adaptor proteins: Regulation of functional diversity." Gene 473: 67-75.

17 Shibolet, O.; Podolsky, D.; et al. (2007). "AKAP13, a RhoA GTPase-specific Guanine Exchange Factor, Is a Novel Regulator of TLR2 Signaling" JBC 282 (48): 35308-35317.

18 Song, C.; Tian, D.; et al. (2013). "Expression of p114RhoGEF predicts lymph node metastasis and poor survival of squamous-cell lung carcinoma patients." Tumour Biol. 34 (3): 1925-33.

19 Niu, J.; Voyno-Yasenetskaya, T.; et al. (2003). "G Protein  $\beta\gamma$  Subunits Stimulate p114RhoGEF, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for RhoA and Rac1." Circulation Research 93: 848-56

20 Ridgway, L.; Ngo, J.; et al. (2012). "Heparanase-Induced GEF-H1 Signaling Regulates the Cytoskeletal Dynamics of Brain Metastatic Breast Cancer Cells" *Mol Cancer Res* 10 (6): 689-702

21 Birkenfeld, J.; Bokoch, G.; et al. (2008). "Cellular functions of GEF-H1, a microtubule-regulated Rho-GEF: is altered GEF-H1 activity a crucial determinant of disease pathogenesis?" *Trends in Cell Biology* 18 (5): 210-19

22 Ren, Y.; Busch, H.; et al. (1998). "Cloning and Characterization of GEF-H1, a Microtubule-associated Guanine Nucleotide Exchange Factor for Rac and Rho GTPases." *JBC* 273 (52): 34954-60

23 Medina, F.; Sternweis, P.; et al. (2013). "Activated RhoA Is a Positive Feedback Regulator of the Lbc Family of Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor Proteins." *JBC* 288; 11325-33

24 Hart, M.; Bollag, G.; et al. (1996). "Identification of a Novel Guanine Nucleotide Exchange Factor for the Rho GTPase" *JBC* 271 (41): 25452-58

25 Rumenapp, U.; Jakobs, K.; et al. (1999). "Rho-specific binding and guanine nucleotide exchange catalysis by KIAA0380, a dbl family member." *FEBS Lett* 459 (3): 313-8

26 Dachsel, J.; Anastasiadis, P.; et al. (2013). "The RhoGEF Syx regulates the balance of Dia and ROCK activities to promote polarized cancer cell migration." *MCB* 565 (13)

27 Toledo, M.; Blangy, A.; et al. (2001). "The gene for a new brain specific RhoA exchange factor maps to the highly unstable chromosomal region 1p36.2 ± 1p36.3." *Oncogene* 20: 7307-7317

28 Wang, Y.; Yamada, N.; et al. (2004). "WGEF is a novel RhoGEF expressed in intestine, liver, heart, and kidney" *BBRC* 324: 1053-58

29 <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ARHGEF19&search=Arhgef19> Consultado 20 de Octubre de 2013

30 Ogita, H.; Mochizuki, N.; et al. (2003). "EphA4-Mediated Rho Activation via Vsm-RhoGEF Expressed Specifically in Vascular Smooth Muscle Cells." *Circ Res* 93: 23-31

31 Rossman, K.; Sondek, J.; et al. (2005). "GEF Means Go: Turning On Rho GTPases With Guanine Nucleotide-Exchange Factors." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2): 167-80

32 <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ARHGEF15&search=Arhgef15> Consultado 10 de noviembre de 2013

33 Kusuhara, S.; Fukushima, Y.; et al. (2012). "Arhgef15 Promotes Retinal Angiogenesis by Mediating VEGF-Induced Cdc42 Activation and Potentiating RhoJ Inactivation in Endothelial Cells." *PLOS One* 7 (9): 1-11

34 Hiramoto-Yamaki, N.; Takeuchi, S.; et al. (2010). "Ephexin4 and EphA2 mediate cell migration through a RhoG-dependent mechanism." *JCB* 190 (3): 461-477

35 Oliver, A.; He, X.; et al. (2011). "The HPV16 E6 binding protein Tip-1 interacts with ARHGEF16, which activates Cdc42." *British Journal of Cancer* 104: 324-31

36 Hall, A. (2012). "Rho family GTPases". *Biochem. Soc. Trans.* 40 (6): 1378-82

37 Cook, D.; Rossman, K.; et al. (2013). "Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease." *Oncogene* 362: 1-15