

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

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**RhoGEFs activadores de la GTPasa RhoJ y sus  
implicaciones angiogénicas**

**T E S I S**

**Que presenta**

**M. en C. Víctor Manuel Color Aparicio**

**Para obtener el grado de**

**Doctor en Ciencias**

**En la Especialidad de Farmacología.**

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

**Ciudad de México**

**Octubre 2020**

**Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme una beca con número de CVU 594977, para realizar mis estudios de Doctorado en Ciencias en la Especialidad de Farmacología, inscrito al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Centro de Investigación y De Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV). La infraestructura del proyecto fue apoyada por los donativos del CONACYT: 286274 al Dr. José Vázquez Prado y 240119 a la Dra. Guadalupe Reyes Cruz.**

## **Agradecimientos:**

**Al Dr. José Vázquez Prado, por su paciencia, infraestructura, apoyo y dirección en el proyecto, durante mi estancia en el laboratorio y realización de mis estudios de doctorado.**

**A mis asesores de Tesis: Dra. Guadalupe Reyes Cruz, Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza, Dr. Fernando López Casillas y Dr. Benjamín Floran Garduño Mendoza por aceptar ser evaluadores de este proyecto, sus consejos y opiniones para mejorar el proyecto.**

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

**A los colaboradores de este proyecto, M. en C. Yareli Mabell Beltrán, M. en C. Irving García Jiménez y Biol. Estanislao Escobar, gracias por todo su apoyo.**

**Un agradecimiento especial al Dr. Rodolfo Daniel Cervantes Villagrana, por su enseñanza, apoyo en los experimentos, en la publicación del artículo y por su amistad, muchas gracias amigo.**

**A mis compañeros del laboratorio 35 de Farmacología y laboratorio 19 de Biología Celular.**

**Al personal de apoyo: Estanislao Escobar Islas, David Pérez Rangel, Margarita Raquel Valadez Sánchez, Jaime Estrada Trejo y Omar Hernández.**

**A la doctora Victoria Heath de la Universidad de Birmingham por la donación de plásmidos de RhoJ.**

**Al personal administrativo del Departamento de Farmacología y del Cinvestav.**

## **Dedicatoria**

**Esta tesis va dedicada a mi familia, mi padre Antonio Color Piñón, mi madre Jovita Aparicio Jerónimo, mi hermano y su esposa Francisco Raymundo Color Aparicio y Eloísa Morales.**

**De manera muy especial a las pequeñas; Layla Color Morales y Itza Sofía Color Morales, dos pequeñas que le han dado una inmensa alegría a nuestras vidas.**

**Esta tesis va dedicada a la familia Santiago Pérez y mis padrinos de graduación: Teresa Pérez y Alfredo Santiago.**

**Para María, Concepción y mi abuelita Florentina con amor y cariño.**

## Contenido

Abreviaturas .....	I
Resumen .....	II
Abstract.....	III
1.- Introducción .....	1
<u>Figura 1.1.- La angiogénesis tumoral es importante para el crecimiento tumoral y establecimiento de metástasis</u> .....	2
1.2.- Migración celular.....	2
<u>Figura 1.2.- La migración celular es importante en el proceso angiogénico tumoral.</u> .....	3
1.3.- RhoGTPasas .....	4
<u>Figura 1.3.1- Ciclo de regulación de las RhoGTPasas</u> .....	5
1.3.1.- Familia de RhoA .....	6
1.3.2.- Familia de Rac1.....	6
1.3.3.- Familia de Cdc42 .....	7
1.3.4.-RhoJ .....	7
1.3.4.1.-Expresión de RhoJ.....	8
1.3.4.2.-Función de RhoJ .....	8
1.3.4.3.- Funciones de RhoJ en cáncer.....	9
1.3.4.4.-Modulación del citoesqueleto por RhoJ.....	9
<u>Figura 1.3.2.- Participación de RhoJ en procesos celulares</u> .....	10
1.3.4.5.-RhoJ como blanco terapéutico .....	11
1.4.- RhoGEFs.....	11
1.4.1-RhoGEFs específicos para RhoA .....	12
<u>Figura 1.4.- Ejemplos de RhoGEFs de la familia Dbl.</u> .....	13
1.4.2-RhoGEFs específicos para Rac1.....	13
1.4.3-RhoGEFs específicos para Cdc42.....	14

<b>2.-Justificación .....</b>	<b>15</b>
<b>    <u>Figura 2.1.- RhoJ juega un papel importante en la angiogénesis tumoral. ....</u></b>	<b>15</b>
<b>2.1 Hipótesis .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Objetivo General .....</b>	<b>16</b>
<b>2.3 Objetivos específicos .....</b>	<b>16</b>
<b>3.- Estrategia experimental .....</b>	<b>17</b>
<b>    <u>Figura 3.1.- Estrategia experimental: .....</u></b>	<b>18</b>
<b>    <u>Figura 3.2.- Estrategia experimental: .....</u></b>	<b>19</b>
<b>4.- Material y Métodos .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1.-Reactivos .....</b>	<b>20</b>
<b>4.2.-Plásmidos .....</b>	<b>21</b>
<b>    <u>Tabla 4.2.- Plásmidos utilizados.....</u></b>	<b>21</b>
<b>4.3.-Obtención de construcciones DPH-RhoGEFs .....</b>	<b>22</b>
<b>    <u>Tabla 4.3.1.- Oligonucleótidos utilizados para las construcciones DPH-RhoGEFs .....</u></b>	<b>22</b>
<b>    <u>Tabla 4.3.2.- Condiciones de la PCR.....</u></b>	<b>23</b>
<b>4.4.- Obtención de la mutante libre de nucleótido RhoJ-G33A.....</b>	<b>24</b>
<b>    <u>Tabla 4.4.1.- Condiciones de la PCR de mutación.....</u></b>	<b>25</b>
<b>    <u>Tabla 4.4.2.- Condiciones de PCR de secuenciación.....</u></b>	<b>26</b>
<b>4.5.- Subclonación de RhoJ-G33A en pCEFL-GST-RhoJ .....</b>	<b>27</b>
<b>4.6.- Obtención de pCEFL-GST-ITSN1-DPH.....</b>	<b>28</b>
<b>4.7.- Preparación de perlas de GST en bacterias <i>E. coli</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>4.8.- Ensayo pulldown para captura de RhoGEFs DPH con GTPasas libres de nucleótido.....</b>	<b>31</b>
<b>    4.8.1.- Con perlas recombinantes de RhoJ-G33A y Cdc42-G15A preparadas en bacterias.....</b>	<b>31</b>
<b>    4.8.2.- Con sepharosa 4B y GST-RhoJ-G33A en cotransfección.....</b>	<b>32</b>

<b>4.9.- Ensayos de Pulldown para activación de GTPasas por RhoGEFs-DHPH .....</b>	<b>32</b>
<b>4.10.- Ensayos de Pulldown para activación de GTPasas por Medios Condicionados Tumoraes .....</b>	<b>33</b>
<b>4.11.- Ensayos de Pulldown para activación de GTPasas por VEGF-A...34</b>	<b>34</b>
<b>4.12.- Ensayo de pulldown para la captura de GTPasas-QL.....</b>	<b>35</b>
<b>4.13.- Ensayo de pulldown para captura de Mutantes de RhoJ .....</b>	<b>35</b>
<b>4.14.- Ensayo de pulldown para activación de RhoJ por ITSNs-DHPH ..36</b>	<b>36</b>
<b>4.15.- Ensayo de pulldown para evaluar el efecto de RhoJ-T35N como un potencial inhibidor de la activación de RhoJ.....</b>	<b>36</b>
<b>4.16.- Ensayo de pulldown para evaluar el potencial efecto inhibitorio de FAK sobre la activación de RhoJ dependiente del ITSN1-DHPH .....</b>	<b>36</b>
<b>4.17.- Ensayo de pulldown para activación de RhoJ por ITSN1 completa .....</b>	<b>37</b>
<b>4.18.- Ensayo de pulldown para el efecto inhibitorio de FAK sobre la activación de RhoJ dependiente de ITSN1 completa.....</b>	<b>37</b>
<b>4.19.- Ensayo de pulldown para captura de ITSNs-DHPH con GTPasas libres de nucleótido.....</b>	<b>38</b>
<b>4.19.1.- Con perlas recombinantes de RhoJ-G33A y Cdc42-G15A preparadas en bacterias.....</b>	<b>38</b>
<b>4.19.2.- Con sepharosa 4B y GST-RhoJ-G33A en cotransfección.....</b>	<b>38</b>
<b>4.20.- Ensayo de pulldown para el efecto inhibitorio de FAK en la captura de ITSN1-DHPH con RhoJ libre de nucleótido .....</b>	<b>38</b>
<b>4.20.1.- Con perlas recombinantes de RhoJ-G33A y Cdc42-G15A preparadas en bacterias.....</b>	<b>38</b>
<b>4.20.2.- Con sepharosa 4B y GST-RhoJ-G33A en cotransfección.....</b>	<b>39</b>
<b>4.21.- Ensayo de pulldown para identificar fosforilaciones en ITSN1-DHPH .....</b>	<b>39</b>
<b>4.22.-Western Blot.....</b>	<b>40</b>
<b><u>    </u>Tabla 4.22.1.- Anticuerpos utilizados en el Western Blot .....</b>	<b>40</b>

<b>___ Tabla 4.22.2.- Peso en KiloDaltones de proteínas utilizadas en el Western Blot .....</b>	<b>41</b>
<b>4.23.- Stripping .....</b>	<b>41</b>
<b>4.24.- Preparación de cajas con poli-D-lisina .....</b>	<b>41</b>
<b>4.25.- Tripsinización de células HEK293T, PAE y LAP0297 .....</b>	<b>42</b>
<b>4.26.- Transfección de células HEK293T p60 con PEI-1X.....</b>	<b>42</b>
<b>4.27.- Transfección de células PAE p35 con turbofect .....</b>	<b>42</b>
<b>4.28.- Ayuno de células HEK293T .....</b>	<b>43</b>
<b>4.29.- Ayuno de células PAE .....</b>	<b>43</b>
<b>4.30.- Ayuno de células LAP0297 para obtención de medios condicionados .....</b>	<b>43</b>
<b>4.31.- Fluorescencias y tinción con faloidina .....</b>	<b>43</b>
<b>5.- Estadística .....</b>	<b>45</b>
<b>6.- Resultados .....</b>	<b>46</b>
<b>6.1- Identificación de RhoGEFs-DHPH como posibles activadores de RhoJ por interacción con RhoJ-G33A recombinante en perlas de glutatión-sepharosa .....</b>	<b>46</b>
<b>___ Figura 6.1.1- Tamizaje de interacción RhoGEFs-DHPH con RhoJ-G33A.....</b>	<b>47</b>
<b>___ Figura 6.1.2- Resumen del tamizaje de interacción.....</b>	<b>48</b>
<b>6.2- Identificación de RhoGEFs-DHPH como posibles activadores de RhoJ por interacción con RhoJ-G33A en un sistema de cotransfección..</b>	<b>48</b>
<b>___ Figura 6.2.1- Ensayos de interacción RhoGEFs-DHPH con RhoJ-G33A en el sistema de cotransfección. ....</b>	<b>49</b>
<b>___ Figura 6.2.2.- Resumen de los ensayos de interacción. Se identifican 6 RhoGEFs-DHPH como candidatos activadores de RhoJ. ....</b>	<b>50</b>
<b>6.3.- RhoGEFs-DHPH activadores de RhoJ por un mecanismo directo ..</b>	<b>50</b>
<b>___ Figura 6.3.1.- RhoGEFs-DHPH activadores de RhoJ.....</b>	<b>51</b>



<b>___ Figura 6.3.2.- Resumen de los ensayos de activación de RhoJ por RhoGEFs-DHPH. ....</b>	<b>52</b>
<b>6.4.- Elección del RhoGEF-DHPH para su caracterización en procesos angiogénicos .....</b>	<b>53</b>
<b>6.5.- Comparación de los cambios morfológicos inducidos por Cdc42, Rac1, RhoA y RhoJ .....</b>	<b>53</b>
<b>___ Figura 6.5.1.- Árbol filogenético de las RhoGTPasa. ....</b>	<b>53</b>
<b>___ Figura 6.5.2. RhoJ induce la formación de filopodios en células endoteliales. ....</b>	<b>54</b>
<b>___ Figura 6.5.3.- RhoJ y Cdc42 llevan a la formación de filopodios por mecanismos independientes.....</b>	<b>55</b>
<b>6.6.- Análisis bioinformático del complejo estructural ITSN1-DHPH con Cdc42 .....</b>	<b>56</b>
<b>___ Figura 6.6.- Análisis bioinformático del complejo Cdc42 y ITSN1-DHPH (1K11). ....</b>	<b>56</b>
<b>6.7.- Activación de RhoJ por ITSN1-DHPH pero no por ITSN2-DHPH .</b>	<b>57</b>
<b>___ Figura 6.7.- El DHPH de ITSN1, pero no ITSN2, promueve la activación de RhoJ. ....</b>	<b>58</b>
<b>6.8.- RhoJ forma una interacción directa con el módulo DHPH de ITSN1 .....</b>	<b>58</b>
<b>___ Figura 6.8.- El DHPH de ITSN1 tiene afinidad por RhoJ-G33A.....</b>	<b>59</b>
<b>6.9.- Activación de RhoJ por ITSN1 completa .....</b>	<b>60</b>
<b>___ Figura 6.9.- ITSN1 en su versión completa promueve la activación de RhoJ.....</b>	<b>60</b>
<b>6.10.- El DHPH de ITSN1, pero no ITSN2, induce la formación de estructuras tipo filopodios en células endoteliales .....</b>	<b>61</b>
<b>___ Figura 6.10.- El módulo DHPH de ITSN1 induce la formación de estructuras tipo filopodios en células endoteliales. ....</b>	<b>62</b>
<b>6.11.- La dominante negativa de RhoJ (T35N) bloquea la señalización de RhoJ dependiente del módulo DHPH de ITSN1 .....</b>	<b>63</b>

<b>___ Figura 6.11.1.- RhoJ-T35N impide la activación de RhoJ por ITSN1-DHPH. ....</b>	<b>64</b>
<b>___ Figura 6.11.2.- RhoJ-T35N evita la formación de filopodios inducidos por el DHPH de ITSN1 en células endoteliales. ....</b>	<b>64</b>
<b>6.12.- RhoJ-T35N colocaliza con el DHPH de ITSN1 y el DHPH de ITSN2 en vesículas que corresponden a endosomas tempranos .....</b>	<b>65</b>
<b>___ Figura 6.12.1.- RhoJ-T35N es una dominante negativa que genera estructuras tipo vesiculares en células endoteliales. ....</b>	<b>65</b>
<b>___ Figura 6.12.2.- RhoJ-T35N colocaliza con el DHPH de ITSN1 y el DHPH de ITSN2 en estructuras tipo vesiculares. ....</b>	<b>66</b>
<b>___ Figura 6.12.3.- RhoJ-T35N interacciona con el DHPH de ITSN1 e ITSN2.....</b>	<b>67</b>
<b>___ Figura 6.12.4.- RhoJ-T35N colocaliza con Rab5 en endosomas tempranos en células endoteliales.....</b>	<b>68</b>
<b>6.13.- RhoJ es activada por factores de células tumorales y VEGF-A.....</b>	<b>69</b>
<b>___ Figura 6.13.1.- Expresión de RhoJ en líneas celulares. ....</b>	<b>69</b>
<b>___ Figura 6.13.2.- RhoJ se activa por factores de origen tumoral.....</b>	<b>70</b>
<b>___ Figura 6.13.3.- RhoJ es activa por VEGF-A.....</b>	<b>71</b>
<b>6.14.- El DHPH de ITSN1 es fosforilado por la cinasa de adhesiones focales (FAK) .....</b>	<b>71</b>
<b>___ Figura 6.14.- El módulo DHPH de ITSN1 se fosforila en tirosinas por la cinasa de adhesiones focales (FAK).....</b>	<b>72</b>
<b>6.15.- FAK disminuye la interacción entre RhoJ y el módulo DHPH de ITSN1.....</b>	<b>73</b>
<b>___ Figura 6.15.1.- FAK disminuye la afinidad entre RhoJ y el módulo DHPH de ITSN1. ....</b>	<b>74</b>
<b>___ Figura 6.15.2.- FAK disminuye la afinidad entre el DHPH de ITSN1 y RhoJ, pero no afecta la afinidad por Cdc42. ....</b>	<b>75</b>
<b>6.16.- FAK evita la activación de RhoJ inducida por el DHPH de ITSN1.....</b>	<b>75</b>

<b>__ Figura 6.16.1.- FAK disminuye la activación de RhoJ por el DHPH de ITSN1.....</b>	<b>76</b>
<b>__ Figura 6.16.2.- FAK no afecta la formación de filopodios por el DHPH de ITSN1 en células endoteliales.....</b>	<b>77</b>
<b>6.17.- FAK evita la activación de RhoJ inducida por ITSN1.....</b>	<b>77</b>
<b>__ Figura 6.17.- FAK inhibe la activación de RhoJ por la ITSN1 completa. ....</b>	<b>78</b>
<b>7.- Discusión .....</b>	<b>79</b>
<b>8.- Conclusiones .....</b>	<b>82</b>
<b>__ Figura 8.- ITSN1 promueve la activación de RhoJ e induce la formación de filopodios por un mecanismo que requiere el tráfico de endosomas. ....</b>	<b>82</b>
<b>9.- Perspectivas .....</b>	<b>84</b>
<b>10.- Referencias.....</b>	<b>85</b>
<b>11.- Publicaciones .....</b>	<b>90</b>

## **Abreviaturas**

VEGF.- Vascular Endothelial Growth factor.  
VEGFR.- Vascular Endothelial Growth Factor Receptor.  
Ang2.- Angiopoietin-2.  
GTP.- Guanosine Triphosphate.  
GDP.-Guanosine Diphosphate.  
GEF.- Guanine Nucleotide Exchange Factor.  
GAP-GTPase Activating Protein.  
GDI.- Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor Protein.  
RGS-RhoGEFs.- RGS-containing RhoGEFs  
P-REX1.- Phosphatidylinositol, 3,4,5 triphosphate-dependent Rac exchanger protein.  
RhoJ.-Ras Homolog Family Member J.  
EGFP.-Enhanced Green Fluorescent Protein.  
PCR.- Polymerase chain reaction.  
HEK293T.- Human Embryonic Kidney Transforming Cells.  
PAE.- Porcine Aorta Endothelial Cells.  
GST.-Glutathione S-Transferase.  
BMDC.- Bone Marrow-Derived Cell  
ITSN1.- Intersectin-1  
ITSN2.- Intersectin-2  
FAK.- Focal Adhesion Kinase

## **Resumen**

La angiogénesis es un proceso importante en diversos eventos celulares, en condiciones neoplásicas, los tumores utilizan la angiogénesis para obtener oxígeno, nutrientes, eliminar desechos y establecer metástasis. Por estas circunstancias, la angiogénesis tumoral es un proceso que requiere ser controlado para evitar el crecimiento tumoral y metástasis. La angiogénesis comprende la extensión de la red vascular, lo cual incluye la migración de células endoteliales, en este proceso, las células endoteliales modifican su citoesqueleto de actina en respuesta a un gradiente quimiotáctico.

Las RhoGTPasas son los maestros reguladores del citoesqueleto de actina, entre las RhoGTPasas se encuentra RhoJ. RhoJ es una GTPasa importante en procesos angiogénicos tumorales, se sobreexpresa en endotelio tumoral, es importante para el crecimiento tumoral y metástasis. RhoJ ha tomado relevancia como un blanco terapéutico debido a que su bloqueo evita el crecimiento tumoral y no afecta el desarrollo de otros órganos y tejidos, sin embargo, se desconocen los reguladores de su actividad. Al ser una RhoGTPasa, su activación debe ser controlada por RhoGEFs, los cuales aún no se han identificado.

Para la identificación de RhoGEFs, se utilizaron construcciones activas de RhoGEFs (RhoGEFs-DHPH), con estas construcciones se identificaron las que tienen afinidad por RhoJ y puedan llevar a su activación. Se evaluaron 20 construcciones de las cuales los DHPHs de ITSN1, ARHGEF15, ARHGEF11 y P-REX1 llevan a la activación de RhoJ por un mecanismo directo. La ITSN1 en su versión DHPH como en su versión completa promueven la activación de RhoJ.

La expresión del DHPH de ITSN1 en células PAE induce la formación de estructuras tipo filopodios, estos filopodios requieren de la actividad de RhoJ. Para la formación de filopodios se requiere del tráfico de endosomas tempranos, esto debido a que al utilizar la dominante negativa de RhoJ (T35N) se evita la formación de filopodios y se observan estructuras vesiculares que colocalizan con Rab5, lo cual corresponde a endosomas tempranos.

RhoJ es activada río abajo de factores de origen tumoral y VEGF-A, en la señalización de VEGF-A participa la cinasa de adhesiones focales (FAK). ITSN1 tiene sitios posibles de fosforilación en tirosinas, uno en el DH y otro en el PH, la expresión de FAK conduce a la fosforilación de ITSN1 DHPH. Esta fosforilación disminuye la afinidad del DHPH de ITSN1 por RhoJ, pero no con Cdc42, lo cual indica un efecto inhibitorio específico sobre la actividad de RhoJ.

En conclusión, la ITSN1 promueve la activación de RhoJ induciendo la formación de filopodios mediante un mecanismo que involucra el tráfico de endosomas tempranos. Como

parte de la cascada de señalización, RhoJ se activa río abajo de VEGFR2, en esta cascada también se activa la cinasa de adhesiones focales (FAK) quien fosforila el módulo DHPH de ITSN1 disminuyendo de manera específica, la afinidad del DHPH por RhoJ.

### **Abstract**

Angiogenesis contributes to tumor growth. This process can be therapeutically controlled to avoid tumor growth and metastasis. Tumoral angiogenesis is involved vascular network extension. In this process, endothelial cells change their actin cytoskeleton to migrate towards chemotactic gradients. RhoGTPases are master regulators of the actin cytoskeleton; RhoJ has been associated with the progression of cancer, metastasis and chemotherapeutic resistance. RhoJ knockout does not affect development of normal tissues and organs, but it is an important therapeutic target. RhoJ, like other RhoGTPases, is regulated by guanine nucleotide exchange factors (GEFs), but the RhoGEFs for RhoJ are unknown.

We used active RhoGEF constructs (RhoGEFs-DHPH) to identify activators of RhoJ. We evaluated 20 RhoGEFs-DHPH and identified 4 constructs able to activate RhoJ upon direct interaction; these DHPHs are from ITSN1, ARHGEF16, ARHGEF11 and P-REX1. ITSN1 DHPH, as well as the full-length version of this GEF activated RhoJ. ITSN1 DHPH expression in PAE cells induced filopodia formation via RhoJ. Vesicle trafficking seems to be linked to filopodia formation induced by RhoJ as indicated by the localization of dominant negative RhoJ (T35N) which collocated with Rab5, a marker of early endosomes. RhoJ was activated downstream of tumoral factors such as VEGF which also activated FAK (Focal Adhesion Kinase). Overexpression of FAK induced phosphorylation of the ITSN1 DHPH construct, decreasing its affinity for RhoJ, but not for Cdc42.

Thus, we demonstrate that ITSN1 activates RhoJ promoting filopodia formation. This GTPase is activated by VEGF and its regulation by ITSN involves endosome trafficking and is regulated by FAK. This pathway might represent a novel target for antiangiogenic therapies.

## 1.- Introducción

La red vascular es importante para el crecimiento, reparación, desarrollo de tejidos y órganos, por este medio se eliminan productos de desecho y se transporta el oxígeno necesario para las células. La red vascular se forma por la acción coordinada de la vasculogénesis, angiogénesis y arteriogenesis. En la vasculogénesis se forma la primera red vascular a partir de células precursoras endoteliales de la médula ósea (EPC, *endothelial progenitor cell*), en la angiogénesis la red vascular se expande y ramifica, la arteriogenesis es la etapa final, donde la red vascular se estabiliza y madura [1].

La angiogénesis se define como la formación de vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente, la angiogénesis es importante en el desarrollo embrionario para la formación de tejidos y órganos. Junto con la angiogénesis, las células neuronales se extienden para formar el sistema nervioso, las células epiteliales forman tejidos como la piel e intestino y las células endoteliales forman la red vascular [2].

En condiciones adversas, como daño tisular, se liberan factores que son reconocidos por las células endoteliales y promueven su proliferación. Con ello se establece una extensión de la red vascular para reparar el daño ocasionado. En ciertas patologías como retinopatía diabética y neoplasias, los tumores sólidos aprovechan esta acción para poder acceder a la red vascular, obtener nutrientes, eliminar desechos y establecer metástasis [1, 3].

La angiogénesis en estado patológico, como el cáncer, se conoce como angiogénesis tumoral y se ha reconocido como un proceso que puede ser controlado para evitar el crecimiento tumoral y establecimiento de metástasis.

### 1.1.-Angiogénesis tumoral

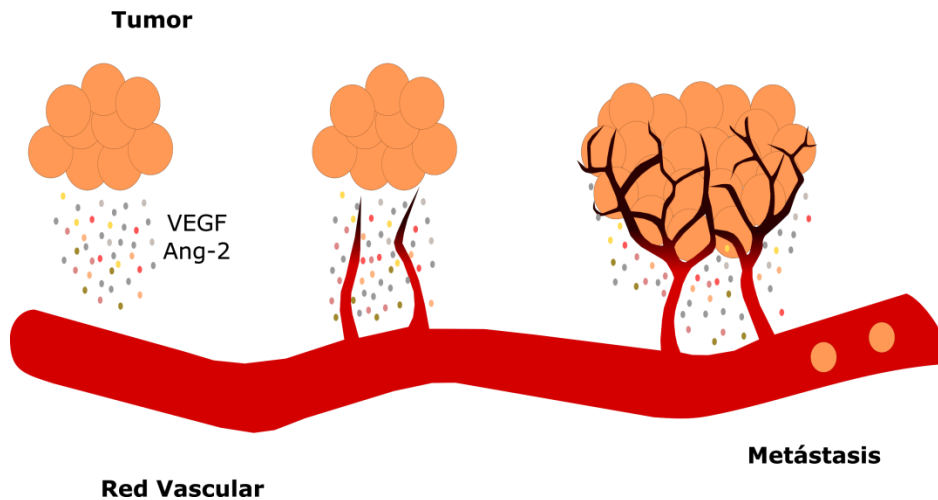
Los tumores liberan factores que les permiten acceder a la angiogénesis tumoral y tener acceso a la red vascular, esto les permite obtener nutrientes, eliminar sustancias de desecho y la capacidad de invadir y establecer metástasis (Figura 1.1).

Entre los factores que se liberan se encuentra la angiopoyectina-2 (ANG-2) que desestabilizan a los pericitos que normalmente dan estabilidad a la red vascular [1]. Otro factor liberado es el factor de crecimiento de endotelio vascular (*VEGF, vascular endothelial growth factor*). Este factor promueve la formación de filopodios en las células endoteliales para comenzar la extensión de la red vascular (Figura 1.1). Para tener una extensión vascular ordenada, se requiere la selección de una célula TIP, la cual guiará la red vascular en dirección del gradiente quimiotáctico tumoral [1, 4].

## Marco Teórico

La selección de la célula TIP ocurre como consecuencia de la activación de la vía Notch, la célula TIP libera Delta-4 (Dll4) que activa la vía Notch en células adyacentes, esta vía inhibe la expresión de receptores para VEGF (VEGFR), lo cual impide que la célula responda al VEGF y la convierte en una célula Stalk [1, 5, 6].

### Angiogénesis tumoral



**Figura 1.1.- La angiogénesis tumoral es importante para el crecimiento tumoral y establecimiento de metástasis.** Las células tumorales liberan factores que son reconocidos por las células endoteliales de la red vascular, mediante este mecanismo, la red vascular se ramifica, da acceso a los tumores a nutrientes y es la vía de entrada a la circulación para el establecimiento de metástasis.

Por medio de este mecanismo, la red vascular se extiende en dirección del gradiente quimiotáctico tumoral, con la guía de una célula TIP se establece la red vascular tumoral que promueve el crecimiento de células tumorales y el establecimiento de metástasis (Figura 1.1) [1].

Para que las células TIP promuevan la formación de una nueva red vascular, requieren migrar en dirección del factor quimiotáctico, una acción que requiere de cambios en su citoesqueleto de actina.

### 1.2.- Migración celular

La migración celular es un proceso complejo e importante en diversos aspectos fisiológicos, como el desarrollo embrionario, respuesta inmune, reparación, regeneración de órganos y tejidos. La migración puede darse de manera colectiva, como en el remodelado de la red vascular o individual como en la respuesta inmune [7-9].

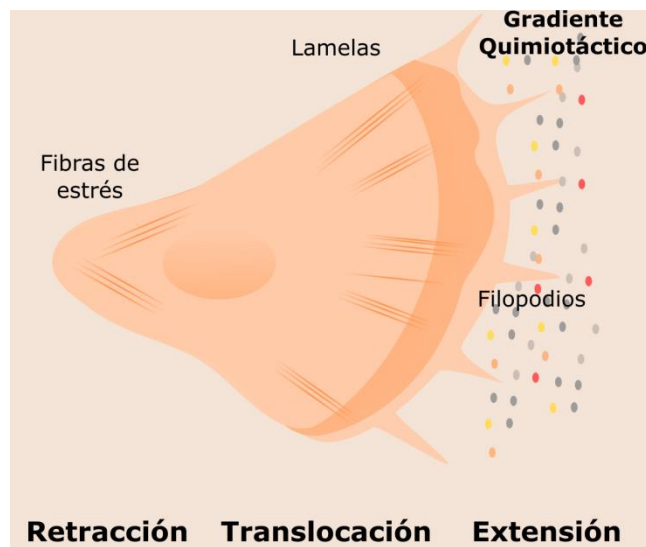


## Marco Teórico

La migración celular es un proceso cíclico que comprende: extensión de la célula en dirección del gradiente quimiotáctico, translocación del cuerpo celular y retracción de la parte posterior de la célula. Estos eventos requieren la coordinación del ensamble y desensamble de adhesiones, las adhesiones se afectan por cambios en la dinámica de la polimerización de actina del citoesqueleto (Figura 1.2)[10].

El remodelado del citoesqueleto requiere de una organización espacio-temporal dirigido por diversas vías de señalización, donde participan receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), receptores para factores de crecimiento e integrinas, entre otros. La integración de la señal desde la membrana hasta el citoesqueleto, permite a las células moverse en respuesta a un factor quimiotáctico liberado bajo condiciones como hipoxia, daño tisular o en respuesta a un antígeno [8, 9].

En condiciones neoplásicas, los tumores establecen un microambiente tumoral liberando factores que favorecen la migración de células derivadas de la médula ósea, células endoteliales, células del sistema inmune, que en conjunto establecen la formación de nuevos vasos sanguíneos, incrementan la comunicación paracrina para el crecimiento tumoral y establecimiento de metástasis [8].



**Figura 1.2.- La migración celular es importante en el proceso angiogénico tumoral.** La migración involucra un ciclo de procesos que consisten en: extensión, translocación y retracción del cuerpo celular para avanzar en dirección de un gradiente quimiotáctico. En este proceso se requiere de la formación de estructuras del citoesqueleto como filopodios, lamelas y fibras de estrés.

## Marco Teórico

---

Conocer las bases moleculares de la migración celular servirá para desarrollar estrategias terapéuticas. El ensamble y desensamble de adhesiones está regulado, entre otras proteínas, por GTPasas de la familia de Rho, quienes controlan la formación de estructuras del citoesqueleto, necesarias para procesos de migración tanto colectiva como individual (Figura 1.2) [7, 10].

### 1.3.- RhoGTPasas

Las GTPasas de la familia de Rho comprenden 20 proteínas divididas en 8 subfamilias: 1) Subfamilia de RhoA, RhoB y RhoC, 2) Subfamilia de Rnd1, Rnd2 y Rnd3, 3) Subfamilia de RhoF y RhoD, 4) Subfamilia de Rac1, Rac2, Rac3 y RhoG, 5) Subfamilia de Cdc42, RhoQ y RhoJ, 6) Subfamilia de RhoV y RhoU, 7) Subfamilia de RhoH y 8) Subfamilia de RhoBTB1 y RhoBTB2 [11-13].

Las RhoGTPasas tienen regiones conservadas con Ras; tienen un dominio G, responsable de su unión a nucleótidos de guanina, un dominio efector, formado por dos regiones Switch I y II donde interaccionan con sus efectores, y una región C-terminal, en la que se encuentra una secuencia de isoprenilación CAAX (C-cisteína, A-alifático, A-alifático, X-cualquier aminoácido) que le permite su localización en membranas celulares [14].

Las GTPasas son interruptores moleculares, se encuentran en estado inactivo (apagadas) cuando están unidas a GDP o en estado activo (encendidas) cuando se unen a GTP. Cuando se encuentran en estado activo, pueden activar a una variedad de proteínas efectoras e inducir cambios en el citoesqueleto en procesos de morfogénesis, adhesión, migración, invasión, proliferación y polaridad [15, 16].

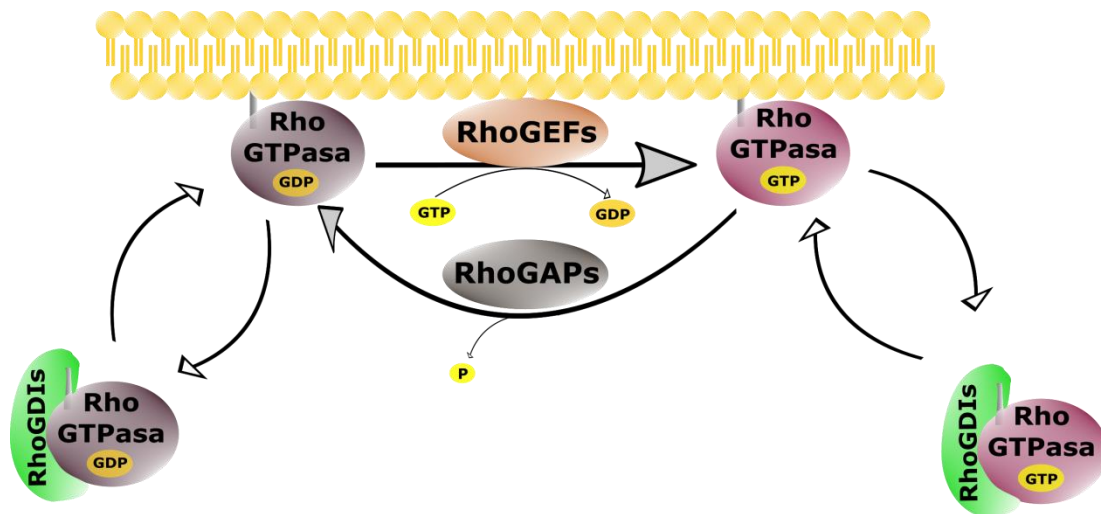
Además de la regulación del citoesqueleto, las GTPasas de la familia de Rho participan en diversos procesos, su señalización dependerá del tipo celular, tipo de activadores y efectores que se expresen en la célula. Así, pueden participar en apoptosis, sobrevivencia celular, dinámica de microtúbulos, formación de lumen, tráfico vesicular y ciclo celular [17].

Las GTPasas responden a estímulos extracelulares y se encuentran en estados cíclicos de activación e inactivación. Los controles de activación de las GTPasas incluyen: su localización subcelular, expresión y su unión a GTP. La regulación de su localización subcelular se produce mediante modificaciones postraduccionales, como isoprenilaciones, en su secuencia CAAX y regiones polibásicas, zonas ricas en aminoácidos básicos. Estas modificaciones les permite anclarse a diversos sub-compartmentos membranales como: membrana plasmática, endosomas o vesículas caveolares [16, 18-20].

## Marco Teórico

La regulación de la expresión de RhoGTPasas depende del tipo de tejido, algunas son de expresión ubicua, como en el caso de Cdc42, Rac1 y RhoA, o específica como Rac2 en células hematopoyéticas. Entre los mecanismos involucrados participan factores transcripcionales para su expresión restringida a ciertos tejidos o degradación proteica [16].

En el control de la unión a GTP participan tres tipos proteínas: RhoGEFs, RhoGAPs y RhoGDIs. Los RhoGEFs promueven el intercambio de GDP por GTP, los RhoGAPs incrementan la actividad GTPasa favoreciendo la hidrólisis de GTP y los RhoGDIs capturan los grupos isoprenilos secuestrando la GTPasa en el citosol interfiriendo con su ciclo de activación (Figura 1.3) [16, 18-20].



**Figura 1.3.1- Ciclo de regulación de las RhoGTPasas.** Los RhoGEFs promueven el intercambio de GDP por GTP, los RhoGAPs incrementan la actividad GTPasa hidrolizando el GTP en GDP y Pi, los RhoGDIs secuestran a la RhoGTPasa interrumpiendo con su ciclo de activación.

Tres de las 20 RhoGTPasas se han tomado como prototipo para entender los cambios inducidos en el citoesqueleto; Cdc42 induce la formación de filopodios e invadopodios, Rac1 forma lamelas y está relacionada con adhesiones focales, RhoA conduce a la formación de fibras de estrés y contracción acto-miosina, indispensable en adhesiones focales y formación de invadopodios [7].

Las GTPasas de Rho pueden estar sobreexpresadas en cáncer, donde favorecen la transformación oncogénica, sobrevivencia y metabolismo acelerado. Por ejemplo, RhoA presenta mayor sobreexpresión en cáncer de colon [21, 22], Rac1 se sobreexpresa en carcinoma de mama invasivo y leucemia [22, 23], Cdc42 en cáncer colorrectal [24]. En

## Marco Teórico

---

tejido tumoral de testículo y carcinoma de pulmón se encuentran sobreexpresadas RhoA, Rac1 y Cdc42 [25, 26].

### 1.3.1.- Familia de RhoA

Esta familia está formada por las GTPasas RhoA, RhoB y RhoC. Estas GTPasas sufren modificaciones postraduccionales como farnesilación y geranilación en su secuencia CAAX, y solo RhoB sufre palmitoilación [27]. Estas GTPasas tienen como efectores a Rhotekina, ROCK y forminas, inducen la formación de fibras de estrés, adhesiones focales y contracción celular [28].

RhoA participa en la progresión tumoral promoviendo la migración celular mediada por la contracción acto-miosina, forma *Blebs* que contribuyen a la motilidad de células de cáncer controlado por Rock. RhoA genera fuerzas de tracción mediadas por mDia, participa en la maduración de adhesiones focales [29].

RhoB actúa como un supresor tumoral, su sobreexpresión en cáncer gástrico inhibe la proliferación y migración de células tumorales. RhoC participa en la progresión de melanoma y cáncer de ovario donde favorece la migración e invasión de células tumorales, conduce a la formación de invadopodios incrementando su poder metastásico [29, 30].

### 1.3.2.- Familia de Rac1

La familia de Rac está formada por las GTPasas Rac1, Rac2, Rac3 y RhoG. Estas RhoGTPasas inducen la formación de ruffles y lamelas, tiene como efectores a PAK1 y WAVE [28]. Rac1 induce la formación de lamelas y ruffles en procesos de motilidad, participa en procesos de adhesión a fibronectina conduciendo a la formación de nuevas adhesiones, coopera con Raf-1 para inducir proliferación dependiente de H-Ras [29, 31-33].

En células tumorales, Rac1 se recluta en endosomas tempranos en respuesta a HGF y promueve el reciclamiento de endosomas a la membrana para la formación de ruffles y lamelas. Esto induce un fenotipo ameboide que favorece la invasión de células tumorales [34].

Rac1 y Rac2 promueven la activación de NADPH, el mecanismo involucra PAK1-p67<sup>PHOX</sup> importante en procesos de fagocitosis a través de la producción de superóxidos [35-37]. La expresión de Rac2 es restringida a células sanguíneas donde es activada por L-selectina, esto induce cambios en el citoesqueleto necesarios para la migración celular [38].

## Marco Teórico

---

### 1.3.3.- Familia de Cdc42

La familia de Cdc42 está formada por tres GTPasas: Cdc42, RhoQ y RhoJ. Cdc42 se identificó en una librería de placenta y se llamó Gp/G25K. El análisis de su secuencia determinó su homología a Cdc42 de levadura y su comportamiento como una GTPasa al incorporar GTP  $\gamma$  S. Tienen como efectores PAK1 y WASP [28, 39].

Cdc42 participa en el tráfico vesicular del retículo endoplásmico al aparato de Golgi [40-43], en sobrevivencia celular a través de la vía PI3K-AKT [44], también activa a MEKK-JNK en procesos de apoptosis y proliferación [45, 46]. En migración, la participación de Cdc42 depende del tipo celular. En macrófagos, Cdc42 es necesaria para la migración individual inducida por CSF-1 (*Colony stimulating factor 1*) [47], en fibroblastos promueve la polarización y la migración individual, pero no colectiva. En células endodérmicas no promueve ni polarización ni migración [48].

RhoQ en su estado activo induce la formación de filopodios, comparte efectores con Cdc42 como PAK y JNK [49]. RhoQ participa en la translocación dependiente de insulina de transportadores de glucosa GLUT4 (*glucose transporter 4*) a la membrana plasmática [3].

### 1.3.4.-RhoJ

RhoJ se identificó mediante marcadores de secuencias expresadas (*EST, Expressed Sequence Tag*) en muestras de tejidos humanos y murinos, pertenece a la subfamilia de Cdc42, es homóloga a RhoQ (Tc10), por lo que al inicio se le llamo TCL (Tc10-Like). A pesar del parecido con RhoQ, sus funciones celulares son diferentes [50, 51].

El análisis de su DNA indica que se encuentra en el cromosoma humano 14 y está formada por 5 exones, al igual que las otras GTPasas de la familia de Rho, presenta una secuencia CAAX donde sufre modificaciones postraduccionales para su localización en membrana plasmática y endosomas tempranos. RhoJ tiene regiones llamadas polibásicas ricas en aminoácidos básicos que le permite unirse por atracción electrostática a membranas celulares [50, 52, 53].

RhoJ tiene un amino terminal con 20 aminoácidos ausentes en la secuencia de Cdc42, los residuos que comprenden los aminoácidos 17-20 son importantes para la localización de RhoJ en la membrana plasmática y estabilizan la unión de GTP, la pérdida del N-terminal de RhoJ la relocaliza en endosomas tempranos [54, 55].

### 1.3.4.1.-Expresión de RhoJ

RhoJ se detecta en tejidos humanos como pulmón, útero y corazón [50, 56], se expresa en células de origen endotelial regulado por el factor transcripcional ERG [57, 58], su expresión en endotelio se detecta desde etapas tempranas del desarrollo embrionario [59, 60].

RhoJ se sobreexpresa en endotelio tumoral de cáncer de Lewis, mama y colon, localizándose en la periferia del tumor [61, 62]. En células tumorales se ha detectado la expresión de RhoJ en melanoma y cáncer gástrico [62, 63]. RhoJ se expresa en células derivadas de la médula ósea (*BMDC, Bone Marrow Derived Cells*), estas células establecen comunicación paracrina con células tumorales para favorecer el crecimiento tumoral [64].

### 1.3.4.2.-Función de RhoJ

En la retina, RhoJ se expresa en endotelio y regula el crecimiento vascular, el VEGF dirige la angiogénesis retinal y mediante la vía Sema3E-PlexinD1-RhoJ se controla el crecimiento desordenado de la red vascular en procesos isquémicos [65]. ARHGGEF15, un GEF que se expresa en células endoteliales, promueve la activación de Cdc42 e inhibe la de RhoJ para inducir migración de células endoteliales en la angiogénesis retinal en respuesta a VEGF [66, 67].

RhoJ participa en la formación de estructuras tipo lumen y túbulos en angiogénesis in vitro en respuesta a VEGF [58], contribuye en la formación de endosomas tempranos para la internalización del receptor de transferrina y regula el tráfico de la integrina  $\alpha 5 \beta 1$  en células endoteliales [52, 68].

RhoJ participa en la transición endotelio-mesénquima (EndMT), que permite una mayor migración de células endoteliales en condiciones de hipoxia. RhoJ regula a la metiltransferasa WDR5, quien a su vez controla factores de transcripción como TWIST y SNAIL, estos factores inhiben la transcripción de CDH5 (VE-Cadherina) [69].

En adipocitos RhoJ se expresa en pre-adipocitos e incrementa marcadores de adipocitos como C/EBP y SREBP-1, esto indica la participación de RhoJ en etapas tempranas de la diferenciación de adipocitos [70, 71]. En neuronas, induce la formación de neuritas y se requiere para la diferenciación neuronal [56]. RhoJ ayuda en la división celular, en la progresión de la mitosis dirigida por Cdc42 [72].

## Marco Teórico

---

En fibroblastos, RhoJ coopera con Cdc42 en la migración individual en respuesta a PDGF [73], en células epiteliales de la córnea humana (HCET) RhoJ y Cdc42 regulan la polarización y migración [74].

### **1.3.4.3.- Funciones de RhoJ en cáncer**

RhoJ promueve la migración de células de melanoma y cáncer gástrico para el establecimiento de metástasis [62, 75], en melanoma RhoJ inhibe la apoptosis, para ello activa a PAK1 quien inhibe por fosforilación a BAD, al inhibir BAD se evita la apoptosis y se favorece el desarrollo de los melanocitos en melanoma [76].

RhoJ promueve la sobrevivencia de células tumorales de melanoma ante terapias como cisplatino, el mecanismo involucra la vía RhoJ-PAK1-PLK1 para llevar a la degradación de claspina, claspina es una proteína de andamiaje necesaria en la reparación del DNA. Ante un daño en el DNA, se activan reguladores transcripcionales como ATR-ATF2 que inhiben a Sox10, un gen de sobrevivencia, la degradación de claspina evita la activación de ATF2 promoviendo sobrevivencia. Otra vía que se activa ante daño en el DNA es la vía ATR-Chk1 que llevan a la activación de p53 para inducir apoptosis, sin claspina no se produce la activación de p53 ni se induce apoptosis [63].

RhoJ es importante en etapas tempranas del crecimiento tumoral donde favorece la angiogénesis tumoral. RhoJ promueve la migración de células endoteliales para inducir la extensión vascular y el establecimiento de metástasis mediada por VEGF [61]. En la formación de la red capilar, se reportó que la Glutamina Sintetasa (GS) es importante, GS palmitoila y activa por interacción directa a RhoJ, quien promueve la migración de células endoteliales [77].

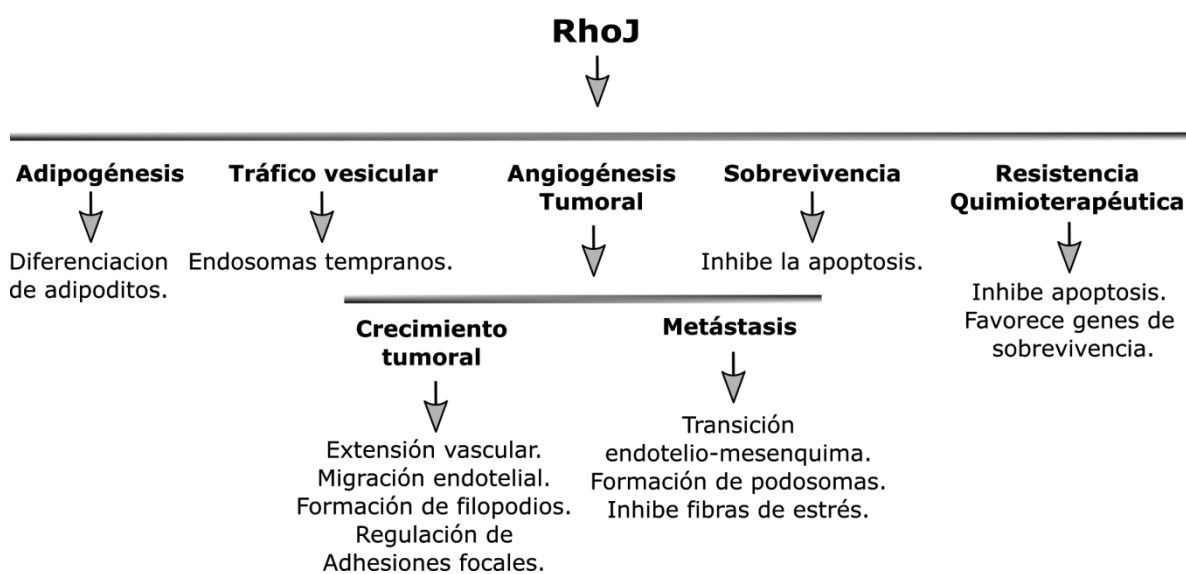
### **1.3.4.4.-Modulación del citoesqueleto por RhoJ**

En melanoma, RhoJ modula el citoesqueleto por un mecanismo que comprende a PAK1-LIMK que inhiben por fosforilación a cofilina y promueven la polimerización de actina a través del complejo Arp2/3 [75].

RhoJ induce la formación de estructuras tipo filopodios [50, 56], en células PAE-PDGFR  $\beta$  RhoJ induce la extensión de las células, la formación de adhesiones focales y la formación de podosomas [28, 78]. RhoJ inhibe la formación de fibras de estrés, inhibe a ROCK evitando la fosforilación de la cadena ligera de miosina (pMLC) [59, 61].

## Marco Teórico

RhoJ se encuentra en sitios de inserción en la membrana plasmática (*AMIS*, *Apical Membrane insertion Sites*), en estas regiones, RhoJ induce la formación de filamentos de actina mediada por formina-3 (FMNL3), FMNL3 a su vez, recluta a podocaxilina (PODXL) a superficies apicales de la membrana para iniciar la polarización de la célula endotelial [79].



**Figura 1.3.2.- Participación de RhoJ en procesos celulares.** RhoJ participa en la diferenciación de adipocitos en donde incrementa la expresión de C/EBP, colocaliza con Rab4 en endosomas tempranos, inhibe BAD impidiendo la apoptosis, promueve resistencia a quimioterapia al incrementar la expresión de Sox10 e inhibir p53. En la angiogénesis tumoral, promueve el crecimiento tumoral manteniendo una extensión vascular ordenada a través de Sema3E-PlexinD1, favorece la polaridad celular en la migración endotelial a través de formina3-podocaxilina, regula las adhesiones focales al unirse al complejo GIT-PIX. En metástasis, RhoJ favorece la transición endotelio-mesénquima, induce la formación de podosomas en procesos de invasión tumoral, inhibe la actividad de RhoA y favorece la polimerización de actina a través de PAK1-LIMK.

RhoJ favorece la migración de células endoteliales al regular el tamaño de las adhesiones focales. RhoJ incrementa el tamaño de las adhesiones focales y disminuye su tiempo de vida, se traslada a las adhesiones focales a través de GIT1/2 donde forma un complejo con ARHGEF7, necesario para la formación de túbulos angiogénicos [80].

RhoJ comparte efectores con Cdc42, entre los efectores de RhoJ se encuentran a FMNL3, PAK1, PAK4, WASP, N-WASP, CIP4, PAR6 y p50RhoGAP [28, 50, 56, 79]. RhoJ puede interactuar con JAMB, una proteína de adhesión celular, también lleva a la fosforilación de PAK2 y B-RAF por un mecanismo desconocido [58].



### 1.3.4.5.-RhoJ como blanco terapéutico

La expresión de RhoJ de manera restringida al endotelio y en ciertas células tumorales como melanoma, hace de esta GTPasas un blanco interesante para evitar el crecimiento tumoral y establecimiento de metástasis [63, 67, 81]. RhoJ se sobreexpresa en endotelio tumoral y participa en la normalización de la vasculatura tumoral, el bloqueo de RhoJ evita el crecimiento tumoral y se considera un potencial blanco terapéutico [61, 80].

El bloqueo de otras RhoGTPasas trae efectos adversos para el organismo, en este sentido se ha reportado que el KO (*Knock out*) de RhoJ no afecta el desarrollo normal de órganos y tejidos, además su expresión se asocia con una menor sobrevivencia de pacientes con cáncer gástrico, lo cual incrementa el interés en RhoJ como blanco terapéutico [61, 62].

Debido a que RhoJ promueve resistencia ante terapias dirigidas al melanoma, se considera a RhoJ como un atractivo blanco para evitar la resistencia y tener un mejor efecto de las terapias establecidas contra el melanoma [63].

RhoJ puede incrementar el potencial terapéutico antitumoral utilizando radiación, mediante el empleo de radiosensibilizadores, mediante esta técnica anticuerpos contra RhoJ se fusionan a partículas de oro que se dirigen directamente a la vasculatura tumoral y mediante bajas dosis de radiación destruyen el tumor sin afectar la integridad de otros órganos o tejidos [82].

Entre otras posibles aplicaciones de RhoJ como blanco terapéutico, se ha reportado que es blanco de fármacos anti-proliferativos [83], su expresión se desregula en cardiomiopatías [84] y se encuentra desregulada en lupus eritematosos sistémico [85].

RhoJ es un interesante blanco terapéutico para evitar el crecimiento tumoral y establecimiento de metástasis, sin embargo, se desconoce el o los RhoGEFs que pueda llevar a su activación y su participación en procesos angiogénicos tumorales.

### 1.4.- RhoGEFs

Existen dos familias de activadores de RhoGTPasas, los de la familia Dock y los de la familia Dbl. La familia Dock está compuesta por 4 grupos: A (Dock1, Dock2 y Dock5), B (Dock3 y Dock4), C (Dock6, Dock7 y Dock8) y D (Dock9, Dock10 y Dock11), tienen en común dominios DHR-1 y DHR-2, el dominio DHR-2 tiene la función RhoGEF. La familia Dbl comprende 70 miembros que tienen en común el dominio DH, responsable de la función RhoGEF [18, 86].

## Marco Teórico

---

El primer RhoGEF de la familia Dbl se aisló del bazo de pacientes con linfoma difuso de células B y se le llamó Dbl (*Diffuse B cell lymphoma*), una proteína de 66 kilodaltones (Kd). La expresión de Dbl en fibroblastos, induce su transformación en células gigantes multinucleares y se pierde la inhibición por contacto, con estos resultados se reportó el aislamiento de un nuevo oncogén humano diferente a los conocidos hasta entonces [87, 88].

Posteriormente se demostró que Dbl promueve el intercambio de nucleótido de guanina, GDP por GTP en Cdc42, Rac1 y RhoA, por lo que se clasificó como un GEF para GTPasas de la familia de Rho [89, 90]. Los RhoGEFs de la familia Dbl tienen regiones conservadas en el dominio DH, estas regiones se nombran CR1-CR3 y forman la superficie que se une a las regiones Switch de las RhoGTPasas para favorecer la liberación de GDP. Además del dominio DH, algunos RhoGEFs requieren del dominio PH para activar a las RhoGTPasas [18].

Existen una amplia variedad de RhoGEFs de la familia Dbl para la activación de RhoGTPasas, hay RhoGEFs específicos para RhoA, Rac1 y Cdc42, y existen RhoGEFs que activan a dos a más RhoGTPasas. Aparte de su actividad GEF, los RhoGEFs funcionan como plataformas de señalización, vinculan las señales provenientes de los receptores de la membrana plasmática con las RhoGTPasas, para modular diversos procesos celulares [22].

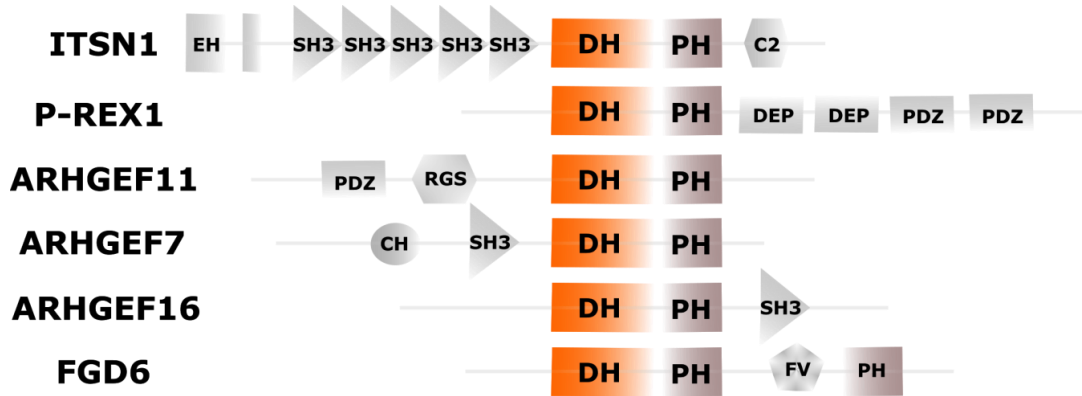
La abundancia de los RhoGEFs es indicativa del control estricto en la regulación de la actividad de las GTPasas. Muchos GEFs se encuentran desregulados en cáncer, por ejemplo, P-REX1 promueve la metástasis en cáncer de próstata y melanoma, LARG se sobreexpresa en leucemia. De esta manera los RhoGEFs pueden ser potenciales blancos terapéuticos para disminuir el crecimiento tumoral y metástasis [22].

### 1.4.1-RhoGEFs específicos para RhoA

Entre los GEFs específicos para RhoA se encuentran los de la familia RGS-RhoGEFs, esta familia está formada por ARHGEF1 (p115-RhoGEF), ARHGEF11 (PDZ-RhoGEF) y ARHGEF12 (LARG), se activan por medio de la proteína  $G\alpha_{12/13}$  [7].

ARHGEF1 participa en la secreción del factor von Willebrand (vWF) en células endoteliales, en células musculares lisas incrementa el tono vascular, produce vasoconstricción e hipertensión, en linfocitos T es importante para su migración en procesos inflamatorios en el pulmón de ratones [91-93].

## Marco Teórico



**Figura 1.4.- Ejemplos de RhoGEFs de la familia Dbl.** Se reportan alrededor de 70 RhoGEFs de la familia Dbl, estos RhoGEFs son proteínas multidomínios que tienen en común el módulo catalítico DHPH. Existen RhoGEFs específicos para una GTPasa como en el caso de ITSN1, FGD6 y ARHGEF16 para Cdc42, P-REX1 para Rac1 y ARHGEF11 para RhoA, y RhoGEFs con afinidad por uno o varias RhoGTPasas como ARHGEF7.

ARHGEF11 es un GEF para RhoA y RhoC, tiene dominios PDZ, RGS, DH y PH. Se activa por trombina a través de GPCRs acoplados a  $G\alpha_{12/13}$ , su actividad GEF incrementa por fosforilación en tirosinas dependientes de FAK e induce la formación de invadopodios [94, 95].

ARHGEF12 (LARG) es un RhoGEF para RhoA, se activa por IGF-1 e interacciona con IGFR-1 para llevar a la formación de fibras de estrés [96]. En cáncer de mama y colorrectal, ARHGEF12 actúa como un supresor tumoral, disminuye la formación de colonias, proliferación e inhibe la migración celular [97].

### 1.4.2-RhoGEFs específicos para Rac1

Entre los GEFs reportados como específicos para Rac1 se encuentran los de la familia de P-REX, formada por P-REX1 y P-REX2. Estos GEFs se activan por la vía PI3K-PIP3 y  $G\beta\gamma$  para promover la activación de Rac1 [98].

P-REX1 participa en la progresión de cáncer de próstata y melanoma, se activa por  $G\beta\gamma$  que se libera por  $G\alpha_i$  e interacciona en los dominios DH y C-terminal de P-REX1. El dominio DEP de P-REX interacciona con mTOR y en los dominios PDZ se presenta interacción con PKA. La cinasa PKA con sus subunidades reguladoras activa a P-REX y la subunidad catalítica fosforila el dominio DEP inactivando a P-REX1 y regulando su localización en membrana plasmática [8, 99-101].

## Marco Teórico

---

P-REX2 tiene dos isoformas, 2a y 2b, se encuentra en músculo esquelético, intestino y cerebro, participa en la migración de células de melanoma al inhibir al supresor tumoral PTEN [98]. P-REX2 lleva a la resistencia a insulina al inhibir en parte a PTEN, lo cual puede llevar a la alteración del síndrome metabólico y producir diabetes tipo 2 [102].

### 1.4.3-RhoGEFs específicos para Cdc42

Entre los RhoGEFs que se reportan específicos para Cdc42 se encuentra la familia de las Intersectinas, formada por ITSN1 e ITSN2, cada una tiene una versión larga (*Long*) con módulo DH-PH y un versión corta (*Short*) sin módulo DHPH [103-105].

Se nombró Intersectina por ser una proteína que contiene dos segmentos separados por una región interna, un segmento lo forman los dominios EH y el otro los dominios SH3 [106]. La ITSN1 participa en diversos procesos celulares como tráfico vesicular, transformación celular, endocitosis, exocitosis, adhesión a sustrato, secreción de metaloproteinasas y formación de filopodios [107, 108].

Es una proteína con diversos dominios, tiene un dominio EH que interacciona con proteínas vesiculares. Tiene 5 dominios SH3 (A-E) que interaccionan con diversas proteínas como Sos1 (GEF para Ras y Rac), N-WASP, WIP y DENND2B (GEF par Rab13) [107-112]. El Tándem DHPH se requiere para la activación de Cdc42 y la liberación de vesículas de la membrana plasmática, se encuentra auto inhibido por la región linker adyacente al dominio DH [113, 114].

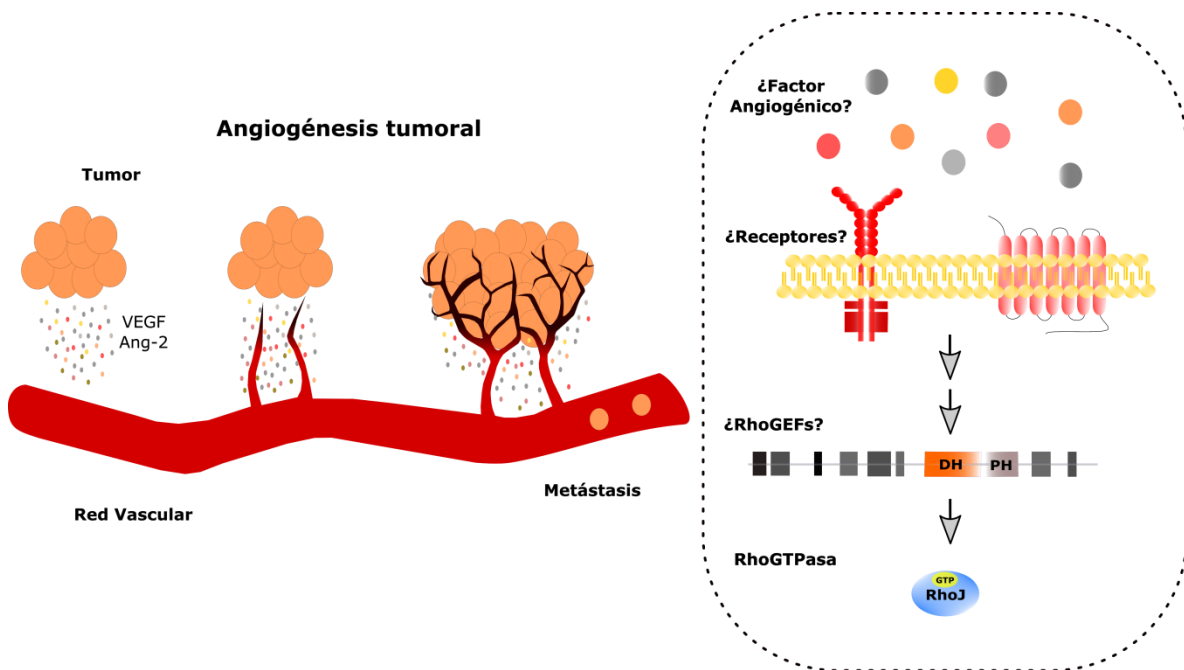
En condiciones patológicas ITSN1 se asocia con neurodegeneración [115], en glioma y cáncer de mama, la expresión de ITSN1 se encuentra disminuida, esto permite la sobrevivencia, proliferación e incrementa el poder invasivo de las células tumorales [116, 117].

En la actualidad no se conocen los RhoGEFs activadores de RhoJ, debido a que RhoJ es un atractivo blanco terapéutico, su RhoGEF activador podría participar en procesos angiogénicos tumorales y convertirse en otro blanco terapéutico para evitar el crecimiento tumoral y metástasis.

## 2.-Justificación

La angiogénesis es un proceso fundamental para el desarrollo, reparación y mantenimiento de tejidos y órganos; sin embargo, en etapas neoplásicas promueve el crecimiento tumoral y metástasis. En esta situación, la angiogénesis puede ser inhibida con fines terapéuticos para evitar el crecimiento tumoral, pero sin afectar los procesos fisiológicos normales.

La angiogénesis tumoral involucra migración de células endoteliales en respuesta a un estímulo para establecer una nueva red vascular alrededor del tumor. La migración es controlada mediante la activación de cascadas de señalización que llevan a la activación de GTPasas de la familia de Rho que coordinan cambios en el citoesqueleto (figura 2.1).



**Figura 2.1.- RhoJ juega un papel importante en la angiogénesis tumoral.** Su expresión en endotelio favorece el crecimiento tumoral y establecimiento de metástasis. A pesar de la importancia de RhoJ, no se conoce su activador ni la cascada de señalización angiogénica en la que participa.

RhoJ es una GTPasa de la familia de Rho, se expresa en células endoteliales y ciertas células tumorales, se encuentra sobreexpresada en endotelio tumoral y favorece la diseminación de metástasis de células que se desprenden de tumores primarios. Estos hallazgos sustentan la idea que RhoJ es un potencial blanco terapéutico para evitar el crecimiento tumoral y la formación de metástasis.

# Justificación

---

Actualmente RhoJ despierta mucho interés y comienzan a dilucidarse aspectos moleculares relacionados con sus efectos a nivel celular. Sin embargo, no se ha reportado el mecanismo de activación de RhoJ. Al ser una GTPasa de la familia de Rho requiere de un GEF que la active, el cual hasta estas fechas no ha sido reportado.

La identificación de un GEF activador de RhoJ y su vinculación con procesos angiogénicos tumorales incrementará el conocimiento sobre mecanismos reguladores de procesos angiogénicos tumorales y la existencia de nuevos blancos terapéuticos para el control de procesos neoplásicos.

## 2.1 Hipótesis

RhoJ es una GTPasa importante en procesos angiogénicos tumorales, su activación depende de RhoGEFs que integran cascadas de señalización en respuesta a estímulos angiogénicos. Los RhoGEFs que activan a RhoJ, vinculan la señalización inicial (reconocimiento de la señal por receptores) con las consecuencias morfológicas y funcionales derivadas de la activación de RhoJ.

## 2.2 Objetivo General

Identificar RhoGEFs que activen a RhoJ, promuevan cambios en el citoesqueleto compatibles con los inducidos por RhoJ y regulen procesos celulares compatibles con fenotipos angiogénicos in vitro.

## 2.3 Objetivos específicos

- Identificar RhoGEFs expresados como construcciones constitutivamente activas EGFP-RhoGEF-DHPH-CAAX capaces de activar a RhoJ.
- Determinar los cambios del citoesqueleto promovidos por DHPH-RhoGEFs activadores de RhoJ.
- Identificar la participación de RhoGEFs activadores de RhoJ en procesos celulares compatibles con fenotipos angiogénicos.

## Estrategia experimental

---

### 3.- Estrategia experimental

La identificación de RhoGEFs que promuevan la activación de RhoJ se realizará utilizando variantes constitutivamente activas de RhoGEFs. Los RhoGEFs de la familia Dbl son proteínas multidomínios que tienen en común el módulo DH-PH, responsable de su actividad catalítica.

La expresión del módulo DH-PH fusionado a la EGFP (*EGFP, Enhanced Green Fluorescent Protein*) y una secuencia de isoprenilación CAAX (*Cistein-alifatic-alifatic-X aminoacid*), llevará a la localización del GEF activo a la membrana plasmática y la activación de una o varias RhoGTPasas para las cuales tenga afinidad.

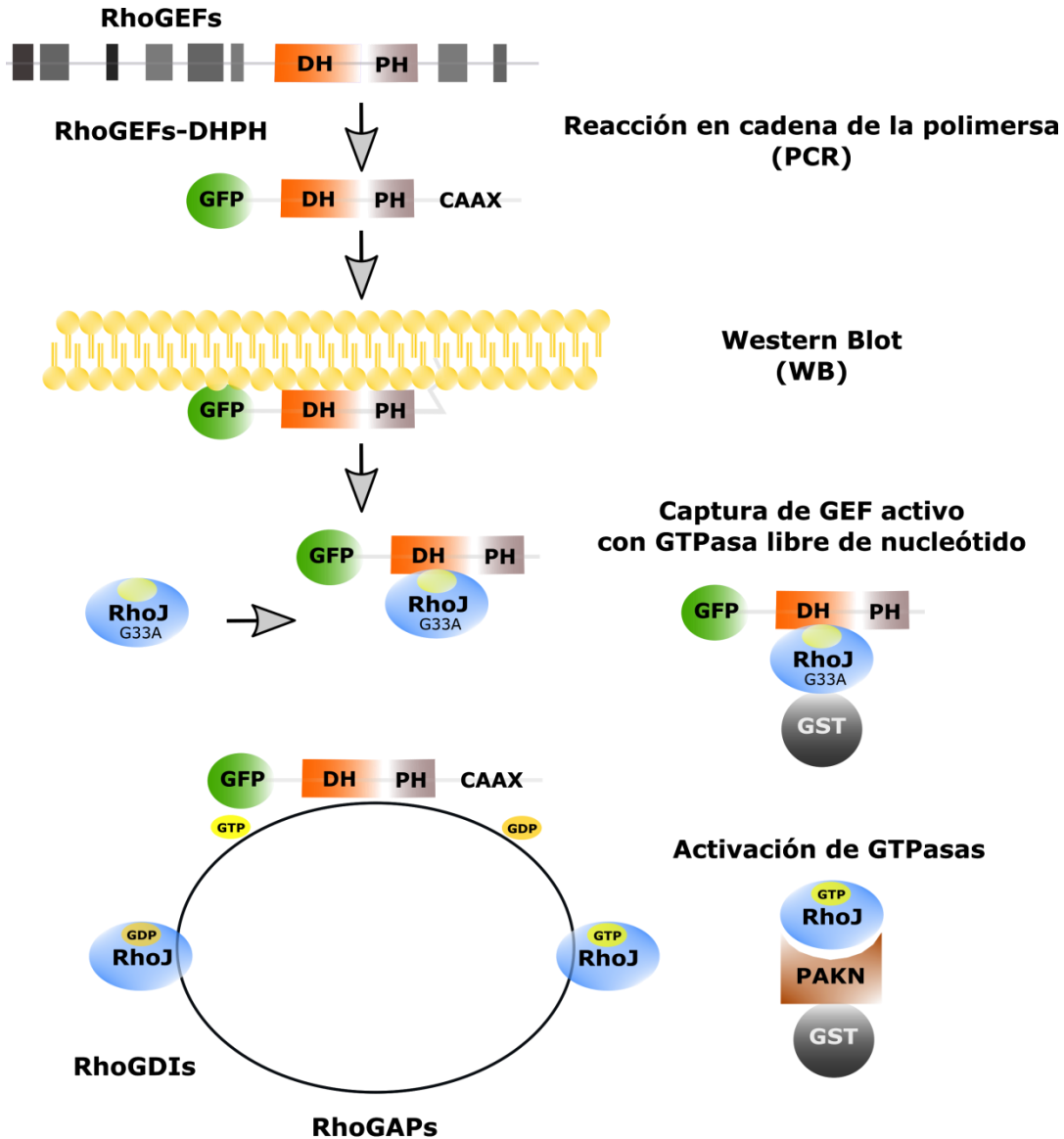
Contamos con una colección de construcciones de RhoGEFs activos, misma que se aumentará mediante preparación de construcciones adicionales. Se amplificará por PCR la secuencia DH-PH de cada RhoGEF elegido y se insertará con enzimas de restricción en el vector pCEFL-EGFP-CAAX para su expresión en células de mamíferos. La identificación del RhoGEF-DHPH se realizará por Western blot al expresar la construcción en células HEK293T, mediante anticuerpo contra GFP y el peso molecular, se determinará la identidad de cada construcción ([figura 3.1](#)).

La selección de los RhoGEFs como candidatos activadores de RhoJ, se realizará mediante captura del RhoGEF-DHPH con RhoJ libre de nucleótido (G33A) en células HEK293T. RhoJ-G33A es una GTPasa que por analogía con las otras GTPasas libres de nucleótido tiene afinidad por su RhoGEF-DHPH en estado activo. Se prepararán perlas de glutation sepharosa conteniendo una construcción de RhoJ-G33A fusionada a GST. Esta se preparará en bacterias y la proteína recombinante será aislada por precipitación con la resina de glutación-sefarosa, misma que atrapa con alta afinidad a la proteína GST. Mediante ensayos de captura, se obtendrán los RhoGEFs-DHPH como posibles activadores de RhoJ por interacción directa.

Los RhoGEFs seleccionados del ensayo de captura con RhoJ-G33A se someterán a ensayos de activación de RhoJ con perlas de PAKN, un efector de RhoJ que tiene dominios CRIB y reconoce a RhoJ unida a GTP. Se prepararán perlas de GST-PAKN de origen bacteriano purificadas mediante coprecipitación con GST ([figura 3.1](#)).

Los ensayos de activación de RhoJ se llevarán a cabo en células HEK293T donde se expresará a RhoJ junto con los RhoGEFs-DHPH y mediante Western Blot con anticuerpo contra RhoJ se determinará la fracción activa.

## Estrategia experimental



**Figura 3.1.- Estrategia experimental:** primera etapa. Se amplificará por PCR el módulo DHPH de cada RhoGEF, se fusionará a la GFP y una secuencia CAAX, la construcción se expresará en células HEK293T. Por ensayos de Interacción con RhoJ-G33A se identificarán DHPH-RhoGEFs como posibles activadores de RhoJ. Por ensayos de activación de GTPasa con PAKN se identificarán DHPH-RhoGEFs activadores de RhoJ.

Hasta este punto se habrán identificado RhoGEFs que en su versión activa promuevan la actividad de RhoJ, para profundizar en sus efectos angiogénicos se seleccionará un DHPH, el cual, se someterá a ensayos que evalúen su participación en una cascada de transducción angiogénica.

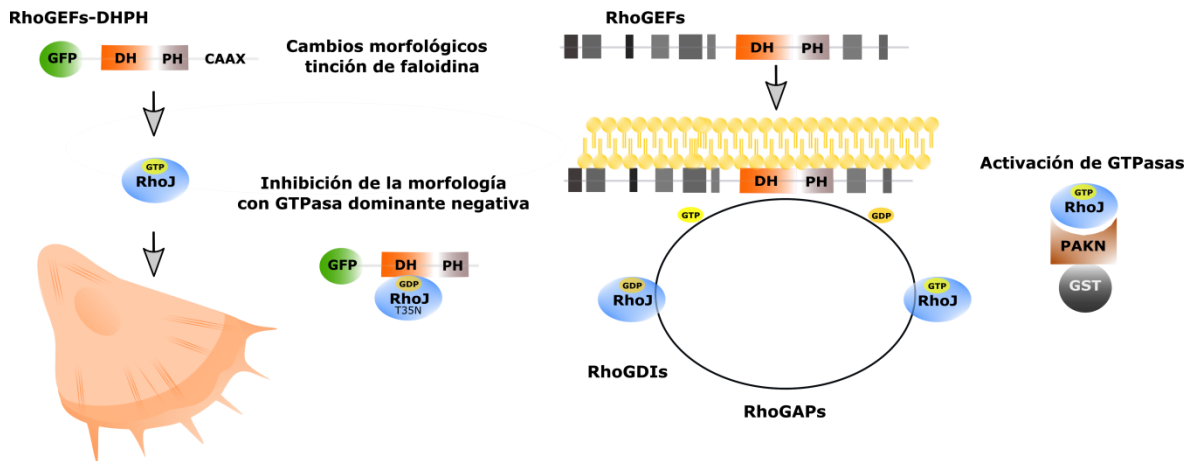
Para la siguiente etapa, se evaluarán los cambios morfológicos asociados a la activación de RhoJ mediante el empleo de variantes constitutivamente activas (RhoJ-Q79L, Cdc42-Q61L,



## Estrategia experimental

Rac1-Q61L y RhoA-Q63L), estas mutantes tienen afectada su actividad GTPasa y permanecen más tiempo unidas a GTP.

Las variantes activas de GTPasas se expresarán en células endoteliales PAE (*Porcine Aortic Endothelial Cells*) y se hará un comparativo entre las estructuras del citoesqueleto formadas por RhoJ-Q79L y las otras GTPasas QL. Esto permitirá establecer un vínculo, por análisis bioinformático y estructuras del citoesqueleto, entre RhoJ y una de las tres GTPasas más estudiadas con la finalidad de seleccionar un RhoGEF-DHPH activador de RhoJ y evaluar su participación en procesos angiogénicos.



**Figura 3.2.- Estrategia experimental:** segunda etapa. El DHPH-RhoGEF deberá producir fenotipos similares a los de RhoJ en estado activo, estas estructuras deberán ser sensibles a la expresión de RhoJ-T35N. Por último se evaluará la capacidad de RhoGEF completo para promover la activación de RhoJ.

Una vez seleccionado el RhoGEF-DHPH, se expresará en células PAE y se observarán los cambios en el citoesqueleto, de manera que correlacionen con los fenotipos asociados a la actividad de RhoJ. Para demostrar que los cambios inducidos por el RhoGEF-DHPH involucran a RhoJ, se utilizará la versión dominante negativa de RhoJ (T35N). Esta mutante mantiene su unión a GDP, por lo cual, bloquea la señalización dependiente de RhoJ (Figura 3.2).

El siguiente paso es determinar la activación de RhoJ por algún estímulo angiogénico y vincular la participación del RhoGEF-DHPH dentro de esa cascada angiogénica. Debido a que los RhoGEFs son proteínas multidomínios cuya actividad puede ser afectada por procesos auto-inhibitorios y modificaciones postraduccionales como fosforilaciones, se buscará alguna modulación de este tipo sobre el RhoGEF activador de RhoJ.

# Material y Métodos

---

## 4.- Material y Métodos

### 4.1.-Reactivos

Solución 1 para preparación de perlas GST. En 99ml de PBS 1X se disuelve 1ml de tritón X-100 y 200 $\mu$ L de EDTA 0,5M. Se adiciona inhibidores de proteasas: Aprotinina 10 $\mu$ g/ml (1 $\mu$ L/ml), Leupeptina 10 $\mu$ g/ml (1 $\mu$ L/ml) y PMSF 100mM (10 $\mu$ L/ml).

Solución 2 para preparación de perlas GST. En 99ml de PBS 1X se disuelve 1ml de tritón X-100. Se adiciona inhibidores de proteasas: Aprotinina 10 $\mu$ g/ml (1 $\mu$ L/ml), Leupeptina 10 $\mu$ g/ml (1 $\mu$ L/ml) y PMSF 100mM (10 $\mu$ L/ml).

Solución 3 para preparación de perlas GST. A 100ml de PBS 1X se adiciona inhibidores de proteasas: Aprotinina 10 $\mu$ g/ml (1 $\mu$ L/ml), Leupeptina 10 $\mu$ g/ml (1 $\mu$ L/ml) y PMSF 100mM (10 $\mu$ L/ml).

Preparación de buffer de lisis. En agua bidestilada se adiciona 5ml de tritón 1%, 25ml de Tris HCL 1M, 5ml de EDTA 0,5M y 30ml de NaCl 2,5M. Se lleva a un volumen de 500ml. Se adiciona MgCl<sub>2</sub> 10mM (10 $\mu$ L/ml). Al buffer de lisis se le adicionan inhibidores de proteasas: Aprotinina 10 $\mu$ g/ml (1 $\mu$ L/ml), Leupeptina 10 $\mu$ g/ml (1 $\mu$ L/ml), Fluoruro de sodio 1mM (1 $\mu$ L/ml), Ortovanadato de sodio 1mM (1 $\mu$ L/ml), PMSF 100mM (10 $\mu$ L/ml),  $\beta$ -glicerol 1mM (10 $\mu$ L/ml) y MgCl<sub>2</sub> 10mM (10 $\mu$ L/ml) según el tipo de ensayo.

Buffer de muestra 4X. Para preparar 24ml de buffer de muestra se requieren: 8ml de SDS 10%, 4ml de glicerol, 2,4 ml de Tris 1M PH 6.8, 5,6ml de agua miliQ, 4ml de  $\beta$ -mercapto-etanol y azul de bromofenol.

Preparación de geles de agarosa.- para la preparación de gel de agarosa 1,5%, 0,6g de agarosa se disuelven en 40ml de TAE 1X, se calienta para disolver la agarosa, se atempera y se adiciona 4 $\mu$ L de Bromuro de Etidio, se vierten en su cámara y se espera a que solidifique. Preparación de buffer TAE. A partir del stock 20X se prepara la solución 1X diluyendo con agua bidestilada.

Preparación de buffer de corrida 1X. Para preparar 1 litro de buffer de corrida se agregan 3g de Trizma Base, 14,5g de Glicina y 1g de SDS en agua bidestilada.

Preparación del buffer de transferencia 1X. Para preparar un litro se agregan 3g de Trizma Base, 14,5g de Glicina y 200 ml de metanol en agua bidestilada.

## Material y Métodos

Preparación de TBS-Tween. Para preparar dos litros de TBS 10X, se agregan 24,22g de Trizma Base y 175,32g de NaCl en agua bidestilada. Para el TBS-Tween, el TBS 10X se diluye con agua bidestilada, para 1litro se ponen 100ml de TBS 10X y se lleva a un litro con agua bidestilada, se añaden 500  $\mu$ L de Tween.

Preparación de rojo de Ponceau. 0,5g de rojo de Ponceau se disuelven en 1ml de ácido acético glacial y se lleva a un volumen de 100ml.

Preparación de PEI 1X. El stock de PEI (Polysciences, 23966) se disuelve en agua bidestilada estéril a 80 °C (10mg/ml), el stock 10X se diluye a 1X con agua bidestilada, se neutraliza con HCL concentrado a un PH de 7,2 y se esteriliza por filtración con filtro de 0,22 $\mu$ m.

Preparación de solución de *stripping*. Para preparar 500ml de solución de *stripping* se agrega 3,75g de glicina, 2,5g de SDS en agua bidestilada y se agrega 5ml de HCl concentrado.

Preparación de VEGF-A. El VEGF-A liofilizado se diluye con una solución de PBS-BSA 0,1% hasta una concentración de 10ng/ml, se esteriliza en filtros de 0,22 $\mu$ m y se guarda a -20 °C.

Preparación de IPTG. El IPTG se diluye con agua bidestilada hasta una concentración 0,2M, se esteriliza en filtros de 0,22  $\mu$ m y se guarda a -20 °C.

### 4.2.-Plásmidos

<b>Tabla 4.2.- Plásmidos utilizados</b>	
pCEFL-EGFP-CAAX	pCEFL-GST-RhoJ-G33A
pCEFL-EGFP-ARHGEF7-DH-PH-CAAX	pCEFL-GST-DH-PH-ITSN1
pCEFL-EGFP-FARP2-DH-PH-CAAX	pCEFL-GST
pCEFL-EGFP-FARP1-DH-PH-CAAX	pGEX-6P1
pCEFL-EGFP-ITSN1-DH-PH-CAAX	pGEX-6P1-RhoJ-WT
pCEFL-EGFP-ITSN2-DH-PH-CAAX	pGEX-6P1-RhoJ-G33A
pCEFL-EGFP-FGD5-DH-PH-CAAX	pGEX-6P1-RhoJ-T35N
pCEFL-EGFP-FGD6-DH-PH-CAAX	pGEX-6P1-Cdc42-G15A
pCEFL-EGFP-P-REX1-DH-PH-CAAX	pGEX-6P1-PAKN
pCEFL-EGFP-TUBA-DH-BAR-CAAX	pGEX-6P1-RHOTEKINA
pCEFL-EGFP-ARHGEF16-DH-CAAX	pIRES-VEGFR2-EGFP
pCEFL-EGFP-ARHGEF11-DH-PH-CAAX	pCDNA3-HA-FAK
pCEFL-EGFP-ARHGEF15-DH-PH-CAAX	pCDNA3-HA-ITSN1
pCEFL-EGFP-AKAP13-DH-PH-CAAX	pWPXL-RhoJ-WT
pCEFL-EGFP-ARHGEF18-DH-PH-CAAX	pCEFL-Au5-Cdc42-Q61L
pCEFL-EGFP-PLEKHG5-DH-PH-CAAX	pCEFL-Au5-Rac1-Q61L

## Material y Métodos

pCEFL-EGFP-ARHGEF12-DH-PH-CAAX	pCEFL-Au1-RhoA-Q63L
pCEFL-EGFP-ARHGEF1-DH-PH-CAAX	pEGFP-Rab5-WT
pCEFL-EGFP-ARHGEF17-DH-PH-CAAX	pEGFP-Rab7-WT
pCEFL-EGFP-ARHGEF5-DH-PH-CAAX	pEGFP-Rab11-WT
pCEFL-EGFP-ARHGEF19-DH-PH-CAAX	pCEFL-EGFP-RhoJ-T35N
pCEFL-EGFP-RhoJ-WT	pCEFL-RhoJ-Q79L
pCEFL-EGFP-Rho-Q79L	pCEFL-mCherry-RhoJ-T35N

### 4.3.-Obtención de construcciones DHPH-RhoGEFs

Para la obtención de las construcciones se diseñan oligos/primers para amplificar por PCR el módulo DHPH de cada RhoGEF, mediante enzimas de restricción se inserta la secuencia del módulo DHPH en el vector pCEFL-EGFP-CAAX, este vector tiene la proteína verde fluorescente (*EGFP, Enhanced Green Fluorescent Protein*) como un indicador de su expresión y una secuencia de isoprenilación CAAX (*Cistein-alifatic-alifatic-X aminoacid*) para su localización en membrana.

En este trabajo se utilizaron construcciones cuya obtención se puede revisar en la tesis de maestría Castillo, A. (2013), además se elaboraron nuevas construcciones DHPH-RhoGEFs y en total se trabajaron con 20 DHPH-RhoGEFs. Para las construcciones nuevas se utilizaron los siguiente primers (sigma):

**Tabla 4.3.1.- Oligonucleótidos utilizados para las construcciones DHPH-RhoGEFs**

RhoGEF	Forward	Reverse
ARHGEF7	BamHI-DH ATAGGATCCGTGCTACAGAATATTTTAGAAACAG	EcoRI-PH ATAGAATTCCTGACCTTCGTTTGCTTCTG
FARP2	NheI-DH ATAGCTAGCATAGTCAAAGAGATTCTCGCT	EcoRI-PH ATAGAATTCGGCTGCTTGGATCGCGGAGTTC
FGD5	BamHI-DH ATAGGATCCATCGCACAGGAAGTCTATCT	EcoRI-PH ATAGAATTCGTCCTCAGGGAGGGCTCTGCTC
FGD6	BglII-DH ATAAGATCTATTGCCAAGGAGATCATGAGC	NheI-PH ATAGCTAGCATACTCTTCTATTGCCCTGGA
TUBA	BamHI-DH ATAGGATCCGTCATAGAAGAAGTCTTTCAG	NheI-BAR ATAGCTAGCCACTTTGAGTAACGAAAGCAGC

Las PCRs se llevan a cabo con los siguientes reactivos: Agua Pura (36  $\mu$ l), Buffer10X (5  $\mu$ l), dNTPs 50X (1  $\mu$ l), primer Forward 1 $\mu$ M(1  $\mu$ l), primer Reverse 1 $\mu$ M(1  $\mu$ l), Dimetilsulfoxido-DMSO 1% (2.5  $\mu$ l), Betaína 1,5M (2.5  $\mu$ l), cDNA (100ng) y Polimerasa Expand High Fidelity PCR Sistem, Roche, Cat. 11732641001, 100U (1  $\mu$ l).

Las condiciones de las PCRs se iniciaron con las estándares, y a partir de ahí se modificaron de acuerdo a las temperaturas de hibridación de cada par de oligos. Las condiciones estándares de PCR fueron las siguientes:

## Material y Métodos

**Tabla 4.3.2.- Condiciones de la PCR**

Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
94	4 minutos	1 ciclo
94	50 segundos	30 ciclos
60	50 segundos	
72	50 segundos	
4	--	

Una vez obtenido el producto de PCR se realiza una prueba diagnóstica en gel de agarosa al 1,5%, conteniendo Bromuro de Etidio, para comprobar la correcta amplificación del módulo DPHH. El producto de PCR se purifica en columnas siguiendo las instrucciones del Kit PCR Purification 250 QIAGEN. El producto de PCR purificado y el vector, se digieren con enzimas de restricción para generar insertos con extremos pegajosos que pueden ser complementarios con los extremos del vector linearizado.

Para la digestión, se utilizan las enzimas de restricción con sus correspondientes buffers (<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11082035001bul.pdf>). Las enzimas utilizadas son de la marca Roche: BamHI, EcoRI, NheI y BgIII, para estas enzimas su buffer de mejor actividad es el buffer A.

Las digestiones se realizan en un volumen final de 30µL, cuyas cantidades son las siguientes: buffer A (3 µL), enzimas (0,5 µL), plásmido (1 µL) y se ajusta al volumen de 30 µL con agua PISA. La mezcla de digestión se incuba a 37°C durante 14 horas.

Los productos de digestión se purifican por columna siguiendo las instrucciones del Kit PCR Purification 250 QIAGEN y se realiza una prueba diagnóstico en gel de agarosa 1,5% (+ Bromuro de Etidio) para verificar la presencia de insertos y vector linearizado.

Se realiza la ligación de los insertos en el vector, para ello se utiliza ligasa T4 DNA Ligase, Roche, Cat. 10481220001, 1U/µL y se deja 12 horas a 17 °C. Las cantidades utilizadas en la ligación son las siguientes: Ligasa T4 (0.5 µl), Buffer de ligasa 10X (1 µl), vector (0.5 µl) e inserto (7.5 µl), el volumen final es 10 µl que se ajusta con agua PISA.

El producto de ligación se transforma en bacterias *E. coli* DH5-alfa ultracompetentes. Las bacterias se mezclan con buffer TB (vial 200µL + 64 µL buffer TB), se toman 50µL para cada condición y se les añade 2µL de cada producto de ligación y se incuban en hielo por 20 minutos. Se realiza un choque térmico de 1 minuto a 47°C y los viales se vuelven a incubar 10 minutos en hielo. Se adiciona 300µL de medio S.O.C (invitrogen, 15544-034) a cada vial y se incuban a 37°C durante 60 minutos.

## Material y Métodos

---

Los viales se centrifugan a 13 000 rpm durante 2,5 minutos a temperatura ambiente, se descarta el sobrenadante y la pastilla de bacterias se resuspende con 50µL de medio LB líquido, la resuspensión de bacterias se siembra en placas de agar LB (conteniendo el antibiótico apropiado) y se dejan crecer por 12 horas a 37 °C. De las colonias formadas, se seleccionan 3 y se crecen en medio LB líquido (conteniendo el antibiótico apropiado) durante 14 horas a 37 °C. Se preparan minipreps, siguiendo el protocolo de minipreps Sigma R1149-100ML.

Las preparaciones de cDNA se cuantifican a una longitud de onda de 280/260 nm y se realiza una digestión diagnóstico con la enzima de restricción XhoI (Roche): buffer H (3 µL), enzima (0,5 µL), plásmido (1 µL) y se ajusta al volumen de 30 µL con agua PISA. La mezcla de digestión se incuba a 37°C durante 14 horas. Mediante un gel de agarosa 1,5%(+Bromuro de Etidio) y el tamaño del cDNA se comprueba que el vector contenga al inserto.

Una vez comprobado los cDNAs de las construcciones DPH-RhoGEFs, se expresan en células HEK293T y se identifica su correcta expresión mediante Western blot (gel acrilamida 10%) con anticuerpo contra EGFP y el peso molecular de cada construcción.

### **4.4.- Obtención de la mutante libre de nucleótido RhoJ-G33A**

La mutante RhoJ-G33A es una mutante libre de nucleótido, indispensable para la captura de DPH-RhoGEFs. Para obtenerla se utilizó el plásmido pGEX-6P1 que tiene la secuencia silvestre de RhoJ, se usa el método de mutación por traslape con los siguientes primers:

RhoJ 5´-3´BamHI (ataGGATCCATGAACTGCAAAGAGGGAACTG).

RhoJ 3´-5´EcoRI (ataGAATTCTCAGATAATTGAACAGCAGCTG).

RhoJ-G33A 5´-3´ (GGTGGGGGACGGTGCCGTGgcgAAAACCTGCCTGCTGATGA).

RhoJ-G33A 3-5´ (TCATCAGCAGGCAGGTTTTcgCACGGCACCGTCCCCCACC).

La mutación por traslape consiste en realizar 3 PCRs. La primera PCR se realiza con los primers RhoJ 5´-3´BamHI y RhoJ-G33A 3-5´para amplificar la región que codifica para los primeros 1-33 aminoácidos, la segunda PCR con los primers RhoJ-G33A 5´-3´ y RhoJ 3´-5´EcoRI para amplificar la región que codifica para los siguientes 33-214 aminoácidos y la tercera PCR se realiza utilizando como templado los fragmentos de las dos PCRs anteriores junto con los primers RhoJ 5´-3´BamHI y RhoJ 3´-5´EcoRI.

## Material y Métodos

Las PCRs se llevaron a cabo con los siguientes reactivos: Agua Pura ( $36 \mu\text{l}$ ), Buffer10X ( $5 \mu\text{l}$ ), dNTPs 50X ( $1 \mu\text{l}$ ), primer 5'-3' ( $1 \mu\text{M}$  ( $1 \mu\text{l}$ )), primer 3'-5' ( $1 \mu\text{M}$  ( $1 \mu\text{l}$ )), DMSO 1% ( $2.5 \mu\text{l}$ ), Betaína 1,5M ( $2.5 \mu\text{l}$ ), cDNA (100ng) y Polimerasa-Turbo ( $1 \mu\text{l}$ ). Las condiciones de la PCRs fueron las siguientes:

Temperaturas °C	Tiempo	Ciclos
98	1 minuto	1 ciclo
98	30 segundos	30 ciclos
60	1 minuto	
68	12 minutos	
4	--	

De los productos de las dos primeras PCRs se realiza una prueba diagnóstica en gel de agarosa 1,5%-Bromuro de Etidio, para verificar la correcta amplificación de los fragmentos esperados. El producto de PCR se purifica por columna siguiendo las instrucciones del Kit PCR Purification 250 QIAGEN. Estos dos fragmentos de PCR purificados se utilizan como templados para la tercera PCR, se realiza con las mismas cantidades y condiciones mencionadas anteriormente.

Del producto de la tercera PCR se realiza una prueba diagnóstico en gel de agarosa 1,5% (+Bromuro de Etidio) y se espera un fragmento cerca de 700pb. Una vez comprobada la tercera PCR se purifica el producto de PCR por columna siguiendo las instrucciones del Kit PCR Purification 250 QIAGEN.

El producto de PCR purificado y el vector pGEX-6P1 se someten a digestión con enzimas de restricción BamH1 y EcoRI. Las digestiones se realizan en un volumen final de  $30 \mu\text{L}$ , cuyas cantidades son las siguientes: buffer A ( $3 \mu\text{L}$ ), enzimas ( $0,5 \mu\text{L}$ ), plásmido ( $1 \mu\text{L}$ ) y se ajusta al volumen de  $30 \mu\text{L}$  con agua PISA. La mezcla de digestión se incuba a  $37^\circ\text{C}$  durante 14 horas.

Los productos de digestión se purifican por columna siguiendo las instrucciones del Kit PCR Purification 250 QIAGEN y se realiza una prueba diagnóstico en gel de agarosa 1,5%-Bromuro de Etidio, para verificar la presencia de insertos y vector linearizado.

Se realiza la ligación de los insertos en el vector, para ello se utiliza ligasa T4 DNA Ligase, Roche, Cat. 10481220001,  $1\text{U}/\mu\text{L}$  y se deja 16 horas a  $17^\circ\text{C}$ . Las cantidades utilizadas en

## Material y Métodos

la ligación son las siguientes: Ligasa T4 (0.5  $\mu$  l), Buffer de ligasa 10X (1  $\mu$  l), vector (0.5  $\mu$  l) e inserto (7.5  $\mu$  l), el volumen final es 10  $\mu$  l que se ajusta con agua PISA.

El producto de ligación se transforma en bacterias *E. coli* ultracompetentes DH5  $\alpha$ , las bacterias se mezclan con buffer TB (vial 200 $\mu$ L + 64  $\mu$ L buffer TB), se toman 50 $\mu$ L para cada condición y se les añade 2 $\mu$ L de cada producto de ligación, se incuban en hielo por 20 minutos. Se realiza un choque térmico de 1 minuto a 47°C y los viales se vuelven a incubar 10 minutos en hielo. Se adiciona 300 $\mu$ L de medio S.O.C (invitrogen, 15544-034) a cada vial y se incuban a 37°C durante 60 minutos.

Los viales se centrifugan a 13 000 rpm durante 2,5 minutos a temperatura ambiente, se descarta el sobrenadante y la pastilla de bacterias se resuspende con 50 $\mu$ L de medio LB líquido. Las bacterias se siembran en placas de agar LB (conteniendo el antibiótico apropiado) y se dejan crecer por 12 horas a 37 °C. De las colonias formadas, se seleccionan 3 y se crecen en medio LB líquido (conteniendo el antibiótico apropiado) durante 14 horas a 37 °C. Se preparan minipreps, siguiendo el protocolo de minipreps Sigma R1149-100ML.

Las preparaciones de cDNA se cuantifican a una longitud de onda de 280/260 nm y se realiza una digestión diagnóstico con la enzima de restricción ApaI (Roche): buffer A (3  $\mu$ L), enzima (0,5  $\mu$ L), plásmido (1  $\mu$ L) y se ajusta al volumen de 30  $\mu$ L con agua PISA. La mezcla de digestión se incuba a 37°C durante 14 horas. Mediante un gel de agarosa 1,5% (+Bromuro de Etidio) y el tamaño del cDNA se comprueba que el vector contenga al inserto.

Una vez obtenido el plásmido con el inserto de la mutante RhoJ-G33A (pGEX-6P1-RhoJ-G33A) se realiza la prueba de secuenciación para comprobar la correcta mutación puntual. Para la secuenciación, se realiza una PCR con los reactivos: BigDye (2  $\mu$  l), cDNA-RhoJ-G33A (0.5  $\mu$  g), Primer 1  $\mu$  l (RhoJ 5'-3'BamHI), Betaína (0.5  $\mu$  l), DMSO (0.5  $\mu$  l) y agua Pisa (1.87  $\mu$  l). Las condiciones de la PCR de secuenciación son las siguientes:

Temperaturas °C	Tiempo	Ciclos
98	10 segundos	25 ciclos
50	50 segundos	
63	4 minutos	
4	--	



## Material y Métodos

---

El producto de la PCR se prepara para la secuenciación de la siguiente manera: el producto de PCR se centrifuga brevemente, se añade 5  $\mu$ L de EDTA 125mM a PH 8 y 20  $\mu$ L de etanol absoluto, se mezclan y se vuelve a centrifugar. Se deja secar el producto 30 minutos a temperatura ambiente, se vuelve a centrifugar y se retira el sobrenadante, se realiza un lavado con 250  $\mu$ L de etanol al 70%, se vuelve a centrifugar y se retira el sobrenadante. Se deja secar 30 minutos a temperatura ambiente y se guarda a 4°C protegido de la luz hasta la secuenciación.

La secuenciación se realizó en el equipo Applied-biosystems-ABI PRISM310 del Departamento de Genética y Biología Molecular, Cinvestav. El análisis de las secuencias se realizó en el programa Bioedit y se comprobó el correcto cambio de aminoácidos G-A, posición 33.

### **4.5.- Subclonación de RhoJ-G33A en pCEFL-GST-RhoJ**

La mutante RhoJ-G33A se obtuvo en el plásmido pGEX-6P1. Esta mutante es necesaria para pruebas de interacción de RhoJ libre de nucleótido, con los distintos DHPH-RhoGEFs. Una forma de realizar estas pruebas de interacción es fusionando RhoJ-G33A a GST, para ello se requiere subclonar a RhoJ-G33A del plásmido pGEX-6P1 al pCEFL-GST.

El plásmido pGEX-6P1-RhoJ-G33A y el vector pCEFL-GST se someten a digestión con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI. Las digestiones se realizan en un volumen final de 30  $\mu$ L, cuyas cantidades son las siguientes: buffer A (3  $\mu$ L), enzimas (0,5  $\mu$ L), plásmido (1  $\mu$ L) y se ajusta al volumen de 30  $\mu$ L con agua PISA. La mezcla de digestión se incubaba a 37°C durante 14 horas.

Los productos de digestión se purifican por columna siguiendo las instrucciones del Kit PCR Purification 250 QIAGEN y se realiza una prueba diagnóstico en gel de agarosa 1,5% (+Bromuro de Etidio) para verificar la presencia de insertos y vector linearizado.

Se realiza la ligación del inserto en el vector, para ello se utiliza ligasa T4 DNA Ligase, Roche, Cat. 10481220001, 1U/  $\mu$  L y se deja 16 horas a 17 °C. Las cantidades utilizadas en la ligación son las siguientes: Ligasa T4 (0.5  $\mu$  l), Buffer de ligasa 10X (1  $\mu$  l), vector (0.5  $\mu$  l) e inserto (7.5  $\mu$  l), el volumen final es 10  $\mu$  l que se ajusta con agua PISA.

El producto de ligación se transforma en bacterias *E. coli* ultracompetentes DH5  $\alpha$ . Las bacterias se mezclan con buffer TB (vial 200  $\mu$ L + 64  $\mu$ L buffer TB), se toman 50  $\mu$ L, se les

## Material y Métodos

---

añade 2 $\mu$ L del producto de ligación y se incuba en hielo por 20 minutos. Se realiza un choque térmico de 1 minuto a 42°C y el vial se vuelve a incubar 10 minutos en hielo. Se adiciona 300 $\mu$ L de medio S.O.C (invitrogen, 15544-034) y se incuba a 37°C durante 60 minutos.

El vial se centrifuga a 13 000 rpm durante 2,5 minutos a temperatura ambiente, se descarta el sobrenadante y la pastilla de bacterias se resuspende con 50 $\mu$ L de medio LB líquido. La resuspensión de bacterias se siembra en placas de agar LB y se dejan crecer por 12 horas a 37 °C. De las colonias formadas, se seleccionan 3 y se crecen en agar LB líquido durante 14 horas a 37 °C. Se preparan minipreps, siguiendo el protocolo de minipreps Sigma R1149-100ML.

Las preparaciones de cDNA se cuantifican a una longitud de onda de 280/260 nm y se realiza una digestión diagnóstica con la enzima de restricción XhoI (Roche): buffer H (3  $\mu$ L), enzima (0,5  $\mu$ L), plásmido (1  $\mu$ L) y se ajusta al volumen de 30  $\mu$ L con agua PISA. La mezcla de digestión se incuba a 37°C durante 14 horas. Mediante un gel de agarosa 1,5%(+Bromuro de Etidio) y el tamaño del cDNA se comprueba que el vector contenga al inserto.

Las clonas que resultaron positivas en la prueba de digestión se transfectan en células HEK293T para comprobar su expresión por Western Blot con anticuerpo anti-GST y peso molecular.

### **4.6.- Obtención de pCEFL-GST-ITSN1-DHPH**

La preparación de pCEFL-GST-DH-PH de ITSN1 se requiere para identificar posibles modificaciones postraduccionales, como fosforilaciones, que puede sufrir el modulo catalítico de ITSN1.

Se realiza la digestión del plásmido pCEFL-EGFP-ITSN1-DHPH-CAAX y el vector pCEFL-GST con las enzimas de restricción NheI y EcoRI. Las digestiones se realizan con las cantidades siguientes: buffer A (3  $\mu$ L), enzimas (0,5  $\mu$ L), plásmido (1  $\mu$ L) y se ajusta al volumen de 30  $\mu$ L con agua PISA. La mezcla de digestión se incuba a 37°C durante 14 horas.

Al producto de la digestión se le realiza una prueba diagnóstica en gel de agarosa 1,5%(+Bromuro de Etidio) para verificar que el módulo DHPH-ITSN1 se liberó del vector.

## Material y Métodos

---

Los productos de digestión se purifican por columna siguiendo las instrucciones del Kit PCR Purification 250 QIAGEN.

Se realiza la ligación del inserto en el vector, para ello se utiliza ligasa T4 DNA Ligase, Roche, Cat. 10481220001, 1U/ $\mu$ L y se deja 16 horas a 17 °C. Las cantidades utilizadas en la ligación son las siguientes: Ligasa T4 (0.5  $\mu$ l), Buffer de ligasa 10X (1  $\mu$ l), vector (0.5  $\mu$ l) e inserto (7.5  $\mu$ l), el volumen final es 10  $\mu$ l que se ajusta con agua PISA.

El producto de ligación se transforma en bacterias *E. coli* ultracompetentes, las bacterias se mezclan con buffer TB (vial 200 $\mu$ L + 64  $\mu$ L buffer TB), se toman 50 $\mu$ L, se les añade 2 $\mu$ L del producto de ligación y se incuba en hielo por 20 minutos. Se realiza un choque térmico de 1 minuto a 42°C y el vial se vuelve a incubar 10 minutos en hielo. Se adiciona 300 $\mu$ L de medio S.O.C (invitrogen, 15544-034) y se incuba a 37°C durante 60 minutos.

El vial se centrifuga a 13 000 rpm durante 2,5 minutos a temperatura ambiente, se descarta el sobrenadante y la pastilla de bacterias se resuspende con 50 $\mu$ L de medio LB líquido. La resuspensión de bacterias se siembra en placas de agar LB y se dejan crecer por 12 horas a 37 °C. De las colonias formadas, se seleccionan 3 y se crecen en medio LB líquido, durante 14 horas a 37 °C. Se preparan minipreps, siguiendo el protocolo de minipreps Sigma R1149-100ML.

Las preparaciones de cDNA se cuantifican a una longitud de onda de 280/260 nm y se realiza una digestión diagnóstica con la enzima de restricción XhoI (Roche): buffer H (3  $\mu$ L), enzima (0,5  $\mu$ L), plásmido (1  $\mu$ L) y se ajusta al volumen de 30  $\mu$ L con agua PISA. La mezcla de digestión se incuba a 37°C durante 14 horas. Mediante un gel de agarosa 1,5%(+Bromuro de Etidio) y el tamaño del cDNA se comprueba que el vector contenga al inserto.

Las clonas que resultaron positivas en la prueba de digestión se transfectan en células HEK293T para comprobar su expresión por Western Blot con anticuerpo anti-GST y peso molecular.

### **4.7.- Preparación de perlas de GST en bacterias *E. coli***

Las proteínas recombinantes fusionadas a GST y aisladas en perlas de Glutación-sefarosa son indispensables en ensayos de coprecipitación. Mediante este procedimiento se preparan

## Material y Métodos

---

y purifican perlas de GST-PAKN y GST-Rhotekina para la captura de GTPasas activas, GST-RhoJ-G33A y GST-Cdc42-G15A para captura de RhoGEFs en estado activo.

Cada cDNA se encuentra en el plásmido pGEX-6P1 y se transforman en bacterias *E. coli* BL21. Estas bacterias se utilizan para la expresión de proteínas inducida por IPTG y carecen de proteasas que puedan degradar la proteína de interés, de manera que se puede enriquecer la expresión de la proteína recombinante deseada. Para transformar los plásmidos en bacterias BL21 se sigue el protocolo descrito anteriormente para bacterias *E. coli* DH5  $\alpha$ .

De las colonias de bacterias BL21 formadas en agar, se pican 4 y cada una se crece en 5ml de medio LB líquido + antibiótico durante toda la noche a 37 °C. Los 5ml se expanden a 250ml con medio LB + antibiótico por 3h horas a 37°C, se adiciona 250 $\mu$ L de IPTG 0,2M y se dejan en agitación toda la noche a 17°C.

La suspensión de bacterias se centrifuga a 5000 rpm/10 min a 4°C, se desecha el sobrenadante y la pastilla de bacterias se resuspende con 10ml de solución 1 (PBS1X-Triton100X, aprotinina 10 $\mu$ g/ml, leupeptina 10 $\mu$ g/ml y PMSF 100mM). La suspensión se traslada a un tubo falcón de 50ml. Se realizan tres ciclos de congelamiento con nitrógeno líquido y descongelamiento con agua tibia de la llave.

El producto bacteriano se somete lisis por sonicación, tres ciclos de 10 segundos con sonicador. Los lisados se centrifugan a 10 000 rpm/30 minutos a 4°C. Se separa el sobrenadante y se incuba con 250 $\mu$ L de sepharosa 4B, se pone en agitación en hielo durante 90 minutos.

Posteriormente se centrifuga a 3000 rpm/5 minutos a 4°C y se retira el sobrenadante sin perder la pastilla. Se resuspende la pastilla con 3ml de la solución 2 (PBS1X-Triton100X-aprotinina 10 $\mu$ g/ml-leupeptina 10 $\mu$ g/ml-PMSF 100mM), se reparte en dos tubos eppendorf de 1,5ml y se centrifuga 5000 rpm/2,5minutos. Se realizan dos lavados con solución 2 y tres lavados con solución 3 (PBS1X-aprotinina 10 $\mu$ g/ml-leupeptina 10 $\mu$ g/ml-PMSF 100mM). Después del último lavado se adiciona 250 $\mu$ L de solución 3 y 250 $\mu$ L de glicerol al 30%, las perlas se almacenan a -20°C hasta su uso.

Para comprobar la purificación de la proteína recombinante, se corre un gel de acrilamida 10% y se tiñe con coomassie. El gel se destiñe con lavados de etanol al 40% y mediante el peso molecular se comprueba la expresión de las proteínas recombinantes.

## Material y Métodos

---

### 4.8.- Ensayo pulldown para captura de RhoGEFs DHPH con GTPasas libres de nucleótido

#### 4.8.1.- Con perlas recombinantes de RhoJ-G33A y Cdc42-G15A preparadas en bacterias

Una vez comprobada la purificación de perlas recombinantes de RhoJ-G33A y Cdc42-G15A, se procede a los ensayos de copresipitación para identificar RhoGEFs DHPH con afinidad por las GTPasa libres de nucleótido.

Células HEK293T (p60) se transfectan con EGFP-RhoGEFs-DHPH utilizando el reactivo PEI 1X y se ayunan 16 horas. Se prepara el buffer de lisis (EDTA 0,5M, NaCl 2,5M, Triton100X, Tris-HCl 1M) con inhibidores de proteasas (aprotinina 10µg/ml, leupeptina 10µg/ml, ortovanadato de sodio 1mM, fluoruro de sodio 1mM, PMSF 100mM y  $\beta$ -Glicerol 1mM).

Se retira el medio de ayuno de las células y se realiza un lavado con PBS 1X (1ml por caja), se retira el PBS y se pone 1ml por caja de buffer de lisis con inhibidores de proteasas, inmediatamente se raspa la superficie de la caja con gendarme, se recupera el sobrenadante y se centrifuga a 13 000 rpm/10 min a 4°C. Se toman 100 µl del sobrenadante y se mezclan con 33 µl de buffer de muestra 4X con mercapto-etanol para los lisados totales (LT).

El resto del lisado se divide en dos partes, una se incuba con perlas de RhoJ-G33A (40 µl/tubo) y la otra con perlas de Cdc42G15A (20 µl/tubo), se llevan a un volumen final de 1 ml y se incuban 60 minutos a 4°C. Posteriormente se centrifugan a 5000 rpm/2,5 min a 4°C, se retira el sobrenadante sin perder la pastilla y se resuspende con 1ml de buffer de lisis con inhibidores de proteasas, se realizan otros dos lavados.

Después del último lavado se retira el sobrenadante y la pastilla se resuspende con 35 µl de buffer de muestra 1X con mercapto-etanol (pulldown, PD). Los lisados totales y el pulldown se hierven en agua 5 minutos y se guardan a -20°C.

Se descongelan las muestras y se hierven 5 minutos en agua, se realiza el Western Blot en gel de acrilamida 10% y se incuba con anticuerpo primario GFP 1:5000, secundario anti-mouse 1:10 000 y se revela en placas fotosensibles con reactivo Millipore. Después de revelar, se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS sin tween y se tiñe con rojo de ponceau para identificar las perlas de RhoJ-G33A y Cdc42G15A.

## Material y Métodos

---

### 4.8.2.- Con sepharosa 4B y GST-RhoJ-G33A en cotransfección

Células HEK293T (p60) se transfectan con el EGFP-RhoGEFs-DHPH y GST-RhoJ-G33A utilizando el reactivo PEI 1X y se ayunan 16 horas. Se prepara el buffer de lisis (EDTA 0.5M, NaCl 2.5M, Triton100X, Tris-HCl 1M) con inhibidores de proteasas (Aprotinina 10µg/ml, leupeptina 10µg/ml, ortovanadato de sodio 1mM, fluoruro de sodio 1mM, PMSF 100mM y  $\beta$ -Glicerol 1mM).

Se retira el medio de ayuno de las células y se realiza un lavado con PBS 1X (1ml por caja), se retira el PBS y se pone 1ml por caja de buffer de lisis con inhibidores de proteasas, inmediatamente se raspa la superficie de la caja con gendarme, se recupera el sobrenadante y se centrifuga a 13 000 rpm/10 min a 4°C. Se toman 100 µl del sobrenadante y se mezclan con 33 µl de buffer de muestra 4X con mercapto-etanol para los lisados totales (LT).

El resto del lisado se incuba con Sepharosa 4B (20 µl/ tubo), 60 minutos a 4 °C. Posteriormente se centrifuga a 5000 rpm/2,5 min a 4°C, se retira el sobrenadante sin perder la pastilla y se resuspende con 1ml de buffer de lisis con inhibidores de proteasas, se realizan otros dos lavados.

Después del último lavado se retira el sobrenadante y la pastilla se resuspende con 35 µl de buffer de muestra 1X con mercapto-etanol (pulldown, PD). Los lisados totales y el pulldown se hierven en agua 5 minutos y se guardan a -20°C.

Se descongelan las muestras y se hierven 5 minutos en agua, se realiza el Western Blot en gel de acrilamida 10% y se incuba con anticuerpo primario GFP 1:5000, secundario anti-mouse 1:10 000 y se revela en placas fotosensibles con reactivo Millipore.

Después de revelar, a esta misma membrana se le realizan 3 lavados de 10 minutos con TBS-T, se bloquea, se reincuba con anticuerpo primario GST 1:1000., y secundario anti-mouse 1:5000. Se vuelve a revelar con reactivo millipore.

### 4.9.- Ensayos de Pulldown para activación de GTPasas por RhoGEFs-DHPH

Con las perlas purificadas de PAKN se puede aislar la fracción activa de RhoJ y Cdc42. PAKN es un dominio efector de estas GTPasas que las reconoce cuando esta unidas a GTP. Células HEK293T (p60) se transfectan con el EGFP-RhoGEF-DHPH y RhoJ-WT utilizando el reactivo PEI 1X y se ayunan 16 horas.

## Material y Métodos

---

Se prepara el buffer de lisis (EDTA 0,5M, NaCl 2,5M, Triton100X, Tris-HCl 1M) con los inhibidores de proteasas (aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 10µg/ml, ortovanadato de sodio 1mM, fluoruro de sodio 1mM, PMSF 100mM y β -Glicerol 1mM) y cloruro de magnesio 10mM.

Se retira el medio de ayuno de las células y se realiza un lavado con PBS 1X (1ml por caja), se retira el PBS y se pone 1ml por caja de buffer de lisis con inhibidores de proteasas y cloruro de magnesio, inmediatamente se raspa la superficie de la caja con gendarme, se recupera el sobrenadante y se centrifuga a 13 000 rpm/10 min a 4°C. Se toman 100 µl del sobrenadante y se mezclan con 33 µl de buffer de muestra 4X con mercapto-etanol para los lisados totales (LT).

El resto del lisado se incuba con perlas de PAKN (20 µl/tubo) y se incuban 60 minutos a 4°C. Posteriormente se centrifugan a 5000 rpm/2,5 min a 4°C, se retira el sobrenadante sin perder la pastilla y se resuspende con 1ml de buffer de lisis con inhibidores de proteasas, se realizan otros dos lavados.

Después del último lavado se retira el sobrenadante y la pastilla se resuspende con 35 µl de buffer de muestra 1X con mercapto-etanol (pulldown, PD). Los lisados totales y el pulldown se hierven en agua 5 minutos y se guardan a -20°C.

Se descongelan las muestras y se hierven 5 minutos en agua, se realiza el Western Blot en gel de acrilamida 12% y se incuba con anticuerpo primario RhoJ 1:2500, secundario anti-mouse 1:5000 y se revela en placas fotosensibles con reactivo Millipore.

Después de revelar, a esta misma membrana se le realizan 3 lavados de 10 minutos con TBS-T, se bloquea y se corta la membrana en dos partes (cortar en el peso de 25 KDa) para reincubar anticuerpos primarios: Cdc42 1:2500, secundario anti-mouse 1:2500, GFP 1:5000, secundario anti-mouse 1:10 000. Se revela en placas fotosensibles con reactivo millipore. Después de revelar, se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS sin tween y se tiñe con rojo de ponceau para identificar las perlas de PAKN.

### **4.10.- Ensayos de Pulldown para activación de GTPasas por Medios Condicionados TumORAles**

Con las perlas purificadas de PAKN se puede aislar la fracción activa de RhoJ y Cdc42, PAKN es un efector de estas GTPasas que las reconoce cuando se unen a GTP. Células

## Material y Métodos

---

PAE (p100) y LAP0297 confluentes se ayunan 16 horas, se retira el medio de las células LAP0297, se centrifuga a 2500 rpm/10 min a temperatura ambiente y se recupera el sobrenadante.

Se retira el medio de las células PAE y se estimulan con los medios condicionados tumorales en los siguientes tiempos: 1, 5, 15, 30 y 60 minutos. Antes de terminar el tiempo de estímulo se prepara el buffer de lisis. La lisis y el pulldown se realizan de manera similar que en la sección 4.9 utilizando 40µL de perlas PAKN. Se realiza el Western Blot en gel de acrilamida 12% y se incuba con anticuerpo primario RhoJ 1:2500, secundario anti-mouse 1:5000 y se revela en placas fotosensibles con reactivo millipore.

Después de revelar, a esta misma membrana se le realizan 3 lavados de 10 minutos con TBS-T, se bloquea y se corta la membrana en dos partes (cortar en el peso de 25 KD) para reincubar anticuerpos primarios: Cdc42 1:2500, secundario anti-mouse 1:2500, pERK 1:5000, secundario anti-rabbit 1:10 000,. Se revela en placas fotosensibles con reactivo millipore.

A la membrana donde se revelo pERK se le realiza un stripping y se reincuba con anticuerpo primario ERK 1:10 000, secundario anti-rabbit 1:10 000. Se revela en placas fotosensibles con reactivo millipore. Después de revelar, se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS sin tween y se tiñe con rojo de ponceau para identificar las perlas de PAKN.

### **4.11.- Ensayos de Pulldown para activación de GTPasas por VEGF-A**

Con las perlas purificadas de PAKN se puede aislar la fracción activa de RhoJ y Cdc42, PAKN es un efector de estas GTPasas que las reconoce cuando esta unidas a GTP. Células HEK293T (p60) se transfectan con VEGFR2 y Rho-WT utilizando el reactivo PEI 1X y se ayunan 16 horas. Se retira el medio de las células y se estimulan con VEGF-A (10ng/ml) en los siguientes tiempos: 1, 5, 15, 30 y 60 minutos. Antes de terminar el tiempo de estímulo se prepara el buffer de lisis.

La lisis y el pulldown se realizan de manera similar que en la sección 4.9. Se realiza el Western Blot en gel de acrilamida 12% y se incuba con anticuerpo primario RhoJ 1:2500, secundario anti-mouse 1:5000 y se revela en placas fotosensibles con reactivo millipore.

Después de revelar se bloquea la membrana y se corta en dos partes (cortar en el peso de 25KDa) para reincubar anticuerpos primarios: Cdc42 1:2500, secundario anti-mouse



## Material y Métodos

---

1:2500, pERK 1:5000, secundario rabbit 1:10 000. Se revela en placas fotosensibles con reactivo millipore.

Después de revelar, se realizan 3 lavados de 10 minutos con TBS-T y se realiza stripping sobre la membrana donde se revelo pERK. Se reincuba con anticuerpo primario ERK 1:10 000, secundario rabbit 1:10 000 y se revela en placas fotosensibles con reactivo millipore. Después de revelar, se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS sin tween y se tiñe con rojo de ponceau para identificar las perlas de PAKN.

### **4.12.- Ensayo de pulldown para la captura de GTPasas-QL**

Con las perlas purificadas de PAKN se pueden aislar las fracciones activas de RhoJ, Cdc42 y Rac1, para RhoA se requieren perlas de Rhotekina. Células HEK293T (p60) se transfectaron con RhoJ-Q79L, Cdc42-Q61L, Rac1Q61L, RhoA-Q63L y RhoJ-WT utilizando el reactivo PEI 1X y se ayunaron 16 horas.

La lisis y el pulldown se realizan de manera similar que en la sección 4.9. Se realiza el Western Blot en gel de acrilamida 12% y se incuba con anticuerpo primario RhoJ 1:5000,, secundario anti-mouse 1:5000 y se revela en placas fotosensibles con reactivo Millipore. Después de revelar se realizan 3 lavados de 10 minutos con TBS-T, se le realiza stripping se bloquea y se reincuba con anticuerpo primario Cdc42 1:2500, secundario anti-mouse 1:2500.

Se revela en placas fotosensibles con reactivo de millipore y después de revelar se vuelve hacer stripping, se bloquea con leche y se reincuba con anticuerpo primario Rac1 1:10 000, secundario anti-mouse 1:5000 y se revela en placas fotosensibles con reactivo millipore. Se tiñen la membrana con rojo de ponceau para identificar las perlas de PAKN.

### **4.13.- Ensayo de pulldown para captura de Mutantes de RhoJ**

Células PAE (p60) se transfectan con GFP-RhoJ-WT, GFP-RhoJ-Q79L y GFP-RhoJ-T35N utilizando el reactivo Turbofect y se ayunan 18 horas. La lisis y el pulldown se realizan de manera similar que en la sección 4.9.

Se realiza el Western Blot en gel de acrilamida 10% y se incuba con anticuerpo primario GFP 1:5000, secundario anti-mouse 1:10 000 y se revela en placas fotosensibles con reactivo Millipore. Después de revelar, se realizan 3 lavados de 5 minutos y se tiñe con rojo de ponceau para identificar las perlas de PAKN.

## Material y Métodos

---

### **4.14.- Ensayo de pulldown para activación de RhoJ por ITSNs-DHPH**

Células HEK293T (p60) se transfectan con GFP-ITSN1-DHPH, GFP-ITSN2-DHPH y RhoJ-WT utilizando el reactivo PEI 1X y se ayunan 18 horas. La lisis y el pulldown se realizan de manera similar que en la sección 4.9. Se realiza el Western Blot en gel de acrilamida 12% y se incuba con anticuerpo primario RhoJ 1:2500, secundario anti-mouse 1:5000 y se revela en placas fotosensibles con reactivo Millipore.

Después de revelar la membrana se corta en dos partes (cortar en el peso de 25 KDa) para reincubar anticuerpos primarios: Cdc42 1:2500, secundario anti-mouse 1:2500 y GFP 1:5000, secundario 1:10 000 y se revele en placas fotosensibles con reactivo de millipore. Después de revelar, se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS sin tween y se tiñe con rojo de ponceau para identificar las perlas de PAKN.

### **4.15.- Ensayo de pulldown para evaluar el efecto de RhoJ-T35N como un potencial inhibidor de la activación de RhoJ**

Células HEK293T (p60) se transfectan con GFP-ITSN1-DHPH, GFP-ITSN1-DHPH con RhoJ-T35N y RhoJ-WT utilizando el reactivo PEI 1X y se ayunan 18 horas. La lisis y el pulldown se realizan de manera similar que en la sección 4.9. Se realiza el Western Blot en gel de acrilamida 12% y se incuba con anticuerpo primario RhoJ 1:2500, secundario anti-mouse 1:5000 y se revela en placas fotosensibles con reactivo millipore.

La membrana se corta en dos partes (cortar en el peso de 25 KDa) y se reincuba con anticuerpos primarios: Cdc42 1:2500, secundario anti-mouse 1:2500 y GFP 1:5000, secundario 1:10 000 y se revele en placas fotosensibles con reactivo de millipore. Después de revelar, se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS sin tween y se tiñe con rojo de ponceau para identificar las perlas de PAKN.

### **4.16.- Ensayo de pulldown para evaluar el potencial efecto inhibitorio de FAK sobre la activación de RhoJ dependiente del ITSN1-DHPH**

Células HEK293T (p60) se transfectan con RhoJ-WT, GFP-ITSN1-DHPH y GFP-ITSN-DHPH con HA-FAK utilizando el reactivo PEI 1X y se ayunan 18 horas. La lisis y el pulldown se realizan de manera similar que en la sección 4.9. Se realiza el Western Blot en gel bifásico de acrilamida 8/12%, se transfiere a PVDF a 330 mAmp/230min.

La membrana se corta en tres partes (cortar en los pesos de 25 y 100 KDa) y se incuba con anticuerpos primario RhoJ 1:2500, secundario anti-mouse 1,5000, GFP 1:5000, secundario anti-mouse 1:5000 y HA 1:2500, secundario anti-mouse 1:5000. Se revela con reactivo de

## Material y Métodos

---

millipore. Después de revelar, se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS sin tween y se tiñe con rojo de ponceau para identificar las perlas de PAKN.

### **4.17.- Ensayo de pulldown para activación de RhoJ por ITSN1 completa**

Células HEK293T (p60) se transfectan con HA-ITSN1 y RhoJ-WT utilizando el reactivo PEI 1X y se ayunan 18 horas. La lisis y el pulldown se realizan de manera similar que en la sección 4.9. Se realiza el Western Blot en un gel bifásico de acrilamida 6/12%, se transfiere a PVDF a 330 mA/230min.

Se corta la membrana en dos partes (cortar en el peso de 50 KDa) y se incuban con anticuerpos primarios: RhoJ 1:2500, secundario anti-mouse 1:5000 y HA 1:2500, secundario anti-mouse 1:5000 y se revela en placas fotosensibles con reactivo Millipore. A la membrana donde se reveló RhoJ, se reincuba con anticuerpo primario: Cdc42 1:2500, secundario anti-mouse 1:2500. Se revela en placas fotosensibles con reactivo millipore. Después de revelar, se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS sin tween y se tiñe con rojo de ponceau para identificar las perlas de PAKN.

### **4.18.- Ensayo de pulldown para el efecto inhibitorio de FAK sobre la activación de RhoJ dependiente de ITSN1 completa**

Células HEK293T (p60) se transfectan con RhoJ-WT, HA-ITSN1 y HA-ITSN1 con HA-FAK utilizando el reactivo PEI 1X y se ayunan 18 horas. La lisis y el pulldown se realizan de manera similar que en la sección 4.9. Se realiza el Western Blot en gel bifásico de acrilamida 6/12% y se transfiere a PVDF a 330 mA/230min.

Se corta la membrana en dos partes (cortar en el peso 50 KDa) y se incuban con anticuerpos primarios: RhoJ 1:2500, secundario anti-mouse 1:5000, HA 1:2500, secundario anti-mouse 1:5000 y se revela en placas fotosensibles con reactivo Millipore. Después de revelar, se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS sin tween y se tiñe con rojo de ponceau para identificar las perlas de PAKN.

## Material y Métodos

---

### **4.19.- Ensayo de pulldown para captura de ITSNs-DHPH con GTPasas libres de nucleótido**

#### **4.19.1.- Con perlas recombinantes de RhoJ-G33A y Cdc42-G15A preparadas en bacterias**

Células HEK293T (p60) se transfectan con GFP-ITSN1-DHPH y GFP-ITSN2-DHPH utilizando el reactivo PEI 1X y se ayunan 16 horas. La lisis y el pulldown se realizan de manera similar que en la sección 4.8.1.

Se realiza el Western Blot en gel de acrilamida 10%, se incuban con anticuerpo primario GFP 1:5000, secundario anti-mouse 1:10 000, se revela en placas fotosensibles con reactivo de millipore. Después de revelar, se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS sin tween y se tiñe con rojo de ponceau para identificar las perlas de RhoJ-G33A y Cdc42-G15A.

#### **4.19.2.- Con sepharosa 4B y GST-RhoJ-G33A en cotransfección**

Células HEK293T (p60) se transfectan con GST-RhoJ-G33A, GFP-ITSN1-DHPH y GFP-ITSN2-DHPH utilizando el reactivo PEI 1X y se ayunan 16 horas. La lisis y el pulldown se realizan de manera similar que en la sección 4.8.2.

Se realiza el Western Blot en gel de acrilamida 10%, se incuban con anticuerpo primario GFP 1:5000, secundario anti-mouse 1:10 000, se revela en placas fotosensibles con reactivo de millipore. Después de revelar se realizan tres lavados con TBS-T, se bloquea con leche y se reincuba con anticuerpo primario GST 1:10 000, secundario anti-mouse 1:5000. Se revela en placas fotosensibles con reactivo de millipore.

### **4.20.- Ensayo de pulldown para el efecto inhibitorio de FAK en la captura de ITSN1-DHPH con RhoJ libre de nucleótido**

#### **4.20.1.- Con perlas recombinantes de RhoJ-G33A y Cdc42-G15A preparadas en bacterias**

Células HEK293T (p60) se transfectan con GFP-ITSN1-DHPH y GFP-ITSN1-DHPH con HA-FAK utilizando el reactivo PEI 1X y se ayunan 16 horas. La lisis y el pulldown se realizan de manera similar que en la sección 4.8.1.

Se realiza el Western Blot en gel bifásico de acrilamida 8/10%, se transfiere a PVDF a 330mAmp/230 minutos. Se corta la membrana para incubar con anticuerpos primarios: GFP

## Material y Métodos

---

1:5000, secundario anti-mouse 1:10 000, HA 1:2500, secundario anti-mouse 1:5000. Se revela en placas fotosensibles con reactivo de millipore. Después de revelar, se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS sin tween y se tiñe con rojo de ponceau para identificar las perlas de RhoJ-G33A y Cdc42-G15A.

### **4.20.2.- Con sepharosa 4B y GST-RhoJ-G33A en cotransfección**

Células HEK293T (p60) se transfectan con GST-RhoJ-G33A, GFP-DHPH-ITSN1 y GFP-DHPH-ITSN1 con HA-FAK utilizando el reactivo PEI 1X y se ayunan 16 horas. La lisis y pulldown se realizan de manera similar que la sección 4.8.2.

Se realiza el Western Blot en gel bifásico de acrilamida 8/10%, se transfiere a PVDF a 330mAmp/230min. Se corta la membrana en dos partes (se corta en el peso de 100 KDa) y se incuban con anticuerpos primarios: GFP 1:5000, secundario anti-mouse 1:10 000, HA 1:2500, secundario anti-mouse 1:5000 y se revela en placas fotosensibles con reactivo de millipore.

A la membrana donde se revelo GFP se le realizan 3 lavados de 10 minutos con TBS-T, se bloquea y se reincuba con anticuerpo primario GST 1:10 000, secundario anti-mouse 1:5000, se revela en placas fotosensibles con reactivo de millipore.

### **4.21.- Ensayo de pulldown para identificar fosforilaciones en ITSN1-DHPH**

Para identificar modificaciones postraduccionales como fosforilaciones, se requiere la construcción GST-ITSN1-DHPH. Células HEK293T (p60) se transfectaron con GST-ITSN1-DHPH en ausencia y presencia de la cinasa de adhesiones focales (HA-FAK) con el reactivo PEI 1X y se ayunaron durante 16 horas. La lisis y el pulldown se realizan de manera similar que en la sección 4.8.2.

Se realiza el Western Blot en gel de acrilamida 8%, se transfiere a PVDF a 330 Amp/220 min. Se incuba con anticuerpo primario fosfotirosinas (pY) 1:5000, secundario anti-mouse 1:10 000 y se revela en placas fotosensibles con reactivo millipore. Después de revelar, se realizan 3 lavados de 10 minutos con TBS-T y se realiza stripping sobre toda la membrana, se bloquea, se corta la membrana en dos partes (cortar en el peso de 100KDa) y reincubar con anticuerpos primarios: GST 1:10 000, secundario anti-mouse 1:5000, HA 1:2500, secundario anti-mouse 1:5000. Se revela en placas fotosensibles con reactivo millipore.

## Material y Métodos

### 4.22.-Western Blot

Se prepara un gel de acrilamida, el porcentaje depende del tamaño de las proteínas, se descongela el pulldown (PD) y listados totales (LT) a temperatura ambiente, ambos se hierven en agua 5 minutos y se centrifugan a 14 000 rpm/5 minutos. Se carga 4  $\mu$ l de marcador de peso molecular precisión plus, del PD se carga todo y del LT se cargan 40  $\mu$ l en el gel de acrilamida. Se corre a 20mAmp y se transfiere a PVDF a 330 mAmp/180min.

La membrana de PVDF se bloquea 60 minutos con leche 5%/TBS-T, se retira el exceso de leche con 3 lavados de 5 minutos de TBS-T y se incuba con anticuerpo primario toda la noche a 4 °C. Se retira el anticuerpo primario, se lava la membrana varias veces y luego se pone el anticuerpo secundario en leche 5%/TBS-T durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se retira el anticuerpo secundario y se realizan 3 lavados de 10 minutos de TBS-T para quitar el exceso de anticuerpo secundario.

Se procede a revelar, se moja la membrana PVDF con la mezcla de sustrato y luminol (1:1) y se expone sobre placas fotosensibles. Después de revelar, se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS sin tween y se tiñe con rojo de ponceau o se deja secar la membrana.

Secundarios	
Anti-mouse	KPL cat-074-1802
Anti-rabbit	KPL cat-074-1516
Primarios	
RhoJ	Abcam-ab57584 y Santa Cruz Biotechnmology-SC-81936
Cdc42	Santa Cruz Biotechnology (sc-8401)
Rac1	BD Transduction laboratories (610651)
pERK	Cell Sinaling Technology (9191)
ERK	Santa Cruz Biotechnology (sc-154)
GFP	Santa Cruz Biotechnology (B-2, sc-9996)
GST	Santa Cruz Biotechnology (B-14, sc-138)
HA	Sigma (H-3663)
pY	Santa Cruz Biotechnology SC-7020

## Material y Métodos

**Tabla 4.22.2.- Peso en KiloDaltones de proteínas utilizadas en el Western Blot**

Proteínas	Peso KDa	Proteína	Peso KDa
RhoJ	24	GFP-FGD5-DHPH	60
Cdc42	22	GFP-FGD6-DHPH	60
Rac1	20	GFP-FARPI-DHPH	55
GFP-RhoJ-WT	50	GFP-FAPR2-DHPH	50
GFP-RhoJ-T35N	50	GFP-ITSN1-DHPH	70
GFP-RhoJ-Q79L	50	GFP-ITSN2-DHPH	72
mCherry-RhoJ-T35N	50	GFP-ARHGEF15-DHPH	60
GST-RhoJ-G33A	50	GFP-ARHGEF16-DHPH	71
GFP-CAAX	27	GFP-AKAP13-DHPH	70
GFP	25	GFP-ARHGEF18-DHPH	69
GST	25	GFP-PLEKHG5-DHPH	75
HA-FAK	120	GFP-ARHGEF12-DHPH	68
HA-ITSN1	200	GFP-ARHGEF11-DHPH	67
GST-ITSN1-DHPH	70	GFP-ARHGEF1-DHPH	60
pERK	37	GFP-TUBA-DHBAR	65
ERK	37	GFP-ARHGEF7-DHPH	60
GST-PAKN(perlas)	37	GFP-P-REX1-DHPH	70
GST-RhoJ-G33A (perlas)	50	GFP-ARHGEF17-DHPH	70
GST-Cdc42-G15A (perlas)	40	GFP-ARHGEF5-DHPH	68
GST-RhoJ-T35N (perlas)	50	GFP-ARHGEF19-DHPH	70

### 4.23.-Stripping

Después de revelar, se realizan 3 lavados de 10 minutos con TBS-T y se realiza stripping. Para realizar el stripping se hierve agua y se pone sobre la membrana un minuto en agitación, se retira el agua y se pone la solución de stripping 30 minutos bajo agitación, se retira la solución de stripping y se realiza un lavado de 5 minutos con TBS-T.

Se bloquea la membrana 60 minutos con leche 5%/TBS-T, se retira el exceso de leche con 3 lavados de 5 minutos de TBS-T y se reincuba anticuerpos primarios.

### 4.24.- Preparación de cajas con poli-D-lisina

A cada caja P60 se añade 2ml de poli-D-lisina 1X, se distribuye uniformemente sobre la superficie hasta cubrirla completamente, se deja reposar 15 minutos en campana. Pasado el tiempo se retira y se realiza un lavado con 2ml/caja de PBS1X estéril, se retira el PBS y se agrega 2ml de medio completo (DMEM+SFB+Antibiotico).

## Material y Métodos

---

### **4.25.- Tripsinización de células HEK293T, PAE y LAP0297**

Un Stock P100 de células confluentes, se retira el medio y se realiza un lavado con 5ml de PBS1X estéril, se retira el PBS y se agrega 1 ml de tripsina que se distribuye sobre la superficie de las células y se deja reposar en incubadora 5 minutos para células HEK293T, 10 minutos para células PAE y LAP0297.

Al terminar el tiempo, se agrega 7ml de DMEM completo a las células con tripsina, se resuspende las células de manera que se despeguen las adheridas al plástico. De esta suspensión se añade 1ml/caja a las cajas tratadas con poli-D-lisina (p60) y se dejan en incubadora toda la noche.

### **4.26.- Transfección de células HEK293T p60 con PEI-1X**

Se etiqueta un tubo eppendorf de 600  $\mu$ L y se les agrega 250 $\mu$ L de medio DMEM ayuno, se añade el cDNA correspondiente. En otro tubo se pone medio DMEM de ayuno 250  $\mu$ L. El PEI 1X (3 $\mu$ L por 1 $\mu$ g de cDNA) se calienta 2min a 70°C, se añade al medio DMEM, se mezcla y se pone 250 $\mu$ L al tubo que contiene DMEM y cDNA. Se mezclan y se dejan reposar 15 minutos en campana, se preparan las células para agregarles la mezcla de transfección.

Se retira el medio de las células, se realiza un lavado con 2ml/caja de PBS1X, se retira el PBS y se añade 2,5ml por caja de medio DMEM ayuno. La mezcla de transfección se añade a las células y se deja 12 horas en la incubadora. Terminado el tiempo de incubación, se retira el medio con la mezcla de transfección y se adiciona medio DMEM completo, se dejan en la incubadora hasta la hora del ayuno.

### **4.27.- Transfección de células PAE p35 con turbofect**

Se etiqueta un tubo eppendorf de 600  $\mu$ l y se agregan 200  $\mu$ l de DMEM ayuno, se adiciona 2  $\mu$ l de turbofect (Thermo Fisher, R0531) y el cDNA correspondiente. Se mezclan y se deja reposar 15 minutos en campana. Se retira el medio de las células y se realiza un lavado con 1ml PBS 1X, se retira el PBS y se añade 1,5ml de DMEM completo.

La mezcla de transfección se añade a las células y se deja 12 horas en la incubadora. Terminado el tiempo de incubación, se retira el medio con la mezcla de transfección y se adiciona medio DMEM completo, se dejan en incubadora hasta la hora del ayuno.



## Material y Métodos

---

### **4.28.- Ayuno de células HEK293T**

Se revisa que las células se encuentren sanas y verdes en el caso de transfectar la GFP. Para ayunar las células, se retira el medio y se realizan 3 lavados con 2ml de PBS1X/caja, después del último lavado se añade 2,5ml/caja de DMEM ayuno y se dejan en incubadora por 16 horas.

### **4.29.- Ayuno de células PAE**

Para células transfectadas, se revisa el estado de las células, sanas y verdes para el caso de ser transfectadas con GFP. Para ayunar las células se retira el medio y se realizan 3 lavados con 2ml de PBS1X/caja (para p100 se utilizan 3ml de PBS1X), después del último lavado se añade 2ml/caja p35, 2,5ml/caja p60 o 7ml/caja p100 de DMEM ayuno y se dejan en incubadora por 16 horas.

### **4.30.- Ayuno de células LAP0297 para obtención de medios condicionados**

Se revisa que las células LAP0297 (p100) se encuentren sanas con una confluencia superior al 80%, se retira el medio y se realizan 3 lavados con 5 ml de PBS1X. Después del último lavado se añade 12ml de DMEM ayuno y se deja en incubadora mínimo 16 horas. Se recupera el medio de las células, se centrifuga a 2500 rpm/10 minutos a temperatura ambiente, se traslada a otro tubo y se preparan las células para ser estimuladas o se congela el medio condicionado a -70°C.

### **4.31.- Fluorescencias y tinción con faloidina**

Cubreobjetos estériles se colocan sobre el fondo de cajas p35 y se adiciona gelatina 0,02% (2ml por condición) y se deja reposar en campana durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se retira la gelatina, se realizan dos lavados con PBS 1X estéril para retirar el exceso de gelatina y se pone 2 ml de medio DMEM completo a cada condición.

Se prepara la suspensión de células PAE provenientes de una caja p100 semiconfluente (se diluye 1/10 con medio DMEM completo, y se coloca 1ml de la dilución en cada condición). Se dejan en incubadora por 12 horas, se revisan y se transfectan con turbofect con los plásmidos correspondientes (pCEFL-EGFP, pCEFL-EGFP-CAAX, pCEFL-EGFP-RhoJ-Q79L, pCEFL-mCherry-RhoJ-T35N, pCEFL-EGFP-ITSN1-DHPH-CAAX, pCEFL-EGFP-ITSN2-DHPH-CAAX).

Se ayunan las células 16 horas, se retira el medio, se realizan 3 lavados con PBS 1X, se adiciona 0,5ml de paraformaldehído 4% por condición y se deja reposar en campana

## Material y Métodos

---

durante 15 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz. Se retira el paraformaldehído y se realizan 3 lavados con PBS 1X para quitar el exceso de paraformaldehído.

Las células fijadas se permeabilizan con Tritón/PBS 0.5% durante 10 minutos, se retira el Tritón y se realizan 3 lavados con PBS, se incuban 10 minutos con BSA/PBS al 2%, se retira el BSA y se realizan 2 lavados con PBS, se prepara la faloidina sobre un parafilm (1 gota de faloidina sobre el parafilm) y se coloca el cubreobjetos sobre la faloidina, se deja incubar 20 minutos en ausencia de luz.

Terminado el tiempo se regresa el cubreobjetos a la caja p35 y se realizan 2 lavados, después del último lavado se deja secar exceso de PBS. Sobre los portaobjetos se coloca la solución de montaje (7 $\mu$ l por condición), sobre la solución de montaje se pone el cubreobjetos seco y se deja protegido de la luz a 4°C por 24 horas.

Las células se observaron en el microscopio NIKON con un aumento de resolución de 60X con aceite de inmersión, las células se contaron manualmente y se realizaron 3 experimentos independientes donde se contaron aproximadamente 45 células por condición en cada ensayo. Para la cuantificación de células con filopodios, se contó manualmente cada prolongación en la célula y se tomó como regla que tuviera más de 9 extensiones para ser considerada positiva.

### **5.- Estadística**

Para cuantificar los resultados de los Western blots, se utilizó el programa ImageJ para obtener las densitometrías. El análisis estadístico y las gráficas se realizaron en el programa SigmaPlot-11.0. Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de mínimo tres experimentos independientes. Se consideró una significancia estadística mínima de  $p < 0.05$ .

Para el análisis estadístico de las imágenes de fluorescencias, se obtuvieron 45 fotos por condición, el análisis estadístico y las gráficas se realizaron en el programa SigmaPlot-11.0. Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes. Se consideró una significancia estadísticas mínima de  $p < 0.05$ .

Los análisis estadísticos utilizados fueron ANOVA una vía-Tukey y T-Student.

## 6.- Resultados

### **6.1- Identificación de RhoGEFs-DHPH como posibles activadores de RhoJ por interacción con RhoJ-G33A recombinante en perlas de glutatión-sepharosa**

Como se mencionó en la estrategia experimental, para identificar RhoGEFs que promuevan la activación de RhoJ, se realizaron construcciones RhoGEFs-DHPH y se evaluaron mediante ensayos de interacción por afinidad con RhoJ libre de nucleótido (RhoJ-G33A).

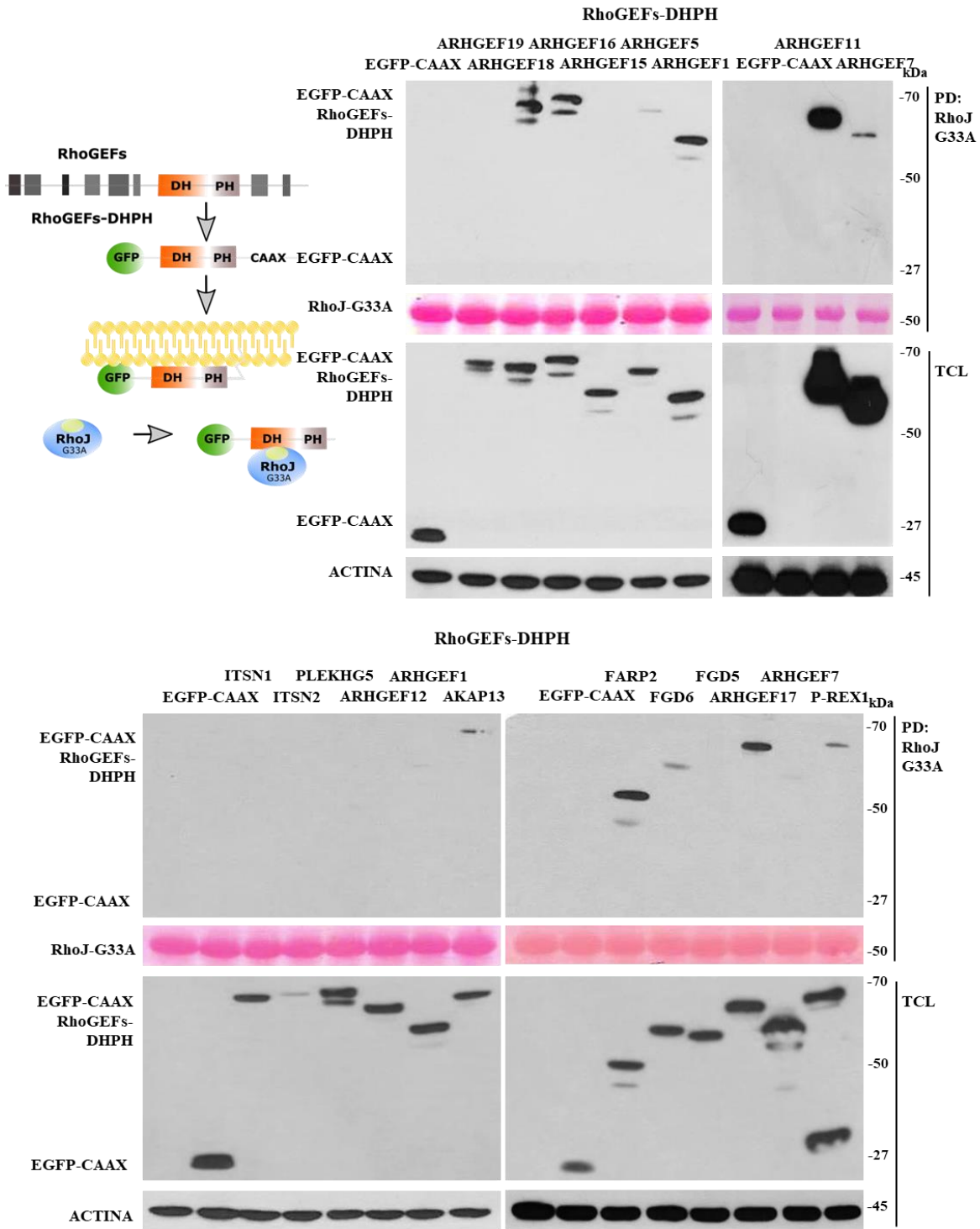
La mutante RhoJ-G33A es una mutante libre de nucleótido que por homología con otras GTPasas libres de nucleótido, permite identificar RhoGEFs-DHPH con afinidad por RhoJ, de manera que los RhoGEFs-DHPH que interaccionen con RhoJ-G33A, tendrán una mayor posibilidad de activar a RhoJ mediante un mecanismo directo.

Se han reportado 65 RhoGEFs en la base de datos SMART, se agrupan en 4 ramas de acuerdo al alineamiento de su secuencia del dominio DH [105]. De la rama 1A se cuenta con las construcciones de FGD5, FGD6, FARP1 y FARP2, de la rama 1B se cuenta con ARHGEF17, de la rama 2A se cuenta con ITSN1, ITSN2, ARHGEF5, ARHGEF15, ARHGEF16, ARHGEF19, AKAP13, ARHGEF18, PLEKHG5, ARHGEF12, ARHGEF11, ARHGEF1, de la Rama 2B se cuenta con TUBA, ARHGEF7 y P-REX1.

En total se evaluaron 20 construcciones RhoGEFs-DHPH que corresponden a GEFs específicos para Cdc42 como: ITSN1, ITSN2, ARHGEF16, TUBA, FGD5 y FGD6, GEFs específicos para Rac1 como: P-REX1, FARP1 y FARP2, GEFs específicos para RhoA como: ARHGEF1, ARHGEF11, ARHGEF12, AKAP13, ARHGEF18 y ARHGEF17. Los GEFs restantes se han reportado con afinidad para dos o más GTPasas.

Células HEK293T se transfectaron con los RhoGEFs-DHPH, se lisaron y se obtuvieron los sobrenadantes para mezclarse con las perlas de GST-RhoJ-G33A recombinante. De los RhoGEFs-DHPH evaluados, el ARHGEF11 presenta la máxima interacción con RhoJ-G33A, en segundo lugar se encuentran los GEFs: FARP1, FARP2, ARHGEF17, ARHGEF16, ARHGEF18 y ARHGEF1, con una ligera interacción se encuentran los GEFs: FGD6, ARHGEF5, AKAP13, ARHGEF7 y P-REX1, GEFs de los cuales no se detectó interacción son: ITSN1, ITSN2, FGD5, ARHGEF15, ARHGEF19, PLEKHG5 y ARHGEF12 (Figura 6.1.1).

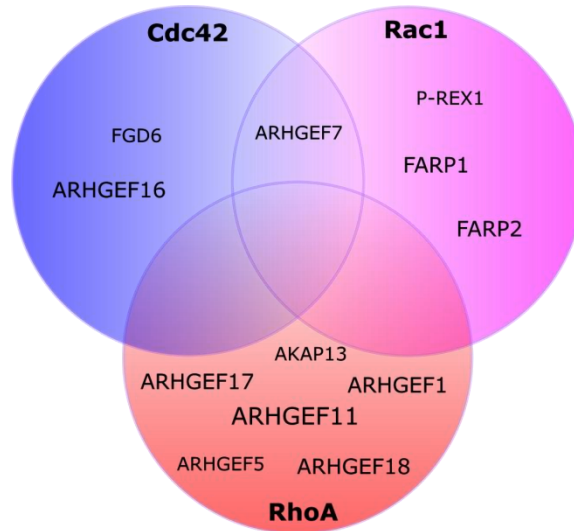
# Resultados



**Figura 6.1.1- Tamizaje de interacción RhoGEFs-DHPH con RhoJ-G33A.** Se evaluaron 20 RhoGEFs-DHPH y se encontró interacción con ARHGEF18, ARHGEF16, ARHGEF5, ARHGEF11, ARHGEF1, ARHGEF7, AKAP13, FARP2, FGD6, ARHGEF17 y P-REX1. FARP1 es un GEF que se evaluó después de los tamizajes y se detectó interacción con RhoJ-G33A.

## Resultados

De este análisis se obtuvieron datos interesantes; el ARHGEF11, ARHGEF17, ARHGEF18, y ARHGEF1 que tienen afinidad por RhoJ-G33A son GEFs reportados específicos para RhoA, los FARP presentan interacción y se han reportado con mayor especificidad por Rac1. El ARHGEF16 y FGD6 son GEFs considerados específicos para Cdc42, ITSN1 es un GEF que en su versión DHPH se identificó como activador de RhoJ, tesis de maestría Color-Aparicio VM (2015), sin embargo, en los tamizajes de interacción no se detectó afinidad por RhoJ.



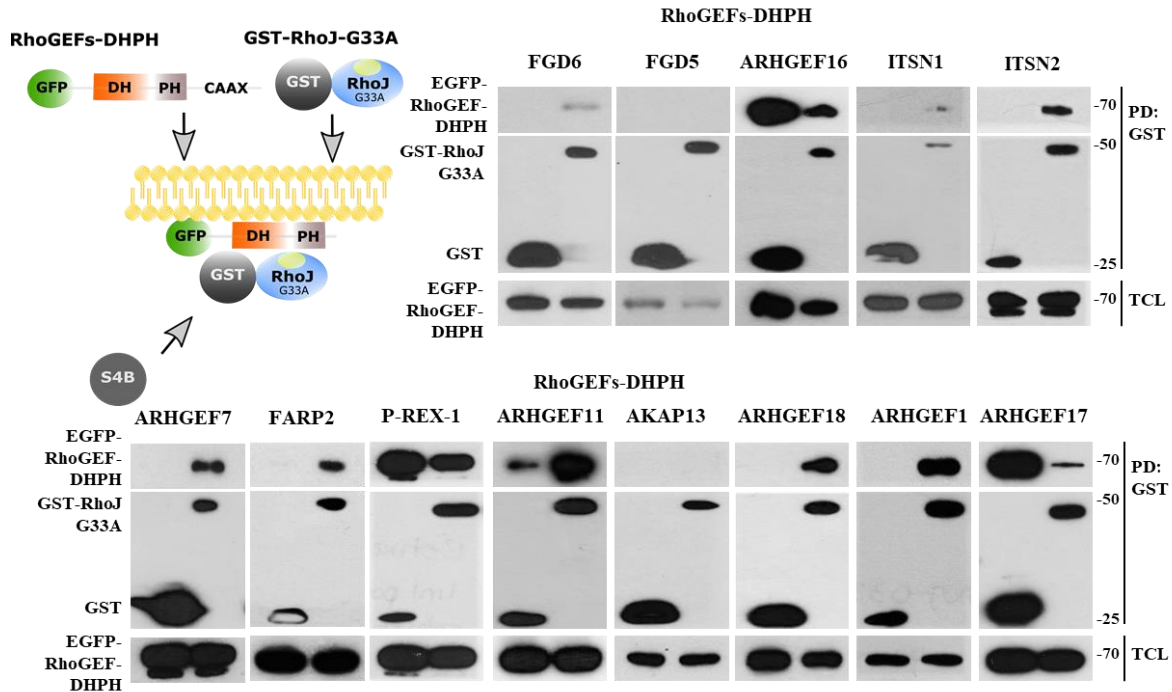
**Figura 6.1.2- Resumen del tamizaje de interacción.** Se encontraron 13 RhoGEFs-DHPH que tienen afinidad por RhoJ-G33A. Existen GEFs específicos para Cdc42 como ARHGEF16 y FGD6, específicos para Rac1 como P-REX-1, FARP1 y FARP2 y GEFs específicos para RhoA como ARHGEF11, ARHGEF17, ARHGEF1, AKAP13, ARHGEF5 y ARHGEF18.

De los 20 RhoGEFs-DHPH se encontró que 12 tienen afinidad por RhoJ-G33A, la mayoría de estos GEFs pertenecen al grupo de GEFs para RhoA (Figura 6.1.2).

### 6.2- Identificación de RhoGEFs-DHPH como posibles activadores de RhoJ por interacción con RhoJ-G33A en un sistema de cotransfección

Como resultado de los tamizajes de interacción se identificaron 12 RhoGEFs-DHPH que tienen afinidad por RhoJ-G33A. Para confirmar estos resultados, se realizaron ensayos de interacción mediante el sistema de cotransfección, en dicho sistema el RhoGEF-DHPH se transfecta junto con GST-RhoJ-G33A y se obtiene el complejo por coprecipitación con glutatión-sepharosa 4B (Figura 6.2.1).

## Resultados



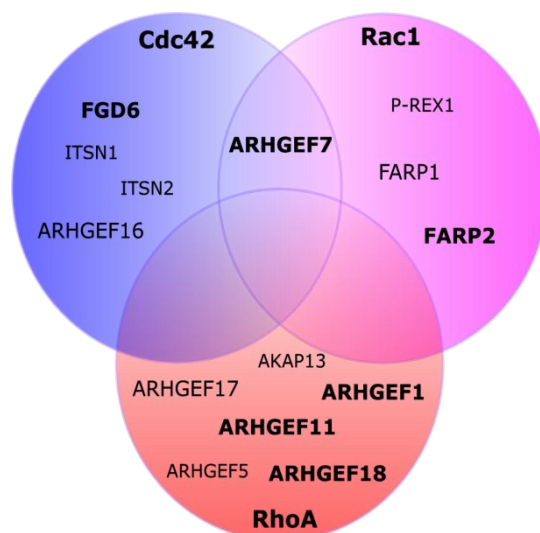
**Figura 6.2.1- Ensayos de interacción RhoGEFs-DHPH con RhoJ-G33A en el sistema de cotransfección.** Los RhoGEFs-DHPH FGD6, ARHGEF7, FARP2, ARHGEF11, ARHGEF18 y ARHGEF1 tienen interacción con RhoJ-G33A. Las ITSNs, GEFs específicos para Cdc42, presentan interacción con RhoJ-G33A.

Resultado de los ensayos de interacción por cotransfección se comprobó que FGD6, ARHGEF7, FARP2, ARHGEF11, ARHGEF18 y ARHGEF1 mantienen la afinidad por RhoJ-G33A. Los RhoGEFs FGD5, ARHGEF16, P-REX1, AKAP13 y ARHGEF17 no presentan interacción y tienen pegado inespecífico bajo las mismas condiciones en que se trataron los otros GEFs. Los GEFs FARP1 y ARHGEF5 no se probaron en estas condiciones de cotransfección.

Un resultado interesante fue que se detecta interacción con las ITSNs, GEFs específicos para Cdc42. El DHPH de ITSN1 es un activador de RhoJ y hasta la fecha el único que se conoce (datos de nuestro laboratorio). Esto nos hace suponer que existe afinidad entre ITSNs-DHPH y RhoJ, pero es sensible a las condiciones en que se realizaron los tamizajes.

Como resultado de los tamizajes de interacción se identificaron 6 posibles RhoGEFs-DHPH como candidatos activadores de RhoJ. Estos son los DHPH de FGD6, ARHGEF7, FARP2, ARHGEF1, ARHGEF11 y ARHGEF18. Estos 6 RhoGEFs-DHPH se someten a ensayos de activación para verificar que promuevan la activación de RhoJ (Figura 6.2.2).

## Resultados



**Figura 6.2.2.- Resumen de los ensayos de interacción. Se identifican 6 RhoGEFs-DHPH como candidatos activadores de RhoJ.** Los GEFs identificados son FGD6, ARHGEF7, FARP2, ARHGEF1, ARHGEF11 y ARHGEF18. Sin embargo no se pueden descartar los GEFs: ITSN1, ITSN2, ARHGEF16, P-REX1, FARP1, AKAP13, ARHGEF17 y ARHGEF5 debido a que tienen afinidad por RhoJ.

**6.3.- RhoGEFs-DHPH activadores de RhoJ por un mecanismo directo**  
De las 20 construcciones RhoGEFs-DHPH, se identificaron 12 con afinidad por RhoJ y se confirmaron 6 como posibles activadores de RhoJ. Para corroborar que estos GEFs pueden activar a RhoJ se realizaron ensayos de activación de RhoJ mediante captura de GTPasa activa con PAKN (Figura 6.3.1).

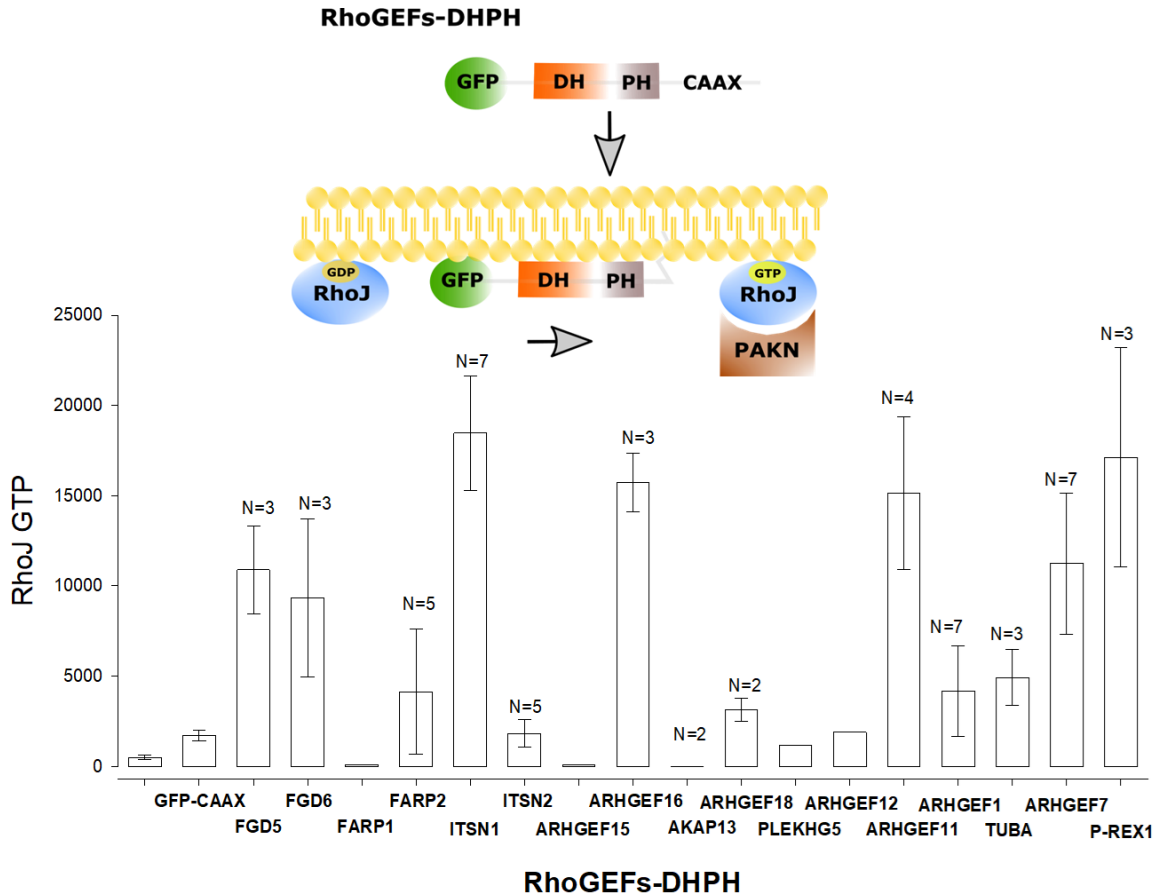
Células HEK293T se transfectaron con los RhoGEFs-DHPH y RhoJ-WT, se obtuvieron los lisados y se mezclaron con perlas purificadas de PAKN para obtener la fracción activa de RhoJ.

De los 6 RhoGEFs-DHPH que resultaron como mayores candidatos, el ARHGEF11 promueve la mayor activación de RhoJ; FGD6 y ARHGEF7 promueven una moderada activación de RhoJ; FARP2, ARHGEF18 y ARHGEF1 no promueven la activación.

Se evaluaron otros GEFs como FGD5, este GEF no presenta afinidad por RhoJ en ensayos de interacción pero promueve una moderada activación de RhoJ. ITSN1 presenta afinidad por RhoJ en el sistema de cotransfección y es el máximo activador de RhoJ de todos los DHPH evaluados. El ARHGEF16 y P-REX1 tiene afinidad por perlas recombinantes de RhoJ y promueve su activación.



## Resultados

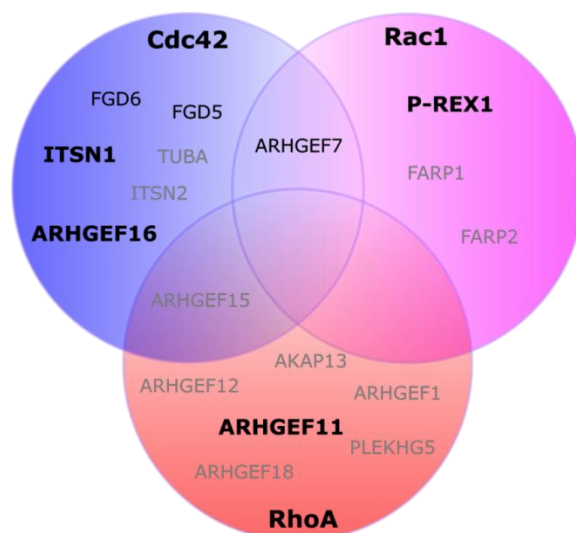


**Figura 6.3.1.- RhoGEFs-DHPH activadores de RhoJ.** El DHPH de ITSN1 es el que promueve la mayor activación de RhoJ, seguido de ARHGEF16, ARHGEF11 y P-REX1. Con moderada activación se encuentran los GEFs FGD5, FGD6 y ARHGEF7, GEFs que no activan a RhoJ son FARP1, FARP2, ITSN2, ARHGEF15, AKAP13, ARHGEF18, PLEKHG5, ARHGEF12, ARHGEF1 y TUBA.

Los GEFs FARP1, ITSN2 y AKAP13 que tienen cierta afinidad por RhoJ no promueven su activación. Los GEFs ARHGEF15, ARHGEF12, PLEKHG5 y TUBA no tienen afinidad por RhoJ en los tamizajes de interacción y no promueven su actividad.

El análisis de los resultados de interacción y activación de RhoJ por RhoGEFs-DHPH, identifica a 7 GEFs que promueven la activación de RhoJ. Estos GEFs pertenecen a RhoGEFs de la familia de RhoA, Cdc42 y Rac1. De la familia de RhoA se encontró el mayor número de RhoGEFs-DHPH, 6 tienen afinidad por RhoJ, sin embargo, solo el ARHGEF11 promueve la activación de RhoJ (Figura 6.3.2).

## Resultados



**Figura 6.3.2.- Resumen de los ensayos de activación de RhoJ por RhoGEFs-DHPH.** Entre los GEFs que promueven la activación de RhoJ por interacción directa se encuentran principalmente ITSN1, ARHGEF16, ARHGEF11 y P-REX1. Entre los RhoGEFs-DHPH que promueven una moderada activación de RhoJ se encuentran FGD6 y ARHGEF7. FGD5 promueve la activación de RhoJ por un mecanismo indirecto. Los GEFs que no activan a RhoJ son: TUBA, ITSN2, FARP1, FARP2, ARHGEF15, AKAP13, ARHGEF12, ARHGEF1, ARHGEF18 y PLEKHG5.

De la familia de Rac1 se encontraron 3 RhoGEFs-DHPH con afinidad por RhoJ, pero solo P-REX1 lleva a la activación de RhoJ. De la familia de Cdc42, 4 RhoGEFs-DHPH tienen afinidad por RhoJ y 3 de ellos promueven su actividad, entre ellos se encuentra ITSN1 que es el DHPH que promueve la máxima activación de RhoJ. FGD5 es un GEF que aunque no se detectó interacción con perlas de RhoJ, sí promueve su actividad (Figura 6.3.2).

Con esta estrategia experimental, se identificaron RhoGEFs-DHPH activadores de RhoJ entre los que se encuentran ITSN1, ARHGEF16, ARHGEF11 y P-REX1. De estos resultados se puede concluir que aunque el RhoGEF-DHPH tenga afinidad por RhoJ, no necesariamente promueve su actividad. Un concepto interesante, debido a que actualmente se consideran a muchos GEFs como plataformas moleculares que integran diversas vías de señalización.

Hasta este punto se concluye la primera etapa de la estrategia experimental que consistió en identificar RhoGEFs-DHPH activadores de RhoJ. Para la segunda etapa se procede a seleccionar un RhoGEF-DHPH y caracterizar su participación en procesos angiogénicos a través de la activación de RhoJ.

## Resultados

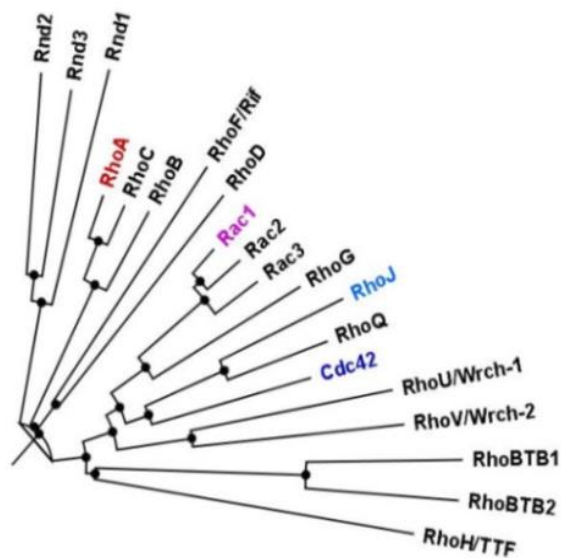
### 6.4.-Elección del RhoGEF-DHPH para su caracterización en procesos angiogénicos

Se identificaron 7 RhoGEFs-DHPH que promueven la activación de RhoJ (Figura 6.3.2), de estos el FGD5 lo hace a través de un mecanismo indirecto, por lo cual, se descarta debido a que se buscan activadores de RhoJ por un mecanismo directo. El ARHGEF16 es un GEF que no se expresa en células endoteliales [105], debido a que los efectos de RhoJ en angiogénesis ocurren en células endoteliales, este GEF se descarta.

Los RhoGEFs-DHPH FGD6 y ARHGEF7 promueven una activación moderada de RhoJ, mientras que ITSN1, P-REX1 y ARHGEF11 son los máximos activadores. ITSN1 es un GEF específico para Cdc42, P-REX1 es un GEF para Rac1 y ARHGEF11 es un GEF para RhoA. Para seleccionar uno de estos tres RhoGEFs-DHPH, se analizó el parecido en secuencia y cambios en el citoesqueleto derivados de la activación de RhoJ y estas tres RhoGTPasa.

### 6.5.- Comparación de los cambios morfológicos inducidos por Cdc42, Rac1, RhoA y RhoJ

Como se tiene un RhoGEF específico para Cdc42, uno para Rac1 y uno para RhoA, se pensó que si los cambios en el citoesqueleto inducidos por RhoJ, se parecen a los inducidos por alguna de estas tres RhoGTPasas, se podría establecer un vínculo con el GEF de esa GTPasa.



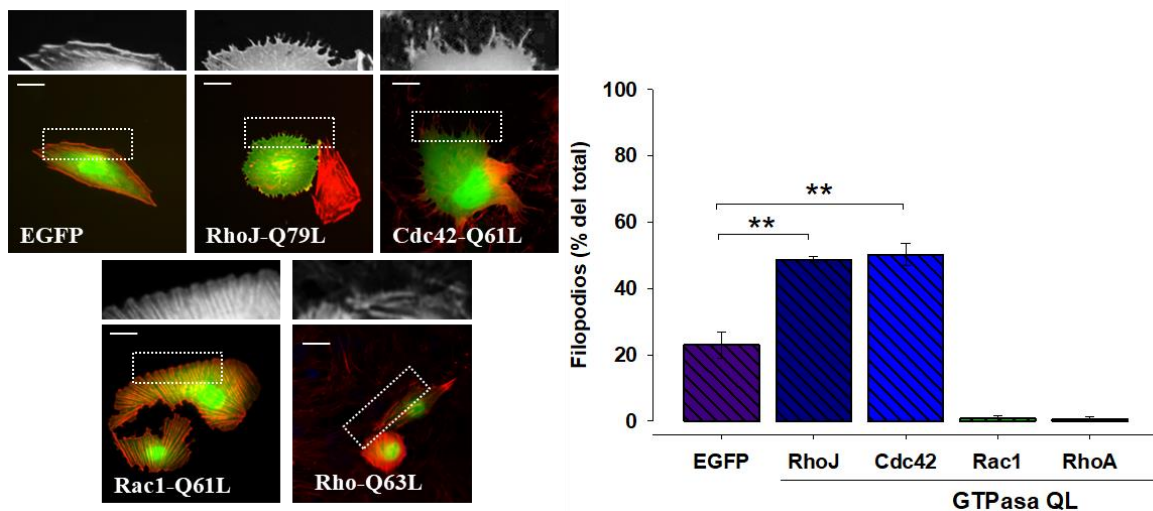
**Figura 6.5.1.- Árbol filogenético de las RhoGTPasa.** Las RhoGTPasas se clasifican en 8 familias: Rnd, RhoA, RhoD, Rac, Cdc42, RhoU, RhoBTB y RhoH. RhoJ pertenece a la familia de Cdc42.

## Resultados

En primera instancia se realizó un análisis de secuencia de RhoJ, Cdc42, Rac1 y RhoA. El comparativo de la secuencia de RhoJ con Cdc42 es de 54,6%, con Rac1 es de 47,6% y con RhoA de 47,7% (*BioEdit Sequence Alignment Editor*). Como indica su alineamiento, RhoJ se parece más en secuencia a Cdc42 y en menor porcentaje a Rac1 y RhoA.

Al crear un árbol filogenético, las 20 RhoGTPasas se pueden agrupar en 8 familias: Rnd, RhoA, RhoD, Rac1, Cdc42, RhoU, RhoBTB y RhoH. RhoJ pertenece a la familia de Cdc42 (*Figura 6.5.1*). Para comprobar el parecido en secuencia, se analizó la morfología asociada a la expresión de GTPasas en estado activo. Se utilizaron mutantes QL (sustitución de Glutamina por Leucina) que afecta la actividad GTPasa, de manera que no pueden hidrolizar GTP y permanecen por más tiempo en estado activo.

Células PAE (*Porcine Aorta Endothelial*) se transfectaron con las mutantes RhoJ-Q79L, Cdc42-Q61L, Rac1-Q61L y RhoA-Q63L, para identificar las células transfectadas y observar su morfología se cotransfectó la proteína verde fluorescente (GFP) y se realizaron tinciones con faloidina. Las tinciones se observaron en el microscopio NIKON con un aumento 60X en aceite de inmersión. Como se esperaba, la expresión de Cdc42-Q61L induce la formación de estructuras tipo filopodios, Rac1-Q61L conduce a la formación de lamelas y ruffles, RhoA promueve la formación de fibras de estrés. La expresión de RhoJ-Q79L induce la formación de estructuras tipo filopodios, similar a Cdc42 (*Figura 6.5.2*).



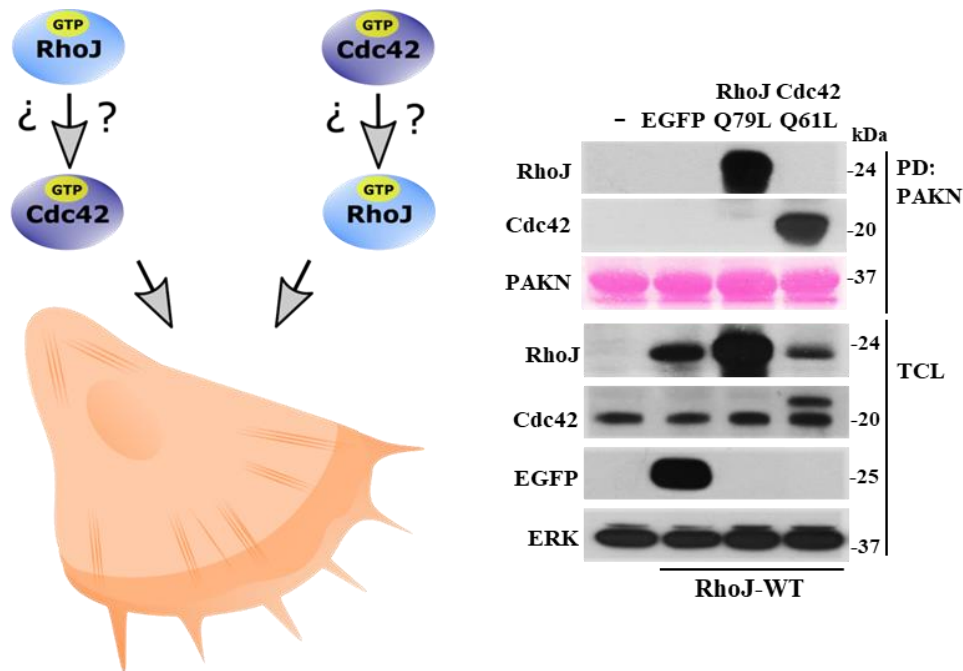
**Figura 6.5.2. RhoJ induce la formación de filopodios en células endoteliales.** La expresión de RhoJ-Q79L en células PAE induce la formación de estructuras tipo filopodios de manera similar que Cdc42-Q61L, Rac1-Q61L promueve la formación de lamelas y ruffles, RhoA-Q63L lleva a la formación de fibras de estrés. ANOVA una vía, Tukey,  $**P < 0,01$ .  $N=3$ , barra=  $20\mu\text{m}$ . recuadro: incremento digital.

## Resultados

Los filopodios se definen como prolongaciones de la membrana plasmática, su función es censar el microambiente para la motilidad de la célula. Para hacer un comparativo entre los filopodios formados por Cdc42 y RhoJ, se estableció que solo las células que tuvieran más de 9 prolongaciones se consideran positivas a filopodios. RhoJ y Cdc42 inducen la formación de filopodios de manera similar, aproximadamente 50% de las células que expresaron RhoJ o Cdc42 presentan filopodios (Figura 6.5.2).

Cdc42 se considera prototipo en la formación de filopodios, para determinar si los filopodios formados por RhoJ se producen por un efecto en cascada con Cdc42 o viceversa, células HEK293T se transfectaron con RhoJ-Q79L, Cdc42-Q61L y RhoJ-WT y se buscó la activación en cascada de estas GTPasas por interacción con PAKN.

RhoJ-Q79L se captura con PAKN pero no se detecta que promueva la activación de Cdc42, por otro lado, Cdc42-Q61L se captura con PAKN pero no se observa que induzca la activación de RhoJ. Esto indica que RhoJ conduce a la formación de filopodios por un mecanismo que no requiere de la actividad de Cdc42, y Cdc42 promueve la formación de filopodios de manera que no requiere la actividad de RhoJ (Figura 6.5.3).



**Figura 6.5.3.- RhoJ y Cdc42 llevan a la formación de filopodios por mecanismos independientes.** La expresión de RhoJ-Q79L en células HEK293T no promueve la activación de Cdc42, la expresión de Cdc42-Q61L no induce la activación de RhoJ, esto descarta un efecto en cascada entre estas RhoGTPasas. Con esto se confirma que RhoJ y Cdc42 son GTPasas que inducen la formación de filopodios de manera independiente entre ellas. *N=3*

## Resultados

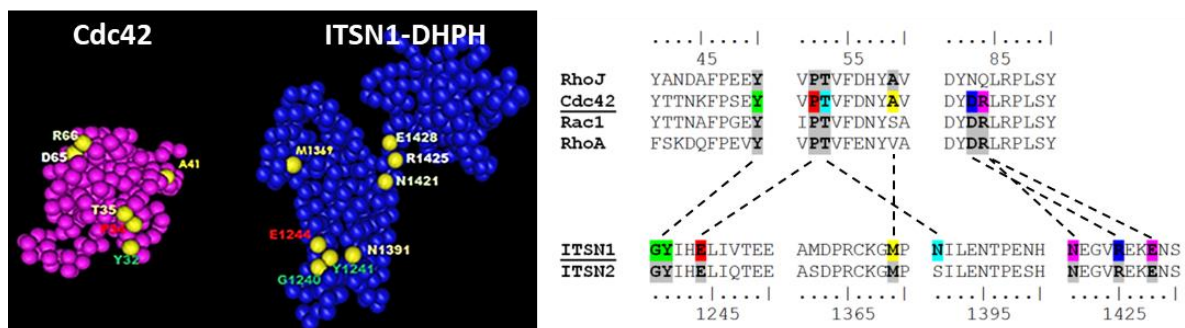
Hasta esta parte, RhoJ es una GTPasa homóloga y que forma filopodios de manera similar a Cdc42. Para la elección del RhoGEF-DHPH se propuso establecer la relación en homología y fenotipo entre RhoJ, Cdc42, Rac1 y RhoA. Con los resultados anteriores y teniendo como activadores de RhoJ al DHPH de ITSN1, P-REX1 y ARHGEF11, se elige a ITSN1 debido a que es un GEF específico para Cdc42 y se procede a caracterizarlo en la segunda etapa.

### 6.6.- Análisis bioinformático del complejo estructural ITSN1-DHPH con Cdc42

Una vez elegido el DHPH de ITSN1, un GEF específico para Cdc42, se realizó un análisis bioinformático para identificar si los sitios de interacción con los cuales el DHPH activa a Cdc42, pueden ser los mismos en RhoJ. Se identificaron los sitios de interacción del complejo estructural 1K11 y se realizaron alineamientos de secuencia para comparar estos sitios entre RhoJ y Cdc42.

Los sitios de interacción en Cdc42 son: Tirosina 32 (Y32), Prolina 34 (P34), Treonina 35 (T35), Metionina 41 (M41), Acido aspártico 65 (D65) y Arginina 66 (R66). RhoJ conserva los sitios Y32, P34, T35 y M41, no conserva los sitios D65 y R66. RhoJ conserva 4 de los 6 puntos de interacción, estos sitios pueden ser los responsables de que ITSN1-DHPH active a RhoJ.

La ITSN1 pertenece a la familia de las ITSNs, conformada por ITSN1-L (Long), ITSN1-S (Short), ITSN2-L (Long) e ITSN2-S (Short). Las ITSNs-S no tienen módulo DHPH, las ITSNs-L tienen módulo DHPH y se consideran GEFs específicos para Cdc42. En los ensayos de activación se encontró que el DHPH de ITSN1, pero no el de ITSN2, promueven la activación de RhoJ, ambas construcciones interaccionan con RhoJ-G33A.



**Figura 6.6.- Análisis bioinformático del complejo Cdc42 y ITSN1-DHPH (1K11).** RhoJ conserva 4 de los 6 sitios de interacción necesarios para activación de Cdc42 por ITSN1. ITSN2 conserva 7 de los 8 residuos que participan en la activación de Cdc42 por ITSN1.

## Resultados

---

Para intentar dilucidar esta diferencia entre el DPH de ITS1 e ITS2 sobre la activación de RhoJ, se realizó alineamiento de sus secuencias y se encontró una identidad entre ITS1 e ITS2 de 57,8% (*BioEdit Sequence Alignment Editor*).

Se buscaron los sitios de interacción del ITS1-DPH en el complejo 1K11, estos sitios corresponden a: Glicina 1240 (G1240), Tirosina 1241 (Y1241), Ácido glutámico 1244 (E1244), Metionina 1369 (M1369), Asparagina 1391 (N1391), Asparagina 1421 (N1421), Arginina 1425 (R1425) y Acido glutámico 1428 (E1428) ([Figura 6.6](#)).

Solo el residuo N1391 no se conserva en el DPH-ITS2. ITS2 conserva 7 de los 8 residuos necesarios para activar a Cdc42 ([Figura 6.6](#)). El ARHGEF11 conserva 3 sitios (E1244, N1421 y E1428) y P-REX1 conserva solo un residuo (R1425).

Como resultado de este análisis, se puede conjeturar, que los DPH pueden activar a RhoJ por sitios de interacción diferentes a los del ITS1-DPH, debido a que ARHGEF11 y P-REX1 no conservan la mayoría de los sitios de interacción de ITS1, pero promueven la activación de RhoJ.

En el caso de las ITSs, el residuo N1391 en la ITS1 no se requiere para la interacción, pero es indispensable para la activación de RhoJ. Por eso, el DPH de ITS2 tiene afinidad por RhoJ-G33A pero no tiene la capacidad de activar a RhoJ. Para comprobar esto se requiere determinar que realmente el DPH de ITS2 es activo.

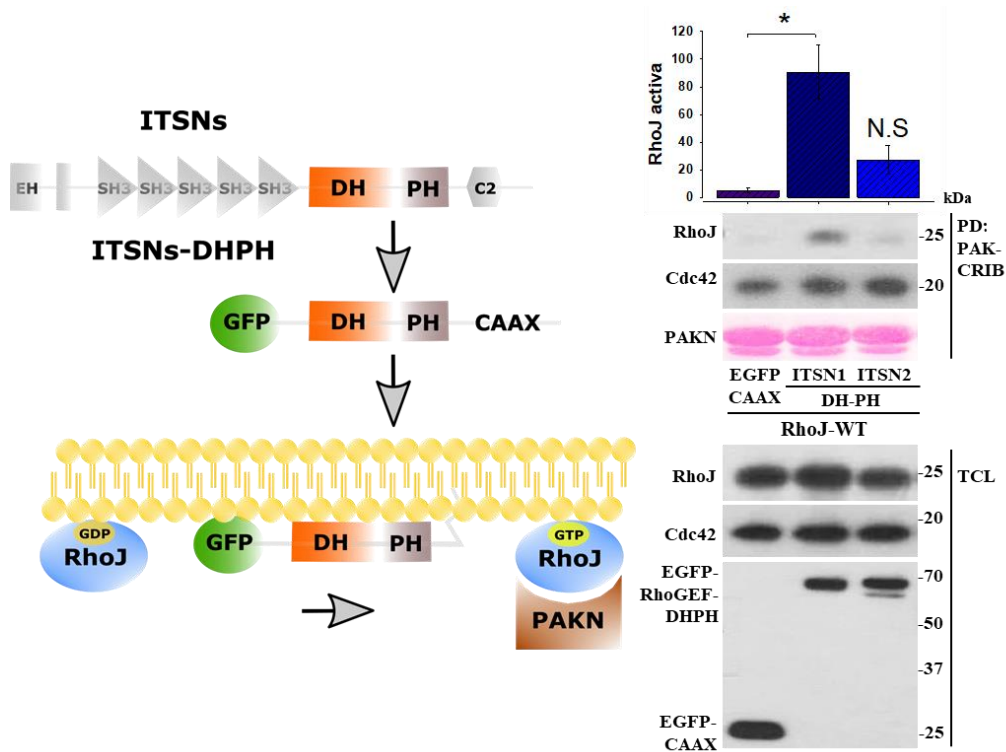
### **6.7.- Activación de RhoJ por ITS1-DPH pero no por ITS2-DPH**

Para comprobar que solo el DPH de ITS1, pero no ITS2, promueven la activación de RhoJ, células HEK293T se transfectaron con RhoJ WT, GFP-CAAX, GFP-ITS1-DPH y GFP-ITS2-DPH, se determinó la activación de RhoJ por interacción con PAKN.

Como se había obtenido en los tamizajes de activación de RhoJ por RhoGEFs-DPH, solo el DPH de ITS1 promueve la activación de RhoJ, sin embargo, ambas construcciones son activas para Cdc42. Estos resultados confirman que solo el DPH de ITS1 es activador de RhoJ y descarta que en los tamizajes se obtuviera, un falso negativo con el DPH de ITS2 ([Figura 6.7](#)).

Esto también apoya la conjetura derivada del análisis bioinformático, el residuo N1391 parece jugar un papel importante en la activación de RhoJ, ITS2 no conserva este residuo y no promueve la activación de RhoJ. Para determinar si el DPH es un activador directo de RhoJ, se realizaron nuevamente ensayos de interacción.

## Resultados



**Figura 6.7.- El DHPH de ITSN1, pero no ITSN2, promueve la activación de RhoJ.** Se ha reportado que tanto DHPH-ITSN1 y DHPH-ITSN2 llevan a la activación de Cdc42 en células HEK293T, pero sólo de manera específica, el DHPH de ITSN1 promueve la activación de RhoJ. ANOVA de una vía, Tukey \* $P < 0,05$ .  $N=3$

**6.8.- RhoJ forma una interacción directa con el módulo DHPH de ITSN1**  
Para corroborar que ITSN1 es un activador directo de RhoJ, células HEK293T se transfectaron con GFP-CAAX, ITSN1-DHPH y ITSN2-DHPH, se realizaron ensayos de interacción con perlas purificadas de RhoJ-G33A y mediante el sistema de cotransfección.

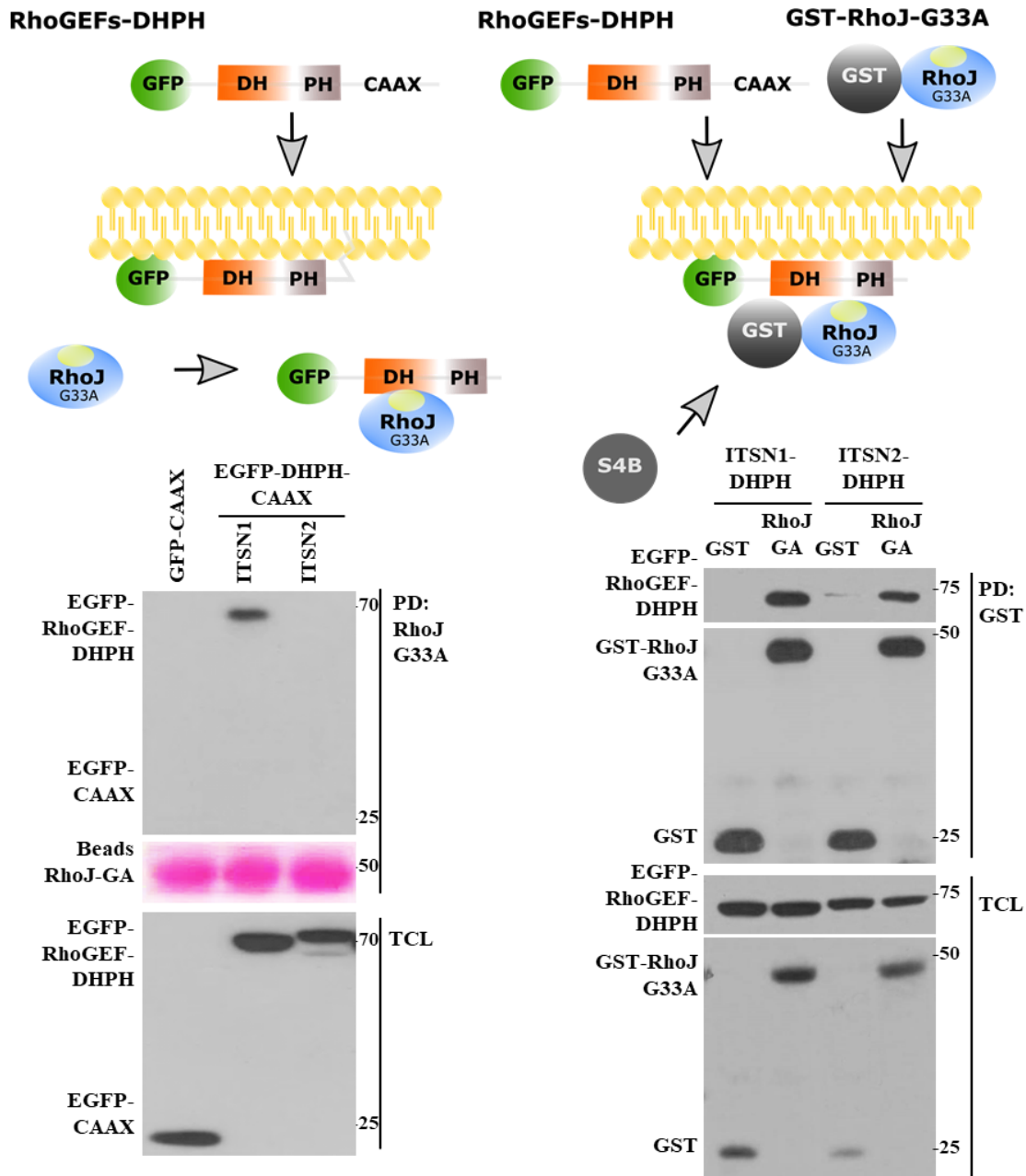
En los tamizajes de interacción con perlas recombinantes de RhoJ-G33A, no se identificó interacción entre ITSN1 DHPH y RhoJ-G33A (Figura 6.1.1), en estos ensayos la sensibilidad de detección se toma igual para todos los RhoGEFs DHPH, por lo cual, para descartar un falso negativo se ajustaron condiciones (mayor tiempo de exposición a la placa fotosensible, mayor purificación de proteína recombinante, mejor expresión de ITSNs DHPH) y se buscó la interacción entre ITSNs DHPH y RhoJ G33A.

Como se puede observar, con perlas conteniendo GST-RhoJ-G33A purificada se logra detectar interacción entre RhoJ-G33A y ITSN1 DHPH pero no con ITSN2-DHPH, mientras que el sistema de coprecipitación con glutation-sepharosa 4B (a partir de células en las que GST-RhoJ-G33A fue cotransfectada), se detecta interacción de RhoJ-G33A con ambos



## Resultados

ITSNs-DHPH. Esto indica que ITSN1-DHPH lleva a la activación de RhoJ mediante una interacción directa.



**Figura 6.8.- El DHPH de ITSN1 tiene afinidad por RhoJ-G33A.** Mediante perlas que contienen la proteína recombinante purificada se comprobó que sólo el ITSN1 DHPH tiene afinidad por RhoJ-G33A. En células HEK293T, usando un sistema de cotransfección y coprecipitación con glutatión-sepharosa 4B, tanto el DHPH de ITSN1 como el DHPH de ITSN2 tienen afinidad por RhoJ.  $N=3$

El hecho que RhoJ-G33A tenga afinidad por ITSN2 DHPH en el sistema de coprecipitación con glutatión-sepharosa 4B, indica que los módulos DHPH tendrían otra función adicional a

## Resultados

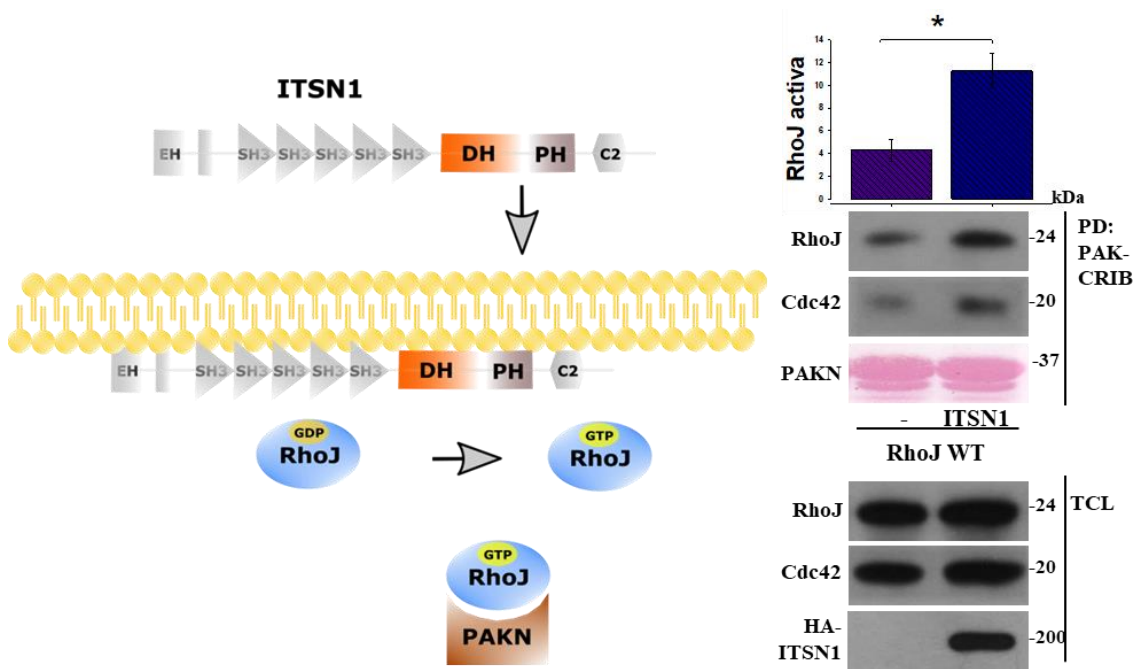
su actividad RhoGEF y funcionarían como módulos adaptadores, retomando el concepto de RhoGEFs como plataformas de señalización.

Hasta este punto, se determinó que el DHPH de ITSN1 promueve la activación de RhoJ por medio de un mecanismo directo, pero ITSN1 es un GEF complejo cuya función puede variar entre su versión DHPH y la versión completa.

### 6.9.- Activación de RhoJ por ITSN1 completa

La ITSN1 es un RhoGEF que presenta dominios EH, 5 dominios en tándem SH3, el módulo DHPH y un dominio C2. Para verificar si la versión completa tiene la capacidad de activar a RhoJ de manera similar que su versión DHPH, células HEK293T se transfectaron con HA-ITSN1 y RhoJ-WT, y se aisló la fracción activa de RhoJ mediante interacción con PAKN.

Como se puede observar, la expresión de la versión completa de ITSN1 promueve la activación de RhoJ y Cdc42, lo cual confirma que tanto su versión DHPH como la versión completa mantienen la actividad hacia RhoJ y Cdc42 (Figura 6.9).



**Figura 6.9.- ITSN1 en su versión completa promueve la activación de RhoJ.** La ITSN1 es un GEF con dominios EH, 5 dominios en tándem SH3, el módulo DHPH y un dominio C2. A pesar de su complejidad, y su posible estado de autoinhibición, tiene la capacidad de activar a RhoJ y Cdc42 en células HEK293T. *T-student*, \* $P=0,008$ ,  $N=3$ .

## Resultados

---

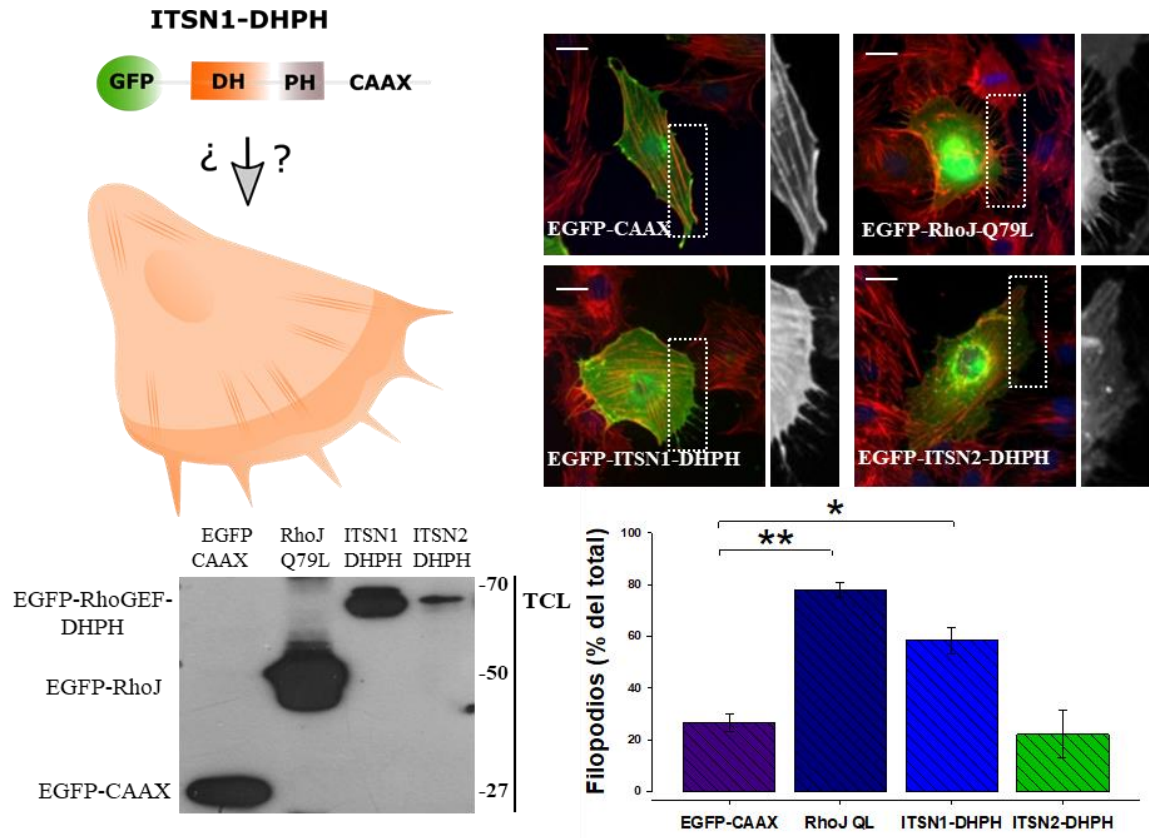
Con estos resultados se confirma que RhoJ puede ser activada tanto por la versión DHPH como por la versión completa de ITSN1, sin embargo, se desconoce si la versión DHPH de ITSN1 promueve la formación de filopodios de manera similar a la expresión de RhoJ.

### **6.10.- El DHPH de ITSN1, pero no ITSN2, induce la formación de estructuras tipo filopodios en células endoteliales**

Aunque el DHPH de ITSN1 promueva la activación de RhoJ y Cdc42, no indica que lleve a la formación de filopodios, para ello, células PAE se transfectaron con GFP, GFP-RhoJ-Q79L, GFP-ITSN1-DHPH y GFP-ITSN2-DHPH, y se realizaron tinciones con faloidina. Las tinciones se observaron en el microscopio NIKON con un aumento 60X en aceite de inmersión.

Como se reportó en la sección 6.5, la expresión de RhoJ-Q79L induce la formación de filopodios en un 50% de las células transfectadas, el porcentaje incrementa debido a que en esta situación la GFP está fusionada a la GTPasa y se garantiza un porcentaje mayor de células transfectadas con RhoJ ([Figura 6.10](#)).

## Resultados



**Figura 6.10.- El módulo DHPH de ITSN1 induce la formación de estructuras tipo filopodios en células endoteliales.** La expresión del DHPH-ITSN1 en células PAE promueve la formación de filopodios de manera similar a RhoJ-Q79L, el DHPH-ITSN2 no induce la formación de filopodios, pero genera estructuras vesiculares. ANOVA una vía, tukey, \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ .  $N=3$ , Barra= $20\mu\text{m}$ .

La expresión del módulo DHPH de ITSN1 lleva a la formación de filopodios en un 60% de las células transfectadas, mientras que el módulo DHPH de ITSN2 no induce la formación de filopodios, en cambio se observan estructuras tipo vesiculares. A pesar de que en los lisados totales se observa una menor expresión del DHPH de ITSN2, en ningún ensayo se detectó formación de filopodios por ITSN2 y en todos aparecen formas tipo vesiculares (Figura 6.10).

Estos resultados confirman que el DHPH de ITSN1 es un activador de RhoJ que promueve la formación de estructuras tipo filopodios, pero aún no se determina que estos filopodios formados por el DHPH requieran de la actividad de RhoJ.

## Resultados

---

### **6.11.- La dominante negativa de RhoJ (T35N) bloquea la señalización de RhoJ dependiente del módulo DHPH de ITSN1**

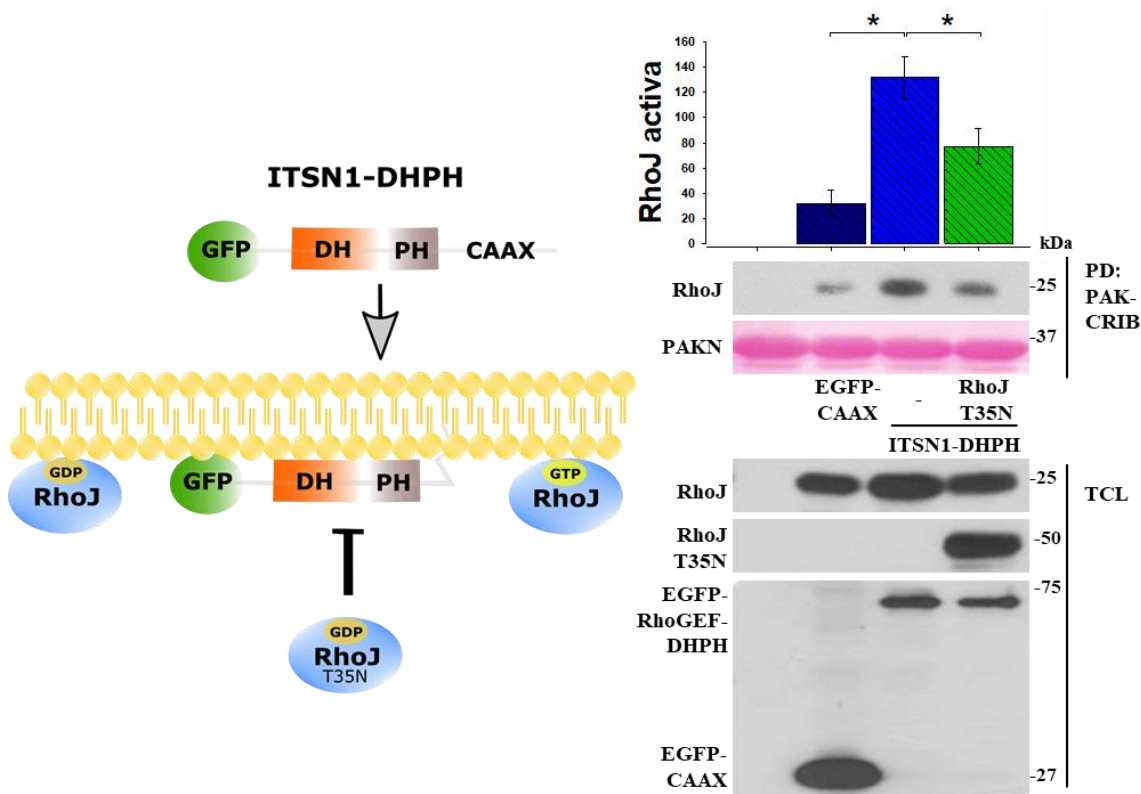
La dominante negativa de RhoJ (T35N) es una herramienta útil para el bloqueo de la señalización de RhoJ, esta mutante podrá capturar al DHPH de ITSN1 e impedir la activación de RhoJ.

Para demostrar esto, células HEK293T se transfectaron con GFP-CAAX, GFP-ITSN1-DHPH y GFP-ITSN1-DHPH con RhoJ-T35N, la fracción activa de RhoJ se captura con PAKN. Como se esperaba, el DHPH de ITSN1 promueve la activación de RhoJ, dicha activación se evita cuando se expresa la mutante dominante negativa de RhoJ (Figura 6.11.1).

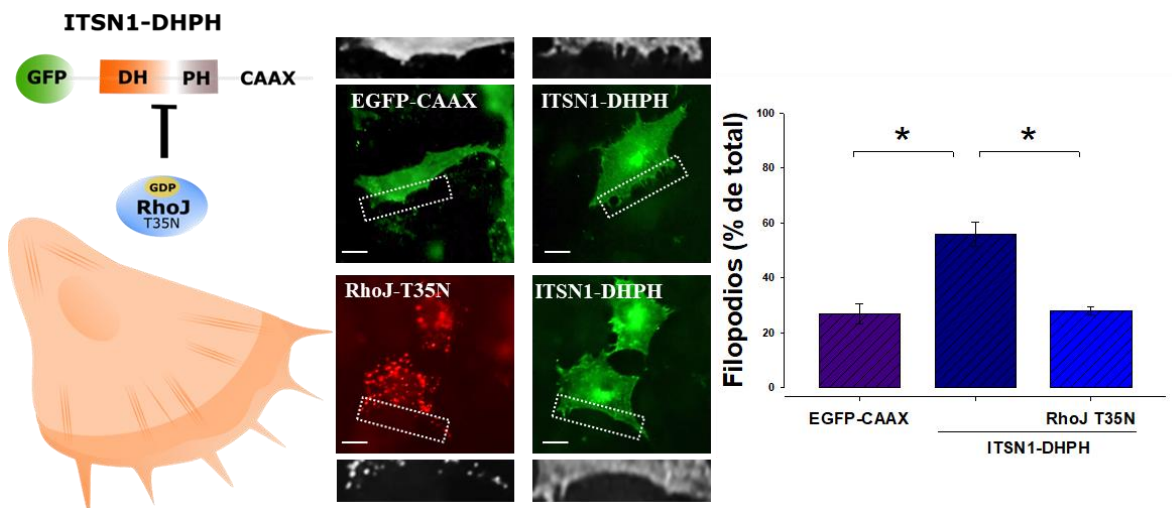
Como la dominante negativa de RhoJ bloquea la activación de RhoJ dependiente del DHPH de ITSN1, los filopodios formados por el DHPH serán bloqueados por la expresión de RhoJ-T35N. Células PAE se transfectaron con GFP-CAAX, GFP-ITSN1-DHPH y GFP-ITSN1-DHPH con mCherry-RhoJ-T35N, y se realizaron tinciones con faloidina. Las tinciones se observaron en el microscopio NIKON con un aumento 60X en aceite de inmersión.

Como se observa, la expresión del DHPH de ITSN1 induce la formación de filopodios en un 60% de las células transfectadas, la expresión de RhoJ-T35N evita la formación de filopodios y confirma que la dominante negativa abate la activación de RhoJ por el DHPH de ITSN1 (Figura 6.11.2).

## Resultados



**Figura 6.11.1.- RhoJ-T35N impide la activación de RhoJ por ITSN1-DHPH.** El DHPH de ITSN1 promueve la activación de RhoJ en células HEK293T, dicha activación disminuye con la expresión de la mutante RhoJ-T35N, dominante negativa de RhoJ. ANOVA una vía, Tukey, \* $P < 0.05$ .  $N=3$ .



**Figura 6.11.2.- RhoJ-T35N evita la formación de filopodios inducidos por el DHPH de ITSN1 en células endoteliales.** La expresión del DHPH de ITSN1 en células PAE promueve la formación de filopodios, la expresión de RhoJ-T35N, dominante negativa, evita la formación de filopodios por el DHPH de ITSN1 y se observan estructuras tipo vesiculares. ANOVA una vía, tukey, \* $P < 0.05$ .  $N=3$ , Barra=20 $\mu$ m.

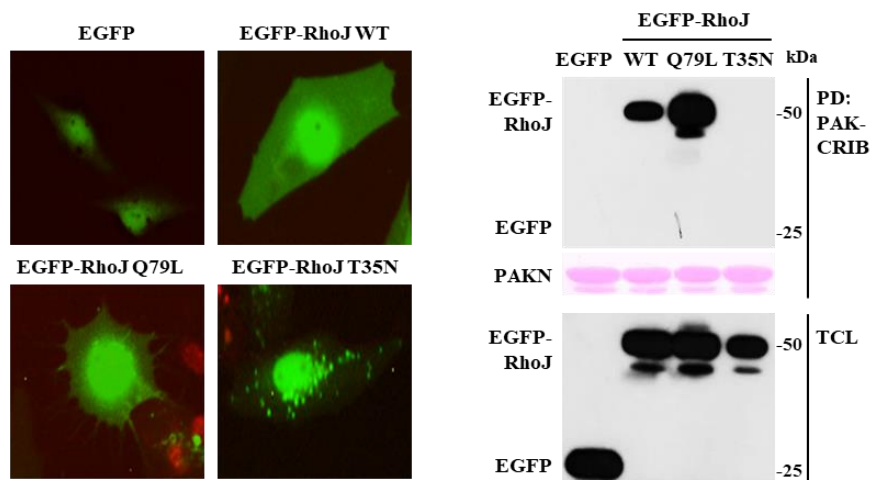
## Resultados

Como conclusión, se puede afirmar que el DHPH de ITSN1 promueve la formación de filopodios mediante la activación de RhoJ. Una observación interesante resultó con la expresión de RhoJ-T35N donde se observan numerosas estructuras tipo vesiculares, estructuras similares a las observadas cuando se expresa el DHPH de ITSN2 y que no se observan en gran número cuando sólo se expresa el DHPH de ITSN1.

### 6.12.- RhoJ-T35N colocaliza con el DHPH de ITSN1 y el DHPH de ITSN2 en vesículas que corresponden a endosomas tempranos

De los resultados anteriores, se observó que la expresión de la dominante negativa genera estructuras tipo vesiculares, estructuras que también se observan con la expresión del DHPH de ITSN2. Se ha reportado la participación de ITSN1 e ITSN2 en procesos de tráfico vesicular, lo cual, hace suponer que la dominante negativa de RhoJ puede bloquear el tráfico vesicular del DHPH de ITSN1 y puede colocalizar con el DHPH de ITSN2 en estructuras vesiculares.

Para determinar esta conjetura, primero se caracterizó que la dominante negativa de RhoJ sea una dominante negativa. Células PAE se transfectaron con GFP, GFP-RhoJ-WT, GFP-RhoJ-Q79L y GFP-RhoJ-T35N, se observaron los cambios en la morfología de las células con el microscopio NIKON a un aumento de 20X e incremento digital. De estas mismas células se aisló la fracción activa de RhoJ por interacción con PAKN.



**Figura 6.12.1.- RhoJ-T35N es una dominante negativa que genera estructuras tipo vesiculares en células endoteliales.** RhoJ-WT y RhoJ-Q79L generan cambios en el citoesqueleto de células PAE; incrementan la extensión de la célula, forman estructuras tipo filopodios y se encuentran unidas a GTP, captura con PAK. RhoJ-T35N genera estructuras tipo vesiculares y no se encuentra unida a GTP, no se captura con PAKN.

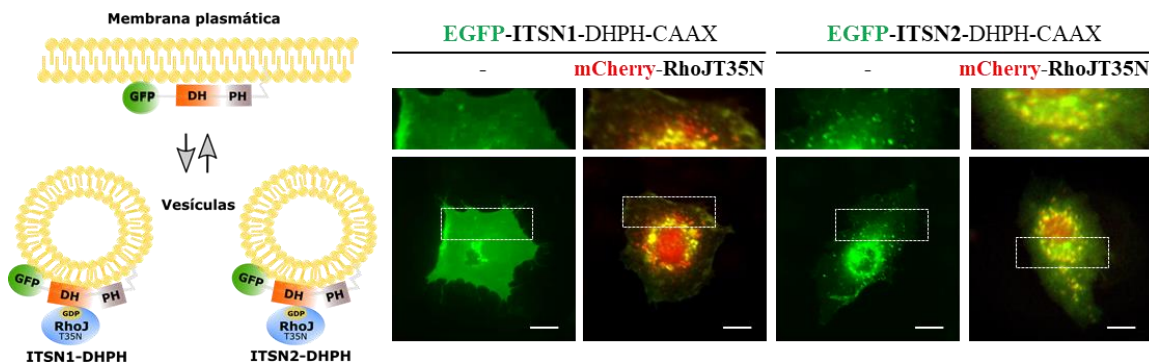
## Resultados

Con la expresión de RhoJ-WT se detecta cambios en la forma de las células, se observan más extendidas y se forman pequeñas extensiones tipo filopodios, esto concuerda con la activación que se detecta por interacción con PAKN. La expresión de RhoJ-Q79L genera filopodios y se detecta mayor activación de RhoJ con PAKN (Figura 6.12.1).

La expresión de RhoJ-T35N promueve cierta extensión en las células pero no genera estructuras tipo filopodios, no se detecta activación de RhoJ por interacción con PAKN. Con estos resultados se comprueba que la dominante negativa de RhoJ no está unida a GTP y genera las mismas estructuras tipo vesiculares observadas con mCherry-RhoJ-T35N (Figura 6.12.1).

Como se observó en la figura 6.11.2 la expresión de RhoJ-T35N inhibe la formación de filopodios inducida por el DHPH de ITSN1, además se observan estructuras tipo vesiculares similares a las formadas por la expresión del DHPH de ITSN2.

Para averiguar si RhoJ-T35N colocaliza con el DHPH de ITSN1 y el DHPH de ITSN2 en estas estructuras tipo vesiculares, células PAE se transfectaron con GFP-ITSN1-DHPH, GFP-ITSN2DHPH, GFP-ITSN1-DHPH con mCherry-RhoJ-T35N y GFP-ITSN2-DHPH con mCherry-RhoJ-T35N. Las células se fijaron con paraformaldehído y se observaron en el microscopio NIKON con un aumento 60X en aceite de inmersión.



**Figura 6.12.2.- RhoJ-T35N colocaliza con el DHPH de ITSN1 y el DHPH de ITSN2 en estructuras tipo vesiculares.** La expresión del DHPH de ITSN1 en células PAE forma filopodios, estos se inhiben con la expresión de RhoJ-T35N y colocalizan en estructuras vesiculares en células. La expresión del DHPH de ITSN2 forma estructuras vesiculares que colocalizan con RhoJ-T35N. Barra=20μm.

La expresión del DHPH de ITSN1 promueve la formación de filopodios y se observan pocas estructuras tipo vesiculares, pero cuando se expresa RhoJ-T35N se inhibe la formación de filopodios, se incrementan las estructuras tipo vesiculares y al hacer el traslape de las imágenes se observa que el DHPH de ITSN1 colocaliza con RhoJ-T35N. La

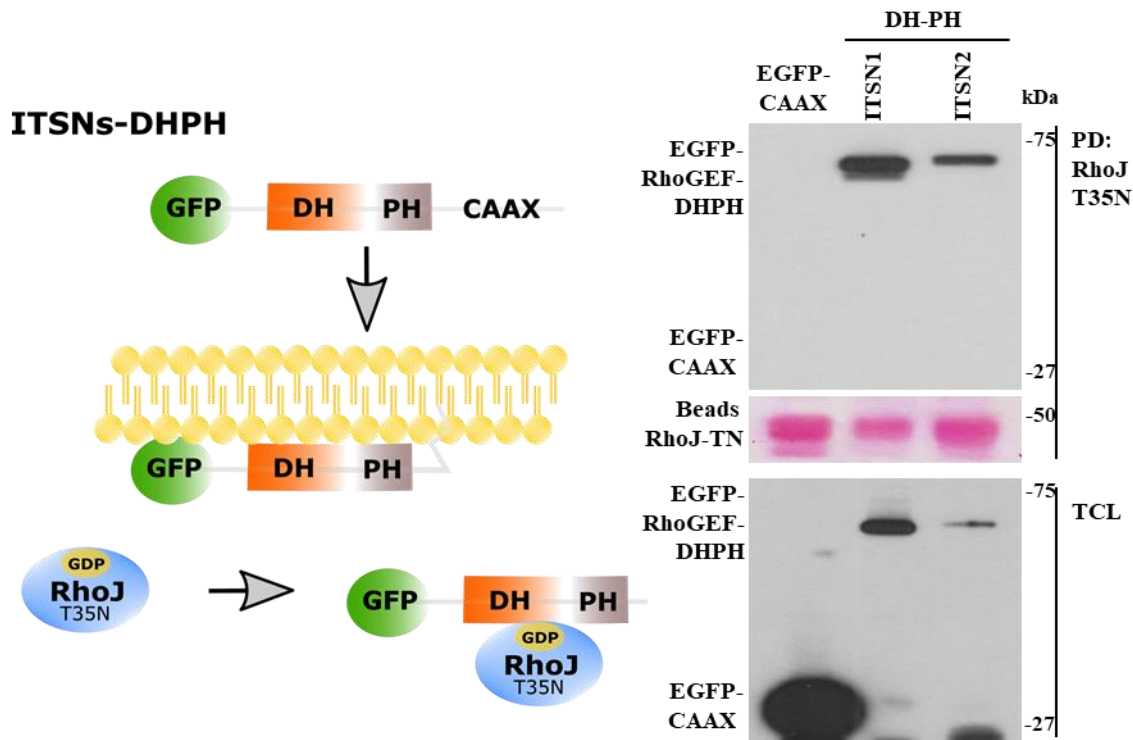


## Resultados

expresión del DHPH de ITSN2 no genera filopodios, se observan estructuras vesiculares y al hacer el traslape de las imágenes se observa colocalización entre el DHPH de ITSN2 y RhoJ-T35N (Figura 6.12.2).

Estos resultados confirman que RhoJ-T35N captura al DHPH de ITSN1 en estructuras tipo vesiculares impidiendo la activación de RhoJ y la formación de filopodios. La colocalización observada nos indica la presencia tanto del DHPH de ITSN1 como de ITSN2 en estructuras vesiculares, sin embargo, la colocalización no indica que estas proteínas estén unidas directamente.

Para explorar esta observación, células HEK293T se transfectaron con GFP-CAAX, GFP-ITSN1-DHPH y GFP-ITSN2-DHPH, se buscó la interacción con perlas purificadas de RhoJ-T35N.



**Figura 6.12.3.- RhoJ-T35N interacciona con el DHPH de ITSN1 e ITSN2.** Mediante perlas purificadas de RhoJ-T35N se detecta interacción con el DHPH de ITSN1 y el DHPH de ITSN2 en células HEK293T. Esta interacción confirma los ensayos de colocalización e indica la formación de un complejo entre los DHPH de las ITSNs y RhoJ-T35N. *N*=3

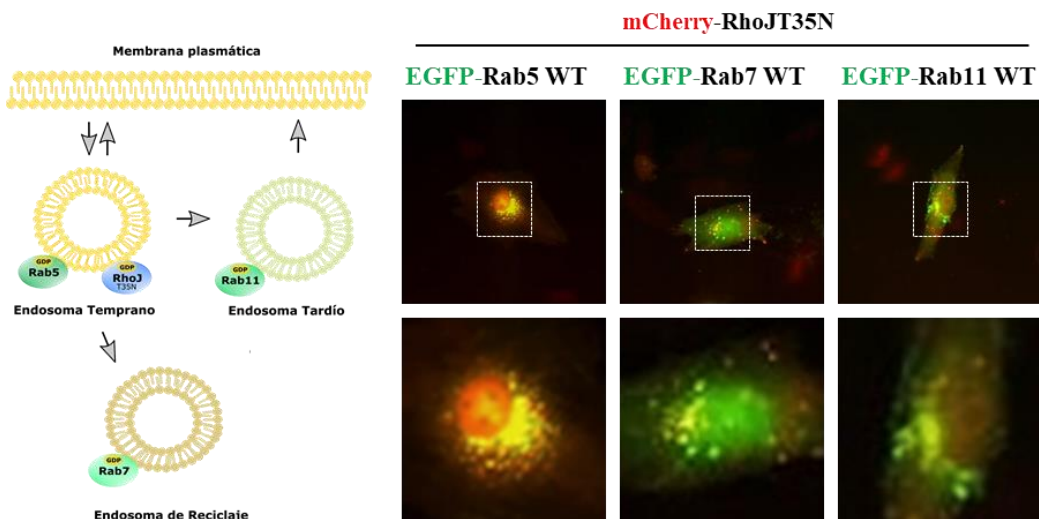
Como se puede observar, las perlas de RhoJ-T35N recombinante tienen afinidad tanto por el DHPH de ITSN1 como por el DHPH de ITSN2. Esto concuerda con los ensayos de interacción utilizando las perlas de RhoJ-G33A, y confirma que la colocalización observada

## Resultados

en los ensayos de fluorescencias es debida a una interacción directa entre RhoJ-T35N y los DHPHs de ITSN1 e ITSN2 (Figura 6.12.3).

RhoJ-T35N secuestra al DHPH de ITSN1 en vesículas e impide la formación de filopodios dependiente de RhoJ, esto indica la participación del tráfico vesicular en la formación de filopodios.

El tráfico vesicular involucra endosomas tempranos, tardíos y de reciclaje. Para determinar qué tipo de estructuras vesiculares forma la dominante negativa de RhoJ, células PAE se transfectaron con mCherry-RhoJ-T35N y las GTPasas GFP-Rabs. Las células se fijaron con paraformaldehído y se observaron en el microscopio NIKON con un aumento 60X en aceite de inmersión.



**Figura 6.12.4.- RhoJ-T35N colocaliza con Rab5 en endosomas tempranos en células endoteliales.** La dominante negativa de RhoJ colocaliza parcialmente con Rab11 y Rab7, la mayor colocalización se encuentra con Rab5 en células PAE. Estos resultados indican la formación de vesículas por RhoJ-T35N que corresponden a endosomas tempranos.

Las GTPasas Rabs participan en el tráfico vesicular localizándose en estructuras vesiculares específicas: Rab5 es una GTPasa presente en endosomas tempranos, Rab11 en endosomas tardíos y Rab7 en endosomas de reciclaje.

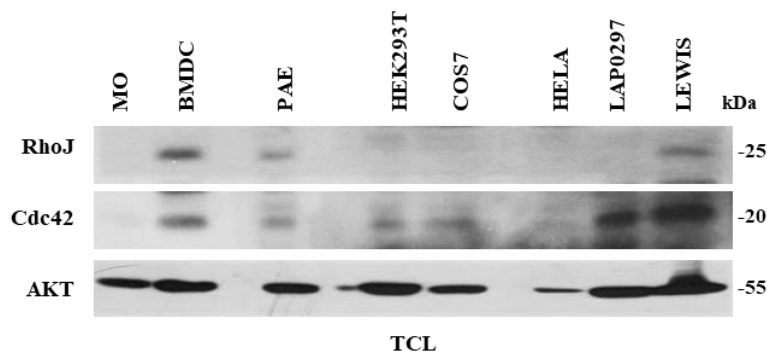
Como se puede observar, la expresión de las Rabs genera estructuras vesiculares, la coexpresión de RhoJ-T35N tiene cierta colocalización con Rab11 y Rab7, pero con Rab5 se presenta la mayor colocalización. Con estos resultados se observa que RhoJ-T35N se encuentra principalmente en endosomas tempranos (Figura 6.12.4).

## Resultados

Hasta esta etapa se identificó a la ITSN1 como un activador de RhoJ, que genera estructuras tipo filopodios por medio del tráfico vesicular que requiere de endosomas tempranos. RhoJ participa en la angiogénesis tumoral, sin embargo, no se ha reportado una cascada de señalización angiogénica en la cual participe RhoJ e ITSN1.

### 6.13.- RhoJ es activada por factores de células tumorales y VEGF-A

RhoJ se sobreexpresa en endotelio tumoral de carcinoma de pulmón y colon. La sobreexpresión no es indicativa de que RhoJ esté activa. Para comprobarlo, se buscó la activación de RhoJ por medios condicionados de origen tumoral. El primer paso fue determinar la expresión de RhoJ endógena en células de origen endotelial. Lisados celulares de diversos cultivos se corrieron por Western Blot y se buscó la expresión de RhoJ con anticuerpos.



**Figura 6.13.1.- Expresión de RhoJ en líneas celulares.** RhoJ se expresa en células endoteliales PAE, cultivos primarios de células derivadas de la medula ósea (BMDC) y células tumorales LEWIS. No se expresa en líneas epiteliales como HEK293T y COS7, ni en cultivos primarios de medula ósea fresca (MO), no se detecta en líneas tumorales como LAP0297 y HELA. Cdc42 se expresa en casi todas las líneas evaluadas.

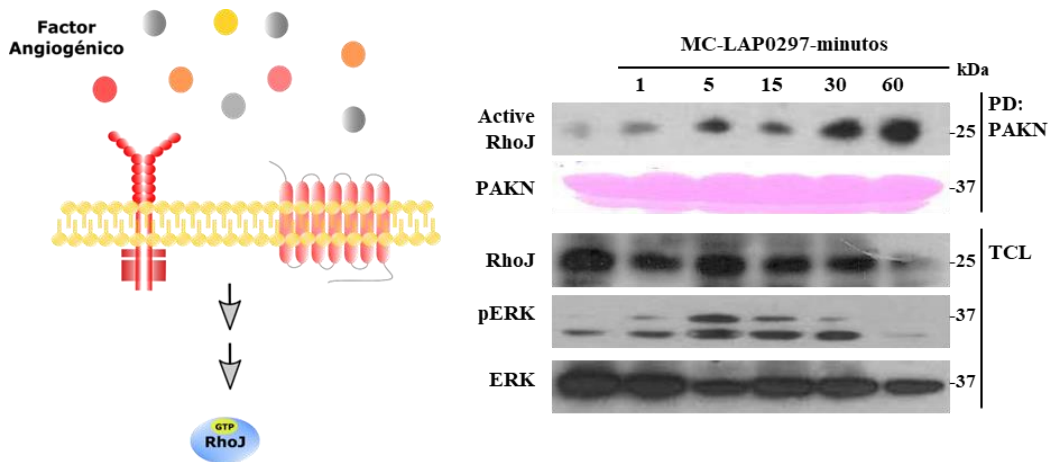
Las líneas celulares evaluadas fueron: cultivos primarios de medula ósea fresca (MO) y células derivadas de la medula ósea (BMDC), cultivos de células endoteliales (PAE), cultivos de células epiteliales (HEK293T y COS7) y cultivos de células tumorales (HELA, LAP0297 y LEWIS). Se detecta expresión de RhoJ en células BMDC, PAE y LEWIS, como comparativo Cdc42 se detecta en BMDC, PAE, HEK293T, COS7, LAP0297 y LEWIS (Figura 6.13.1).

De los tres cultivos donde se detecta expresión de RhoJ, solo las PAE son células endoteliales, además es el modelo donde se realizaron las pruebas de morfología. Para los

## Resultados

ensayos de activación de RhoJ por medios condicionados tumorales, se eligió la línea tumoral LAP0297, una línea de carcinoma de pulmón.

Los medios condicionados de células LAP0297 se recolectaron a las 16 horas y se estimularon células PAE en los tiempos 1, 5, 15, 30 y 60 minutos. La fracción activa de RhoJ endógena se aisló por interacción con perlas de PAKN.



**Figura 6.13.2.- RhoJ se activa por factores de origen tumoral.** Las células PAE se estimularon con medios condicionados de células tumorales LAP0297, se detectó la activación de RhoJ endógena mediante interacción con PAKN. Se detecta una activación de RhoJ que incrementa con el tiempo de estímulo. *N=3*

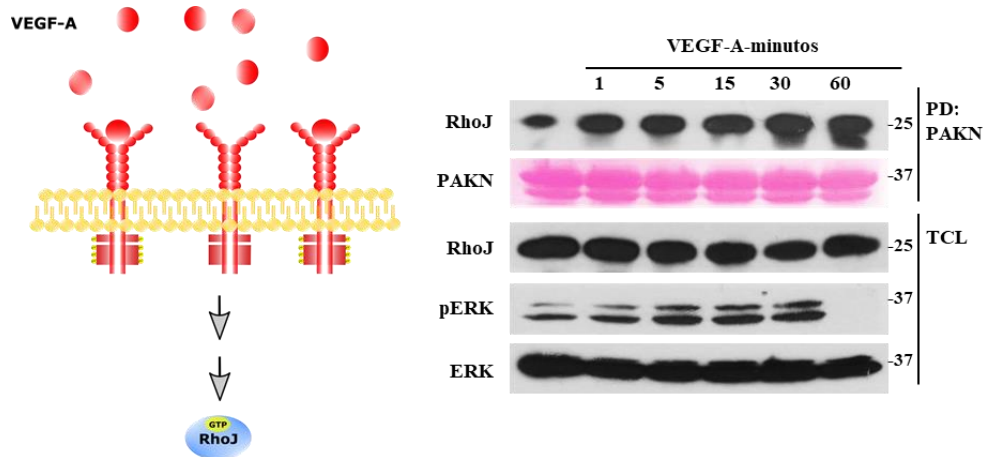
Los medios condicionados estimulan las células PAE, como se puede observar con la fosforilación de ERK que presenta una activación entre 5 y 15 minutos. Con respecto a RhoJ, se detecta activación desde los 5 minutos e incrementa con respecto al tiempo hasta los 60 minutos. Esta cinética de activación es diferente a la activación de Cdc42, que se presenta entre 1 y 5 minutos (Tesis de maestría Color-Aparicio VM-2015) (Figura 6.13.2).

Los medios condicionados contienen múltiples factores que pueden activar diversas cascadas de transducción de señales, entre los factores que tienen se encuentra el VEGF-A, un factor que participa en procesos angiogénicos tumorales. Datos iniciales indican que RhoJ es activado por VEGF-A, para comprobarlo, se utilizó un sistema donde las células no expresen receptores de VEGF.

Células HEK293T se transfectaron con el receptor VEGFR-2 y RhoJ-WT, las células se estimularon con VEGF-A en los tiempos 1, 5, 15, 30 y 60 minutos. Se aisló la fracción activa de RhoJ por interacción con PAKN.

## Resultados

Como se puede observar, la estimulación con VEGF-A induce la fosforilación de ERK entre 5 y 30 minutos, indicando que las células responden a VEGF-A. RhoJ presenta una activación desde el primer minuto y se mantiene activa hasta los 60 minutos. Este resultado correlaciona con la cinética de activación de RhoJ por medios condicionados de células tumorales LAP0297, cuya cinética incrementa con respecto al tiempo.



**Figura 6.13.3.- RhoJ es activa por VEGF-A.** Se expresa RhoJ y VEGFR2 en células HEK293T, se determina la activación de RhoJ con PAKN ante el estímulo de VEGF-A. Se detecta la activación de RhoJ desde el primer minuto y se mantiene activa hasta los 60 minutos de estimulación por VEGF-A.  $N=1$

Con estos resultados se demuestra que además de estar sobreexpresada en endotelio tumoral, RhoJ es activada por factores de origen tumoral. Además, RhoJ se activa en una cascada de señalización por VEGF-A. Sin embargo, bajo la activación de receptores para VEGF (VEGFR2) existen cinasas que pueden regular la actividad de RhoJ.

Entre las cinasas que están río abajo de los receptores para VEGF se encuentra la cinasa de adhesiones focales (FAK, *focal adhesion kinase*), esta cinasa participa en procesos de adhesión, proliferación, motilidad y sobrevivencia, se encuentra sobreexpresada en cáncer de pulmón [118].

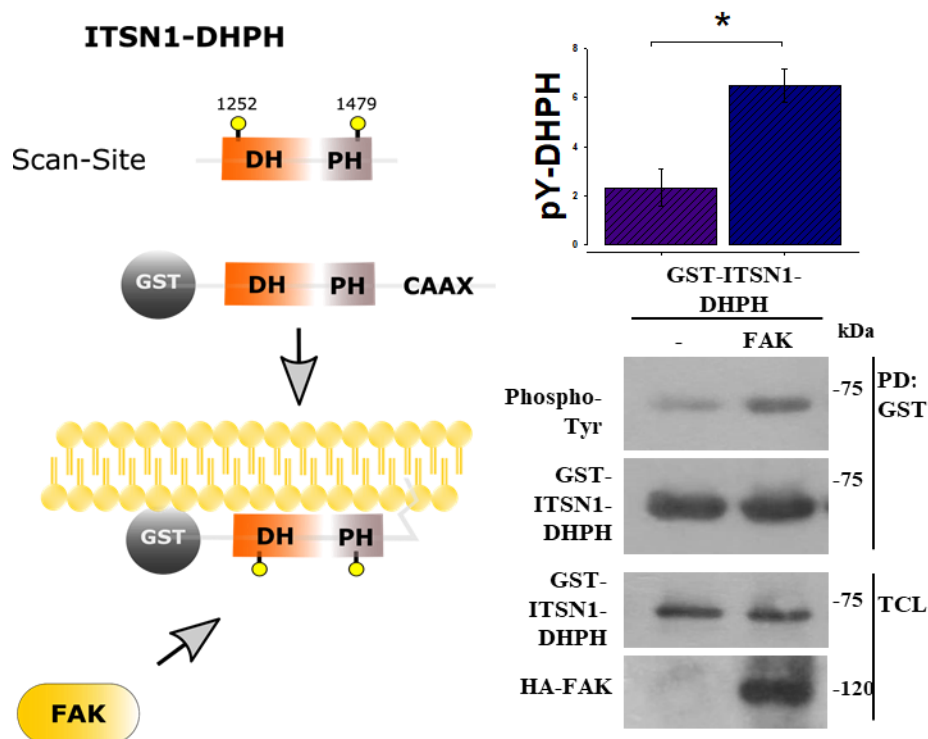
### 6.14.- El DHPH de ITSN1 es fosforilado por la cinasa de adhesiones focales (FAK)

Como se mencionó, la señalización de VEGF-A involucra la participación de cinasas de fosfotirosinas como FAK, además se ha reportado que RhoJ modula la migración celular a

## Resultados

través de regular las adhesiones focales, el mecanismo de su activación en adhesiones focales no se conoce.

Para determinar si RhoJ o su activador, ITSN1, son regulados por FAK, se realizó un análisis en silico de la secuencia de RhoJ e ITSN1 en la plataforma Scansite para identificar posibles sitios de fosforilación en tirosinas. Para RhoJ se identificó un sitio de fosforilación y mediante ensayos de coprecipitación con GST-RhoJ no se detectó fosforilación en tirosinas en presencia de la cinasa FAK. Para ITSN1 se detectaron múltiples sitios de fosforilación, sin embargo, dos sitios de fosforilación en el módulo DHPH despertaron el interés.



**Figura 6.14.- El módulo DHPH de ITSN1 se fosforila en tirosinas por la cinasa de adhesiones focales (FAK).** El análisis de la secuencia de ITSN1 identifica dos sitios potenciales de fosforilación en tirosinas, uno en el dominio DH posición 1252 y otro en el dominio PH posición 1479. El análisis en silico se comprobó por precipitación de GST-DHPH-ITSN1 en células HEK293T y se detectó fosforilaciones en tirosinas. Se detecta señal de fosfotirosinas en el DHPH de ITSN1 en presencia de FAK. T-student \*P=0,015, N=3.

## Resultados

---

Para determinar si FAK lleva a la fosforilación en tirosinas del DHPH de ITSN1, células HEK293T se transfectaron con GST-ITSN1-DHPH y GST-ITSN1-DHPH con FAK, mediante precipitación con glutatión-sepharosa 4B y con el anticuerpo anti-fosfotirosinas se determinó la fosforilación del DHPH por FAK.

El análisis *in silico* identifica dos sitios de fosforilación en tirosinas, uno ubicado en el dominio DH en la posición 1252 y otro ubicado en el PH en 1479. En los ensayos de precipitación se observó que la presencia de FAK conduce a la detección de fosfotirosinas en el módulo DHPH de ITSN1 (Figura 6.14).

Con este resultado se podría suponer que FAK puede regular, por fosforilación en tirosinas, la actividad del módulo DHPH de ITSN1.

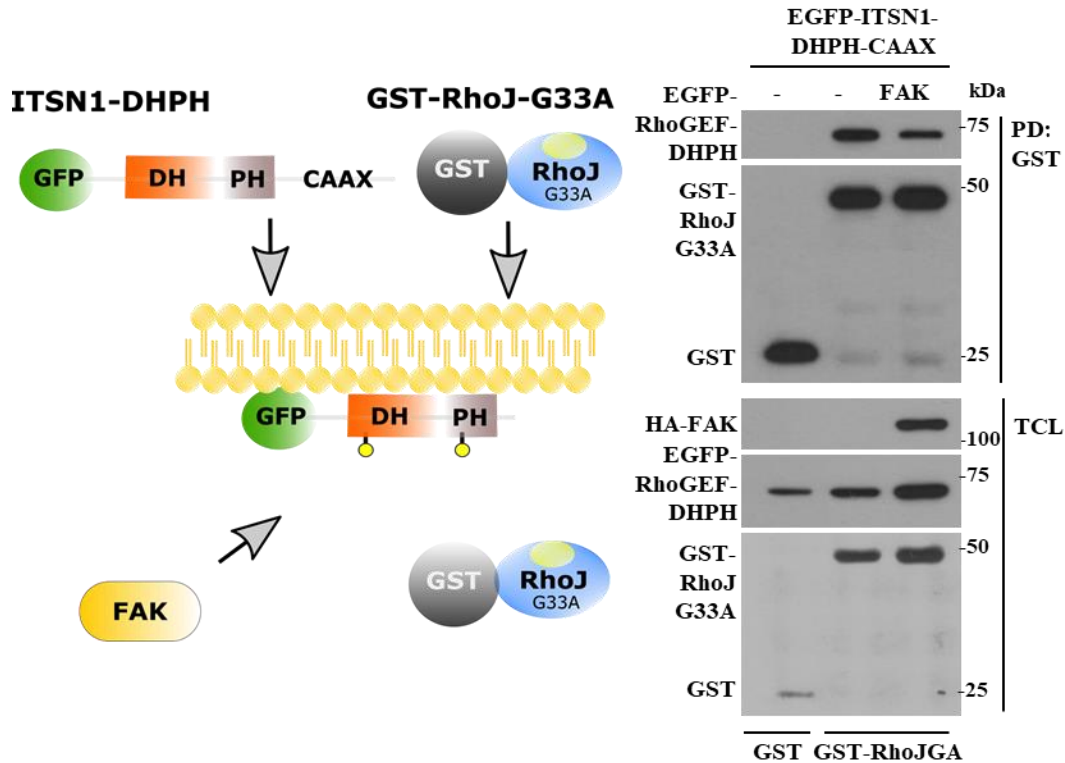
### **6.15.- FAK disminuye la interacción entre RhoJ y el módulo DHPH de ITSN1**

Como se mencionó en la sección 6.7, RhoJ se une por interacción directa al módulo DHPH de ITSN1, para determinar si la fosforilación en tirosinas del módulo DHPH de ITSN1 incrementa o disminuye esta interacción, se realizaron ensayos de interacción utilizando el sistema de cotransfección y perlas purificadas de RhoJ-G33A.

Para el sistema de cotransfección, células HEK293T se transfectaron con GFP-ITSN1-DHPH, GFP-ITSN1-DHPH con FAK y se cotransfectó GST-RhoJ-G33A, se buscó la interacción por coprecipitación de RhoJ-G33A con glutatión-sepharosa 4B.

Como se puede observar, RhoJ-G33A se une por interacción directa al módulo DHPH de ITSN1, pero la presencia de FAK disminuye esta interacción. Este resultado indica que la fosforilación del módulo DHPH por FAK disminuye la afinidad por RhoJ-G33A (Figura 6.15.1).

## Resultados



**Figura 6.15.1.- FAK disminuye la afinidad entre RhoJ y el módulo DHPH de ITSN1.** RhoJ-G33A forma un complejo de interacción con el módulo DHPH de ITSN1 en el sistema de cotransfección en células HEK293T, la presencia de FAK disminuye la afinidad de RhoJ por el DHPH, esto disminuye la formación del complejo RhoJ-G33A y ITSN1-DHPH.  $N=3$

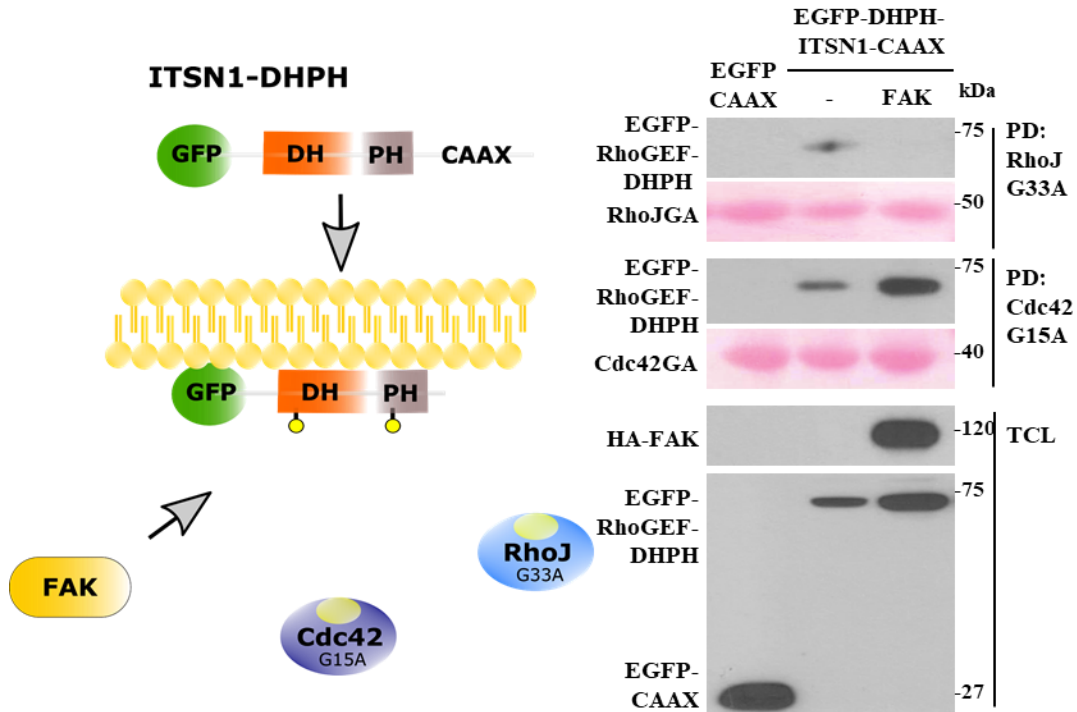
Para el ensayo de interacción con perlas de GST-RhoJG33A recombinante, células HEK293T se transfectaron con GFP-CAAX, GFP-ITSN1-DHPH y GFP-ITSN1-DHPH con FAK, y se buscó la interacción con perlas de RhoJ-G33A y Cdc42-G15A.

Se detecta interacción entre el DHPH de ITSN1 y RhoJ-G33A. Esta interacción disminuye cuando se expresa FAK. Este resultado concuerda con los ensayos de cotransfección, FAK disminuye la afinidad entre RhoJ y el DHPH. Como se ha reportado en la literatura, ITSN1 es un GEF para Cdc42, se comprobó que el DHPH de ITSN1 se une por interacción directa a Cdc42-G15A, la expresión de FAK no afecta esta interacción (Figura 6.15.2).

Con estos resultados se demostró que FAK disminuye la afinidad entre RhoJ y el DHPH de ITSN1, este efecto es específico, debido a que FAK no afecta la afinidad entre Cdc42 y el DHPH de ITSN1. Hasta este punto, FAK fosforila el DHPH de ITSN1, esta fosforilación disminuye la afinidad por RhoJ, esto supondría que al disminuir la afinidad se afecta la activación de RhoJ inducida por el DHPH de ITSN1.



## Resultados



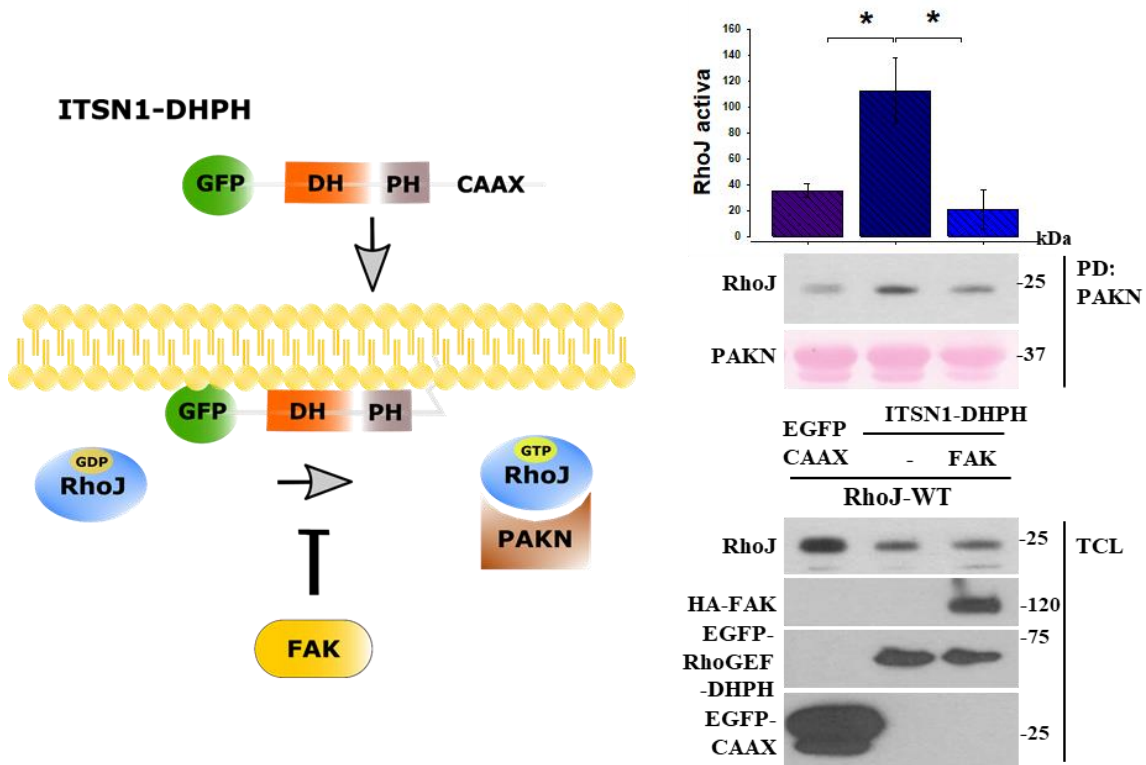
**Figura 6.15.2.- FAK disminuye la afinidad entre el DHPH de ITSN1 y RhoJ, pero no afecta la afinidad por Cdc42.** RhoJ se une al DHPH de ITSN1, células HEK293T transfectadas como se indica en la figura fueron incubadas con perlas de RhoJ-G33A recombinante. La interacción disminuye con la presencia de FAK. Cdc42 se une al DHPH de ITSN1 detectada con Cdc42-G15A recombinante, esta interacción no se afecta por la presencia de FAK. *N*=2.

### 6.16.- FAK evita la activación de RhoJ inducida por el DHPH de ITSN1

La expresión de FAK disminuye la afinidad entre RhoJ y el DHPH de ITSN1, esto hace suponer que FAK disminuiría la activación de RhoJ por el DHPH. Para comprobar esto, células HEK293T se transfectaron con RhoJ-WT, GFP-CAAX, GFP-ITSN1-DHPH y GFP-ITSN1-DHPH con FAK, se obtuvo la fracción activa de RhoJ por interacción con PAKN.

Como ya se había demostrado, el DHPH de ITSN1 promueve la activación de RhoJ, sin embargo, la expresión FAK disminuye esta activación. Estos resultados confirman los hallazgos encontrados en los ensayos de interacción y demuestran que, FAK disminuye la afinidad del DHPH de ITSN1 por RhoJ, lo cual trae como consecuencia, una menor activación de RhoJ (Figura 6.16.1).

## Resultados



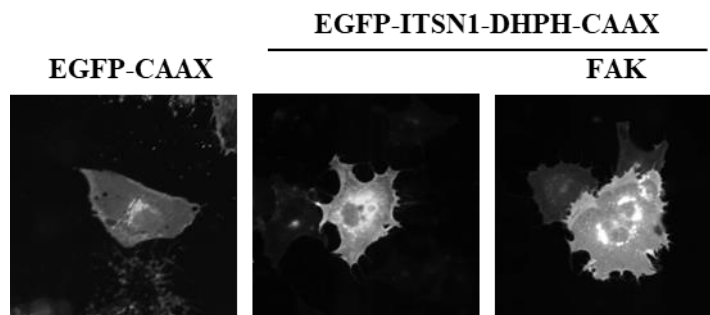
**Figura 6.16.1.- FAK disminuye la activación de RhoJ por el DHPH de ITSN1.** La expresión del DHPH de ITSN1 induce la activación de RhoJ, detectada con perlas de PAKN en células HEK293T. Esta activación se ve afectada con la expresión de FAK. ANOVA una vía, Tukey. \* $P < 0,05$ ,  $N=3$

Datos preliminares buscaron determinar el efecto de FAK en la formación de filopodios por el DHPH de ITSN1. Células PAE se transfectaron con GFP-CAAX, GFP-ITSN1-DHPH y GFP-ITSN1-DHPH con FAK y se observaron en el microscopio NIKON a un aumentos de 40X.

Como se esperaba el DHPH de ITSN1 induce la formación de filopodios, estos filopodios no se afectan con la expresión de FAK. Este resultado podría suponer que Cdc42 rescata la formación de filopodios, debido a que en los ensayos de interacción, la afinidad del DHPH de ITSN1 por Cdc42 no se afecta por la presencia de FAK (Figura 6.16.2).

## Resultados

---



**Figura 6.16.2.- FAK no afecta la formación de filopodios por el DHPH de ITSN1 en células endoteliales.** El DHPH de ITSN1 induce la formación de filopodios en células PAE, estas estructuras no se afectan con la expresión de FAK. N=1

Estos resultados indican que la activación de RhoJ por el módulo DHPH de ITSN1 es regulado por fosforilación en tirosinas dependiente de FAK. Sin embargo, se desconoce si FAK puede regular la actividad de la ITSN1 completa.

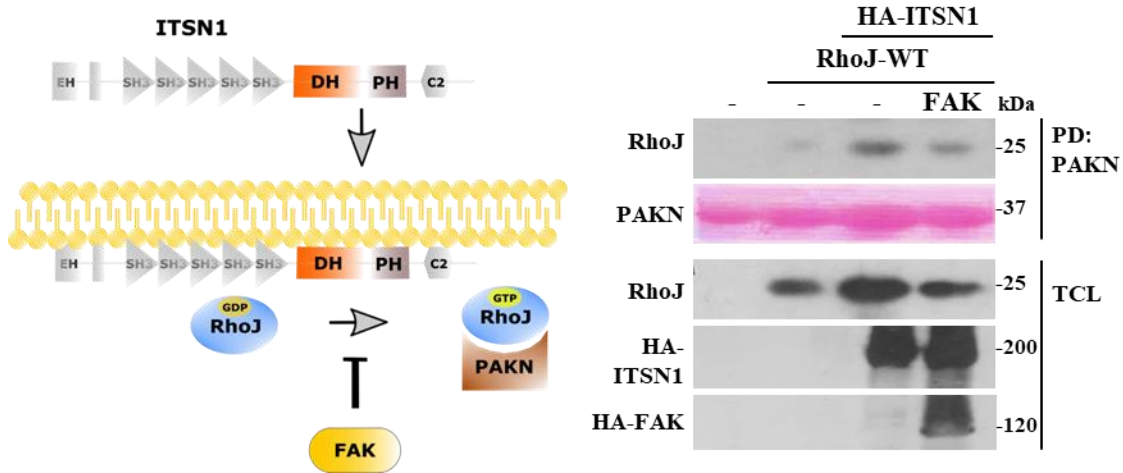
### **6.17.- FAK evita la activación de RhoJ inducida por ITSN1**

Como se demostró en la sección 6.9, la ITSN1 completa induce la activación de RhoJ. ITSN1 tiene múltiples sitios de fosforilación en tirosinas, sin embargo, como se demostró las fosforilaciones en el DHPH regulan la actividad RhoGEF hacia RhoJ.

Para determinar si el efecto observado con FAK en el DHPH se reproduce en la ITSN1 completa, células HEK293T se transfectaron con RhoJ-WT, HA-ITSN1 y HA-ITSN1 con FAK, se determinó la fracción activa de RhoJ por interacción con PAKN.

Como se puede observar ([figura 6.17](#)), la expresión de ITSN1 promueve la activación de RhoJ, con la expresión de FAK, la activación de RhoJ disminuye. Esto demuestra que FAK tiene la capacidad de regular tanto a la versión DHPH como a la ITSN1 completa.

## Resultados



**Figura 6.17.- FAK inhibe la activación de RhoJ por la ITSN1 completa.** La expresión de ITSN1 promueve la activación de RhoJ, detectada con PAKN en células HEK293T. La expresión de FAK disminuye la activación de RhoJ por la ITSN1 en su versión completa. N=2

## Discusión

---

### 7.- Discusión

RhoJ es una GTPasa importante en procesos angiogénicos tumorales, su expresión restringida en endotelio tumoral y ciertas células tumorales, la hace un atractivo blanco terapéutico para evitar el crecimiento de tumores y establecimiento de metástasis. Sin embargo, no se conocen sus activadores ni procesos angiogénicos en los que participa.

La primera etapa de la estrategia experimental fue la identificación de activadores de RhoJ. Los RhoGEFs son proteínas complejas, tienen en común un módulo catalítico DHPH responsable de su actividad RhoGEF. Por ensayos de interacción con RhoJ-G33A se eligieron los candidatos RhoGEFs-DHPH con mayor posibilidad de activar a RhoJ.

Se han reportado 63 RhoGEFs en la base de datos SMART, se cuenta con 20 RhoGEFs-DHPH, de estos, se identificaron 14 con afinidad por RhoJ en los tamizajes iniciales, se redujo a 6 por ensayos de interacción en el sistema de cotransfección. Un dato interesante, de los 6 RhoGEFs-DHPH candidatos, 3 están reportados como GEFs específicos para RhoA.

En los ensayos de activación, de los 6 RhoGEFs-DHPH candidatos, 3 promueven la activación de RhoJ. Debido a que se encontraron otros RhoGEFs-DHPH con cierta afinidad por RhoJ, de igual manera se sometieron a ensayos de activación. Se encontró que 4 RhoGEFs-DHPH adicionales pueden activar a RhoJ, esto da un total de 7 RhoGEFs-DHPH como activadores de RhoJ. Contrario a lo observado en los ensayos de interacción, de los 7 RhoGEFs-DHPH activadores de RhoJ, 4 se reportaron como específicos para Cdc42.

De los ensayos de interacción y activación se obtuvo una observación interesante, la interacción entre el módulo DHPH y RhoJ no necesariamente lleva a una activación, este concepto resulta interesante, debido a la función de los RhoGEFs, en este caso el módulo DHPH, como plataformas moleculares para la integración de cascadas de señalización.

Con esta estrategia experimental se identificaron 7 RhoGEFs-DHPH como activadores de RhoJ, aunque esta estrategia no permitió identificar un nuevo GEF, si permitió identificar activadores para RhoJ, hasta la fecha desconocidos. Además se obtuvo información para refutar la especificidad de algunos GEFs, que se consideran específicos para ciertas RhoGTPasas.

## Discusión

---

En resumen, en la primera etapa se identificaron 7 RhoGEFs-DHPH como activadores de RhoJ, 4 resaltan por promover una activación fuerte de RhoJ. Estos RhoGEFs-DHPH son ITSN1, ARHGEF16, P-REX1 y ARHGEF11.

La segunda etapa de la estrategia experimental consistió en la caracterización de un GEF activador de RhoJ en una cascada de señalización angiogénica. Un primer paso fue elegir un GEF de los 4 activadores de RhoJ. Tomando en cuenta las estructuras del citoesqueleto formadas por las GTPasas; Cdc42 filopodios, Rac1 lamelas y RhoA fibras de estrés, se determinó que RhoJ forma filopodios.

Con base en este resultado, se comprobó el parecido en secuencia y morfología entre Cdc42 y RhoJ, de los 4 GEFs; ITSN1 y ARHGEF16 son GEFs específicos para Cdc42, ARHGEF16 no se expresa en células endoteliales [105], por lo tanto, el GEF elegido fue ITSN1.

La ITSN1 tiene un dominio EH, 5 dominios en tandem SH3, el módulo DHPH y un dominio C2. La ITSN1 participa en procesos de tráfico vesicular, adhesión y modulación del citoesqueleto a través de Cdc42 [108], no existe nada reportado entre ITSN1 y RhoJ.

La expresión del DHPH de ITSN1 en células endoteliales induce la formación de filopodios a través de regular la actividad de RhoJ. El mecanismo involucra el traslado de la construcción en vesículas endosomales hacia la membrana plasmática, lugar donde activa a RhoJ e induce la formación de filopodios.

Similar a ITSN1, RhoJ requiere del tráfico endosomal, como se demostró con la dominante negativa de RhoJ, estos son positivos a Rab5, por lo que son endosomas tempranos. Se ha demostrado que ITSN1 participa en el tráfico endosomal en respuesta a factores de crecimiento [111]. RhoJ es activada por factores de origen tumoral y por VEGF, esto indicaría el reclutamiento de ITSN1 y RhoJ en la membrana para su activación y relocalización mediante el tráfico endosomal.

La señalización de VEGF involucra la participación de cinasas de tirosinas como la cinasa de adhesiones focales (FAK), esta cinasa puede localizarse en endosomas tempranos y regular diversas vías de señalización [119]. Se demostró que FAK lleva a la fosforilación del módulo DHPH de ITSN1, esta fosforilación en tirosinas disminuye la afinidad por RhoJ afectando la activación dependiente de ITSN1.

## Discusión

---

Aunque no se estableció una dependencia directa entre el VEGF e ITSN1, se proporciona evidencia de que ITSN1 puede ser modulada por FAK, una cinasa que se activa río abajo de VEGFR2.

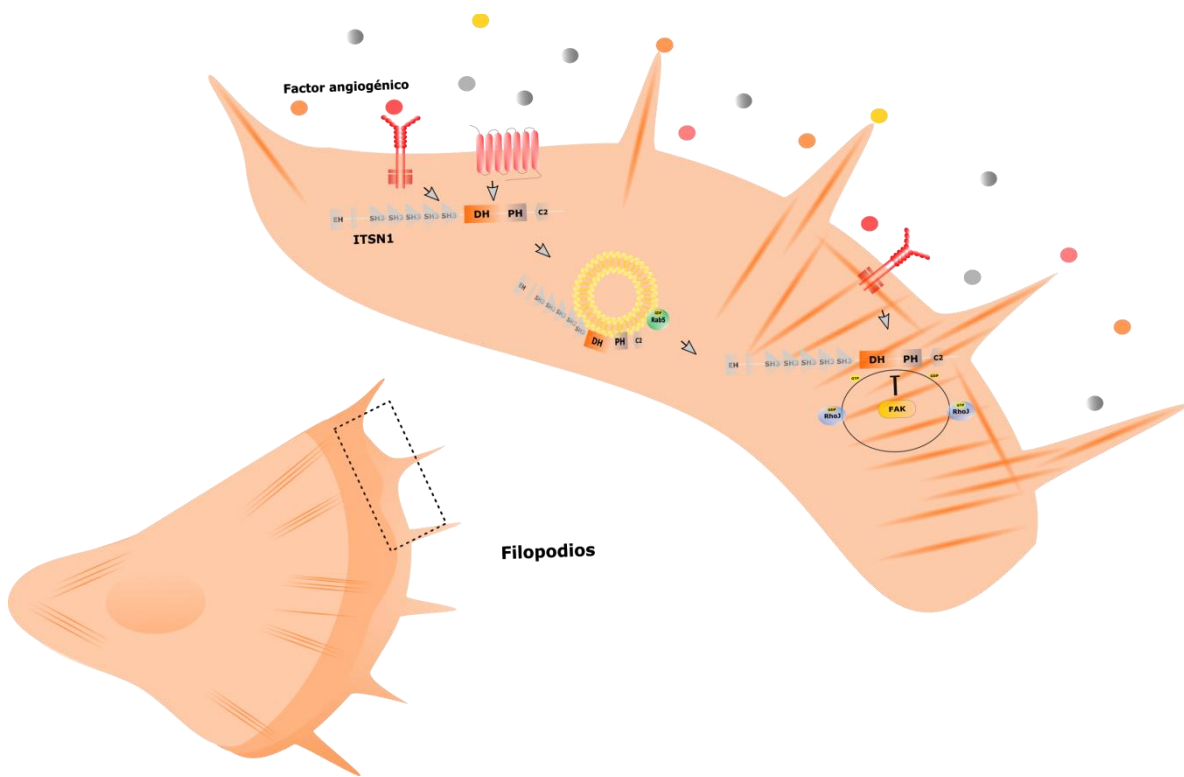
El mecanismo final, propone una maquinaria molecular en endosomas tempranos, el VEGF-A promovería el reclutamiento de ITSN1, RhoJ y FAK, lo cual llevaría a su localización en endosomas tempranos, por un lado FAK inactivaría la función GEF de ITSN1 hacia RhoJ en endosomas tempranos, la liberación en membrana plasmática de ITSN1 promovería la activación de RhoJ y la formación de filopodios.

# Conclusiones

## 8.- Conclusiones

RhoJ es una GTPasa que es activada por factores de origen tumoral y VEGF-A, modula el citoesqueleto en procesos migratorios que conducen al crecimiento de tumores y establecimiento de metástasis.

Se identificaron los primeros RhoGEFs activadores de RhoJ, entre ellos se identificaron a P-REX1, ARHGEF16, ARHGEF11 e ITSN1 que en su versión DHPH promueven la activación de RhoJ. La ITSN1 es un GEF reportado específico para Cdc42, su versión DHPH induce la formación de filopodios a través de la activación de RhoJ.



### Figura 8.- ITSN1 promueve la activación de RhoJ e induce la formación de filopodios por un mecanismo que requiere el tráfico de endosomas.

ITSN1 promueve la activación de RhoJ para la formación de filopodios mediante un mecanismo que involucra el tráfico de endosomas tempranos. Un mecanismo de regulación, involucra la cinasa de adhesiones focales (FAK) que fosforila en tirosinas al módulo DHPH de ITSN1 disminuyendo la afinidad de ITSN1 por RhoJ.

La formación de filopodios por el DHPH de ITSN1 requiere de un mecanismo vesicular que involucra endosomas tempranos. Este mecanismo es bloqueado por la dominante negativa de RhoJ, quien bloquea el tráfico de endosomas tempranos.



## Conclusiones

---

ITSN1 es regulada por fosforilación en tirosinas, FAK es una cinasa que se activa río abajo de VEGFR2 y conduce a la fosforilación del DHPH de ITSN1. Estas fosforilaciones disminuyen la afinidad por RhoJ afectando su activación, pero no afectan la afinidad del DHPH por Cdc42. Esto determina un efecto inhibitorio específico hacia RhoJ.

Con estos resultados, se demuestra que ITSN1 promueve la activación de RhoJ induciendo la formación de filopodios mediante un mecanismo que involucra el tráfico de endosomas tempranos. Como parte de la cascada de señalización, RhoJ se activa río abajo de VEGFR2, en esta cascada también se activa la cinasa de adhesiones focales (FAK) quien fosforila el módulo DHPH de ITSN1 disminuyendo de manera específica, la afinidad del DHPH por RhoJ (Figura 8).

## Perspectivas

---

### **9.- Perspectivas**

Se caracterizó la ITSN1 como activador de RhoJ, sin embargo, de este estudio se identificaron otros GEFs: P-REX1 un RacGEF, ARHGEF11 un RhoAGEF y ARHGEF16 un Cdc42GEF. Estos GEFs deberán probarse si la versión completa tiene la capacidad de activar a RhoJ e inducir cambios en el citoesqueleto vía RhoJ. Además se requiere determinar su participación en procesos angiogénicos.

Se determinó que RhoJ es activada por VEGF-A y medios condicionados de células tumorales, sin embargo, falta determinar que estos estímulos conduzcan a la activación de ITSN1 (captura de GEF completo con RhoJ-G33A) y su participación en la activación de RhoJ (Knock Down de ITSN1).

Se identificó que FAK fosforila el DHPH de ITSN1, en esta región hay dos sitios, se requiere determinar el sitio de fosforilación específico que disminuye la afinidad hacia RhoJ mediante el empleo de mutantes no fosforilables. Además existen otros sitios potenciales de fosforilación en otros dominios de ITSN1 que pueden regular la actividad de ITSN1.

Se requiere determinar de manera específica la fosforilación de ITSN1 por FAK, debido a que otras cinasas como Src se activan río abajo de VEGFR2. Además se requiere determinar el efecto de FAK en ITSN2.

Se requiere determinar de manera endógena la participación de la vía VEGFR2-ITSN1-RhoJ y su regulación por FAK, en procesos de motilidad celular como migración y angiogénesis in vitro.

Se ha reportado que RhoJ participa en la regulación de las adhesiones focales, se requiere determinar el efecto de FAK sobre RhoJ en estas estructuras importantes para la motilidad de células endoteliales.

# Referencias

---

## 10.- Referencias

1. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 298-307.
2. Lu, P. and Z. Werb, *Patterning mechanisms of branched organs*. Science, 2008. **322**(5907): p. 1506-9.
3. Leszczynska, K., et al., *The role of RhoJ in endothelial cell biology and angiogenesis*. Biochemical Society transactions, 2011. **39**(6): p. 1606-11.
4. Gavard, J. and J.S. Gutkind, *VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin*. Nature cell biology, 2006. **8**(11): p. 1223-34.
5. Hellstrom, M., et al., *Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis*. Nature, 2007. **445**(7129): p. 776-80.
6. Benedito, R., et al., *The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis*. Cell, 2009. **137**(6): p. 1124-35.
7. Lawson, C.D. and A.J. Ridley, *Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion*. The Journal of cell biology, 2018. **217**(2): p. 447-457.
8. Vazquez-Prado, J., et al., *Gbetagamma Pathways in Cell Polarity and Migration Linked to Oncogenic GPCR Signaling: Potential Relevance in Tumor Microenvironment*. Molecular pharmacology, 2016. **90**(5): p. 573-586.
9. Ridley, A.J., et al., *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1704-9.
10. Webb, D.J., J.T. Parsons, and A.F. Horwitz, *Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again*. Nature cell biology, 2002. **4**(4): p. E97-100.
11. Kozma, R., et al., *The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts*. Molecular and cellular biology, 1995. **15**(4): p. 1942-52.
12. Boureux, A., et al., *Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes*. Molecular biology and evolution, 2007. **24**(1): p. 203-16.
13. Wennerberg, K. and C.J. Der, *Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it)*. Journal of cell science, 2004. **117**(Pt 8): p. 1301-12.
14. Valencia, A., et al., *The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids*. Biochemistry, 1991. **30**(19): p. 4637-48.
15. Etienne-Manneville, S. and A. Hall, *Rho GTPases in cell biology*. Nature, 2002. **420**(6916): p. 629-35.
16. Bustelo, X.R., V. Sauzeau, and I.M. Berenjeno, *GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo*. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, 2007. **29**(4): p. 356-70.
17. Murga, C., et al., *Rac1 and RhoG promote cell survival by the activation of PI3K and Akt, independently of their ability to stimulate JNK and NF-kappaB*. Oncogene, 2002. **21**(2): p. 207-16.
18. Rossman, K.L., C.J. Der, and J. Sondek, *GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2005. **6**(2): p. 167-80.
19. Moon, S.Y. and Y. Zheng, *Rho GTPase-activating proteins in cell regulation*. Trends in cell biology, 2003. **13**(1): p. 13-22.
20. DerMardirossian, C. and G.M. Bokoch, *GDI: central regulatory molecules in Rho GTPase activation*. Trends in cell biology, 2005. **15**(7): p. 356-63.
21. Fritz, G., I. Just, and B. Kaina, *Rho GTPases are over-expressed in human tumors*. International journal of cancer, 1999. **81**(5): p. 682-7.
22. Porter, A.P., A. Papaioannou, and A. Malliri, *Deregulation of Rho GTPases in cancer*. Small GTPases, 2016. **7**(3): p. 123-38.
23. Schnelzer, A., et al., *Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b*. Oncogene, 2000. **19**(26): p. 3013-20.
24. Del Pulgar, T.G., et al., *Cdc42 is highly expressed in colorectal adenocarcinoma and downregulates ID4 through an epigenetic mechanism*. International Journal of Oncology, 2008. **33**(1): p. 185-193.
25. Kamai, T., et al., *Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2004. **10**(14): p. 4799-805.
26. Liu, Y., et al., *Abnormal expression of p120-catenin, E-cadherin, and small GTPases is significantly associated with malignant phenotype of human lung cancer*. Lung cancer, 2009. **63**(3): p. 375-82.
27. Adamson, P., et al., *Post-translational modifications of p21rho proteins*. The Journal of biological chemistry, 1992. **267**(28): p. 20033-8.
28. Aspenstrom, P., A. Fransson, and J. Saras, *Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system*. The Biochemical journal, 2004. **377**(Pt 2): p. 327-37.

## Referencias

---

29. Haga, R.B. and A.J. Ridley, *Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology*. Small GTPases, 2016. **7**(4): p. 207-221.
30. Clark, E.A., et al., *Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC*. Nature, 2000. **406**(6795): p. 532-5.
31. Posern, G., et al., *Rapid lamellipodia formation in nerve growth factor-stimulated PC12 cells is dependent on Rac and PI3K activity*. Journal of cellular physiology, 2000. **183**(3): p. 416-24.
32. del Pozo, M.A., et al., *Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK*. The EMBO journal, 2000. **19**(9): p. 2008-14.
33. Tan, W., et al., *An essential role for Rac1 in endothelial cell function and vascular development*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2008. **22**(6): p. 1829-38.
34. Palamidessi, A., et al., *Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration*. Cell, 2008. **134**(1): p. 135-47.
35. Bokoch, G.M., B.P. Bohl, and T.H. Chuang, *Guanine nucleotide exchange regulates membrane translocation of Rac/Rho GTP-binding proteins*. The Journal of biological chemistry, 1994. **269**(50): p. 31674-9.
36. Ando, S., et al., *Post-translational processing of rac p21s is important both for their interaction with the GDP/GTP exchange proteins and for their activation of NADPH oxidase*. The Journal of biological chemistry, 1992. **267**(36): p. 25709-13.
37. Ahmed, S., et al., *Cryptic Rac-binding and p21(Cdc42Hs/Rac)-activated kinase phosphorylation sites of NADPH oxidase component p67(phox)*. The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(25): p. 15693-701.
38. Brenner, B., et al., *L-selectin regulates actin polymerisation via activation of the small G-protein Rac2*. Biochemical and biophysical research communications, 1997. **231**(3): p. 802-7.
39. Shinjo, K., et al., *Molecular cloning of the gene for the human placental GTP-binding protein Gp (G25K): identification of this GTP-binding protein as the human homolog of the yeast cell-division-cycle protein CDC42*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. **87**(24): p. 9853-7.
40. Lin, R., et al., *A novel Cdc42Hs mutant induces cellular transformation*. Current biology : CB, 1997. **7**(10): p. 794-7.
41. Lin, R., R.A. Cerione, and D. Manor, *Specific contributions of the small GTPases Rho, Rac, and Cdc42 to Dbl transformation*. The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(33): p. 23633-41.
42. Wu, W.J., et al., *The gamma-subunit of the coatamer complex binds Cdc42 to mediate transformation*. Nature, 2000. **405**(6788): p. 800-4.
43. Erickson, J.W., et al., *Mammalian Cdc42 is a brefeldin A-sensitive component of the Golgi apparatus*. The Journal of biological chemistry, 1996. **271**(43): p. 26850-4.
44. Zheng, Y., S. Bagrodia, and R.A. Cerione, *Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85*. The Journal of biological chemistry, 1994. **269**(29): p. 18727-30.
45. Olson, M.F., A. Ashworth, and A. Hall, *An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1*. Science, 1995. **269**(5228): p. 1270-2.
46. Teramoto, H., et al., *Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family*. The Journal of biological chemistry, 1996. **271**(44): p. 27225-8.
47. Allen, W.E., et al., *A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis*. The Journal of cell biology, 1998. **141**(5): p. 1147-57.
48. Czuchra, A., et al., *Cdc42 is not essential for filopodium formation, directed migration, cell polarization, and mitosis in fibroblastoid cells*. Molecular biology of the cell, 2005. **16**(10): p. 4473-84.
49. Murphy, G.A., et al., *Cellular functions of TC10, a Rho family GTPase: regulation of morphology, signal transduction and cell growth*. Oncogene, 1999. **18**(26): p. 3831-45.
50. Vignal, E., et al., *Characterization of TCL, a new GTPase of the rho family related to TC10 and Ccdc42*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(46): p. 36457-64.
51. Chiang, S.H., et al., *Cloning and functional characterization of related TC10 isoforms, a subfamily of Rho proteins involved in insulin-stimulated glucose transport*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(15): p. 13067-73.
52. de Toledo, M., et al., *The GTP/GDP cycling of rho GTPase TCL is an essential regulator of the early endocytic pathway*. Molecular biology of the cell, 2003. **14**(12): p. 4846-56.
53. Jack, E.R., et al., *Membrane interactions of peptides representing the polybasic regions of three Rho GTPases are sensitive to the distribution of arginine and lysine residues*. Molecular membrane biology, 2008. **25**(1): p. 14-22.

## Referencias

---

54. Ackermann, K.L., et al., *TCL/RhoJ Plasma Membrane Localization and Nucleotide Exchange Is Coordinately Regulated by Amino Acids within the N Terminus and a Distal Loop Region*. The Journal of biological chemistry, 2016. **291**(45): p. 23604-23617.
55. Florke, R.R., G.T. Young, and M.J. Hamann, *Unraveling a model of TCL/RhoJ allostereism using TC10 reverse chimeras*. Small GTPases, 2020. **11**(2): p. 138-145.
56. Abe, T., et al., *Small GTPase Tc10 and its homologue RhoT induce N-WASP-mediated long process formation and neurite outgrowth*. Journal of cell science, 2003. **116**(Pt 1): p. 155-68.
57. Herbert, J.M., et al., *A novel method of differential gene expression analysis using multiple cDNA libraries applied to the identification of tumour endothelial genes*. BMC genomics, 2008. **9**: p. 153.
58. Yuan, L., et al., *RhoJ is an endothelial cell-restricted Rho GTPase that mediates vascular morphogenesis and is regulated by the transcription factor ERG*. Blood, 2011. **118**(4): p. 1145-53.
59. Kaur, S., et al., *RhoJ/TCL regulates endothelial motility and tube formation and modulates actomyosin contractility and focal adhesion numbers*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2011. **31**(3): p. 657-64.
60. Masiero, M., et al., *A core human primary tumor angiogenesis signature identifies the endothelial orphan receptor ELTD1 as a key regulator of angiogenesis*. Cancer cell, 2013. **24**(2): p. 229-41.
61. Kim, C., et al., *Vascular RhoJ is an effective and selective target for tumor angiogenesis and vascular disruption*. Cancer cell, 2014. **25**(1): p. 102-17.
62. Kim, C., et al., *Rho GTPase RhoJ is Associated with Gastric Cancer Progression and Metastasis*. Journal of Cancer, 2016. **7**(11): p. 1550-6.
63. Ho, H., et al., *RhoJ regulates melanoma chemoresistance by suppressing pathways that sense DNA damage*. Cancer research, 2012. **72**(21): p. 5516-28.
64. Cervantes-Villagrana, R.D., et al., *Protumoral bone marrow-derived cells migrate via Gbetagamma-dependent signaling pathways and exhibit a complex repertoire of RhoGEFs*. Journal of cell communication and signaling, 2019. **13**(2): p. 179-191.
65. Fukushima, Y., et al., *Sema3E-PlexinD1 signaling selectively suppresses disoriented angiogenesis in ischemic retinopathy in mice*. The Journal of clinical investigation, 2011. **121**(5): p. 1974-85.
66. Kusahara, S., et al., *Arhgef15 promotes retinal angiogenesis by mediating VEGF-induced Cdc42 activation and potentiating RhoJ inactivation in endothelial cells*. PloS one, 2012. **7**(9): p. e45858.
67. Takase, H., et al., *Genome-wide identification of endothelial cell-enriched genes in the mouse embryo*. Blood, 2012. **120**(4): p. 914-23.
68. Sundararaman, A., et al., *RhoJ Regulates alpha5beta1 Integrin Trafficking to Control Fibronectin Remodeling during Angiogenesis*. Current biology : CB, 2020.
69. Liu, L., et al., *RhoJ promotes hypoxia induced endothelial-to-mesenchymal transition by activating WDR5 expression*. Journal of cellular biochemistry, 2018. **119**(4): p. 3384-3393.
70. Nishizuka, M., et al., *Crucial role of TCL/TC10beta L, a subfamily of Rho GTPase, in adipocyte differentiation*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(17): p. 15279-84.
71. Kawaji, A., et al., *TC10-like/TC10betaLong regulates adipogenesis by controlling mitotic clonal expansion*. Biological & pharmaceutical bulletin, 2010. **33**(3): p. 404-9.
72. Yasuda, S., et al., *An essential role of Cdc42-like GTPases in mitosis of HeLa cells*. FEBS letters, 2006. **580**(14): p. 3375-80.
73. Monypenny, J., et al., *Cdc42 and Rac family GTPases regulate mode and speed but not direction of primary fibroblast migration during platelet-derived growth factor-dependent chemotaxis*. Molecular and cellular biology, 2009. **29**(10): p. 2730-47.
74. Hou, A., et al., *Rho GTPases and regulation of cell migration and polarization in human corneal epithelial cells*. PloS one, 2013. **8**(10): p. e77107.
75. Ho, H., et al., *RhoJ modulates melanoma invasion by altering actin cytoskeletal dynamics*. Pigment cell & melanoma research, 2013. **26**(2): p. 218-25.
76. Ruiz, R., et al., *The RhoJ-BAD signaling network: An Achilles' heel for BRAF mutant melanomas*. PLoS genetics, 2017. **13**(7): p. e1006913.
77. Eelen, G., et al., *Role of glutamine synthetase in angiogenesis beyond glutamine synthesis*. Nature, 2018. **561**(7721): p. 63-69.
78. Billottet, C., et al., *Regulatory signals for endothelial podosome formation*. European journal of cell biology, 2008. **87**(8-9): p. 543-54.
79. Richards, M., C. Hetheridge, and H. Mellor, *The Formin FMNL3 Controls Early Apical Specification in Endothelial Cells by Regulating the Polarized Trafficking of Podocalyxin*. Current biology : CB, 2015. **25**(17): p. 2325-31.
80. Wilson, E., et al., *RhoJ interacts with the GIT-PIX complex and regulates focal adhesion disassembly*. Journal of cell science, 2014. **127**(Pt 14): p. 3039-51.

## Referencias

---

81. Mills, J., et al., *Chromatin structure predicts epigenetic therapy responsiveness in sarcoma*. Molecular cancer therapeutics, 2011. **10**(2): p. 313-24.
82. Liu, S., et al., *Anti-RhoJ antibody functionalized Au@I nanoparticles as CT-guided tumor vessel-targeting radiosensitizers in patient-derived tumor xenograft model*. Biomaterials, 2017. **141**: p. 1-12.
83. Peffer, M.E., et al., *Caveolin-1 regulates genomic action of the glucocorticoid receptor in neural stem cells*. Molecular and cellular biology, 2014. **34**(14): p. 2611-23.
84. Molina-Navarro, M.M., et al., *Functional networks of nucleocytoplasmic transport-related genes differentiate ischemic and dilated cardiomyopathies. A new therapeutic opportunity*. PloS one, 2014. **9**(8): p. e104709.
85. Renauer, P., et al., *DNA methylation patterns in naive CD4+ T cells identify epigenetic susceptibility loci for malar rash and discoid rash in systemic lupus erythematosus*. Lupus science & medicine, 2015. **2**(1): p. e000101.
86. Cote, J.F. and K. Vuori, *Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity*. Journal of cell science, 2002. **115**(Pt 24): p. 4901-13.
87. Eva, A. and S.A. Aaronson, *Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma*. Nature, 1985. **316**(6025): p. 273-5.
88. Eva, A., et al., *The predicted DBL oncogene product defines a distinct class of transforming proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988. **85**(7): p. 2061-5.
89. Hart, M.J., et al., *Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product*. Nature, 1991. **354**(6351): p. 311-4.
90. Hart, M.J., et al., *Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product*. The Journal of biological chemistry, 1994. **269**(1): p. 62-5.
91. Rusu, L., et al., *G protein-dependent basal and evoked endothelial cell vWF secretion*. Blood, 2014. **123**(3): p. 442-50.
92. Guilluy, C., et al., *The Rho exchange factor Arhgef1 mediates the effects of angiotensin II on vascular tone and blood pressure*. Nature medicine, 2010. **16**(2): p. 183-90.
93. Brown, J.P., et al., *Arhgef1 is required by T cells for the development of airway hyperreactivity and inflammation*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2007. **176**(1): p. 10-9.
94. Fukuhara, S., et al., *A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho*. The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(9): p. 5868-79.
95. Chikumi, H., S. Fukuhara, and J.S. Gutkind, *Regulation of G protein-linked guanine nucleotide exchange factors for Rho, PDZ-RhoGEF, and LARG by tyrosine phosphorylation: evidence of a role for focal adhesion kinase*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(14): p. 12463-73.
96. Taya, S., et al., *Direct interaction of insulin-like growth factor-1 receptor with leukemia-associated RhoGEF*. The Journal of cell biology, 2001. **155**(5): p. 809-20.
97. Ong, D.C., et al., *LARG at chromosome 11q23 has functional characteristics of a tumor suppressor in human breast and colorectal cancer*. Oncogene, 2009. **28**(47): p. 4189-200.
98. Cook, D.R., K.L. Rossman, and C.J. Der, *Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease*. Oncogene, 2014. **33**(31): p. 4021-35.
99. Adame-Garcia, S.R., et al., *cAMP-dependent activation of the Rac guanine exchange factor P-REX1 by type I protein kinase A (PKA) regulatory subunits*. The Journal of biological chemistry, 2019. **294**(7): p. 2232-2246.
100. Robles-Molina, E., et al., *Gbetagamma interacts with mTOR and promotes its activation*. Biochemical and biophysical research communications, 2014. **444**(2): p. 218-23.
101. Chavez-Vargas, L., et al., *Protein Kinase A (PKA) Type I Interacts with P-Rex1, a Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor: EFFECT ON PKA LOCALIZATION AND P-Rex1 SIGNALING*. The Journal of biological chemistry, 2016. **291**(12): p. 6182-99.
102. Welch, H.C., *Regulation and function of P-Rex family Rac-GEFs*. Small GTPases, 2015. **6**(2): p. 49-70.
103. Guipponi, M., et al., *Two isoforms of a human intersectin (ITSN) protein are produced by brain-specific alternative splicing in a stop codon*. Genomics, 1998. **53**(3): p. 369-76.
104. Pucharcos, C., et al., *The human intersectin genes and their spliced variants are differentially expressed*. Biochimica et biophysica acta, 2001. **1521**(1-3): p. 1-11.
105. Hernandez-Garcia, R., et al., *Endothelial RhoGEFs: A systematic analysis of their expression profiles in VEGF-stimulated and tumor endothelial cells*. Vascular pharmacology, 2015. **74**: p. 60-72.
106. Yamabhai, M., et al., *Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains*. The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(47): p. 31401-7.
107. Gryaznova, T., et al., *WIP/ITSN1 complex is involved in cellular vesicle trafficking and formation of filopodia-like protrusions*. Gene, 2018. **674**: p. 49-56.
108. Hussain, N.K., et al., *Splice variants of intersectin are components of the endocytic machinery in neurons and nonneuronal cells*. The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(22): p. 15671-7.

## Referencias

---

109. Wang, J.B., W.J. Wu, and R.A. Cerione, *Cdc42 and Ras cooperate to mediate cellular transformation by intersectin-L*. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(24): p. 22883-91.
110. Tong, X.K., et al., *The endocytic protein intersectin is a major binding partner for the Ras exchange factor mSos1 in rat brain*. The EMBO journal, 2000. **19**(6): p. 1263-71.
111. Hussain, N.K., et al., *Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP*. Nature cell biology, 2001. **3**(10): p. 927-32.
112. Ioannou, M.S., et al., *Intersectin-s interaction with DENND2B facilitates recycling of epidermal growth factor receptor*. EMBO reports, 2017. **18**(12): p. 2119-2130.
113. Kintscher, C., et al., *Autoinhibition of GEF activity in Intersectin 1 is mediated by the short SH3-DH domain linker*. Protein science : a publication of the Protein Society, 2010. **19**(11): p. 2164-74.
114. Malacombe, M., et al., *Intersectin-1L nucleotide exchange factor regulates secretory granule exocytosis by activating Cdc42*. The EMBO journal, 2006. **25**(15): p. 3494-503.
115. Makhoul, C., et al., *Intersectin-1 interacts with the golgin GCC88 to couple the actin network and Golgi architecture*. Molecular biology of the cell, 2019. **30**(3): p. 370-386.
116. Shao, Y., et al., *Alternative splicing-derived intersectin1-L and intersectin1-S exert opposite function in glioma progression*. Cell death & disease, 2019. **10**(6): p. 431.
117. Xie, C., et al., *Intersectin 1 (ITSN1) identified by comprehensive bioinformatic analysis and experimental validation as a key candidate biological target in breast cancer*. OncoTargets and therapy, 2019. **12**: p. 7079-7093.
118. Yoon, H., et al., *Understanding the roles of FAK in cancer: inhibitors, genetic models, and new insights*. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society, 2015. **63**(2): p. 114-28.
119. Alanko, J. and J. Ivaska, *Endosomes: Emerging Platforms for Integrin-Mediated FAK Signalling*. Trends in cell biology, 2016. **26**(6): p. 391-398.

## 11.- Publicaciones



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)



### Endothelial cell sprouting driven by RhoJ directly activated by a membrane-anchored Intersectin 1 (ITSN1) RhoGEF module

Víctor Manuel Color-Aparicio<sup>a</sup>, Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana<sup>a</sup>,  
Irving García-Jiménez<sup>b</sup>, Yarely Mabel Beltrán-Navarro<sup>a</sup>, Alejandro Castillo-Kauil<sup>b</sup>,  
Estanislao Escobar-Islas<sup>a</sup>, Guadalupe Reyes-Cruz<sup>b</sup>, José Vázquez-Prado<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departments of Pharmacology, CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico  
<sup>b</sup> Departments of Cell Biology, CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico

Journal of Cell Communication and Signaling (2019) 13:179–191  
<https://doi.org/10.1007/s12079-018-00502-6>



### Protumoral bone marrow-derived cells migrate via Gβγ-dependent signaling pathways and exhibit a complex repertoire of RhoGEFs

Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana<sup>1</sup> · Víctor Manuel Color-Aparicio<sup>1</sup> · Guadalupe Reyes-Cruz<sup>2</sup> · José Vázquez-Prado<sup>1</sup>

Received: 4 October 2018 / Accepted: 14 December 2018 / Published online: 5 January 2019  
© The International CCN Society 2019

**JBC ARTICLE**



### Gβγ signaling to the chemotactic effector P-REX1 and mammalian cell migration is directly regulated by Gα<sub>q</sub> and Gα<sub>13</sub> proteins

Received for publication, October 15, 2018, and in revised form, November 12, 2018. Published, Papers in Press, November 16, 2018, DOI 10.1074/jbc.RA118.006254

✉ Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana<sup>‡</sup>, Sendi Rafael Adame-García<sup>§</sup>, Irving García-Jiménez<sup>§</sup>,  
Víctor Manuel Color-Aparicio<sup>‡</sup>, Yarely Mabel Beltrán-Navarro<sup>‡</sup>, Gabriele M. König<sup>¶</sup>, ✉ Evi Kostenis<sup>¶</sup>,  
Guadalupe Reyes-Cruz<sup>§</sup>, J. Silvio Gutkind<sup>||</sup>, and ✉ José Vázquez-Prado<sup>‡1</sup>

From the Departments of <sup>‡</sup>Pharmacology and <sup>§</sup>Cell Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), 07360 Mexico City, Mexico, the <sup>¶</sup>University of Bonn, Institute of Pharmaceutical Biology, 53115 Bonn, Germany, and the <sup>||</sup>Moore's Cancer Center and Department of Pharmacology, University of California, San Diego, La Jolla, California 92093

Edited by Henrik G. Dohlman