



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**“MECANISMOS DE REGULACIÓN DE ARHGEF17,
UN MARCADOR DE ENDOTELIO TUMORAL”**

**Tesis que Presenta:
Q. F. B. Irving García Jiménez**

**PARA OBTENER EL GRADO DE
Maestro en Ciencias
EN LA ESPECIALIDAD DE
Farmacología**

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

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por otorgarme la beca de manutención en apoyo a mis estudios de posgrado, beca número (575367).

Al Dr. José Vázquez Prado por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme formar parte de su grupo de trabajo. Gracias por enseñarme que la constancia es la clave para el éxito.

A mi comité tutoría, a la Dra. María del Carmen García García y la Dra. Guadalupe Reyes Cruz, gracias por sus valiosos comentarios que ayudaron a la finalización de este proyecto.

DEDICATORIAS

- Agradezco a Dios por darme la oportunidad de conocer la paz en cada momento de mi vida, una vida tan dichosa que repetiría una y otra vez.
- A mi madre Lupita, quiero que sepas que te amo, le doy gracias a Dios por darme una madre ejemplar y amorosa, todo lo bueno que hay en mí es gracias a que tengo la dicha de tenerte, ¡gracias mamá!
- Con mucho amor para mi padre Pedro, sé que desde el cielo me sigues cuidando.
- A mis abuelos y en especial a mi abuela Micaela, Dios tiene la dicha de tener un ángel más, espero algún día volver a verte, ¡te amo!
- A mis hermanos Mónica, Jorge, Pedro y Erick, muchas gracias por formar parte de mi vida, como hermano menor de ustedes he aprendido los mejores ejemplos, ¡los amo!
- A mis compañeros del laboratorio 19 del departamento de biología celular: Lennis, Tania, Cesar, Misael, Sandra, Margarita y Jaime. Del laboratorio 35 del departamento de farmacología: Daniel, Sendi, Víctor, Alejandro, Magda, David y Estanislao muchas gracias por su amistad y sus consejos, sin ustedes este proyecto no hubiera sido posible.
- A mis amigos de Guerrero: Alejandro, Manuel, José Antonio, Víctor, Enrique, Yese, Jesús, Rino, Rolando, Yahir y Arturo saben que los quiero como hermanos.

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.” Albert Einstein.

ABREVIATURAS

ABD: Dominio de Unión a Actina

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AMPc: Adenosina Monofosfato cíclico

ARN: Ácido Ribonucleico

BMDC: Células Derivadas de la Médula Ósea

DAPI: 4',6-Diamino-2-Fenilindol

DH: Homólogo a Dbl

GAP: Proteína Activadora de GTPas

GDI: Inhibidores de la de Nucleótidos de Guanina

SIP: Homólogo a Src 2 Disociación de nucleótidos de Guanina

GDP: Guanosina Difosfato

GPCR: Receptores Acoplados a Proteínas G

GTP: Guanosina Trifosfato

HGF: Factor de Crecimiento de hepatocitos

LPA: Ácido lisofosfatídico

OMS: Organización Mundial de la Salud

PH: Homólogo a Pleckstrina

PKA: Proteína Cinasa A

PKG: Proteína Cinasa G

RBD: Dominio de unión a Rho

RhoGEFs: Factores Intercambiadores de Nucleótidos de Guanina

SH3: Homólogo a Src 3

TEM4: Marcador de Endotelio Tumoral 4

TEM5: Marcador de Endotelio Tumoral 5

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial VascularEsfingosina-1-Fosfato

SH2: Homólogo a Src 2

INDICE

ABSTRACT	9
RESUMEN	10
I.- INTRODUCCIÓN	11
1.1.- Angiogénesis.....	11
1.1.1.- Angiogénesis y cáncer	12
1.2.- Marcadores de endotelio tumoral.....	13
1.2.1- TEM4 (ARHGEF17).....	14
1.4.- GTPasas de la familia de Rho y migración celular	15
1.5.- Factores intercambiadores de nucleótido de guanina (RhoGEFs).....	15
1.6.- Mecanismos de regulación de los RhoGEFs	17
1.6.1.- RhoGEFs en auto-inhibición basal.....	17
1.6.2.- RhoGEFs regulados por receptores con actividad de tirosina cinasa (RTKs)	18
1.6.3.- GPCRs y proteínas G heterotriméricas	18
1.6.3.1.- RhoGEFs regulados por la subunidad $G\alpha$	19
1.6.3.2.- RhoGEFs regulados por el heterodímero $G\beta\gamma$	19
1.7.- RhoGEFs como plataformas de señalización	20
1.8.- Potencial oncogénico de los RhoGEFs.....	21
2.- JUSTIFICACIÓN	23
3.- HIPÓTESIS	24
4.- OBJETIVO GENERAL	25
5.- OBJETIVOS PARTICULARES	25
6.- ESTRATEGIA EXPERIEMENTAL	26
7.- METODOLOGÍA	27
7.1.- Generación de construcciones de ARHGEF17.....	27
7.1.1.-Diseño de primers.....	28
7.1.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	29
7.1.3.- Electroforesis de ADN en gel de agarosa	31

7.1.4.- Purificación de ADN a partir de PCR.....	32
7.1.5.- Purificación de ADN a partir de gel de agarosa	32
7.1.6.- Digestión de ADN	33
7.1.7.- Reacción de ligación.....	34
7.1.8.- Desfosforilación de vector.....	35
7.1.9.- Transformación de Bacterias ultra competentes <i>E. coli DH5a</i> con producto de ligación.....	35
7.1.10.- Extracción de ADN plasmídico (MINI-PREP).....	36
7.1.11.- Transfección con Lipofectamina-PLUS	37
7.1.12.- Transfección con Polyfect.....	39
7.1.13.- Ensayo de Western Blot.....	40
7.2.- Generación de una variante constitutivamente activa de ARHGEF17.....	41
7.2.1.- Ensayo de captura de GTPasa activa	41
7.2.2.- Ensayo de captura de GEF activo.....	42
7.2.3.- Efecto morfológico de la expresión de ARHGFEF17 constitutivamente activo en células endoteliales (PAE).....	44
7.3 Evaluación de interacciones inhibitorias en ARHGEF17.....	45
7.3.1.- Ensayo de captura de GTPasa activa	46
7.3.2.- Ensayo de captura de GEF activo.....	47
7.3.3.- Evaluación de la interacción del amino- y carboxilo-terminal con el módulo DH-PH de ARHGEF17.	48
7.4.- Activación de ARHEGF17 por estímulos angiogénicos.....	48
7.4.1.- Ensayo de captura de GEF activo.....	49
7.5.- Efecto de la expresión de G β γ en la activación de ARHGEF17.....	50
7.5.1.- Evaluación de la interacción del heterodímero G β γ con ARHGEF17	50
7.5.2.- Efecto de la expresión del heterodímero G β γ en la actividad basal de ARHGEF17	50
7.5.3.- Efecto de la expresión del heterodímero G β γ en la localización de ARHGEF17	51
7.6.- Ensayo de dimerización de ARHGEF17	53
8.- RESULTADOS.....	54
8.1.-Generación de una variante constitutivamente activa de ARHGEF17.....	54
8.1.1- Clonación del módulo DH-PH de ARHGEF17 en el pCEFL-EGFP-CAAX.	54

8.1.2.- Evaluación de la actividad de la construcción pCEFL-EGFP-ARHGEF17-DH-PH-CAAX.	55
8.1.3.- Cambios morfológicos en células endoteliales asociados a la expresión de la construcción pCEFL-EGFP-ARHGEF17-DH-PH-CAAX.....	56
8.2 Evaluación de interacciones intramoleculares inhibitorias en ARHGEF17.....	57
8.2.3.- Evaluación del efecto inhibitorio de la co-expresión del amino- y carboxilo-terminal de ARHGEF17 con la variante constitutivamente activa pCEFL-EGFP-ARHGEF17-DH-PH-CAAX.....	59
8.2.4. El módulo ARHGEF17-DH-PH interacciona con el amino y carboxilo terminal.	60
8.3.- Activación de ARHGEF17 en células endoteliales.....	61
8.4.- Análisis bioinformático de la secuencia de ARHGEF17	62
8.5- La interacción de Gβγ con ARHGEF17 promueve su activación.....	63
8.5.1.- Efecto de la expresión de Gβγ en la localización de ARHGEF17	64
8.5.1.1.-Subclonación de Gβ en el pCEFL-mCherry.....	65
8.5.1.2.- La co-expresión de ARHGEF17 con Gβγ promueve su reclutamiento a la membrana.....	66
8.6.-Determinación de un estado de dimerización de ARHGEF17.....	66
8.6.1.- Clonación de ARHGEF17 en pCEFL-EGFP	68
9.- DISCUSIÓN.....	70
10.- CONCLUSIONES.....	76
11.- PERSPECTIVAS	77
12.- REFERENCIAS	78

ABSTRACT

Angiogenesis is the formation of new blood vessels from existing ones. It occurs in normal processes such as wound healing, but in cancer, angiogenesis promotes tumor growth and metastasis. From this perspective, proteins with exacerbated expression or activity in tumor endothelium and tumor stroma represent potential drug targets. The RhoGEF known as ARHGEF17 (or TEM4, tumor endothelium marker 4) was found overexpressed in tumor endothelium of colon cancer (Croix et al. 1999). Here, we demonstrate that in endothelial cells, ARHGEF17 is activated in response to conditioned media derived from lung carcinoma cells (LAP0297) and by lysophosphatidic acid (LPA). In addition, ARHGEF17 is recruited to the membrane by interaction with the G β γ heterodimer. In order to understand the molecular mechanisms underlying ARHGEF17 regulation, we first generated a constructs including the catalytic module anchored to the membrane, which itself functions as a constitutively active variant of ARHGEF17. This construct strongly activated RhoA. Furthermore, we demonstrated that ARHGEF17 is self-inhibited by interaction of the terminal amino and carboxyl with the catalytic DH-PH module. Finally, ARHGEF17 dimerization is promoted by factors secreted by tumor cells indicating an activation mechanism that involves dynamic intramolecular interactions and homodimerization. Thus, our results show that ARHGEF17 is stimulated by tumor cell-secreted factors suggesting a potential role in tumor angiogenesis.

RESUMEN

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros pre-existentes. Esta ocurre en procesos normales como la cicatrización de heridas, pero en el cáncer, la angiogénesis promueve la metástasis y el crecimiento tumoral. Desde esta perspectiva, las proteínas con expresión o actividad exacerbada en el endotelio o estroma tumoral representan potenciales blancos farmacológicos. El RhoGEF conocido como ARHGEF17 (o TEM4, Marcador de Endotelio Tumoral 4) se encontró sobre-expresado en endotelio de cáncer de colon (Croix et al. 1999). Aquí demostramos que, en células endoteliales, ARHGEF17 es activado por medios condicionados de células de carcinoma de pulmón (LAP0297) y por ácido lisofosfatídico (LPA). Además, ARHGEF17 es reclutado a la membrana por interacción con el heterodímero G $\beta\gamma$. Con la finalidad de comprender los mecanismo moleculares de regulación de ARHGEF17, primero generamos una construcción del módulo catalítico (DH-PH) anclado a la membrana, que funcionó como una variante constitutivamente activa. Esta construcción activó específicamente a RhoA. Además, demostramos que ARHGEF17 es auto-inhibido por interacción del amino- y carboxilo terminal con el módulo catalítico DH-PH. Por último, se demostró que ARHGEF17 se homodimeriza en respuesta a factores secretados por células tumorales, indicando un mecanismo de activación que involucra una dinámica de homodimerización e interacciones intramoleculares. Así, nuestros resultados demostraron que ARHGEF17 es activado por factores secretados por células tumorales sugiriendo su rol potencial en la angiogénesis tumoral.

I.- INTRODUCCIÓN

El cáncer representa uno de los principales problemas de salud a nivel mundial; la OMS estima que en 2012 se reportaron 8.2 millones de muertes a causa de esta condición patológica (<http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>). El cáncer es una enfermedad caracterizada por la proliferación indiscriminada de un grupo de células transformadas, esta alteración les confiere la capacidad para evadir los mecanismos naturales anti-proliferativos, como la muerte natural programada (apoptosis) y la destrucción por células del sistema inmune, entre otros. El crecimiento tumoral depende de un correcto aporte de oxígeno y nutrientes. En este sentido, la inhibición de la vascularización tumoral representa un enfoque antineoplásico muy prometedor. Encontrar blancos farmacológicos específicos para dicho proceso permitirá evitar los efectos colaterales de las terapias antineoplásicas actuales que se caracterizan por ejercer un efecto fuera del blanco, afectando a grupos celulares diferentes a las tumorales o del estroma tumoral.

1.1.- Angiogénesis

Durante la etapa embrionaria, después de la formación del plexo vascular primario (Vasculogénesis), se lleva a cabo la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, un proceso denominado angiogénesis (Carmeliet 2000). Esta red vascular madura aporta el oxígeno y nutrientes necesarios para el funcionamiento correcto de órganos y tejidos. Adicionalmente, la angiogénesis participa en múltiples procesos como la reparación de heridas, reproducción y regeneración de huesos fracturados. En procesos como la reparación ósea se secretan factores angiogénicos en respuesta al ambiente hipóxico. Entre estos factores, el más conocido y mejor estudiado es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), del que se ha demostrado inducir la migración de células endoteliales y promover la formación de estructuras tipo capilar (Li, Bai et al. 2015). También se ha demostrado el reclutamiento de células progenitoras endoteliales al sitio de lesión ósea de una manera dependiente del eje SDF1/CXCR4 (Kawakami et al. 2015).

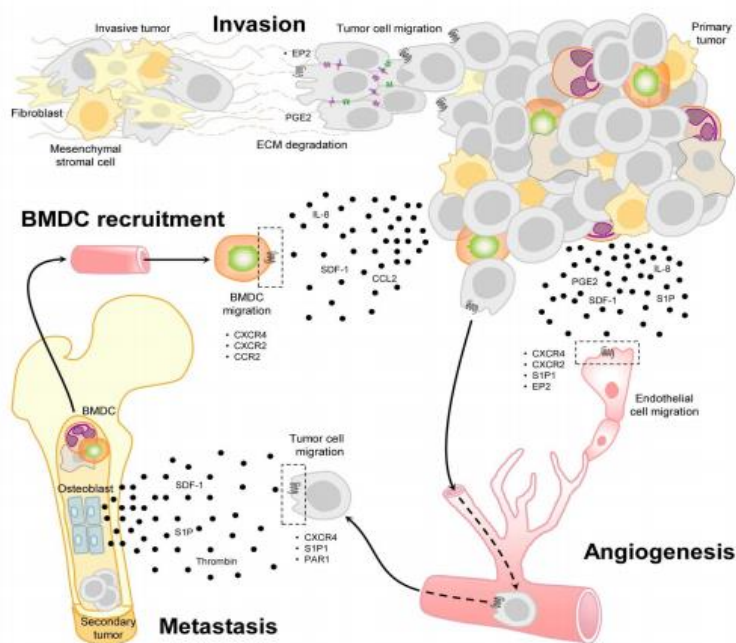


Figura 1. Angiogenesis tumoral: Células tumorales y del estroma tumoral (neutrófilo, macrófagos, fibroblastos, entre otros) secretan distintos factores angiogénicos como el SDF1 y IL-8 que activan a las células endoteliales promoviendo la remodelación vascular (angiogenesis tumoral). Estos factores también promueven el reclutamiento de células derivadas de la médula ósea (BMDC) que ejercen un efecto paracrino sobre la remodelación vascular.

1.1.1.- Angiogenesis y cáncer

La angiogenesis también está implicada en condiciones patológicas como la retinopatía diabética y el cáncer (Martin et al. 2003; Hillen & Griffioen 2007). En el cáncer, el desarrollo tumoral no depende únicamente de las células tumorales, también hay una gran contribución de células que conforman el estroma tumoral. Entre ellas podemos mencionar: macrófagos, neutrófilos, fibroblastos y células endoteliales.

Estas poblaciones celulares originan un ambiente permisivo para el desarrollo tumoral, por ejemplo; la secreción de distintos factores genera un ambiente inmunosupresor, contribuyendo a evadir la respuesta inmune anti-tumoral (Vazquez-Prado, Bracho-Valdes et al. 2016).

Por otro lado, el crecimiento tumoral es limitado por el deficiente aporte de oxígeno y nutrientes por parte de los vasos adyacentes al tumor. En este punto se enciende el interruptor angiogénico, que representa la secreción de distintos factores angiogénicos por parte de las células tumorales y aquellas conforman el estroma tumoral. Entre ellos se encuentran el VEGF, HGF y SDF-1, quienes promueven la remodelación de la red vascular adyacente al tumor, un proceso denominado angiogénesis tumoral (Figura 1) (Vazquez-Prado, Bracho-Valdes et al. 2016).

Estos factores angiogénicos también promueven el reclutamiento de células progenitoras endoteliales derivadas de la médula ósea, de quienes se ha demostrado ejercer un efecto paracrino en la angiogénesis tumoral y promover la formación de vasos sanguíneos de *novo* (Vasculogénesis tumoral) (Weis & Cheresh 2011). Dada la importancia de la angiogénesis en el desarrollo tumoral resulta relevante diseñar estrategias farmacológicas dirigidas a inhibir este proceso. Desde esta perspectiva, las proteínas cuya expresión o actividad esté restringida en endotelio tumoral representan blancos farmacológicos potenciales.

1.2.- Marcadores de endotelio tumoral

Anteriormente se mencionó que las proteínas expresadas de manera diferencial en endotelio tumoral representan blancos farmacológicos potenciales. Basado en esta premisa, Croix en 1991 identificó los ARN mensajeros más abundantes en endotelio de cáncer de colon denominados: Marcadores de Endotelio Tumoral o TEMs por sus siglas en inglés (*Tumoral Endothelial Marker*), (Croix et al. 1999).

De particular interés para nuestro laboratorio fueron TEM5 y TEM4 que codifican para un GPCR de la familia de adhesión y un RhoGEF respectivamente. TEM5, ahora mejor conocido como GPR124, se ha caracterizado como un GPCR importante para el desarrollo vascular durante la etapa embrionaria en modelos murinos (Dejana and Nyqvist 2010). En el contexto tumoral, este receptor participa en la angiogénesis tumoral mediada por VEGF (Wang, Cho et al. 2014). La participación del RhoGEF TEM4 en la angiogénesis ha sido pobremente establecida. Los RhoGEFs, como se mencionará más adelante, representan una gran familia de proteínas cuya función es activar a las GTPasas de la

familia de Rho. Estas últimas promueven la migración celular, un proceso de suma importancia durante la angiogénesis. De este modo, TEM4 podría representar un vínculo entre la activación de receptores quimiotácticos y la migración celular.

1.2.1- TEM4 (ARHGEF17)

TEM4, ahora mejor conocido como ARHGEF17, es un RhoGEF expresado abundantemente a nivel de ARNm en endotelio tumoral (Croix et al. 1999). Datos de nuestro laboratorio indican que ARHGEF17 es uno de los RhoGEFs más abundantes (ARNm) en una subpoblación de células de la médula ósea que favorece la progresión tumoral en un modelo murino (Daniel Cervantes, tesis doctoral). Estos antecedentes ubican la sobreexpresión del ARNm de ARHGEF17 en dos poblaciones celulares (Endotelio tumoral y subpoblación de células de la médula ósea) que favorecen la progresión tumoral. Esto hace atractivo estudiar a ARHGEF17 por su posible implicación en el contexto neoplásico y de particular interés para nosotros en la angiogénesis tumoral. Desde esta perspectiva, estudios utilizando ARN de interferencia han evidenciado la participación de ARHGEF17 en procesos de angiogénesis *in vitro* (Mitin et al. 2013). Además de ser importante su participación en procesos como migración celular (Mitin et al. 2013), adhesión célula-célula e integridad de la monocapa (Ngok et al. 2013).

A nivel molecular, los primeros estudios de este RhoGEF se hicieron con la clona parcial P164RhoGEF. En ella se encontró una especificidad por activar a RhoA y se postularon posibles interacciones intramoleculares (Rümenapp et al. 2002; De Toledo et al. 2000). Estructuralmente, ARHGEF17 presenta un dominio catalítico DH (homólogo a Dbl), típico de los RhoGEF de esta familia, en tanto el dominio PH (homólogo a Pleckstrina) se ha considerado ausente o bien modificado (Rümenapp et al. 2002). Además, ARHGEF17 puede asociarse a filamentos de actina y ser regulado por la cinasa PKG (Mitin et al. 2012; Lutz et al. 2013). En vista de los hallazgos sobre ARHGEF17, resulta interesante estudiar las vías de transducción de señales angiogénicas que pudieran estar modulando su actividad en el proceso de angiogénesis tumoral y de esta forma poder caracterizarlo como un posible blanco farmacológico.

1.4.- GTPasas de la familia de Rho y migración celular

Las GTPasas de la familia de Rho (RhoGTPasas) son un grupo de aproximadamente 20 proteínas cuya actividad está relacionada con la reorganización del citoesqueleto de actina. Las RhoGTPasas funcionan como interruptores moleculares, alternando entre un estado encendido y apagado, dependiendo del nucleótido de guanina al cual estén asociadas (Figura 2). Por un lado, las RhoGTPasas se asocian a GTP para adquirir una conformación activa, capaz de interactuar con sus efectores, mientras que su asociación con GDP las mantiene en un estado inactivo. La activación de las RhoGTPasas es facilitada por los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (RhoGEFs). Por otro lado, los RhoGAPs (Proteínas activadoras de GTPasa) promueven la hidrólisis del GTP a GDP, favoreciendo un estado inactivo. Por último, se encuentran los inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (RhoGDI), quienes se asocian a las RhoGTPasas en un estado inactivo evitando de esta forma su activación (Boulter, Estrach et al. 2012).

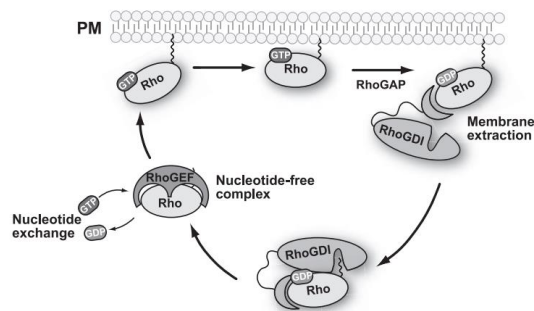


Figura 2. El ciclo de las RhoGTPasas: El ciclo de activación e inactivación de las RhoGTPasas es facilitado por los RhoGEFs y RhoGAPs respectivamente. Los RhoGDIs a su vez regulan negativamente la activación de las RhoGTPasas secuestrándolas en un estado inactivo (unido a GDP) y evitando su activación por un RhoGEF. Tomada de Boulter, Estrach et al. 2012.

El primer RhoGEF se identificó en linfoma difuso de células B, por esta razón fue denominado Dbl. Análisis de la secuencia de Dbl reveló una región de aproximadamente 200 aminoácidos con homología a Cdc24, una proteína que en levaduras funciona como GEF para Cdc42 (Ron D, et al., 1991). Posteriormente se demostró que Dbl cataliza el intercambio de GDP por GTP en Cdc42 humano. Desde entonces se han identificado

aproximadamente 73 proteínas con dominio homólogo a Dbl (DH), de las cuales en nuestro laboratorio se demostró que 63 de ellas están expresadas en células endoteliales (Figura 3) (Hernández-García et al. 2015).

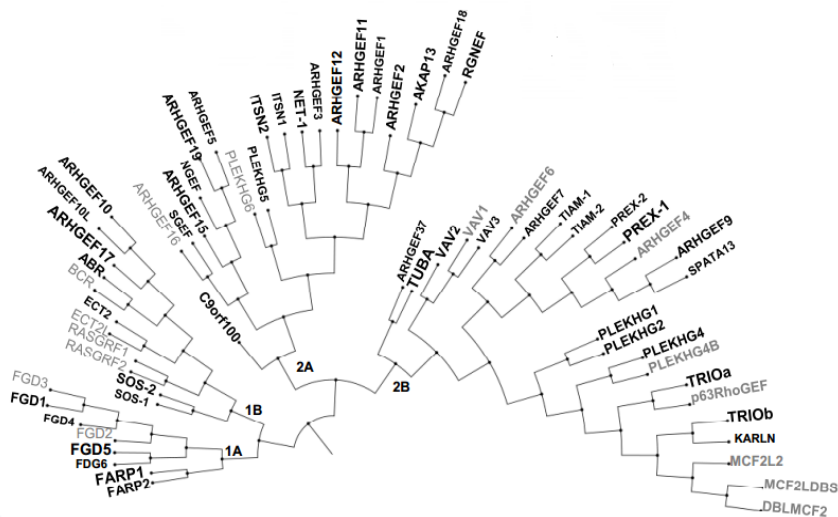


Figura 3. RhoGEFs expresados en células endoteliales. Se muestra un árbol filogenético del perfil de expresión de RhoGEFs (ARNm) en células endoteliales. La intensidad y tamaño de la letra representa el índice de expresión de cada RhoGEF. Tomada de Hernández-García et al. 2015.

Típicamente los RhoGEFs presentan un dominio homólogo a Pleckstrina (PH) en tándem al dominio DH. El dominio DH presenta la actividad catalítica, mientras que el dominio PH promueve el reclutamiento a la membrana, vía el reconocimiento de fosfoinosítidos como el PIP3, y así modular la actividad de intercambio de una manera alostérica. (Viaud, Gaits-Iacovoni et al. 2012). Adicional al tándem DH-PH, los RhoGEFs presentan gran variedad de dominios que hace de ellos candidatos idóneos para fungir como plataformas de señalización, integrando distintas señales que modulan su actividad de GEF (Figura 4)

(Bi, Debreceni et al. 2001; Yohe, Rossman et al. 2007; Cook, Rossman et al. 2014).

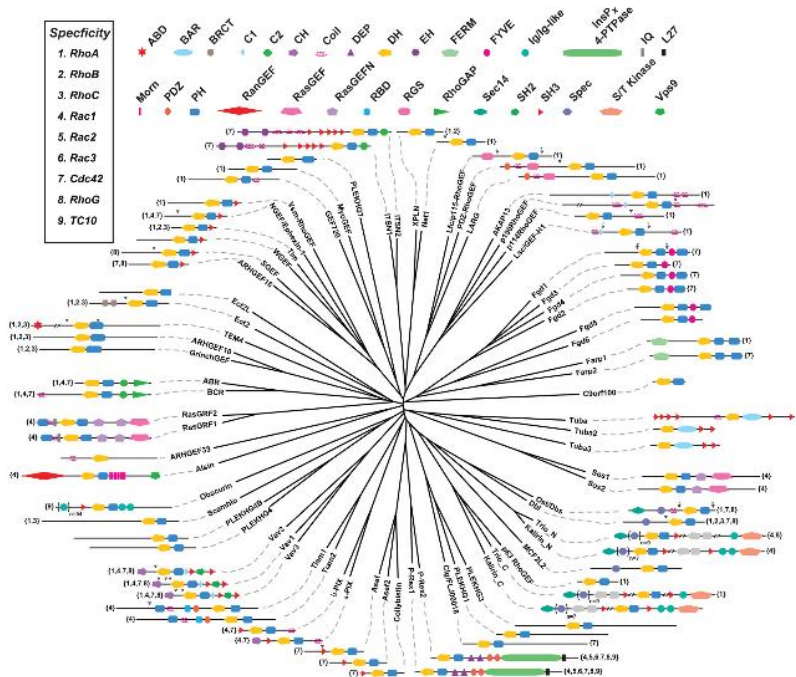


Figura 4. RhoGEFs como proteínas multidominio. Se muestra un árbol filogenético de la familia de RhoGEFs. Se ilustra la multitud de dominios presentes en los RhoGEFs adicional al tándem DH-PH, así como la especificidad para activar a Rho, Rac y Cdc42. Tomada de Cook, Rossman et al. 2014

1.6.1.- RhoGEFs en auto-inhibición basal

La variabilidad multidominio presente en los RhoGEFs impacta fuertemente en su actividad, favoreciendo en muchos casos un estado de auto-inhibición mediado principalmente por interacciones intramoleculares. Algunos ejemplos de RhoGEFs en auto-inhibición son Dbl y Vav (Aghazadeh, Lowry et al. 2000; Bi, Debreceni et al. 2001). En ambos casos existe un plegamiento del amino terminal hacia el módulo DH-PH, lo que impide la interacción de la GTPasa con el dominio DH. En el primer caso, Dbl es activado por interacción con el heterodímero $G\beta\gamma$. Por otra parte, la activación de Vav es promovida por fosforilación en la tirosina 174 por la cinasa Src (Crespo, Schuebel et al.

1997; Aghazadeh, Lowry et al. 2000). Dichos eventos de activación requieren de cascadas de señalización promovidas por receptores a nivel membranal, entre los que destacan receptores para factores de crecimiento (RTKs) y receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).

1.6.2.- RhoGEFs regulados por receptores con actividad de tirosina cinasa (RTKs)

Evidencia creciente apunta a la activación de RhoGTPasas vía mecanismos de señalización dependientes de receptores para factores de crecimiento, un ejemplo es la activación de Rac vía Vav en una manera dependiente del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Garrett, Van Buul et al. 2007). Adicionalmente se reportó que la estimulación de células de melanoma con VEGF promueve la activación de RhoA vía el complejo entre GIPC1 y el RhoGEF Syx. (Yoshida, Shimizu et al. 2015). De manera similar a los RTKs, una gran cantidad de agonistas para GPCRs promueven la activación de distintos RhoGEFs.

1.6.3.- GPCRs y proteínas G heterotriméricas

Los GPCRs son receptores de siete pasos transmembranales que están acoplados a proteínas G heterotriméricas, compuestas por las subunidades α y $\beta\gamma$. Las proteínas G heterotriméricas se clasifican en: Gs, Gi, Gq y G12/13. El efecto neto de la activación de los GPCRs depende del tipo de heterotrímero al cual esté acoplado. Comúnmente la respuesta generada por los receptores acoplados a Gs es un incremento en el AMPc citosólico, quien se asocia a las subunidad regulatoria de la PKA y de este modo promueve su activación. Esta cinasa fosforila gran cantidad de sustratos entre los que se encuentran factores transcripcionales y RhoGTPasas. Los receptores acoplados a Gi tienen un efecto contrario al ejercido por los acoplados a Gs, es decir causan una disminución en los niveles de AMPc. Por otro lado, los GPCRs acoplados a Gq activan vías dependientes de la fosfolipasa C, cuya actividad está relacionada con la regulación del calcio citosólico. Por último, los GPCRs acoplados a G12/13 promueven la activación de RhoGTPasas, principalmente RhoA, vía la interacción y activación de un grupo de RhoGEFs como se mencionará más adelante (Kehrl 1998).

La unión del agonista con el receptor (GPCR) induce un cambio conformacional que promueve el intercambio del GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$, promoviendo la disociación del heterotrímero en subunidad $G\alpha$ GTP y $G\beta\gamma$, quienes interaccionan con distintas proteínas efectoras, entre los que se encuentran RhoGEFs.

1.6.3.1.- RhoGEFs regulados por la subunidad $G\alpha$

Distintos RhoGEFs son activados por la subunidad $G\alpha$ entre los que podemos mencionar: TRIO, PDZRhoGEF, LARG, P115RhoGEF, ARHGEF28, ARHGEF2 y Dbl (Figura 5). De los RhoGEFs antes mencionados, el mecanismo de activación de PDZ-RhoGEF, LARG y P115-RhoGEF es promovido por GPCRs acoplados a $G\alpha_{12/13}$. Estos RhoGEFs tienen en común un dominio RGS (*regulator of G protein signalling*) el cual funciona como un GAP para la subunidad α unida a GTP. Así, al activarse el heterotrímero se promueve el reclutamiento a la membrana de los RGS-RhoGEFs, vía la subunidad α , dicho evento induce un cambio conformacional en los RGS-RhoGEFs finalizando en su activación, mismos que estimulan a la GTPasa RhoA (Fukuhara, Chikumi et al. 2000; Vazquez-Prado, Miyazaki et al. 2004; Chen, Singer et al. 2008). Además, dicha interacción promueve la hidrólisis del GTP en la subunidad α promoviendo la re-asociación del heterotrímero.

Comentado [jvp1]: hay que ser más preciso.

1.6.3.2.- Regulación de RhoGEFs por el heterodímero $G\beta\gamma$

Tradicionalmente se concebía a la subunidad $G\beta\gamma$ para funcionar como un “*timer*” para la señalización promovida por la subunidad $G\alpha$, re-asociándose a esta una vez hidrolizado el GTP. En los últimos años, una gran cantidad de proteínas efectoras del heterodímero $G\beta\gamma$ han sido caracterizadas, entre las que se encuentran canales, cinasas y algunos RhoGEFs. Entre estos RhoGEFs podemos encontrar a P-Rex1/2, P114RhoGEF, Dbl, PLEKHG2 y ARHGEF5 (Figura 5) (Nishida, Kaziro et al. 1999; Niu, Profirovic et al. 2003; Ueda, Nagae et al. 2008; Runne and Chen 2013). Además, se ha demostrado que la señalización del heterodímero $G\beta\gamma$ es importante para la migración y metástasis de células de cáncer de mama. En este sentido aquellos RhoGEFs activados por $G\beta\gamma$ representan blancos farmacológicos potenciales, ya que vinculan la señalización de $G\beta\gamma$ y la migración celular (Kirui, Xie et al. 2010).

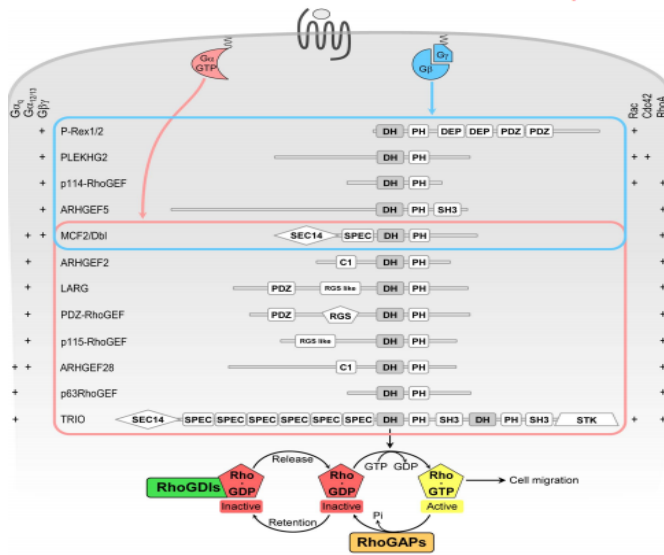


Figura 5. RhoGEFs regulados por proteínas G heterotrímicas. Se esquematizan los RhoGEFs regulados por la subunidad $G\alpha$ -GTP (rectángulo rojo) y por el heterodímero $G\beta\gamma$ (rectángulo azul). Tomada de Vazquez-Prado, Bracho-Valdes et al. 2016

1.7.- RhoGEFs como plataformas de señalización

La elevada complejidad estructural presente en los RhoGEFs permite que distintas cascadas de señalización modulen su actividad. Un ejemplo bien caracterizado de RhoGEF como plataforma de señalización es el RacGEF P-Rex1. En nuestro laboratorio hemos demostrado que P-Rex1 es activado por GPCRs acoplados a G_i , como el receptor para SDF-1. (Carretero-Ortega, Walsh et al. 2010). Esta activación requiere de la interacción de P-Rex1 con el heterodímero $G\beta\gamma$ y el segundo mensajero PIP3 (Barber, Donald et al. 2007). Resultados adicionales de nuestro laboratorio indican que la proteína cinasa A (PKA) regula negativamente la actividad de P-Rex1, por fosforilación en la serina 436. Por último, la posible participación de la subunidad reguladora de la PKA sobre la actividad de P-Rex1 ha sido recientemente sugerida (Figura 6) (Chavez-Vargas, Adame-Garcia et al. 2016)

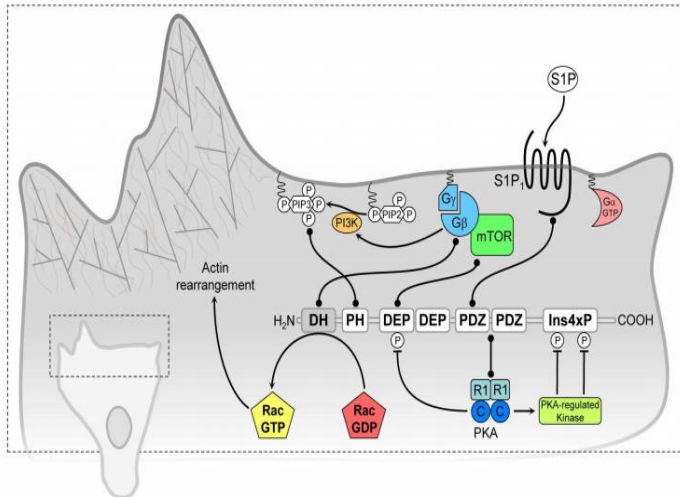


Figura 6. P-Rex1 como plataforma de señalización. La activación del RacGEF P-Rex1 es modulada por interacciones proteína-proteína con $G\beta\gamma$ y mTOR y proteína-lípido con PIP3. Mientras que la fosforilación en la serina 436 por la PKA regula negativamente su actividad. Tomada de Vazquez-Prado, Bracho-Valdes et al. 2016

1.8.- Potencial oncogénico de los RhoGEFs

Los RhoGEFs representan un vínculo entre la activación de receptores quimiotácticos y la migración celular. En este sentido, aquellos RhoGEFs con actividad exacerbada podrían promover la progresión tumoral. Un ejemplo claro lo representa Dbl, quien fue inicialmente identificado como un gen transformante, debido a la expresión de una versión truncada hacia el extremo amino terminal que carecía de interacciones inhibitorias (Ron, Graziani et al. 1989). Similar a Dbl, diversos RhoGEFs han sido caracterizados por su potencial transformante, entre ellos podemos mencionar a Vav, Sos y Abr. El índice elevado de mutaciones de los RhoGEFs en distintos tipos de cáncer hace evidente su importancia para la progresión tumoral. En la figura 7 se traza una línea del tiempo representando los distintos RhoGEFs identificados como oncogenes en distintos tipos de cáncer (Cook, Rossman et al. 2014).

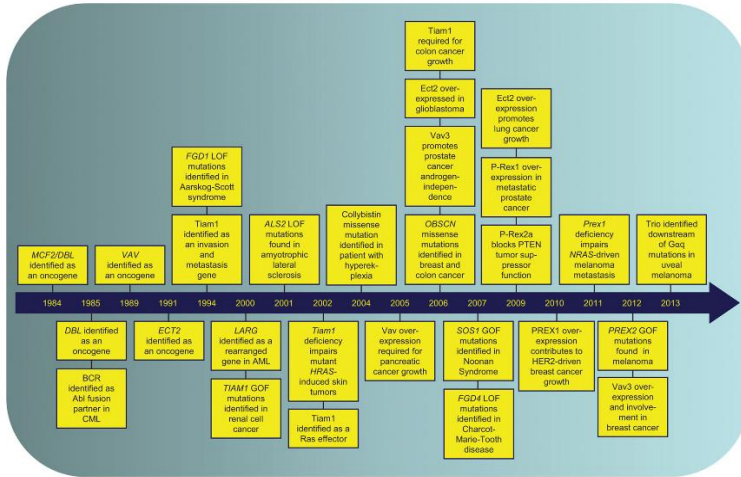


Figura 7. Potencial oncogénico de los RhoGEFs. Se esquematiza una línea del tiempo de los distintos RhoGEFs encontrados con actividad transformante. Tomada de Cook, Rossman et al. 2014

2.- JUSTIFICACIÓN

El hecho de que el proceso de angiogénesis sea importante para la progresión de los tumores, hace evidente la necesidad de encontrar blancos terapéuticos implicados en dicho proceso. Desde esta perspectiva, las proteínas abundante y diferencialmente expresadas en endotelio tumoral, representan candidatos idóneos como posibles blancos terapéuticos. ARHGEF17, al ser un RhoGEF diferencialmente expresado en endotelio tumoral y un activador de RhoA, una GTPasa importante para la migración y metástasis de células de cáncer de ovario y de páncreas (Kusama, Mukai et al. 2006; Hwang, Kim et al. 2014), hace que resulte atractivo como sujeto de estudio para entender su posible implicación en cascadas de transducción de señales angiogénicas. Por otra parte, estudios *in vitro* han proporcionado información sobre interacciones intra-moleculares en ARHGEF17 posiblemente involucradas en un estado de auto-inhibición. En vista de los hallazgos en nuestro laboratorio respecto a la elevada expresión de este RhoGEF en células endoteliales, resulta interesante el estudiar si ARHGEF17 reúne los requerimientos estructurales para adquirir una conformación auto-inhibitoria en condiciones basales, y si la activación de cascadas de transducción de señales angiogénicas promueven que ARHGEF17 se active por un mecanismo de control de interacciones intramoleculares. Entender las bases moleculares de la activación de ARHGEF17 en cascadas de transducciones señales angiogénicas, nos permitirá caracterizarlo de manera más precisa como un posible blanco farmacológico.

3.- HIPÓTESIS

Estímulos angiogénicos, principalmente aquellos reconocidos por GPCRs, activan a ARHGEF17, un RhoGEF inicialmente reconocido como un marcador de endotelio tumoral (TEM4), vía un mecanismo que involucra una dinámica de control de interacciones intramoleculares inhibitorias.

4.- OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los mecanismos de transducción de señales que promueven la activación de ARHGEF17 en respuesta a estímulos angiogénicos.

5.- OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Determinar la activación de ARHGEF17 en respuesta a diferentes estímulos angiogénicos como LPA y medios condicionados de células tumorales.

2.- Determinar el posible mecanismo implicado en la auto-inhibición de ARHGEF17.

3.- Realizar un análisis de los múltiples sitios consenso de fosforilación presentes en ARHGEF17 posiblemente implicados en la regulación de su actividad.

6.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la figura 8 se esquematiza la estrategia general abordada en este proyecto. De manera general se investigaron los estímulos angiogénicos que promovieran la activación de ARHGEF17 en células endoteliales (Figura 8A), haciendo principal énfasis en la activación promovida por receptores acoplados a proteínas G. Además, para abordar una estrategia de ganancia de función, se generó una variante constitutivamente activa de ARHGEF17 (Figura 8B). Esto se logró clonando el módulo DH-PH de ARHGEF17 en el plásmido pCEFL-EGFP-CAAX. Por otra parte, con la finalidad de evaluar interacciones intramoleculares inhibitorias, se generaron construcciones DH-PH extendidas hacia el extremo amino y carboxilo (Figura 8C). La actividad de estas construcciones y del GEF completo se evaluó por ensayos de *pulldown* de captura de GTPasa y GEF activo. Además, también se determinaron los cambios morfológicos asociados a la expresión de dichas construcciones. Por último, se evaluó la posible existencia de un estado de dimerización de ARHGEF17. Para esto se utilizó un sistema de co-inmunoprecipitación de ARHGEF17 con dos epitopes diferentes EGFP y Flag (Figura 8D).

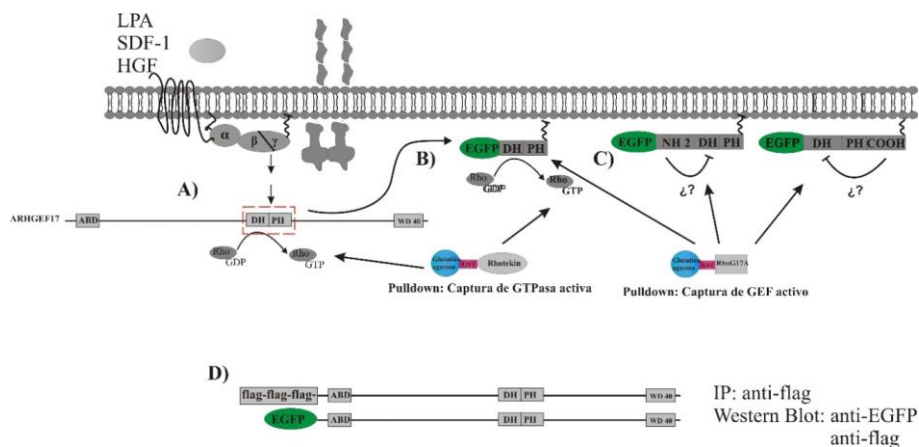


Figura 8. Estrategia general. A) Evaluación de estímulos que llevan a la activación de ARHGEF17. B) Estrategia de ganancia de función, evaluación de la actividad del módulo ARHGEF17-DH-PH expresado en el pCEFL-EGFP-CAAX. C) Evaluación de interacciones inhibitorias, expresión del módulo ARHGEF17-DH-PH extendido hacia el amino o carboxilo terminal en el pCEFL-EGFP-CAAX. La actividad de todas las construcciones se evaluó por ensayos de captura de GTPasa (RBD-Rhotekin) y GEF (RhoG17A) activo. D) Evaluación del estado de dimerización de ARHGEF17, Flag-ARHGEF17 co-expresado con EGFP-ARHGEF17 fue inmunoprecipitado para posteriormente realizar un análisis por Western Blot anti-EGFP y anti-Flag.

7.- METODOLOGÍA

Comentado [jvp2]: Hasta aquí llegué

7.1.- Generación de construcciones de ARHGEF17

La estrategia experimental para generar las distintas construcciones de ARHGEF17 está resumida en la figura 9. De manera breve, se diseñaron primers para amplificar por PCR las distintas regiones de ARHGEF17 a partir del plásmido pCEFL-3xflag-ARHGEF17 utilizado como templado. Enseguida tanto las regiones amplificadas, así como el plásmido de interés se sometieron a una reacción de digestión con enzimas de restricción. Una vez digeridos, ambos son sometidos a una reacción de ligación catalizada por la enzima ADN ligasa. Este producto de ligación es utilizado para transformar bacterias ultra competentes *E. coli DH5α*, de las cuales posteriormente se realiza la extracción de ADN plasmídico. Por último, se realiza una digestión diagnóstica para las clonas seleccionadas y aquellas que den positivo a inserto se procede a expresarlas en células de mamífero.

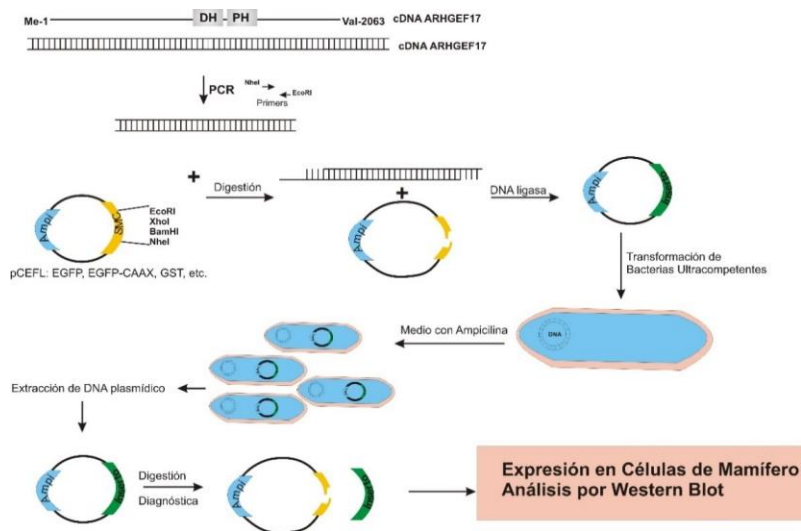


Figura 9. Procedimiento general para la generación de las distintas construcciones de ARHGEF17.

7.1.1.-Diseño de primers

Para el diseño de los primers, primero se delimitó la longitud en pares de bases (pb) para cada región de ARHGEF17, para esto nos apoyamos de plataformas como el SMART o InterProScan. Una vez hecho lo anterior se introdujo la secuencia completa de ARHGEF17 en el programa BioEdit para el diseño de los primers, teniendo como características; una longitud de 25-30 pb, secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción, misma que se debe encontrar en el sitio de multiclonación del plásmido de interés y ausentes en la región a amplificar. En la figura 10 y tabla 1 se esquematizan las construcciones de ARHGEF17 generadas en este proyecto, así como la combinación de primers para amplificar dichas regiones:

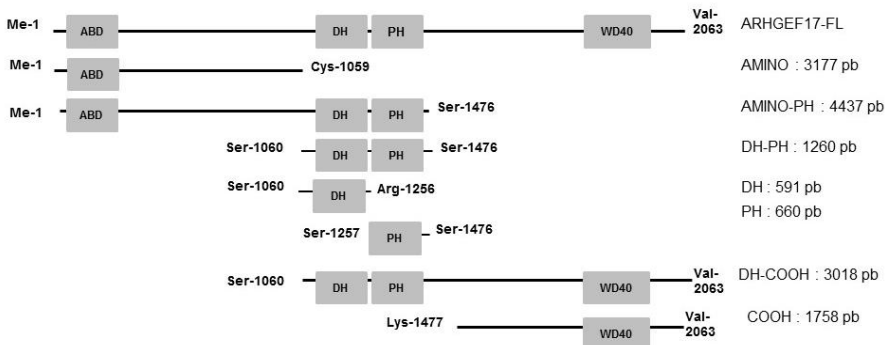


Figura 10. Se esquematizan las distintas construcciones de ARHGEF17. Se muestra la longitud en aminoácido y en pares de bases (pb) de cada construcción. Para la reacción de PCR se utilizó como templado el plásmido pCFEL-3xflag-ARHGEF17 que codifica para ARHGEF17-FL.

Construcción	Combinación de primers	Secuencia de primers
Amino	hTEM4amino-(M-5'-NheI) hTEM4_amino-(Cys1059)- 3'EcoRI	ataGCTAGCATGGCGGACGGGGCACCCCGG ataGAATTCcaGCAGCACTTGCTGGCAGGGGT
Amino-PH	hTEM4amino-(M-5'-NheI) hTEM4PH(S1476)3'EcoRI	ataGCTAGCATGGCGGACGGGGCACCCCGG ataGAATTCGCTGGATGCCAGCTTCCTCTTGG
DH-PH	hTEM4DH(S1060)5'NheI hTEM4PH(S1476)3'EcoRI	ataGCTAGCAGCAAGCCACAGGTGGACATGCG ataGAATTCGCTGGATGCCAGCTTCCTCTTGG
DH	hTEM4DH(S1060)5'NheI hTEM4-DH-3'EcoRI	ataGCTAGCAGCAAGCCACAGGTGGACATGCG ataGAATTCCTCCGACACCCTTGTTGATGCG
PH	hTEM4-PH-5'BamHI hTEM4PH(S1476)3'EcoRI	ataGGATCCAGTGCCGAGGAGGCGGAGCGC ataGAATTCGCTGGATGCCAGCTTCCTCTTGG
DH-Carboxilo	hTEM4DH(S1060)5'NheI hTEM4_COOH(Val- 2063stop)-3'-EcoRI	ataGCTAGCAGCAAGCCACAGGTGGACATGCG ataGAATTCcaCACCTCCACAGAGGAGGTG
Carboxilo	hTEM4COOH(Lys1477)- 5'NheI hTEM4_COOH(Val- 2063stop)-3'-EcoRI	ataGCTAGCAAAAGCTGTCTAGACCCTGAG ataGAATTCTCACACCCTCCACAGAGGAGGTG
<p>Tabla 1. Combinación de primers utilizada para amplificar por PCR las distintas construcciones de ARHGEF17. Para este proyecto se utilizaron las combinaciones NheI/EcoRI y BamHI/EcoRI para realizar las clonaciones en los distintos plásmidos, dichos sitios de restricción se diseñaron utilizando el programa Bioedit.</p>		

Todos los primers se resuspendieron en agua Piza estéril a una concentración de 10 ng/ μ l y conservados a -20 °C hasta su utilización.

7.1.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez diseñados los primers se procedió a amplificar por reacción de PCR las distintas

regiones de ARHGEF17. Para la reacción de PCR la concentración utilizada de los primers fue de 10 ng/ μ l y las del oligotemplado (pCEFL-3xflag-ARHGEF17) fue de 50 ng/ μ l. En la tabla 2 se enlistan los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de PCR.

Reactivo	Volumen
MgCL ₂	4 μ l
Buffer 10 X	5 μ l
DMSO	2.5 μ l
Betaína	2.5 μ l
dNTPs	1 μ l
Primers 5´	1 μ l
Primers 3´	1 μ l
Oligotemplado	0.5 μ l
Taq-polimerasa	0.5 μ l
H ₂ O	32 μ l
Volumen final	50 μ l
Tabla 2. Mezcla de reacción para PCR	

Nota: Es importante agregar DMSO y betaína cuando los primers son altamente susceptibles a formar estructuras secundarias (Información en hoja de proveedor).

Una reacción PCR convencional se realiza durante 35 ciclos de desnaturalización, hibridación, y elongación. El tiempo para la reacción de elongación depende principalmente del tamaño de la región a amplificar, tomando como referencia que la polimerasa amplifica en promedio una longitud de 1 Kb por minuto. En la tabla 3 se enlistan las condiciones generales para una reacción de PCR.

	Temperatura	Tiempo
	96°C	
Desnaturalización	96°C	50 seg.
Hibridación	68 °C	50 seg.
Elongación	72 °C	Depende de la longitud de la región a amplificar (La polimerasa amplifica 1Kb por min.)
	72°C	5 min.
	4°C	Forever
Tabla 3. Condiciones generales para llevar a cabo una reacción de PCR		

7.1.3.- Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Una vez terminada la PCR es importante corroborar que nuestro fragmento se amplificó de manera correcta, para hacerlo se corre nuestra muestra de PCR en gel de agarosa. El agente comúnmente utilizado para visualizar el ADN en geles de agarosa es el bromuro de etidio que se intercala en las bases de ADN y al ser excitado con luz ultravioleta permite visualizar nuestra muestra. Enseguida se enlista el protocolo general para una electroforesis en gel de agarosa:

1. La dureza del gel depende principalmente del tamaño de los fragmentos de ADN a separar, pero comúnmente se utilizan geles al 1%.
2. Pesar la agarosa y diluir en buffer TAE en un recipiente de uso exclusivo para este propósito. Calentar la solución 1 minuto y 30 segundos en horno de microondas (hay un horno exclusivo para este propósito). Nota: es importante no cerrar por completo el frasco.
3. Dejar la solución por 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo agregar 1.5 µl de bromuro de etidio y agregar la solución a un molde para geles de agarosa. Dejar a temperatura ambiente por 20 minutos.
4. El gel debe tener una consistencia semisólida. Colocar el gel en la cámara de geles de agarosa y agregar buffer TAE cubriendo completamente el gel.
5. Cargar la muestra con el marcador naranja de acridina a una proporción 5:1. Correr el

gel a 60 mAp.

6. Una vez terminado el corrimiento exponer el gel a luz ultravioleta utilizando el trasluminador.

Si nuestro producto de PCR es único este se podrá fácilmente purificar por columna, en caso contrario se necesita una purificación por gel de agarosa.

7.1.4.- Purificación de ADN a partir de PCR

Este protocolo es útil para productos de PCR únicos:

1. Corroborar la amplificación del ADN de interés corriendo un gel de agarosa del producto de PCR (7.1.3).
2. Agregar 5 volúmenes de solución PB por cada volumen de PCR (mezclar subiendo y bajando con la pipeta).
3. Colocar la columna en el tubo de colección y verter la mezcla anterior y Centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto.
4. Eliminar el eluato, agregar 750 μ l de buffer PE y centrifugar nuevamente.
5. Eliminar eluato, secar la membrana centrifugando nuevamente.
6. Colocar la columna en un tubo de colección nuevo y agregar de 30-50 μ l de agua piza, centrifugar como en los pasos anteriores.
7. Para corroborar la purificación del ADN de interés se realiza una electroforesis en gel de agarosa (7.1.3).

7.1.5.- Purificación de ADN a partir de gel de agarosa

Una vez amplificada nuestra secuencia de ADN de interés es importante purificarla del resto de la mezcla de reacción. En la mayoría de los casos el producto de PCR es único mientras que en otras ocasiones se producen bandas secundarias al producto esperado, en este caso se purifica la banda de interés a partir de gel de agarosa. El siguiente protocolo nos permite purificar una banda de ADN a partir de una PCR o un producto de digestión:

1. Al término del corrimiento electroforético (7.1.3), exponer el gel de agarosa al trasluminador con la finalidad de corroborar que se encuentra la banda de interés.

2. Cortar la banda de interés con una navaja exclusiva para este propósito previamente limpiada con alcohol al 70%. Es importante cortar al margen de la banda debido a que un exceso de agarosa disminuye el rendimiento de la purificación.
3. Colocar el gel en un tubo Eppendorf previamente pesado y posteriormente se vuelve a pesar para determinar el peso del gel restando el peso inicial.
4. Agregar 5 volúmenes de buffer QG por peso de gel (ejemplo 500 μ l de buffer QG por 100 mg de gel). Fundir el gel en baño María a 50°C por 10 minutos (dar vortex cada 5-3 minutos).
5. Una vez fundido el gel agregar 1 volumen de isopropanol por volumen de gel.
6. Colocar la columna en tubo de colección y posteriormente agregar la mezcla anterior y centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto.
7. Eliminar eluato y agregar 750 μ l de buffer PE y centrifugar nuevamente.
8. Eliminar eluato y secar la columna centrifugando nuevamente.
9. Pasar la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, agregar de 30-50 μ l de agua piza y centrifugar como en los pasos anteriores.
10. Para corroborar la purificación de nuestra banda de interés se realiza una electroforesis en gel de agarosa (7.1.3).

7.1.6.- Digestión de ADN

La digestión de ADN se hace con la finalidad de liberar fragmentos de interés a partir de un plásmido o generar en esté extremos cohesivos para la inserción de secuencias de ADN de interés. En este caso nosotros digerimos nuestro producto de PCR y nuestro plásmido de interés. Los sitios de restricción utilizados en nuestros primers fueron las combinaciones NheI/EcoRI y BamHI/EcoRI, mientras que los plásmidos utilizados fueron: pCEFL-EGFP-CAXX, pCEFL-EGFP y pCEFL2-GST. La tabla 4 enlista la mezcla de reacción para una digestión de ADN:

ADN	1-2 μ l
Enzima	0.5 μ l
Buffer (A,B,H)	3 μ l
Agua	Hasta completar 30 μ l
Tabla 4. Mezcla de reacción para una digestión de ADN.	

Esta mezcla de reacción se incuba toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se corre un gel de agarosa (7.1.3) para comprobar la digestión y se procede a purificar la banda de ADN, si nuestra banda es única se purifica por columna (7.1.4), caso contrario la banda de interés se purifica por extracción en gel de agarosa (7.1.5).

7.1.7.- Reacción de ligación

La reacción de ligación es útil para unir dos fragmentos de ADN que a nivel de laboratorio son comúnmente obtenidos por reacciones de digestión (7.1.6). La tabla 5 enlista la mezcla utilizada para una reacción de ligación:

Reactivo	Volumen
inserto	7.5 μ l
Vector	0.5 μ l
Buffer de ligación	1 μ l
T4ligasa	1 μ l
Tabla 7. Mezcla para una reacción de ligación.	

Nota: para incrementar la probabilidad de ligación la mezcla de reacción lleva una proporción de 15:1 de inserto respecto al vector.

La mezcla anterior se incuba en el termociclador a 16 °C por 16 horas, opcionalmente la reacción también puede realizarse a 4 °C toda la noche. Al día siguiente se guarda el ADN a -20°C hasta su utilización.

7.1.8.- Desfosforilación de vector

En muchas ocasiones no ocurre una ligación exitosa debido a una elevada religación del vector, esta probabilidad se puede disminuir por desfosforilación del vector. En la tabla 8 se enlistan los reactivos necesarios para una reacción de desfosforilación:

Reactivo	Volumen
Vector	X μ l
Buffer de fosfatasa alcalina 10X	3 μ l
Fosfatasa alcalina	1 μ l
Agua	Hasta completar 30 μ l

Tabla 8. Mezcla para una reacción de desfosforilación.

La mezcla anterior se incuba 1 hora a 37 °C. Una vez terminado el tiempo de incubación se desactiva la fosfatasa alcalina incubando la solución en baño María a 65 °C por 10 minutos. Posteriormente se purifica el vector por gel de agarosa mediante el método antes descrito (7.1.5).

7.1.9.- Transformación de Bacterias ultra competentes *E. coli* DH5 α con producto de ligación

Este protocolo permite corroborar una correcta reacción de ligación entre el vector y el inserto debido a que las bacterias que adquieran al ADN correctamente ligado serán capaces de crecer en medio restrictivo (ejemplo: ampicilina o canamicina), debido a la presencia de genes de resistencia en el vector. El procedimiento general se muestra a continuación:

1. Descongelar bacterias ultra competentes (Cepa *E. coli* DH5 α) sobre hielo, las cuales están guardadas en nitrógeno líquido.
2. Una vez descongeladas las bacterias, agregar 64 μ l de buffer TB por cada 200 μ l de bacterias.
3. Mezclar 1 μ l de ligación con 50 μ l de bacterias, incubar en hielo por 20 minutos.

4. Terminado el tiempo dar un choque térmico a 42 °C por 1 minuto. Posteriormente incubar 10 minutos en hielo.
5. Terminado el tiempo agregar 300 µl de medio SOC e incubar en shaker a 37°C a 180-200 rpm. .
6. Terminado el tiempo de incubación, centrifugar a 2300 rpm por 2 minutos.
7. Eliminar sobrenadante y resuspender las bacterias en 50 µl de medio con antibiótico. Sembrar el volumen completo en placas de agar solido con antibiótico e incubar toda la noche a 37 °C.

Nota: Cuando se trasforma plásmido superenrollado se utiliza medio liquido LB (sin antibiótico) y solo plaquear 2 µl de bacterias transformadas.

7.1.10.- Extracción de ADN plasmídico (MINI-PREP)

A partir de las distintas colonias de bacterias transformadas con el producto de ligación es importante obtener el ADN plasmídico, para esto se utiliza el kit “Plasmid Miniprep kit” (SIGMA-ALDRICH Cat. no. PLN350). Enseguida se enlista el protocolo general:

1. A partir de una caja de medio solido LB ampicilina picar de dos a cuatro colonias, y resuspender en 5 ml de medio liquido LB-ampicilina, incubar toda la noche en shaker a 37 °C a 180-200 rpm.
2. Al día siguiente centrifugar los tubos a 2500 rpm durante 5 minutos (centrifuga Sorvall RT7), eliminar el sobrenadante y resuspender la pastilla bacteriana con 200 µl de buffer de resuspención (se encuentra a 4°C), dar vortex ligeramente.
3. Adicionar 200 µl de buffer de lisis, agitar gentilmente invirtiendo los tubos e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Agregar 350 µl de solución de neutralización, subir y bajar con micropipeta, posteriormente centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos.
5. Colocar las columnas en los tubos de colección de 2 ml y adicionar 500 µl de solución de preparación de columna, centrifugar 1 minuto a 12000 rpm, eliminar eluato.
6. Una vez terminada la centrifugación de la mezcla bacteriana, transferir el sobrenadante a las columnas ya preparadas (paso anterior), centrifugar a 14000 rpm

por 1 minuto.

7. Eliminar eluato y adicionar 500 μ l de solución de lavado opcional, centrifugar nuevamente.
8. Eliminar eluato y agregar 750 μ l de solución de lavado, centrifugar nuevamente, y eliminar eluato.
9. Centrifugar nuevamente los tubos para secar la columna. Etiquetar tubos Eppendorf de 1.5 ml.
10. Finamente transferir columna a tubos Eppendorf etiquetados, agregar de 30-50 μ l de agua piza, centrifugar 1 minuto a 14000 rpm.

Una vez extraído el ADN plasmídico de las bacterias es necesario confirmar si este contiene nuestro fragmento de interés o si solo se trata de plásmido religado.

Para tal efecto se realiza una digestión diagnóstica con la enzima XhoI (comúnmente para plásmidos pCEFL) o con la combinación de enzimas utilizada para digerir nuestro fragmento (7.1.6). Posteriormente la digestión se corre en un gel de agarosa (7.1.3) y si nuestra ligación es correcta se procede a expresar nuestra construcción en células de mamífero utilizando comúnmente las células HEK293T dada su elevada eficiencia de transfección. Se espera que producto de expresión sea acorde al peso esperado, así como epítoto fusionado (flag, GST, EGFP). En el apartado siguiente se muestra el protocolo general para transfectar células de mamífero.

7.1.11.- Transfección con Lipofectamina-PLUS

Las células deben dividirse un día antes de la transfección y crecerse en placas pre-tratadas durante 10 minutos con poly-D-lysina (Solo para HEK293T) y lavadas con PBS 1X. El protocolo de transfección que se muestra a continuación es para transfectar cajas de 100 mm, en la tabla 9 se muestra la concentración y volumen máximo de ADNc, PLUS y lipofectamina a utilizar dependiendo del área de la caja a transfectar.

1. Preparar PLUS en un tubo de polipropileno dependiendo el número de cajas a transfectar. 0.75 ml de medio DMEM sin suero por caja más 10 μ l PLUS. Si hay algún ADNc en común agregarlo en este punto. Agitar e incubar 15 minutos. Agregar PLUS

sobre el medio y no al revés.

2. Preparar lipofectamina en un tubo de polipropileno dependiendo el número de cajas a transfectar. 0.75 ml de medio DMEM sin suero más 12 μ l de lipofectamina por caja. Agitar e incubar 15 minutos.
3. Alicuotar el PLUS. 760 μ l por tubo (Los tubos deben estar rotulados). Adicionar el ADNc a cada tubo, la concentración máxima depende del tipo de caja a transfectar, ver tabla. Agitar e incubar 15 minutos.
4. Agregar 762 μ l de mezcla de lipofectamina a la mezcla de PLUS más ADNc. Agitar e incubar 15 minutos.
5. Preparar células. Lavar las cajas una vez con PBS 1X y agregar 5 ml de medio DMEM sin suero.
6. Agregar por decantación la mezcla de transfección, incubar a 37 °C por 3 horas.
7. Una vez terminado el tiempo sustituir el medio de transfección por medio completo (DMEM c/antibiótico + 10% suero fetal bovino). Procesar las muestras 48 horas después.

	ADNc total (μ g)	PLUS (μ l)	Medio para diluir plus y lipof. (μ l)	Lipofectamina (μ l)	Medio que se agrega a células (ml)	Volumen final (ml)
96 pozos	0.1	1	10	0.5	0.05	0.07
24 pozos	0.4	1	25	1	0.2	0.25
12 pozos	0.7	2	50	2	0.4	0.5
6 pozos	1	3	100	3	0.8	1
60 mm	2	6	250	6	2	2.5
100 mm	4	10	750	12	5	6.5

Tabla 9. Mezcla de transfección con lipofectamina-PLUS dependiendo el área de la caja a utilizar.

7.1.12.- Transfección con Polyfect

Las células deben dividirse un día antes de la transfección y crecerse en placas pre tratadas durante 10 minutos con poly-D-lysina (solo para HEK293T) y lavadas con PBS 1X. El protocolo de transfección que se muestra a continuación es para transfectar cajas de 100 mm, en la tabla 10 se muestra la concentración y volumen máximo de ADNc y polyfect dependiendo del área de la caja a transfectar.

1. Preparar polyfect en un tubo de polipropileno dependiendo el número de cajas a transfectar. 300 μ l de medio DMEM sin suero más 25 μ l de polyfect por caja.
2. Marcar tubos, transferir 300 μ l de la solución anterior a cada uno, añadir ADNc, agitar, incubar 10 minutos.
3. Prepara las células. Lavar con PBS 1X, agregar 7 ml de medio DMEM con suero 10 %.
4. Terminado el tiempo de incubación añadir 1 ml de DMEM con suero 10 % a cada tubo. Mezclar y decantar en cajas.
5. Incubar a 37°C, 5 % de CO₂. Procesar las células 2 o 3 días después de la transfección.

	Vol. final (ml)	μ g de ADNc	Vol. para diluir Polyfect (μ l)	Vol. de Polyfect (μ l)	Vol. de medio que se agrega a células (ml)	Vol. de medio que se adiciona a complejos (ml)
Placas de 6 pozos	3	1.5	100	10	1.5	0.6
Caja de 600 mm	5	2.5	150	15	3	1
Caja de 100 mm	8	4	300	25	7	1

Tabla 10. Mezcla de transfección con Polyfect dependiendo el área de la caja a utilizar.

7.1.13.- Ensayo de Western Blot

Con la finalidad de corroborar una correcta expresión de una construcción de interés se realiza un ensayo de Western Blot que permite detectar su expresión a nivel de proteína. El primer paso es separar las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida que las separa por su diferencia en peso molecular. El procedimiento general se muestra a continuación:

1. Desnaturalizar la muestra de proteínas por la adición de buffer de muestra 4X para lisado total y 1X para muestras de *pulldown* y posteriormente hervir a 100 °C por 5 minutos. Centrifugar las muestras a máxima velocidad por 5 minutos.
2. Las muestras se cargan en el gel de poliacrilamida, el porcentaje del gel depende del tamaño de las proteínas a resolver. Es importante agregar el marcador de peso molecular para identificar nuestro peso de interés.
3. Se corre la muestra a 20 mAp.
4. Una vez terminado el corrimiento electroforético, transferir las proteínas a una membrana de PVDF. Para proteínas menores a 100 kDa la transferencia se realiza a 320 mAp por 150 minutos, mientras que aquellas de mayor peso molecular la transferencia se realiza a 350 mAp por 250 minutos en hielo.
5. Una vez terminada la transferencia bloquear la membrana con una solución de TBS-T-0.05%/leche al 5 % por 1 hora a temperatura ambiente.
6. Terminado el tiempo de incubación lavar la membrana 3 veces con TBS-T-0.05% por 5 minutos.
7. Incubar la membrana con anticuerpo primario toda la noche a 4 °C en agitación moderada. El anticuerpo primario va dirigido contra el epítopo correspondiente (GST, EGFP, flag y HA) o contra la proteína silvestre.
8. Al día siguiente lavar la membrana con TBS-T-0.05% como se mencionó anteriormente en el inciso 6.
9. Incubar 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario diluido en T-0.05%/leche al 5 %. El anticuerpo secundario a utilizar (anti-ratón, anti-conejo y anti-cabra) dependerá del origen del anticuerpo primario.

10. Una vez terminado el tiempo de incubación hacer 3 lavados con TBS-T-0.05% como se mencionó anteriormente.
11. Revelar utilizando el reactivo “Immobilon TMWestern” de MILLIPORE (Cat. No. WBKLS0500), se recomiendan exposiciones cortas de 5 y 15 segundos, y exposiciones largas de 30 segundos y 1 minuto.

7.2.- Generación de una variante constitutivamente activa de ARHGEF17

Para iniciar con el estudio de los mecanismos de regulación de ARHGEF17 se utilizó una estrategia de ganancia de función que implica la activación constitutiva del GEF en ausencia de estímulo. Se sabe que el reclutamiento a la membrana de distintos RhoGEFs es un paso importante para su activación, con esta premisa nos dimos a la tarea de expresar el módulo DH-PH de ARHGEF17 anclado a la membrana. Para esto se utilizó el plásmido pCEFL-EGFP-CAAX que permite expresar nuestra construcción anclada a la membrana gracias a la secuencia CAAX que representa una señal de prenilación, una modificación de naturaleza lipídica. Además, la construcción se expresa fusionada a la proteína verde fluorescente (EGFP), que permite seguir su dinámica celular y detección a nivel de Western Blot. Para generar esta construcción se siguió la metodología antes mencionada (7.1-7.1.13). Una vez expresada de manera correcta nuestra construcción se prosiguió a evaluar su capacidad para activar a las GTPasas mejor caracterizadas (RhoA, Rac y Cdc42) mediante ensayos de captura de GTPasa y GEF activo.

7.2.1.- Ensayo de captura de GTPasa activa

En este ensayo se aprovecha la capacidad de algunas proteínas efectoras para asociarse a las GTPasas solo en un estado activo, de este modo se ha conseguido expresar sus dominios de interacción fusionados a perlas de glutatión agarosa y así poder realizar un ensayo de *pulldown* para capturar a las GTPasas solo en un estado activo (unidas a GTP). Por un lado, se utiliza el dominio RBD de Rhotekin un efector muy conocido de la GTPasa RhoA y por otro se utiliza el dominio CRIB de la cinasa PAKN un efector dual para Rac y Cdc42. Enseguida se muestra el protocolo general:

1. Para la evaluación de la actividad de módulo DH-PH en el plásmido pCEFL-EGFP-

CAAX, células HEK293T se transfirieron por el método de Lipofectamina-PLUS como se describió anteriormente (7.1.11).

2. 12 horas post-transfección las células se ayunan toda la noche en medio libre suero.
3. Posterior a las 12 horas de ayuno lisar las células por 5 minutos con buffer de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas. **Nota:** la lisis por 5 minutos es solo para construcciones que se asume son constitutivamente activas, en caso de utilizar estímulo se recomienda lisar inmediatamente después de terminado el tiempo de estimulación.
4. Se recolecta el lisado celular y se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 ml sobre hielo. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min.
5. A partir del sobrenadante se toman 75 μ l para lisado total y agregar 25 μ l de buffer de muestra 4X. El resto del sobrenadante se incuba en hielo en posición horizontal con perlas glutatión-GST-RBD-Rhotekin (25-35 μ l) para la captura de RhoA activo (RhoA-GTP) o glutatión-GST-CRIB-PAKN para capturar de Rac y Cdc42 activos, esto por 45 minutos. **Nota:** es de suma importancia agregar el cloruro de magnesio al buffer de lisis.
6. Terminado el tiempo de incubación, centrifugar a 5000 rpm por 2 minutos a 4°C.
7. Con ayuda del vacío eliminar sobrenadante.
8. Agregar 1 ml de buffer de lisis y dar vortex ligeramente, centrifugar nuevamente.
9. Repetir el lavado 2 veces más.
10. En el último lavado eliminar sobrenadante y agregar 35-50 μ l de buffer de muestra 1X. Hervir las muestras (*Pulldown* y lisados totales) durante 5 minutos y centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos.
11. Las muestras se pueden procesar para electroforesis en gel de poliacrilamida (7.1.13) el mismo día, de lo contrario debe guardarse a -20°C hasta su procesamiento.

7.2.2.- Ensayo de captura de GEF activo

Este ensayo permite corroborar si la activación de las GTPasa por las construcciones es por interacción directa o es una activación en cascada. Como antecedentes se sabe que durante la reacción de intercambio de nucleótido catalizada por los RhoGEFs existe un estado de transición, en donde la GTPasa libera el GDP y el GTP se dispone a entrar al

bolsillo de unión de nucleótido (GTPasa libre de nucleótido), y este estado se describe como el de mayor afinidad entre el RhoGEF y la GTPasa. Basados en este principio, para los ensayos de captura de GEF activo se utilizan GTPAsas mutantes libres de nucleótido (RhoAG17A, RacG15A y Cdc42G15A) fusionadas a perlas de glutatión agarosa y de esta forma poder capturar a los RhoGEFs solo en un estado activo. El procedimiento general se describe a continuación:

1. Este protocolo se utiliza para determinar la actividad de GEFs completos (inducida por estímulos) o construcciones DH-PH en el plásmido pCEFL-EGFP-CAAX (constitutivamente activas). Células HEK293T se transfectan por el método de lipofectamina-PLUS como se describió anteriormente (7.1-7.1.13). 12 horas post-transfección las células se ayunan toda la noche en medio libre suero.
2. Posterior a las 12 horas de ayuno lisar las células por 5 minutos con buffer de lisis con inhibidores de proteasa y fosfatasas. **Nota:** la lisis por 5 minutos es solo para construcciones que se asume son constitutivamente activas, en caso de utilizar estímulo (activación de GEF completo) se recomienda lisar inmediatamente después de terminado el tiempo de estimulación.
3. Se recolecta el lisado celular y se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 ml sobre hielo. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min.
4. A partir del sobrenadante se toman 75 μ l para lisado total y agregar 25 μ l de buffer de muestra 4X. El resto del sobrenadante se incuba en hielo en posición horizontal con perlas glutatión-GST-(RhoG17A, RacG15A y Cdc42G15A) dependiendo el caso, por un tiempo de 45 minutos para módulos DH-PH y 1 hora y media para captura de GEFs completos. Terminado el tiempo de incubación, centrifugar a 5000 rpm por 2 minutos a 4°C.
5. Con ayuda del vacío eliminar sobrenadante.
6. Agregar 1 ml de buffer de lisis y dar vortex ligeramente, centrifugar nuevamente.
7. Repetir el lavado 2 veces más.
8. En el último lavado eliminar sobrenadante y agregar 35-50 μ l de buffer de muestra 1X. Hervir las muestras (*pulldown* y lisados totales) durante 5 minutos y centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos.

9. Las muestras se pueden procesar para electroforesis en gel de poliacrilamida (7.1.13) el mismo día, de lo contrario debe guardarse a -20°C hasta su procesamiento.

7.2.3.- Efecto morfológico de la expresión de ARHGFEF17 constitutivamente activo en células endoteliales (PAE)

Enseguida se evaluarán los cambios morfológicos inducidos por expresión de la construcción pCEFL-EGFP-ARHGFEF17-DH-PH-CAAX en células endoteliales de aorta porcina (PAE). Es importante señalar que las GTPasas de la familia de Rho están principalmente implicadas en cambios morfológicos asociados a la reorganización del citoesqueleto de actina. Para contrastar tal efecto el citoesqueleto de actina de las células endoteliales es comúnmente teñido con ayuda de agentes como la faloidina que se une a la actina filamentosa. El protocolo general para la tinción de células de mamífero se describe a continuación:

1. Colocar un cubreobjetos sobre una caja de 35 mm y esterilizar agregando 3 veces 1 ml de etanol al 75 % por 5 minutos. Posteriormente se incuba con 1 ml de una solución de colágeno al 0.002% por 30 minutos a 37°C .
2. Terminado el tiempo de incubación lavar con 1 ml de PBS 1X.
3. A partir de un stock de células PAE sembrar un volumen de 50-60 μl sobre la caja p35 con el cubreobjeto (cortar punta con ayuda de tijeras), esto con la finalidad de tener células aisladas.
4. Al día siguiente transfectar las células por el método de Polyfect como se mencionó anteriormente (7.1.12).
5. 12 horas pos-transfección ayunar las células toda la noche en medio libre de suero. Al día siguiente se procede a fijar las células.
6. Eliminar el medio con ayuda del vacío y lavar las células con 1 ml de PBS 1X por cada pozo.
7. Fijar las células adicionando 0.5 ml de paraformaldehído al 4% en PBS 1X por cada pozo.
8. Incubar por 20 minutos y retirar al concluir el tiempo.
9. Lavar 2 veces con PBS 1X.
10. Permeabilizar con 0.5 ml de PBS-Tritón 0.5% por cada pozo.

11. Incubar por 10 minutos y retirar al concluir el tiempo.
12. Lavar 3 veces con 1 ml de PBS-Tritón 0.1% con una duración de 1 minuto por cada lavado.
13. Bloquear con 500 μ l de PBS-Tritón 0.1% con BSA al 2% por cada pozo.
14. Incubar por 10 minutos y retirar al concluir el tiempo.
15. Lavar 2 veces con 1 ml de PBS-Tritón 0.1% por cada pozo.
16. Teñir con faloidina, por lo que se colocan 50 μ l de faloidina sobre una caja con parafilm, se retira el cubreobjetos de la caja de 6 pozos y se deja caer sobre la gota de faloidina.
17. Incubar por 20 minutos (tiempo durante el cual se puede proceder a limpiar con una gasa y alcohol los portaobjetos sobre los cuales se montará el cubreobjetos, además de sacar la solución de montaje con al menos 10 minutos antes de su uso) y retirar al concluir el tiempo, retirando el cubreobjetos y depositarlo nuevamente en el pozo de la caja de 6 pozos (a partir de este punto mantener alejado o exponer lo mínimo posible a la luz las células).
18. Lavar 3 veces con 1 ml de PBS-Tritón 0.1%.
19. Teñir con DAPI siguiendo el mismo procedimiento que en el punto 16 y 17, con excepción que el tiempo de incubación es de 1 minuto.
20. Lavar 3 veces con 1 ml de PBS-Tritón 0.1%.
21. Sobre cada portaobjetos colocar 7 μ l de solución de montaje (previamente calentada), retirar el cubreobjetos del pozo y secar con papel, dejar caer el cubreobjetos sobre la gota de solución de montaje tratando de central lo mejor posible sobre el portaobjetos.
22. Colocar los portaobjetos en un recipiente que permita protegerlos de la luz y refrigerar por 24 horas.
23. Pasado el tiempo es posible revisarlos al microscopio de fluorescencia con ayuda de aceite de inmersión, siempre protegiendo de la luz.

7.3.-Evaluación de interacciones inhibitorias en ARHGEF17

Con la finalidad de evaluar el efecto inhibitorio del amino o carboxilo sobre el módulo catalítico se generaron construcciones del módulo DH-PH extendido hacia el extremo amino o carboxilo en el plásmido pCEFL-EGFP-CAAX (Figura 11). Para generar estas

construcciones se siguió la metodología antes mencionada (7.1-7.1.13). Posteriormente se evaluó su actividad catalítica comparada a la del módulo DH-PH expresado por sí solo (PCEFL-EGFP-ARHGEF17-DH-PH-CAAX).

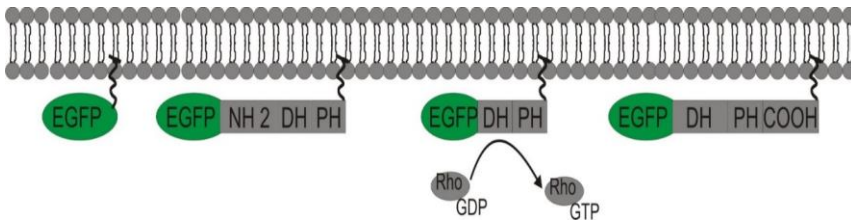


Figura 11. Estrategia para la evaluación interacciones intramoleculares en ARHGEF17. Se expresó el módulo DH-PH de ARHGEF17 extendido hacia el amino o carboxilo terminal en el PCEFL-EGFP-CAAX.

7.3.1.- Ensayo de captura de GTPasa activa

1. Células HEK293T se transfectaron por el método de lipofectamina-PLUS (7.1.11) con las construcciones NH2-PH, DH-PH y DH-COOH en el pCEFL-EGFP-CAAX o con plásmido vacío. 12 horas post-transfección las células se ayunaron por 12 horas en medio libre suero.
2. Lisar las células por 5 minutos con buffer de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas. **Nota:** la lisis por 5 minutos es solo para construcciones que se asume son constitutivamente activas, en caso de utilizar estímulo se recomienda lisar inmediatamente después de terminado el tiempo de estimulación.
3. Se recolecta el lisado celular y se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 ml sobre hielo. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min.
4. A partir del sobrenadante se toman 75 μ l para lisado total y se le agregan 25 μ l de buffer de muestra 4X. El resto del sobrenadante se incubó en hielo en posición horizontal con perlas glutatión-GST-RBD-Rhotekin (25-35 μ l) para la captura de RhoA activo (RhoA-GTP), esto por 45 minutos. **Nota:** es de suma importancia agregar el cloruro de magnesio al buffer de lisis.
5. Terminado el tiempo de incubación, centrifugar a 5000 rpm por 2 minutos a 4°C.

6. Con ayuda del vacío eliminar sobrenadante.
7. Agregar 1 ml de buffer de lisis y dar vortex ligeramente, centrifugar nuevamente.
8. Repetir el lavado 2 veces más.
9. En el último lavado eliminar sobrenadante y agregar 35-50 μ l de buffer de muestra 1X. Hervir las muestras (*pulldown* y lisados totales) durante 5 minutos y centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos.
10. Las muestras se pueden procesar para electroforesis en gel de poliacrilamida el mismo día (7.1.13), de lo contrario debe guardarse a -20°C hasta su procesamiento.

7.3.2.- Ensayo de captura de GEF activo

1. Células HEK293T se transfectaron por el método de lipofectamina-PLUS (7.1.11) con las construcciones NH2-PH, DH-PH y DH-COOH en el pCEFL-EGFP-CAAX o con plásmido vacío. 12 horas post-transfección ayunar las células por 12 horas en medio libre suero.
2. Posterior a las 12 horas de ayuno lisar las células con buffer de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas por 5 minutos. Nota: la lisis por 5 minutos es solo para construcciones que se asume son constitutivamente activas, en caso de utilizar estímulo (activación de GEF completo) se recomienda lisar inmediatamente después de terminado el tiempo de estimulación.
3. Se recolecta el lisado celular y se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 ml sobre hielo. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min.
4. A partir del sobrenadante se toman 75 μ l para lisado total y se le agregan 25 μ l de buffer de muestra 4X. El resto del sobrenadante se incuba en hielo en posición horizontal con perlas glutatión-GST-RhoG17A, por un tiempo de por 45 minutos. Terminado el tiempo de incubación, centrifugar a 5000 rpm por 2 minutos a 4°C .
5. Con ayuda del vacío eliminar sobrenadante.
6. Agregar 1 ml de buffer de lisis y dar vortex ligeramente, centrifugar nuevamente.
7. Repetir el lavado 2 veces más.
8. En el último lavado eliminar sobrenadante y agregar 35-50 μ l de buffer de muestra 1X. Hervir las muestras (*Pulldown* y lisados totales) durante 5 minutos y centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos.

9. La muestra se puede procesar para una electroforesis el mismo día, de lo contrario debe guardarse a -20°C hasta su procesamiento.

7.3.3.- Evaluación de la interacción del amino- y carboxilo-terminal con el módulo DH-PH de ARHGEF17.

1. Células HEK293T se transfectaron por el método de lipofectamina-PLUS (7.1.11) con EGFP-amino o carboxilo co-transfectados con GST-DH-PH o plásmido vacío . 12 horas pos-transfección las células se ayunaron toda la noche en medio libre de suero.
2. Al día siguiente, colocar las cajas sobre una charola con hielo lavar las células con PBS 1X (2-3 ml por caja).
3. Lisar con 1 ml buffer de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas por 10 minutos.
4. Se recolecta el lisado celular y se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 ml sobre hielo. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min a 4°C .
5. A partir del sobrenadante se toman 75 μl para lisado total y se le agregan 25 μl de buffer de muestra 4X. El resto del sobrenadante se incuba en hielo en posición horizontal con perlas glutatión-agarosa, por un tiempo de 30 minutos. Terminado el tiempo de incubación, centrifugar a 3000 rpm por 1 minutos a 4°C .
6. Con ayuda del vacío eliminar sobrenadante.
7. Agregar 1 ml de buffer de lisis y dar vortex ligeramente, centrifugar nuevamente, pero a 5000 rpm durante 1 minuto a 4°C .
8. Eliminar el sobrenadante y repetir el lavado 2 veces más.
9. En el último lavado eliminar sobrenadante y agregar 35-50 μl de buffer de muestra 1X. Hervirlas muestras (*Pulldown* y lisados totales) durante 5 minutos y centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos.
10. Las muestras se pueden procesar para electroforesis en gel de poliacrilamida el mismo día, de lo contrario debe guardarse a -20°C hasta su procesamiento.

7.4.-Activación de ARHEGF17 por estímulos angiogénicos

La elevada expresión de ARHGEF17 (ARNm) en endotelio tumoral hizo que resultara interesante el caracterizar aquellos estímulos angiogénicos que promovieran su activación en células endoteliales. Para esto se utilizaron como modelo de estudio las células PAE,

dado su origen endotelial, transfectadas con el plásmido pCEFL-3xflag-ARHEGF17 que expresa a nuestra proteína de interés asociada al epítopo flag lo que nos permite su detección a nivel de Western Blot, debido a que no se contaba con el anticuerpo para la proteína silvestre.

7.4.1.- Ensayo de captura de GEF activo

1. Células PAE se transfectaron por el método de Polyfect (7.1.12) con el plásmido pCEFL-3xflag-ARHGEF17 o con plásmido vacío. 12 horas post-transfección las células se ayunaron por 12 horas en medio libre suero.
2. Posterior a las 12 horas de ayuno las células se estimularon por 10 minutos con: ácido lisofosfatídico 1 μ M (LPA), medios condicionados de carcinoma de pulmón (LAP0297) y suero fetal bovino (SFB).
3. Terminado el tiempo de estimulación retirar medio con ayuda del vacío. Lavar con 5 ml de PBS 1X. Trabajar siempre sobre una cama de hielo.
4. Lisar las células con 1 ml de buffer de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Se recolecta el lisado celular y se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 ml sobre hielo. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min.
5. A partir del sobrenadante se toman 75 μ l para lisado total y se le agregan 25 μ l de buffer de muestra 4X. El resto del sobrenadante se incuba en hielo en posición horizontal con perlas glutatión-GST-RhoG17A, por un tiempo de 90 minutos. Terminado el tiempo de incubación, centrifugar a 5000 rpm por 2 minutos a 4°C.
6. Con ayuda del vacío eliminar sobrenadante.
7. Agregar 1 ml de buffer de lisis y dar vortex ligeramente, centrifugar nuevamente.
8. Repetir el lavado 2 veces más.
9. En el último lavado eliminar sobrenadante y agregar 35-50 μ l de buffer de muestra 1X. Hervir las muestras (*Pulldown* y lisados totales) durante 5 minutos y centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos.
10. Las muestras se pueden procesar para electroforesis en gel de poliacrilamida el mismo día, de lo contrario debe guardarse a -20°C hasta su procesamiento.
11. Para el ensayo de Western Blot ARHGEF17 activo se detecta en el pulldown utilizando el anticuerpo anti flag (anti-flag M2 monoclonal de sigma, catalogo F1804).

7.5.- Efecto de la expresión de Gβγ en la activación de ARHGEF17

7.5.1.- Evaluación de la interacción del heterodímero Gβγ con ARHGEF17

1. Células COS-7 se transfectaron por el método de lipofectamina-PLUS (7.1.11) con flag-ARHGEF17 por si solo o co-transfectado con GST-Gβγ. 12 horas post-transfección las células se ayunaron toda la noche en medio libre de suero.
2. Al día siguiente, colocar las cajas sobre una charola con hielo lavar las células con PBS 1X (2-3 ml por caja).
3. Lisar con 1 ml buffer de lisis con inhibidores por 10 minutos.
4. Se recolecta el lisado celular y se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 ml sobre hielo. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min a 4°C.
5. A partir del sobrenadante se toman 75 μl para lisado total y se le agregan 25 μl de buffer de muestra 4X. El resto del sobrenadante se incuba en hielo en posición horizontal con perlas glutatión-agarosa, por un tiempo de por 30 minutos. Terminado el tiempo de incubación, centrifugar a 3000 rpm por 1 minutos a 4°C.
6. Con ayuda del vacío eliminar sobrenadante.
7. Agregar 1 ml de buffer de lisis y dar vortex ligeramente, centrifugar nuevamente, pero a 5000 rpm durante 1 minuto a 4°C.
8. Eliminar el sobrenadante y repetir el lavado 2 veces más.
9. En el último lavado eliminar sobrenadante y agregar 35-50 μl de buffer de muestra 1X. Hervir las muestras (*Pulldown* y lisados totales) durante 5 minutos y centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos.
10. Las muestras se pueden procesar para electroforesis en gel de poliacrilamida el mismo día, de lo contrario debe guardarse a -20°C hasta su procesamiento.

7.5.2.- Efecto de la expresión del heterodímero Gβγ en la actividad basal de ARHGEF17

1. Células COS-7 se transfectaron por el método de lipofectamina-PLUS (7.1.11) con flag-ARHGEF17 por si solo o co-transfectado con flag-Gβγ. 12 horas post-transfección las células se ayunan por 12 horas en medio libre suero.
2. Posterior a las 12 horas de ayuno las células se lisaron por 5 minutos con buffer de

lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Nota: la lisis por 5 minutos es solo para construcciones que se asume son constitutivamente activas, en caso de utilizar estímulo (activación de GEF completo) se recomienda lisar inmediatamente después de terminado el tiempo de estimulación.

3. Se recolecta el lisado celular y se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 ml sobre hielo. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min.
4. A partir del sobrenadante se toman 75 μ l para lisado total y se le agregan 25 μ l de buffer de muestra 4X. El resto del sobrenadante se incuba en hielo en posición horizontal con perlas glutatión-GST-RhoG17A por un tiempo de por 45 minutos para módulos DH-PH y 90 minutos para la captura de GEFs completos. Terminado el tiempo de incubación, centrifugar a 5000 rpm por 2 minutos a 4°C.
5. Con ayuda del vacío eliminar sobrenadante.
6. Agregar 1 ml de buffer de lisis y dar vortex ligeramente, centrifugar nuevamente.
7. Repetir el lavado 2 veces más.
8. En el último lavado eliminar sobrenadante y agregar 35-50 μ l de buffer de muestra 1X. Hervir las muestras (*Pulldown* y lisados totales) durante 5 minutos y centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos.
9. Las muestras se pueden procesar para electroforesis en gel de poliacrilamida el mismo día, de lo contrario debe guardarse a -20°C hasta su procesamiento.

7.5.3.- Efecto de la expresión del heterodímero G β en la localización de ARHGEF17

Para este ensayo se utilizaron células COS-7 debido a su morfología característica (Forma de huevo estrellado), que permite visualizar colocalización a nivel membranal. El protocolo es el mismo descrito en el apartado 7.3.4:

1. Colocar un cubre objetos sobre una caja de 35 mm y se esteriliza colocando 3 veces 1 ml de etanol al 75 % por 5 minutos. Posteriormente se incuba con 1 ml de una solución de colágeno al 0.002% por 30 minutos a 37 °C.
2. Terminado el tiempo de incubación lavar con 1 ml de PBS 1X.
3. A partir de un stock de células COS-7 sembrar un volumen de 50-60 μ l sobre la caja p35 con el cubreobjeto, esto con la finalidad de tener células aisladas.

4. Al día siguiente se transfectan las células por el método de lipofectamina-PLUS (7.1.11) con EGFP-ARHGEF17 por si solo o co-transfectado con mCherry-G β γ .
5. 12 horas pos-transfección las células se ayunan en medio libre de suero toda la noche. Al día siguiente se procede a fijar las células.
6. Eliminar el medio con ayuda del vacío y lavar las células con 1 ml de PBS 1X por cada pozo.
7. Fijar las células adicionando 0.5 ml de paraformaldehído al 4% en PBS 1X por cada pozo.
8. Incubar por 20 minutos y retirar al concluir el tiempo.
9. Lavar 2 veces con PBS 1X.
10. Permeabilizar con 0.5 ml de PBS-Tritón 0.5% por cada pozo.
11. Incubar por 10 minutos y retirar al concluir el tiempo.
12. Lavar 3 veces con 1 ml de PBS-Tritón 0.1% con una duración de 1 minuto por cada lavado.
13. Bloquear con 500 μ l de PBS-Tritón 0.1% con BSA al 2% por cada pozo.
14. Incubar por 10 minutos y retirar al concluir el tiempo. Nota: en este punto se puede calentar la solución de montaje y limpiar los cubreobjetos con alcohol al 75 %.
15. Lavar 2 veces con 1 ml de PBS-Tritón 0.1% por cada pozo.
16. Teñir con DAPI, por lo que se colocan 50 μ l de DAPI sobre una caja con parafilm, se retira el cubreobjetos de la caja de 6 pozos y se deja caer sobre la gota de DAPI.
17. Incubar durante 1 minuto y retirar al concluir el tiempo, retirando el cubreobjetos y depositándolo nuevamente en el pozo de la caja de 6 pozos (a partir de este punto mantener alejado o exponer lo mínimo posible a la luz las células).
18. Lavar 3 veces con 1 ml de PBS-Tritón 0.1%.
19. Sobre cada portaobjetos colocar 7 μ l de solución de montaje (previamente calentada), retirar el cubreobjetos del pozo y secar con papel, dejar caer el cubreobjetos sobre la gota de solución de montaje tratando de central lo mejor posible.
20. Colocar los portaobjetos en un recipiente que permita protegerlos de la luz y refrigerar por 24 horas.
21. Pasado el tiempo es posible revisarlos al microscopio de fluorescencia con ayuda de aceite de inmersión, siempre protegiendo de la luz.

7.6.- Ensayo de dimerización de ARHGEF17

La estrategia utilizada para abordar esta posibilidad fue la de realizar un ensayo de co-inmunoprecipitación para flag-ARHGEF17 co-transfectado con EGFP-ARHGEF17 en presencia o ausencia de estímulo. Enseguida se describe la metodología más a detalle:

1. Una caja de células COS-7 fue transfectada solo con EGFP-ARHGEF17, mientras que 2 se co-transfectaron con flag-ARHGEF17 por el método de Lipofectamina-PLUS (7.1.11). 12 horas posterior a la transfección las células fueron ayunadas por 12 horas en medio libre de suero.
2. Al día siguiente una de las cajas co-transfectada se estimuló con medio condicionado de células de carcinoma de pulmón por 10 min.
3. Terminado el tiempo de estimulación, retirar el medio con ayuda de vacío y lavar las cajas con 5 ml de PBS 1X.
4. Lisar con 1ml de buffer de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasa, recolectar el lisado celular y colocar en un tubo Eppendorf de 1.5 ml sobre hielo. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min.
5. A partir del sobrenadante se toman 75 μ l para lisado total y se le agregan 25 μ l de buffer de muestra 4X. flag-ARHGEF17 es inmunoprecipitado del resto del lisado con 2 μ l de anticuerpo anti-flag (anti-flag M2 monoclonal de sigma, catalogo F1804), incubando toda la noche en agitación constante a 4 °C.
6. Al día siguiente agregar 30 μ l de proteína G agarosa, incubar en hielo en posición horizontal por 3 horas.
7. Terminado el tiempo de incubación, centrifugar 1 minuto a 5000 rpm a 4 °C.
8. Con ayuda del vacío eliminar sobrenadante.
9. Agregar 1 ml de buffer de lisis y dar vortex ligeramente, centrifugar nuevamente.
10. Repetir el lavado 2 veces más.
11. En el último lavado eliminar sobrenadante y agregar 35-50 μ l de buffer de muestra 1X. Hervir las muestras durante 5 minutos y centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos. La muestra puede ser procesada para electroforesis en gel de poliacrilamida el mismo día (7.1.13), de lo contrario guardar a -20°C.

8.- RESULTADOS

8.1.-Generación de una variante constitutivamente activa de ARHGEF17

8.1.1- Clonación del módulo DH-PH de ARHGEF17 en el pCEFL-EGFP-CAAX

Se amplificó por PCR la región que codifica para el módulo DH-PH de ARHGEF17 y se clonó en el plásmido pCEFL-EGFP-CAAX, esto permitió expresar a la construcción anclada a la membrana y asociada a la proteína verde fluorescente (Figura 12). De esta forma se pudo seguir su dinámica celular y su detección por ensayo de Western Blot. En la figura 12A se muestra la amplificación por PCR del módulo DH-PH de ARHGEF17. Posteriormente este fragmento se clonó en el pCEFL-EGFP-CAAX con la combinación NheI/EcoRI. En la figura 12B se muestra la digestión diagnóstica de cinco clones con la enzima XhoI de las cuales claramente la 1 y 2 contienen inserto (Fragmento de 2200 pb). Ambas clonas se expresaron de manera correcta en células de HEK293T (Figura 12 C).

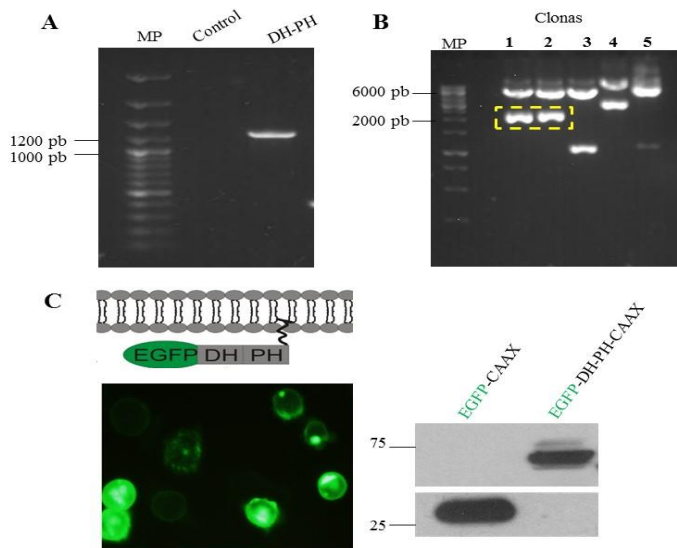
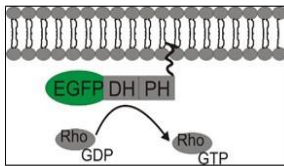


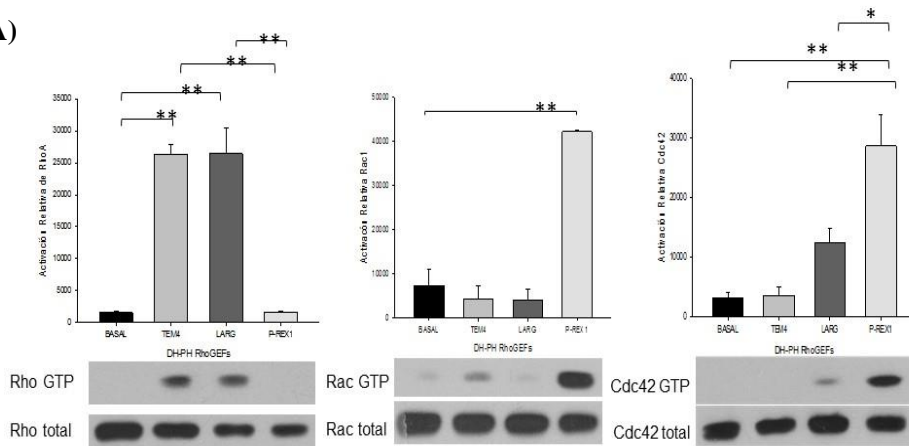
Figura 12. Expresión de ARHGEF17-DH-PH en pCEFL-EGFP-CAAX: A) Amplificación de ARHGEF17-DH-PH por PCR, como control se utilizó la mezcla de reacción sin templado. B) Digestión diagnóstica de cinco clones con la enzima XhoI, el fragmento esperado es de 2200 pb. C) Expresión de clona positiva a inserto en células HEK293T.

8.1.2.- Evaluación de la actividad de la construcción pCEFL-EGFP-ARHGEF17-DH-PH-CAAX.

Para validar nuestro sistema de ganancia de función el siguiente paso fue evaluar la capacidad de la construcción pCEFL-EGFP-ARHGEF17-DH-PH-CAAX para activar a las GTPasas mejor caracterizadas (Rho, Rac y Cdc42). Cabe mencionar que ARHGEF17 fue identificado como un RhoGEF específico para la GTPasa RhoA. Como se puede observar en la figura 13A, esta construcción activó de manera específica sólo a RhoA. Además, esta activación es por interacción directa entre RhoA y la construcción, como lo demostraron los resultados de captura de GEF activo, en donde la construcción se capturó de manera específica sólo con la mutante libre de nucleótido RhoG17A y no así por RacG15A y Cdc42G15A (Figura 13B).



A)



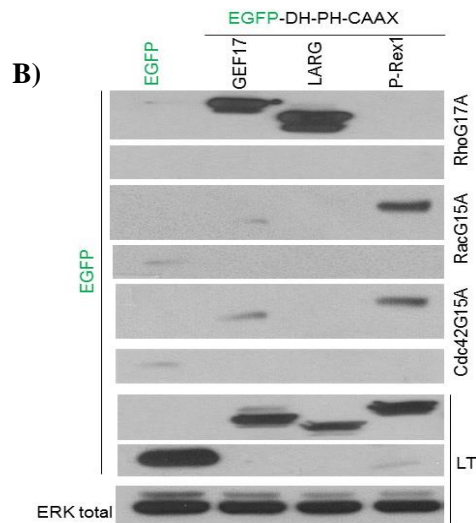


Figura 13. La construcción pCEFL-EGFP-ARHGEF17-DH-PH-CAAX activa a la GTPasa RhoA. Células HEK293T se transfectaron como el módulo DH-PH de ARHGEF17 en el pCEFL-EGFP-CAAX. 24 horas post-transfección las células se ayunaron toda la noche en medio libre de suero. Al día siguiente se realizó el ensayo de captura de GTPasa (A) y GEF activo (B) como se describió en la metodología. Como controles positivos se utilizaron el módulo DH-PH de LARG para RhoA y P-Rex1 para Rac y Cdc42. n=3, ANOVA de una vía, Tukey.

8.1.3.- Cambios morfológicos en células endoteliales asociados a la expresión de la construcción pCEFL-EGFP-ARHGEF17-DH-PH-CAAX

Posteriormente se evaluaron los cambios morfológicos inducidos por la expresión de la construcción pCEFL-EGFP-ARHGEF17-DH-PH-CAAX en células endoteliales. Para esto, células PAE se transfectaron con plásmido vacío, pCEFL-EGFP-ARHGEF17 y pCEFL-EGFP-ARHGEF17-DH-PH-CAAX. Como se puede observar en la figura 14, la construcción ARHGEF17-DH-PH originó una gran cantidad de fibras de estrés y las células adquirieron una forma redonda lo que es compatible con la activación específica de la GTPasa RhoA. Por otra parte, la construcción EGFP-ARHGEF17 colocalizó con fibras de actina acorde a la posibilidad de la existencia de una región de unión a actina en el extremo amino terminal.

En conjunto, estos resultados indican que ARHGEF17 es un RhoGEF específico para la GTPasa RhoA y validan el sistema de ganancia de función.

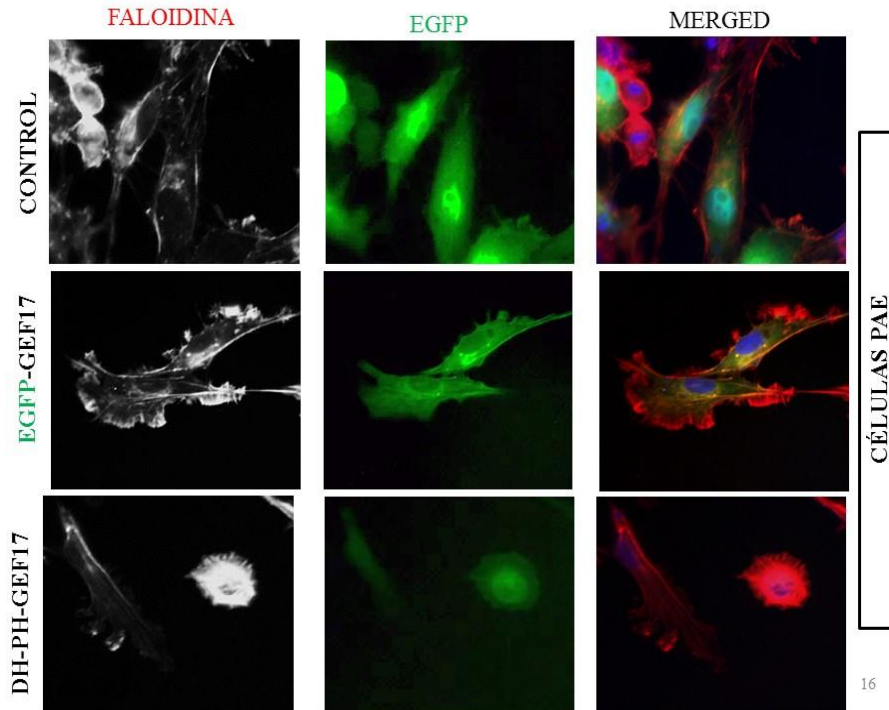


Figura 14. Células de aorta porcina (PAE) fueron transfectadas con pCEFL-EGFP-ARHGEF17-DH-PH-CAAX, EGFP-CAAX, pCEFL-EGFP-ARHGEF17 o plásmido vacío. 24 horas post-transfección las células fueron fijadas y teñidas con faloidina para visualizar actina polimerizada (rojo) y con DAPI (azul) para teñir el núcleo.

8.2 Evaluación de interacciones intramoleculares inhibitorias en ARHGEF17

Para investigar la existencia de posibles interacciones intramoleculares inhibitorias en ARHGEF17 se expresó el módulo catalítico extendido hacia el extremo amino o carboxilo en el plásmido pCEFL-EGFP-CAAX como se describió en la metodología. Posteriormente se evaluó la capacidad de estas construcciones para activar a RhoA comparadas con la construcción constitutivamente activa pCEFL-EGFP-ARHGEF17-

DH-PH-CAAX (Figura 15). Los resultados de captura de GTPasa activa indicaron un claro abatimiento en la activación de RhoA por la construcción del módulo DH-PH extendido hacia el extremo amino. Por otra parte la construcción DH-PH extendida hacia el extremo carboxilo también mostro una significativa disminución en la activación de RhoA, sin superar el alcanzado por el amino terminal (Figura 15A). Además, los resultados de activación de GTPasa se correlacionaron con los de captura de GEF activo en donde claramente la construcción DH-PH extendida hacia el amino terminal no capturó con la mutante RhoG17A (Figura 15B).

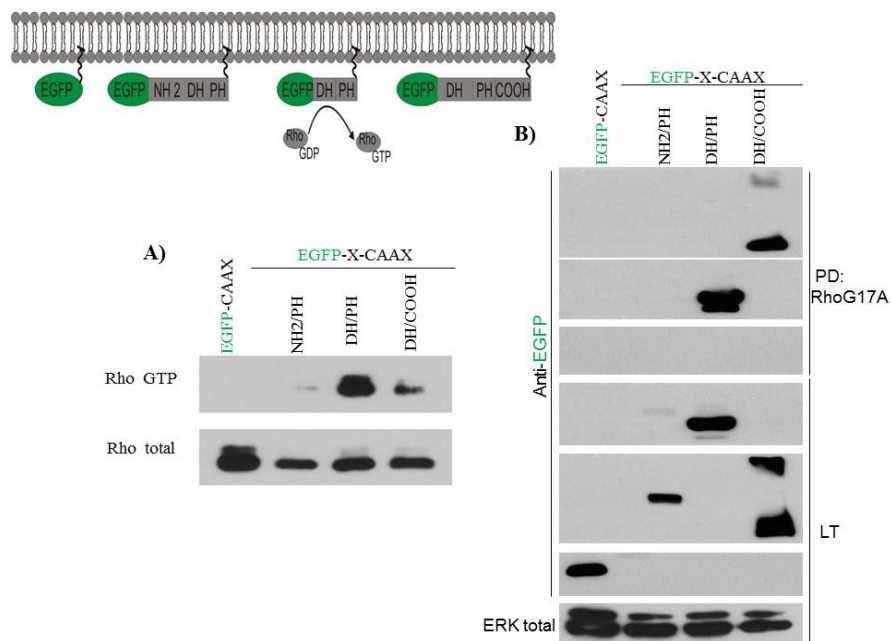


Figura 15. Evaluación de interacciones inhibitorias en ARHGEF17. Células HEK293T se transfectaron con las distintas construcciones (pCEFL-EGFP- (NH2-PH, DH-PH Y DH-COOH)-CAAX) o plásmido vacío. 24 horas post-transfección las células se ayunaron toda la noche en medio libre de suero y la actividad de las distintas construcciones se evaluó por ensayo de captura de GTPasa activa (RBD-Rhotekin) (A) y de GEF activo (RhoG17A) (B). n=2

8.2.3.- Evaluación del efecto inhibitorio de la co-expresión del amino- y carboxilo-terminal de ARHGEF17 con la variante constitutivamente activa pCEFL-EGFP-ARHGEF17-DH-PH-CAAX

Enseguida se evaluó el efecto inhibitorio de amino y carboxilo sobre el módulo DH-PH expresados de manera independiente. Como se puede observar en la figura 16A la co-expresión del módulo DH-PH con el extremo carboxilo claramente disminuyó la activación de RhoA sin abatirla por completo, sin embargo, este efecto inhibitorio no se observó al co-expresar el módulo DH-PH con el extremo amino terminal. De manera interesante los resultados de captura de GEF activo mostraron que el extremo amino de ARHGEF17 se viene asociado en el *pulldown* al capturar al módulo DH-PH, el cual se captura a un nivel comparable a el módulo DH-PH expresado por sí solo, lo que podría indicar que el amino de ARHGEF17 se asocia al módulo DH-PH en una región diferente a la de interacción con la GTPasa (Figura 16B).

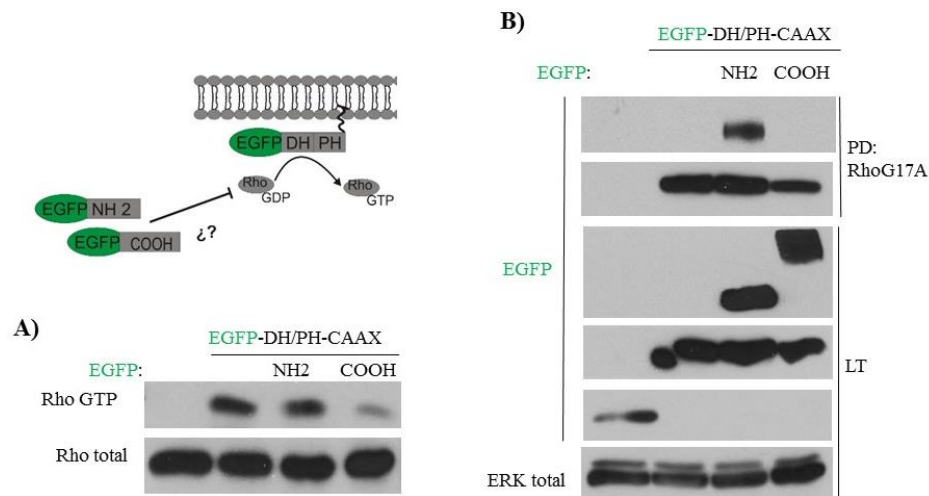


Figura 16. Células HEK293T se transfectaron con la construcción pCEFL-EGFP-ARHGEF17-DH-PH-CAAX sola o co-expresada con el amino o el carboxilo de ARHGEF17, estos últimos fusionados a la proteína verde fluorescente (EGFP). 24 horas post-transfección las células se ayunaron toda la noche en medio libre de suero y el efecto inhibitorio del amino y carboxilo se evaluó por ensayo de captura de GTPasa (RBD-Rhotekin) (A) y GEF activo (RhoG17A) (B). n=2

8.2.4. El módulo ARHGEF17-DH-PH interacciona con el amino y carboxilo terminal.

Para corroborar si los efectos inhibitorios observados eran debido a una interacción directa entre el módulo DH-PH y el amino y carboxilo de ARHGEF17, se realizó un ensayo de *pulldown* para GST-DH-PH co-transfectado con EGFP-NH2 o EGFP-COOH. Como se puede observar en la figura 17 tanto el amino y el carboxilo interaccionan a una extensión similar como el módulo DH-PH, lo que indica que dicho efecto inhibitorio es por interacción directa. En conjunto todos estos resultados sugieren la existencia de un estado de auto-inhibición basal de ARHGEF17, que involucra la interacción del módulo DH-PH con el amino- y carboxilo terminal de ARHGEF17.

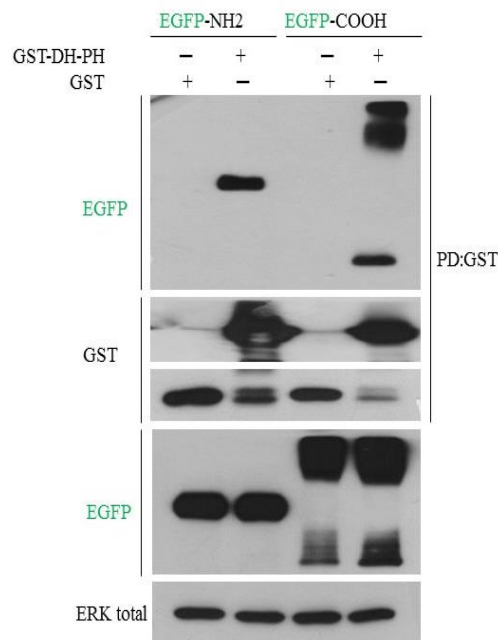


Figura 17. El módulo DH-PH interacciona con el amino y carboxilo terminal. Células HEK293T se transfectaron con EGFP-amino(NH2) y EGFP-carboxilo (COOH), co-transfectados con GST-DH-PH o plásmido vacío pCEFL-GST. 24 horas pos-transfección las células se ayunaron toda la noche en medio libre de suero. Al día siguiente se realizó un ensayo de pull-down GST utilizando la resina glutatión agarosa. n=3

8.3.- Activación de ARHGEF17 en células endoteliales

En vista de la elevada expresión de ARHGEF17 (ARNm) en endotelio tumoral resultó interesante el explorar su activación en respuesta a estímulos angiogénicos. Para esto células endoteliales de aorta porcina (PAE) fueron transfectadas con flag-ARHGEF17, para posteriormente determinar la activación de ARHGEF17 en respuesta a distintos estímulos angiogénicos por ensayo de captura de GEF activo utilizando la mutante RhoG17A. Los resultados mostraron una clara activación de ARHGEF17 por ácido lisofosfatídico (LPA) (Figura 18), un agonista de GPCRs comúnmente desregulado en cáncer. Por otra parte, ARHGEF17 se activó fuertemente por medios condicionados de carcinoma de pulmón (LAP0297) dejando en evidencia su posible activación en un contexto tumoral.

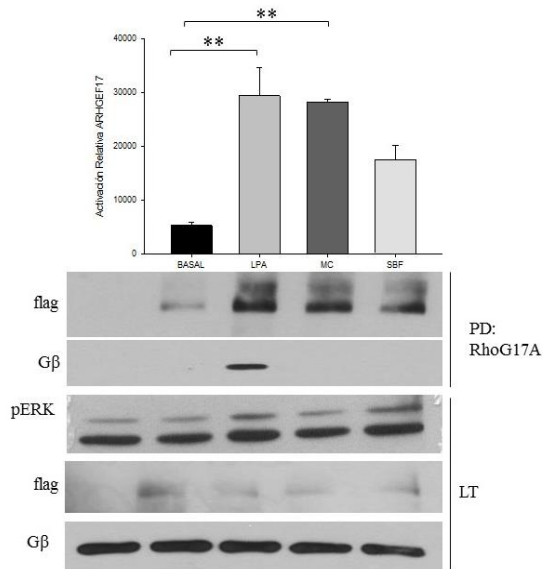


Figura 18. ARHGEF17 es activado por estímulos angiogénicos. Células PAE se transfectaron por el método de Polyfect con flag-ARHGEF17, 24 horas pos-transfección las células se ayunaron toda la noche en medio libre de suero. Al día siguiente se estimuló por 10 min. con: ácido lisofosfatídico 1 μ M (LPA), medios condicionados de carcinoma de pulmón LAP0297 (MC) y suero fetal bovino (SFB). La activación de ARHGEF17 se determinó por ensayo de pulldown utilizando a la mutante RhoG17A. n=3, ANOVA de una vía, Tukey. ** p \leq 0,001 , * p<0,05.

8.4.- Análisis bioinformático de la secuencia de ARHGEF17

Con la finalidad de evaluar la regulación de ARHGEF17 por eventos de fosforilación se realizó un análisis bioinformático de la secuencia de ARHGEF17 en la plataforma PhosphoSitePlus (Figura 19A). Los resultados indican que la mayoría de los sitios consenso de fosforilación se encuentran el extremo amino terminal, teniendo sitios de fosforilación para cinasas como la PKA, PKC, Akt entre otras. Por otra parte, un análisis de la secuencia carboxilo terminal de ARHGEF17 en la plataforma Phyre² (Kelley, Mezulis et al. 2015) predice la existencia de un dominio WD40, el cual sirve de sitio de interacción para otras proteínas WD40, así como para reconocer serinas y treoninas fosforiladas (Figura 19A).

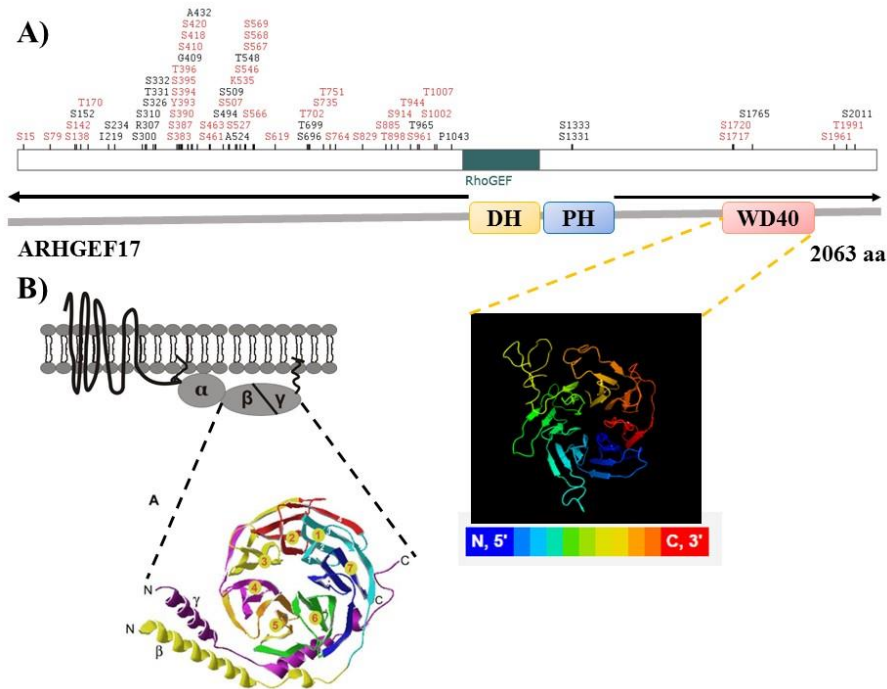


Figura 19. Análisis bioinformático de ARHGEF17. A) Sitios de fosforilación en ARHGEF17 predichos por la plataforma PhosphositePlus. Se muestra la Estructura secundaria predichida para el dominio WD40 carboxilo terminal de ARHGEF17 (cuadro negro) B) Estructura secundaria del heterodímero Gβγ. Estructuralmente Gβ consta de 7 repeticiones WD40 mientras que la subunidad Gγ está representada por dos alfas hélices. Modificada de Chen, Spiegelberg et al. 2004.

En base a este análisis podemos dividir a ARHGEF17 en dos regiones de regulación ajenos al módulo DH-PH, por un lado, la actividad de cinasas puede modular las interacciones inhibitorias ejercidas por el extremo amino, mientras que la interacción con proteínas WD40 pudiera modular la interacción del carboxilo con el módulo DH-PH. Desde la perspectiva de regulación del carboxilo, el heterodímero $G\beta\gamma$ representa un prototipo de la familia WD40 (Figura 19B) y dada la activación de ARHGEF17 por LPA hizo pensar la posible participación del $G\beta\gamma$ en la activación de ARHGEF17. En apoyo a esta hipótesis están los resultados de captura de GEF activo en donde $G\beta$ se viene asociado en el pulldown de ARHGEF17 activo solo cuando es promovida por LPA (Figura 18).

8.5- La interacción de $G\beta\gamma$ con ARHGEF17 promueve su activación

Para explorar más a detalle la implicación del heterodímero $G\beta\gamma$ en la activación de ARHGEF17, primero se evaluó la posibilidad de una interacción directa entre ambas proteínas. Para esto se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación para flag- $G\beta\gamma$ co-transfectado con EGFP-ARHGEF17. Los resultados demuestran que efectivamente EGFP-ARHGEF17 co-inmuno precipita con $G\beta\gamma$ (Figura 20A). Una vez demostrada la interacción entre ARHGEF17 y $G\beta\gamma$ se evaluó el efecto de la sobreexpresión de $G\beta\gamma$ en la activación de ARHGEF17.

Los resultados de captura de GEF activo mostraron un ligero incremento en la actividad basal de ARHGEF17 al sobre-expresar $G\beta\gamma$ y dicha activación es abatida en presencia de $G\alpha_i$ (Figura 20B). Así estos resultados apuntan a la participación del heterodímero $G\beta\gamma$ en la activación de ARHGEF17 río abajo de receptores acoplados a proteínas G y esta activación es promovida por interacción directa entre ambas proteínas.

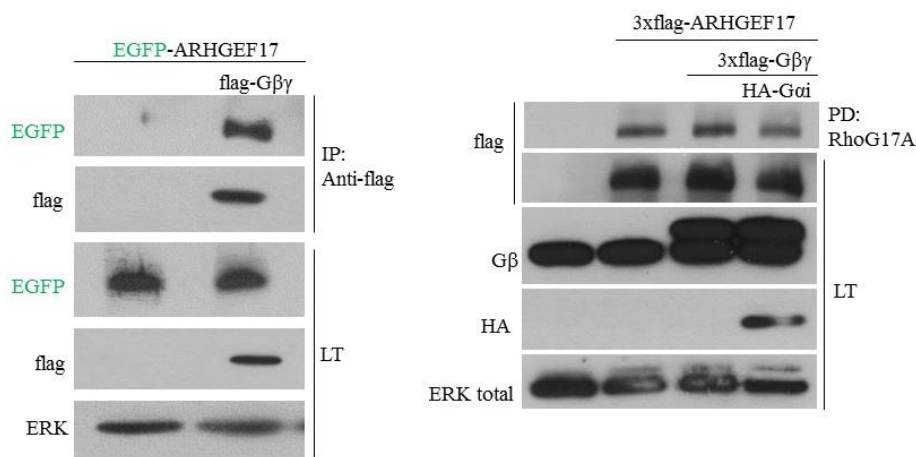


Figura 20. ARHGEF17 interacciona y es activado por Gβγ: A) ARHGEF17 interacciona con Gβγ: células HEK293T se transfectoron con flag- Gβγ co-transfectado con EGFP-ARHGEF17, 48 horas post transfección Gβγ fue inmunoprecipitado utilizando anticuerpo anti-flag B) La sobre-expresión de Gβγ promueve la activación de ARHGEF17: células COS-7 se transfectoron con flag-ARHGEF17 co-transfectado con flag-Gβγ en presencia o ausencia de G-αi. 24 horas pos-transfección las células se ayunaron toda la noche y al día siguiente la activación de ARHGEF17 se determinó por ensayo de pulldown utilizando la mutante RhoG17A

8.5.1.- Efecto de la expresión de Gβγ en la localización de ARHGEF17

El reclutamiento a la membrana de los RhoGEFs, vía su dominio PH que reconoce fosfoinosítidos (PIP3), ha sido descrito como parte del mecanismo de activación de distintos RhoGEFs. Desde esta perspectiva la interacción de ARHGEF17, una proteína citosólica, y Gβγ, una proteína membranal, abre la posibilidad de que la interacción entre ambas proteínas promueva la localización de ARHGEF17 a nivel membranal como parte de su mecanismo de activación. Para evaluar esta posibilidad células COS-7 fueron co-transfectadas con ARHGEF17 y Gβγ fusionadas a EGFP y mCherry respectivamente.

8.5.1.1.- Subclonación de Gβ en el pCEFL-mCherry

Gβ se subclonó del pCEFL-GST al pCEFL-mCherry. Para esto el pCEFL-GST-Gβ se digirió con la combinación EcoRI/NotI, liberando un fragmento de 1025 pb, que corresponde a la región codificante para Gβ, este fragmento se purificó por gel de agarosa. Posteriormente se realizó una reacción de ligación entre el fragmento de interés y el

plásmido pCEFL-mCherry digerido con EcoRI/NotI. El producto de ligación se utilizó para transformar bacterias ultra competentes *E. coli* DH5 α . En la figura 21A se muestra la digestión diagnóstica (EcoRI/NotI) para 4 clonas, que claramente dieron positivas a inserto. Estas clonas se expresaron de manera correcta en células HEK293T (Figura 21B y C).

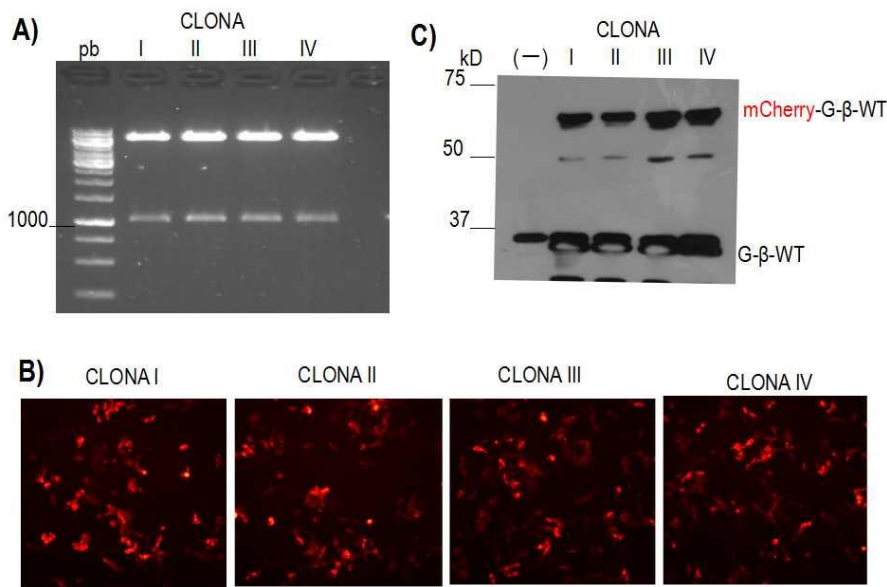


Figura 21. Expresión de G β en el pCEFL-mCherry. A) Digestión diagnóstica de 4 clonas con la combinación EcoRI/NotI. B) Expresión de clonas positivas a inserto en células HEK293T. C) Análisis por Western blot para G β silvestre, el incremento en el peso molecular es por el epítipo mCherry que pesa aproximadamente 25 kDa.

8.5.1.2.- La co-expresión de ARHGEF17 con G $\beta\gamma$ promueve su reclutamiento a la membrana.

Como se puede observar en la figura 22, ARHGEF17 (EGFP-ARHGEF17) esta preferencialmente distribuido a nivel citosólico y existe una clara redistribución de EGFP-ARHGEF17 a nivel membranal al ser co-transfectado con mCherry-G $\beta\gamma$ (EGFP-ARHGEF17 + mCherry-G $\beta\gamma$). Así tomando juntos todos estos resultados indican que parte del mecanismo de activación de ARHGEF17 promovido por GPCRs requiere de su

interacción con el heterodimero $G\beta\gamma$ y dicha interacción promueve un cambio en la localización de ARHGEF17 a nivel membranal.

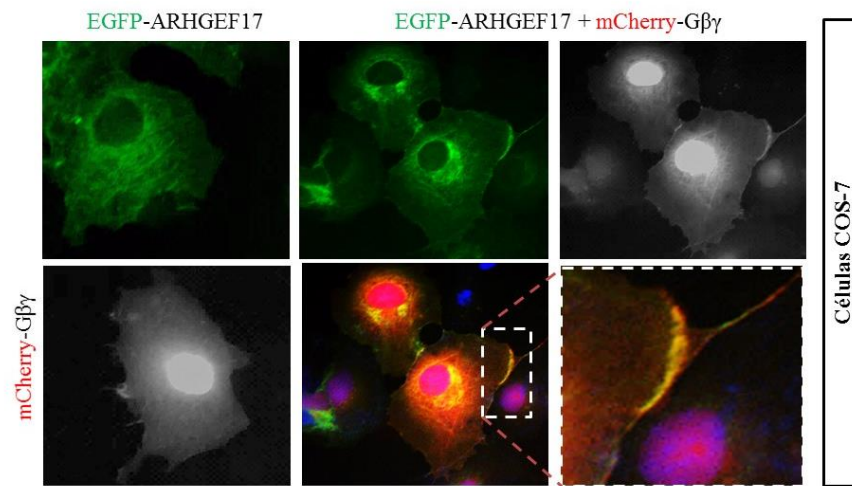


Figura 22. $G\beta\gamma$ promueve la localización de ARHGEF17 a nivel membranal. Células COS-7 se transfectaron con EGFP-ARHGEF17(verde) y mCherry- $G\beta\gamma$ (grises) solas o co-transfectadas por el método de lipofectamina-PLUS. Después de 12 horas de ayuno las células se fijaron y se utilizó la tinción con DAPI para visualizar el núcleo (azul).

8.6.-Determinación de un estado de dimerización de ARHGEF17

8.6.1.- Clonación de ARHGEF17 en pCEFL-EGFP

Para poder evaluar un posible estado de dimerización de ARHGEF17 fue necesario tener a la proteína fusionada a dos epítopes diferentes, por un lado, ya se contaba con el plásmido que codificaba para flag-ARHGEF17 y entonces se decidió expresar a ARHGEF17 fusionado a la proteína verde fluorescente en el plásmido pCEFL-EGFP. La estrategia que se abordó fue la de aprovechar un sitio de reconocimiento para la enzima ClaI en la posición 3495 pb en el dominio DH, que se traslapaba en las construcciones pCEFL-EGFP-Amino-PH-CAAX y pCEFL-EGFP-DH-Carboxilo-CAAX (Figura 23A). Ambas construcciones se sometieron a una digestión enzimática con las combinaciones NheI/ClaI y ClaI/EcoRI que generaron los fragmentos #1 (3495 pb) y #2 (2695pb)

respectivamente, ambos productos fueron purificados por gel de agarosa (Figura 23A y B). Estos fragmentos tenían en común un sitio ClaI y se aprovechó para someterlos a una primera reacción de ligación, si la reacción se llevaba a cabo con éxito se obtendría el ADNc completo de ARHGEF17 con la combinación NheI/EcoRI hacia sus extremos 5 y 3 prima respectivamente. El producto de esta primera reacción de ligación se utilizó para una segunda reacción de ligación con el plásmido pCEFL-EGFP digerido con la combinación NheI/EcoRI. El producto de la segunda reacción de ligación se utilizó para transformar bacterias ultra competentes, en donde solo crecieron 3 colonias a partir de las cuales se obtuvo el ADN plasmídico. En la figura 23C se muestra la digestión diagnóstica de las 3 clonas con la enzima XbaI y claramente las clonas 1 y 2 liberaron inserto (1782 pb). Ambas clonas se expresaron de manera correcta en células HEK293T (Figura 23D). Enseguida se procedió a evaluar el posible estado de dimerización de ARHGEF17.

8.6.2.- ARHGEF17 se dimeriza en respuesta a medios condicionados de carcinoma de pulmón.

Recientemente se ha demostrado la homodimerización de la proteína RACK1 vía sus dominios WD40 (Thornton, Tang et al. 2004). Estos antecedentes abren la posibilidad de un estado de homodimerización para ARHGEF17 vía su dominio WD40 carboxilo terminal. Para abordar esta posibilidad células COS-7 se transfectaron con EGFP-ARHGEF17 solo o co-transfectado con flag-ARHGEF17 y se evaluó el efecto de estímulo (Medios condicionados de carcinoma de pulmón) en un posible estado de homodimerización de ARHGEF17. Como se puede observar en la figura 24 EGFP-ARHGEF17 se ve enriquecido en el inmunoprecipitado de flag-ARHGEF17 en presencia de medios condicionados de carcinoma de pulmón (LAP0297), un estímulo ya caracterizado por llevar a la activación de ARHGEF17, por lo que se puede postular un estado de homodimerización como parte del mecanismo de activación de ARHGEF17 en respuesta a medios condicionados de células tumorales

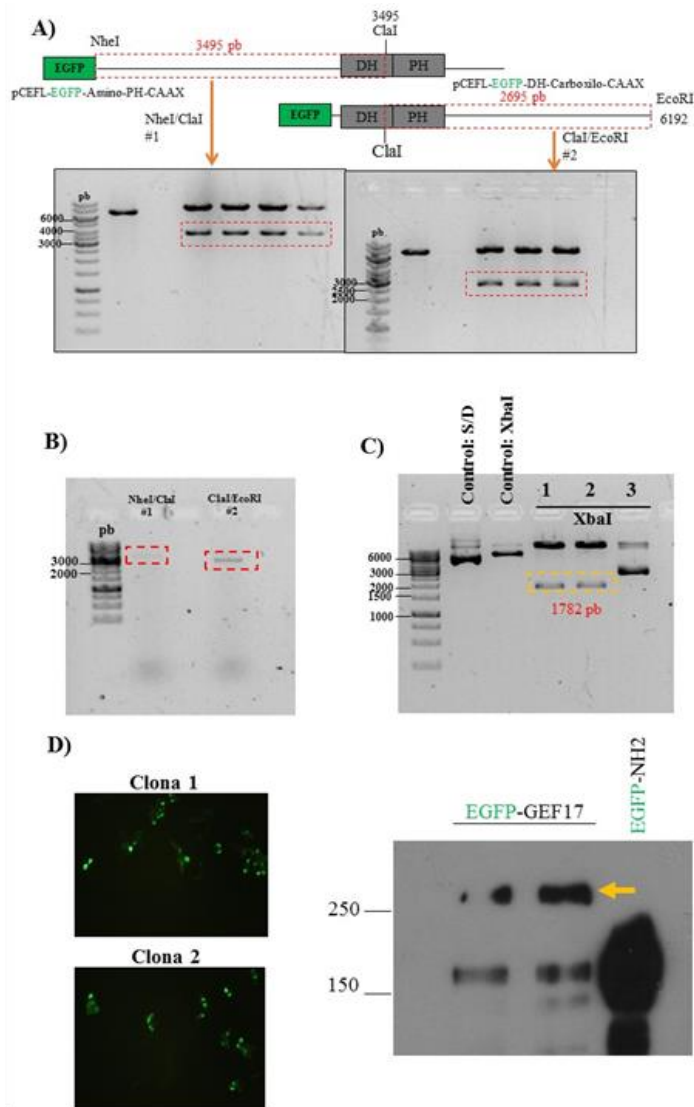


Figura 23. Expresión de ARHGEF17 en pCEFL-EGFP. A) Digestión de pCEFL-EGFP-Amino-PH-CAAX con la combinación NheI/ClaI y el pCEFL-EGFP-DH-Carboxilo-CAAX con la combinación de ClaI/EcoRI se generaron dos fragmentos de empalme de 3495 y 2695 pb respectivamente. B) Purificación de fragmentos de empalme por gel de agarosa. C) Digestión diagnóstica de 3 clonas con la enzima XbaI, fragmento esperado es de 1782 pb. D) Expresión de clonas positivas a inserto en células HEK293T, el análisis de Western Blot se realizó para el epítipo EGFP, como control positivo se utilizó el pCEFL-EGFP-ARHGEF17-Amino-terminal.

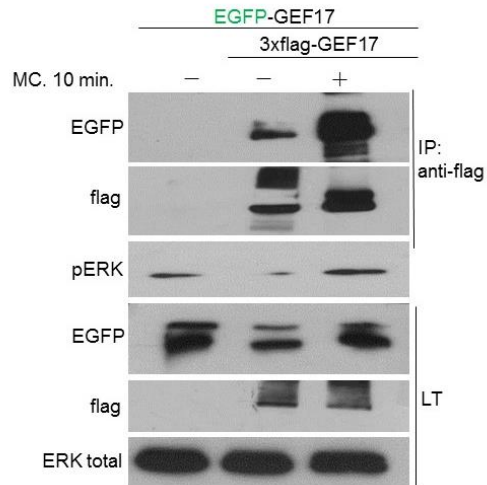


Figura 24. ARHGEF17 se dimeriza en respuesta a estímulos angiogénicos. Células COS-7 se transfectaron con flag-ARHGEF17 solo o co-transfectado con EGFP-ARHGEF17, 24 horas pos-transfección las células se ayunaron en medio libre de suero. Al día siguiente se estimuló por 10 minutos con medios condicionados de carcinoma de pulmón (MC) y a partir del lisado celular flag-ARHGEF17 se inmunoprecipito toda la noche a 4°C utilizando el anticuerpo anti-flag (mouse). El nivel de dimerización se evaluó revelando el Western blot anti-EGFP y anti-flag. n=2

9.- DISCUSIÓN

La angiogénesis, un proceso de suma importancia para el desarrollo tumoral, requiere de eventos como proliferación y migración de células endoteliales. Estos eventos son promovidos vía estímulos quimiotácticos secretados por las células tumorales. La migración celular requiere del remodelamiento del citoesqueleto de actina, un proceso estrechamente vinculado con la actividad de las RhoGTPasas. Los RhoGEFs al promover la activación de las RhoGTPasas representan un vínculo entre la activación de receptores quimiotácticos y el proceso de migración celular, por esta razón pueden ser considerados potenciales blancos farmacológicos. En este contexto, solo aquellos RhoGEFs cuya expresión o actividad esté restringida en la angiogénesis tumoral podrán ser considerados candidatos idóneos. Desde ésta perspectiva, ARHGEF17 es un RhoGEF cuya expresión (ARNm) está alterada en endotelio de cáncer de colon, lo que genera una pauta para estudiar su posible implicación en la angiogénesis tumoral.

Por lo antes mencionado, decidimos estudiar la activación de ARHGEF17 en células endoteliales en respuesta a estímulos angiogénicos. Los resultados obtenidos demuestran que ARHGEF17 es fuertemente activado por medios condicionados de carcinoma de pulmón (LAP0297) y ácido lisofosfatídico (LPA), lo que sugiere su rol potencial durante el proceso de angiogénesis tumoral. En tanto estos resultados son de gran relevancia debido a que en la literatura no se ha descrito ningún estímulo angiogénico que promueva la activación de ARHGEF17. El LPA es un agonista de GPCRs comúnmente alterado en cáncer, esto sugiere la participación de vías dependientes de proteínas G heterotriméricas en la activación de ARHGEF17. El análisis bioinformático de la secuencia de ARHGEF17 en la plataforma Phyre², predice la existencia de un dominio WD40 en su carboxilo terminal, un dominio que funciona como un sitio de anclaje para otras proteínas de tipo WD40, del cual el heterodímero G $\beta\gamma$ es uno de los miembros más representativos, del que se ha demostrado su interacción con otras proteínas WD40 como WDR26, RACK1 y Raptor (Chen, Spiegelberg et al. 2004). Por lo tanto, esto abrió la posibilidad de la participación del heterodímero G $\beta\gamma$ en la activación de ARHGEF17 promovida por receptores para LPA. En este sentido, resultados de ensayos de co-inmunoprecipitación para flag-G $\beta\gamma$ indican que existe una interacción entre ambas proteínas. Además, la co-

expresión de EGFP-ARHGEF17 con mCherry-G $\beta\gamma$ promueve su reclutamiento a la membrana. Sin embargo, los resultados de captura de ARHGEF17 activo al sobre-expresar a G $\beta\gamma$ solo mostraron un modesto incremento en la actividad basal, lo que podría indicar que G $\beta\gamma$ puede estar funcionando como un co-activador de ARHGEF17 al promover un cambio en su localización celular. En este sentido, se podría postular que vías dependientes de la subunidad G α promuevan una activación completa del GEF, por ejemplo; la fosforilación del GEF podría desestabilizar las interacciones inhibitorias y de este modo activar a ARHGEF17 una vez reclutado en la membrana.

Por otra parte, se ha demostrado que la homodimerización de la proteína RACK1 es mediada por la interacción de dominios WD40 (Thornton, Tang et al. 2004). Este antecedente permitió postular un posible estado de homodimerización para ARHGEF17. Los resultados obtenidos al co-expresar flag-ARHGEF17 con EGFP-ARHGEF17, indican que efectivamente existe un ligero estado de homodimerización de ARHGEF17, el cual es favorecido por la estimulación con medios condicionados de carcinoma de pulmón. Esto apoya la hipótesis de un estado de homodimerización de ARHGEF17 como parte de su mecanismo de activación. Estrategias de competencia utilizando el amino, DH-PH y carboxilo de ARHGEF17 permitirán evaluar la región de ARHGEF17 responsable de dicho estado de homodimerización. Además, resulta interesante el preguntarse cómo ARHGEF17 interacciona con G $\beta\gamma$ y formar homodímeros durante el proceso de activación. Una posible explicación podría estar relacionada al plegamiento del dominio WD40, que podría formar una estructura tipo barril que expone diferentes regiones de interacción, por lo que se puede postular que la interacción ARHGEF17-G $\beta\gamma$ y la de homodimerización se da en regiones diferentes (Figura 25) (Chen, Spiegelberg et al. 2004).

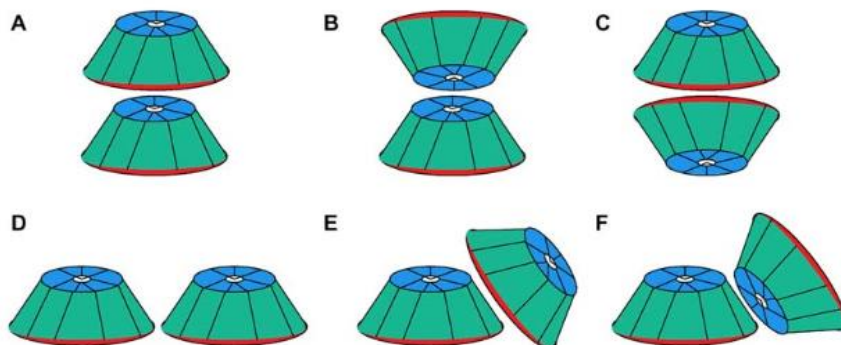


Figura 25. Representación esquemática de interacciones entre proteínas con repeticiones WD40. Una estructura tipo barril es utilizada para representar la estructura tridimensional de la propela de las proteínas con repeticiones WD40. Tomada de Chen, Spiegelberg et al. 2004.

En tanto más esfuerzos son necesarios para elucidar el mecanismo preciso involucrado en la activación de ARHGEF17 en respuesta a LPA. Agrupados estos resultados, ubican la activación de ARHGEF17 en cascadas dependientes de receptores para LPA, mediante un mecanismo que involucra su homodimerización y la interacción con el heterodímero $G\beta\gamma$.

Los primeros estudios de ARHGEF17 se hicieron con la clona P164RhoGEF, que carece de aproximadamente 500 aminoácidos hacia su amino terminal, en donde se postularon posibles interacciones inhibitorias. Por lo que nos pareció interesante estudiar los mecanismos de regulación de ARHGEF17 en condiciones basales. Con la finalidad de estudiar un posible estado de auto-inhibición basal de ARHGEF17, se utilizó un esquema de ganancia de función. Para esto se clonó el módulo DH-PH de ARHGEF17 en el plásmido pCEFL-EGFP-CAAX, esto permitió expresar el módulo DH-PH anclado a la membrana gracias a la señal de isoprenilación (CAAX). Se esperó que esto fuera suficiente para obtener una activación constitutiva del módulo DH-PH de ARHGEF17. Los resultados de captura de GTPasa y GEF activo validaron el sistema de ganancia de función debido a que la construcción pCEFL-EGFP-ARHGEF17-DH-PH-CAAX activa específicamente y por interacción directa a la GTPasa RhoA, acorde a lo antes reportado para este RhoGEF (Rumenapp, Freichel-Blomquist et al. 2002). Además, estos resultados indican que la sola expresión del módulo DH-PH de ARHGEF17 mantiene la

especificidad hacia su sustrato lo que no sucede para otros RhoGEFs como P-Rex1, quien es un GEF reportado para activar a Rac. Sin embargo, los resultados indicaron que el módulo DH-PH de P-Rex1 activa de manera dual a Rac y Cdc42, esto puede indicar que regiones adicionales al tándem DH-PH proporcionan cierto grado de especificidad. Además, la activación específica de la GTPasa RhoA fue acorde con los efectos morfológicos asociados a la expresión de la construcción pCEFL-EGFP-ARHGEF17-DH-PH-CAAX en células PAE, en donde las células adquirieron una forma redonda con gran cantidad de fibras de estrés.

Por otra parte, la expresión del módulo DH-PH extendido hacia sus extremos amino o carboxilo en el pCEFL-EGFP-CAAX permitió evaluar algún tipo de regulación negativa hacia el módulo catalítico. Los resultados mostraron que la construcción extendida hacia el extremo amino terminal disminuyó significativamente la tasa de activación de RhoA. Estos resultados fueron compatibles con los de captura de GEF activo, en donde dicha construcción no se capturó con la mutante RhoG17A, lo que sugiere un posible rol negativo por parte del amino terminal de ARHGEF17. A su vez la construcción extendida hacia el extremo carboxilo también mostró una disminución en la tasa de activación de RhoA. Dicho efecto inhibitorio no superó el alcanzado por la construcción DH-PH extendida hacia el amino terminal.

Además, se evaluó el efecto inhibitorio de la expresión del amino y carboxilo co-expresados con el tándem DH-PH. En este caso se observó que el carboxilo mantuvo su capacidad inhibitoria disminuyendo la tasa de activación de RhoA. Sin embargo, la co-expresión del amino con el módulo DH-PH no afectó esta actividad. De manera interesante, el amino de ARHGEF17 se asoció al *pulldown* de DH-PH activo, lo que puede sugerir que el amino se une al tándem DH-PH en una región diferente a la de interacción con la GTPasa. Por ejemplo, su asociación con el dominio PH bloquearía el acceso al dominio DH, esto explicaría porque al expresarlo de manera independiente al tándem DH-PH esté carece de efecto inhibitorio (Figura 26A). Por otra parte, es probable que el extremo carboxilo terminal ejerza su efecto inhibitorio desestabilizando directamente el dominio catalítico DH, ya que al expresarlo fusionado al tándem DH-PH o de manera independiente se observa el mismo efecto inhibitorio (Figura 26B). Además, ensayos de

pulldown demostraron que dichos efectos inhibitorios fueron por interacción entre el amino y carboxilo con el módulo DH-PH..

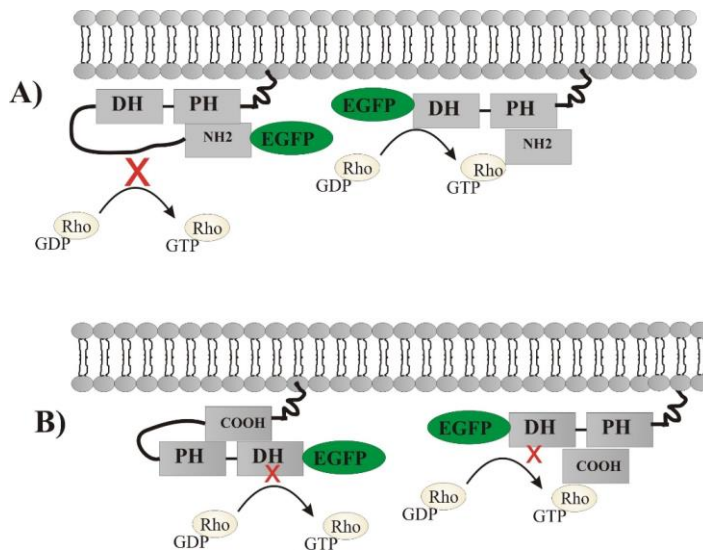


Figura 26. Modelo de inhibición del amino y carboxilo terminal sobre el tándem DH-PH de ARHGEF17. A) El amino terminal bloquea el acceso al dominio DH por interacción con el dominio PH. B) el carboxilo terminal ejerce un efecto negativo directo sobre el dominio catalítico DH.

Por último, se sabe que el mecanismo de auto-inhibición de Vav y Dbl es mediado por interacción del amino terminal con el módulo DH-PH, y en vista de los hallazgos del posible rol inhibitorio del amino terminal de ARHGEF17, parece que este mecanismo de auto-inhibición podría estar conservado entre algunos miembros de la familia de RhoGEFs. Más interesante es el hecho de que algunos de estos RhoGEFs se identificaron como genes transformantes (Ron, Tronick et al. 1988) debido a la expresión de versiones truncadas de su extremo amino terminal, por lo que cabe preguntarse si ARHGEF17 truncado de su amino terminal podría tener capacidad transformante. En la figura 27 se esquematiza el modelo propuesto para la activación de ARHGEF17 en respuesta a LPA. Estos resultados refuerzan la hipótesis de un rol potencial para ARHGEF17 durante el proceso de angiogénesis tumoral, en tanto más esfuerzos son necesarios para vincular de una manera más precisa su activación durante el contexto tumoral, principalmente a nivel de células endoteliales y derivadas de la médula ósea que como ya se mencionó, en ambas

poblaciones el ARNm de ARHGEF17 esta enriquecido.

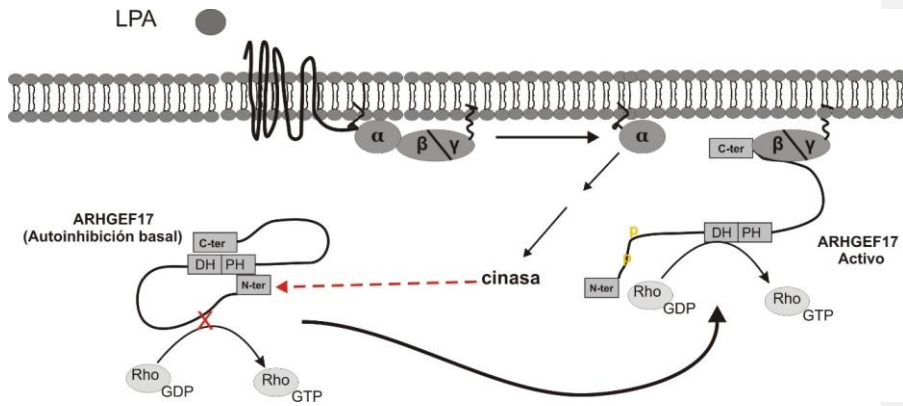


Figura 27. Modelo de activación de ARHGEF17 por LPA. La activación de receptores para LPA promueve que ARHGEF17 se relocalice a en la membrana por interacción con Gβγ. Se postulan eventos de fosforilación para una activación completa del GEF.

10.- CONCLUSIONES

- ARHGEF17 es activado en células endoteliales por ácido lisofosfatídico (LPA) y medios condicionados de carcinoma de pulmón.
- La activación de ARHGEF17 río abajo de GPCRs requiere de su interacción con el heterodímero G $\beta\gamma$ lo que promueve su reclutamiento a la membrana.
- ARHGEF17 se dimeriza en respuesta a estímulos que promueven su activación.
- La construcción pCEFL-ARHGEF17-DH-PH-CAAX activa de manera directa y específica a la GTPasa RhoA.
- La actividad del módulo DH-PH es regulada negativamente por interacción con el amino y carboxilo terminal, lo que lleva a un estado de auto-inhibición.

11.- PERSPECTIVAS

Los resultados del presente proyecto generan las bases para la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen en la regulación de ARHGEF17. Además, es importante enfatizar que dichos hallazgos han trazado el camino para futuras investigaciones dirigidas a vincular la actividad de ARHGEF17 en el contexto neoplásico, entre las que podemos mencionar:

- La activación de ARHGEF17 por medios complejos (como los de células tumorales), hace evidente la necesidad de caracterizar estímulos angiogénicos adicionales que promuevan su activación. Esto apoyaría la idea de que distintas cascadas de señalización podrían converger para promover su activación, en otras palabras, estudiar a ARHGEF17 como una posible plataforma de señalización.
- Además, resulta interesante estudiar la participación de ARHGEF17 en la formación de estructuras tipo capilar (angiogénesis *in vitro*), en respuesta a LPA o medios de células tumorales.
- Para lo anterior se plantea usar esquemas de ganancia y pérdida de función. En el primer caso podríamos utilizar como herramienta nuestra construcción constitutivamente activa (pCEFL-EGFP-ARHGEF17-DH-PH-CAAX) transfectada en células endoteliales y ver su efecto en la angiogénesis *in vitro*. Mientras que en el segundo caso se pueden utilizar siRNAs para reducir la expresión de ARHGEF17.
- Adicionalmente resulta de gran interés para nosotros poder extrapolar nuestros resultados a modelos animales. En este sentido estamos muy interesados en elucidar el posible rol de ARHGEF17 en células derivadas de la médula ósea y su contribución a la progresión tumoral. Para esto de igual manera se plantea el utilizar esquemas de ganancia y pérdida de función, pero en este caso utilizar la transferencia de genes mediante vectores lentivirales.
-

12.- REFERENCIAS

- Aghazadeh, B., W. E. Lowry, et al. (2000). "Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation." Cell **102**(5): 625-633.
- Barber, M. A., S. Donald, et al. (2007). "Membrane translocation of P-Rex1 is mediated by G protein betagamma subunits and phosphoinositide 3-kinase." J Biol Chem **282**(41): 29967-29976.
- Bi, F., B. Debreceni, et al. (2001). "Autoinhibition mechanism of proto-Dbl." Mol Cell Biol **21**(5): 1463-1474.
- Boulter, E., S. Estrach, et al. (2012). "Off the beaten paths: alternative and crosstalk regulation of Rho GTPases." FASEB J **26**(2): 469-479.
- Carmeliet, P., 2000a. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*, 6(4), pp.389–395.
- Carretero-Ortega, J., C. T. Walsh, et al. (2010). "Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex-1), a guanine nucleotide exchange factor for Rac, mediates angiogenic responses to stromal cell-derived factor-1/chemokine stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL-12) linked to Rac activation, endothelial cell migration, and in vitro angiogenesis." Mol Pharmacol **77**(3): 435-442.
- Chahdi, A. & Sorokin, A., 2008. Protein Kinase A-Dependent Phosphorylation Modulates beta 1Pix Guanine Nucleotide Exchange Factor Activity through 14-3-3 beta Binding Protein Kinase A-Dependent Phosphorylation Modulates 1 Pix Guanine Nucleotide Exchange Factor Activity through. , 28(5), pp.1679–1687.
- Chavez-Vargas, L., S. R. Adame-Garcia, et al. (2016). "Protein Kinase A (PKA) Type I Interacts with P-Rex1, a Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor: EFFECT ON PKA LOCALIZATION AND P-Rex1 SIGNALING." J Biol Chem **291**(12): 6182-

- 6199.Chen, S., B. D. Spiegelberg, et al. (2004). "Interaction of Gbetagamma with RACK1 and other WD40 repeat proteins." J Mol Cell Cardiol **37**(2): 399-406.
- Chen, Z., W. D. Singer, et al. (2008). "Recognition of the activated states of G α 13 by the RGS domain of PDZ-RhoGEF." Structure **16**(10): 1532-1543.3.54
- Cook, D. R., K. L. Rossman, et al. (2014). "Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease." Oncogene **33**(31): 4021-4035.
- Crespo, P., K. E. Schuebel, et al. (1997). "Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product." Nature **385**(6612): 169-172.
- Croix, B.S. et al., 1999. Genes Expressed in Human Tumor Endothelium. , 159(1996).
- Dejana, E. and D. Nyqvist (2010). "News from the brain: the GPR124 orphan receptor directs brain-specific angiogenesis." Sci Transl Med **2**(58): 58ps53.
- Fukuhara, S., H. Chikumi, et al. (2000). "Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor (LARG) links heterotrimeric G proteins of the G(12) family to Rho." FEBS Lett **485**(2-3): 183-188.
- Garrett, T. A., J. D. Van Buul, et al. (2007). "VEGF-induced Rac1 activation in endothelial cells is regulated by the guanine nucleotide exchange factor Vav2." Exp Cell Res **313**(15): 3285-3297.
- Hernández-García, R. et al., 2015. Endothelial RhoGEFs: A systematic analysis of their expression profiles in VEGF-stimulated and tumor endothelial cells. *Vascular Pharmacology*, 74, pp.60–72. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2015.10.003>.
- Hillen, F. & Griffioen, A.W., 2007. Tumour vascularization: Sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(3-4), pp.489–502.

- Hwang, H., E. K. Kim, et al. (2014). "RhoA and Rac1 play independent roles in lysophosphatidic acid-induced ovarian cancer chemotaxis." Integr Biol (Camb) **6**(3): 267-276.
- Yohe, M. E., K. L. Rossman, et al. (2007). "Auto-inhibition of the Dbl family protein Tim by an N-terminal helical motif." J Biol Chem **282**(18): 13813-13823.
- Yoshida, A., A. Shimizu, et al. (2015). "VEGF-A/NRP1 stimulates GIPC1 and Syx complex formation to promote RhoA activation and proliferation in skin cancer cells." Biol Open **4**(9): 1063-1076.
- Kawakami, Y. et al., 2015. SDF-1/CXCR4 axis in tie2-Lineage cells including endothelial progenitor cells contributes to bone fracture healing. *Journal of Bone and Mineral Research*, 30(1), pp.95–105.
- Kehrl, J. H. (1998). "Heterotrimeric G protein signaling: roles in immune function and fine-tuning by RGS proteins." Immunity **8**(1): 1-10.
- Kelley, L. A., S. Mezulis, et al. (2015). "The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis." Nat. Protocols **10**(6): 845-858.
- Kirui, J. K., Y. Xie, et al. (2010). "Gbetagamma signaling promotes breast cancer cell migration and invasion." J Pharmacol Exp Ther **333**(2): 393-403.
- Kusama, T., M. Mukai, et al. (2006). "Inactivation of Rho GTPases by p190 RhoGAP reduces human pancreatic cancer cell invasion and metastasis." Cancer Sci **97**(9): 848-853.
- Li, F., Y. Bai, et al. (2015). "Quercetin inhibits vascular endothelial growth factor-induced choroidal and retinal angiogenesis in vitro." Ophthalmic Res **53**(3): 109-116.
- Lutz, S. et al., 2013. RhoGEF17, a Rho-specific guanine nucleotide exchange factor activated by phosphorylation via cyclic GMP-dependent kinase I?? *Cellular Signalling*, 25(3), pp.630–638. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.11.016>.
- Martin, A., Komada, M.R. & Sane, D.C., 2003. Abnormal angiogenesis in diabetes

mellitus. *Medicinal Research Reviews*, 23(2), pp.117–145.

Meiri, D. et al., 2009. Modulation of Rho guanine exchange factor Lfc activity by protein kinase A-mediated phosphorylation. *Molecular and cellular biology*, 29(21), pp.5963–73. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2772734&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>.

Mitin, N. et al., 2013. The RhoGEF TEM4 Regulates Endothelial Cell Migration by Suppressing Actomyosin Contractility. *PLoS ONE*, 8(6).

Mitin, N., Rossman, K.L. & Der, C.J., 2012. Identification of a novel actin-binding domain within the Rho guanine nucleotide exchange factor TEM4. *PLoS ONE*, 7(7).

Ngok, S.P. et al., 2013. TEM4 is a junctional Rho GEF required for cell-cell adhesion, monolayer integrity and barrier function. *Journal of cell science*, 126(Pt 15), pp.3271–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23729734> \n<http://jcs.biologists.org/content/126/15/3271.abstract>.

Niu, J. et al., 2003. G Protein betagamma subunits stimulate p114RhoGEF, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and Rac1: regulation of cell shape and reactive oxygen species production. *Circulation research*, 93(9), pp.848–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14512443>.

Nishida, K., Y. Kaziro, et al. (1999). "Association of the proto-oncogene product dbl with G protein betagamma subunits." *FEBS Lett* **459**(2): 186-190.

Niu, J., J. Profirovic, et al. (2003). "G Protein betagamma subunits stimulate p114RhoGEF, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and Rac1: regulation of cell shape and reactive oxygen species production." *Circ Res* **93**(9): 848-856.

Ron, D., S. R. Tronick, et al. (1988). "Molecular cloning and characterization of the human dbl proto-oncogene: evidence that its overexpression is sufficient to transform NIH/3T3 cells." *EMBO J* **7**(8): 2465-2473.

- Ron, D., G. Graziani, et al. (1989). "The N-terminal region of proto-dbl down regulates its transforming activity." *Oncogene* **4**(9): 1067-1072.
- Ron D, et al., 1991. A region of proto-Dbl for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24, and the human breakpoint cluster gene, bcr. *New Biol.*, 372-9
- Rümenapp, U. et al., 2002. A mammalian Rho-specific guanine-nucleotide exchange factor (p164-RhoGEF) without a pleckstrin homology domain. *The Biochemical journal*, 366(Pt 3), pp.721–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1222833&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Runne, C. & Chen, S., 2013. PLEKHG2 promotes heterotrimeric G protein $\beta\gamma$ -stimulated lymphocyte migration via Rac and Cdc42 activation and actin polymerization. *Molecular and cellular biology*, 33(21), pp.4294–307. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24001768>.
- Thornton, C., K. C. Tang, et al. (2004). "Spatial and temporal regulation of RACK1 function and N-methyl-D-aspartate receptor activity through WD40 motif-mediated dimerization." *J Biol Chem* **279**(30): 31357-31364.
- De Toledo, M. et al., 2000. The yeast exchange assay, a new complementary method to screen for Dbl-like protein specificity: Identification of a novel RhoA exchange factor. *FEBS Letters*, 480(2-3), pp.287–292.
- Ueda, H. et al., 2008. Heterotrimeric G protein $\beta\gamma$ subunits stimulate FLJ00018, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42. *Journal of Biological Chemistry*, 283(4), pp.1946–1953.
- Vazquez-Prado, J., H. Miyazaki, et al. (2004). "Chimeric G α i2/G α 13 proteins reveal the structural requirements for the binding and activation of the RGS-like (RGL)-containing Rho guanine nucleotide exchange factors (GEFs) by G α 13." *J Biol Chem* **279**(52): 54283-54290.

- Vazquez-Prado, J., I. Bracho-Valdes, et al. (2016). "Gbetagamma pathways in cell polarity and migration linked to oncogenic GPCR signaling: potential relevance in tumor microenvironment." Mol Pharmacol.
- Viaud, J., F. Gaits-Iacovoni, et al. (2012). "Regulation of the DH-PH tandem of guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases by phosphoinositides." Adv Biol Regul **52**(2): 303-314.
- Yohe, M. E., K. L. Rossman, et al. (2007). "Auto-inhibition of the Dbl family protein Tim by an N-terminal helical motif." J Biol Chem **282**(18): 13813-13823.
- Yoshida, A., A. Shimizu, et al. (2015). "VEGF-A/NRP1 stimulates GIPC1 and Syx complex formation to promote RhoA activation and proliferation in skin cancer cells." Biol Open **4**(9): 1063-1076.
- Wang, Y., S. G. Cho, et al. (2014). "G-protein coupled receptor 124 (GPR124) in endothelial cells regulates vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced tumor angiogenesis." Curr Mol Med **14**(4): 543-554.
- Weis, S.M. & Cheresh, D.A., 2011. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*, 17(11), pp.1359–1370. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22064426> \n<http://www.nature.com/nm/journal/v17/n11/pdf/nm.2537.pdf>.