

Centro de Investigación y Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
Unidad Zacatenco

Departamento de Farmacología

**Identificación de Activadores de la GTPasa RhoJ,
Potencialmente Relevantes en la Angiogénesis Tumoral.**

T E S I S

Que presenta

Q.F.B Víctor Manuel Color Aparicio

Para obtener el Grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en
Farmacología.

Director de Tesis:

Dr. José Vázquez Prado.

Departamento de Farmacología, CINVESTAV.

Asesores:

Dr. Guadalupe Reyes Cruz.

Departamento de Biología Celular. CINVESTAV.

Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza.

Departamento de Farmacología. CINVESTAV.

México DF.

Diciembre 2015

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme una beca con número de CVU 594977, para realizar mis estudios de Maestría en Ciencias con Especialidad en Farmacología, inscrito al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV). La infraestructura del proyecto fue apoyada por los donativos del CONACYT: 152434 al Dr. José Vázquez Prado y 79429 a la Dra. Guadalupe Reyes Cruz.

Agradecimientos

A mi director de Tesis, Dr. José Vázquez Prado, por aceptarme en su grupo de investigación y nutrir mi enseñanza con sus consejos y experiencia, convirtiéndose en mentor para mi aprendizaje en la investigación científica.

A mis asesores de Tesis: Dra. Guadalupe Reyes Cruz y Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza por aceptar ser asesores de este proyecto, sus consejos y opiniones durante el desarrollo del proyecto.

A la Dr. Guadalupe Reyes Cruz por sus consejos, opiniones y apoyo en infraestructura para realizar este proyecto de maestría.

A mis compañeros del laboratorio: M.C. Zendi Rafael Adame García y M.C. Rodolfo Daniel Cervantes Villagrana, por su amistad y ser instructores en mi enseñanza de las técnicas, sus opiniones y consejos para realizar los ensayos requeridos para el proyecto.

A mis demás compañeros del laboratorio: M.C. Magda Hernández Vázquez, M.C. Ricardo Hernández García, M.C. Lydia Chávez Vargas, M.C. Alejandro Castillo Kauil y Q.F.B Irving García Jiménez por su amistad, opiniones y consejos durante la realización del proyecto.

Al personal de apoyo: Estanislao Escobar Islas, David Pérez Rangel, Margarita Raquel Valadez Sánchez y Jaime Estrada Trejo por su asistencia técnica durante la realización del proyecto.

A las secretarias: Patricia Pérez Rangel y Beatriz alcántara castro por su apoyo y asistencia administrativa.

A mis compañeros del laboratorio 19 de Biología Celular por su Amistad y apoyo.

Al laboratorio del Dr. Fernando Navarro García de Biología Celular, por apoyarme con el sonicador para realizar perlas de fusión.

Dedicatoria

Esta Tesis va dedicada a mi familia, mi padre Antonio Color, mi Madre Jovita Aparicio y mi Hermano Francisco Raymundo Color, sin su apoyo difícilmente podría alcanzar una nueva meta en mi vida, para ellos con mucho amor y cariño.

Sin olvidar a mis amigos Luis Arturo Herrera, Guillermo Ivan Baltierra, Ramon Vazquez, Francisco Cuin y en especial a Jiovani Gonzales Rivera aunque no estes físicamente vivirás siempre en nuestros corazones.

Por último, a toda mi familia, mis amigos y conocidos de la comunidad indígena de Ichupio Michoacan, de la cual estoy orgulloso de formar parte.

Índice

Abreviaturas	1
Indice de Tablas	3
Indice de Figuras	3
Resumen	5
Abstract	6
Identificación de activadores de la GTPasa RhoJ, potencialmente relevantes en la angiogénesis tumoral	7
Angiogénesis	7
Angiogenesis Tumoral	11
Migración Celular Polarizada	14
GTPasas de la Familia de Rho	18
Regulación de la activación de GTPasas de la familia de Rho	23
• RhoGEFs	23
• RhoGAPs	24
• RhoGDIs	25
RhoJ	27
• Identificación de RhoJ	27
• Efectos en el Citoesqueleto y Localización Subcelular	27
• Expresión en Células Endoteliales	28
• Efectos en células endoteliales	28
• Participación en la Angiogénesis	29
• Participación en Cáncer	30
• RhoJ como Potencial Blanco Terapéutico	30
• RhoJ como Regulador de Quimiorresistencia de Células Tumorales	31
Justificación	33
Hipótesis	34
Objetivo General	34
Objetivos específicos	34

Estrategia experimental	36
1. Identificación de RhoGEFs para RhoJ por criterios de homología, parecido estructural y expresión con GTPasas de la familia de Rho en células endoteliales	36
2. Identificación de RhoGEFs por afinidad con RhoJ potencialmente relevantes en la angiogénesis tumoral	37
3. RhoJ como promotor de procesos celulares compatibles con una respuesta Angiogénica	38
Material y Métodos	39
Obtención de cDNA de pWPXL-RhoJ-WT, pWPXL-RhoJ-T35N y pWPXL-RhoJ-Q79L	39
Subclonación de RhoJ-T35N en el plásmido pGEX6P1 para preparación de proteína de fusión	40
Obtención de proteínas de fusión GST-RhoJ-T35N y GST-PAKN-CRIB	42
Curva de activación de RhoJ en células PAE estimuladas con medios condicionados de células tumorales LAP0297	43
Transfección de construcciones pCEFL-DH-PH RhoGEFs CAAX en células HEK293T	44
Captura de DH-PH RhoGEFs CAAX con GST-RhoJ-T35N	45
Activación de RhoJ por DH-PH RhoGEFs en células HEK293T	46
Subclonación de RhoJ-WT, RhoJ-T35N y RhoJ-Q79L en el plásmido pCEFL-EGFP	47
Transfección de cDNA de pCEFL-EGFP-RhoJ-WT, pCEFL-EGFP-RhoJ-T35N y pCEFL-EGFP-RhoJ-Q79L en células PAE	47
Resultados	50
Identificación de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina de la familia de Rho (RhoGEFs) por criterios de homología, expresión y parecido estructural con GTPasas de la familia de Rho	50
Identificación de RhoGEFs por interacción directa con RhoJ potencialmente relevantes en la angiogénesis tumoral	55
Repercusión funcional a nivel celular de la activación de RhoJ vinculado a una respuesta angiogénica tumoral	59
Discusión	64
Conclusiones	68
Perspectivas	69
Referencias	70

Abreviaturas

- ATF2.**- Activador del Factor Transcripcional 2 (*Activating Transcription Factor 2*).
- ATR.**- Proteína Relacionada con Ataxia (*Ataxia Tlanguiectasia-Rad3 related protein*).
- DMEM.** - Dulbecco Modified Eagle Medium.
- FGF.**- Factor de Crecimiento de Fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor*).
- GFP.**- Proteína Verde Fluorescente (*Green Fluorescent Protein*).
- GPCRs.**- Receptores Acoplados a Proteínas G (*G Protein-Coupled Receptors*).
- GST.**- Glutathion S-Transferasa (*Glutathione S-transferase*).
- HDMECs.**- Celulas Endoteliales Microvasculares Dérmicas Humanas (*Human Dermal Microvascular Endothelial Cells*).
- HGF.**- Factor de Crecimiento de Hepatositos (*hepatocyte growth factor*).
- HUVECs.**- Celulas Endoteliales de la Vena Umbilical Humana (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*).
- IPTG.**- Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (*Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*).
- LB.**- Medio *Luria-Bertani Broth*.
- LPA.**- Acido Lisofosfatídico (*Lysophosphatidic Acid*).
- MLC.**- Cadena Ligera de Miosina (*Myosin Light Chain*).
- MMPs.**- Metaloproteinasas de matriz (*Matrix Metalloproteinases*).
- PAE.**- Celulas endoteliales de Aorta Porcina (*Porcine Aortic Endothelial Cells*).
- PBS.** - Buffer salino de fosfatos (*Phosphate-buffered saline*).
- PCR.**- Reaccion en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).
- PDGF.**- Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (*Platelet-derived growth factor*).
- PDGFR- β .**- Receptor Beta del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (*Platelet-derived growth factor receptor beta*).
- RhoGDIs.**- Inhibidores de la Disociacion de GDP de RhoGTPasas (*Rho GDP-dissociation inhibitor*).
- RhoGEFs.**- Factores Intercambiadores de nucleótidos de Guanina de RhoGTPasas (*Rho guanine nucleotide exchange factor*).
- RhoGTPasas.**- GTPasas de la Famliila de Rho.
- SMART.**- *Simple Modular Architecture Research Tool*.

VEGF.- Factor de Crecimiento de Endotelio Vasular (*Vascular Endothelial Growth Factor*).

VEGFR.- Receptor para el factor de crecimiento de endotelio vascular (Receptor for *Vascular Endothelial Growth Factor*).

WFV.- *Von Willebrand Factor*.

Índice de tablas

Tabla #1.- Reactivos y cantidades para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	40
Tabla #2.- Condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	41
Tabla #3.- Reactivos y cantidades para la digestión de producto purificado de PCR y pGEX6p1	41
Tabla #4.- Reactivos y cantidades para la ligación de RhoJ-T35 en pGEX6p1	42
Tabla #5.- Reactivos y soluciones utilizados en los ensayos de interacción y activación de RhoJ por DH-PH-RhoGEFs	48

Índice de Figuras

Figura 1.- Procesos que involucran la formación de nuevos vasos sanguíneos	8
Figura 2.- El brote angiogenico es mediado por una célula líder (Tip Cell) que dirige la extensión vascular de manera ordenada	9
Figura 3.- La angiogénesis facilita el crecimiento y metástasis tumoral	13
Figura 4.-Tipos de migración celular	15
Figura 5.- Factores que estimulan la migración celular polarizada	17
Figura 6.- Las GTPasas de la familia de Rho modulan cambios en la dinámica del citoesqueleto de células endoteliales	19
Figura 7.- Ciclo de regulación de la actividad de RhoGTPasas	26
Figura 8.- RhoJ es una RhoGTPasa que regula la angiogénesis tumoral	32
Figura 9.- Los activadores de la GTPasa RhoJ pueden ser indentificados por un análisis de homologías, expresión, interaccion directa de RhoJ con RhoGEFs y sus efectos en células endoteliales	35
Figura 10.- Análisis bioinformático para identificar RhoGEFs candidatos activadores de RhoJ	36
Figura 11.- Captura de RhoGEFs con GST-RhoJ-T35N y captura de RhoJ-GTP con GST-PAKN-CRIB	37
Figura 12.- Fenotipo celular asociado a la activación de RhoJ	38
Figura 13.- RhoJ pertenece a la familia de Cdc42 integrada por: Cdc42, RhoQ y RhoJ. Existen 63 RhoGEFs que potencialmente podrían activar a RhoJ	51
Figura 14.- La ITS1 se expresa en endotelio y existe descrito un complejo estructural con Cdc42	52

Figura 15.- La Alanina 41 en la interface de interacción de Cdc42 con ITSN1 es conservada únicamente por la familia de Cdc42, por lo que posiblemente RhoGEFs que conserven ese sitio de interacción tendrán mayor posibilidad de activar a RhoJ	53
Figura 16.- Los RhoGEFs, ITSN1, ITSN2, PLEKHG1, ARHGEF15, ARHGEF7, NGEF y ARHGEF5 surgen como principales candidatos activadores de RhoJ	54
Figura 17.- RhoJ tiene su mayor activación a los 60 minutos cuando se estimulan células endoteliales con medios condicionados de células tumorales	56
Figura 18.- Obtención de la proteína de fusión GST-RhoJ-T35N	57
Figura 19.- ITSN1 y ARHGEF1 activan a RhoJ por interacción directa	58
Figura 20.- RhoJ se expresa en un 33% de células endoteliales PAE transfectadas en las que promueve cambios en la morfología de las células	59
Figura 21.- Las células endoteliales de aorta porcina (PAE) presentan una morfología alargada con pocas extensiones tipo filopodios	60
Figura 22.- La expresión de RhoJ en células endoteliales de aorta porcina (PAE) cambia la morfología de las células, aumenta el número y longitud de filopodios	60
Figura 23.- La expresión de RhoJ Q79L en células endoteliales de aorta porcina (PAE) aumenta el número de filopodios con respecto a RhoJ y las células conservan la morfología similar a lo observado con RhoJ	61
Figura 24.- La expresión de RhoJ T35N en células endoteliales de aorta porcina (PAE) regresan a su morfología inicial con la supresión de filopodios	62
Figura 25.- La expresión de RhoJ en células endoteliales favorece la formación de filopodios	63

Resumen

RhoJ es una GTPasa de la familia de Rho que se ha encontrado sobreexpresada en el endotelio tumoral y participa en proceso angiogénicos. Debido a esto, se ha considerado el potencial terapéutico de inhibir a RhoJ o bien a sus activadores para evitar el crecimiento y metástasis tumoral. Sin embargo, hasta la fecha se desconocen los activadores de RhoJ, por que el objetivo de este proyecto fue precisamente identificar RhoGEFs activadores de la GTPasa RhoJ, cuya señalización pudiera vincularse con la respuesta angiogénica tumoral.

El objetivo se abordó comparando secuencias de las GTPasas de Rho y predicciones basadas en el análisis de un complejo estructural entre un RhoGEF y una RhoGTPasa y selección de candidatos basada en la expresión endotelial de RhoGEFs. Esto permitió identificar candidatos potenciales para activar a RhoJ. Ahí encontramos que RhoJ es homóloga a Cdc42. Tomando como base un modelo estructural de Cdc42 e ITSN1 (DH-PH) se identificaron 7 RhoGEFs como posibles activadores de RhoJ. De estos, se evaluaron 4 en su forma constitutivamente activa, ITSN1, ITSN2, ARHGEF15, ARHGEF5 (DH-PH-RhoGEF-CAAX), los cuales potencialmente activarían a RhoJ por interacción directa. Evaluando la interacción de los RhoGEFs con RhoJ-T35N (dominante negativa) encontramos que sólo ITSN1 e ITSN2 interactúan con RhoJ. Al evaluar un RhoGEF del grupo regulado por proteínas G13 como activador de RhoJ, el ARHGEF1 cuya especificidad se ha reportado por RhoA, sorprendentemente interactuó con RhoJ-T35N. De los tres RhoGEFs que interactuaron con RhoJ, sólo ITSN1 y ARHGEF1 activaron a esta GTPasa en células HEK293T. Puesto que la activación de RhoJ debe ser compatible con procesos angiogénicos, evaluamos la morfología de células endoteliales transfectadas con mutantes de RhoJ. La mutante constitutivamente activa (RhoJ-Q79L) provocó la formación de filopodios en el 50% de las células transfectadas; por el contrario, en células que expresaron la mutante dominante negativa (RhoJ T35N) los filopodios se suprimieron. En conclusión, identificamos a dos RhoGEFs como activadores directos de la GTPasa RhoJ y demostramos que la expresión de esta en células endoteliales conduce a la formación de estructuras en el citoesqueleto que han sido vinculadas a la formación de capilares para el crecimiento y metástasis tumoral.

Palabras Clave: RhoJ, RhoGEFs, Angiogénesis Tumoral, Citoesqueleto Células Endoteliales.

Abstract

RhoJ is a RhoGTPase involved in tumor induced angiogenesis linked to its overexpression in the tumor endothelium. RhoJ is considered an attractive therapeutic target to prevent tumor growth and metastasis. However, the molecular mechanisms that activate RhoJ are currently unknown, but it is predicted to involve specific RhoGEFs that, due to the oncogenic actions of RhoJ, would be considered attractive therapeutic targets. Therefore, our main goal was to identify RhoJ-GEFs potentially involved in tumor angiogenesis.

We compared the sequences of all RhoGTPases and analyzed them together with available structural data and expression of endothelial of RhoGEFs. We found that RhoJ is highly homologous to Cdc42, the closest GTPase for which a structural complex with one of its activators, ITSN1 (DH-PH), is available. Our analysis revealed the identity of 7 RhoGEFs as possible activators of RhoJ. Then, we assessed constitutively active mutants of 4 RhoGEFs: ITSN1, ITSN2, ARHGEF15, and ARHGEF5 (DH-PH-RhoGEF-CAAX) as activators of RhoJ, based on their potential interaction with RhoJ-T35N (dominant negative). From those, only ITSN1 and ITSN2 interacted with RhoJ. Besides, a G13-regulated RhoGEF, ARHGEF1, considered specific for RhoA, surprisingly interacted with RhoJ-T35N. Two of them, ITSN1 and ARHGEF1, activated RhoJ in HEK293T cells. Since the activation of RhoJ should be compatible with angiogenic processes, we analyzed the morphology of endothelial cells transfected with RhoJ mutants. Interestingly, 50% of cells transfected with constitutively active RhoJ (RhoJ-Q79L) presented filopodia, which was absent in cells expressing dominant negative RhoJ (RhoJ-T35N). In conclusion, we identified two RhoGEFs as direct activators of RhoJ and demonstrated that endothelial cells expressing a constitutively active mutant of this GTPase showed cytoskeletal changes that have been linked to the formation of capillaries in tumors.

Keywords: RhoJ, RhoGEFs, Tumor Angiogenesis, Endothelial Cell cytoskeleton.

Identificación de activadores de la GTPasa RhoJ, potencialmente relevantes en la angiogénesis tumoral.

Angiogénesis.

El sistema vascular es importante para el transporte de gases, líquidos, nutrientes, moléculas de señalización, desechos y células inmunes que circulan por los tejidos y órganos, siendo fundamental para la comunicación intercelular que garantiza el mantenimiento saludable de un organismo y la sobrevivencia de las células que lo constituyen (Adams and Alitalo 2007; Potente, Gerhardt et al. 2011; Stapor, Wang et al. 2014). Está formado por células endoteliales que recubren el interior de la superficie vascular, manteniendo la homeostasis del organismo sano. Forma barreras celulares como la barrera hematoencefálica, vasos de glándulas, válvulas linfáticas que controlan el transporte transendotelial (Adams and Alitalo 2007; Potente, Gerhardt et al. 2011). Para facilitar el transporte, los capilares extienden su red vascular mejorando el intercambio de gases y productos metabólicos, requeridos para procesos de crecimiento y remodelado celular (Adams and Alitalo 2007).

Durante el desarrollo embrionario, las células progenitoras endoteliales (angioblastos) se diferencian en células endoteliales ensamblando el plexo vascular primario, en un proceso conocido como vasculogénesis. Posterior a esta formación primaria, la red vascular se extiende por un proceso de surgimiento, ramificación y remodelado de arterias y venas formando una red vascular más elaborada y madura, proceso conocido como angiogénesis (Fraisl, Mazzone et al. 2009; Potente, Gerhardt et al. 2011). La estabilización de la red vascular se produce por reclutamiento de pericitos y células musculares lisas que envuelven los nuevos vasos proporcionándoles estabilidad, suprimiendo la proliferación celular y regulando la perfusión (Figura 1) (Carmeliet and Jain 2011).

La angiogénesis es por lo tanto una morfogénesis vascular, involucra la ramificación de células endoteliales formando una nueva red vascular y la formación del lumen (Bryan and D'Amore 2007), coordinado por la liberación de agentes angiogénicos como el VEGF y angiopoyectinas que funcionan como agentes quimiotácticos que conducen a la diferenciación, proliferación y ensamblaje de células endoteliales en estructuras vasculares (Adams and Alitalo 2007; Fraisl, Mazzone et al. 2009).

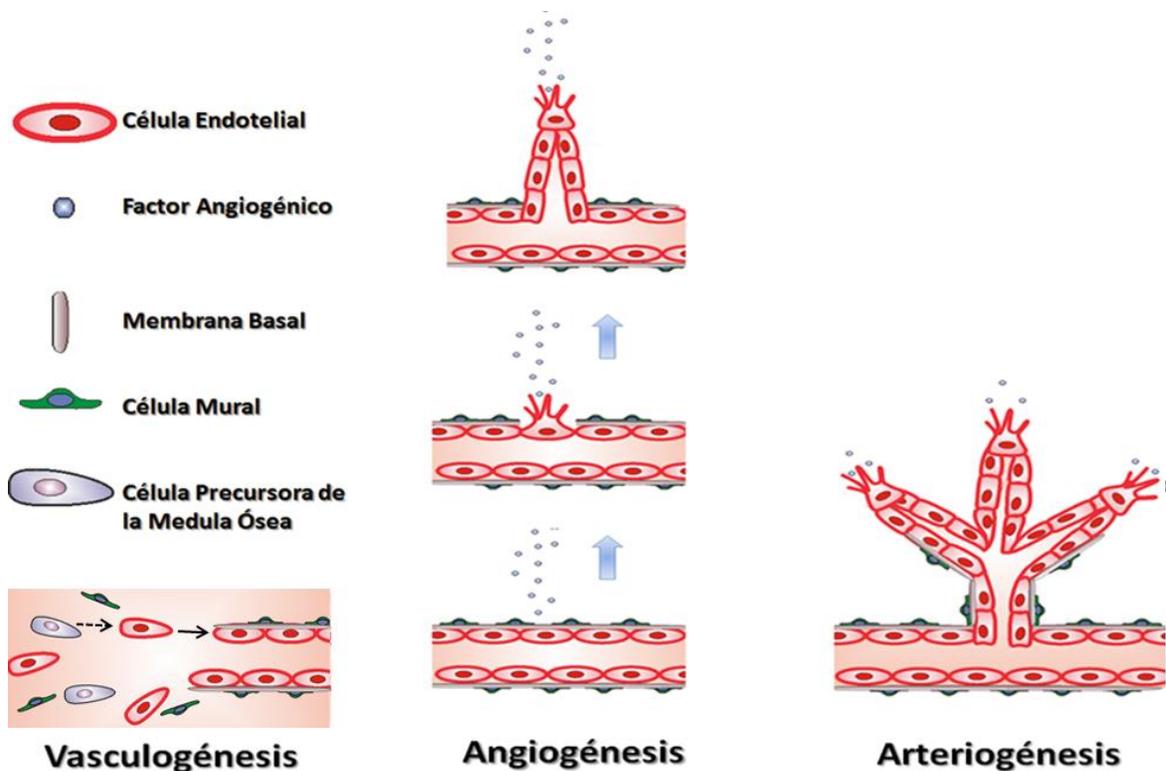


Figura 1.- Procesos que involucran la formación de nuevos vasos sanguíneos. La formación del plexo vascular inicial es mediada por la vasculogénesis con la participación de células progenitoras endoteliales, que son células precursoras de la médula ósea que dan origen a células endoteliales y células murales. Del plexo vascular primario surge, se ramifica y remodela la red vascular en un proceso conocido como angiogénesis. La arteriogénesis proporciona la estabilidad y madurez de la nueva red vascular.

En el adulto, los vasos raramente forman nuevas ramificaciones. Sin embargo, las células endoteliales pueden responder a señales angiogénicas bajo ciertas condiciones, como la reparación tisular (Potente, Gerhardt et al. 2011). Cuando los vasos quiescentes detectan una señal angiogénica, los pericitos se desprenden de la pared vascular y se liberan metaloproteinasas (MMPs) que degradan la matriz extracelular con la pérdida de uniones celulares estrechas y adherentes. Este proceso permite la creación de espacios entre los bordes, facilitando el flujo de fluidos y macromoléculas a través del endotelio (Bryan and D'Amore 2007; Carmeliet and Jain 2011).

Durante el crecimiento angiogénico ciertas células endoteliales son seleccionadas para dirigir el crecimiento vascular. Estas células endoteliales son llamadas células Tip (líder) y responden a la señal angiogénica por medio de estructuras dinámicas llamadas filopodios y lamellipodios, cuya estructura intracelular está constituida por polímeros de actina, que dirigen la migración evitando

crecimientos descontrolados que alteren la integridad y perfusión tisular (Adams and Alitalo 2007; Carmeliet and Jain 2011). En este contexto, es importante la vía de señalización del VEGF a través de sus receptores VEGFR-2 y 3 que se activan en las células líder, la señalización del VEGF induce la expresión de la vía de Notch que reduce la sensibilidad al VEGF en las células Stalk (seguidoras) que constituyen el cuerpo del brote emergente (Plate, Scholz et al. 2012). La vía Notch juega un papel importante en este proceso, su receptor Notch 1 se expresa en células endoteliales y parece ser clave en el desarrollo angiogénico (Adams and Alitalo 2007; Potente, Gerhardt et al. 2011; Plate, Scholz et al. 2012). De los ligandos de Notch, el Delta 4 (DII4) es importante en el proceso angiogénico ya que contribuye a mantener la estructura de un brote al influir en que las células líderes y sus seguidoras tengan una respuesta diferenciada a los estímulos angiogénicos, requerida para coordinar la prevalencia del brote angiogénico en la célula líder. Las células Stalk expresan otro ligando de la vía de Notch, Jagged1, que antagoniza al ligando DII4, perdiendo su capacidad de activar la vía de Notch en células adyacentes a las células Tip. Este proceso permite seleccionar una célula Tip líder que detecte la señal angiogénica en tanto que sus seguidoras (las células Stalk) preferencialmente proliferan. Los ligandos DII4 y Jagged1 tienen efectos opuestos en el crecimiento capilar, siendo moduladores de diferentes señales pro y anti angiogénicas (Benedito, Roca et al. 2009) e integran la transición dinámica de los fenotipos de células Tip y Stalk (Figura 2) (Potente, Gerhardt et al. 2011).

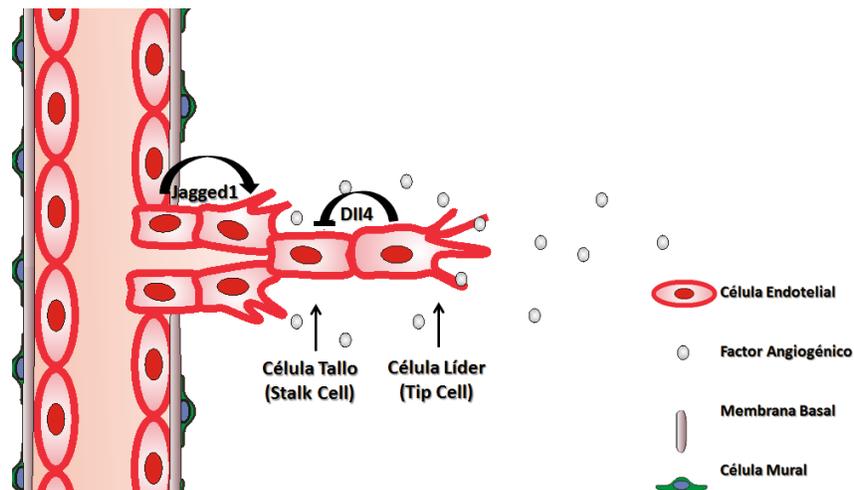


Figura 2.- El brote angiogénico es mediado por una célula líder (Tip Cell) que dirige la extensión vascular de manera ordenada. En este proceso, la vía Notch juega un papel clave, su ligando delta 4 (DII4) permite mantener la selección de una célula líder que dirija el crecimiento vascular. Las células Tallo (Stalk Cell) liberan otro ligando de la vía Notch, Jagged1 que antagoniza el ligando delta 4 (DII4). De esta manera se regula el brote angiogénico controlando los fenotipos celulares Tip y Stalk a través de diferentes señales pro y anti angiogénicas.

Una vez que el brote capilar se ha extendido se forma el lumen y se fortalece mediante la incorporación de pericitos, células murales que se incorporan en la pared vascular, estabilizando las nuevas conexiones vasculares reduciendo la proliferación, promoviendo la maduración y quiescencia (Adams and Alitalo 2007). Además de la importancia de la angiogénesis en la neovascularización normal, en condiciones neoplásicas favorece el crecimiento tumoral, un proceso conocido como angiogénesis tumoral.

Angiogénesis tumoral.

La angiogénesis en condiciones neoplásicas proporciona el ambiente adecuado para el crecimiento tumoral y la metástasis. Los tumores promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos reclutando células endoteliales para la formación de capilares en la vecindad del tumor (Figura 3) (Potente, Gerhardt et al. 2011; Takase, Matsumoto et al. 2012).

La formación de capilares que crecen con los tumores resulta de una pérdida en el balance entre señales pro-angiogénicas y anti-angiogénicas. La pérdida de este equilibrio conduce al desarrollo de la vasculatura tumoral, que se caracteriza por presentar estructuras anormales con funciones alteradas que no garantizan una buena perfusión, requerida para el transporte de sustancias y el intercambio gaseoso (Bergers and Benjamin 2003; Potente, Gerhardt et al. 2011).

Los tumores utilizan diferentes mecanismos para aprovecharse del sistema vascular, entre estos mecanismos tenemos los siguientes:

- **Angiogénesis por ramificación de la vasculatura existente.** Este es el principal mecanismo de vascularización tumoral. Los capilares se forman a partir de los vasos ya existentes y se extienden en respuesta a la señal angiogénica tumoral (Plate, Scholz et al. 2012).
- **Co-optación vascular.** Las células tumorales se infiltran en tejidos normales y adoptan la vasculatura ya existente produciendo fenotipos invasivos (Plate, Scholz et al. 2012). En este proceso los tumores cooptan a la vasculatura adyacente obteniendo una segunda vasculatura con pérdida de masa tumoral. Este proceso es inducido como un medio para evitar los mecanismos de defensa del huésped que producen regresión tumoral (Holash, Maisonpierre et al. 1999).
- **Intususcepción vascular.** Este término se refiere a la formación y remodelado de nuevos vasos por invaginación y división del plexo capilar preexistente, sin la proliferación de células endoteliales (Djonov, Schmid et al. 2000; Plate, Scholz et al. 2012). En este proceso los capilares se expanden por inserción de tejido transcapilar y se forma el tronco vascular involucrando cuatro etapas: 1) demarcación de futuros vasos, 2) formación de septos, 3) delineación, segregación, crecimiento y extracción de nuevas entidades vasculares por fusión de septos y 4) formación de la red vascular completando el crecimiento y maduración de los componentes repitiendo sucesivamente el proceso (Djonov, Schmid et al. 2000).
- **Mimetismo vascular.** En este proceso las células tumorales sustituyen a las células endoteliales formando la vasculatura tumoral (Plate, Scholz et al. 2012). Esta plasticidad

de las células tumorales mimetizando estructuras vasculares ha sido implicada en procesos metástasis de varios tipos de tumorales (Liu, Zhang et al. 2011).

- Vasculogénesis por precursores endoteliales de la médula ósea. Los tumores reclutan precursores de células endoteliales que se integran en la pared vascular y se diferencian en células endoteliales (Plate, Scholz et al. 2012). Estas células progenitoras proporcionan instrucciones (liberación de factores angiogénicos) y soporte estructural (incorporación vascular) para estabilizar la vasculatura tumoral y producir macrometástasis (Rafii and Lyden 2008).
- Vasculogénesis derivada de células madre cancerígenas. Las células cancerígenas se integran en la pared vascular y posteriormente sufren una transdiferenciación para formar células endoteliales (Plate, Scholz et al. 2012). En el endotelio vascular se han encontrado grupos de células tumorales que producen una gran vascularización. Estas células cancerígenas interactúan estrechamente con el nicho vascular promoviendo la angiogénesis a través de la liberación de factores angiogénicos como el VEGF y el factor derivado del estroma (SDF1) (Ricci-Vitiani, Pallini et al. 2010).
- Angiogénesis tumoral por células derivadas de la médula ósea. Células derivadas de la médula ósea, como los monocitos y macrófagos, se polarizan ejerciendo diversas funciones, entre ellas, la secreción de una variedad de factores pro-angiogénicos que inducen la formación de la vasculatura tumoral (Plate, Scholz et al. 2012). Otras células de este tipo expresan mediadores que modulan el reclutamiento de leucocitos, con la subsecuente liberación de citocinas pro-inflamatorias que inducen la angiogénesis tumoral (Grivennikov, Greten et al. 2010).

Estos procesos requieren que los diversos tipos celulares involucrados cambien su forma y se muevan en dirección de diferentes estímulos quimiotácticos, entre ellos factores angiogénicos tumorales reconocidos por receptores que mediante la activación de cascadas intracelulares de señalización polarizan a las células que se desplazan en una dirección particular.

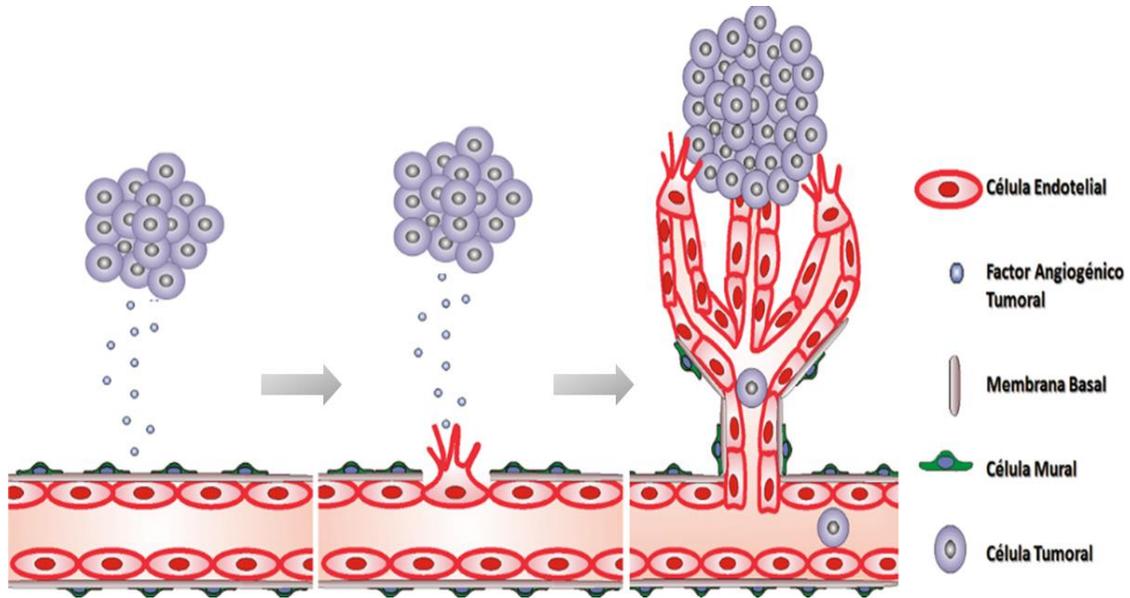


Figura 3.- La angiogénesis facilita el crecimiento y metástasis tumoral. Los tumores liberan factores angiogénicos tumorales que son reconocidos por receptores de membrana en las células endoteliales. Estos activan cascadas de señalización que inducen la degradación de la membrana basal. La degradación de la membrana basal permite la migración de células endoteliales para formar una nueva red vascular. Esta red vascular tumoral facilita el crecimiento del tumor y la metástasis.

Migración celular polarizada.

La migración celular es un proceso necesario para la formación, desarrollo, morfogénesis y diferenciación de tejidos y órganos. En este proceso se ven involucrados diversos tipos de células, entre ellas tenemos a células epiteliales, endoteliales y neuronales, entre muchas otras que migran favoreciendo el desarrollo de tejidos y órganos en etapas embrionarias y post-embrionarias (Etienne-Manneville and Hall 2002; Friedl and Wolf 2010).

La migración de células endoteliales es indispensable para la formación del plexo vascular durante la embriogénesis; sin embargo, en etapas postembrionarias su migración disminuye, pero se reactiva bajo ciertas condiciones como daño tisular y neoplasias. La migración celular es pues un proceso básico fundamental en distintos contextos en los que es regulada por diversas señales extracelulares. Existen procesos migratorios de células individuales como los leucocitos o colectiva como en la formación de órganos y tejidos (Friedl and Wolf 2010).

La migración es un proceso importante y puede ser clasificada en base a patrones moleculares: organización del citoesqueleto, interacciones célula-matriz, fuerza de generación y modificaciones estructurales derivadas de la migración (Friedl and Wolf 2010).

Basados en estos parámetros, los tipos de migración celular se clasifican en dos categorías:

- **Migración simple/individual (mesenquimal o ameboide).** La migración mesenquimal se caracteriza por la morfología alargada de las células involucradas en este proceso y requiere de proteólisis extracelular. La migración ameboide se puede subdividir en dos subtipos dependiendo de la morfología de las células en movimiento: ameboide circular; donde la migración se realiza utilizando el sustrato quimioatrayente como guía para el movimiento, y ameboide circular-alargado; donde se generan filopodios ricos en actina que forman un borde de avance con la pérdida de adhesiones focales y la formación de fibras de estrés (Sanz-Moreno and Marshall 2009; Friedl and Wolf 2010).
- **Migración colectiva (multicelular o colectivo).** La migración colectiva puede ser dividida en dos subtipos: migración multicelular en la que existen contactos célula-célula formando una cadena migratoria, y migración colectiva en la que se forman estructuras multicelulares como tubos, hebras, formas irregulares, masas o láminas (Friedl and Wolf 2010).

La migración simple o individual permite la incorporación de células en tejidos locales o distantes, contribuyendo al cumplimiento de diversas funciones como la respuesta inmune. La migración colectiva es indispensable en procesos fisiológicos como la formación y remodelado de tejidos,

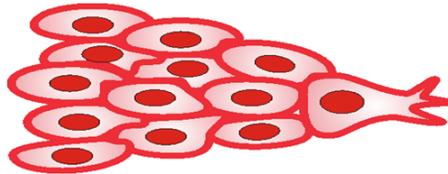
órganos tales como glándulas y la red vascular (Friedl and Wolf 2010). Estos tipos de migraciones celulares se consideran movimientos interconvertibles que reflejan la existencia de mecanismos de plasticidad celular (Figura 4) (Sanz-Moreno and Marshall 2009).

A) Migración Simple/Individual



Respuesta inmune, incorporación de células individuales en órganos o tejidos

B) Migración Colectiva/multicelular



Morfogénesis, desarrollo, reparación de órganos y tejidos.

Figura 4- Tipos de migración celular. A) Las células pueden migrar individualmente para incorporarse en tejidos y órganos distantes cumpliendo ciertas funciones específicas como la respuesta inmune. B) La migración celular colectiva cumple funciones en la formación y reparación de órganos y tejidos. En ambos tipos de migración las células modifican su citoesqueleto de actina.

Tanto la migración individual como la colectiva requieren de señales celulares que dirijan a las células a su destino final. Durante la angiogénesis, por ejemplo, las células endoteliales reconocen factores angiogénicos que sirven como estímulo para su migración y formación de nuevos vasos sanguíneos. Dependiendo de la disponibilidad en el medio de estos factores, ya sea solubles o fijados a sustratos, dan lugar a movimientos polarizados clasificados a distintas categorías (Figura 5) (Lamallice, Le Boeuf et al. 2007):

- Quimiotaxis. Este tipo de migración es conducida por un gradiente de quimioattractores solubles como los factores de crecimiento; por ejemplo, el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y las angiopoyectinas, por mencionar algunos (Lamallice, Le Boeuf et al. 2007). En este proceso, el VEGF es el factor representativo para procesos de neovascularización. Las células endoteliales reconocen al VEGF por medio de receptores que se localizan en la membrana plasmática. Dichos receptores son conocidos como receptores para el VEGF o VEGFRs. Una vez que los VEGFRs reconocen a su ligando, forman homodímeros y heterodímeros sufriendo un proceso de transfosforilación en la cara citosólica de la membrana. La fosforilación de los receptores promueve el reclutamiento de proteínas que participan en vías de señalización que conducen a la

migración de células endoteliales (Lamallice, Houle et al. 2006; Olsson, Dimberg et al. 2006).

- **Haptotaxis.** Este tipo de migración se activa en respuesta a un gradiente de ligandos inmovilizados de diversos componentes de la matriz extracelular. El endotelio vascular está asentado sobre una base de matriz extracelular, dependiendo de su naturaleza, puede promover o inhibir la migración endotelial. Muchos de los componentes de la matriz extracelular, como la fibrina y el colágeno I, se encuentran asociados a procesos de migración. Esta migración es importante en la reparación de tejido vascular (Lamallice, Le Boeuf et al. 2007).
- **Mecanotaxis.** Esta migración es generada por fuerzas mecánicas, como la fuerza de estrés o tensión, que ocurre por el contacto de fluidos con las células endoteliales que forman los vasos sanguíneos. El contacto continuo del fluido sanguíneo con el endotelio forma una fuerza de estrés por la presión ejercida sobre las células endoteliales, lo que inicia y modula la extensión, adhesión y retracción de dichas células. Esta fuerza de estrés influye en el desarrollo y remodelado vascular a través de la creación de complejos mecanosensores que involucran la activación de integrinas. Las integrinas regulan vías de señalización con la participación de diversas proteínas que regulan la dinámica del citoesqueleto (Olsson, Dimberg et al. 2006; Lamallice, Le Boeuf et al. 2007). Como resultado de esta fuerza de estrés, las células endoteliales migran por el intersticio, disociando contactos celulares y activando vías de señalización que remodelan el citoesqueleto de una manera polarizada (Lamallice, Le Boeuf et al. 2007).

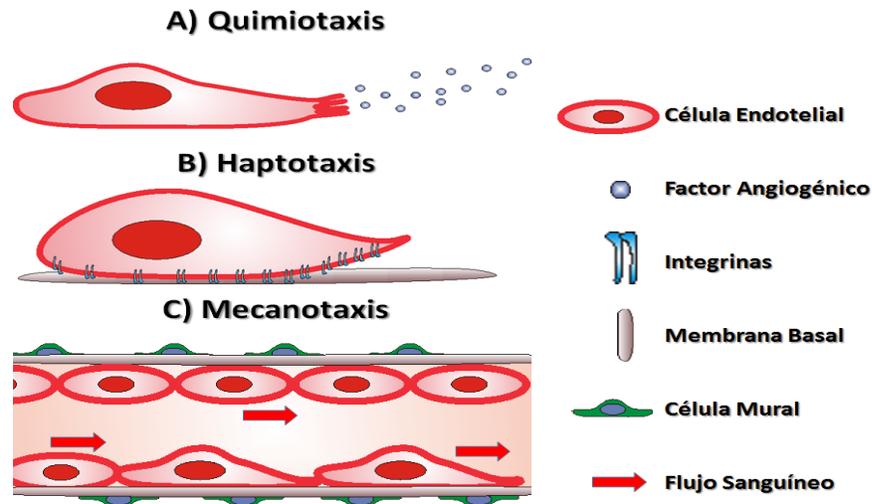


Figura 5.- Factores que estimulan la migración celular polarizada. Diversos estímulos activan receptores en las células endoteliales que transducen la señal coordinando la migración de células endoteliales para la formación de nuevos vasos sanguíneos. A) En la quimiotaxis las células responden a un gradiente de quimioattractores solubles como los factores angiogénicos. B) En la haptotaxis un gradiente de ligandos inmovilizados como las proteínas de matriz extracelular dirigen la dirección de la migración. C) La mecanotaxis es controlada por fuerzas mecánicas producidas por el rozamiento de fluidos como la sangre y las células endoteliales que forman los capilares.

La migración celular es una integración de estos mecanismos que producen cambios en el citoesqueleto. El citoesqueleto está compuesto por diversos componentes como la actina. La actina está compuesta por subunidades monoméricas que se ensamblan, polimerizan y elongan formando filamentos, y pueden estar acoplados a un ciclo repetitivo de contracción actinomiocina. Este proceso origina protrusión de la membrana, interacción con el ambiente extracelular, translocación y retracción celular, dando lugar al desplazamiento celular. La pérdida de uniones célula-célula mediadas por cadherinas y la liberación de proteasas que remuevan el tejido circundante son requisitos indispensables para dar lugar a la migración celular (Farooqui and Fenteany 2005; Lamalice, Le Boeuf et al. 2007; Friedl and Wolf 2010).

La dinámica de actina es controlada por un gran número de proteínas y efectores de una transducción de señales que modula el estado del citoesqueleto, entre estas proteínas se encuentran las GTPasas de la familia de Rho (Farooqui and Fenteany 2005; Lamalice, Le Boeuf et al. 2007). La activación de estas GTPasas produce la polarización de la célula, procesando las señales de una manera dependiente del espacio y tiempo, transmitiendo la información al citoesqueleto propiciando cambios morfológicos (Monypenny, Zicha et al. 2009).

GTPasas de la familia de Rho.

Las GTPasas son proteínas que funcionan como interruptores moleculares que controlan diversos procesos celulares. Las GTPasas de la superfamilia de Ras (también conocidas como GTPasas monoméricas pequeñas) son particularmente interesantes en el ámbito biológico ya que funcionan como reguladores clave de muchos aspectos del comportamiento celular. Este grupo de GTPasas monoméricas pequeñas está formado por 167 proteínas que se pueden clasificar en 5 grupos principales: 39 de Ras, 22 de Rho, 65 de Rab, 30 de Arf y 1 de Ran. Además se incluyen 10 proteínas más cuya secuencia no permite clasificarlas en alguno de los grupos anteriores (Etienne-Manneville and Hall 2002; Rojas, Fuentes et al. 2012). Las GTPasas de Ras regulan la proliferación, diferenciación, morfología y apoptosis, las de Rab están involucradas en el transporte y tráfico de proteínas vía endocitosis, secreción y tráfico entre organelos, las de Ran están vinculadas con el transporte nuclear, las de Arf en el tráfico vesicular y las de Rho participan en la regulación del citoesqueleto de actina, progresión del ciclo celular y expresión génica (Rojas, Fuentes et al. 2012). El gen de Rho fue identificado en 1985 y se han descrito 18 genes que codifican para 22 miembros de esta familia en células de mamíferos. Estas GTPasas promueven la reorganización del citoesqueleto de actina, el establecimiento de la polaridad celular, la transcripción génica, la progresión del ciclo celular, la dinámica de microtúbulos, el transporte vesicular a través de la activación de una gran variedad de enzimas efectoras (Etienne-Manneville and Hall 2002; Wennerberg and Der 2004; Ridley 2006).

Al igual que otras GTPasas, los miembros de la familia de Rho, o RhoGTPasas, actúan como interruptores moleculares cuyo estado activo corresponde a la forma unida a GTP, en tanto que el inactivo depende de que la GTPasa tenga unido a GDP. El estado activo, por supuesto, es el que lleva a cambios en el citoesqueleto de actina a través de promover la formación de sitios de nucleación que dependen de la interacción de la RhoGTPasas con sus diversas proteínas efectoras. Su activación es mediada por receptores de superficie celular, como los de citocinas, tirosina cinasas, receptores de adhesión y receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Estos generan cascadas intracelulares de señalización que resultan en la activación de RhoGEFs que favorecen el intercambio de nucleótidos de guanina en la RhoGTPasa, promoviendo la liberación de GDP y la incorporación de GTP que la lleva a un estado activo (Figura 6) (Rossman, Der et al. 2005; Ridley 2006; Jaiswal, Dvorsky et al. 2013).

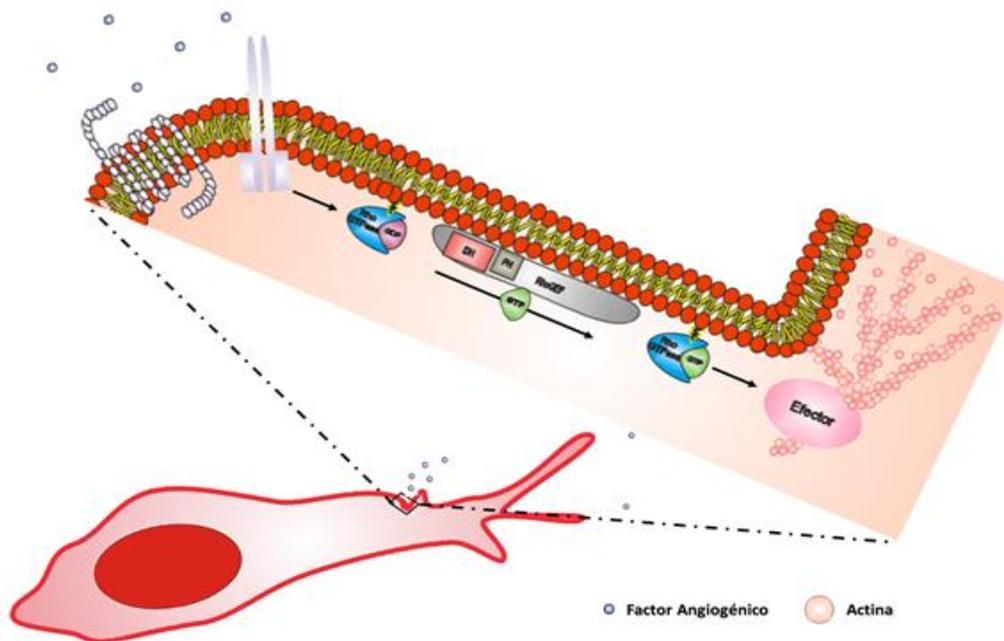


Figura 6.- Las GTPasas de la familia de Rho modulan cambios en la dinámica del citoesqueleto de células endoteliales. Los factores angiogénicos son reconocidos por receptores en la membrana de células endoteliales. Estos transducen la información activando RhoGEFs que, a su vez, activan a RhoGTPasas. Las RhoGTPasas activas transmiten la información a sus efectores modulando el ensamblaje de filamentos de actina, produciendo cambios en el citoesqueleto durante la migración celular.

Las RhoGTPasas tienen un dominio GTPasa con varios motivos conservados, involucrados en la unión e hidrólisis de nucleótidos de guanina, conocidos como regiones Switch. La región Switch 1 interactúa con los RhoGEFs en sus regiones conservadas de CR1 y CR3, siendo la región CR1 crucial para la formación del complejo de intercambio de nucleótido. La región Switch 2 interactúa con CR3 y porciones de la hélice C-terminal en el dominio DH del RhoGEF, contribuyendo a la actividad de intercambio de nucleótido (Rossman, Der et al. 2005; Ridley 2006; Jaiswal, Dvorsky et al. 2013). Algunas GTPasas requieren de magnesio como cofactor para estabilizar su estado activo unido a GTP y proteínas llamadas RhoGAPs favorecen la hidrólisis de GTP inactivando la RhoGTPasa. Estos RhoGAPs por medio de residuos de glutamina y arginina facilitan la incorporación de una molécula de agua para producir la hidrólisis de GTP en GDP y fosfato. De forma excepcional, ciertas RhoGTPasas no obedecen el ciclo de activación e inactivación clásico, entre ellas tenemos a RhoE y RhoH, las cuales tienen baja actividad GTPasa (Kather and Kroll 2013).

Las RhoGTPasas sufren modificaciones postraduccionales como isoprenilación y palmitoilación en el carboxilo terminal, en la caja CAAX (residuos de aminoácidos de Cisteína, Alifático, Alifático y X, no específico). Esta modificación permite su localización en membranas celulares. Además,

pueden ser blanco de fosforilación o ubiquitinación y con esto aumentar su afinidad por inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina de las RhoGTPasas o RhoGDIs. Como consecuencia se puede modificar la estabilidad de estas proteínas, ya sea siendo protegidas o marcadas para su degradación. Sin embargo, el papel de estas modificaciones covalentes en la fisiología normal aún no es claro (Jaffe and Hall 2005; Ridley 2006; Csepanyi-Komi, Levay et al. 2012).

Las GTPasas de la familia de Rho estimulan la protrusión de la membrana induciendo la nucleación y polimerización de filamentos de actina (Ridley 2006). Esto lo hacen a través de su interacción con diversos efectores entre los que se encuentran cinasas de serina-treonina, cinasas de tirosina, cinasas de lípidos, lipasas, oxidasas y proteínas de andamiaje. Además, es posible que las RhoGTPasas sirvan como reclutadoras para la formación y localización de complejos proteicos (Jaffe and Hall 2005). De acuerdo a su identidad, función y estructura, las GTPasas de la familia de Rho se pueden dividir en 8 familias que tienen propiedades similares, pero no idénticas (Wennerberg and Der 2004):

- Subfamilia relacionada con RhoA. En este grupo se encuentra RhoA, RhoB y RhoC las cuales presentan una identidad de secuencia del 85%. Responden a señales extracelulares, como los factores de crecimiento promoviendo la formación de fibras de estrés y adhesiones focales, regulando la forma y motilidad celular (Wennerberg and Der 2004; Wu, Wu et al. 2010). Estas RhoGTPasas son activadas por RhoGEFs e interactúan con sus efectores, entre ellos la cinasa ROCK. Participan en la generación de fuerzas contráctiles mediante fosforilaciones en la cadena ligera de miosina (MLC), promoviendo el movimiento del cuerpo celular siguiendo al borde de avance (Sahai and Marshall 2002; Wennerberg and Der 2004; Jaffe and Hall 2005).
- Subfamilia relacionada con Rac. En este grupo se encuentran Rac1, Rac2, Rac3 y RhoG. Rac 1, 2 y 3 presentan una identidad de secuencia del 88% y divergen en el carboxilo terminal, mientras que RhoG presenta una identidad del 72% con Rac. Estas RhoGTPasas promueven a través de sus efectores WAVE y Arp2/3 la polimerización y formación de filamentos de actina en estructuras llamadas lamellipodios, que se encuentran en el borde de avance de la migración (Wennerberg and Der 2004; Jaffe and Hall 2005; Ridley 2006).
- Subfamilia relacionada con Cdc42. En este grupo se encuentra Cdc42, TC10 (RhoQ), TCL (RhoJ), Chp/Wrch-2 y Wrch-1 que se asocian con estructuras llamadas filopodios, que son protrusiones de la membrana que contienen filamentos de actina. Estas estructuras son

importantes porque detectan señales provenientes del ambiente extracelular y direccionan el movimiento celular (Sahai and Marshall 2002; Wennerberg and Der 2004; Ridley 2006).

- Subfamilia relacionada con Rnd. En este grupo se encuentran Rnd1, Rnd2 y RhoE/Rnd3 que tienen un alto grado de identidad con RhoA, entre el 45-49%; sin embargo sus funciones bioquímicas difieren de la del grupo de RhoA, inhibiendo la formación de fibras de estrés y las adhesiones focales, propiciando la redondez celular (Wennerberg and Der 2004).
- Subfamilia relacionada con RhoBTB. Estas GTPasas son estructuralmente diferentes de otros miembros de la familia de Rho. Tienen secuencias adicionales de dominios BTB en tándem y se han identificado 3 miembros en mamíferos: RhoBTB-1, RhoBTB-2 y RhoBTB-3 (Wennerberg and Der 2004).
- Subfamilia relacionada con Miro. Esta subfamilia consiste de 2 proteínas: Miro-1 y Miro-2. Estas GTPasas se localizan en las mitocondrias y pueden promover la apoptosis. No se han reportado efectos en el citoesqueleto de actina o en la morfología celular (Wennerberg and Der 2004).
- RhoD y Rif. Estas RhoGTPasas están relacionadas en un 48% de identidad, divergen en los efectos en el citoesqueleto de actina. RhoD está implicada en transporte endosomal. Rif promueve la formación de filopodios de una manera independiente de Cdc42, y existe una identidad del 43% entre RhoD y Cdc42.
- RhoH/TTF. Fue identificado como un transcrito quimérico, pero luego se le nombró RhoH porque su expresión es específica de células hematopoyéticas. Su sobreexpresión no tiene efectos en el citoesqueleto de actina (Wennerberg and Der 2004).

Incuestionablemente las RhoGTPasas tienen funciones coordinadas en procesos de migración celular. Siendo Cdc42, Rac1, RhoG, RhoQ, RhoJ, Rac2 y Rac3 importantes reguladores de la morfología, controlando la velocidad y dirección de migración en respuesta a un gradiente quimiotáctico (Monypenny, Zicha et al. 2009). Para producir motilidad celular, las RhoGTPasas conducen a cambios en el citoesqueleto en un ciclo que consiste de 4 procesos:

- Protrusión de la membrana en dirección del borde de avance.
- Adhesión de las protrusiones en dirección del agente quimiotáctico.
- Translocación del cuerpo celular.
- Retracción del cuerpo celular.

En conjunto, las RhoGTPasas participan en este ciclo de manera coordinada, polarizando el movimiento celular (Lazer and Katzav 2011). Debido a que las RhoGTPasas regulan la motilidad celular, alteraciones en su regulación están involucradas con fenotipos invasivos de células tumorales. En este caso, las células tumorales liberan señales proliferativas, llevando al crecimiento inapropiado de tumores. Entre las señales que liberan se encuentran los factores de crecimiento que conducen a la activación de GTPasas de Rho, estos incluyen: factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), ácido lisofosfatídico (LPA), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Sahai and Marshall 2002).

La activación de estas RhoGTPasas promueve la migración e invasión de tumores humanos y su papel patológico está relacionado con su expresión y activación descontrolada (Lazer and Katzav 2011). Las RhoGTPasas son reguladores clave de procesos clínicos relevantes, pero no son atractivos blancos terapéuticos, debido a que se expresan en varios tejidos y órganos y, como se señaló, están vinculadas a procesos fundamentales, lo cual hace pensar que tratar de modularlas farmacológicamente podría dar lugar a efectos indeseados, por lo que la atención se ha enfocado en sus reguladores y efectores (Lazer and Katzav 2011; Kather and Kroll 2013).

Los RhoGEFs por otro lado, surgen como potenciales blancos terapéuticos, el tener como principal papel la regulación de las RhoGTPasas los convierte en sujetos potenciales de estrategias farmacológicas orientadas a combatir cánceres humanos que involucran la activación descontrolada de RhoGTPasas (Lazer and Katzav 2011; Kather and Kroll 2013).

Regulación de la activación de GTPasas de la familia de Rho

Las GTPasas de la familia de Rho participan en procesos fisiológicos modulando el citoesqueleto de actina, sin embargo su sobreexpresión e hiperactividad conduce a la progresión de cánceres humanos. Esto sugiere que sus proteínas reguladoras; GEFs, GAPs y GDIs, también pudieran encontrarse alteradas, promoviendo la progresión del cáncer (Lazer and Katzav 2011). El ciclo coordinado de activación e inactivación de RhoGTPasas indica que su regulación es temporal, balanceada por proteínas inhibitoras; RhoGAPs y RhoGDIs, y estimuladoras de su actividad, RhoGEFs (Figura 7) (Bryan and D'Amore 2007).

Otro mecanismo poco común de regulación de RhoGTPasas es por su expresión y niveles de proteína estables en ciertos tejidos, siendo transcritas solo cuando son necesarias e indicando una función especializada en diferentes tipos celulares (Wennerberg and Der 2004).

RhoGEFs

La familia de RhoGEFs es grande, consiste en aproximadamente 69 miembros pertenecientes a la familia Dbl (*diffuse B-cell lymphoma*) y alrededor de 11 miembros pertenecientes a la familia de Dock (*dedicator of cytokinesis*) (Wennerberg and Der 2004).

Su actividad depende de su regulación espacio-temporal que afecta su eficiencia catalítica, selectividad de sustrato, especificidad estructural, y actividad biológica. Controlan un amplio espectro de funciones celulares en respuesta a distintos estímulos (Jaiswal, Dvorsky et al. 2013). Los RhoGEFs integran y modulan diversas señales controlando selectivamente la activación y localización subcelular de las RhoGTPasas bajo diferentes estímulos. Esta dinámica de las RhoGTPasas aumenta o atenúa la señalización, por lo tanto, hay múltiples RhoGEFs que pueden activar una misma RhoGTPasa y un RhoGEF puede activar más de una RhoGTPasa (Rossman, Der et al. 2005; Garcia-Mata and Burridge 2007). De esta manera los RhoGEFs son atractivos blancos terapéuticos para una gran variedad de condiciones patológicas (Jaiswal, Dvorsky et al. 2013).

Los RhoGEFs clásicos tienen un dominio homólogo a Dbl (DH) que consiste en cerca de 200 residuos de aminoácidos formando de 10 a 15 alfa hélices con tres regiones conservadas (CR1-CR3), su función es la catálisis del intercambio de GDP por GTP en la RhoGTPasa. Los dominios DH difieren en longitud y orientación de la hélice del C-terminal entre los RhoGEFs, pero en todos ellos el dominio DH interactúa con las regiones Switch de la RhoGTPasa correspondiente. Además del dominio DH, existe un dominio homólogo a plekstrina (PH) que contiene cerca de 100 residuos de aminoácidos, localizado en la región C-terminal del dominio DH y su función es facilitar la

activación de la RhoGTPasa. El dominio PH interactúa con fosfoinosítidos en la membrana lipídica, gracias a lo cual orienta al dominio DH para asociarse con la RhoGTPasa, favoreciendo su actividad y le dan cierta especificidad del RhoGEF por determinadas RhoGTPasas (Rossman, Der et al. 2005; Jaiswal, Dvorsky et al. 2013). Además de estos dominios, las proteínas Dbl contienen diversos motivos y dominios estructurales implicados en su regulación y localización subcelular (Jaiswal, Dvorsky et al. 2013).

Los miembros de la familia RhoGEF existen en un estado inactivo o parcialmente activo antes de la estimulación. Su estado puede ser regulado por uno o más mecanismos, como la interacción de dominios DH y PH con lípidos de membrana, interacción con otros dominios reguladores, segundos mensajeros o modificaciones postraduccionales. Estos mecanismos de regulación translocan el RhoGEFs a compartimentos celulares específicos para la activación de determinadas RhoGTPasas, liberándose de autoinhibidores de RhoGEFs o sufriendo cambios alostéricos que repercuten en la actividad catalítica del RhoGEF (Bos, Rehmann et al. 2007; Lazer and Katzav 2011).

RhoGAPs.

La familia de RhoGAPs está compuesta por cerca de 80 miembros codificados en el genoma humano, tienen una amplia diversidad de estructura y secuencia. Existen RhoGAPs específicos para una sola RhoGTPasa, pero también existen RhoGAPs con una amplia especificidad para varias RhoGTPasas (Wennerberg and Der 2004; Braun and Olayioye 2015).

Estas proteínas reguladoras se unen y estimulan la actividad GTPasa terminando la señalización de las RhoGTPasas (Lazer and Katzav 2011; Braun and Olayioye 2015). Para la hidrólisis de GTP se requiere la introducción de una molécula de agua, en este sentido la unión del RhoGAP a la RhoGTPasa es estabilizada por residuos de glutamina en la RhoGTPasa, lo cual, permite la introducción de una molécula de agua y la formación de un estado de transición, donde residuos de arginina del RhoGAP neutralizan las cargas negativas de fosfatos en el sitio activo y permiten la liberación de un fosfato del GTP formando GDP (Bos, Rehmann et al. 2007).

La actividad de los RhoGAPs sobre las RhoGTPasas depende de su regulación. Los RhoGAPs tienen multidominios que permiten las interacciones proteína-proteína, proteína-lípidos e incluso dominios catalíticos y sitios de fosforilación como reguladores de su actividad. La cantidad de RhoGAPs en la célula es otra forma de regulación que depende de la concentración local, afectando su actividad y especificidad (Lazer and Katzav 2011; Braun and Olayioye 2015).

Aunque se ha hecho mayor énfasis de la actividad de los RhoGAPs como reguladores negativos de la actividad de RhoGTPasas, estos pueden actuar como efectores y/o proteínas de andamiaje que integran cascadas de señalización de una manera independiente de su acción GAP (Braun and Olayioye 2015).

RhoGDIs.

Un paso importante para la activación de las RhoGTPasas, es su asociación con la membrana. Este paso es favorecido por modificaciones postraduccionales, como isoprenilaciones, e inhibido por la interacción con RhoGDIs. A diferencia de los RhoGEFs y RhoGAPs, solo unos pocos RhoGDIs se han identificado y difieren en sus afinidades por las RhoGTPasas. (Wennerberg and Der 2004).

Los RhoGDIs regulan la localización subcelular de RhoGTPasas e inhiben la disociación de GDP, se unen a la forma isoprenilada de la RhoGTPasa formando un complejo; RhoGTPasas-GDP/RhoGDI, este complejo secuestra la RhoGTPasa en el citosol en un estado inactivo (Csepanyi-Komi, Levay et al. 2012).

La regulación de la actividad de los RhoGDIs es poco clara, pero se conoce que fosforilaciones en los RhoGDIs tienen un papel clave para la liberación de RhoGTPasas secuestradas. Fosforilaciones en residuos de tirosina de RhoGDIs liberan a Cdc42, mientras que fosforilaciones en residuos de serina liberan a Rac1 (Csepanyi-Komi, Levay et al. 2012). La expresión ubicua de los RhoGDIs parece funcionar como un sistema de control de tráfico entre el citosol y la membrana para las RhoGTPasas (Lazer and Katzav 2011).

La regulación de las RhoGTPasas es fundamental para el control adecuado de su actividad. En este sentido se desconocen los reguladores de muchas RhoGTPasas con relevancia clínica. Dentro de estas RhoGTPasas se encuentra RhoJ. Esta RhoGTPasa ha tomado relevancia clínica en los últimos años por su expresión restringida al endotelio y su sobreexpresión en endotelio tumoral. Lo cual, junto con su participación en la angiogénesis tumoral, la convierte en un atractivo blanco terapéutico para combatir el crecimiento y metástasis tumoral (Kim, Yang et al. 2014).

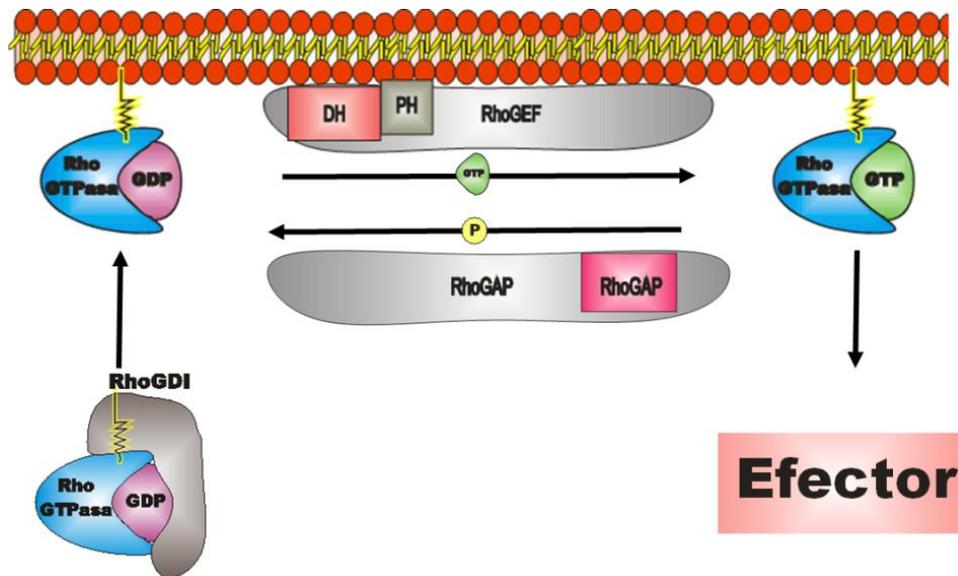


Figura 7.- Ciclo de regulación de la actividad de RhoGTPasas. Las RhoGTPasas son interruptores moleculares que en su estado inactivo tienen unido GDP y en su estado activo GTP. Las RhoGTPasas se localizan en la membrana plasmática gracias a que cuentan con una isoprenilación. Los RhoGEFs sufren cambios en su localización celular cuando son activados, gracias a ello se encuentran con las RhoGTPasas en las membranas celulares. Los RhoGEFs clásicos presentan dominios PH para anclarlos a la membrana y dominios DH que interactúan con la RhoGTPasa intercambiando GDP por GTP, activando la RhoGTPasa. Las RhoGTPasas en su estado activo transducen la señal a sus efectores. La inactivación de RhoGTPasas es mediada por RhoGAPs, que estimulan su actividad GTPasa hidrolizando el GTP en GDP más fosfato. Otras proteínas llamadas RhoGDIs sequestran a las RhoGTPasas, impidiendo su localización en la membrana para ser activadas.

RhoJ

La GTPasa RhoJ fue nombrada inicialmente como TCL/TC10-Like por su homología con TC10 (RhoQ). El nombre de TC10 se debe a su identificación en genes derivados de librerías de teratocarcinoma NTera2 y, por lo tanto, RhoJ al ser parecida a TC10 se nombró TCL/TC10-Like (Drivas, Shih et al. 1990).

Identificación de RhoJ

RhoJ/TCL fue identificada inicialmente como una nueva GTPasa de la familia de Rho por análisis bioinformático y de expresión en tejidos murinos por dos grupos de investigación independientes. El grupo de *vignal et al*, identificaron su expresión en diversos tejidos murinos, encontrando una mayor expresión de RhoJ en corazón y menor en hígado y pulmón. Identificaron que RhoJ tiene un parecido del 85% a RhoQ y 78% a Cdc42, se localiza en el cromosoma 14 y su región codificante la forman 5 exones (Vignal, De Toledo et al. 2000).

De forma independiente el grupo de *Chiang, Hou et al*, al caracterizar isoformas de TC10 en músculo de ratón, identificaron lo que inicialmente se pensó que era una variante más larga de TC10, misma que inicialmente fue llamada TC10 β L y luego conocida como TCL. Las funciones de esta proteína diferían de las isoformas TC10 α , TC10 β que participan en la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática en adipocitos estimulados con insulina (Chiang, Hou et al. 2002).

Efectos en el citoesqueleto y localización subcelular

La mutante activa de RhoJ (Q79L) produce cambios morfológicos en fibroblastos REF-52 formando un fenotipo celular alargado ocasionalmente con extensiones periféricas, ricas en actina tipo filopodios y disminución de la formación de fibras de estrés. La mutante dominante negativa de RhoJ (T35N) produce un ligero incremento de fibras de estrés. Mediante ensayos de interacción se encontró que RhoJ-Q79L reconoce a los dominios CRIB de PAK1 y WASP, efectores que comparte con Cdc42 y RAC1, (Vignal, De Toledo et al. 2000) y en menor grado se encontró la asociación con Rhotekin-GBD, un efector de RhoA (Aspenstrom, Fransson et al. 2004).

Al ser una RhoGTPasa, RhoJ debe localizarse en la membrana celular para ser activada, siendo la caja CAAX indispensable para su localización en diversas membranas, como la plasmática e intracelulares como la de microsomas, en tanto que no fue detectada en membranas de lisosomas. A su vez, se demostró que RhoJ participa en el transporte de endosomas tempranos regulando el movimiento de vesículas dependientes de clatrina (de Toledo, Senic-Matuglia et al.

2003). Mediante inmunofluorescencias se detectó a RhoJ asociado a regiones específicas conocidas como adhesiones focales (Kaur, Leszczynska et al. 2011).

Expresión endotelial

El primer indicio que hizo pensar en la participación de RhoJ en procesos angiogénicos surgió de la identificación de RhoJ como una GTPasa expresada de manera específica en células endoteliales. Esto se obtuvo de un análisis bioinformático y de expresión por PCR en tiempo real, en Células Endoteliales de la Vena Umbilical Humana (HUVECs) y las Células Endoteliales Microvasculares Dérmicas Humanas (HDMECs) (Herbert, Stekel et al. 2008).

El factor transcripcional RGS es responsable de la expresión restringida de RhoJ al endotelio. Este factor transcripcional pertenece a la familia de factores de transcripción ETS que regulan genes involucrados en procesos hematopoyéticos y vasculares. En especial, RGS regula la expresión de genes restringidos al endotelio como la VE-Cadherina (*vascular endothelial cadherin*), endogлина y VWF (*von willebrand factor*) que participan en procesos angiogénicos y formación del lumen. Utilizando siRNAs dirigidos contra el factor RGS se demostró su participación en la formación del lumen en matrices 3D de colágeno. Posteriormente, mediante qPCR se determinó la presencia de transcritos de genes blanco del factor RGS. En particular se identificó a RhoJ, cuya expresión disminuía al utilizar siRNAs de RGS. Utilizando técnicas moleculares, se identificó la región del promotor del gen de RhoJ y se subclonaron regiones conservadas de unión a RGS para posteriormente ser transfectadas en HUVECs con el factor transcripcional RGS. De esta manera se demostró que RhoJ es el principal gen blanco del factor transcripcional RGS, cuya participación es clave para procesos de formación del lumen vascular (Yuan, Sacharidou et al. 2011).

Efectos en células endoteliales

En células endoteliales PAE (células endoteliales de aorta porcina) transfectadas establemente con el receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR β), la GTPasa RhoJ, expresada como una mutante constitutivamente activa RhoJ-Q79L (TCL-L79), produce la formación de estructuras similares a lamelipodios y un aumento de la formación de fibras de estrés (Aspenstrom, Fransson et al. 2004).

Además, RhoJQ79L conduce a la formación de podosomas en las mismas células PAE. Es decir, RhoJ no sólo participa en la formación de filopodios y lamelipodios si no que genera podosomas, localizándose en el núcleo y en anillos pequeños del podosoma (Billottet, Rottiers et al. 2008).

Un estudio realizado en HUVECs demostró la activación de RhoJ en respuesta al factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y su participación en la formación tubular y motilidad de células endoteliales regulando el número de adhesiones focales, fibras de estrés y la contractilidad dependiente de actomiosina, siendo RhoJ un regulador de la vía RhoA/Rock (Kaur, Leszczynska et al. 2011).

Al silenciar la expresión de RhoJ en HUVECs se incrementa el número de adhesiones focales, se altera la formación tubular, integridad vascular y la migración de células endoteliales (Kim, Yang et al. 2014). Por el contrario, expresar una variante constitutivamente activa de RhoJ disminuye el número de adhesiones focales, incrementando rápidamente su desensamble. Mediante ensayos de pulldown y doble híbrido en levadura se determinó que la variante constitutivamente activa de RhoJ interactúa con el complejo GIT-bPIX, mediante el dominio SHD1 de GIT. La formación de este complejo colocaliza con proteínas de adhesiones focales como la vinculina y tiene un papel positivo en la formación tubular (Wilson, Leszczynska et al. 2014).

Participación en la angiogenesis

Modelos murinos en los que se suprimió la expresión de RhoJ tuvieron, durante el desarrollo embrionario, un retardo ligero pero significativo en el crecimiento del área radial de la vasculatura de la retina respecto a ratones cuya expresión de RhoJ no se suprimió. La expresión de RhoJ parece estar restringida a los capilares vasculares y ausente en las arterias de la retina de ratones embrionarios y su depleción no afecta el desarrollo embrionario (Takase, Matsumoto et al. 2012).

Habiendo detectado a RhoJ en células endoteliales de retinas de embriones de ratón, principalmente en venas y capilares, se estudió su participación en procesos angiogénicos en la retina de ratones neonatales. En dicho estudio se encontró a RhoJ mayormente expresado en etapas neonatales, mientras que en etapas postnatales la detección de RhoJ disminuyó. En estas etapas y en condiciones de hipoxia, RhoJ es un integrador de la señalización del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y de Semaforina 3E (Sema3E), controlando la extensión y retracción de filopodios y evitando la desorientación durante la migración de células endoteliales. Sema3E funciona como un regulador negativo del VEGF a través de la activación de RhoJ, controlando la angiogénesis en retinas de ratones neonatos sometidos a estados de hipoxia (Fukushima, Okada et al. 2011).

Al conocer que RhoJ participa en la extensión vascular en retinas de ratones, se estudió su participación en retinas postnatales. En dicho estudio, RhoJ funciona como un regulador negativo

de la red vascular, donde su inactivación conduce a la polimerización de actina favoreciendo la motilidad celular. Utilizando líneas celulares HUVECs y HEK293T se determinó que el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) conduce a la inactivación de RhoJ mediante la participación de ARHGEF15. De esta manera ARHGEF15, promueve la extensión de la red vascular en retinas de ratones postnatales inhibiendo la actividad de RhoJ y favoreciendo la activación de Cdc42 (Kusuhara, Fukushima et al. 2012).

Participación en cancer

RhoJ, además de expresarse en endotelio normal de diversos órganos se encontró sobreexpresada en tejidos neoplásicos. Un análisis de expresión identificó a RhoJ en células endoteliales de tejidos normales y neoplásicos humanos, principalmente en corazón, glándula adrenal, nodos linfáticos, músculo, páncreas, placenta, hígado, pulmón, neoplasias de vejiga, hueso y ovarios (Kaur, Leszczynska et al. 2011).

En modelos murinos de carcinoma de pulmón, mama y melanoma, implantados con células de cáncer de Lewis (LLC), melanoma (B16F10) y mama (PyMT), se observó una sobreexpresión de RhoJ en el endotelio tumoral, sobre todo en regiones peritumorales; en tanto que su expresión fue baja en el estroma tumoral e infrecuente en tejidos adultos. Deficiencias de RhoJ afectan el crecimiento tumoral y su metástasis en etapas tempranas de la tumorigénesis, observándose alteración de la vasculatura tumoral. Estos resultados indican que RhoJ es un regulador clave de la angiogénesis manteniendo la integridad de la vasculatura tumoral (Figura 8) (Kim, Yang et al. 2014).

RhoJ como potencial blanco terapéutico

RhoJ es una GTPasa cuya expresión es restringida al endotelio, la depleción de RhoJ no afecta el desarrollo embrionario, se sobreexpresa en endotelio tumoral y es un regulador clave de la angiogénesis tumoral e integridad de los vasos sanguíneos asociados a tumores (Yuan, Sacharidou et al. 2011; Kaur, Leszczynska et al. 2011; Kim, Yang et al. 2014). Esto convierte a RhoJ en un nuevo blanco terapéutico potencial, cuya inhibición evitaría la formación de nuevos vasos sanguíneos tumorales y favorecería la destrucción de los ya existentes (Kim, Yang et al. 2014).

RhoJ como regulador de quimiorresistencia de células tumorales

RhoJ en células tumorales favorece la quimiorresistencia a la terapia convencional. Utilizando modelos de melanoma (células MNT-1, C8161 y SK-Mel-28), donde se identificó a RhoJ sobreexpresada y asociada con supervivencia de células de melanoma al suprimir la apoptosis mediada por el supresor tumoral p53 y la activación del oncogén Sox10. En respuesta al daño causado en el DNA por cisplatino, de alguna forma no caracterizada, RhoJ es activada y estimula a su efector PAK1 (group 1 PAK Kinases). En consecuencia, PAK1 fosforila a la cinasa Plk1 (polo-like kinasa 1) y ésta a una proteína de andamiaje llamada clapsina, lo que conduce a su degradación vía proteosoma. La expresión de clapsina es necesaria para detener el ciclo celular y llevar a la apoptosis a células cuyo DNA ha sido dañado de forma irreversible, por lo que su degradación dependiente de la activación de RhoJ tiene un efecto oncogénico (Ho, Aruri et al. 2012).

RhoJ es un regulador de la migración e invasión de células de melanoma por medio de la activación de PAK1. PAK1 activa a la cinasa LIMK que inhibe a la cofilina, la cual, promueve el corte de filamentos de actina, favoreciéndose la polimerización de filamentos de actina. Por otro lado, PAK1 activa a la proteína p-41ARC quien por medio del complejo ARP2/3 favorece el ensamblaje de filamentos de actina. De esta manera RhoJ modula cambios en el citoesqueleto de células de melanoma favoreciendo su migración e invasión produciendo fenotipos más agresivos (Ho, Soto Hopkin et al. 2013).

RhoJ es una GTPasa con relevancia clínica para prevenir el crecimiento y metástasis tumoral. Su activación es mediada por un RhoGEF, esta activación induce su participación en procesos angiogénicos tumorales. Debido a su importancia como integradores de transducción de señales, los RhoGEFs surgen como atractivos blancos terapéuticos para controlar la transmisión de esa información al citoesqueleto, controlando procesos como la migración celular, indispensable para la llevar a cabo la angiogénesis tumoral.

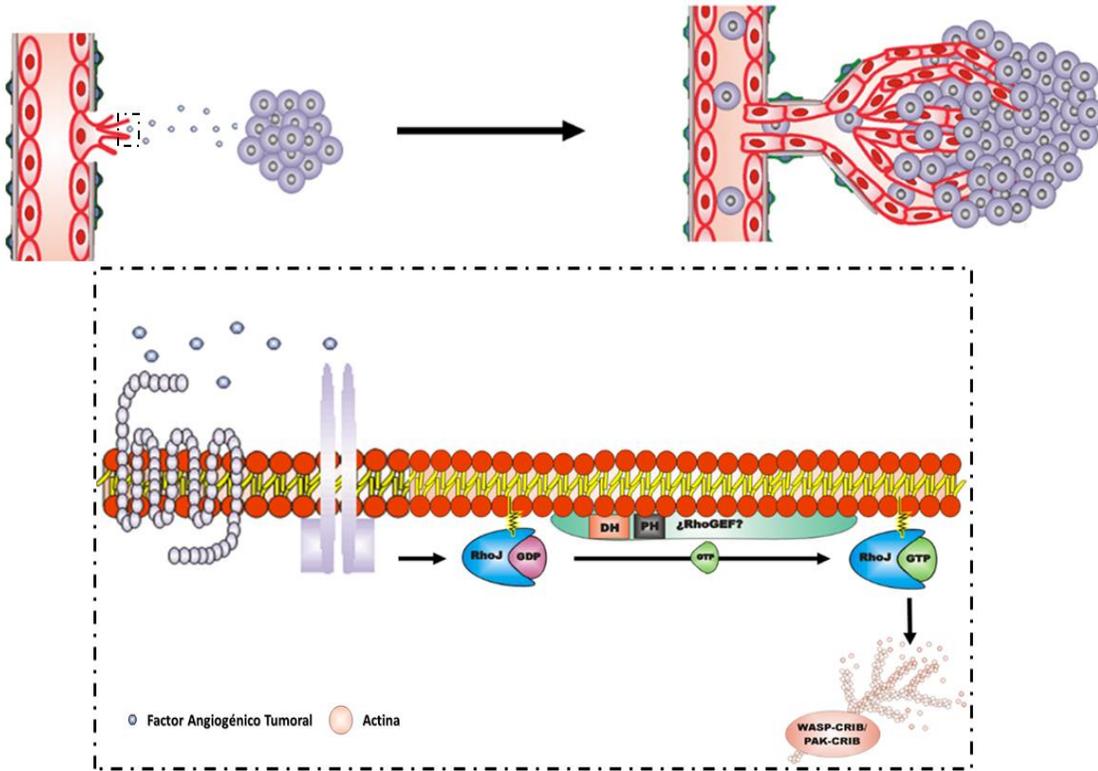


Figura 8.- RhoJ es una RhoGTPasa que regula la angiogénesis tumoral. Los tumores liberan factores angiogénicos que son reconocidos por receptores de membrana. Estos receptores transducen la señal generando cascadas que llevan a la activación de RhoJ, lo que involucraría la participación de uno a varios RhoGEF hasta ahora no identificados. RhoJ transmite la información a sus efectores WASP-CRIB, PAK1-CRIB. Estos efectores modulan el citoesqueleto favoreciendo la migración de las células endoteliales y la formación de vasculatura tumoral. Con la complicidad de RhoJ el tumor crece y hace metástasis.

Justificación

La formación de capilares sanguíneos es un proceso relevante en el desarrollo y regeneración tisular en etapas tempranas y posteriores al desarrollo embrionario, dicho proceso se conoce como angiogénesis. En tejidos tumorales, la angiogénesis se convierte en un proceso no deseado que requiere ser controlado porque favorece el crecimiento de los tumores y su metástasis.

La angiogénesis involucra la migración de células endoteliales conducidas por factores angiogénicos, contribuyendo de esta manera a la formación de nuevos vasos en el estroma tumoral. Las células endoteliales modifican la dinámica de su citoesqueleto para poder dirigirse hacia las señales angiogénicas tumorales. En este contexto, se ha considerado que las GTPasas de la familia de Rho son esenciales, ya que es ampliamente reconocida su participación en procesos que controlan la dinámica del citoesqueleto y la migración celular. Una de estas GTPasa, RhoJ, se ha encontrado expresada de manera restringida en células endoteliales y su sobreexpresión en el endotelio de diferentes tipos de tumores favorece el crecimiento y metástasis tumoral.

Por lo tanto, RhoJ se ha propuesto como un interesante blanco terapéutico para suprimir el crecimiento y la metástasis tumoral en combinación con la quimioterapia convencional. Sin embargo, se desconocen los reguladores involucrados en la activación de esta GTPasa. Por supuesto, considerando los mecanismos generales de regulación de GTPasas de la familia de Rho, es de esperarse que RhoJ requiera de GEFs que la activen al promover el intercambio de GDP por GTP.

Inherente a esto, surge el interés por identificar a los reguladores de la actividad de RhoJ, abordando diferentes estrategias que nos permitan delimitar el número de candidatos posibles, tomando un mayor enfoque en aquellos candidatos activados en la angiogénesis tumoral que pudieran conducir a la activación de RhoJ y su participación en crecimiento y metástasis tumoral. Esto nos permitirá aumentar el conocimiento sobre los mecanismos moleculares reguladores de la angiogénesis tumoral y proponer nuevos blancos terapéuticos en la batalla contra el cáncer.

Hipótesis:

Los activadores de la GTPasa RhoJ, potencialmente relevantes en la angiogénesis tumoral, pueden ser identificados por un análisis de homologías, estructuras, expresión e interacciones directas entre RhoGEFs y RhoJ, además de sus efectos en células endoteliales vinculados a una respuesta angiogénica.

Objetivo general:

Identificar los RhoGEFs potencialmente vinculados a una respuesta angiogénica tumoral activando la GTPasa RhoJ en células endoteliales.

Objetivos específicos:

1. Identificar RhoGEFs para RhoJ utilizando criterios de homología, parecido estructural y expresión con GTPasas de la familia de Rho durante un proceso de angiogénesis tumoral.
2. Identificación de RhoGEFs por interacción directa con RhoJ potencialmente relevantes en la angiogénesis tumoral.
3. Repercusión funcional a nivel celular de la activación de RhoJ vinculados a una respuesta angiogénica tumoral.

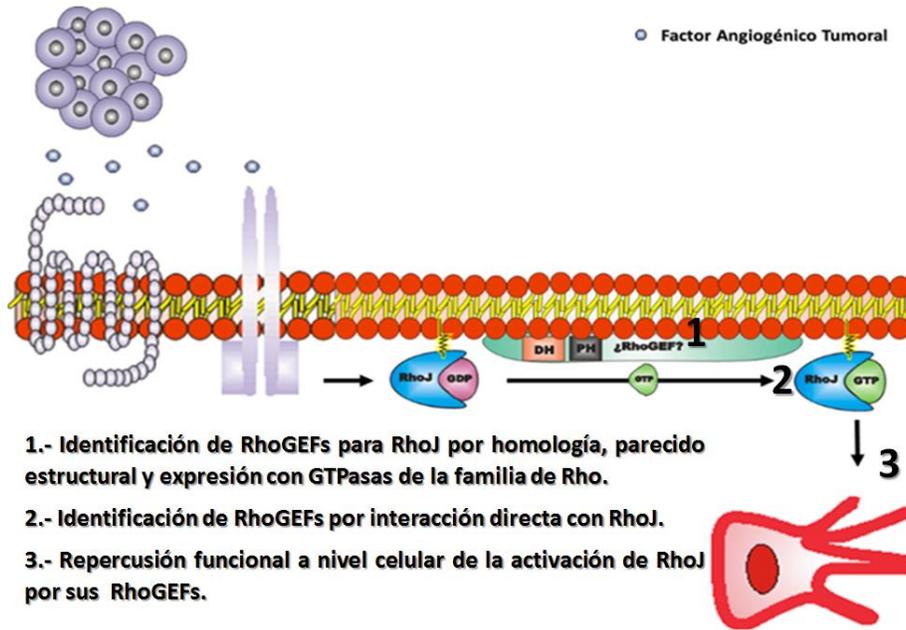


Figura 9.-Los activadores de la GTPasa RhoJ pueden ser indentificados por un análisis de homologías, expresión, interaccion directa de RhoJ con RhoGEFs y sus efectos en celulas endoteliales. La identificación de RhoGEFs candidatos por medio de un análisis bioinformático permitirá enfocar la búsqueda de activadores de RhoJ basado en su homología con GTPasas de la familia de Rho. Los RhoGEFs seleccionados serán evaluados en cuanto a su posible interacción directa con RhoJ y efecto activador empleando RhoGEFs constitutivamente activos. La repercusión funcional, a nivel celular, de la activación de RhoJ por un RhoGEF sentará las bases para establecer la importancia del RhoGEF en el proceso angiogénico tumoral.

Estrategia experimental

Identificación de RhoGEFs para RhoJ por criterios de homología, parecido estructural y expresión con GTPasas de la familia de Rho en células endoteliales.

El análisis bioinformático de bases de datos públicas permite identificar RhoGEFs candidatos para RhoJ. Se comparan por alineamiento múltiple las secuencias de GTPasas de la familia de Rho, para identificar las GTPasas filogenéticamente más cercanas a RhoJ. Esto contribuirá a delimitar nuestra búsqueda de RhoGEFs, ya que nos enfocaremos en aquellos activadores conocidos de GTPasas homólogas a RhoJ.

Un análisis de expresión en células endoteliales de RhoGEFs incrementará la probabilidad de identificar RhoGEFs relevantes en procesos angiogénicos tumorales que activen a RhoJ. El análisis de un complejo estructural entre un RhoGEF y una GTPasa homóloga a RhoJ permitirá determinar los aminoácidos de interacción con esta GTPasa, seguido de un alineamiento múltiple de secuencias de RhoGEFs.

Identificando los aminoácidos conservados en las secuencias de los RhoGEFs nos permitirá definir un orden de prioridad de los RhoGEFs considerados como candidatos activadores de RhoJ en células endoteliales.

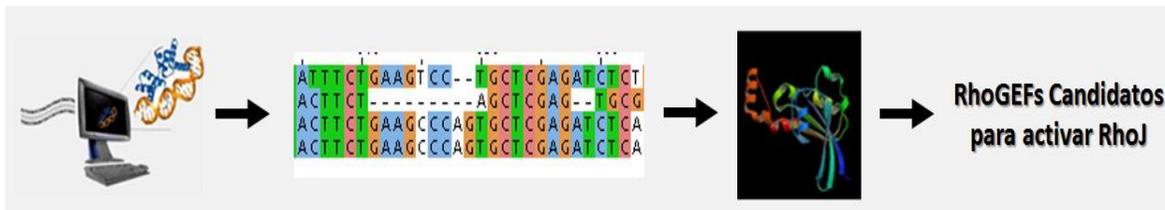


Figura 10.- Análisis bioinformático para identificar RhoGEFs candidatos activadores de RhoJ. En la base de datos pública SMART se identifican las secuencias de RhoGEFs y RhoGTPasas. Mediante alineamiento múltiple de secuencias se determinan las GTPasas homólogas a RhoJ. Por análisis de un complejo de interacción entre un RhoGEF y la GTPasa homóloga a RhoJ se identifican los aminoácidos de interacción. Posteriormente, por alineamiento múltiple de RhoGEFs se determinan los candidatos activadores de RhoJ.

Identificación de RhoGEFs con afinidad por RhoJ potencialmente relevantes en la angiogénesis tumoral.

Los RhoGEFs identificados como candidatos para RhoJ a través del análisis bioinformático, serán confirmados por ensayo de afinidad utilizando la mutante RhoJ-T35N (dominante negativa) y RhoGEFs constitutivamente activos (DH-PH RhoGEFs). Además, se determinará la activación de RhoJ utilizando lisados celulares de cultivos de células endoteliales que hayan sido estimuladas con medios condicionados de células tumorales.

RhoJ-T35N tiene afinidad por sus RhoGEFs, y esta afinidad aumenta cuando los RhoGEFs son constitutivamente activos (DH-PH RhoGEFs). Gracias a esto, podemos realizar la captura de RhoGEFs por interacción directa con RhoJ-T35N y determinar su activación.

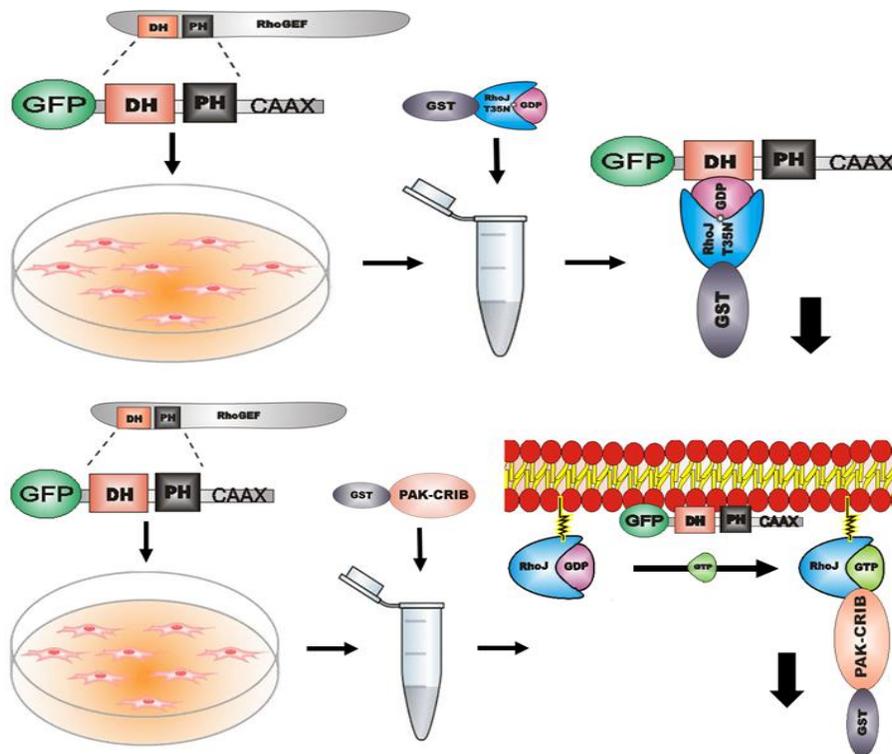


Figura 11.- Captura de RhoGEFs con GST-RhoJ-T35N y captura de RhoJ-GTP con GST-PAK-CRIB. Los RhoGEFs constitutivamente activos presentan el epítipo de la proteína verde fluorescente (GFP) y pueden ser capturados con RhoJ-T35N. Su identificación se realizará utilizando anticuerpos contra GFP correlacionado con el peso de la construcción del RhoGEF y la GFP. RhoJ-GTP puede ser capturado con PAK-CRIB, un efector de RhoJ, su identificación será utilizando anticuerpos contra RhoJ.

RhoJ como promotor de procesos celulares compatibles con una respuesta angiogénica. La activación de RhoJ por un RhoGEF induce cambios en el citoesqueleto de actina de células endoteliales compatibles con procesos angiogénicos. Para determinar dichos cambios mediados por RhoJ, se transfectarán mutantes de RhoJ asociadas a la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) en células endoteliales, con el fin de determinar los fenotipos resultantes de la expresión de dichas mutantes de RhoJ. En este sentido se transfectará RhoJ tipo silvestre, RhoJQ79L (constitutivamente activa) y RhoJT35N (dominante negativa) en células PAE y se observará por fluorescencia los fenotipos resultantes de su expresión.

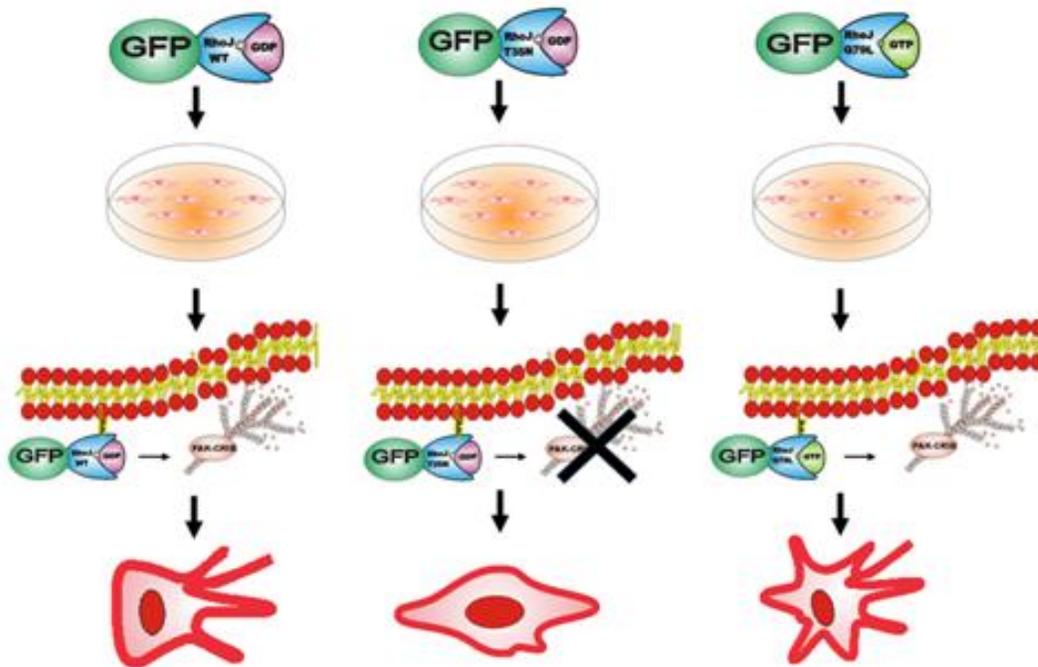


Figura 12.- Fenotipo celular asociado a la activación de RhoJ. RhoJ regula la angiogénesis tumoral, por ende, mutantes de RhoJ deben correlacionar con cambios en la dinámica del citoesqueleto de células endoteliales compatible con fenotipos asociados a la angiogénesis tumoral. Es de esperarse que una mutante constitutivamente activa de RhoJ (Q79L) genere estructuras tipo filopodios en un mayor grado que RhoJ silvestre (WT) y que la dominante negativa de RhoJ (T35N) suprima esta formación de filopodios.

Material y métodos

Obtención de cDNA de pWPXL-RhoJ-WT, pWPXL-RhoJ-T35N y pWPXL-RhoJQ79L.

1. Mezclar 200µL de bacterias E. coli DH5α ultracompetentes con 64µL de buffer TB (*transformation buffer*) y repartir en alícuotas de 50µL en tubos eppendorf de 1,5ml, trabajar sobre hielo.
2. Agregar 1µL de cada cDNA de pWPXL-RhoJ-WT, pWPXL-RhoJ-T35N, pWPXL-RhoJ-Q79L (cDNA previamente hidratado de papel filtro, obsequiado por la Dr. Victoria Heath MA, DPhil, Institute of Cardiovascular Sciences, University of Birmingham(Kaur, Leszczynska et al. 2011)), mezclar y dejar reposar 20 minutos en hielo.
3. Someter tubos a choque térmico, 42°C/ 1 minuto en baño maría.
4. Incubar 10 minutos en hielo.
5. Adicionar 300µL de medio S.O.C (*Super Optimal Broth, invitrogen*) a cada tubo y agitar a 180rpm/ 60 minutos a 37 °C.
6. Centrifugar a 13000rpm/ 2,5 minutos a temperatura ambiente.
7. Retirar sobrenadante y resuspender bacterias con 50µL de medio LB (*Luria-Bertani broth*)+ ampicilina en campana de seguridad con flujo laminar.
8. Tomar 1µL por tubo y sembrar en placas de agar LB.
9. Incubar a 37°C durante 14 horas y observar crecimiento de colonias.
10. Con un asa estéril picar una colonia de cada cDNA de RhoJ y resuspender en 5ml de medio LB+ ampicilina.
11. Dejar agitando la suspensión de bacterias 180 rpm/ 16 horas a 37°C.
12. Centrifugar tubos a 2400rpm/5 minutos a temperatura ambiente y retirar sobrenadante.
13. Resuspender bacterias con 200µL de buffer de resuspensión + RNAasa (Sigma R1149-100ML) y transferir a un tubo eppendorf de 1,5ml.
14. Agregar a cada tubo 200µL de buffer de lisis y homogenizar contenido.
15. Adicionar 350µL de buffer de neutralización y homogenizar contenido.
16. Centrifugar a 13000rpm/10 minuto a temperatura ambiente y recuperar sobrenadante (lisados).
17. Preparar columna adicionando 500µL de buffer de preparación de columna y dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
18. Centrifugar a 13000 rpm/ 1 minuto a temperatura ambiente y desechar sobrenadante.
19. Transferir lisado a columna y dejar reposar 1 minuto a temperatura ambiente.

20. Centrifugar a 13000 rpm/1 minuto a temperatura ambiente y desechar sobrenadante.
21. Adicionar a la columna 750 μ L de buffer de lavado con etanol.
22. Centrifugar a 13000 rpm/1 minuto a temperatura ambiente y desechar sobrenadante.
23. Transferir columna a tubo de colección (ependorf de 1,5ml), adicionar 50 μ L de agua PISA inyetable y dejar reposar 2 minutos.
24. Centrifugar a 13000 rpm/ 1 minuto a temperatura ambiente y desechar columna.
25. Cuantificar cDNAs de RhoJ a una dilución 1:50 y leer en espectrofotómetro a una λ de 280/260nm.

Subclonación de RhoJ-T35N en el plásmido pGEX-6p1 para preparación de proteína de fusión.

1. Preparar sobre hielo la mezcla de reactivos (Tabla 1) para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los Primers: Fw 5'-3'BamHI **ataGGATCCATGAACTGCAAAGAGGGAAGCTG (sigma)** y Rw 3'-5'EcoRI **ataGAATTCTCAGATAATTGAACAGCAGCTG (Sigma)**.

Tabla 1.- Reactivos y cantidades para la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	
Buffer 10X	5 μ L
dNTPs 50X	1 μ L
Primer FW 5' - 3' BamHI	1 μ L
Primer RW 3'-5'EcoRI	1 μ L
Dimetil-Sulfoxido (DMSO)	2,5 μ L
Betaina	2,5 μ L
cDNA templado (pWPXL-RhoJ-T35N)	50ng
Enzima (expand High Fidelity PCR Sistem, Roche, Cat. 11732641001, 100U)	0,5 μ L
Agua inyetable estéril PISA	Cbp 50 μ L
Notas: la mezcla se realiza en campana de seguridad de flujo laminar y se agrega primero el agua al tubo de PCR y luego los demás reactivos respetando el orden de la tabla de arriba hacia abajo. El DMSO no se coloca en hielo por que se congela. La mezcla de reacción de PCR se homogeniza suavemente con una micropipeta	

2. Colocar mezcla de reacción en termociclador bajo las siguientes condiciones de la tabla 2:

Tabla 2.- Condiciones para la reacción en cadena de polimerasa (PCR)		
Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	Número de ciclos
94	240	1
94 60 72	50	30
72	300	1

- Realizar un análisis electroforético de producto de PCR en gel de agarosa 1,5%/bromuro de etidio, debe observarse una banda entre los 650 pares de bases.
- Purificar producto de PCR (PCR Purification Kit, 250 QIAGEN) colocando 150µL de buffer PBI y 30 µL de producto amplificado de PCR en un tubo eppendorf de 1,5ml, mezclar con micropipeta. Transferir mezcla a una columna de 2ml, centrifugar a 13000 rpm/1 minuto a temperatura ambiente y desechar sobrenadante. Lavar columna con 750 µL de buffer PE + Etanol, centrifugar a 13000 rpm/1 minuto y desechar sobrenadante. Colocar columna en tubo de colección tubo eppendorf 1,5ml, agregar 30 µL de agua inyectable PISA, reposar 1 minuto. Centrifugar a 13000rpm/1 minuto, coleccionar sobrenadante y desechar columna.
- Realizar análisis electroforético de producto purificado de PCR en gel de agarosa 1,5%/bromuro de etidio, debe observarse una banda entre los 650 pares de bases.
- Realizar digestión de producto purificado de PCR y el plásmido pGEX-6p1 14 horas a 37°C con los reactivos y cantidades de la tabla 3.

Tabla 3.- Reactivos y cantidades para la digestión de producto purificado de PCR y pGEX6p1	
Buffer A (Sure/cut Buffer A for Restriction Enzymes Roche)	3 µL
Enzima BamH1 (Roche)	0,5 µL
Enzima EcoR1 (Roche)	0,5 µL
cDNA de RhoJ-T35N o PGEX-6p1	750ng
Agua inyectable PISA (cbp)	30 µL
Notas: la mezcla se realiza en un tubo eppendorf de 1,5ml. Se añade primero el agua y después los reactivos en el orden de la tabla de arriba hacia abajo. Estas cantidades son un solo cDNA.	

- Realizar análisis electroforético de digestión de RhoJT35N y pGEX6p1 en gel de agarosa 1% bromuro de etidio, se deben observar bandas de 650 y 5000pb.

8. purificar todo el producto de digestión de manera similar que inciso 4.
9. Realizar nuevamente análisis electroforético como en el inciso 7.
10. Realizar ligación de RhoJ-T35N en pGEX6p1 durante 14 horas a 16°C con las cantidades y resctivos de la tabla 4.

Tabla 4.- Reactivos y cantidades para la ligación de RhoJ-T35N en pGEX-6P1	
Buffer 10x	0,5 µL
Enzima ligasa (T4 DNA Ligase, Roche, Cat. 10481220001, 1U/µL)	1 µL
RhoJ-T35N (digerido y purificado)	7,5 µL
Plásmido (pGEx-6P1 digerido y purificado))	0,5 µL
Agua inyectable PISA	0,5 µL
Notas: la mezcla se realiza en un tubo para PCR sobre hielo. Se agrega primero el agua y luego los reactivos en el orden de la tabla de arriba hacia abajo. Se mezcla con micropipeta.	

11. Transformar producto de ligación para obtención de pGEX-RhoJ-T35N. Es muy importante el uso de bacterias ultracompetentes (ver protocolo: obtención de cDNA de pWPXL-RhoJ-WT, pWPXL-RhoJ-T35N y pWPXL-RhoJQ79L).
12. Realizar una digestión diagnostico y análisis electroforetico para comprobar la correcta ligación de RhoJT35N en pGEX6p1 (incisos 6 y 7)

Obtención de proteínas de fusión GST-RhoJ-T35N y GST-PAKN.

1. Transformar cDNA pGEX-RhoJ-T35N y pGEX-PAKN en bacterias **BL21 competentes** (ver protocolo: obtención de cDNA de pWPXL-RhoJ-WT, pWPXL-RhoJ-T35N y pWPXL-RhoJQ79L pero en lugar de utilizar bacterias DH5α se utilizan bacterias BL21).
2. Picar una colonia con asa estéril en campana de seguridad con flujo laminar y resuspender en 5 ml de medio LB + ampicilina, crecer 14 horas a 37°C en agitación constante en shaker.
3. Resuspender los 5 ml de suspensión de bacterias en 250 ml de medio LB + ampicilina, crecer 3 horas a 37°C en agitación constante en shaker.
4. Adicionar 250µL de IPTG 0,2 M (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido) a cada frasco y dejar agitando 14 horas a 16°C.
5. Centrifugar suspensión de bacterias a 5000rpm/10 minutos a 4 °C.
6. Retirar el sobrenadante y resuspender bacterias con 10ml de solución 1 (ver tabla 5 al final de los procedimientos). Trabajar sobre hielo.

-
7. Transferir lisado a tubo falcon de 50 ml y realizar 3 ciclos de congelamiento sumergiendo los tubos en nitrógeno líquido y descongelamiento en agua de la llave.
 8. Sonicar 3 veces cada tubo a una amplitud de 80 y en ciclos de 10 segundos con sonicador de punta. El sonicador se introduce en los tubos falcon durante 10 segundos, los tubos deben estar sobre hielo.
 9. Centrifugar a 10 000rpm/ 30 minutos a 4°C.
 10. Transferir sobrenadante a tubo falcon de 15ml, incubar 60 minutos con 250µL de glutatión Sepharosa 4B en agitación en hielo.
 11. Centrifugar a 3000rpm/3 minutos a 4°C.
 12. Retirar sobrenadante y resuspender pastilla con 3ml de solución 2 y transferir a tubos eppendorf de 1,5ml.
 13. Centrifugar a 5000rpm/2 minutos a 4°C, retirar sobrenadante y resuspender con 1ml de solución 2 (ver tabla 5).
 14. realizar 2 lavados adicionales con solución 2 y 3 lavados con solución 3 (ver tabla 5).
 15. Después del último lavado retirar el sobrenadante y agregar 250µL de solución 3 y 250µL de glicerol 30%.
 16. Correr gel de acrilamida 10% y teñir con Coomassie para comprobar la obtención de proteínas de fusión. se debe observar una banda cercana a 50Kd.

Curva de activación de RhoJ en células PAE estimuladas con medios condicionados de células tumorales LAP0297.

1. Dividir células PAE y LAP0297 en cajas de 10 cm (se coloca un inóculo de 1ml de células proveniente de una dilución 1:10 de cajas confluentes de 10cm) y ayunar con medio DMEM sin suero y sin antibiótico durante 16 horas.
2. Retirar medio de células LAP0297 y centrifugar a 2500 rpm/ 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Estimular células PAE con 4ml de medios condicionados tumorales durante los tiempos: 0, 1, 5, 15, 30 y 60 minutos.
4. Terminado el tiempo de estímulo, lavar células con 4ml de PBS/MgCl₂, lisar con 1ml de buffer de lisis+ inhibidores de proteasas y raspar superficie de la caja con gendarme. Tranajar sobre hielo.

-
5. Recuperar sobrenadante y centrifugar a 13000 rpm/10 minutos. Recuperar sobrenadante y tomar 75µL para Lisados Totales y el resto del lisado incubar con 50µL de perlas GST-PAKN en agitación constante en hielo durante 45 minutos.
 6. Centrifugar a 5000 rpm/2,5 minutos a 4°C, retirar sobrenadante y resuspender la pastilla con 1ml de buffer de lisis+ inhibidores de proteasas. Realizar 2 lavados adicionales con buffer de lisis + inhibidores de proteasas.
 7. Después del último lavado, retirar el sobrenadante y agregar 35µL de buffer de muestra 1x y 25µL de buffer de muestra 4x para los lisados totales.
 8. Hervir los tubos en agua durante 5 minutos.
 9. Realizar Western Blot del Pull Down y Lisados Totales corriendo gel de acrilamida 12%, transferir a filtro PVDF (inmobilon) a 350aAmp durante 150 minutos y bloquear 60 minutos con leche al 5%.
 10. Incubar con anticuerpo primario 16 horas a 4°C. RhoJ 1:5000 (abcam, ab57584) en Pull Down y Lisados Totales, pERK 1:20 000 y ERKt 1:20 000 en Lisados Totales.
 11. Incubar con anticuerpo secundario anti-mouse 60 minutos a temperatura ambiente (RhoJ) 1:10 000 y anti-Rabbit (pERK, ERKt) 1:20 000.
 12. Revelar con substrato de quimioluminiscencia (MILLIPORE, Chemiluminescent HRP Substrate, WBKLS0100).

Transfección de construcciones pCEFL-EGFP-DH-PH RhoGEFs-CAAX en celulas HEK293T (caja de 6 pozos).

1. Dividir celulas HEK293T en cajas previamente recubiertas con poli-D lisina. Colocar un inóculo de 200µL (dilución 1:10 de celulas confluentes en cajas de 10cm) por pozo en cajas de 6 pozos.
2. Incubar a 37°C/5% CO₂/95% aire 14 horas.
3. Transfectar con reactivo de lipofectamina-Plus (QIAGEN) en campana de seguridad con flujo laminar.
4. Colocar en tubo eppendorf de 1,5 ml 650 µL de medio DMEM sin suero ni antibiótico, adicionar 19,5µL de reactivo Plus y cDNA común (para ensayo de activación de RhoJ agregar 750ng de pWPXL-RhoJ, las celulas HEK293T no expresan RhoJ endogeno).
5. En otro tubo eppendorf de 1,5ml colocar 650µL de medio DMEM sin suero ni antibiótico y adicionar 19,5µL de reactivo de lipofectamina.
6. Agitar y centrifugar ambos tubos brevemente.

-
7. Reposar 15 minutos a temperatura ambiente.
 8. Alícuotar a cada tubo 100µL de la mezcla DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium)/Plus/RhoJ.
 9. Adicionar DNAs no comunes a su tubo correspondiente: pCEFL-EGFP-CAAX (50ng), pCEFL-EGFP-DH-PH ITSN1-CAAX (100ng), pCEFL-EGFP-DH-PH ITSN2-CAAX (750ng), pCEFL-EGFP-DH-PH ARHGEF15-CAAX (750ng), pCEFL-EGFP-DH-PH ARHGEF5-CAAX (750ng) y pCEFL-EGFP-DH-PH-ARHGEF1-CAAX (750ng).
 10. Agitar y centrifugar brevemente.
 11. Reposar 15 minutos a temperatura ambiente.
 12. Adicionar 100µL a cada tubo de la mezcla DMEM293T/Lipofectamina.
 13. Agitar y centrifugar brevemente.
 14. Reposar 15 minutos. Durante este tiempo preparar células HEK293T; lavar cada pozo con 1mL de PBS 1X estéril y colocar 2mL de medio DMEM 293T sin suero ni antibiótico.
 15. Decantar contenido de transfección en su pozo correspondiente.
 16. Incubar a 37°C/5% CO₂/95% aire durante 240 minutos.
 17. Retirar mezcla de transfección y colocar 2ml de medio DMEM 293T con suero y antibiótico.
 18. Incubar a 37°C/5% CO₂/95% aire 14 horas.
 19. Observar fluorescencia con microscopio óptico.

Captura de DH-PH RhoGEFs con GST-RhoJ-T35N.

1. Transfectadas las células HEK293T en caja de 6 pozos con las construcciones de RhoGEFs, ayunar células 16 horas con medio DMEM sin suero ni antibiótico.
2. Retirar medio de células HEK293T, lavar células con 1ml de PBS/MgCl₂ y lisar con 500µL de buffer de lisis + inhibidores de proteasas. Trabajar sobre hielo.
3. Raspar superficie con gendarme y recuperar sobrenadante en tubos eppendorf de 1,5ml.
4. Centrifugar a 13 000rpm/10 minutos a 4°C, recuperar sobrenadante y tomar 75µL para lisados totales. El resto del lisado incubar con 40 µL de perlas de fusión (20 de glutatión + 20 de GST-RhoJ-T35N) y llevar a un volumen total de 1ml con buffer de lisis más inhibidores de proteasas. Agitar durante 45 minutos en frío.

-
5. Centrifugar a 5000 rpm/2,5 minutos a 4°C, retirar sobrenadante y resuspender la pastilla con 1ml de buffer de lisis+ inhibidores de proteasas. Realizar 2 lavados adicionales con buffer de lisis + inhibidores de proteasas.
 6. Después del último lavado, retirar el sobrenadante y agregar 35µL de buffer de muestra 1x y 25µL de buffer de muestra 4x para los lisados totales.
 7. Hervir los tubos en agua durante 5 minutos.
 8. Realizar Western Blot corriendo gel de acrilamida 10%, transferir a filtro PVDF (inmobilon) a 350mA durante 150 minutos y bloquear 60 minutos con leche al 5%.
 9. Incubar con anticuerpo primario 16 horas a 4°C. GFP 1:10 000 (GFP (B-2): sc-9996, Santa Cruz Biotechnology, INC).
 10. Incubar con anticuerpo secundario anti-mouse 1:20 000/ 60 minutos a temperatura ambiente.
 11. Revelar con substrato de quimioluminiscencia (MILLIPORE, Chemiluminescent HRP Substrate, WBKLS0100).

Activación de RhoJ por DH-PH RhoGEFs en células HEK293T.

1. Transfectar células HEK293T con cDNA de DH-PH RhoGEFs y pWPXL-RhoJ-WT. (ver protocolo de transfección).
2. Ayunar células 16 horas con medio DMEM sin suero ni antibiótico.
3. Retirar medio, lavar células con 1ml de PBS/MgCl₂, lisar con 500µL de buffer de lisis+ inhibidores de proteasas y raspar superficie de la caja con gendarme. Trabajar sobre hielo,
4. Recuperar sobrenadante y centrifugar a 13 000 rpm/10 minutos. Recuperar sobrenadante y tomar 75µL para lisados totales y el resto del lisado incubar con 50µL de perlas GST-PAKN y llevar a un volumen total de 1ml con buffer de lisis más inhibidores de proteasas. Agitar en frío durante 45 minutos.
5. Centrifugar a 5000 rpm/2,5 minutos a 4°C, retirar sobrenadante y resuspender la pastilla con 1ml de buffer de lisis+ inhibidores de proteasas. Realizar 2 lavados más con buffer de lisis + inhibidores de proteasas.
6. Después del último lavado, retirar el sobrenadante y agregar 35µL de buffer de muestra 1x y 25µL de buffer de muestra 4x para los lisados totales.
7. Hervir los tubos en agua durante 5 minutos.

-
8. Realizar Western Blot corriendo gel de acrilamida 12%, transferir a filtro PVDF (inmobilon) a 350mA durante 150 minutos y bloquear 60 minutos con leche al 5%.
 9. Incubar con anticuerpo primario 16 horas a 4°C. RhoJ 1:5000 (abcam, ab57584).
 10. Incubar con anticuerpo secundario anti-mouse 1:10 000/ 60 minutos a temperatura ambiente.
 11. Revelar con substrato de quimioluminiscencia (MILLIPORE, Chemiluminescent HRP Substrate, WBKLS0100).

Subclonación de RhoJ-WT, RhoJ-T35N y RhoJ-Q79L en el plásmido pCEFL-EGFP.

1. Ver protocolo de Subclonación de RhoJ-T35N en el plásmido pGEX-6p1 para preparación de proteína de fusión pero utilizando el plásmido pCEFL-EGFP y las mutantes de RhoJ.

Transfección de cDNA de pCEFL-EGFP-RhoJ-WT, pCEFL-EGFP-RhoJ-T35N y pCEFL-EGFP-RhoJ-Q79L en células endoteliales PAE.

1. Dividir células PAE en caja de 6 pozos, poner un inóculo de células de 200µL por pozo (dilución 1:10 de una suspensión de células confluentes en caja de 100cm), dejar crecer células durante 14 horas a 37°C/5% CO₂/95% aire.
2. Realizar transfección de células PAE con polifect en campana de seguridad con flujo laminar.
3. En un tubo eppendorf de 1,5ml colocar 350µL de medio DMEM 293T sin suero ni antibiótico, agregar 6µg de cDNA pCEFL-Life-Act-mCherry.
4. Mezclar y centrifugar brevemente.
5. Repartir mezcla en alícuotas de 100µL por tubo.
6. Adicionar a cada tubo 1µg del cDNA correspondiente (pCEFL-EGFP-RhoJ-WT, pCEFL-EGFP-RhoJ-T35N, pCEFL-EGFP-RhoJ-Q79L)
7. Mezclar y centrifugar brevemente.
8. Reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Durante este tiempo lavar células PAE con 1ml de PBS estéril por pozo, y colocar 1,5ml de medio DMEM con suero y antibiótico en cada pozo.
10. Decantar el contenido del tubo a su pozo correspondiente.
11. Incubar durante 14 horas a 37°C/5% CO₂/95% aire.
12. Observar fluorescencia en microscopio óptico, ayunar células 14 horas con medio DMEM sin suero y sin antibiótico e incubar a 37°C/5% CO₂/95% aire.
13. Observar morfología de células PAE en microscopio óptico.

14. Lisar células y realizar Western Blot de lisados totales para determinar la expresión de mutantes de RhoJ. Usar en gel de acrilamida al 12%.

Tabla 5.- Soluciones y reactivos utilizados en los ensayos de interacción y activación de RhoJ por DH-PH RhoGEFs	
Solución 1 para la preparación de proteínas de fusión GST-RhoJ-T35N y GST-PAKN-CRIB	
PBS 1X	99ml
Tritón X-100	1ml
EDTA 0,5M	200µL
Aprotinina	1µL/ml solución.
Leupectina	1µL/ml de solución
Fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF 100mM)	10 µL/ml de solución
Solución 2 para la preparación de proteínas de fusión GST-RhoJ	
PBS 1X	99ml
Tritón X-100	1ml
Aprotinina	1µL/ml solución.
Leupectina	1µL/ml de solución
Fluoruro de Fenil Metil Sulfonilo (PMSF 100mM)	10 µL/ml de solución
Solución 3 para la preparación de proteínas de fusión GST-RhoJ	
PBS 1X	100ml
Aprotinina	1µL/ml solución.
Leupectina	1µL/ml de solución
Fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF 100mM)	10 µL/ml de solución
Buffer de lisis	
Tritón 1%	5ml
Tris HCl 1M	25ml
EDTA 0,5M	5ml
NaCl 2,5M	30ml
Agua bidestilada	CBP 500ml
Inhibidores de proteasas	
Aprotinina	1µL/ml de buffer de lisis
Leupectina	1µL/ml de buffer de lisis
Fluoruro de sodio	1µL/ml de buffer de lisis
Ortovanadato de sodio	1µL/ml de buffer de lisis
Fluoruro de Fenil Metil Sulfonilo (PMSF 100mM)	10µL/ml de buffer de lisis
B-Glicerol 1M	10µL/ml de buffer de lisis
Cloruro de Magnesio 1M (MgCl ₂)	10µL/ml de buffer de lisis
Anticuerpos	
RhoJ	anti-RHOJ antibody ab57584, adcam®, mouse
Cdc42	Cdc42 antibody, sc-8401, Santa Cruz Biotechnology, INC
pERK	Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204), Cell Signaling
tERK	ERK 2 (C-14): sc-154, Santa Cruz Biotechnology,

	INC
EGFP	GFP (B-2): sc-9996, Santa Cruz Biotechnology, INC
Sustrato de quimioluminiscencia	
Millipore	Cat: WBKLS0500 western chemiluminescent HRP substrat
Transfección	
Poly Fect	QIAGEN polyfect transfection reagent 2mg/ml, 148019310
lipofectamina	Invitrogen, lipofectamine reagent 2mg/ml, 1642399
plus	Invitrogen, plustm reagent, 3mg/ml, 1618774
Enzimas de Restricción	
BamHI	Roche, Restriction Endonuclease BamHI, Cat.10220612001, 10U/μL.
EcoRI	Roche, Restriction Endonuclease EcoRI, Cat.703737, 10 U/μL

Resultados

Identificación de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina de la familia de Rho (RhoGEFs) con potencial afinidad por RhoJ por criterios de homología, expresión y parecido estructural entre GTPasas de la familia de Rho.

La identidad de los RhoGEFs activadores de la GTPasa RhoJ es desconocida. Puesto que RhoJ es un GTPasa endotelial recientemente vinculada al proceso de angiogénesis tumoral es importante conocer sus mecanismos de activación. Por lo tanto, basados en la premisa: RhoJ está vinculada filogenéticamente con otras RhoGTPasas cuyos mecanismos de activación han sido mejor caracterizados, una estrategia inicial para identificar a RhoGEFs activadores de RhoJ parte de la hipótesis de que estos se parecerán estructuralmente a aquellos que activen a las GTPasas mejor caracterizadas y que tengan secuencias homólogas a las de RhoJ.

Dependiendo del parecido estructural de RhoJ con alguna de las GTPasas más descritas: RhoA, Cdc42 o Rac1, podemos inferir que un RhoGEF que active a la GTPasa más parecida a RhoJ tendrá una mayor probabilidad de activar también a RhoJ, o bien permitirá ubicar a la familia de RhoGEFs entre los que se encuentren los activadores potenciales de RhoJ (Figura 13).

Con base en este razonamiento, se buscaron en bases de datos públicas (**SMART, Simple Modular Architecture Research Tool**. Disponible en: http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?GENOMIC=1) las secuencias de las RhoGTPasas y RhoGEFs para realizar un alineamiento múltiple de secuencias (ClustalW2, disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y un árbol filogenético de RhoGTPasas y RhoGEFs. En esta base de datos se encontraron 63 secuencias para RhoGEFs (Figura 13b) y 20 secuencias para RhoGTPasas codificadas en el genoma humano (Figura 13a).

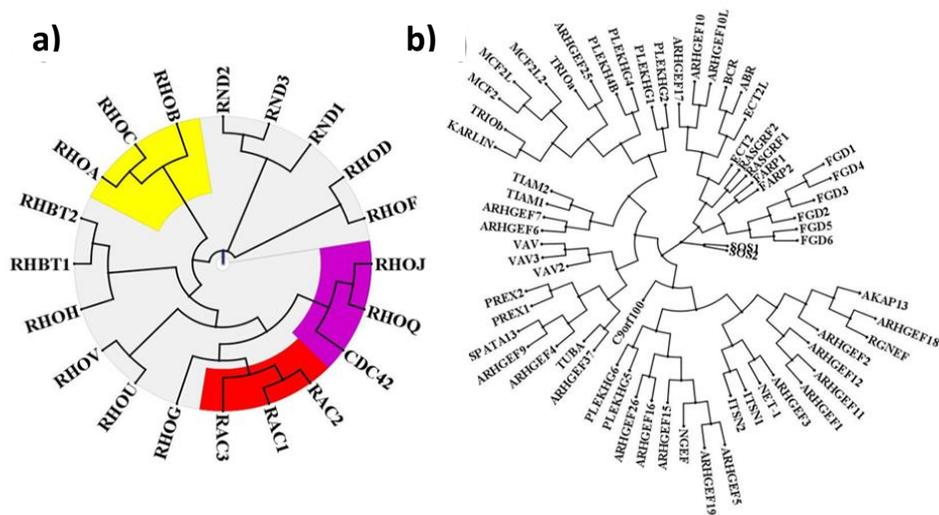


Figura 13.- RhoJ pertenece a la familia de Cdc42 integrada por 3 GTPasas: Cdc42, RhoQ y RhoJ, y existen 63 RhoGEF que potencialmente podrían activar a RhoJ. En la base de datos pública llamada SMART se encontraron a) 20 secuencias para RhoGTPasas y b) 63 secuencias para RhoGEFs. Se identificaron las 3 familias donde se encuentran las GTPasas modelo y se muestran en colores distintivos: RhoA, Rac1 y Cdc42. RhoJ pertenece a la familia de Cdc42, por lo cual, se toma Cdc42 como modelo para identificar por parecido filogenético a RhoGEFs que activen a RhoJ.

Derivado de este análisis se identificó a RhoJ como una GTPasa perteneciente a la familia de Cdc42, esta familia está formada por 3 RhoGTPasas: Cdc42, RhoJ y RhoQ (Figura 13a). RhoJ tiene un parecido del 85% con RhoQ y un 78% con Cdc42 (Vignal, De Toledo et al. 2000). Se tomó como modelo a Cdc42 para la identificación de candidatos activadores de RhoJ debido a que esta RhoGTPasa se ha descrito ampliamente en comparación con RhoQ.

RhoJ se expresa de manera restringida en el endotelio (Yuan, Sacharidou et al. 2011), por lo tanto, es de esperarse que sus RhoGEFs activadores se expresen en el endotelio (Figura 14). De los 63 RhoGEFs reportados en el genoma humano, sólo 48 se expresan en endotelio, de acuerdo al trabajo de nuestro laboratorio que forma parte de la tesis doctoral de Ricardo Hernández-García (Hernandez-Garcia, Iruela-Arispe et al. 2015) (Figura 14a).

Una vez identificados los RhoGEFs que se expresan en endotelio y tomando como modelo Cdc42, se realizó un análisis de la literatura buscando los RhoGEFs cuya actividad sobre Cdc42 se ha comprobado (Pubmed “RhoGEFs and Cdc42” análisis de resúmenes). De esta manera se acotó la lista de candidatos activadores de RhoJ, teniendo 17 RhoGEFs activadores de Cdc42 y cuya expresión es endotelial (Figura 14b).

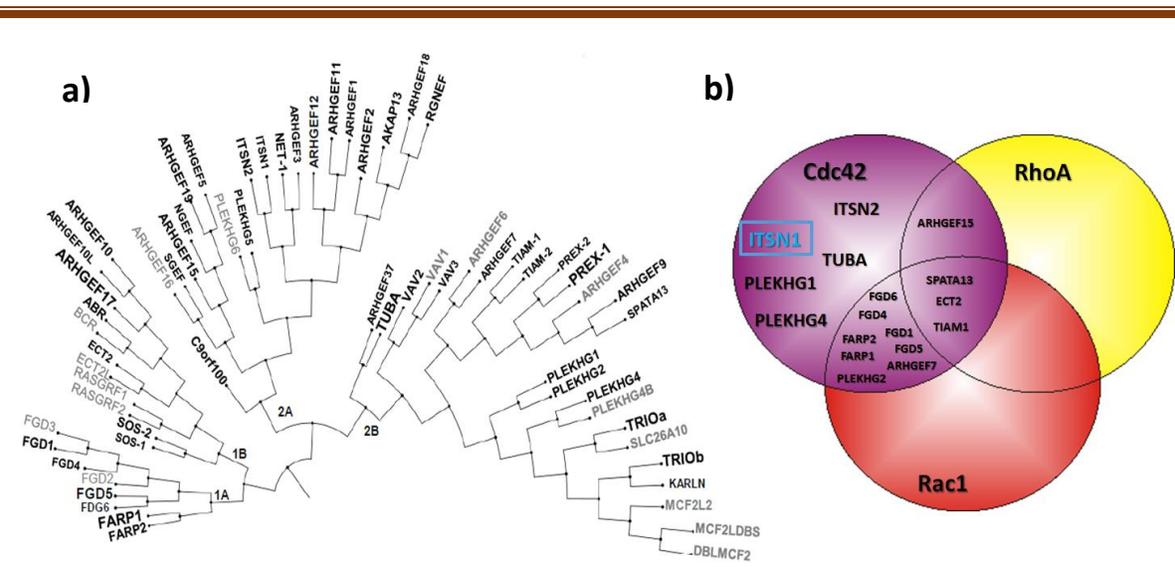


Figura 14.- La ITSN1 se expresa en endotelio y de ella se cuenta con un complejo estructural con Cdc42. a) Cuarenta y ocho RhoGEFs se expresan en endotelio microvascular (Hernandez-Garcia, Iruela-Arispe et al. 2015) y b) 17 de ellos se han reportado en la literatura que activan a Cdc42. De los RhoGEFs reportados como específicos para Cdc42 sólo se cuenta con el complejo estructural de ITSN1 DH-PH con Cdc42, dicho complejo se tomó como base para determinar los aminoácidos presentes en la interfase de interacción.

En este análisis se identificaron 17 RhoGEFs como principales activadores de Cdc42 y de expresión endotelial (Figura 14b). Algunos RhoGEFs son más específicos para Cdc42 como ITSN1, ITSN2, TUBA, PLEKHG1 y PLEKHG4, el resto activan a Cdc42 y a otras GTPasas.

Dentro de los RhoGEFs reportados como específicos para Cdc42, se buscó algún complejo estructural que nos permita el análisis de la interfase de interacción entre Cdc42 y la región catalítica del RhoGEF. Sólo se ha reportado el complejo estructural de Cdc42 con el DH-PH de ITSN1 (MMDB ID: 19544PDB ID: 1KI1 disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=19544>).

Se analizó el complejo estructural a una distancia molecular de 3-3.5 Å y se identificaron los aminoácidos presentes en la interfase de interacción de Cdc42 e ITSN1 (Figura15). Por Cdc42 se identificaron los aminoácidos: Tirosina 32 (Y32), Prolina 34 (P34), Treonina 35 (T35), Alanina 41 (A41), Acido Aspártico 65 (D65) y Arginina (R66), mientras que por la ITSN1 se encontró a: Glicina 1240 (G1240), Tirosina 1241 (Y1241), Acido Glutámico 1244 (E1244), Asparagina 1391 (N1391), Metionina 1369 (M1369), Asparagina 1421 (N1421), Arginina 1425 (R1425) y Acido Glutámico 1428 (E1428). La identificación en Cdc42 de la Alanina 41 (A41) resulta relevante, debido a que es un aminoácido conservado únicamente por esta familia de GTPasas (Cdc42, RhoQ y RhoJ) (Figura 15a). Identificados los aminoácidos de interacción, se realizaron alineamientos múltiples de

secuencias de las RhoGTPasas, para identificar los aminoácidos conservados en RhoJ y se realizaron posteriormente alineamientos múltiples para determinar los RhoGEFs con mayor potencial de activar a RhoJ (Figura 15b).

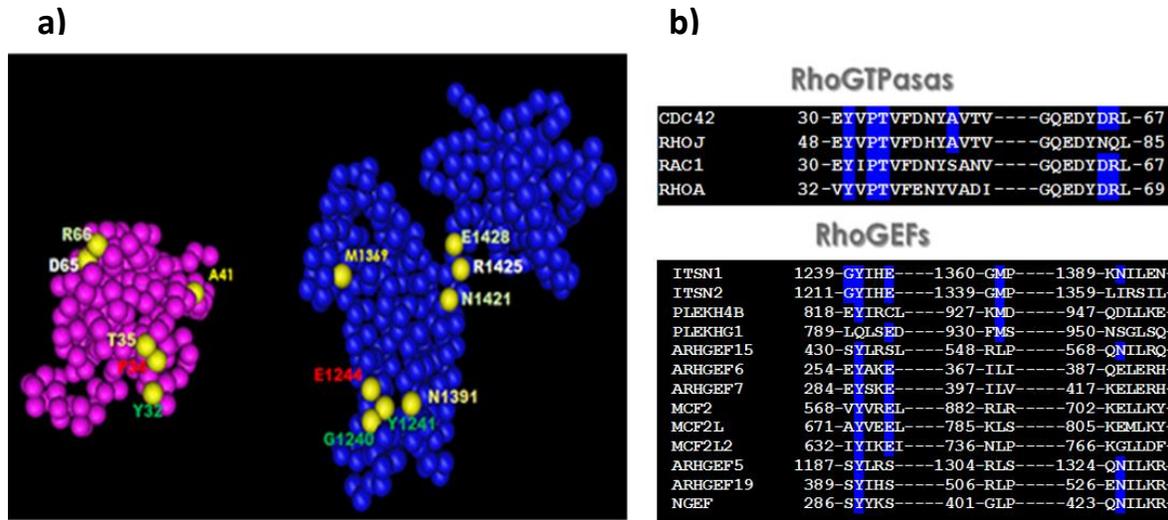


Figura 15.- La Alanina 41 en la interfase de interacción de Cdc42 con ITSN1 es conservada únicamente por la familia de Cdc42. Postulamos pues que RhoGEFs que conserven ese sitio de interacción (M1369) tendrán mayor probabilidad de activar a RhoJ. a) Análisis de la interfase de interacción entre Cdc42 e ITSN1-DH-PH para identificar los sitios de contacto para la activación de Cdc42. b) Alineamientos de secuencias de RhoGTPasa para identificar los sitios de interacción conservados por RhoJ y alineamiento de secuencias de los RhoGEFs para identificar los RhoGEFs candidatos activadores de RhoJ.

En los alineamientos múltiples de secuencias de RhoGTPasas, se encontró que RhoJ no tiene conservados los aminoácidos; ácido Aspártico (D65) y Arginina (R66), y en su lugar se encuentran los aminoácidos; Asparagina (N83) y Glutamina (Q84) (Figura 15b).

Identificados los RhoGEFs que conservan sitios de interacción del complejo Cdc42/ITSN1-DH-PH, se hizo una segunda selección de los posibles RhoGEFs candidatos activadores de RhoJ derivados del análisis del complejo estructural y de expresión (Figura16).

El análisis bioinformático dio como resultado la identificación de los siguientes RhoGEFs que, de acuerdo a los criterios mencionados, tendrían un mayor potencial para activar a RhoJ: ITSN1, ITSN2, PLEKHG1, ARHGEF15, ARHGEF7, NGEF y ARHGEF5 (Figura 16a).

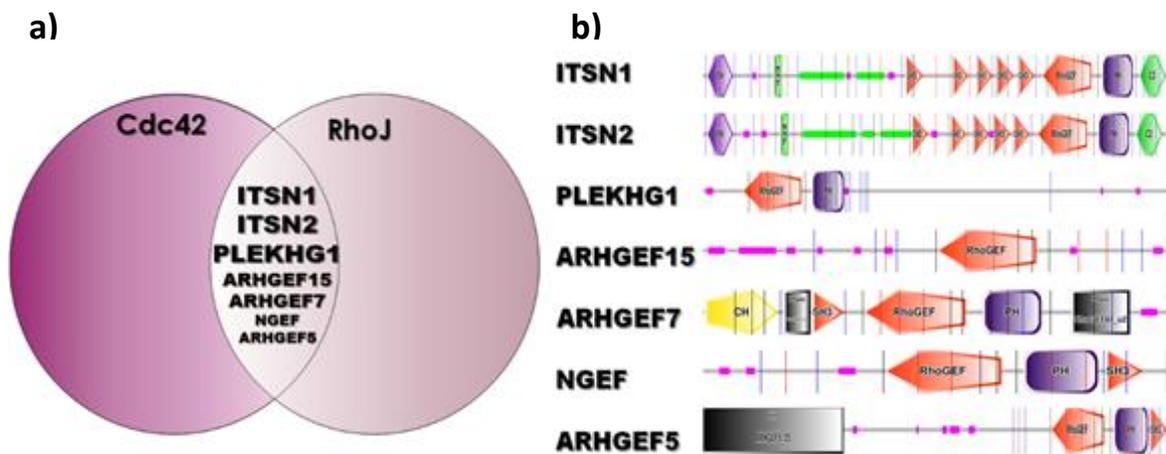


Figura 16.- Los RhoGEFs ITSN1, ITSN2, PLEKHG1, ARHGEF15, ARHGEF7, NGEF y ARHGEF5 surgen como principales candidatos activadores de RhoJ. a) El análisis bioinformático permitió identificar a 7 RhoGEFs como los principales candidatos para activar a RhoJ. Los criterios que cumplieron fueron el estar expresados en endotelio, haber sido reportados como GEFs para Cdc42 y mantener homología con ITSN1 en las regiones de interacción del complejo Cdc42/ITSN1-DH-PH. Estos criterios se establecieron basados en el hecho de que RhoJ es una GTPasa endotelial y de las GTPasas más estudiadas tiene una mayor homología con Cdc42. b) Los 7 RhoGEFs candidatos son proteínas multidominio que difieren en estructura y funciones.

Los RhoGEFs son proteínas multidominio que integran cascadas de señalización y activan RhoGTPasas que regulan el citoesqueleto celular (Figura 16b). Los 7 RhoGEFs candidatos activadores de RhoJ participan en diferentes procesos y activan determinadas RhoGTPasas. Algunos se han estudiado ampliamente, mientras que de otros se desconoce su participación en la señalización celular.

Hasta la fecha no se ha reportado en la literatura que estos 7 RhoGEFs activen a RhoJ. Conociendo que un RhoGEF activa a su RhoGTPasa por interacción directa, es de esperarse que si estos RhoGEFs candidatos activan a RhoJ, tendrán que unirse por interacción directa para activarla, favoreciendo el intercambio de GDP por GTP.

Identificación de RhoGEFs por interacción directa con RhoJ potencialmente relevantes en la angiogénesis tumoral.

RhoJ es una GTPasa que se encuentra sobreexpresada en endotelio tumoral y cuya presencia es clave para la angiogénesis tumoral (Kim, Yang et al. 2014). Su sobreexpresión indica que su activación modula cambios en la dinámica del citoesqueleto de células endoteliales proporcionando fenotipos migratorios que favorecen la angiogénesis tumoral. Por lo tanto, determinar el comportamiento de su cinética de activación, permitirá correlacionar su presencia con su activación cuando las células endoteliales son estimuladas con medios condicionados de células tumorales (Figura 17).

Para determinar la cinética de activación de RhoJ, se requiere capturar a RhoJ cuando se encuentra unida a GTP. Para ello se purificó la proteína de fusión GST-PAKN-CRIB, ésta contiene un dominio de la cinasa PAK, un efector de RhoJ que es reconocido por esta GTPasa unida a GTP (Figura 17a). Se utilizaron medios condicionados de células de carcinoma de pulmón LAP0297 y se estimularon células PAE a los tiempos: 0, 1, 5, 15, 30 y 60 minutos. Cuando las células endoteliales son estimuladas con medios condicionados de células tumorales, se observó un aumento en la activación de RhoJ dependiente del tiempo. Es decir, conforme transcurrió el tiempo de estímulo la activación de RhoJ aumentó, observándose su pico máximo a los 60 minutos (Figura 17b).

RhoJ y Cdc42 son GTPasas homólogas y podría esperarse que su cinética de activación fuera similar; sin embargo, cuando células endoteliales fueron estimuladas con medios condicionados tumorales, la activación de Cdc42 tuvo un ligero aumento entre 1 y 5 minutos, el cual es desde luego diferente a lo observado para RhoJ en las mismas células (Figura 17c).

Este resultado demuestra que aunque RhoJ y Cdc42 son GTPasas homólogas, su cinética de activación es muy diferente.

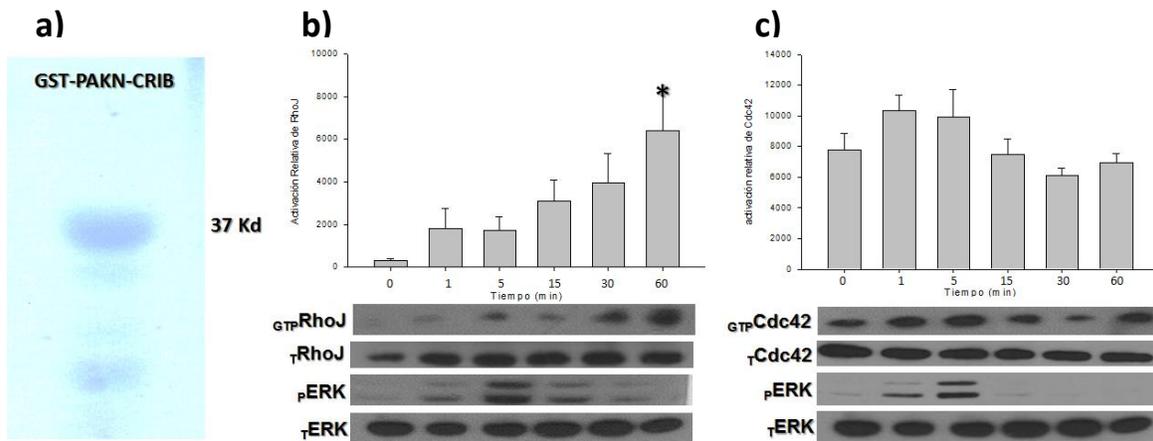


Figura 17.- La GTPasa RhoJ tiene su mayor activación a los 60 minutos cuando se estimulan células endoteliales con medios condicionados de células tumorales. a) Gel teñido con Coomassie de la purificación de la proteína de fusión GST-PAKN-CRIB para los ensayos de activación de RhoJ. b y c) Gráfica de las curvas de activación de RhoJ y Cdc42. Estas RhoGTPasas son homólogas pero su cinética de activación por medios condicionados tumorales es muy diferente (RhoJ n=4, Cdc42 n=3 *P< 0,05). Se muestran los totales de RhoJ (τ -RhoJ), Cdc42 (τ -Cdc42). pERK y τ ERK son controles de estímulo, debido a que los medios condicionados tumorales activan esta vía para la supervivencia de las células endoteliales.

RhoJ es activada por medios condicionados de células tumorales, al ser una RhoGTPasa su activación depende de un RhoGEF que debe ser activado por factores angiogénicos tumorales presentes en los medios condicionados.

El análisis bioinformático condujo a la identificación de 7 RhoGEFs como principales candidatos para activar a RhoJ. Si estos RhoGEFs candidatos activan a RhoJ, deben de interactuar de forma directa entre los dominios DH-PH del RhoGEF y RhoJ, favoreciendo el intercambio de GDP por GTP en la GTPasa. Para realizar los ensayos de interacción se realizó la subclonación de RhoJ-T35N (dominante negativa) en el plásmido pGEX (Figura 18a) para posteriormente expresar y purificar la proteína de fusión GST-RhoJ-T35N (Figura 18b). Esta proteína de fusión tiene afinidad por los RhoGEFs de RhoJ, al tener RhoGEFs constitutivamente activos esa afinidad aumenta, de tal manera que si uno de los RhoGEFs candidatos interactúa con RhoJ se observará claramente.

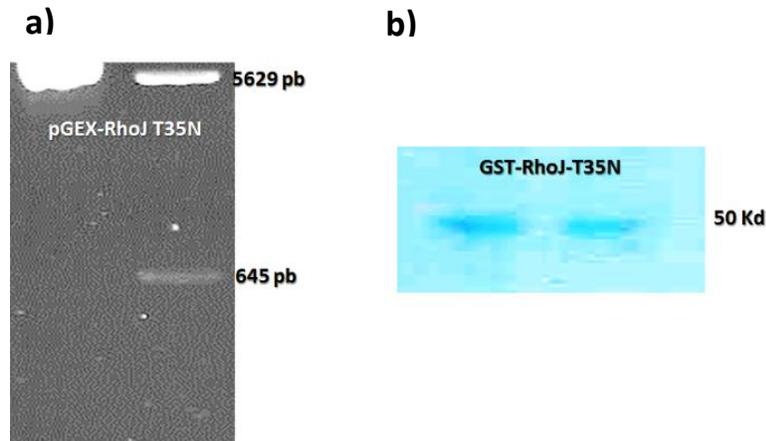


Figura 18.- Obtención de la proteína de fusión GST-RhoJ-T35N. a) Gel de Agarosa/Bromuro de etidio de la subclonación de RhoJ-T35N en pGEX6p1 para la expresión de la proteína de fusión, la banda de 645 bp corresponde al cDNA de RhoJ. b) Tinción de Coomassie de la proteína de fusión GST-RhoJ-T35N purificada para realizar los ensayos de interacción de DH-PH RhoGEFs y RhoJ.

El laboratorio cuenta con algunas construcciones de RhoGEFs constitutivamente activos que fueron obtenidos como parte de la tesis de Maestría de Alejandro Castillo Kauil (Castillo, 2013). De los RhoGEFs que consideramos candidatos activadores de RhoJ se cuenta con las construcciones de los dominios DH-PH de ITSN1, ITSN2, ARHGEF15 y ARHGEF5, todas ellas fusionadas a la proteína verde fluorescente y ancladas a la membrana mediante una señal de isoprenilación.

Se realizaron los ensayos de interacción entre RhoGEFs constitutivamente activos y RhoJ-T35N y se observó que de las 4 construcciones de RhoGEFs candidatos constitutivamente activos, solo la ITSN1 y en menor grado ITSN2 se unieron directamente a RhoJ-T35N, siendo la construcción de ITSN1 la que presentó mayor afinidad de interacción con RhoJ (Figura 19a).

La elección de RhoGEFs candidatos activadores de RhoJ derivó de un análisis bioinformático basado en el parecido filogenético de GTPasas y RhoGEFs, por lo cual, resulta interesante probar un RhoGEF cuya especificidad es para RhoA. El ARHGEF1 (p115) es un RhoGEF que se reporta con mayor especificidad por RhoA y se cuenta con la construcción DH-PH. Esta construcción de ARHGEF1 resultó bastante interesante porque interaccionó con RhoJ-T35N, inclusive, con mayor intensidad que ITSN1 aún cuando no era un candidato resultante del análisis bioinformático (Figura 19a). Con el análisis de interacción se identificaron 3 RhoGEFs ITSN1, ITSN2 y ARHGEF1, que se unieron a RhoJ en su forma de mutante dominante negativa. Sin embargo, sólo las construcciones constitutivamente activas de ITSN1 y ARHGEF1 activaron a RhoJ en un sistema modelo de células HEK293T es el que fueron transfectadas. Esto se demostró en los ensayos de activación de RhoJ por RhoGEFs (Figura 19b).

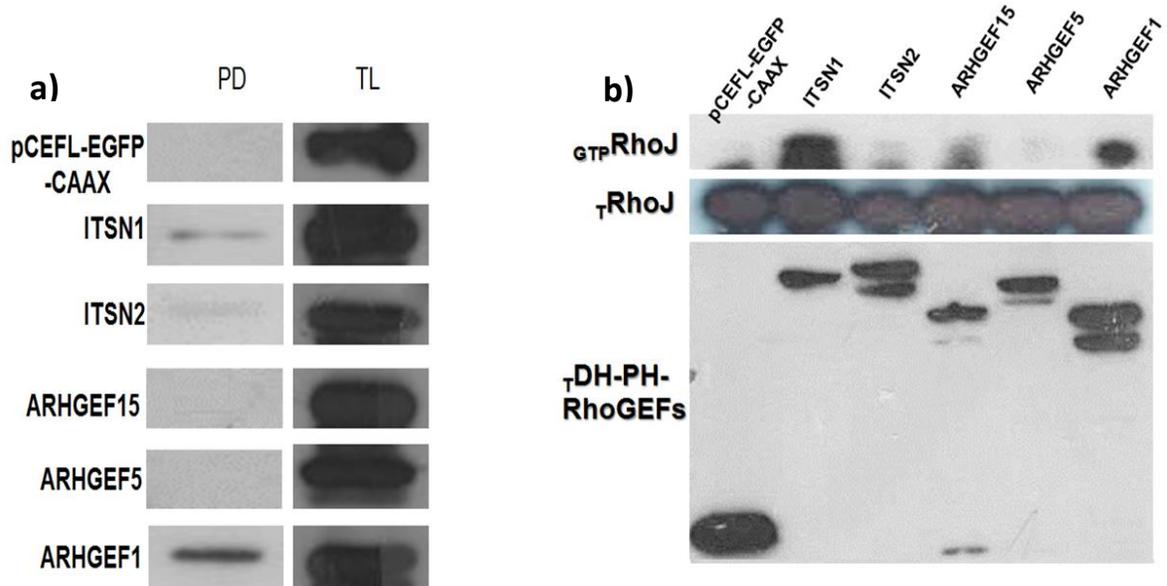


Figura 19.- ITSN1 y ARHGEF1 activan a RhoJ por interacción directa. a) Al evaluar la interacción de 4 de los RhoGEFs candidatos, solo la ITSN1 y en menor grado la ITSN2 interaccionan con RhoJ-T35N. Sin embargo, la construcción ARHGEF1-DH-PH, que originalmente no era considerado un candidato activador de RhoJ, interacciona con RhoJ-T35N, incluso en mayor grado que ITSN1. b) En los ensayos de activación de RhoJ por sus RhoGEFs, sólo la ITSN1 y ARHGEF1 activan a RhoJ (interacción n=3, activación n=2).

En los ensayos de captura de RhoGEFs con afinidad por RhoJ dominante negativa, se detectó la interacción de tres RhoGEFs constitutivamente activos: el ARHGEF1, ITSN1 e ITSN2 (Figura 19a). Con el ARHGEF1 se observó una mayor interacción, seguido por ITSN1 e ITSN2. Sin embargo, en los ensayos de activación de RhoJ por el RhoGEF, sólo la ITSN1 y el ARHGEF1 activaron a RhoJ, observándose un mayor efecto de ITSN1 (Figura 19b).

Los RhoGEFs son proteínas multidomino integradoras de cascadas de señalización que transmiten la información hacia las RhoGTPasas, las cuales, por medio de sus efectores controlan procesos que involucran el remodelado del citoesqueleto celular. Se identificaron 2 RhoGEFs como activadores de RhoJ. Postulamos que estos RhoGEFs transmitirán su información a RhoJ y esta GTPasa dará lugar a cambios en el citoesqueleto de células endoteliales compatibles con procesos angiogénicos tumorales. Con el fin de avanzar en esta dirección, investigamos los efectos de RhoJ en la morfología de células endoteliales.

Repercusión funcional a nivel celular de la activación de RhoJ vinculado a una respuesta angiogénica tumoral.

Se conoce que RhoJ regula la angiogénesis tumoral, por lo tanto, es de esperarse que esta RhoGTPasa participe modulando la dinámica del citoesqueleto y proporcione fenotipos compatibles con procesos de migración celular en células endoteliales. A su vez la participación de RhoJ debe estar regulada por un RhoGEF que transmita la señalización hacia RhoJ y la active modulando el citoesqueleto de células endoteliales.

Para comenzar a evaluar la repercusión funcional de RhoJ en células endoteliales, primero se estudiaron los fenotipos que producen las mutantes RhoJ-T35N (dominante negativa) y RhoJ-Q79L (constitutivamente activa) al ser expresadas en células endoteliales.

Para realizar este ensayo y evaluar la morfología, primero se subclonó a las mutantes de RhoJ a un vector de expresión en células de mamífero con un epítipo que permitiera identificar la expresión de RhoJ (pCEFL-EGFP) después de su transfección a células PAE (Figura 20a). Se determinó la eficiencia de transfección que fue alrededor del 33% para el control (EGFP), RhoJ-WT, RhoJ-Q79L y un 12% para RhoJ-T35N (figura 20b).

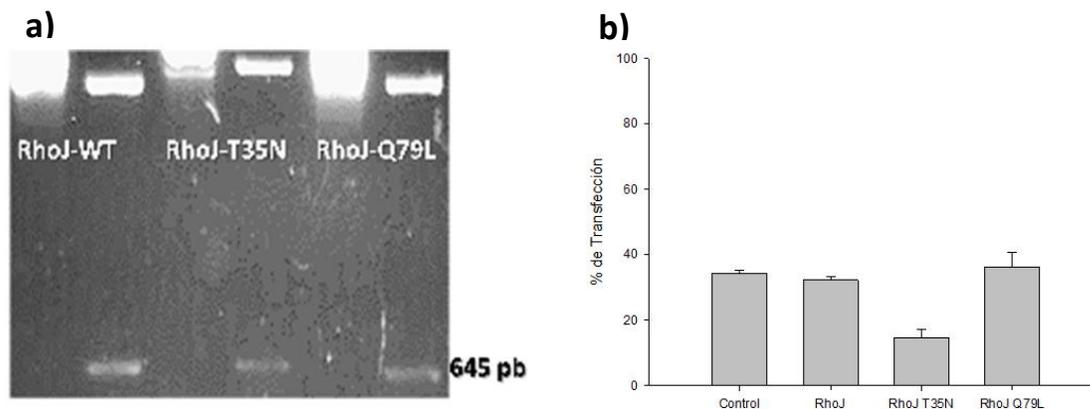


Figura 20.- RhoJ se expresa en un 33% de las células sometidas a transfección. a) Subclonación de RhoJ-WT, RhoJ-T35N, RhoJ-Q79L en el vector pCEFL-EGFP, la banda de 645 bp corresponde al cDNA de RhoJ. b) Cuantificación de la eficiencia de transfección de EGFP, RhoJ-WT, RhoJ-T35N y RhoJ-Q79L en células endoteliales (n=2).

Al observar la morfología de las células endoteliales cuando se sobreexpresaron las mutantes de RhoJ se identificaron cambios muy notables. La expresión de la proteína verde fluorescente (*GFP, Green, Fluorescent protein*) permite determinar la morfología normal de la célula endotelial.

Las células endoteliales PAE se observaron con una morfología alargada teniendo extremos agudos, bordes lisos con pocas prolongaciones tipo filopodios y una región nuclear claramente definida (Figura 21).

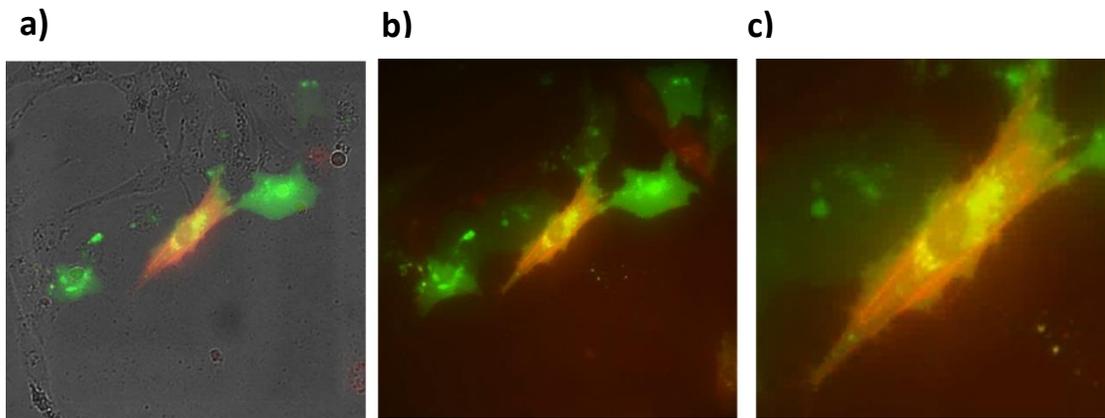


Figura 21.- Las células endoteliales de aorta porcina (PAE) presentan una morfología alargada con pocas extensiones tipo filopodios. a) Imagen de fluorescencia del campo claro, rojo y verde, b) Fluorescencia de campos Rojo y Verde, c) Amplificación de la imagen donde se observan pocas extensiones tipo filopodios. Actina (rojo), Verde (GFP) aumento de resolución 40x.

La expresión de RhoJ-WT cambió marcadamente la morfología de la célula endotelial. La superficie de la célula dejó de ser alargada y de extremos agudos. Las células adquirieron formas geométricas similares a triángulos y rectángulos, los bordes permanecieron lisos, pero con un mayor número de prolongaciones tipo filopodios. La región nuclear se observó claramente definida y la célula se observó aplanada y con un aspecto liso (Figura 22).

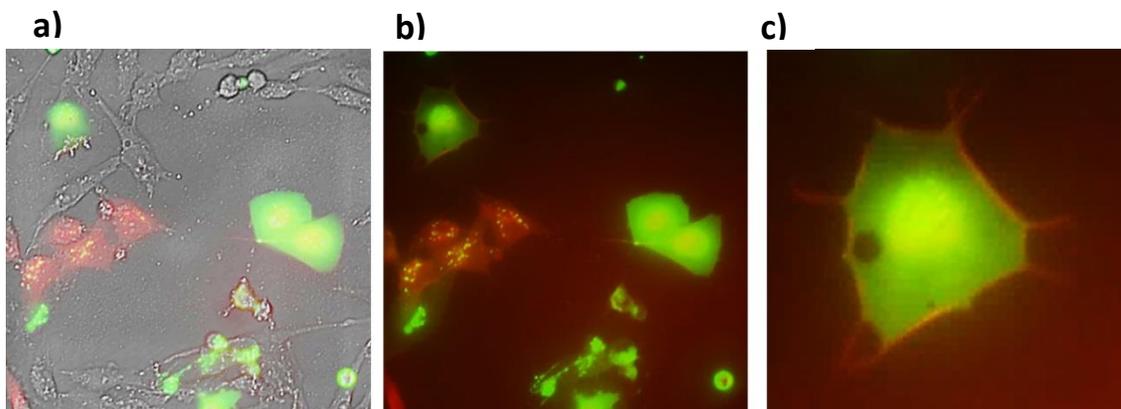


Figura 22.- La expresión de RhoJ en células endoteliales de aorta porcina (PAE) cambia la morfología de las células, aumenta el número y longitud de filopodios. a) Imagen de fluorescencia del campo claro, rojo y verde, b) fluorescencia del campo rojo y verde, c) amplificación de la imagen donde se observa un mayor número de filopodios con respecto a la expresión de GFP. Actina (Rojo), RhoJ (verde), aumento de resolución 40x.

La expresión de RhoJ-Q79L (constitutivamente activa) también cambio evidente de la superficie de la célula, similar a lo observado con RhoJ-WT. Esta mutante cambió la forma de las células endoteliales encontrándose células circulares y triangulares. Los bordes permanecieron lisos con un aumento notable en número y longitud de prolongaciones tipo filopodios. La región nuclear estuvo claramente definida y la célula se observó aplanada con un aspecto liso (Figura 23).

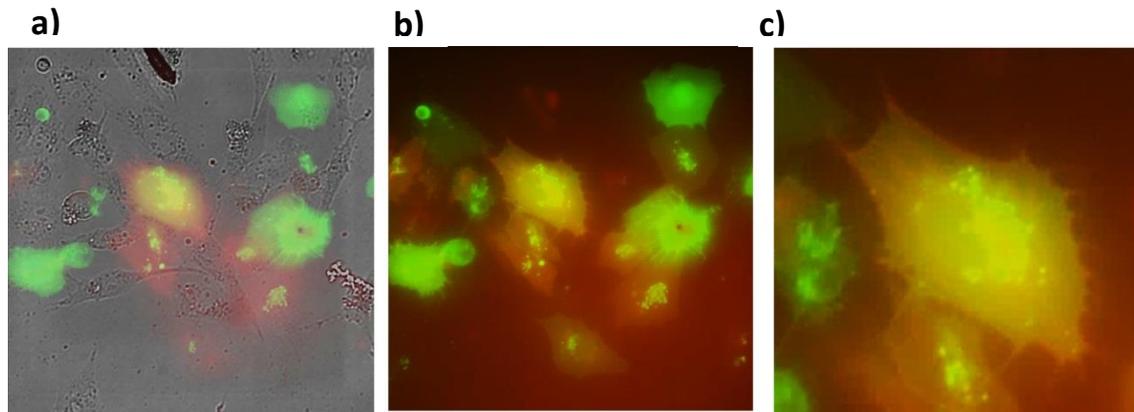


Figura 23.- La expresión de RhoJ Q79L en células endoteliales de aorta porcinas (PAE) aumenta el número de filopodios con respecto a RhoJ y las células conservan la morfología similar a lo observado con RhoJ. a) imagen de fluorescencia del campo claro, rojo y verde, b) fluorescencia del campo rojo y verde, c) ampliación de la imagen donde se observa un mayor número de filopodios con respecto a la expresión de RhoJ. Actina (RhoJ), RhoJ Q79L (verde), aumento de resolución 40x.

Cuando se expresó la mutante RhoJ-T35N (dominante negativa) la célula endotelial cambió también su morfología. Las células PAE adquieren su morfología alargada con extremos agudos. Los bordes adquirieron un aspecto liso con la supresión de prolongaciones tipo filopodios. Las células presentaron un aspecto liso con la región nuclear claramente definida (Figura 24).

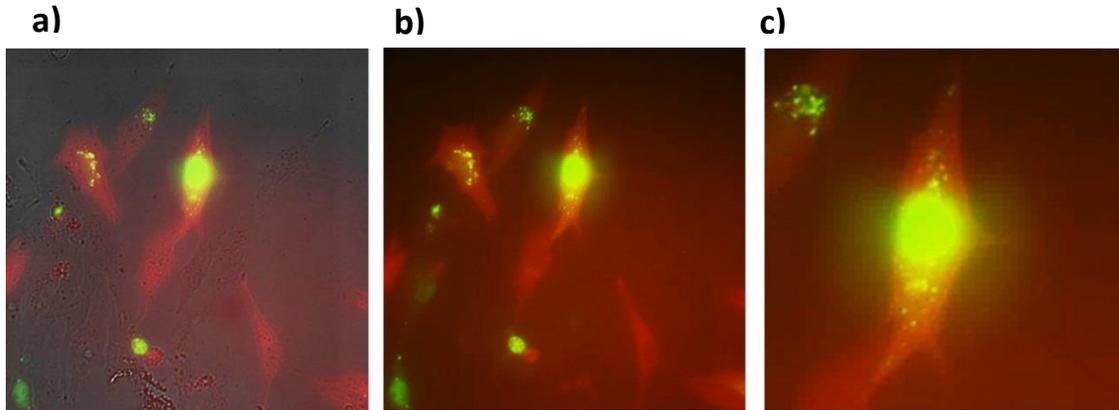


Figura 24.- La expresión de RhoJ T35N en células endoteliales de aorta porcina (PAE) regresa a su morfología inicial con la supresión de filopodios. a) Imagen de fluorescencia de los campos claro, rojo y verde, b) fluorescencia del campo rojo y verde, c) ampliación de la imagen donde se observa la supresión de estructuras tipo filopodios. Actina (rojo), RhoJ T35N (verde), aumento de resolución 40x.

Los filopodios son prolongaciones del citoesqueleto celular que detectan señales angiogénicas. Esto permite a la célula endotelial dirigirse en una dirección particular y formar nuevos vasos sanguíneos. La GTPasa RhoJ participa en la regulación de la angiogénesis tumoral, por lo que al observar estas estructuras estas podrían ser un buen indicador para correlacionar la participación de RhoJ en procesos angiogénicos, regulando la migración de células endoteliales.

En cuanto a las células endoteliales que expresaron a la proteína verde fluorescente (*GFP, Green, Fluorescent protein*), sólo un 11% de ellas presentaron filopodios. La expresión de RhoJ-WT produjo formación de filopodios en 34% de las células transfectadas, mientras que la expresión de RhoJ-Q79L llevó a que un 50% de las células transfectadas formara filopodios. Por el contrario, la expresión de RhoJ-T35N disminuyó la formación de filopodios, observándose estas estructuras en sólo un 9% de las células transfectadas (Figura 25a).

Cuando se determina la expresión de las mutantes de RhoJ por Western Blot se detecta claramente la expresión de la proteína verde fluorescente (*GFP, Green, Fluorescent protein*), RhoJ-WT y RhoJ-Q79L, pero la expresión de RhoJ-T35N no se detecta (figura 25b).

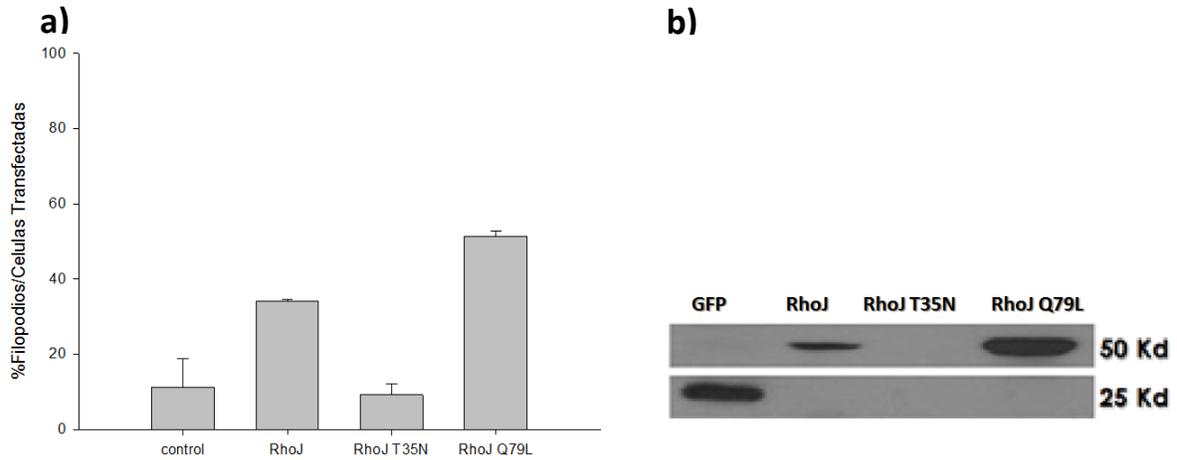


Figura 25.- La expresión de RhoJ en células endoteliales favorece la formación de filopodios. a) RhoJ tipo silvestre favorece la formación de estructuras tipo filopodios, sin embargo, la expresión de RhoJ-Q79L aumenta este fenotipo celular (n=2). Por el contrario, RhoJ-T35N suprime la formación de filopodios. b) Western Blot de la expresión de las mutantes de RhoJ, no se detecta la expresión de RhoJ T35N.

Discusión.

RhoJ es una GTPasa que ha tomado relevancia en los últimos años por su participación en la angiogénesis tumoral, por lo que es considerada un blanco terapéutico para evitar el crecimiento y metástasis tumoral (Kim, Yang et al. 2014). Su sobreexpresión en endotelio tumoral es clave para la regulación de procesos migratorios de células endoteliales en respuesta a factores angiogénicos tumorales.

Al ser una GTPasa, su participación en la angiogénesis tumoral requiere de su activación, dicha activación estaría mediada por la participación de un GEF cuya identidad hasta ahora se desconoce. Por lo que revelarla ha sido motivo de este trabajo. Al igual que otras GTPasas, partimos de la premisa de que la activación de RhoJ ocurre por contacto directo entre el GEF que integra las señales angiogénicas correspondientes, favoreciendo el intercambio de GDP por GTP en RhoJ. Siendo una GTPasa importante en el contexto de la angiogénesis tumoral, identificar su RhoGEF activador es fundamental para entender cómo ocurren los procesos moleculares que conducen a la participación de RhoJ en la angiogénesis tumoral. Los RhoGEFs son proteínas multidominio que integran múltiples señales angiogénicas y transmiten esa información de una manera espacio-tiempo definido activando RhoGTPasas, que a su vez, controlan la forma de las células endoteliales (Hernandez-Garcia, Iruela-Arispe et al. 2015). Pero ¿cómo identificar activadores de RhoJ si en la literatura no se ha reportado ninguno?

El análisis bioinformático permite en primera instancia, enfocar la búsqueda de RhoGEFs con mayor probabilidad de activar a RhoJ, basado en el parecido filogenético con RhoGTPasas homólogas. En el análisis del complejo de Cdc42-ITSN1 se encontró que el aminoácido Alanina 41 (A41) de Cdc42 interactúa con la Metionina 1369 (M1369) del dominio DH de ITSN1 (Figura 15). La A41 únicamente se conserva por la familia de Cdc42, por lo cual se espera que RhoGEFs que conserven la M1369 sean candidatos con mayor probabilidad de activar a RhoJ.

En este contexto se esperaría que ITSN1 e ITSN2 activaran a RhoJ, pero los resultados de interacción y activación demuestran que sólo ITSN1 activa a RhoJ por contacto directo. Se detectó cierta interacción de ITSN2 con RhoJ pero no se logró determinar la activación de RhoJ por este RhoGEF (Figura 19). Algo interesante resultó al considerar un RhoGEF cuya especificidad se ha reportado por RhoA, el ARHGEF1 (P115), que no fue un candidato obtenido por el análisis bioinformático pero que, sin embargo, demostramos que interactúa de forma directa con RhoJ y la activa (Figura 19).

Este resultado indica que si bien el análisis bioinformático para identificar RhoGEFs con afinidad por RhoJ fue una estrategia efectiva al llevar a la identificación de ITSN1 como activadora de RhoJ, esta estrategia tiene sus limitaciones y debe ser complementada con alternativas que lleven a considerar RhoGEFs adicionales como posibles candidatos. El análisis bioinformático se enfocó en el complejo Cdc42-ITSN1, y se tomaron los sitios de interacción conservados por RhoJ. Sin embargo, dos sitios de interacción no se conservaron por RhoJ, el Acido Aspártico 65 (D65) y la Arginina 66 (R66) presentes en Cdc42 corresponden en RhoJ a la Asparagina 83 (N83) y la Glutamina 84 (Q84). Estos sitios podrían ser puntos claves que den cierta especificidad por determinados RhoGEFs. Desafortunadamente, hasta la fecha se desconocen otros modelos estructurales que permitan realizar un análisis más detallado.

Ciertamente el análisis bioinformático no es exhaustivo. Por lo tanto, no podemos afirmar que sólo ITSN1 y ARHGEF1 son activadores de RhoJ. Pero claramente su identificación abre la puerta a estudios enfocados en caracterizar su posible participación en procesos angiogénicos mediante mecanismos que involucren a RhoJ. Podrían existir otros RhoGEFs que activen a RhoJ. Considerando la evidencia de el establecimiento de interacciones directas con RhoGEFs constitutivamente activos, consideramos que ampliar esta estrategia para incluir otros RHOGEFs cuya expresión en endotelio ha sido demostrada permitirá conocer de forma definitiva al grupo de RhoGEFs que a través de RhoJ tuvieron una participación importante en procesos de angiogénesis tumoral. En otro sentido, es clara la participación de RhoJ en procesos angiogénicos, su expresión restringida al endotelio la convierte en un regulador clave en la migración de células endoteliales ante estímulos angiogénicos (Kaur, Leszczynska et al. 2011; Yuan, Sacharidou et al. 2011).

Como se observó en los ensayos de activación de RhoJ por medios condicionados de células tumorales, esta GTPasa tiene una activación que va en aumento conforme transcurre el tiempo de estímulo, observándose su máxima activación a los 60 minutos de estímulo (Figura 17). Este activación sostenida de RhoJ, en comparación con la activación transitoria de otras GTPasas, aunada a su sobreexpresión en endotelio tumoral, destaca como un elemento adicional que correlaciona con su importancia en procesos de angiogénesis tumoral, en donde RhoJ estaría constantemente expuesta a diversos estímulos oncogénicos.

A diferencia de otras GTPasas, la activación de RhoJ es sostenida. Por ejemplo, al comparar la activación de Cdc42 por medios condicionados de células tumorales, se observó una ligera activación entre los minutos 1 y 5. Estos resultados demuestran que a pesar de ser GTPasas

homólogas, sus mecanismos de regulación y por lo tanto su posible participación en procesos angiogénicos sería diferente.

Es de esperarse que esta activación de RhoJ sea mediada por RhoGEFs, posiblemente los aquí identificados ITSN1 o ARHGEF1, que a través de esta GTPasa conducirían a cambios en la dinámica del citoesqueleto de células endoteliales compatibles con procesos migratorios. Sin embargo, es primordial analizar los fenotipos asociados a la expresión de mutantes de RhoJ, para posteriormente realizar el vínculo con los RhoGEFs identificados como activadores de RhoJ.

Como se observa en la morfología de las células endoteliales cuando se expresan las mutantes RhoJ-T35N (dominante negativa) y RhoJ-Q79L (constitutivamente activa), la formación de filopodios se asocia con el estado activo de RhoJ (figura 23). En este sentido, la formación de filopodios es compatible con procesos migratorios, siendo los filopodios, estructuras características observadas con la activación de Cdc42 que detectan señales angiogénicas y permiten la migración de células en una dirección particular (Monypenny, Zicha et al. 2009).

RhoJ controla la polimerización del citoesqueleto de actina mediante su interacción directa con efectores que comparte con Cdc42, tales como la cinasa PAK1 y la proteína multidominio WASP. RhoJ interactúa directamente con estos efectores por medio de dominios CRIB presentes en ellos (Aspenstrom, Fransson et al. 2004). Es de esperarse que la formación de filopodios por RhoJ sea por interacción directa de RhoJ-GTP con WASP, esto indicaría que aunque RhoJ y Cdc42 comparten los mismos efectores, los activarían de una manera espacio-tiempo diferente y, por lo tanto, con repercusiones funcionales distintas. Por supuesto, es posible que RhoJ tenga efectores no compartidos con Cdc42 que aún no hayan sido identificados, lo que abre una serie de posibilidades de estudio interesantes.

Otra posibilidad es la regulación cruzada entre GTPasas. En este terreno, se sabe que RhoJ interactúa con el complejo GIT-PiX localizándose en las adhesiones focales, donde promueve el desensamblaje de estas estructuras y favorece la motilidad, activando Cdc42 y Rac1 (Wilson, Leszczynska et al. 2014). En este sentido, podría esperarse que RhoJ forme complejos que recluten RhoGEFs y activen otras RhoGTPasas favoreciendo la migración de células endoteliales.

Algo interesante se observó cuando se expresó a RhoJ-T35N en células endoteliales; no sólo éstas cambiaron su morfología y se suprimieron los filopodios, sino que perdieron rápidamente la expresión de esta mutante. Es posible pues que la dominante negativa de RhoJ interfiera con procesos de proliferación y supervivencia celular, lo cual explicaría la pérdida de la fluorescencia debido a muerte celular. Sin embargo, también existe la posibilidad de que las células induzcan

procesos que degraden la expresión de la dominante negativa de RhoJ, lo cual indicaría, que esta mutante bloquea procesos fundamentales y las células inducen mecanismos para sobrevivir controlando su expresión.

Los medios condicionados de células tumorales contienen múltiples factores angiogénicos que son reconocidos por diversos receptores de membrana en las células endoteliales. Estos receptores activan cascadas de señalización que llevan a la activación de RhoGEFs que posteriormente activan RhoGTPasas favoreciendo procesos migratorios de dichas células. En este sentido, se espera que los RhoGEFs identificados como activadores de RhoJ, ITSN1 y ARHGEF1 participen modulando cambios en el citoesqueleto por medio de la activación de RhoJ.

Conclusiones.

El análisis bioinformático identificó 7 RhoGEFs como posibles activadores de RhoJ: ITSN1, ITSN2, PLEKHG1, ARHGEF15, ARHGEF7, NGEF y ARHGEF5. De estos candidatos, se evaluaron 4 para ensayos de activación de RhoJ por interacción directa: ITSN1, ITSN2, ARHGEF15 y ARHGEF5. De este grupo, sólo ITSN1 activa a RhoJ. Sin embargo, adicionalmente se evaluó a ARHGEF1 (p115RhoGEF), un RhoGEF que no resultó del análisis bioinformático, pero que resultó un buen activador de RhoJ, demostrándose además una interacción directa. Es de esperarse que los RhoGEFs ITSN1 y ARHGEF1 tengan una participación clave para la integración de señales angiogénicas activando a RhoJ y que esta module los cambios observados en el citoesqueleto de células endoteliales.

RhoJ responde de forma pronunciada y sostenida a la presencia de factores presentes en medios condicionados de células tumorales. Además, promueve la formación de estructuras tipo filopodios. En un tumor en crecimiento, se esperaría entonces que RhoJ estaría siendo activada de forma sostenida y como respuesta promovería la formación de extensiones de la membrana que estarían involucradas en la participación de células endoteliales migrando y formando capilares para favorecer el crecimiento y metástasis tumorales.

Perspectivas.

RhoJ es una GTPasa poco estudiada, siendo un potencial blanco terapéutico, requiere una mejor caracterización de su participación en la angiogenesis tumoral. En este proyecto se identificaron dos RhoGEFs como activadores de RhoJ, pero aun queda un amplio campo de estudio para dilucidar los aspectos moleculares de RhoJ que conducen a la migración de células endoteliales durante procesos angiogénicos. Por lo cual, derivado de este proyecto se proponen los siguientes estudios para entender un aspecto fundamental que es la activación de RhoJ por su RhoGEFs:

- Aunque se identificaron dos RhoGEFs como activadores de RhoJ, esto no quiere decir que sean los únicos, por lo cual, se propone extender la lista de candidatos a otros RhoGEFs abordando diferentes estrategias que permitan identificar otros GEFs activadores de RhoJ.
- El análisis bioinformático identifica RhoGEFs candidatos activadores de RhoJ, eso deja fuera la posibilidad de encontrar un RhoGEF específico para RhoJ. Conociendo que RhoJ es un potencial blanco terapéutico, encontrar un RhoGEF específico para RhoJ abre la posibilidad de identificar un mejor blanco terapéutico para evitar el crecimiento y metástasis tumoral, esto podría investigarse mediante análisis proteómicos usando la proteína de fusión RhoJ dominante negativa con el fin de atrapar RhoGEFs a partir de lisados de células endoteliales.
- La activación de RhoJ por su RhoGEF se analizó en un modelo de células HEK293T, utilizando construcciones constitutivamente activas de RhoGEFs. Se requiere validar si esta activación a través de tales RhoGEF endógenos en un modelo de células endoteliales estimuladas con factores de origen tumoral.
- La activación de RhoJ produce cambios en el citoesqueleto de células endoteliales formando filopodios. Es importante identificar bajo qué cascada de señalización se produce la activación del RhoGEF, que a su vez activa a RhoJ transmitiendo la información al citoesqueleto de células endoteliales, formando los filopodios.
- Una perspectiva muy interesante sería evaluar la participación de RhoJ y sus RhoGEFs en células de la médula ósea, como células progenitoras endoteliales, que contribuyen al crecimiento tumoral.

Referencias

- Adams, R. H. and K. Alitalo (2007). "Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis." Nature reviews. Molecular cell biology **8**(6): 464-478.
- Aspenstrom, P., A. Fransson, et al. (2004). "Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system." The Biochemical journal **377**(Pt 2): 327-337.
- Benedito, R., C. Roca, et al. (2009). "The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis." Cell **137**(6): 1124-1135.
- Bergers, G. and L. E. Benjamin (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch." Nature reviews. Cancer **3**(6): 401-410.
- Billottet, C., P. Rottiers, et al. (2008). "Regulatory signals for endothelial podosome formation." European journal of cell biology **87**(8-9): 543-554.
- Bos, J. L., H. Rehmann, et al. (2007). "GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins." Cell **129**(5): 865-877.
- Braun, A. C. and M. A. Olayioye (2015). "Rho regulation: DLC proteins in space and time." Cellular signalling **27**(8): 1643-1651.
- Bryan, B. A. and P. A. D'Amore (2007). "What tangled webs they weave: Rho-GTPase control of angiogenesis." Cellular and molecular life sciences : CMLS **64**(16): 2053-2065.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2011). "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis." Nature **473**(7347): 298-307.
- Castillo, A. (2013). *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*. Maestria. CINVESTAV.
- Csepanyi-Komi, R., M. Levay, et al. (2012). "Small G proteins and their regulators in cellular signalling." Molecular and cellular endocrinology **353**(1-2): 10-20.
- Chiang, S. H., J. C. Hou, et al. (2002). "Cloning and functional characterization of related TC10 isoforms, a subfamily of Rho proteins involved in insulin-stimulated glucose transport." The Journal of biological chemistry **277**(15): 13067-13073.
- de Toledo, M., F. Senic-Matuglia, et al. (2003). "The GTP/GDP cycling of rho GTPase TCL is an essential regulator of the early endocytic pathway." Molecular biology of the cell **14**(12): 4846-4856.
- Djonov, V., M. Schmid, et al. (2000). "Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation." Circulation research **86**(3): 286-292.
- Drivas, G. T., A. Shih, et al. (1990). "Characterization of four novel ras-like genes expressed in a human teratocarcinoma cell line." Molecular and cellular biology **10**(4): 1793-1798.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature **420**(6916): 629-635.
- Farooqui, R. and G. Fenteany (2005). "Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement." Journal of cell science **118**(Pt 1): 51-63.
- Fraisl, P., M. Mazzone, et al. (2009). "Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism." Developmental cell **16**(2): 167-179.
- Friedl, P. and K. Wolf (2010). "Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model." The Journal of cell biology **188**(1): 11-19.
- Fukushima, Y., M. Okada, et al. (2011). "Sema3E-PlexinD1 signaling selectively suppresses disoriented angiogenesis in ischemic retinopathy in mice." The Journal of clinical investigation **121**(5): 1974-1985.

-
- Garcia-Mata, R. and K. Burridge (2007). "Catching a GEF by its tail." Trends in cell biology **17**(1): 36-43.
- Grivennikov, S. I., F. R. Greten, et al. (2010). "Immunity, inflammation, and cancer." Cell **140**(6): 883-899.
- Herbert, J. M., D. Stekel, et al. (2008). "A novel method of differential gene expression analysis using multiple cDNA libraries applied to the identification of tumour endothelial genes." BMC genomics **9**: 153.
- Hernandez-Garcia, R., M. L. Iruela-Arispe, et al. (2015). "Endothelial RhoGEFs: A systematic analysis of their expression profiles in VEGF-stimulated and tumor endothelial cells." Vascul Pharmacol **74**: 60-72.
- Ho, H., J. Aruri, et al. (2012). "RhoJ regulates melanoma chemoresistance by suppressing pathways that sense DNA damage." Cancer research **72**(21): 5516-5528.
- Ho, H., A. Soto Hopkin, et al. (2013). "RhoJ modulates melanoma invasion by altering actin cytoskeletal dynamics." Pigment cell & melanoma research **26**(2): 218-225.
- Holash, J., P. C. Maisonpierre, et al. (1999). "Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF." Science **284**(5422): 1994-1998.
- Jaffe, A. B. and A. Hall (2005). "Rho GTPases: biochemistry and biology." Annual review of cell and developmental biology **21**: 247-269.
- Jaiswal, M., R. Dvorsky, et al. (2013). "Deciphering the molecular and functional basis of Dbl family proteins: a novel systematic approach toward classification of selective activation of the Rho family proteins." The Journal of biological chemistry **288**(6): 4486-4500.
- Kather, J. N. and J. Kroll (2013). "Rho guanine exchange factors in blood vessels: fine-tuners of angiogenesis and vascular function." Experimental cell research **319**(9): 1289-1297.
- Kaur, S., K. Leszczynska, et al. (2011). "RhoJ/TCL regulates endothelial motility and tube formation and modulates actomyosin contractility and focal adhesion numbers." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **31**(3): 657-664.
- Kim, C., H. Yang, et al. (2014). "Vascular RhoJ is an effective and selective target for tumor angiogenesis and vascular disruption." Cancer Cell **25**(1): 102-117.
- Kusuhara, S., Y. Fukushima, et al. (2012). "Arhgef15 promotes retinal angiogenesis by mediating VEGF-induced Cdc42 activation and potentiating RhoJ inactivation in endothelial cells." PLoS One **7**(9): e45858.
- Lamallice, L., F. Houle, et al. (2006). "Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF." The Journal of biological chemistry **281**(45): 34009-34020.
- Lamallice, L., F. Le Boeuf, et al. (2007). "Endothelial cell migration during angiogenesis." Circulation research **100**(6): 782-794.
- Lamallice, L., F. Le Boeuf, et al. (2007). "Endothelial cell migration during angiogenesis." Circ Res **100**(6): 782-794.
- Lazer, G. and S. Katzav (2011). "Guanine nucleotide exchange factors for RhoGTPases: good therapeutic targets for cancer therapy?" Cellular signalling **23**(6): 969-979.
- Liu, X. M., Q. P. Zhang, et al. (2011). "Clinical significance of vasculogenic mimicry in human gliomas." Journal of neuro-oncology **105**(2): 173-179.
- Monyppenny, J., D. Zicha, et al. (2009). "Cdc42 and Rac family GTPases regulate mode and speed but not direction of primary fibroblast migration during platelet-derived growth factor-dependent chemotaxis." Molecular and cellular biology **29**(10): 2730-2747.
- Olsson, A. K., A. Dimberg, et al. (2006). "VEGF receptor signalling - in control of vascular function." Nature reviews. Molecular cell biology **7**(5): 359-371.
-

-
- Plate, K. H., A. Scholz, et al. (2012). "Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited." Acta neuropathologica **124**(6): 763-775.
- Potente, M., H. Gerhardt, et al. (2011). "Basic and therapeutic aspects of angiogenesis." Cell **146**(6): 873-887.
- Rafii, S. and D. Lyden (2008). "Cancer. A few to flip the angiogenic switch." Science **319**(5860): 163-164.
- Ricci-Vitiani, L., R. Pallini, et al. (2010). "Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells." Nature **468**(7325): 824-828.
- Ridley, A. J. (2006). "Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking." Trends in cell biology **16**(10): 522-529.
- Rojas, A. M., G. Fuentes, et al. (2012). "The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids." The Journal of cell biology **196**(2): 189-201.
- Rossman, K. L., C. J. Der, et al. (2005). "GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors." Nature reviews. Molecular cell biology **6**(2): 167-180.
- Sahai, E. and C. J. Marshall (2002). "RHO-GTPases and cancer." Nature reviews. Cancer **2**(2): 133-142.
- Sanz-Moreno, V. and C. J. Marshall (2009). "Rho-GTPase signaling drives melanoma cell plasticity." Cell cycle **8**(10): 1484-1487.
- Stapor, P., X. Wang, et al. (2014). "Angiogenesis revisited - role and therapeutic potential of targeting endothelial metabolism." Journal of cell science **127**(Pt 20): 4331-4341.
- Takase, H., K. Matsumoto, et al. (2012). "Genome-wide identification of endothelial cell-enriched genes in the mouse embryo." Blood **120**(4): 914-923.
- Vignal, E., M. De Toledo, et al. (2000). "Characterization of TCL, a new GTPase of the rho family related to TC10 and Ccdc42." The Journal of biological chemistry **275**(46): 36457-36464.
- Wennerberg, K. and C. J. Der (2004). "Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it)." Journal of cell science **117**(Pt 8): 1301-1312.
- Wilson, E., K. Leszczynska, et al. (2014). "RhoJ interacts with the GIT-PIX complex and regulates focal adhesion disassembly." Journal of cell science **127**(Pt 14): 3039-3051.
- Wu, M., Z. F. Wu, et al. (2010). "Characterization of the roles of RHOC and RHOA GTPases in invasion, motility, and matrix adhesion in inflammatory and aggressive breast cancers." Cancer **116**(11 Suppl): 2768-2782.
- Yuan, L., A. Sacharidou, et al. (2011). "RhoJ is an endothelial cell-restricted Rho GTPase that mediates vascular morphogenesis and is regulated by the transcription factor ERG." Blood **118**(4): 1145-1153.

Director de Tesis

Dr. Jose Vazquez Prado
Departamento de Farmacología, CINVESTAV

Asesores

Dr. Guadalupe Reyes Cruz
Departamento de Biología Celular, CINVESTAV

Dr. Ranier Gutierrez Mensoza
Departamento de Farmacología, CINVESTAV