

Universidad Cardenal Herrera-CEU
Departamento de Química, Bioquímica y Biología Molecular



Efecto de la proteína RhoE sobre la proliferación y supervivencia de células de glioblastoma humano

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Enric Poch Jiménez

Dirigida por: Ignacio Pérez Roger

VALENCIA

2005

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	III
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 CICLO CELULAR.....	7
1.1.1 <i>Proteínas reguladoras del ciclo celular: ciclinas y Cdks</i>	9
1.1.2 <i>Complejos ciclina/Cdk: funcionamiento y regulación dentro del ciclo celular</i>	10
1.1.3 <i>La proteína de Retinoblastoma (Rb)</i>	13
1.2 VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES	16
1.2.1 <i>Vía Ras/Raf/MEK/ERK</i>	16
1.2.2 <i>Vía PI3 kinasa/AKT</i>	17
1.3 LA FAMILIA RHO	22
1.3.1 <i>Proteínas Rho y citoesqueleto</i>	25
1.3.2 <i>Proteínas Rho y ciclo celular</i>	28
1.3.3 <i>Proteínas Rho y cáncer</i>	31
1.3.4 <i>Rho y muerte celular</i>	32
1.3.5 <i>RhoE/Rnd3</i>	33
2. OBJETIVOS.....	37
3. MATERIAL Y MÉTODOS	39
3.1 OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE DNA	39
3.2 CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES.....	39
3.3 OBTENCIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES ADENOVIRALES.....	40
3.3.1 <i>Obtención de los adenovirus</i>	44
3.3.2 <i>Titulación adenoviral</i>	47
3.3.3 <i>Infección adenoviral</i>	48
3.4 ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR	48
3.4.1 <i>Contaje celular</i>	48
3.4.2 <i>Incorporación de BrdU</i>	48
3.4.3 <i>Análisis de la muerte celular por citometría de flujo</i>	49
3.5 TINCIÓN DE ACTINA CON FALOIDINA	50

3.6 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE WESTERN-BLOT	50
3.7 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD KINASA DE CICLINA E	54
3.8 EXTRACCIÓN DE RNA Y ANÁLISIS POR QRT-PCR	55
3.8.1 <i>Análisis de la expresión de mRNA</i>	57
4. RESULTADOS	59
4.1 EXPRESIÓN DE RHOE EN CÉLULAS U87 MEDIANTE INFECCIÓN ADENOVIRAL ...	59
4.2 RHOE INDUCE LA DESORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA EN CÉLULAS U87	62
4.3 RHOE AFECTA AL CRECIMIENTO EN CULTIVO DE CÉLULAS U87	64
4.4 RHOE DISMINUYE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA DE RETINOBLASTOMA (Rb)	68
4.5 RHOE REDUCE LA ENTRADA EN LA FASE S DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS U87 QUIESCENTES	72
4.6 RHOE RETRASA LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA DE RETINOBLASTOMA (Rb) EN CÉLULAS U87 REESTIMULADAS MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE LA INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CICLINA D1	73
4.7 LA FOSFORILACIÓN DE Rb DEPENDE DE CICLINA E EN CÉLULAS QUE EXPRESAN RHOE	76
4.8 RHOE BLOQUEA LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADA POR ERK	78
4.9 RHOE INDUCE LA MUERTE DE CÉLULAS U87	80
4.10 LA RUTA DE SUPERVIVENCIA DE AKT NO ESTÁ IMPLICADA EN LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR RHOE	82
4.11 RHOE TAMBIÉN INDUCE LA MUERTE CELULAR A TRAVÉS DE UNA VÍA AKT- INDEPENDIENTE EN ASTROCITOS PRIMARIOS DE RATA	87
4.12 RHOE Y RHOA PRODUCEN EFECTOS ANTAGÓNICOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA CELULAR	92
5. DISCUSIÓN.....	97
6. CONCLUSIONES.....	111
7. BIBLIOGRAFÍA.....	113

ABREVIATURAS

- **AdC:** Adeno Control
- **AdMyrAkt:** Ad-HA-MyrAkt
- **AddnAkt:** Ad-HA-dnAkt
- **AdRhoA:** Adeno V14RhoA
- **AdRhoE:** Adeno RhoE
- **cDNA:** DNA complementario
- **CKI:** *cyclin-dependent kinase inhibitor*, inhibidor de kinasas dependientes de ciclinas
- **D-10:** DMEM suplementado con 10% FBS y con un 1% de P/S como antibiótico
- **DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- **DTT:** 1,4 ditiotreitól
- **ERK:** *Extracellular-signal-regulated Kinase*, kinasa regulada por señales extracelulares
- **FAK:** *focal Adhesion Kinase*, kinasa de adhesiones focales
- **FBS:** *foetal bovine serum*, suero bovino fetal
- **GAPDH:** *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, gliceraldehído 3' fosfato deshidrogenasa
- **GFP:** *green fluorescent protein*, proteína fluorescente verde
- **GDP:** Guanosín difosfato
- **GTP:** Guanosín trifosfato
- **IP:** inmunoprecipitación
- **MDCK:** *Madin-Darby canine kidney*, células epiteliales de riñón
- **MEC:** Matriz extracelular
- **MLCK:** *Myosin light chain kinase*, kinasa de la cadena ligera de la miosina
- **MLCP:** *Myosin light chain phosphatase*, fosfatasa de la cadena ligera de la miosina
- **MOI:** *Multiplicity of Infection*, multiplicidad de la infección
- **P/S:** penicilina y estreptomicina
- **PBS:** tampón fosfato salino
- **PBT:** PBS + 0.1% Tween-20

- **PCR:** *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa
- **PDK:** *Phosphoinositide-dependent Kinases*, kinasas dependientes de fosfatidil inositoles
- **PI:** yoduro de propidio
- **PIP2:** fosfatidil inositol 3,4-bifosfato
- **PIP3:** fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato
- **PVDF:** polifluoruro de vinilideno
- **qRT-PCR:** análisis cuantitativo y en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa
- **ROCK:** *Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase*
- **RTK:** receptor tirosina kinasa
- **SDS:** dodecilsulfato sódico
- **SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
- **SEM:** error estándar de la media
- **SNC:** Sistema nervioso central
- **WB:** Western-blot

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer engloba un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento excesivo y descontrolado de células que invaden y dañan tejidos y órganos, provocando finalmente la muerte del individuo. Puede considerarse una enfermedad genética que se desarrolla en organismos superiores, en la mayoría de los tejidos y en todo tipo de células*.

El cáncer aparece como resultado de dos procesos sucesivos: un aumento en la proliferación de un grupo de células (tumor), y la posterior adquisición de una capacidad invasiva que permite a estas células escapar de su lugar de origen en el organismo y colonizar y proliferar en otros tejidos u órganos (metástasis). Cada tipo de cáncer es distinto, con unas determinadas características dependiendo del tipo de célula donde se origina, sus causas, su mecanismo de acción, el grado de malignidad y otros factores.

La proliferación acelerada que caracteriza a las células tumorales es independiente de factores de crecimiento, y se produce como resultado de alteraciones en los mecanismos de regulación del ciclo celular, que inducen tanto la progresión del ciclo como la inhibición de la muerte celular por apoptosis. Además, presentan también alteraciones en la estructura del citoesqueleto, lo que conduce a cambios en la morfología y en su capacidad de unión a la matriz extracelular (MEC) y a las células de su entorno.

El proceso de transformación tumoral implica una acumulación importante de alteraciones sucesivas en distintos genes, que confiere una ventaja selectiva a las células que la presentan y favorece su proliferación. La mayoría de los cánceres se deben a cambios genéticos inducidos por mutaciones, que pueden ser producidas por agentes cancerígenos, así como por errores espontáneos o inducidos en la replicación y reparación del DNA. Estas

* Introducción extraída de Muñoz (1997) y Mendelsohn *et al.* (2001)

mutaciones tienen lugar en tres tipos de genes que controlan el ciclo celular y el proceso de muerte o apoptosis: los proto-oncogenes, los genes supresores de tumores y los genes de reparación del DNA. La velocidad de crecimiento de una célula en cada momento es el resultado de la acción simultánea de los productos de los proto-oncogenes, que inducen el ciclo celular, y de los genes supresores de tumores, que lo inhiben. La mutación en los genes de reparación del DNA favorece la aparición de múltiples mutaciones en el genoma, que cuando implican a proto-oncogenes o a genes supresores de tumores tienen carácter cancerígeno.

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) constituyen aproximadamente el 1.4% del total, produciendo el 2.3% de las muertes directamente causadas por el cáncer. Este tipo de tumores afecta más frecuentemente a adultos que a adolescentes o jóvenes. En la actualidad, se estima que se diagnostican unos 20.000 casos nuevos de tumores del SNC al año, sin incluir los que suponen metástasis cerebrales.

A pesar del pequeño número de tumores cerebrales, en comparación con otros más frecuentes como tumores de colon, pulmón o mama, la morbilidad y mortalidad que causan en la población es altamente significativa. En niños, los tumores del SNC son, tras las leucemias, la segunda causa de muerte debida al cáncer. En adultos, los tumores del SNC son la tercera o cuarta causa de muerte.

Dentro de los tumores cerebrales, los denominados glioblastomas son el tipo de neoplasia más frecuente y maligno dividiéndose en: astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas (Kleihues *et al.* 2000). Los glioblastomas constituyen el 75% de los tumores en pediatría y el 45% en adultos.

En la clínica, se diferencia entre dos formas de presentación de los glioblastomas (Kleihues *et al.* 1997): por una parte, los denominados glioblastomas primarios o *de novo*, que se desarrollan más rápidamente y con

una historia clínica de corta duración. En segundo lugar, los glioblastomas secundarios, desarrollados mediante progresión tumoral a partir de astrocitomas. Existe una evidencia clínica de que estos subtipos de glioblastomas constituyen dos entidades clínicas diferentes, que se manifiestan en pacientes de edad diferente y se desarrollan mediante rutas genéticas distintas (Kleihues *et al.* 1999). Los glioblastomas primarios se presentan en pacientes de mayor edad y se caracterizan por la presentación de amplificación/sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), mutaciones de PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*), deleciones de p16^{Ink4a} o sobreexpresión de MDM2. Por contra, los glioblastomas secundarios se presentan en pacientes más jóvenes y contienen mutaciones de p53 como característica genética preponderante, aunque no exclusiva.

Los modelos animales (ratones *Knock-out*, *Knock-in*, transgénicos) recapitulan los efectos encontrados en los tumores del SNC en humanos y permiten establecer nuevas vías para el diseño de ensayos preclínicos y el desarrollo de nuevas terapias específicas, basadas en la etiología de los diferentes tipos de tumores (Holland 2001a, 2001b; Hesselager *et al.* 2003).

1.1 Ciclo celular*

La serie de sucesos por los que una célula da lugar a dos células hijas se denomina ciclo celular, y comprende el periodo entre dos divisiones mitóticas. La regulación del ciclo celular en células de mamíferos depende tanto de un control interno como de las condiciones ambientales externas y de la presencia de factores de crecimiento necesarios para la célula.

El ciclo celular consta de dos fases principales, síntesis (S) y mitosis (M), separadas por dos interfases, G1 y G2. Existen dos puntos principales de control que se sitúan en las transiciones de las fases G1 a S y de G2 a M, y

otro que se encuentra en la mitad de M. Gracias a estos puntos de control, las células sólo inician una nueva fase de división cuando se han cumplido las condiciones necesarias en cada punto y se ha finalizado correctamente la fase anterior. Cuando las condiciones ambientales no son favorables para que se produzca proliferación celular, el ciclo se detiene en la fase G1 y la célula entra en un estado de reposo conocido como quiescencia o fase G0.

El ciclo celular completo dura unas 24 hrs., aunque hay variaciones. La fase G1 es el periodo de 6 a 12 hrs. que sigue a una división celular, durante el que la célula duplica su tamaño y su masa debido a la síntesis continua de todos sus componentes. En este periodo hay una dependencia de las condiciones externas para que se dé una progresión a lo largo de esta fase.

Al final de la fase G1 aparece el primer punto de control del ciclo celular, el llamado punto de restricción R, que marca la transición G1/S a partir de la cual desaparece la dependencia de señales mitogénicas para que el ciclo pueda seguir avanzando. La fosforilación de una proteína central en el control del ciclo celular, la proteína de Retinoblastoma (Rb), es la que define a nivel molecular este punto de restricción (Sherr 1994; Sherr *et al.* 2002; Stevaux *et al.* 2002; Chau *et al.* 2003).

Después de este primer control del ciclo, las células entran en la fase S, que tiene una duración de 6-8 hrs., y es donde se produce la replicación del DNA. A continuación comienza la fase G2, de una duración de 3-4 hrs., donde las células se preparan para separarse en dos células hijas iguales. En esta fase existe un segundo punto de control G2/M, en el que la célula comprueba que ha duplicado la masa celular y que ha completado correctamente la replicación del DNA y que este proceso lo ha realizado una sola vez. En este momento actúan los productos de los genes de reparación del DNA, para corregir los errores que se hayan podido producir en el proceso de replicación. Si estos errores no se pueden subsanar o son demasiados, se activa el proceso de apoptosis inducido por p53.

Finalmente, las células entran en fase M, de duración aproximada de 1 hora. El tercer punto de control se produce aquí, entre la metafase y la anafase, y asegura que la célula no se divida si hay errores en la formación del huso acromático o en la alineación de los cromosomas en la placa ecuatorial.

1.1.1 Proteínas reguladoras del ciclo celular: ciclinas y Cdks

Las proteínas responsables de la progresión a lo largo del ciclo celular son las ciclinas y las kinasas dependientes de ciclinas (Cdks). Las kinasas coordinan los procesos de control del ciclo celular, y su actividad está regulada por su asociación reversible con las ciclinas. Las ciclinas presentan oscilaciones en su concentración, existiendo un periodo de síntesis y otro de degradación durante cada ciclo celular. Además de su unión a ciclinas, las kinasas pueden ser también reguladas por procesos de fosforilación-defosforilación y por su unión con proteínas inhibidoras (revisado en Swanton 2004).

Hay dos clases principales de ciclinas: las ciclinas G1, que se unen a Cdks durante la fase G1 y son necesarias para el inicio de la fase S, y las ciclinas G2 o mitóticas, que se unen a Cdks durante la fase G2 siendo esenciales para la entrada en M.

Existen numerosas ciclinas, pero las principales y más estudiadas en humanos son las ciclinas A, B, D y E. Las ciclinas de la fase G1 son las ciclinas de tipo D (D1, D2 y D3) y las ciclinas de tipo E (E1 y E2). Estos dos tipos de ciclinas se sintetizan durante la fase G1 y su concentración celular se regula por transcripción y por degradación en el proteasoma, haciendo que desaparezcan durante la fase S o al acabar ésta.

Las ciclinas mitóticas son las ciclinas A, B1 y B2. Se sintetizan durante las fases previas a la mitosis, S o G2, y se degradan rápida y específicamente durante M. La ciclina A participa en el control de la replicación del DNA y en la entrada en M, y la ciclina B participa sólo en la fase M.

Las otras proteínas clave en la regulación del ciclo celular son las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks). Constituyen una familia de proteínas que fosforilan residuos serina y treonina de proteínas específicas que actúan como sustrato. Sólo pueden ejercer esta actividad enzimática cuando están asociadas con una ciclina. De acuerdo con esto, en el complejo activo ciclina/Cdk, la Cdk es la subunidad catalítica y la ciclina la subunidad reguladora. A diferencia de las ciclinas, la concentración de las Cdks no varía de forma importante durante el ciclo celular, aunque puede estar regulada por ciertas señales proliferativas o antiproliferativas. En humanos se han encontrado al menos 8 miembros de esta familia (Cdk1-8), cada uno de los cuales forma complejos quinasas activos con ciclinas distintas. Así, un mismo tipo de Cdk puede unirse a distintas ciclinas, teniendo entonces actividad para fosforilar múltiples proteínas sustrato.

1.1.2 Complejos ciclina/Cdk: funcionamiento y regulación dentro del ciclo celular

Durante las distintas fases del ciclo celular se forman y destruyen diferentes complejos activos de ciclinas y Cdks, cuya actividad fosforilando determinadas proteínas dirige el avance del ciclo. La regulación de la actividad de estos complejos ciclina/Cdk depende de diferentes mecanismos. El primer factor limitante es la tasa de síntesis y degradación de las ciclinas, que determina la concentración disponible de estas proteínas para su unión a las Cdks. Una vez formado el complejo ciclina/Cdk, su actividad como quinasas está sometida a regulación por otras proteínas, que pueden modificar la Cdk por

procesos de fosforilación-defosforilación o se pueden unir a ella inhibiendo su actividad kinasa (Sherr *et al.* 1999).

Las proteínas inhibidoras de los complejos ciclina/Cdk que regulan la actividad kinasa de las Cdk son los CKIs (cyclin-dependent kinase inhibitors), cuyo efecto bloquea el ciclo celular, por lo que funcionan como proteínas oncosupresoras. Los CKIs se agrupan en dos familias en función de su estructura, modo de acción y especificidad de sustrato. La familia INK4 (inhibitors of Cdk4) está formada por las proteínas p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p14^{INK4d} (en humanos, en el ratón equivale a p19^{INK4d}) e inhiben específicamente las subunidades catalíticas de Cdk4 y Cdk6. La otra familia, denominada Cip/Kip (cyclin inhibitor protein / kinase inhibitor protein), incluye las proteínas p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}, que se unen tanto a las subunidades de ciclinas como de Cdk, inhibiendo específicamente la actividad kinasa de Cdk2 (Sherr *et al.* 1999).

La progresión a lo largo de la primera fase del ciclo celular, G1, y el inicio de la síntesis de DNA, en la fase S, están reguladas por distintas clases de complejos ciclina/Cdk que actúan de manera coordinada, y cuya actividad es opuesta a la que desarrollan sus inhibidores CKIs (Elledge *et al.* 1994; Hengst *et al.* 1998; Sherr *et al.* 1999). Las ciclinas D y E son esenciales en células de eucariotas superiores para la progresión a lo largo de G1 y en la transición G1/S, y cuando se sobreexpresan son capaces de disminuir la duración del periodo G1, lo que indica que ambas ciclinas son factores limitantes para la progresión en este momento del ciclo (Resnitzky *et al.* 1994; Resnitzky *et al.* 1995).

Cuando células quiescentes comienzan a dividirse, los genes que codifican las ciclinas D son inducidos en respuesta a una señal mitogénica, y estas ciclinas se asocian con sus kinasas correspondientes, Cdk4 y Cdk6, formando complejos activos a lo largo de la fase G1 (Sherr 1993). La síntesis de ciclinas D, su asociación con Cdk4,6 y el transporte de estos complejos al

núcleo depende de diferentes vías de transducción de señales activadas por la proteína RAS, entre otras (Aktas *et al.* 1997; Weber *et al.* 1997a; Gille *et al.* 1999).

Una segunda actividad no catalítica de los complejos ciclina D/Cdk4,6 es actuar como receptores de los inhibidores p21^{Cip1} y p27^{Kip1} (Sherr *et al.* 1995). Este proceso favorece la formación de los complejos ciclina E/Cdk2 en ausencia de estos inhibidores, contribuyendo así a su activación al final de la fase G1 (Perez-Roger *et al.* 1999). Los niveles de p21^{Cip1} y p27^{Kip1} libres deben determinar una concentración umbral para la activación de los complejos ciclina E/Cdk2 y ciclina A/Cdk2. Cuando desaparecen los mitógenos, la síntesis de las ciclinas D se detiene, liberando así los Cip/Kip que estaban secuestrados en los complejos ciclina D/Cdk4,6, que ahora inhiben a los complejos ciclina E/Cdk2, induciendo una parada del ciclo celular en G1. También los INK4, que se unen a Cdk4,6 rompiendo su unión con ciclina D, liberando de esta manera los Cip/Kip que estaban secuestrando, son inducidos por señales antiproliferativas. Esta captura de las proteínas Cip/Kip en los complejos ciclina D/Cdk4,6 no inhibe la actividad kinasa de Cdk4,6. Además, la interacción de Cip/Kip con ciclina D/Cdk4,6 facilita la formación de estos complejos, su transporte al núcleo y aumenta la estabilidad de la ciclina D (LaBaer *et al.* 1997; Cheng *et al.* 1999). Sin embargo, estudios recientes apoyan que la presencia de p21^{Cip1} y p27^{Kip1} favorece la formación de estos complejos aunque no es necesaria, pudiendo incluso llegar a inhibir su función (Bagui *et al.* 2003). Por tanto, la controversia en cuanto a la función que desarrollan p21^{Cip1} y p27^{Kip1} en los complejos ciclina D/Cdk4,6 continúa.

Así, el inicio de la fase G1 del ciclo celular es un proceso dependiente de la señalización mediada por mitógenos hasta llegar a la activación de los complejos ciclina E/Cdk2. En este momento se reduce la dependencia de la célula por estos mitógenos para poder completar el ciclo, y esto resulta en un compromiso irreversible para que la célula entre en fase S, que coincide con el punto de restricción R.

Alteraciones en el equilibrio entre estas proteínas reguladoras en respuesta a distintos estímulos determinan que una célula prolifere o no, y es este equilibrio el que se ve afectado en células tumorales que son capaces de proliferar de una manera descontrolada.

1.1.3 La proteína de Retinoblastoma (Rb)

El gen de *Retinoblastoma* (*Rb*) fue el primer gen supresor de tumores en identificarse a partir de tumores de retinoblastoma (Friend *et al.* 1986; Fung *et al.* 1987; Lee *et al.* 1987). La proteína Rb es una fosfoproteína nuclear capaz de bloquear el ciclo celular durante la fase G1, a través de la inhibición de la transcripción de genes necesarios para la transición G1/S (Weinberg 1995). La función de *Rb* como gen supresor de tumores se ha confirmado por su capacidad de inhibir la aparición de un fenotipo maligno en células tumorales que tienen delecionado dicho gen (Huang *et al.* 1988).

El sustrato principal de Rb es la familia de factores de transcripción E2F, capaces de unirse a diferentes genes reguladores del ciclo celular. Rb es capaz de unirse a estos factores de transcripción a través de una región central de la proteína, inhibiendo su capacidad transcripcional sobre dichos genes (Zhu *et al.* 1993; Qin *et al.* 1995). Dicha región presenta mutaciones o está ausente en la mayoría de tumores (Horowitz *et al.* 1990).

La progresión G1/S requiere de la inactivación de Rb por fosforilación. Dicha función es llevada a cabo por los complejos ciclina/Cdk (Sherr 1996). Los complejos ciclina D/Cdk4,6 y ciclina E/Cdk2 son los responsables de la progresiva fosforilación de Rb y de su inactivación durante la fase G1/S (Harbour *et al.* 1999). La fosforilación está regulada a través de señales inducidas por factores de crecimiento, lo que explica la capacidad de diversas señales extracelulares de estimular la proliferación celular.

La ausencia de Rb debido a delección génica o su inactivación por mutación en varios tumores es necesaria para sobrepasar la restricción impuesta por Rb en la progresión del ciclo celular. Además, la pérdida de la función de Rb genera una ventaja selectiva para inactivar posibles señales pro-apoptóticas como la regulada por p53, por lo que es frecuente encontrar tumores que contengan mutaciones en ambos genes.

Rb no está sólo implicado en la aparición de retinoblastomas hereditarios, donde la causa es la aparición de una doble mutación en los dos alelos de *Rb*, si no que aparece mutado en un elevadísimo número de otros cánceres. En osteosarcomas, la mutación de un solo alelo de *Rb* causa predisposición a desarrollar la enfermedad, y frecuentemente se encuentran delecciones dobles como en retinoblastomas (Toguchida *et al.* 1989). En carcinoma de pulmón, mama, vejiga, próstata y algunas leucemias, entre otros, la mutación en *Rb* debe cooperar con otras mutaciones en oncogenes y otros genes supresores. De hecho, la mutación de *Rb* es una de las más frecuentes, encontrándose en un 50% del total de cánceres de adultos. Otras dos proteínas, p130 y p107, están estructural y funcionalmente relacionadas con Rb (Hurford *et al.* 1997; Lipinski *et al.* 1999).

Rb se expresa en prácticamente todos los tipos celulares e interviene en el control del punto de restricción al final de la fase G1 (Nevins *et al.* 1997; Harbour *et al.* 2000a; Stevaux *et al.* 2002). Los niveles de Rb no se alteran significativamente durante el ciclo celular, pero sí su grado de fosforilación, que modula su actividad. Durante las fases G0 y G1, la proteína Rb se encuentra hipofosforilada y unida a los factores de transcripción E2F. Los complejos activos ciclina D/Cdk4,6 y ciclina E/Cdk2 son los principales responsables de la fosforilación de Rb durante la fase G1 (Morgan 1997; Sherr *et al.* 1999; Murray 2004), modulando su interacción con E2F y la posterior transcripción de genes cruciales para la proliferación celular. Se ha propuesto que los complejos Rb-E2F están unidos a los promotores de estos genes, de modo que cuando Rb

está hiposforilada inhibe la acción activadora de E2F y al hiperfosforilarse, esta acción desaparece (Nevins *et al.* 1997; Harbour *et al.* 2000b).

En mitad de la fase G1 los complejos ciclina D/Cdk4,6 fosforilan Rb. Rb parece que ser el único sustrato esencial para los complejos ciclina D/Cdk4,6 puesto que los ratones *knock-out* para Rb no necesitan la presencia de ciclina D para proliferar (Sherr 2004).

A finales de la fase G1 los complejos ciclina E/Cdk2 son activos y continúan con este proceso de fosforilación en distintos residuos de Rb (Matsushime *et al.* 1994). Los complejos ciclina A/Cdk2 y ciclina B/Cdk1 se activarán más tarde durante el ciclo celular y contribuirán al mantenimiento de Rb en un estado hiperfosforilado, hasta la salida de la célula de la fase M. La fosforilación de Rb libera los factores de transcripción E2F, que activan la transcripción de *ciclina E* y *ciclina A*, cuyos productos son necesarios en la transición G1/S del ciclo celular (Pagano *et al.* 1992; Ohtsubo *et al.* 1995). El hecho de que E2F induzca la expresión de ciclina E que, por otro lado, regula la actividad de Cdk2 para reforzar la fosforilación de Rb, crea un “feedback” positivo que contribuye a que la transición G1/S sea irreversible.

La ausencia de Rb debido a delección génica o su inactivación por mutación provoca la falta de regulación de la actividad E2F y la estimulación de la progresión del ciclo de división celular. La inactivación de Rb por su unión con diferentes productos de oncogenes, *mdm-2*, *E7*, *E1A*, etc., también provoca la liberación de E2F y la progresión del ciclo celular (Bandara *et al.* 1991; Morris *et al.* 1993; Xiao *et al.* 1995).

1.2 Vías de transducción de señales

Las diferentes moléculas situadas en el exterior de la célula se unen a receptores proteicos específicos situados en la superficie de las células diana. Estos receptores unen la molécula señal con una alta afinidad y transforman este evento extracelular en una o más señales intracelulares, las cuales alteran el comportamiento de la célula diana. Existen diferentes rutas de transducción de señales implicadas en el control de la proliferación y supervivencia celulares (ver **Figura 1**).

1.2.1 Vía Ras/Raf/MEK/ERK

La vía de Ras/Raf/MEK/ERK es una ruta central de transducción de señales, que integra diferentes estímulos desde la superficie celular hasta los factores de transcripción que se encuentran en el núcleo de la célula. La proteína Ras tiene actividad GTPasa y está codificada por un proto-oncogén. En su estado inactivo aparece en el citoplasma unida a GDP, el cual intercambia por GTP cuando se activa por la presencia de estímulos mitogénicos, proceso inducido por GEFs (guanine nucleotide exchange factors). Su actividad GTPasa intrínseca es estimulada por GAPs (GTPase-activating proteins), que conduce a la hidrólisis de este GTP y le devuelve a su estado inactivo unido a GDP. Se han descrito tres miembros dentro de la familia de Ras: H-Ras, K-Ras y N-Ras. La amplificación del proto-oncogén *Ras* y mutaciones puntuales en este gen se observan en aproximadamente el 30% de los cánceres humanos, y conduce a la transformación celular y al acortamiento de la fase G1 del ciclo celular (Downward 2003). En esta vía de señalización, a continuación de Ras, actúa la proteína Raf, que se une a Ras-GTP y es translocada a la membrana citoplasmática, donde se activa (Barnard *et al.* 1998). Finalmente, Raf fosforila a MEK, que a su vez fosforila a ERK (extracellular-signal-regulated-kinase), lo que resulta en una activación de factores transcripcionales cuyos genes diana activan la proliferación celular y la

inhibición de la apoptosis. Entre estos factores de transcripción se encuentran c-Myc, Ets, CREB y c-Jun, cuyos efectos inducen el crecimiento celular. ERK también fosforila e inactiva a la proteína pro-apoptótica Bad, y fosforila a Stat-3 activando su función transcripcional (Ng *et al.* 1997). También se ha implicado esta vía en la regulación transcripcional del promotor de *ciclina D1* y de *p21^{Cip1}* y de la actividad transcripcional de E2F (Gille *et al.* 1999).

1.2.2 Vía PI3 kinasa/AKT

La vía de PI3K/Akt induce supervivencia celular mediante la inhibición de la apoptosis (Franke *et al.* 2003), y también promueve la proliferación celular afectando a la expresión de proteínas que participan en su regulación. La proteína PI3K está formada por una subunidad reguladora de 85 kDa (p85) y por una subunidad catalítica de 110 kDa (p110) (Shibasaki *et al.* 1991). La asociación de p85 con proteínas con actividad tirosina kinasa es suficiente para la activación de la subunidad catalítica p110. PI3K es una familia de proteínas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato del ATP a fosfatidilinositoles, induciendo así la formación de moléculas PIP3 a partir de moléculas de PIP2. La subunidad catalítica p110 de PI3K tiene doble actividad kinasa sobre lípidos y sobre proteínas en residuos serina/treonina. La actividad de PI3K se asocia con la organización del citoesqueleto, división celular, inhibición de la apoptosis y la absorción de glucosa. La activación de PI3K requiere su translocación a la membrana, que es mediada en condiciones normales por la activación de RTKs (Receptores con actividad Tirosina Kinasa), como el receptor de IL-3, o por sus sustratos, como son Ras, Grb2 y Abl, entre otros (van der Geer *et al.* 1994; Wymann *et al.* 1998). Estas interacciones activan la producción de PIP3, que activa diferentes dianas como Akt, PDK, Rac/GEF y PKC, de las cuales la más importante en el mecanismo de acción de PI3K es Akt.

La proteína Akt interacciona con PIP3, lo que promueve su translocación a la membrana plasmática y su posterior activación por PDK (Haslam *et al.*

1993; Mayer *et al.* 1993). Una vez que Akt está fosforilada, se transloca desde la membrana plasmática al citosol o al núcleo, donde ejerce su función (Brazil *et al.* 2002; Scheid *et al.* 2003). El control de la actividad de Akt depende, por tanto, de su fosforilación, estabilidad y localización subcelular.

Las funciones más estudiadas de Akt son la regulación del transporte y metabolismo de glucosa, y el control negativo de la apoptosis. En cuanto a su relación con el metabolismo de la glucosa, Akt fosforila directamente a GSK-3 β (*glycogen synthetase kinase-3 β*) (Cross *et al.* 1995), lo que produce su inactivación. Los efectos anti-apoptóticos de Akt están mediados por la fosforilación de diversos sustratos, entre los que se encuentran Bad, Caspasa-9, factores de transcripción FoxO, IKK, Mdm2 y GSK-3 β . No está claro si todas estas dianas de acción son afectadas de forma directa o indirecta por Akt.

La fosforilación de Bad en Ser136 por Akt impide que esta proteína entre en el núcleo y hace que se acumule en el citoplasma, lo que inhibe su capacidad para unirse a Bcl-2 y Bcl-x_L, ambas proteínas anti-apoptóticas, promoviendo de esta manera la supervivencia celular (Datta *et al.* 1997). Además de Bad, la fosforilación de Caspasa-9 por Akt resulta en su inactivación, con lo que se consigue un bloqueo de la cascada de acción de las caspasas que inducen apoptosis (Cardone *et al.* 1998).

La fosforilación de los factores de transcripción FoxO resulta en su translocación al citoplasma, lo que impide su acción en el núcleo (Biggs *et al.* 1999; Brunet *et al.* 1999). Como resultado, múltiples genes pro-apoptóticos resultan inhibidos, tales como *FasL*, además de otros genes implicados en la regulación del ciclo celular, como el CKI *p27^{Kip1}* (Medema *et al.* 2000; Nakamura *et al.* 2000). El gen de *ciclina D1* está inhibido por FoxO, por lo que Akt induce su expresión (Ramaswamy *et al.* 2002; Schmidt *et al.* 2002). Por otro lado, Akt activa la transcripción de genes anti-apoptóticos a través de la fosforilación de IKK, que fosforila I κ B promoviendo su degradación, y liberando así a los factores transcripcionales NF- κ B (Ozes *et al.* 1999).

Akt promueve la progresión a lo largo del ciclo celular mediante la fosforilación de Mdm2 y GSK-3 β . Una vez que es fosforilado por Akt, Mdm2 se transloca al núcleo donde interacciona con p300, liberando p19^{ARF}, que estaba acomplejada con p300, resultando en la degradación de p53, con lo que promueve la progresión del ciclo y la supervivencia celular (Zhou *et al.* 2001b). La fosforilación de GSK-3 β inhibe su actividad, con lo que aumenta la estabilidad del complejo β -catenina-LEF/TCF que induce la transcripción de diversos genes, entre los que se encuentran *ciclina D1* y *c-myc*, promoviendo así la progresión del ciclo celular (Fukumoto *et al.* 2001). El control de Akt sobre ciclina D1 también se ejerce sobre la estabilidad de la proteína, ya que GSK-3 β fosforila ciclina D1 para producir su degradación en el citoplasma, por lo que al inhibir GSK-3 β aumenta la estabilidad de ciclina D1 en el núcleo (Diehl *et al.* 1998).

Akt también controla la actividad de los CKIs p21^{Cip1} y p27^{Kip1}. Akt fosforila p21^{Cip1} en Thr145 (Zhou *et al.* 2001a) y p27^{Kip1} en Thr157 (Liang *et al.* 2002; Shin *et al.* 2002; Viglietto *et al.* 2002) inhibiendo su translocación al núcleo y promoviendo su acumulación en el citoplasma, lo que impide su actividad inhibidora de los complejos ciclina E/Cdk2 en el núcleo y favorece la progresión del ciclo celular. Sin embargo, no hay evidencia de una relocalización citoplasmática de p21^{Cip1} en tumores (Coqueret 2003), aunque sí de p27^{Kip1} (Liang *et al.* 2002; Shin *et al.* 2002; Viglietto *et al.* 2002; Andreu *et al.* 2005). Por tanto, el inhibidor del ciclo celular p27^{Kip1} no sólo está regulado a nivel transcripcional por PI3K/Akt, mediante la inactivación de FoxO, sino también por su localización celular mediada por la fosforilación de Akt que determina su actividad en el núcleo. Además, los niveles de expresión de p27^{Kip1} son contrarios a los de la proteína Skp2 (Kudo *et al.* 2001; Latres *et al.* 2001; Chiarle *et al.* 2002; Masuda *et al.* 2002; Andreu *et al.* 2005), implicada en su degradación proteasomal, que se ha visto que está controlada positivamente por la vía de PI3K (Mamillapalli *et al.* 2001; Andreu *et al.* 2005).

La vía de PI3K está regulada negativamente por fosfatasas. La proteína PTEN, codificada por un gen supresor de tumores, tiene doble actividad fosfatasa sobre proteínas y lípidos y elimina un grupo fosfato de PIP3 convirtiéndolo en PIP2, lo que previene la activación de Akt (Sun *et al.* 1999; Vazquez *et al.* 2000). PTEN se encuentra mutado con elevada frecuencia en los cánceres humanos. El restablecimiento de la actividad de PTEN es capaz de inhibir el crecimiento de células de glioblastoma y su tumorigenicidad en ratones inmunosuprimidos (Furnari *et al.* 1997; Cheney *et al.* 1998; Li *et al.* 1998). Se ha generado un ratón *knock-out* del gen PTEN, que resulta no viable ya en una temprana etapa embrionaria. Sin embargo, los ratones heterocigotos para PTEN presentan una mayor predisponibilidad a generar tumores, confirmando su importancia como oncosupresor (Di Cristofano *et al.* 1998).

Las células de glioblastoma humano, U87 tienen delecionado el gen de PTEN y por tanto presentan una activación constitutiva de la ruta AKT (Cheney *et al.* 1998; Li *et al.* 1998; Maier *et al.* 1999). Dicha activación es la responsable de su elevada proliferación y de su alta capacidad tumoral.

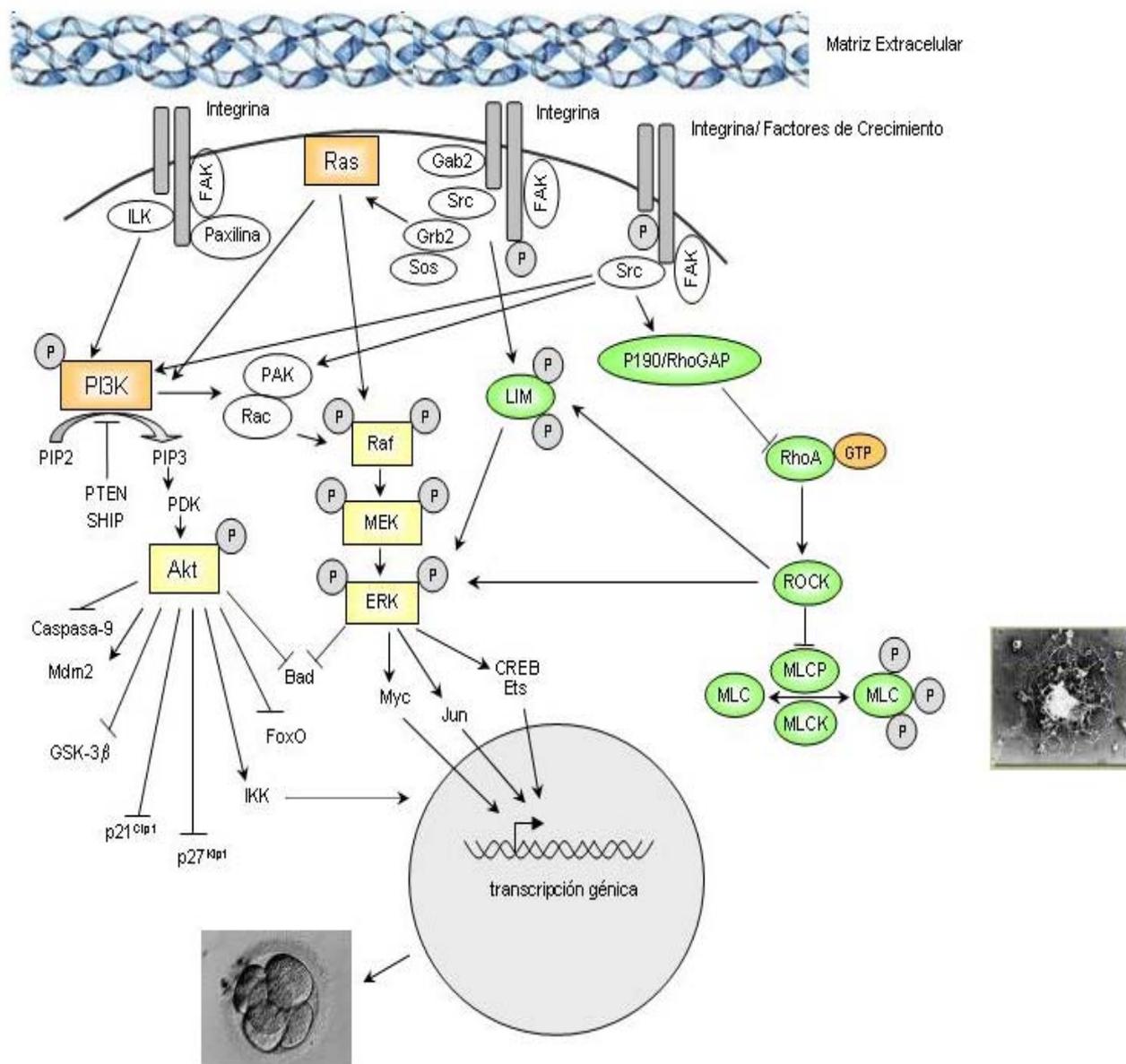


Figura 1. Vías de transducción de señales activadas por los receptores de integrinas y los receptores de factores de crecimiento comentadas en este trabajo.

1.3 La familia Rho

La familia de proteínas Rho (*Ras* *homologue*) cuenta hasta el momento con 18 miembros, que se han clasificado de acuerdo a su secuencia y función (ver **Figura 2**). Esta clasificación incluye proteínas muy similares a RhoA, Rac1 y Cdc42 y finalmente un grupo que abarca aquellas proteínas de la familia que carecen de actividad GTPasa (Rnd y RhoH).

Como los miembros de la familia Ras, las proteínas de la familia Rho contienen modificaciones lipídicas en su estructura que les permiten anclarse a la membrana celular y oscilar entre dos estados conformacionales: un estado activo, donde permanecen unidas a GTP, y otro inactivo, unidas a GDP. La unión a la molécula de GTP se produce a través de un factor intercambiador de nucleótidos guanina específico de Rho (Rho-GEF), mientras que la hidrólisis de GTP es estimulada por una proteína activadora de GTPasa (Rho-GAP). El análisis del genoma humano ha permitido saber que existen muchas proteínas con dominios de unión para estas dos moléculas lo que sugiere la importancia de éstas en el desarrollo de diversos eventos celulares (para una mayor información, ver Van Aelst *et al.* 1997). El siguiente nivel de regulación se produce a través de unas moléculas capaces de inhibir la disociación de Rho-GDP (Rho-GDIs), a través de un secuestro de estas proteínas en el citoplasma, evitando su unión a GTP.

La activación de receptores de factores de crecimiento e integrinas promueve el cambio GDP/GTP en las proteínas Rho, lo que provoca un cambio conformacional activado y su interacción con múltiples efectores, modulando así su actividad y localización. Por ejemplo, muchos de los efectores de proteínas Rho son kinasas, capaces de controlar funciones celulares a través de la fosforilación de proteínas como la kinasa activadora de p21 (PAKs), capaz de unirse a Cdc42 y Rac1, o las kinasas ROCK (*Rho* associated *coiled-coil-forming* *kinases*), que son activadas por RhoA.

Se han descrito otros efectores, como los factores de andamiaje (*scaffold proteins*), encargados de controlar funciones celulares a través de interacciones proteína-proteína (para un resumen de los efectores de Rho, ver Bishop *et al.* 2000). En la **Tabla 1** se describen algunos de los efectores de las proteínas Rho y las funciones conocidas hasta el momento.

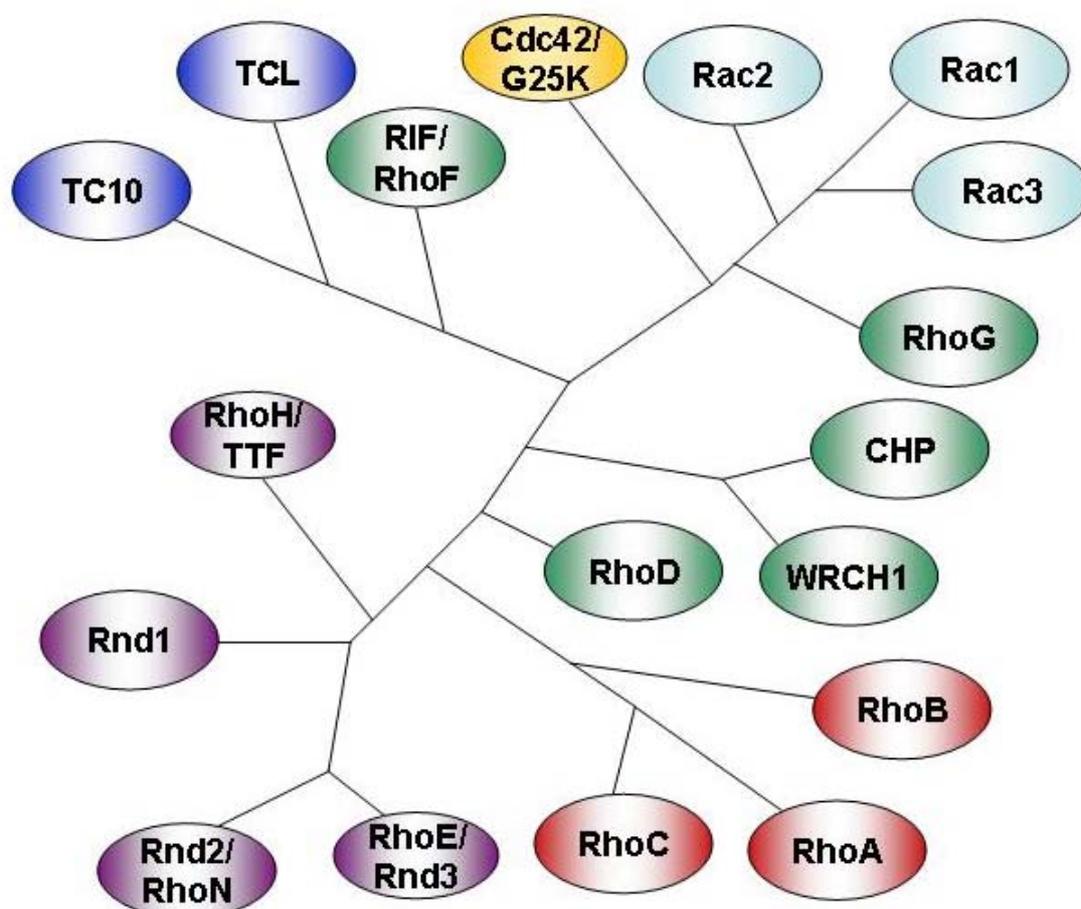


Figura 2. Miembros de la familia Rho. Diagrama representativo de los miembros de la familia Rho. Se han clasificado los diferentes miembros según sus propiedades bioquímicas y funcionales. La subfamilia Rnd y RhoH se han agrupado en base a su deficiencia en actividad GTPasa. (Esquema extraído de Sahai *et al.* 2002 y Coleman *et al.* 2004).

Proteína	Efectores	Tipo de Efector	Función
RhoA, C	ROCK I, II	Kinasa Scaffold	Contracción actomiosina; transformación, transcripción Polimerización actina; transcripción, microtúbulos
	PRK1/PKN	Kinasa	Endocitosis; activación MAPK
	Citron	Kinasa	Citoquinesis
RhoB	PRK1/PKN	Kinasa	Procesamiento EGFR; motilidad y adhesión celular
RhoD	Desconocido	Desconocido	Transporte de vesículas
Rnd1, 2, 3/ RhoE	Desconocido	Desconocido	Antagonista RhoA
RhoG	Kinectina	Scaffold	Unión de microtúbulos
	Desconocido		Activación de Rac y Cdc42
RhoH	Desconocido	Desconocido	Implicado en tumores de la línea mieloide
RIF	Desconocido	Desconocido	Organización actina
CHP	PAK	Kinasa	Activación de JNK
WRCH1	PAK	Kinasa	Activación de JNK
Rac 1, 2, 3	PAK 1, 2, 3	Kinasa	Activación de JNK; transformación
	MLK2, 3	Kinasa	Activación de JNK
	PAR6	Kinasa	Polaridad celular; transformación
	P67 ^{PHOX}	Enzima	Oxidación NADPH, transcripción (NF-κB)
	IQGAP1, 2	Scaffold/GAP	Uniones adherentes
	POSH	Scaffold	Activación de JNK, transcripción (NF-κB)
Cdc42	IRSp53	Scaffold	Polimerización de actina
	PAK1, 2, 3, 4	Kinasa	Activación de JNK, transformación
	MLK2, 3	Kinasa	Activación de JNK
	PAR6	Scaffold	Polaridad celular; transformación
	N-WASP,WASP	Scaffold	Polimerización de actina
MRCK1, 2	Kinasa	Organización de actina	
TC10	PAK	Kinasa	Activación de JNK
	WASP	Scaffold	Polimerización de actina
	PIST ¹³⁶	Scaffold	Desconocido
	Desconocido	Desconocido	Translocación de GLUT4; captación de Glucosa

Tabla 1. Principales efectores de la familia Rho y sus funciones. Se describen en esta tabla las principales funciones descritas para las proteínas Rho así como los efectores conocidos que intervienen en la transducción de señales. Para un mayor conocimiento sobre la función de dichas proteínas se recomiendan las revisiones: Van Aelst *et al.* (1997), Bishop *et al.* (2000) y Sahai *et al.* (2002).

1.3.1 Proteínas Rho y citoesqueleto

La habilidad de las células eucariotas para mantener o cambiar su forma y nivel de anclaje al sustrato en respuesta a señales externas depende en gran parte de la reorganización de su citoesqueleto de actina. Dicha reorganización juega un papel importante en diversos procesos como la movilidad celular, citoquinesis o fagocitosis. Los filamentos de actina están organizados formando diversas estructuras: filopodios, lamelipodios y fibras de estrés. Además, también hay otras proteínas que se asocian a las fibras de actina y forman parte del citoesqueleto (Stossel 1993; Small 1994; Zigmond 1996).

Los miembros de la familia de Rho constituyen el grupo de reguladores más importantes de la dinámica del citoesqueleto en células eucariotas, y juegan un papel crucial en los procesos biológicos relacionados con el citoesqueleto, como la movilidad o el cambio en la forma celular (Etienne-Manneville *et al.* 2002). En células de mamífero, los miembros mejor caracterizados de la familia de Rho son RhoA, Rac 1 y Cdc42. En su conformación activa, son capaces de unirse a diferentes efectores, muchos de los cuales están implicados directamente en la regulación del citoesqueleto, como por ejemplo el ensamblaje de los filamentos de actina y miosina (fibras de estrés) o la de protuberancias ricas en actina (lamelipodios y filopodios) situadas en la membrana celular (Kozma *et al.* 1995; Nobes *et al.* 1995).

En los últimos años se han descrito diversas rutas implicadas en la polimerización de las fibras de actina que dan lugar a dichas modificaciones de la membrana celular. El papel de Rho en la formación de fibras de estrés se demostró al microinyectar un mutante activado de Rho, RhoV14, en fibroblastos quiescentes. Su expresión resultó en la inducción de fibras de estrés y la aparición de adhesiones focales (Ridley *et al.* 1992). Las adhesiones focales se definen como regiones donde las fibras de estrés se anclan a la membrana basal y representan la zona de mayor adhesión de la célula al sustrato. Los componentes citoplasmáticos que forman las adhesiones focales

incluyen la α -actina, vinculina y talina, así como moléculas de señalización celular como la quinasa de adhesiones focales (FAK) (Chrzanowska-Wodnicka *et al.* 1996).

Existen numerosas proteínas capaces de unirse a la forma activa de Rho (Rho-GTP) y que dan lugar a la formación de fibras de estrés y adhesiones focales en diversos tipos celulares. En particular se han descrito una serie de proteínas con actividad serina/treonina quinasa de la familia ROCK llamadas ROK α (ROCK I o Rho-quinasa) o la proteína p160 ROCK (ROCK II o ROK β) (Matsui *et al.* 1996; Nakagawa *et al.* 1996). La interacción de Rho con estas proteínas aumenta su actividad quinasa (Leung *et al.* 1995; Ishizaki *et al.* 1996).

El análisis de la función de ROCK I proviene de los estudios realizados *in vitro* con la cadena ligera de la miosina (MLC). La MLC presenta dos estados: una forma fosforilada (activa) y una forma no fosforilada (inactiva). La regulación de estos dos estados conformacionales viene determinada por una quinasa (MLCK) y una fosfatasa (MLCP) que mantienen en unas cantidades determinadas una forma u otra dependiendo de cada momento. ROCK I es capaz de unirse a la forma activa de Rho y a su vez a una región de la MLCP, llamada MBS (subunidad de unión a miosina), fosforilándola e inactivándola. De este modo, y sin actividad fosfatasa, la MLCK es capaz de fosforilar a la MLC, aumentando la proporción estequiométrica de esta molécula (Kimura *et al.* 1996), lo que implica un cambio conformacional que conlleva una mayor afinidad por los filamentos de actina, y que da lugar a la formación de fibras de estrés (Tan *et al.* 1992).

La sobreexpresión de la forma activada de Rho en NIH-3T3 provoca un aumento de la fosforilación de MLC y de la formación de fibras de estrés. Además, la contracción de fibroblastos inducida por Rho es bloqueada por un inhibidor de MLCK, KT5926, lo que resulta en una disminución de la fosforilación de MLC y la desaparición de fibras de estrés y adhesiones focales (Chrzanowska-Wodnicka *et al.* 1996). Queda por dilucidar si la formación de

estas estructuras transcurre por vías independientes o están interrelacionadas (para posibles hipótesis, ver Nobes *et al.* 1995, Chrzanowska-Wodnicka *et al.* 1996 y Chihara *et al.* 1997).

En fibroblastos, Rac juega un papel en la reorganización del citoesqueleto inducida por factores de crecimiento y la forma activada de Ras (RasV12) (Ridley *et al.* 1992). La microinyección de una forma activada de Rac (RacV12) es suficiente para inducir la formación de lamelipodios (ondulaciones en la membrana celular) y fibras de estrés. El papel de Cdc42 en la remodelación de los filamentos de actina también ha sido demostrado. La sobreexpresión de Cdc42 en fibroblastos desencadena la formación de filopodios en la periferia celular, seguido de la formación de lamelipodios (Kozma *et al.* 1995), lo que representa una ruta de señalización adicional en la interconexión entre los receptores de membrana y la organización del citoesqueleto. Además, tanto Rac como Cdc42 son capaces de inducir el ensamblaje de los complejos focales celulares en la membrana de fibroblastos (Nobes *et al.* 1995). Estos complejos son morfológicamente distintos de los inducidos por Rho. Por otro lado, Ridley *et al.* han demostrado que Rac regula la motilidad inducida por el factor de crecimiento hepático (HGF) y RasV12 en células epiteliales de perro (MDCK) (Ridley *et al.* 1995). En células T, Cdc42 juega un papel importante en la polimerización de actina y microtúbulos durante la presentación de antígeno (Stowers *et al.* 1995). Finalmente, el papel de Cdc42 en el control de la citoquinesis en fibroblastos, células HeLa y embriones de *Xenopus* ha sido descrita (Dutartre *et al.* 1996; Drechsel *et al.* 1997; Qiu *et al.* 1997).

En resumen, aunque se han descrito hasta el momento numerosas dianas potenciales para la familia Rho, es necesario determinar en el futuro las posibles relevancias fisiológicas de todas estas nuevas proteínas en la remodelación del citoesqueleto.

1.3.2 Proteínas Rho y ciclo celular

Además de su papel sobre el citoesqueleto, las proteínas Rho contribuyen a la regulación de otras respuestas celulares como la regulación transcripcional o bien la proliferación y transformación celular (Pruitt *et al.* 2001; Sahai *et al.* 2002; Jaffe *et al.* 2002; Besson *et al.* 2004a).

Uno de los ejemplos mejor caracterizados es la estimulación de células T. La unión del antígeno al receptor de células T induce la unión de Rac a GTP y la posterior estimulación de la cascada de señalización JNK-MAP kinasa. Finalmente, dicha cascada activa al factor de transcripción NF-AT y la expresión de interleuquina-2 (IL-2), que a su vez estimula la progresión de la fase G1 y la expansión clonal de linfocitos específicos para ese antígeno (Cantrell 1998; Reif *et al.* 1998).

En fibroblastos y células epiteliales en cultivo, RhoA, Rac y Cdc42 contribuyen a la progresión G1/S de células quiescentes, mientras que la inhibición de alguna de estas tres proteínas bloquea dicha progresión (Yamamoto *et al.* 1993; Olson *et al.* 1995). Las rutas de transducción de señales implicadas en este proceso no están muy claras, pero parece que RhoA induciría la expresión de ciclina D1 hacia la mitad de la fase G1, activando la ruta de Ras-Raf-MEK-ERK y la inhibición de la expresión de p21^{Cip1} (Liberto *et al.* 2002). Uno de los mecanismos de inhibición de p21^{Cip1} mediado por Rho es a través de la fosforilación de ERK a través de ROCK (Zuckerbraun *et al.* 2003). Dicha fosforilación produce la retención en citoplasma de ERK, lo que se traduce en una inhibición de la expresión de p21^{Cip1} (Lai *et al.* 2002; Zuckerbraun *et al.* 2003).

La activación de Rho permite la progresión a lo largo del ciclo de células estimuladas con mitógenos. Sin embargo, en ausencia de adhesión o cuando las células entran en confluencia, Rho se encuentra inactivo, y los niveles de p21^{Cip1} se encuentran elevados, funcionando como un sensor de las

condiciones en que se encuentra la célula en cada momento. La activación de Rac o Cdc42 por factores de crecimiento o por la adhesión celular mediada por integrinas modula también la progresión en el ciclo, y en el caso de los niveles de p21^{Cip1}, aumentando su degradación por una vía proteosomal ubiquitina-independiente (Bao *et al.* 2002).

La inhibición de RhoA produce un aumento en los niveles de p27^{kip1} (Weber *et al.* 1997a), mientras que su sobreexpresión disminuye dichos niveles (Hirai *et al.* 1997; Laufs *et al.* 1999), posiblemente a través de un aumento de los complejos ciclina E/Cdk2 (Hu *et al.* 1999). La inhibición de RhoA aumenta los niveles de mensajero de p27^{kip1} a través de algún “elemento de respuesta a Rho” situado en la región 3’ no traducida del gen (Vidal *et al.* 2002). Sin embargo, queda por aclarar si el efecto de RhoA sobre los complejos ciclina E/Cdk2 y la degradación de p27^{kip1} son consecuencia de la inhibición de p21^{Cip1}, aumento de la expresión de ciclina E u otros mecanismos.

La inducción de la transcripción de *ciclina D1* mediada por Ras transcurre a través de la activación de la vía Ras-Raf-MEK-ERK (Lavoie *et al.* 1996; Balmano *et al.* 1999). La inducción de ciclina D1 durante la fase G1 está íntimamente regulada a través de la activación de esta ruta (Weber *et al.* 1997b; Roovers *et al.* 2000). Diversas son las evidencias que apuntan que la activación de dicha vía requiere tanto de la participación de receptores de factores de crecimiento como de señales provenientes de moléculas de adhesión que operan a través de proteínas Rho (Roovers *et al.* 1999; Welsh *et al.* 2001; Roovers *et al.* 2003b). Esta cascada de señales provoca la activación de Cdks y un aumento de la estabilidad del factor de transcripción Myc, que son necesarios para inducir la expresión de *ciclina D1* (Sears *et al.* 2002).

Por ejemplo, RhoA es necesario para la activación sostenida de ERK en respuesta a una activación de $\alpha_5\beta_1$ -integrina (el receptor principal para fibronectina). Esta activación requiere de la kinasa LIM que a su vez es fosforilada (activada) por ROCK (Roovers *et al.* 2003a; Roovers *et al.* 2003b).

En fibroblastos murinos, dicha activación sostenida de ERK inducida por mitógenos aumenta la expresión de ciclina D1 durante la mitad de la fase G1, iniciando la progresión G1/S (Welsh *et al.* 2001). Paralelamente, y por algún mecanismo independiente de Rho, la inducción de la expresión de ciclina D1 mediada por Rac y Cdc 42 se encuentra inhibida, evitando así su expresión durante la fase temprana de G1. Sorprendentemente, y a pesar de que la inhibición de Rho, ROCK o LIM bloquean la actividad ERK, se activan mecanismos de inducción de la expresión de Rac o Cdc42 que a su vez activan la vía de ERK mediada por PAK (Frost *et al.* 1997; King *et al.* 1998) y finalmente se produce un aumento en la tasa de transcripción de *ciclina D1*, posiblemente a través de NF- κ B (Vojtek *et al.* 1995).

Así pues, RhoA, Rac y Cdc42 están implicadas en la regulación de la expresión de ciclina D1 inducida por mitógenos a través de, al menos, dos mecanismos: uno, dependiente de Ras y ROCK, que provoca la inducción de la expresión de ciclina D1 en la mitad de la fase G1 y el otro a través de Rac, que supone una inducción temprana de la expresión de dicha ciclina por un mecanismo independiente de ERK.

Otros estudios, en cambio, revelan un mecanismo más directo de la regulación de ERK1/2 por proteínas Rho, a través de señales mediadas por integrinas. Rho y ROCK son necesarias para el ensamblaje de las integrinas en las adhesiones focales (Narumiya *et al.* 1997); sería la formación de estos complejos lo que promovería la activación de ERK1/2 a través de la activación de SRC o FAK y posterior activación de Ras (Danen *et al.* 2001; Assoian *et al.* 2001). En células endoteliales, Rac es esencial para la estimulación de la expresión de ciclina D1 durante la fase G1 aunque, a diferencia de en fibroblastos, su regulación estaría modulada a nivel traduccional y no transcripcional (Mettouchi *et al.* 2001).

El ciclo celular se completa con la división de la célula madre, proceso denominado citocinesis, que en células de mamíferos está regulado por los anillos contráctiles de actina y miosina y que dará lugar a dos células hija. La

inhibición de Cdc42 inhibe la formación de dichos anillos contráctiles en una gran variedad de células de mamífero y en embriones de *Xenopus* (Drechsel *et al.* 1997). La expresión de las formas activadas de Rho o Cdc42 bloquea la citoquinesis, sugiriendo que la alternancia entre los estados activos e inactivos de estas proteínas es necesaria para la regulación de este proceso.

1.3.3 Proteínas Rho y cáncer

Diversos estudios han relacionado a las proteínas Rho con la desregulación de diversas señales mitogénicas. Por ejemplo, se ha descrito que ciclina D1 se encuentra sobreexpresada en una gran variedad de tumores, y que dicha sobreexpresión podría estar controlada por proteínas de la familia Rho, a través de la activación de proteínas quinasas que modularían su actividad transcripcional (ver apartado 1.3.2).

Otro fenómeno que define a una célula cancerígena es la capacidad de desplazarse desde su lugar de origen a otros puntos del organismo, proceso conocido con el nombre de metástasis. Recientemente se ha publicado que p27^{Kip1} es capaz de modular la migración celular a través del control de la activación de RhoA (Besson *et al.* 2004b).

En un estudio realizado por Clark *et al.* (Clark *et al.* 2000) en células de melanoma procedentes de humano y de ratón, se seleccionaron aquellos tumores con mayor capacidad metastásica y se analizaron por la técnica de *microarray* la expresión diferencial de genes respecto a otros tumores con baja capacidad metastásica. En dicho estudio se identificó a un miembro de la familia Rho, *RhoC*, como uno de los genes que se encontraba altamente expresado en tumores con una elevada capacidad metastásica, tanto en el caso de tumores humanos como de ratón.

RhoC presenta gran homología con RhoA y RhoB, aunque a diferencia de otras proteínas de la familia Ras no se han descrito mutaciones en células

cancerígenas, ni tampoco se ha observado que RhoA o RhoB se encuentren sobreexpresadas en células metastásicas. Sin embargo, Clark *et al* observan como la sobreexpresión de RhoC en células de melanoma humano cultivadas *in vitro* es capaz de convertirlas en altamente metastásicas. Queda por dilucidar si RhoC es capaz por sí solo de inducir dicho fenotipo metastático o bien colabora con otros genes implicados para acelerar dicho proceso

1.3.4 Proteínas Rho y muerte celular

Las células tumorales poseen una mayor capacidad de supervivencia en comparación con las células normales, debido a una reducción de la expresión de proteínas proapoptóticas y/o un aumento de la expresión de factores antiapoptóticos. Las proteínas Rho han sido implicadas tanto en señales pro como anti-apoptóticas, así como en el propio proceso de inducción de la apoptosis (Coleman *et al.* 2001b; Coleman *et al.* 2002).

La expresión ectópica de Rac promueve la supervivencia celular en células tumorales o fibroblastos transformados (Joneson *et al.* 1999; Pervaiz *et al.* 2001; Coniglio *et al.* 2001). Rac también es necesaria para la activación de la vía de supervivencia de Akt en mastocitos (Yang *et al.* 2000). Rho juega un papel clave en la inhibición de p53 durante la maduración de células T (Costello *et al.* 2000).

En el caso de la inducción apoptótica mediada por proteínas Rho, se ha descrito que RhoB es necesario para la inducción de apoptosis por agentes quelantes del DNA o inhibidores de la farnesil transferasa (Du *et al.* 1999; Liu, Ax *et al.* 2001; Prendergast 2001). Rac también es necesario para la apoptosis inducida por FAS (Subauste *et al.* 2000).

1.3.5 RhoE/Rnd3

Uno de los miembros de la familia Rho que recientemente ha suscitado la atención de numerosos investigadores es RhoE, miembro de la subfamilia Rnd (*round*) que se caracteriza por la ausencia de actividad GTPasa, permaneciendo constitutivamente unida a GTP y por tanto en su forma activada (Foster *et al.* 1996; Guasch *et al.* 1998; Chardin 1999).

Se ha descrito la estructura molecular de la proteína RhoE y se ha comparado con la de RhoA (Garavini *et al.* 2002; Fiegen *et al.* 2002). Las dos presentan una estructura secundaria de 6 láminas β rodeadas por 5 hélices α . Sin embargo, RhoE presenta 3 mutaciones en el centro activo respecto a la proteína Ras.(Ser12Gly, Ser59Ala y Ser61Gln) que explicarían la ausencia de actividad GTPasa.

RhoE regula la organización del citoesqueleto de actina y la migración celular de una forma antagónica a RhoA (Guasch *et al.* 1998). La microinyección de RhoE en macrófagos produce una reorganización de los filamentos de actina, formando extensiones similares a filopodios o pseudópodos. En células epiteliales (MDCK), RhoE provoca la desaparición de fibras de estrés. Curiosamente, RhoE no afecta, en este tipo celular, a la reorganización de los filamentos de actina (*actin bundles*) que transcurren a lo largo de la membrana externa y que está descrito que están regulados por RhoA. La localización subcelular de RhoE en células MDCK, cerca de las membranas laterales, sugiere un posible papel en la formación de adhesiones célula-célula, que también ha sido descrita para RhoA. Además, RhoE induce un aumento de la migración tras la estimulación con HGF, mientras que RhoA produce el efecto contrario.

La sobreexpresión de RhoE produce la pérdida de fibras de estrés de actina y de las adhesiones focales, lo que promueve un aumento de la migración celular vía la inhibición de ROCK I (Guasch *et al.* 1998; Riento *et al.*

2003). La unión de RhoE a ROCK se produce a través de su región N-terminal (aa 1-420), una zona diferente a la que se une RhoA (Fujisawa *et al.* 1996). Sin embargo, RhoE y RhoA no son capaces de unirse a ROCK I de manera simultánea, lo que sugiere que la unión de uno de estas proteínas produciría algún tipo de cambio conformacional que enmascararía el sitio de unión para la otra, produciéndose una competencia por la unión a ROCK I. En concreto, se ha planteado una hipótesis que implicaría que, cuando ROCK I está inactiva (no fosforilada), RhoE es incapaz de unirse, y es necesario que ROCK I se active para adoptar una conformación abierta y permitir así su unión a RhoE (Riento *et al.* 2003). La unión en primera instancia de RhoA a ROCK I podría inducir esta conformación abierta y permitir, una vez disociada, su posterior unión a RhoE e inhibiendo su actividad y la pérdida de fibras de estrés de actina y de las adhesiones focales en fibroblastos.

Recientes estudios describen por primera vez que RhoE es un sustrato fosforilable por ROCK I, pero no por ROCK II, *in vivo* (Riento *et al.* 2005). Dicha fosforilación provoca un aumento de la estabilidad de RhoE y una relocalización en el citosol, a diferencia de su forma no fosforilada, localizada tanto en membrana como en citosol. Esto implicaría, por una parte que ROCK I es necesario para la relocalización de RhoE a través de su fosforilación, y por otra, que el aumento de la estabilidad de la proteína RhoE hace que ROCK I se mantenga inhibido, no siendo capaz de fosforilar a otros sustratos.

Otros autores, sin embargo describen que la pérdida de fibras de estrés de actina y de las adhesiones focales producida por RhoE en Cos7 o fibroblastos es vía la activación de p190RhoGAP, una proteína activadora de GTPasas específica para RhoA (Wennerberg *et al.* 2003). En este caso, RhoE es capaz de interactuar con p190RhoGAP y aumentar la actividad GTPasa de RhoA. Esto produce una disminución de los niveles de RhoA unida a GTP (activa) y bloquea la ruta de señalización. Los mutantes de RhoE incapaces de unirse a p190RhoGAP revierten el fenotipo "round", demostrando así que el mecanismo de acción de RhoE es a través de dicha proteína.

A pesar de que se ha descrito que otros miembros de la familia Rnd pueden jugar un papel en la transformación celular (Nobes *et al.* 1998), la posibilidad de que RhoE afecte a otras vías celulares reguladas por RhoGTPasas, como por ejemplo el control de la proliferación y transformación celular, no ha sido descrito hasta hace poco.

Hansen *et al.* describen como la inducción de la expresión de RhoE está asociada a la transformación de células epiteliales, a través de la ruta Raf-MEK-ERK (Hansen *et al.* 2000). La activación de Raf aumenta los niveles de Rac, sin afectar a los niveles de RhoA-GTP o Cdc42-GTP. Raf es capaz de activar a RhoE lo que resulta en una pérdida de las fibras de estrés y un aumento de los niveles de actina cortical lo que conlleva a ondulaciones en la membrana. Además, para la inducción de RhoE mediada por Raf es necesaria la activación de la ruta Raf-MEK-ERK, ya que el pre-tratamiento con inhibidores específicos para esta ruta evitan la inducción de RhoE a través de Raf.

Villalonga *et al.* (Villalonga *et al.* 2004) demuestran en un reciente estudio que la sobreexpresión de RhoE en fibroblastos de ratón (NIH-3T3) es capaz de bloquear el ciclo celular en G1 a través de la disminución de ciclina D1, por algún mecanismo post-transcripcional. Dicho bloqueo del ciclo no es a través de ROCK ni de RhoA, pero es rescatado por la sobreexpresión de E1A y ciclina E, lo que indica que RhoE afecta específicamente a los niveles de ciclina D1. Sorprendentemente, RhoE sólo es capaz de inducir efectos transitorios (<24 hrs.) sobre el citoesqueleto en fibroblastos, lo que implicaría que los mecanismos responsables de dichas alteraciones (citoesqueleto y ciclo celular) son independientes. Finalmente, RhoE es capaz de bloquear la transformación de células inducida por Ras y Raf, contrariamente al efecto descrito en el párrafo anterior.

Recientemente se ha descrito el efecto de RhoE sobre células tumorales de próstata (Bektic *et al.* 2005). RhoE es capaz de inducir la parada del ciclo en

G2/M en células con una alta capacidad metastática. Dicho bloqueo se produce por un aumento de los niveles de ciclina B1 y CDC2. Además, RhoE aumenta la muerte celular en estas células, tal y como demuestran los ensayos de actividad caspasa-3.

Todos los datos hasta ahora presentados revelan un papel clave de las proteínas Rho, involucradas inicialmente en la regulación del citoesqueleto, en la proliferación celular. Sin embargo, los resultados sobre RhoE, un miembro de la familia que antagoniza los efectos de RhoA no son concluyentes.

Con la realización de este trabajo hemos querido estudiar el papel RhoE en la proliferación y supervivencia celular y los mecanismos moleculares que están implicados. Para destacar la relevancia de RhoE en cáncer hemos utilizado como modelo células de glioblastoma humano, U87.

2. OBJETIVOS

1. Estudio del efecto de RhoE sobre la proliferación de células U87.
 - 1.1 Análisis de proteínas reguladoras del ciclo celular.
 - 1.2 Análisis de rutas de transducción de señales afectadas.
2. Estudio del efecto de RhoE en la supervivencia de células U87.
 - 2.1 Importancia de la vía de supervivencia PI3K/Akt en la muerte celular inducida por RhoE.
3. Estudio del posible papel antagónico de RhoE y RhoA y su importancia sobre la proliferación y supervivencia de células U87.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Obtención y manipulación de DNA

La manipulación de DNA se ha realizado siguiendo las técnicas descritas en el “Molecular Cloning. A Laboratory Manual” (Sambrook *et al.* 2001). Las enzimas de restricción para la obtención de fragmentos de DNA y la T4 DNA ligasa utilizada para las construcciones han sido obtenidas de Roche. En algunos casos, y como se indica en la descripción de la construcción, el inserto se obtuvo por amplificación de este cDNA mediante la técnica de PCR, utilizando el enzima Netzyme DNA Taq polimerasa (Need). Los productos de la ligación se introdujeron, excepto que se indique lo contrario, en células de la cepa DH5 α de *E. coli* mediante transformación por choque térmico. La obtención del DNA plasmídico para verificar las construcciones se realizó con el “GenElute™ Plasmid Miniprep Kit” (Sigma) y fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa tras haber sido digerido con las mismas enzimas de restricción que se habían empleado para su clonación. La obtención de DNA a gran escala para su uso en transfecciones se realizó con el “Plasmid Maxi Kit” (QIAGEN).

3.2 Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares

Las líneas celulares que se han empleado en la realización de este trabajo han sido 293, U87 y astrocitos primarios de rata.

Las células 293 son células epiteliales de riñón humano infectadas con Ad5 (Graham *et al.* 1977). Estas células crecen en cultivo de forma adherente, en medio DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium) suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (FBS), y con un 1% de P/S como antibiótico (D-10).

Las células U87 (Ponten *et al.* 1968; Westermark *et al.* 1973) son células de glioblastoma humano. En cultivo, estas células crecen de forma adherente en D-10.

Los astrocitos primarios de rata se obtuvieron a partir de fetos de 21 días tal y como se describe en (Renau-Piqueras *et al.* 1989). Los fetos se obtuvieron bajo condiciones de esterilidad y se aislaron los hemisferios cerebrales libres de meninges. Seguidamente se disociaron mecánicamente con la ayuda de una pipeta y en DMEM, se agitaron a máxima velocidad durante 1 min y se filtraron a través de un filtro de nylon de 80 μm de poro. Las células obtenidas se mantuvieron en el mismo medio suplementado con 20% FBS y 1% P/S como antibiótico (D-20). Tras una semana de cultivo, el medio fue reemplazado por medio D-10.

Todos los medios, antibióticos y suplementos usados para el cultivo celular han sido de Invitrogen-GibcoBRL.

Todo el trabajo que ha implicado manipulación de los cultivos celulares ha sido realizado en una campana de flujo laminar de bioseguridad nivel II-A.

El crecimiento de las líneas celulares se ha llevado a cabo en condiciones constantes de temperatura (37°C) y concentración de CO₂ (5%).

Las centrifugaciones para recoger las células, excepto cuando se indique lo contrario, se realizaron en una centrífuga de cabezal basculante Eppendorf 5810 R a una velocidad de 350 g y durante 5 min.

3.3 Obtención de las construcciones adenovirales

Las construcciones Adenovirales Ad-HA-MyrAkt y Ad-HA-dnAkt fueron cedidas por Thomas Franke (Matsui *et al.* 1999). En el primer caso, la secuencia de AKT se encuentra fusionada a la señal de miristoilización de

SRC, lo que provoca su transporte hacia la membrana celular y hace que se comporte como constitutivamente activado. En el caso del Ad-dnAkt, codifica para un mutante catalíticamente inactivo de Akt y actúa como un dominante negativo. En ambos casos las construcciones contienen un epítipo HA para su detección.

Para la expresión de las proteínas Rho en células U87 y astrocitos, se utilizó el sistema de adenovirus Adeasy™ Vector cedido por Bert Vogelstein (He *et al.* 1998) .

La construcción del adenovirus recombinante se produce en dos pasos: 1) clonación del gen de interés en un vector (pAdT-CMV) y 2) transferencia de dicho vector al genoma adenoviral (pAdEasy-1) mediante recombinación homóloga. La inserción del DNA de interés por recombinación homóloga es el sistema más eficaz para introducir un gen en un adenovirus, ya que el genoma adenoviral es grande (>36 Kb) y difícil de manipular. Todas las construcciones fueron clonadas en el vector pAdT-CMV del sistema Adeasy™ Vector que contiene el gen de resistencia a Kanamicina y codifica para la expresión de la proteína GFP bajo el control de un promotor CMV.

Para la obtención del Adenovirus RhoE (AdRhoE), el cDNA de RhoE se obtuvo por PCR a partir de una construcción (pEXV-Myc RhoE) que contenía el cDNA de RhoE murino fusionado a un epítipo de Myc en el extremo c-terminal (Guasch *et al.* 1998). Dicha construcción fue clonada entre los sitios *XhoI* y *HindIII* del vector pAdT-CMV.

Para la construcción del adenovirus que contenía el cDNA de RhoA constitutivamente activa por una mutación del aminoácido Val en posición 14 (AdRhoA), se obtuvo el cDNA por PCR a partir de la construcción pGEX 2T V14RhoA (cedida por Anne Ridley) y se clonó entre los sitios *XhoI* y *HindIII* del vector pAdT-CMV.

Para la obtención del Adenovirus control (AdC), se utilizaron los plásmidos pAdT-CMV vacío y pAdeasy-1 descritos anteriormente. La construcción adenoviral finalmente obtenida permitía la expresión ectópica de la proteína verde fluorescente en las células infectadas. El esquema para la generación de adenovirus recombinantes, usando el sistema AdEasy™ Vector se muestra en la **Figura 3**.

Figure 1:
Generation of a Recombinant Adenovirus Using AdEasy™

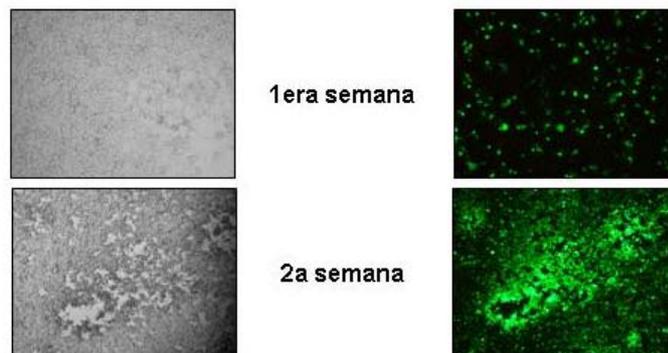
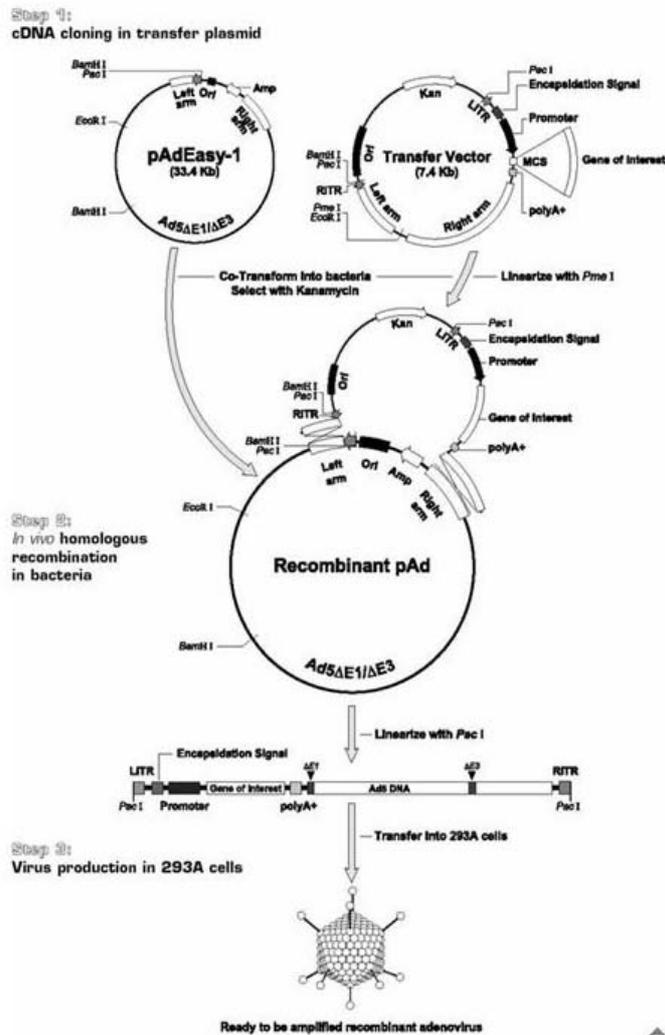


Figura 3. Esquema para la generación de adenovirus recombinantes, usando el sistema AdEasy™ Vector. Esquema representativo de como se han obtenido las diferentes construcciones adenovirales utilizadas en este trabajo. Se muestran fotografías de células 293 transfectadas con uno de los adenovirus. Se analizó la aparición de calvas de lisis y la expresión de la proteína GFP mediante microscopía de fluorescencia a la primera y segunda semana post-transfección.

3.3.1 Obtención de los adenovirus

Una vez comprobadas las construcciones por digestión y secuenciación, se digirieron 2 μ g del clon con *PmeI* con el fin de linearizarlo. Posteriormente, se procedió a transformar por electroporación el DNA lineal en células DH5 α deficientes para el gen *recA* (BJ5183) que contenían el plásmido pAdeasy-1 con la mayoría de genoma adenoviral (células AdEasier). La utilización de la cepa BJ5183 permite aumentar significativamente la probabilidad de recombinación entre los dos plásmidos (pAdTCMV-mycRhoE y pAdeasy-1) y obtener así la construcción adenoviral completa. Dicha transformación se sembró en placas con antibiótico Kanamicina y se dejó crecer a 37°C durante 16-24 hrs. La recombinación homóloga de los dos plásmidos le confiere a la bacteria la capacidad de crecer en un medio con kanamicina, pero no con ampicilina, lo que nos permitía identificar rápidamente los clones potencialmente correctos (ver mapa en **Figura 3**). Para distinguir entre la construcción recombinante o el plásmido pAdTCMV fue necesaria la digestión con el enzima *PacI* y su separación en un gel de agarosa para determinar los tamaños de los fragmentos de DNA resultantes. Una vez obtenidos clones recombinantes se procedió a obtener DNA a gran escala para su uso en transfecciones.

Para la transfección del Adenovirus recombinante, se procedió a digerir 20 μ g de DNA con *PacI* durante 16 hrs. a 37°C. Posteriormente, se precipitó el DNA con una solución de acetato sódico 0.3 M pH 5.5 y dos volúmenes de etanol absoluto. El DNA precipitado fue resuspendido en 50 μ l de agua estéril y se utilizó para la transfección en células 293.

El método de transfección empleado fue el de precipitación con fosfato cálcico (Calcium Phosphate Transfection Kit. Sigma). A las 16 hrs. de la transfección, se cambió el medio de cultivo de las células por medio fresco. A partir de este momento, se monitorizó la presencia de células GFP positivas así como la aparición de calvas de lisis, indicativo de que se estaban produciendo

partículas virales. Entre 10 y 15 días tras la transfección, se recuperaban las células, se lisaban por choques de frío y calor (-80°C/37°C, 3 ciclos) y se centrifugaban (3200 g, 10 min, 4°C). Tras centrifugar el lisado, se procedía a filtrar el sobrenadante (0.2 µm) y a utilizarlo para la siguiente ronda de amplificación donde se infectaba 1 placa de 10 cm. de células 293. Transcurridas 48-72 hrs. se recogían las células por centrifugación y se lisaban tal y como se describe anteriormente para la siguiente ronda de amplificación donde se infectaban 4 placas de 10cm. Transcurridas 48-72 hrs. se recogían las células por centrifugación y se lisaban tal y como se describe anteriormente. El proceso de amplificación culminaba con la infección de 40 placas de 10 cm. de células 293. A las 48-72 hrs. post-infección, se recogían las células por centrifugación y se resuspendía el pellet en 4-5 ml de solución de lisis para Adenovirus (137 mM NaCl, 10 mM Na₂PO₄, 2.7 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, 0.68 mM CaCl₂, 0.49 mM MgCl₂). Seguidamente, se procedía a lisar las células, a su posterior centrifugación (3200 g, 10 min, 4°C; 12000 g, 10 min, 4°C) y al filtrado del sobrenadante (0.2 µm). Finalmente, se guardaba el stock concentrado de virus a -80°C en alícuotas de 0.5 ml.

El proceso global de amplificación del adenovirus duraba aproximadamente 30 días. El esquema general utilizado para la obtención de las diferentes construcciones adenovirales se muestra en la **Figura 4**.

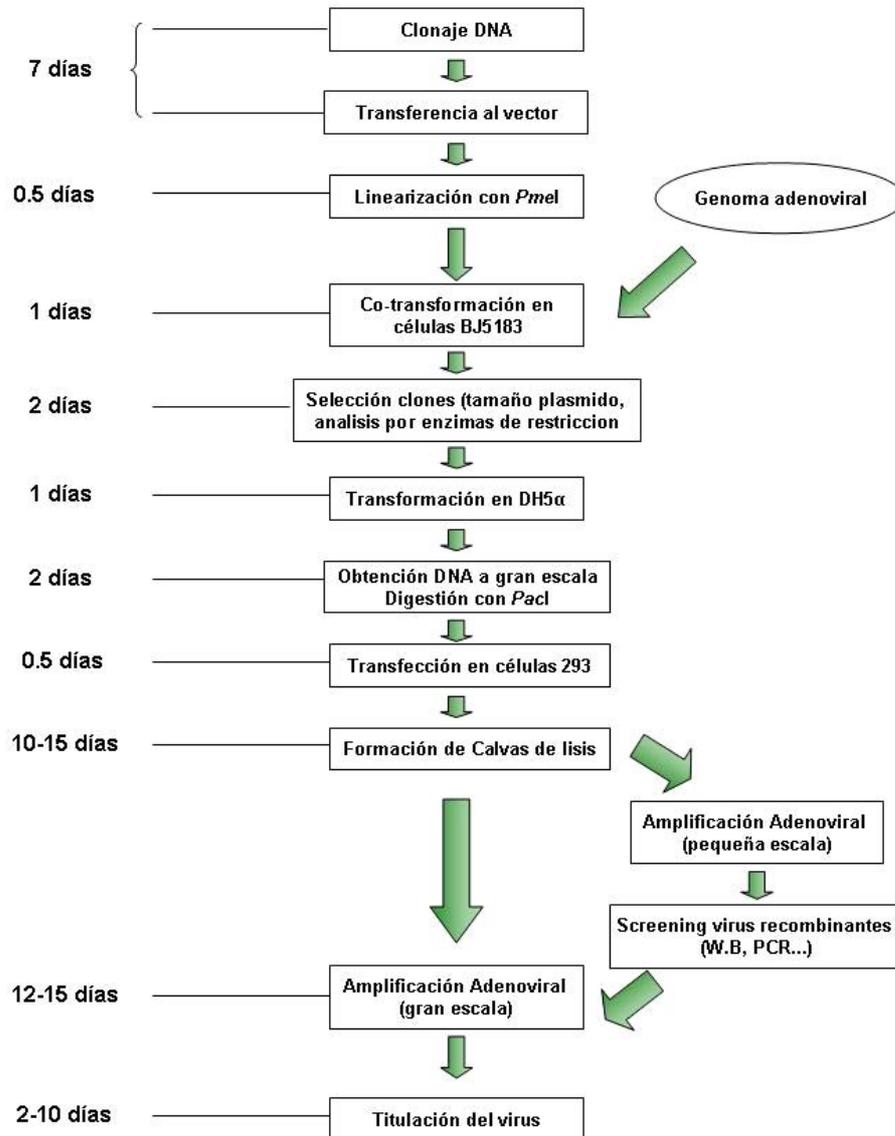


Figura 4. Esquema general utilizado para la obtención de las diferentes construcciones adenovirales. Se representa las diferentes etapas y los tiempos empleados para la generación de los diferentes adenovirus utilizados durante este trabajo. El proceso global desde el clonaje de la construcción adenoviral hasta la obtención de un stock y su titulación suponía 60 días, aproximadamente.

3.3.2 Titulación adenoviral

Para establecer el título de los stocks de adenovirus obtenidos en el apartado anterior se utilizaron dos métodos independientes: el método TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose 50), basado en la estimación del título viral a partir de un estudio a tiempo final de diluciones seriadas de un virus y la aparición del efecto citopático (CPE) en células 293 y, en el caso de adenovirus que coexpresaran la proteína GFP, la cuantificación por citometría de flujo de células U87 infectadas con diluciones seriadas del virus.

Para realizar el primer ensayo, se sembraron células 293 en una placa de 96 pocillos a una densidad de 10⁴ células/pocillo. Seguidamente, se añadían las diferentes diluciones del virus (10⁻³ a 10⁻¹⁰). En los pocillos control (sin infectar) se añadía la misma cantidad de medio. Transcurridos 10 días, se contaban el número de pocillos que presentaban CPE para cada dilución. Para calcular el TCID₅₀/ml se utilizó el método estadístico KÄRBER (Hamilton *et al.* 1977):

$$T = 10^{1+d(S-0.5)}$$

donde, d= Log 10 del factor de dilución empleado

S= suma de las frecuencias de CPE encontradas para cada dilución.

Una vez calculado el valor de TCID₅₀/ml, se obtenía el título viral (pfu/ml):

$$\text{pfu/ml} = 10^{\text{TCID}_{50} - 0.7}$$

El segundo sistema de titulación adenoviral consistió en infectar células U87 con volúmenes conocidos de cada adenovirus (10, 5, 1, 0.5 µl). Transcurridas 24 hrs. de la infección se recogían las células por centrifugación y se resuspendían en 1 ml de PBS. A continuación se analizó por citometría de flujo el porcentaje de células GFP positivas. Conociendo este valor y el número total de células se obtenía el título adenoviral.

Para comprobar la eficacia y reproducibilidad de los dos sistemas, se analizaron los títulos de varios adenovirus de forma paralela con los dos sistemas, obteniendo resultados similares.

3.3.3 Infección adenoviral

Para infectar las diferentes líneas celulares se sembraron las células a una determinada densidad y se les añadió la cantidad apropiada de los stocks adenovirales correspondiente a un MOI (multiplicity of infection) entre 1 y 50, dependiendo del experimento. La infección se realizó en un volumen reducido de medio, que correspondía aproximadamente a 1/5 del volumen de medio final utilizado. Transcurridas 2 hrs. se procedía a retirar el medio de infección y se sustituía por medio fresco.

3.4 Análisis de la proliferación y muerte celular

3.4.1 Contaje celular

Para realizar un análisis de la proliferación celular en células infectadas con los diferentes adenovirus se recogió una alícuota de cada uno de los cultivos a los diferentes tiempos y se realizó un contaje de células viables teñidas con azul de tripano 0.4% (Sigma) en una cámara de hemocimetría Neubauer y con un microscopio de contraste de fases en campo claro.

3.4.2 Incorporación de BrdU

Para el análisis de la entrada en fase S del ciclo celular, se realizaron ensayos de la incorporación de 5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) y posterior detección mediante inmunofluorescencia. El protocolo de marcaje con BrdU fue el siguiente: a los diferentes tiempos tras la infección adenoviral, se añadió BrdU (50 μ M) durante las 2 últimas horas. Pasado este tiempo, se procedió a

la fijación de las células con formaldehído 4% (en PBS). Tras la fijación, se lavaron las células con PBS y se permeabilizaron con una solución de 2N HCl/0.5% Tritón en PBS durante 10 min. Seguidamente se realizaron 3 lavados con PBS y se bloquearon las uniones no específicas con una solución de bloqueo (5% leche descremada en polvo, 10% FBS, 0.5% BSA, 0.1% Tritón X-100 en PBS). Posteriormente se detectó la incorporación de BrdU con un anticuerpo monoclonal específico unido a un fluoróforo rojo (BrdU Alexa Fluor 546. Molecular Probes, ver tabla anticuerpos). Finalmente, se realizaron 3 lavados con PBS+0.1% Tween-20 (PBT) y se tiñeron las células con Hoechst 33258 (1 µg/ml. Sigma) que permite visualizar los núcleos de las células. Para el montaje de las preparaciones, se utilizó una solución de Mowiol (6 g glicerol + 2.4 g mowiol en 6 ml H₂O más 12 ml 200 mM Tris-HCl pH8.5).

Finalmente, para contabilizar el número de células BrdU positivas se contaron en un microscopio de fluorescencia 5 campos diferentes de cada una de las preparaciones, con un mínimo contabilizado de 200 células totales, utilizando un objetivo de 40x.

3.4.3 Análisis de la muerte celular por citometría de flujo

Para el análisis de la muerte celular por citometría de flujo se utilizó un marcaje con ioduro de propidio (PI). A los diferentes tiempos posteriores a la infección se recogieron las células por centrifugación, se lavaron con PBS y finalmente se resuspendieron en un volumen de 1 ml de PBS. Para proceder a su fijación, se pasaron las células por una aguja de 21G y se depositaron lentamente sobre 4 ml de etanol 100% frío. Las células se almacenaron a –20°C un mínimo de una hora hasta su posterior análisis.

Una vez fijadas se procedió a su tinción con PI. Las células fijadas en el paso anterior fueron centrifugadas de nuevo y se lavaron 2 veces con PBS. Seguidamente se resuspendieron en un volumen final de 1 ml PBS y se añadió a cada muestra RNasa A (0.25 µg/µl; Sigma) y PI (33 ng/µl; Sigma). Se

incubaron en esta solución durante 15 min. a temperatura ambiente antes de proceder al análisis por citometría de flujo.

A continuación se analizaron las células en un citómetro de flujo FC500 (Beckman-Coulter) mediante el programa Cytomics™ RXP Cytometer y Cytomics™ RXP Analysis. El análisis de la población subG0-G1 se realizó con la ayuda del programa Cytomics™ RXP Cytometer y Cytomics™ RXP Analysis, que nos permitió estudiar el logaritmo de la población FL3, que refleja en parte el porcentaje de células apoptóticas en una población celular heterogénea. Se analizaron los datos obtenidos en varios experimentos independientes mediante el programa Microsoft Excel, y la media de estos valores se empleó en la realización de un diagrama de barras.

3.5 Tinción de actina con faloidina

Para la tinción de las fibras de actina se procedió a la fijación de las células con formaldehído 4% (en PBS). Tras la fijación, se lavaron las células con PBS y se permeabilizaron con una solución de PBS+0.5% Tritón X-100 durante 10 min. Seguidamente se realizaron lavados con PBS y se bloquearon las uniones no específicas con una solución de bloqueo (5% leche descremada en polvo, 10% FBS, 0.5% BSA, 0.1% Tritón X-100 en PBS). Posteriormente se tiñeron los filamentos de actina con faloidina unida a un fluoróforo rojo (faloidin-TRITC, Sigma.). Finalmente, se realizó una tinción nuclear con Hoescht 33258 (1 µg/ml, Sigma) y se montaron las preparaciones tal y como se describe en el apartado anterior.

3.6 Análisis de proteínas mediante la técnica de Western-blot

Para realizar la extracción de proteínas, las células se recogieron y se centrifugaron para posteriormente lavarlas dos veces con PBS frío. A continuación se resuspendieron en tampón de lisis (150 mM NaCl, 1% Tritón X-

100, 1 mM DTT, 50 mM Tris pH 8.0) más un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche) y de fosfatasas (10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄) y se incubaron durante 30 min. en hielo. Tras la centrifugación de los lisados (20.800 g, 10 min.) en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5417 R con rotor de ángulo fijo, se procedió a la cuantificación de los sobrenadantes con el método "DC protein assay" (Bio-Rad) usando albúmina sérica bovina para establecer una recta patrón.

La metodología de Western-blot empleada ha sido la descrita en "Current Protocols in Protein Science" (Coligan *et al.* 2003). Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE en geles del 11-15% de poliacrilamida, cargando 40-50 µg de proteína total. Antes de realizar la carga, se añadió a las muestras tampón de carga 5x (15% SDS; 50% glicerol; 0.1% azul de bromofenol; 312.5 mM Tris-HCl, pH 6.8; 16% β-mercapto-etanol) y se calentaron a 95°C durante 3 min. Para su separación por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida, se utilizó el sistema MiniProtean III (Bio-Rad) y un tampón compuesto por 50 mM Tris, 27 mM Glicina y 0.1% SDS. La electroforesis se realizó a 200V durante 60 min. En los ensayos de fosforilación de la proteína de Retinoblastoma (Rb), las muestras se separaron en un gel Protean II de 20x20cm (Bio-Rad) de poliacrilamida al 7.5%. Se dejó correr el gel durante toda la noche a un amperaje constante de 40 mA y no superando los 150 V.

La transferencia se hizo a una membrana de PVDF (ImmobilonTM-P Transfer Membrane, Millipore) durante 1 hora a 100V en un aparato MiniProtean (Bio-Rad) y con un tampón compuesto por 20% Metanol, 20 mM Tris y 150 mM Glicina. Transcurrido ese tiempo, las membranas se tiñeron en una solución de rojo Ponceau S (Sigma) al 0.1% en 1% ácido acético para comprobar la eficacia de la transferencia. Seguidamente, las membranas se lavaron con PBS y se incubaron en solución de bloqueo (5% de leche descremada en polvo en PBS + 0.1% Tween-20, PBT) durante 30 min. a temperatura ambiente, y en agitación.

A continuación se procedió a incubar las membranas con los anticuerpos primarios, durante 1 hora, y después se realizaron 3 lavados con PBT durante 30 min. para eliminar los restos de anticuerpo. Tras estos lavados las membranas se incubaron durante 45 min. con los correspondientes anticuerpos secundarios, y se volvieron a lavar 3 veces con PBT durante 30 min. Los anticuerpos empleados para la inmunodetección se especifican en la **Tabla 2** y fueron preparados a las concentraciones que se indica en solución de bloqueo. Las incubaciones de las membranas con los anticuerpos y sus posteriores lavados se realizaron a temperatura ambiente y en agitación. La detección de las proteínas se hizo mediante quimioluminiscencia empleando el kit ECL-plus (Amersham). Las membranas se cubrieron con film transparente y se expusieron a films X-OMAT (Kodak).

Para poder reutilizar las membranas, antes de ser incubadas con un anticuerpo primario distinto, fueron tratadas con 200 mM glicina pH 2.5 y 0.4% SDS durante 30 min. a temperatura ambiente y se lavaron abundantemente con PBS.

Anticuerpos primarios (WB)	Casa comercial	Referencia	Concentración	Descripción
anti Akt	Cell Signaling	9272	1:1000	policlonal de conejo
anti Akt- pS ⁴⁷³	Cell Signaling	9271	1:1000	policlonal de conejo
anti c-myc (9E10)	Santa-Cruz	sc-40	2 µg/ml	monoclonal de ratón
anti Cyc D (G124-259)	Pharmingen	554203	1 µg/ml	monoclonal de ratón
anti Cyc D1 (DCS-6)	Santa-Cruz	sc-20044	2 µg/ml	monoclonal de ratón
anti Cyc D3 (DCS-22)	Cell Signaling	2936	1:2000	monoclonal de ratón
anti Cyc E (M-20)	Santa-Cruz	sc-481	0.4 µg/ml	policlonal de conejo
anti Erk (C-16)	Santa-Cruz	sc-93	0.4 µg/ml	policlonal de conejo
anti Erk-pY ²⁰⁴ (E-4)	Santa-Cruz	sc-7383	1 µg/ml	monoclonal de ratón
anti FAK	Pharmingen	610087	0.25 µg/ml	monoclonal de ratón
anti FAK pY ³⁹⁷	Biosource	44-624 G	1 :1000	policlonal de conejo
anti HA (262K)	Cell Signaling	2362	0.2 µg/ml	monoclonal de ratón
anti Lamin A	Cell Signaling	2032	1:1000	policlonal de conejo
anti p21 ^{Cip1} (C-19)	Santa-Cruz	sc-397	0.5 µg/ml	policlonal de conejo
anti p27 ^{Kip1} (F-8)	Santa-Cruz	sc-1641	0.4 µg/ml	monoclonal de ratón
anti Rb (G3-425)	Pharmingen	554136	1 µg/ml	monoclonal de ratón
Anti-RhoA (26C4)	Santa Cruz	sc-418	2 µg/ml	monoclonal de ratón
Anti-RhoE/rnd3 clone 4	Upstate	05-723	1:500	monoclonal de ratón

Anticuerpos secundarios (WB)	Casa comercial	Referencia	Concentración
anti Rabbit IgG-HRP (Fc)	Pierce	31463	0.08 µg/ml
anti Mouse IgG-HRP (Fc)	Pierce	31437	0.08 µg/ml

Tabla 1: Lista de anticuerpos empleados en la realización de este trabajo.

3.7 Ensayo de la actividad kinasa de ciclina E

Este ensayo se realizó en células U87 (1.5×10^6) sembradas en placas de 10 cm e infectadas con AdC y AdRhoE y reestimuladas a 0, 8 y 16 hrs.

Las células fueron recogidas por centrifugación, se lavaron 2 veces en PBS frío, y se resuspendieron en 100 μ l de tampón de lisis más un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (ver análisis por Western Blot). Se incubaron en esta solución durante 15 min. en hielo y posteriormente se centrifugaron (20800 g, 10 min.) conservando únicamente el sobrenadante.

Los lisados se cuantificaron mediante el sistema "DC protein assay" (Bio-Rad) usando como curva patrón diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina.

Para cada inmunoprecipitación (IP) se emplearon 300 μ g de proteína, y se añadió 1 μ g del anticuerpo anti-ciclina E (ver tabla anticuerpos) y 30 μ l de una suspensión de partículas de agarosa unidas a proteína A/G (Santa Cruz), previamente lavadas 2 veces con el tampón de lisis. Se completó el volumen con tampón de lisis hasta un 1 ml. Se incubó la mezcla 2 hrs. en agitación a 4°C, y los inmunoprecipitados se lavaron 3 veces con tampón de lisis frío.

A continuación se realizó el ensayo kinasa. Para ello, se lavaron las muestras 2 veces en el tampón kinasa (50 mM Tris HCl, pH 7.5; 10 mM $MgCl_2$; 1mM DTT) y se eliminó el sobrenadante con ayuda de una jeringuilla con aguja 25G. Finalmente, se resuspendieron las muestras en 30 μ l de mezcla de reacción (50 mM Tris Hcl, pH 7.5; 10 mM $MgCl_2$; 1 mM DTT; 30 μ M ATP; 0.5 μ g/ μ l Histona H1, de Roche; 0.1 μ Ci/ μ l [^{32}P] γ ATP, de Amersham), y se incubaron en esta solución durante 30 min. a 30°C, agitando suavemente cada 10 min.

Se añadió a cada IP 7 μ l del tampón de carga 5x (15% SDS; 312.5 mM Tris HCl, pH 6.8; 50% glicerol; 16% β -mercapto-etanol; 0.25% azul de bromofenol) y volvimos a agitar. Después desnaturalizamos las proteínas por incubación a 95°C durante 3 min. y analizamos las muestras por SDS-PAGE en un gel del 15%. Tras la electroforesis, se secó el gel durante 40 min. y se expuso a un film de autorradiografía X-Omat (Kodak) a una temperatura de -80°C.

3.8 Extracción de RNA y análisis por qRT-PCR

En los experimentos de extracción de RNA, se sembraron 10^6 células en placas de 10 cm y posteriormente se infectaron con las diferentes construcciones adenovirales. En los experimentos de asincronía, las células se recogieron a 24, 48 y 72 hrs. post-infección. En los experimentos de reestimulación, las células se infectaron, se mantuvieron en 0% FBS durante 48 hrs. y se recogieron a 0, 2, 4 y 8 hrs. post-reestimulación.

El RNA total se extrajo con el “RNeasy Mini Kit” (Qiagen), siguiendo las instrucciones del manual para células adherentes.

Parte del RNA obtenido fue tratado con la DNasa I, Amplification Grade (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del proveedor. Este RNA se cuantificó en un espectrofotómetro Genesys 10 uv a una λ de 260 nm y fue empleado en una reacción de RT. Esta reacción de RT se realizó con el kit “SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR” de Invitrogen siguiendo las instrucciones del proveedor para el uso de Oligo(dT). Para cada reacción se emplearon 2-5 μ g de RNA total.

Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos de Bio-Rad y en un termociclador iCycler (Biorad). La obtención y análisis de

los datos se realizó mediante el programa de ordenador iCycler™ iQ (Optical System Software, Bio-Rad).

Las reacciones de qRT-PCR se realizaron en un volumen final de 20 μ l, que contenía dNTPs (Biotools) a una concentración final de 200 μ M, cebadores (sintetizados por TIB MOLBIOL) a una concentración final de 200 nM (se detallan en la **Tabla 2**), SYBR Green I (Molecular Probes) a una dilución final de 1:250.000, fluoresceína (Bio-Rad) a una concentración final de 10 nM, tampón para PCR de Platinum *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) sin Mg^{2+} , $MgCl_2$ a una concentración final de 1.5 mM (Invitrogen) y Platinum *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) a 0.5 unidades por reacción.

Las condiciones de tiempo y temperatura empleadas en la qRT-PCR fueron las siguientes:

1. 98°C / 3 min (1 ciclo)
2. 94°C / 1 min; 58°C / 1 min; 72°C / 1 min (40 ciclos)
3. 98°C / 1 min (1 ciclo)
4. 50°C / 1 min (1 ciclo)
5. +0.5°C / 10 seg (100 ciclos)

En el paso 5 de la qRT-PCR se produce un aumento gradual de la temperatura de 0.5°C cada 10 segundos, desde 50°C a 100°C. Con esto se consigue elaborar una curva de desnaturalización que nos indica la especificidad con la que se ha dado la reacción, lo que nos permite detectar si se han producido errores en la amplificación o la formación de dímeros entre los cebadores.

Cebadores	Secuencia (5'→3')	Tamaño del amplicón
3' <i>Cyc D1</i>	TTC ACA TCT GTG GCA CAG AG	266 pb
5' <i>Cyc D1</i>	TGC ATG TTC GTG GCC TCT AA	
3' <i>GAPDH</i>	CAC GGA AGG CCA TGC CAG	483 pb
5' <i>GAPDH</i>	CAT CAC CAT CTT CCA GGA GC	

Tabla 2: Lista de cebadores empleados en las reacciones de qRT-PCR.

Los cebadores se diseñaron para que todos tuvieran la misma temperatura de hibridación y poder ser utilizados a la vez bajo las mismas condiciones de qRT-PCR.

3.8.1 Análisis de la expresión de mRNA

El análisis de la cantidad de mRNA se realizó mediante qRT-PCR según lo descrito previamente (Livak *et al.* 2001). Se prepararon tres diluciones del cDNA de cada muestra y se utilizaron como molde en reacciones de PCR con cebadores específicos del gen *ciclina D1* o de *GAPDH* (control interno). Las diluciones del cDNA se hicieron usando un factor de 10, siendo la cantidad mayor de 100 ng de RNA en la reacción de RT. Las reacciones se realizaron por cuadruplicado y en presencia de SYBR Green I (Molecular Probes) en un termociclador iCycler de Bio-Rad.

Para calcular las variaciones de la expresión del transcrito y relativizarlas respecto a su control interno y externo, se utilizaron las fórmulas:

$$CT_{\text{gen}} - CT_{\text{GAPDH}} = \Delta CT$$

$$\Delta CT_{\text{experimento}} - \Delta CT_{\text{control}} = \Delta \Delta CT$$

CT indica el valor umbral de amplificación de cada gen (“cycle threshold”). El valor $2^{-\Delta\Delta CT}$ representa las veces que se expresa más o menos el gen que estamos analizando respecto al de su control.

4. RESULTADOS

4.1 Expresión de RhoE en células U87 mediante infección adenoviral

Para la expresión ectópica de RhoE en células U87 decidimos usar un vector adenoviral, ya que resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que estas células presentan un porcentaje excesivamente bajo de transfección (~20%) por lo que la utilización de este sistema para la sobreexpresión de RhoE resulta poco eficiente. La utilización de adenovirus permite obtener una tasa de infección elevada (>90%) sobre la mayoría de tipos celulares y, en nuestro caso, la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) al mismo nivel que la proteína clonada, permitiendo el seguimiento de las células infectadas por sistemas de detección de la fluorescencia.

Para comprobar los niveles de expresión de RhoE en las células infectadas, se sembraron 150×10^3 células por pocillo en placas de 6 pocillos y se infectaron con cantidades crecientes de virus AdRhoE (MOIs 0.5, 1, 5, 10 y 30). Al cabo de 48 hrs. de infección, se recogieron las células y se obtuvieron extractos proteicos tal y como se describe en Material y Métodos. Como se observa en la **Figura 5-A**, los niveles proteicos de RhoE aumentaron a medida que infectábamos con una mayor cantidad de virus. La hibridación de la membrana con un anticuerpo específico contra el epítipo de Myc mostró como la sobreexpresión de RhoE provenía de la construcción adenoviral.

De la misma manera que en el apartado anterior, se infectaron células U87 con el adenovirus RhoE a un MOI de 30 y se recogieron las células para la obtención de extractos proteicos a 24, 48 y 72 hrs post-infección. Tal y como se muestra en la **Figura 5-B**, los niveles de RhoE ectópico comienzan a observarse a las 24 hrs. y aumentan a medida que transcurre el tiempo, siendo los niveles máximos de expresión a las 72 hrs. post-infección.

Con todos estos resultados, decidimos utilizar un MOI 30 para la infección de células U87 y un tiempo máximo de expresión de 72 horas.

La **Figura 5-C** muestra un ejemplo de infección. Las células U87 se sembraron en cubreobjetos a una densidad de 10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Tras adherirse al sustrato, se infectaron con el virus correspondiente a un MOI 30 tal y como se describe en Material y métodos y se fue analizando la aparición de células GFP positivas cada 24 horas. El porcentaje de infección de las células a las 48 hrs. fue $\geq 90\%$ tanto con el AdC como con AdRhoE, tal y como se puede observar por la aparición de células GFP positivas.

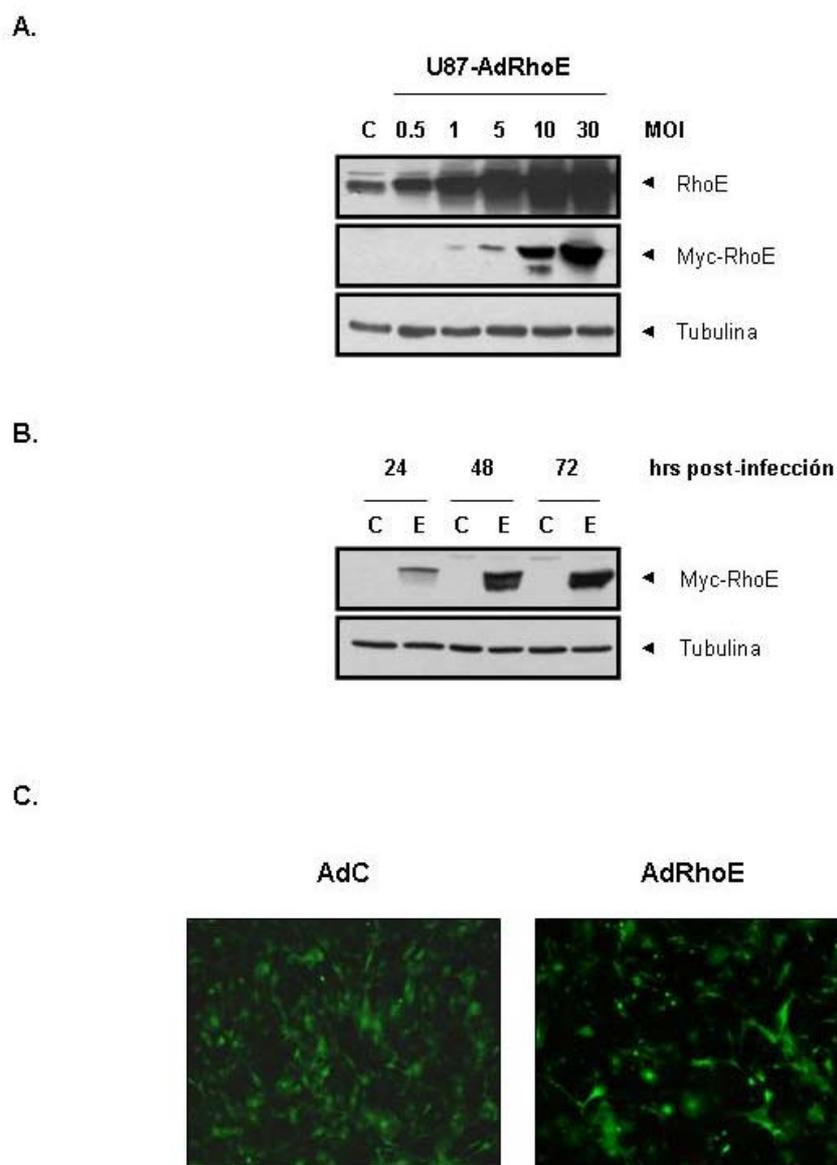


Figura 5. Expresión de RhoE en células U87 mediante infección adenoviral. (A) Análisis de la expresión de RhoE endógeno y exógeno mediante Western Blot. Se muestran los niveles de expresión de la proteína RhoE endógena (RhoE) y exógena (Myc-RhoE) en células infectadas con cantidades crecientes de virus AdRhoE (MOIs 0.5, 1, 5, 10 y 30) durante 48 hrs. **(B)** Análisis de la expresión de RhoE exógeno mediante Western Blot a lo largo del tiempo, usando un anticuerpo contra el epítipo de Myc. Se muestran los niveles de expresión de la proteína RhoE exógena en células infectadas con AdC (C) o AdRhoE (E) durante 24, 48 y 72 hrs. El MOI utilizado en ambos casos fue 30. **(C)** Células U87 fueron infectadas con AdC y AdRhoE a un MOI 30 y se analizó la aparición de células GFP positivas a las 48 hrs. El porcentaje de infección fue $\geq 90\%$ en ambos casos en todos los experimentos realizados.

4.2 RhoE induce la desorganización del citoesqueleto de actina en células U87

Tal y como está descrito en la bibliografía la sobreexpresión de RhoE provoca una desorganización del citoesqueleto de actina en diversos tipos celulares, y en el caso de poseer fibras de estrés y adhesiones focales, su desaparición (ver Introducción). Para comprobar dicho fenotipo en nuestro modelo celular se sembraron células U87 sobre cubreobjetos a una densidad de 10^4 células por pocillo en placas de 6 pocillos y en medio suplementado con suero (D-10). Tras comprobar su adhesión al sustrato se infectaron con AdC o AdRhoE. A las 48 hrs. post-infección, se procesaron para su tinción con faloidina tal y como se describe en Materiales y Métodos. En nuestras condiciones experimentales, el citoesqueleto de actina de U87 está organizado en forma de finos filamentos de actina en el citoplasma, actina cortical, algunos filopodios y una importante cantidad de lamelipodios y ondulaciones de la membrana, siendo esta última una característica fundamental de astrocitomas muy móviles y con gran potencial invasivo (Rutka *et al.* 1998). En la **Figura 6** se observa que la sobreexpresión de RhoE provoca una desorganización del citoesqueleto de actina, en comparación con las células control. Dicha desorganización consiste en la desaparición de los filamentos de actina y la aparición de agregados de actina, consecuencia de su despolimerización, como previamente ha sido descrito en células epiteliales MDCK. Las células presentan un tamaño menor, más redondeado y con largas prolongaciones en su periferia, consecuencia probablemente de la contracción celular que se produce. Se observa también una importante reducción de los lamelipodios y ondulaciones, así como una desaparición de las fibras de actina y una acumulación de actina en la periferia celular, lo que conduce a una contracción del citoplasma y a un cambio en la forma celular, dando un fenotipo más pequeño y redondeado respecto a las células control. Además, las células infectadas con AdRhoE presentan unas prolongaciones del citoesqueleto, posiblemente consecuencia de la contracción celular producida.

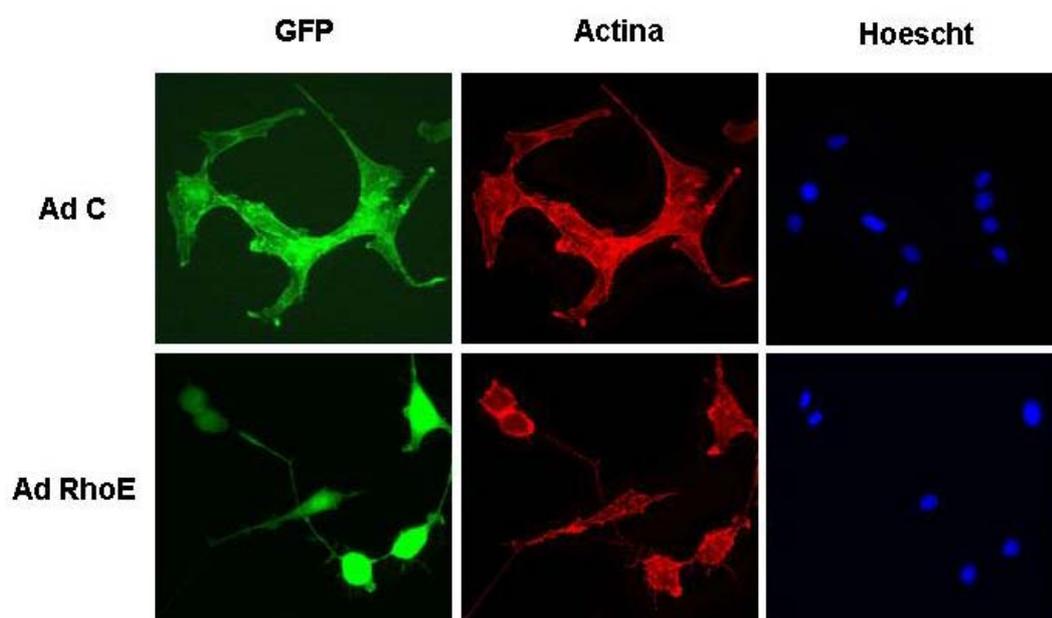


Figura 6. RhoE induce la desorganización del citoesqueleto de actina en células U87. Tinción representativa con faloidina de células infectadas con AdC o Ad RhoE durante 48 hrs. Las células infectadas con AdRhoE presentan una contracción del citoplasma que provoca una morfología redondeada y prolongaciones del citoplasma. Se muestran también fotografías de la expresión de GFP y de la tinción nuclear con Hoescht 33258.

4.3 RhoE afecta al crecimiento en cultivo de células U87

En experimentos preliminares realizados durante el transcurso de este trabajo, se observó como, de manera reiterativa, las células infectadas con AdRhoE crecían a un menor ritmo que las células control. Por otro lado, existe abundante bibliografía que apunta hacia un nuevo papel de las proteínas de la familia Rho no tan solo en el control de la morfología celular y del citoesqueleto de actina si no como elementos activos de la regulación de la expresión de diversos genes implicados en el crecimiento y la supervivencia celular (ver Introducción).

Con todos estos antecedentes, decidimos estudiar el efecto de RhoE sobre el crecimiento de células U87. Para ello se procedió a sembrar las células a una densidad de 0.5 y 1.5×10^6 células en placas de 6 y 10 cm, respectivamente. Tras comprobar su adhesión al sustrato, se infectaron con AdC o AdRhoE y se mantuvieron en presencia de suero (D-10) durante 5 días. Se realizaron contajes a distintos tiempos, tal y como se describe en Material y Métodos. La media de los diferentes tiempos de todos los experimentos realizados se emplea para la representación de las curvas de crecimiento que se muestran en la **Figura 7**. Como se puede observar, durante las primeras 48 horas post-infección, los dos grupos experimentales se comportan de manera similar. A partir del tercer día la curva de crecimiento observada en las células infectadas con los dos adenovirus empieza a ser diferente: mientras que las células control crecen de manera normal, las placas infectadas con AdRhoE presentan un menor número de células. A los 5 días se puede observar como las células control alcanzan una densidad 7 veces superior a la inicial, mientras que las células infectadas con AdRhoE no sobrepasan las 2.5 veces.

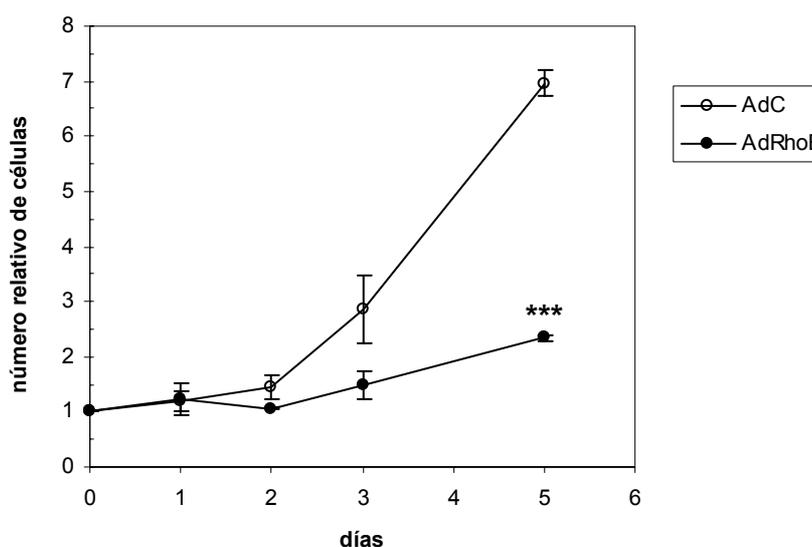
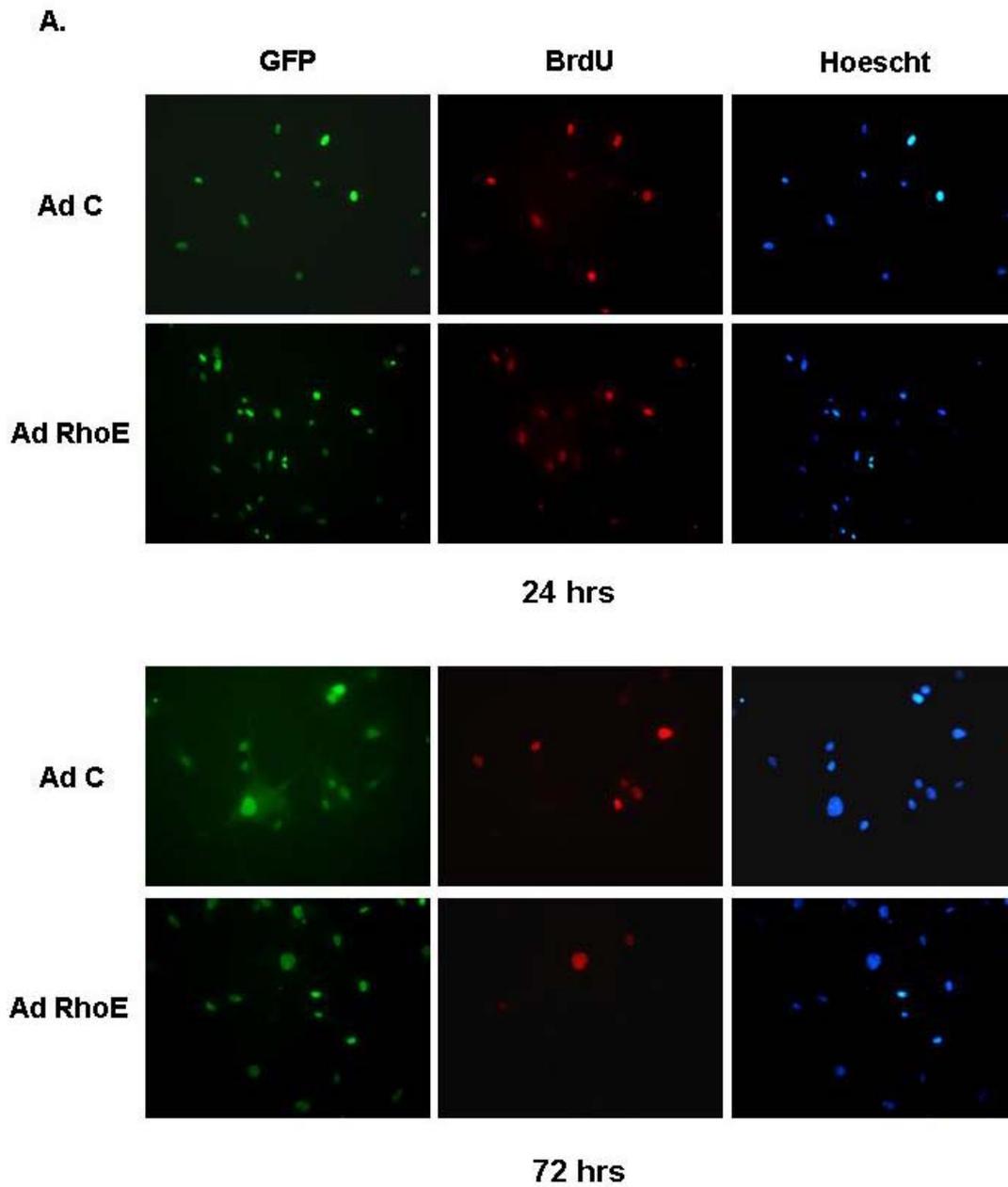


Figura 7. RhoE afecta al crecimiento en cultivo de células U87. Curvas de crecimiento de células infectadas con AdC y AdRhoE a lo largo de 5 días. Se representa la media \pm SEM del número relativo de células, expresado respecto al número inicial (=1) de un total de cinco experimentos independientes para cada construcción adenoviral y tiempo de infección. El análisis estadístico mediante el método *t* de Student, revela diferencias significativas entre los dos grupos ($p < 0.005$).

Para analizar con detalle las diferencias en el crecimiento de las células U87 infectadas con AdRhoE, se realizaron ensayos de incorporación de BrdU que permitieron determinar la tasa de síntesis de DNA tanto en células con RhoE como en el grupo control. Se sembraron las células a una densidad de 10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos y sobre cubreobjetos. Seguidamente las células fueron infectadas con AdC o AdRhoE durante 24, 48 y 72 hrs. 2 horas antes de su procesamiento, se les dio un pulso de BrdU y se realizó el análisis por inmunofluorescencia tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos. En la **Figura 8-A** se puede observar como a las 24 horas post-infección, tanto las células control como RhoE presentan un porcentaje similar de células BrdU positivas. Sin embargo, a las 72 hrs. el número de células que han incorporado este compuesto es claramente inferior en el grupo infectado con RhoE. Si analizamos estadísticamente estos resultados, se observa como la diferencia en el porcentaje de células BrdU positivas a las 72 hrs. post-infección es casi el doble en células control (**Figura 8-B**).

Por tanto, podemos concluir que RhoE afecta al crecimiento de células U87 reduciendo significativamente su tasa de síntesis de DNA.



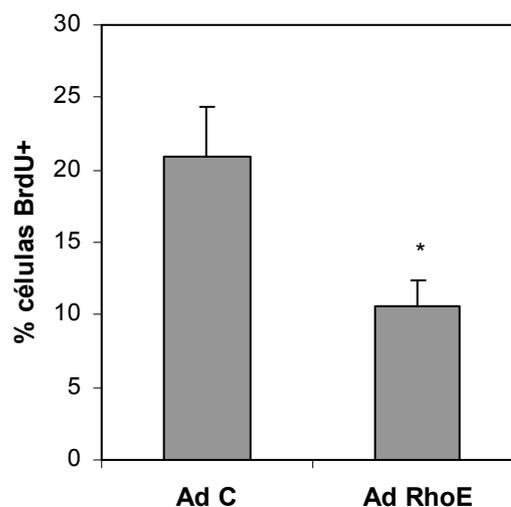
B.

Figura 8. RhoE afecta a la capacidad proliferativa de células U87. (A) Fotografías representativas de los ensayos de la incorporación de BrdU en células infectadas con AdC y AdRhoE durante 24 y 72 hrs. y su posterior detección mediante inmunofluorescencia. Se muestran también fotografías de la expresión de GFP y de la tinción nuclear con Hoescht 33258. **(B)** Gráfica representativa del porcentaje de incorporación de BrdU en células infectadas con AdC y AdRhoE durante 72 hrs. Los resultados son la media +/- SEM de cinco experimentos realizados de forma independiente para cada construcción adenoviral. El análisis estadístico mediante el método *t* de Student revela diferencias significativas entre los dos grupos ($p < 0.05$).

4.4 RhoE disminuye la fosforilación de la proteína de Retinoblastoma (Rb)

Una vez demostrado que RhoE reducía la capacidad proliferativa de células U87, y viendo que esta disminución implicaba una disminución de la síntesis de DNA, quisimos comprobar si RhoE estaba afectando a los niveles de fosforilación de la proteína de Retinoblastoma (Rb), que se ha descrito como elemento clave en la progresión durante la fase G1 del ciclo celular y transición a la fase S.

Para ello, analizamos los niveles de fosforilación de la proteína Rb mediante la técnica de Western Blot (ver Material y Métodos). En la **Figura 9** se puede observar como en las células infectadas con AdC los niveles de fosforilación de Rb se mantienen constantes durante las 72 hrs. de infección. En cambio, en células infectadas con AdRhoE se observa como, a partir de las 24 hrs. los niveles de fosforilación van disminuyendo y se mantienen por debajo de los de las células control hasta las 72 hrs. post-infección.

Para comprobar si RhoE estaba afectando a los niveles de expresión de alguna proteína clave implicada en la fosforilación de Rb analizamos la expresión de las proteínas ciclina E, ciclina D1 y ciclina D3 y del inhibidor p21^{Cip1}, proteína necesaria para la progresión en el ciclo celular desde G1 a S, uniéndose a los complejos ciclina D/Cdk4,6 y favoreciendo su formación, así como la formación de complejos ciclina E /Cdk2 activos al final de fase G1. En la **Figura 9** se observa como ni los niveles de ciclina E ni de ciclina D3 se ven alterados por la presencia de RhoE. Sin embargo, observamos como RhoE produce una bajada de los niveles de ciclina D1 a partir de las 48 hrs. post-infección respecto a las células infectadas con AdC. También se observa que la infección con AdRhoE produce una disminución de los niveles de p21^{Cip1} ya a las 48 hrs. y se mantiene por debajo del grupo control hasta las 72 hrs. post-infección.

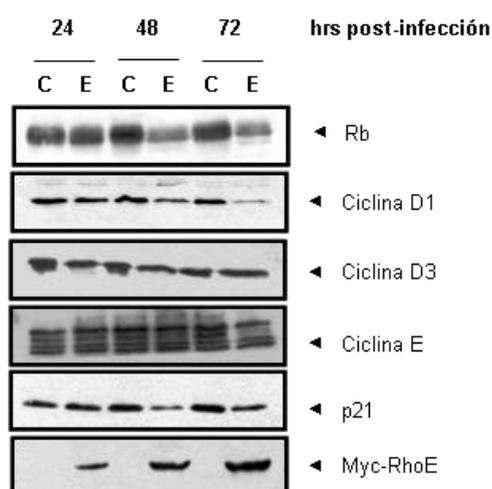


Figura 9. RhoE disminuye la fosforilación de la proteína de Retinoblastoma (Rb) e inhibe la expresión de ciclina D1 y p21^{Cip1}. Análisis de la expresión de las proteínas de Retinoblastoma (Rb), ciclina D1, ciclina D3, ciclina E y p21^{Cip1} (p21) en extractos de células infectadas con AdC y AdRhoE a los tiempos que se indica en la figura mediante la técnica de Western-blot. En la figura se muestra un ejemplo representativo de tres experimentos realizados independientemente para cada construcción adenoviral y tiempo de infección.

Para comprobar si la bajada en los niveles de expresión de la proteína ciclina D1 causada por RhoE era debida a una disminución de los niveles de RNA mensajero (mRNA), se realizó un análisis por PCR cuantitativa. Para ello se recogieron células a las 24, 48 y 72 hrs. post-infección y se extrajo RNA sobre el que realizamos una reacción de retrotranscripción (RT) para obtener cDNA tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos. El cDNA obtenido se utilizó como molde en una reacción de PCR en presencia de SYBR green. Los valores de cantidad de mRNA de *ciclina D1* se refirieron a su control respectivo de *GAPDH*. Para poder realizar un estudio comparativo, los valores representados a diferentes tiempos en la **Figura 10** se refirieron al grupo control. La media de los valores obtenidos en diferentes experimentos se representó mediante diagrama de barras. Tal y como se observa, los niveles de mensajero aumentan a partir de las 48 hrs en las células que sobreexpresan RhoE, y se mantienen elevados a las 72 hrs. Puesto que en presencia de RhoE

los niveles de la proteína ciclina D1 disminuyen, mientras que los niveles del mRNA sorprendentemente aumentan, podemos concluir que RhoE regula el nivel de expresión de ciclina D1 a través de algún mecanismo post-transcripcional.

En resumen, RhoE inhibe la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular ciclina D1 y p21^{Cip1}, lo que resulta en una disminución de los niveles de fosforilación de Rb y, como consecuencia, se reduce la tasa de proliferación de las células U87.

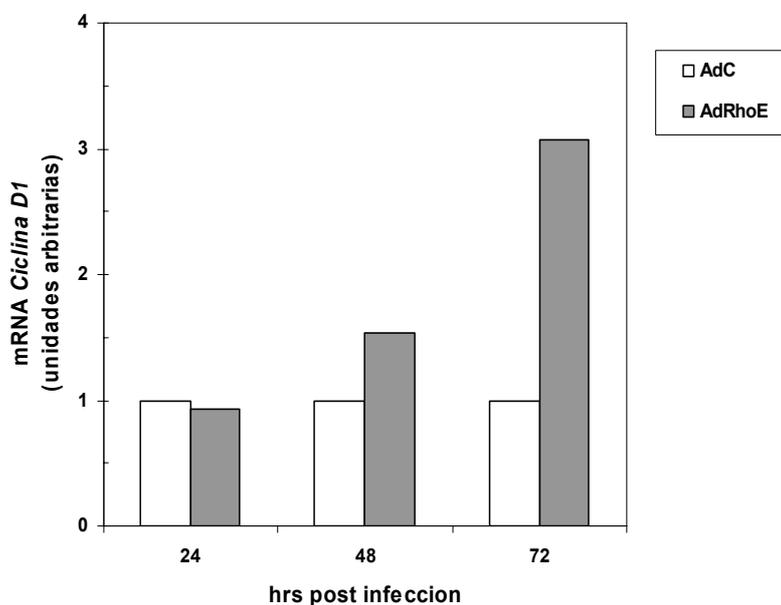


Figura 10. RhoE no inhibe la expresión de ciclina D1 a través de un mecanismo transcripcional. Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *ciclina D1* en células infectadas con AdC y AdRhoE. El cDNA utilizado como molde se obtuvo a partir de células infectadas a los tiempos indicados. Los valores de cantidad de *ciclina D1* se refirieron a su control respectivo de *GAPDH*. Para poder realizar un estudio comparativo, los valores representados a diferentes tiempos se refieren al grupo control (=1). La media de los valores obtenidos corresponde a 2 experimentos realizados de manera independiente para cada construcción adenoviral y tiempo de infección.

Tras comprobar que los niveles de expresión de ciclina D1 y p21^{Cip1} estaban afectados por RhoE, decidimos investigar que tipo de control estaba ejerciendo esta proteína sobre las rutas de PI3K/AKT y ERK así como la posible relación con moléculas como Myc, ya que está descrito que este factor transcripcional induce la expresión de ciclina D1. Para ello, las mismas muestras utilizadas en el apartado anterior fueron procesadas para estudiar la expresión de las proteínas AKT y ERK en su forma activa (pAKT y pERK), y Myc. Tal y como se observa en la **Figura 11**, en estas condiciones experimentales no se observan cambios en los niveles de estas proteínas por la sobreexpresión de RhoE a ningún tiempo del estudio.

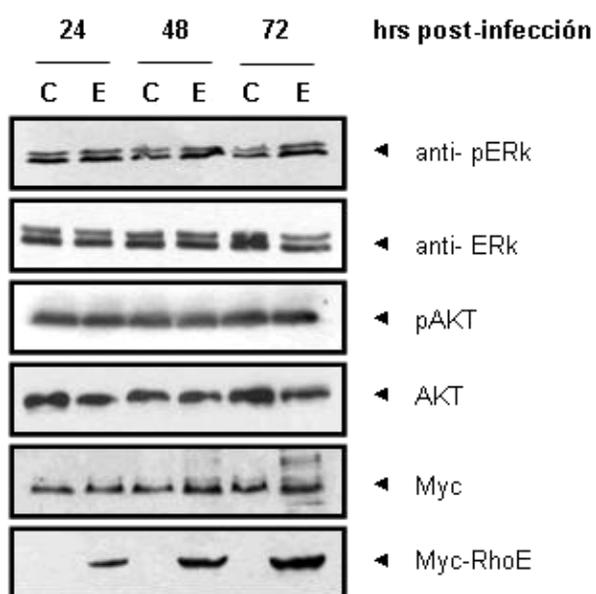


Figura 11. RhoE no afecta a la ruta de transducción de señales ERK, ni a la vía de supervivencia AKT ni a la expresión del factor de transcripción Myc en células U87 asincrónicas. Análisis de la expresión de las proteínas ERK, AKT y sus correspondientes formas fosforiladas (pERK, pAKT) así como Myc en extractos de células infectadas con AdC (C) y AdRhoE (E) a los tiempos que se indica en la figura, mediante la técnica de Western-blot. En la figura se muestra un ejemplo representativo de tres experimentos realizados independientemente para cada construcción adenoviral y tiempo de infección.

4.5 RhoE reduce la entrada en la fase S del ciclo celular en células U87 quiescentes

Puesto que RhoE afecta al nivel de fosforilación de Rb, decidimos estudiar el efecto de esta proteína sobre la entrada en ciclo de células quiescentes inducida por suero. Para ello, decidimos sincronizar las células en G0 mediante la depleción de suero en el medio y analizar el papel de RhoE en la entrada en la fase S del ciclo celular. Se procedió a la infección con AdC o AdRhoE de células U87 sembradas a 10^4 células por pocillo en placas de 6 pocillos y sobre cubreobjetos con 0% FBS. A las 48 hrs. post-infección las células fueron reestimuladas con 10% FBS y se procesaron las muestras para los diferentes experimentos entre 0 y 16 hrs. post-reestimulación, siendo el período total de infección de 3 días. 2 horas antes de su procesamiento, se dio a las células un pulso de BrdU tal y como se describe en Material y Métodos

En la **Figura 12** se representa la tasa de incorporación de BrdU en células quiescentes y reestimuladas con suero a diferentes tiempos. Las células infectadas con AdC empiezan a sintetizar DNA a partir de las 10 hrs., llegando a un pico máximo de síntesis a las 18 hrs. post-reestimulación. La tasa de proliferación de las células infectadas con AdRhoE es menor que la de las células control. Sin embargo RhoE no bloquea completamente la entrada en la fase S del ciclo, puesto que tras 14 horas de reestimulación se observa un aumento del porcentaje de células que han incorporado BrdU, aún siendo este siempre menor que en el grupo control. El análisis estadístico realizado mediante el método comparativo múltiple de Student-Newman-Keuls revela que las células infectadas con AdRhoE presentan una menor capacidad de síntesis durante todo el proceso de reestimulación ($p < 0.001$).

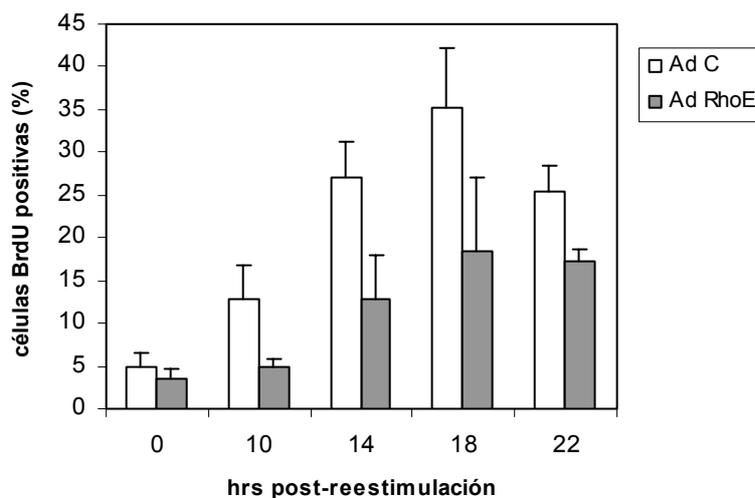


Figura 12. RhoE reduce la entrada en la fase S del ciclo celular en células U87 quiescentes. La gráfica representa el porcentaje de incorporación de BrdU en células quiescentes infectadas con AdC y AdRhoE y reestimuladas con suero durante los periodos de tiempo indicados. 2 hrs. antes de su procesamiento se dio a las células un pulso de BrdU tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados son la media \pm SEM de cuatro experimentos realizados de forma independiente.

En conclusión, RhoE es capaz de reducir la entrada en ciclo respecto a las células infectadas con el AdC, a la vez que disminuye la capacidad proliferativa de estas células.

4.6 RhoE retrasa la fosforilación de la proteína de Retinoblastoma (Rb) en células U87 reestimuladas mediante la inhibición de la inducción de la expresión de ciclina D1

Al igual que en células asincrónicas, quisimos estudiar el papel de RhoE en la fosforilación de la proteína Rb durante la entrada en la fase de S del ciclo celular. Para ello, analizamos los niveles de fosforilación de la proteína Rb mediante la técnica de Western Blot, y tal y como se observa en la **Figura 13**, las células infectadas con el AdC presentan un aumento de la fosforilación de Rb a partir de las 4 hrs. de reestimulación que se mantiene hasta las 16 hrs. post-reestimulación. Sin embargo, RhoE retrasa la fosforilación de Rb hasta las 16 hrs, punto en el que es también ligeramente menor que en células control.

También analizamos la expresión de las proteínas ciclina D1 y p21^{Cip1} mediante la técnica de Western Blot (ver Material y Métodos). Tal y como vemos en la **Figura 13**, los niveles de ciclina D1 aumentan entre las 4 y 8 hrs. post-reestimulación en las células infectadas con AdC para después retornar a los niveles basales. Dicho aumento no se produce en células infectadas con AdRhoE, donde los niveles se mantienen bajos durante todo el ensayo y al mismo nivel que en células quiescentes. En el caso de p21^{Cip1}, también observamos niveles menores de expresión en las células que expresan RhoE con respecto a las células control, incluso antes de la reestimulación.

Estos resultados apuntan hacia el papel de RhoE como un inhibidor de la fosforilación de Rb, lo que produce un bloqueo en la fase G1 y a una menor y retrasada entrada en la fase S en células U87.

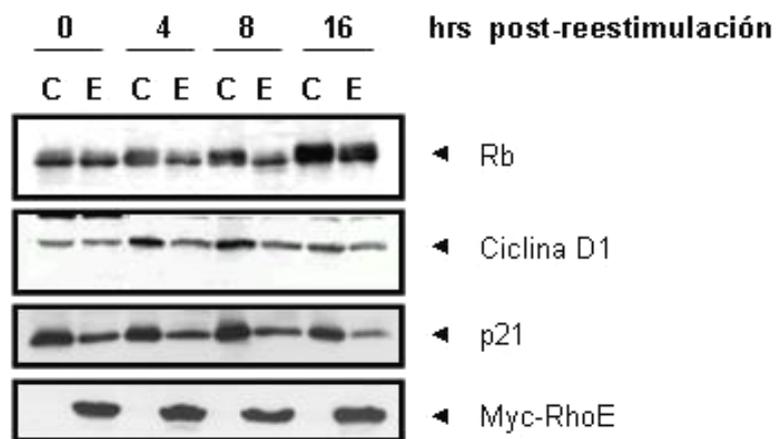


Figura 13. RhoE disminuye la fosforilación de la proteína de Retinoblastoma (Rb) e inhibe la expresión de ciclina D1 y p21^{Cip1} en células U87 reestimuladas. Ejemplo representativo del análisis de la expresión de las proteínas de retinoblastoma (Rb), ciclina D1 y p21^{Cip1} (p21) en extractos de células infectadas con AdC (C) y AdRhoE (E) y reestimuladas con suero durante los tiempos que se indica en la figura, mediante la técnica de Western-blot.

Por último, analizamos si RhoE disminuía la expresión de ciclina D1 a través de un control transcripcional. Para ello, realizamos un ensayo similar al descrito en el apartado anterior y los valores representados a diferentes tiempos se refirieron al grupo control. En la **Figura 14** se observa como los niveles de mRNA detectados en muestras procedentes de células infectadas con RhoE son superiores a las del grupo control en todos los tiempos estudiados, lo que indica que, al igual que en células asincrónicas, la disminución de los niveles de ciclina D1 mediados por RhoE no se deben a una disminución en los niveles de mRNA, si no posiblemente a algún mecanismo post-transcripcional.

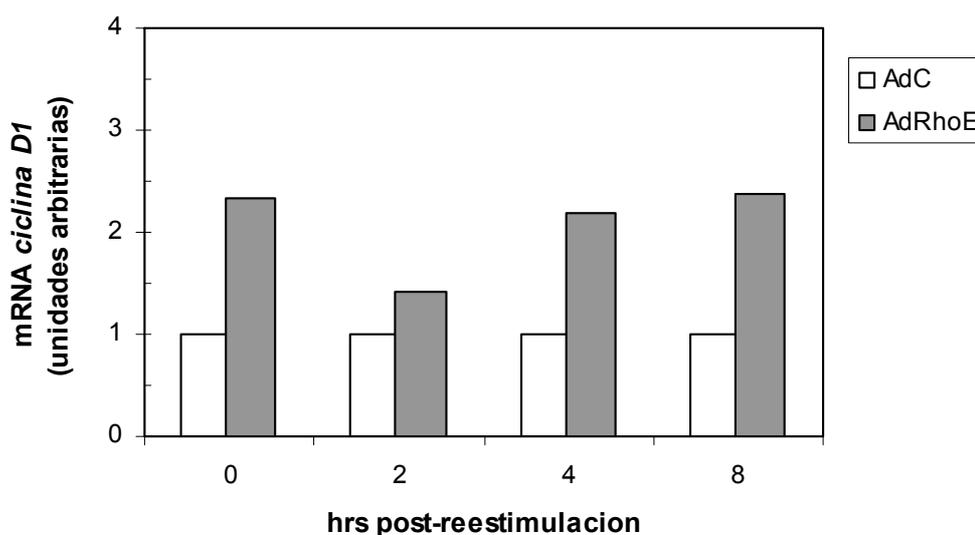


Figura 14. En células reestimuladas, RhoE tampoco inhibe la expresión de ciclina D1 a través de un mecanismo transcripcional. Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de *ciclina D1* en células infectadas con AdC y AdRhoE. El cDNA utilizado como molde se obtuvo a partir de células infectadas a los tiempos indicados. Los valores de cantidad de *ciclina D1* se refirieron a su control respectivo de *GAPDH*. Para poder realizar un estudio comparativo, los valores representados a diferentes tiempos se refieren al grupo control (=1). La media de los valores obtenidos corresponde a 2 experimentos realizados de manera independiente.

4.7 La fosforilación de Rb depende de ciclina E en células que expresan RhoE

Tal y como se ha comentado anteriormente, los complejos ciclina E/Cdk2 son capaces de fosforilar a Rb y permitir así la expresión de genes necesarios para la entrada en la fase S. Puesto que en las células que expresan RhoE se observa un cierto grado de fosforilación de Rb y de incorporación de BrdU, quisimos estudiar si la disminución de los niveles de ciclina D1 mediados por RhoE eran, en parte, compensados por un aumento de los niveles de ciclina E.

Así, al estudiar el efecto de RhoE sobre los niveles de expresión de ciclina E observamos que tampoco varían los niveles de proteína a 4, 8 y 16 hrs. post reestimulación (**Figura 15-A**). Sin embargo, al analizar los niveles de actividad kinasa de los complejos ciclina E/Cdk2 (ver Material y Métodos) se observó como los niveles de fosforilación de Histona H1 producidos por ciclina E eran mayores en células infectadas con RhoE que en células control a las 16 hrs tras la reestimulación (**Figura 15-B**).

Así, podríamos postular que la fosforilación de Rb en células infectadas con RhoE es, al menos en parte, vía los complejos activos de ciclina E/Cdk2. Dichos complejos, sin embargo, no son capaces de fosforilar en igual intensidad ni en el tiempo a Rb comparado con células control, lo que provoca una disminución de la tasa proliferativa en estas células.

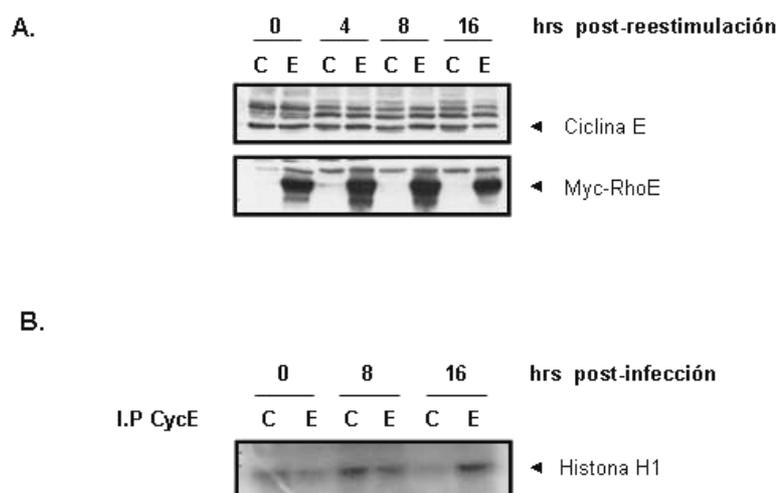


Figura 15. La fosforilación de Rb está mediada, en parte, por la actividad kinasa dependiente de ciclina E. (A) Análisis de la expresión de ciclina E en extractos de células infectadas con AdC (C) y AdRhoE (E) y reestimuladas con suero durante a los tiempos que se indica en la figura, mediante la técnica de Western-blot. **(B)** Análisis de la presencia de complejos ciclina E/Cdk2 activos en extractos de células infectadas con AdC (C) y AdRhoE (E) y reestimuladas con suero durante a los tiempos que se indica en la figura, mediante un ensayo kinasa. Los extractos se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-ciclina E y se analizó su capacidad de fosforilar al sustrato Histona H1 en presencia de [32 P] γ ATP, según se describe en Material y Métodos.

4.8 RhoE bloquea la activación de la ruta de transducción de señales mediada por ERK

Finalmente quisimos estudiar qué rutas de transducción de señales que regulan la expresión de ciclina D1 están afectadas por la expresión de RhoE.

De esta manera, se realizaron ensayos de Western Blot para analizar la expresión y actividad de AKT y de ERK (**Figura 16**). El análisis de los niveles de AKT y su forma activa (fosforilada), no muestra cambios a ningún tiempo tras la reestimulación, ni en células control ni en células infectadas con RhoE. Sin embargo la entrada en ciclo de las células U87 inducida por suero produce una activación de la ruta de ERK en células infectadas con el AdC, tal y como se observa al analizar las muestras con un anticuerpo específico para la forma fosforilada de ERK (pERK). Dicha fosforilación es rápida y corta en el tiempo (10 min tras la reestimulación). En cambio, no observamos un aumento en la fosforilación de ERK a esos tiempos en células que sobreexpresan RhoE.

En definitiva, RhoE interfiere con la activación de la ruta de transducción de señales de ERK, reduciendo por tanto la expresión de ciclina D1 y p21^{Cip1}, con lo que se observa una menor fosforilación de Rb y una reducción de la tasa proliferativa de las células U87.

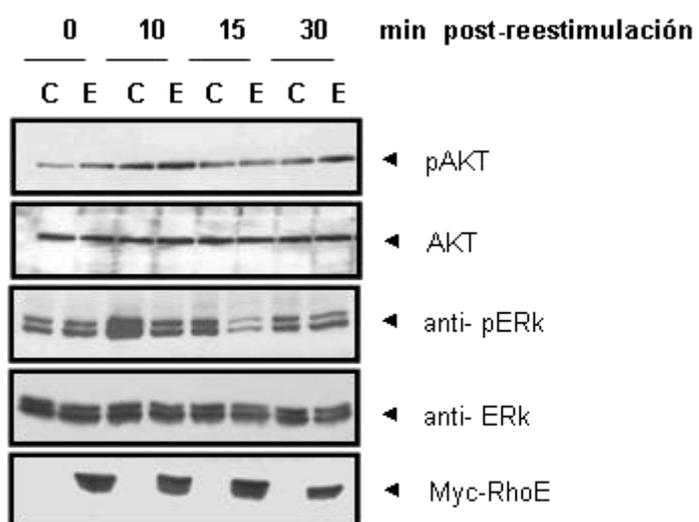


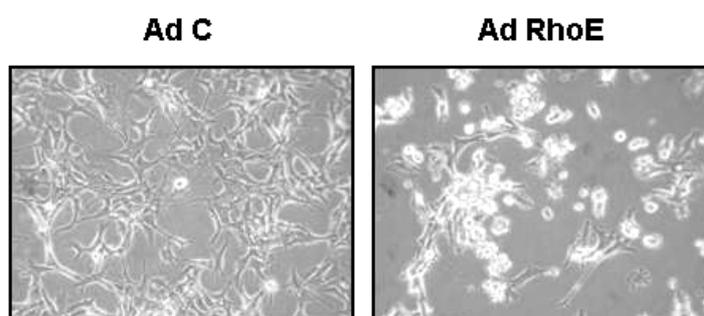
Figura 16. RhoE bloquea la activación de la ruta de transducción de señales mediada por ERK. (A) Análisis de la expresión de ERK, AKT y sus correspondientes formas fosforiladas (pERK, pAKT) en extractos de células infectadas con AdC (C) y AdRhoE (E) y reestimuladas con suero durante a los tiempos que se indica en la figura, mediante la técnica de Western-blot.

4.9 RhoE induce la muerte de células U87

Durante la realización de este trabajo observamos que RhoE induce la muerte de células U87: de manera repetitiva, la infección de células con AdRhoE a un MOI 30 provocaba, a partir de los 2 días post-infección, una desorganización del citoesqueleto de actina, dando un fenotipo más pequeño y redondeado respecto a las células control (ver apartado 4.2). La aparición de estos fenotipos, desembocaba a partir del tercer día en un aumento de células apoptóticas, fenómeno que se prolongaba hasta el día 5 post-infección tal y como demostraban el número de células flotando en el medio (**Figura 17-A**).

Para estudiar el efecto de RhoE sobre la muerte de células U87, se procedió a sembrar las células a una densidad de 50×10^4 en placas de 6 cm. Tras comprobar su adhesión al sustrato se infectaron con AdC o AdRhoE y se mantuvieron en presencia de suero (D-10) durante 5 días. Se procesaron las muestras para su análisis por citometría de flujo, tal y como se describe en Material y Métodos. A los 3 días post-infección, ni las células control ni las infectadas con RhoE presentan un aumento de la población apoptótica. Sin embargo, a los 5 días el porcentaje de la población sub-G0/G1 aumentó hasta un 25% en el caso de las células infectadas con AdRhoE, lo que supone 10 veces más respecto a las células control (**Figura 17-B**).

A.



B.

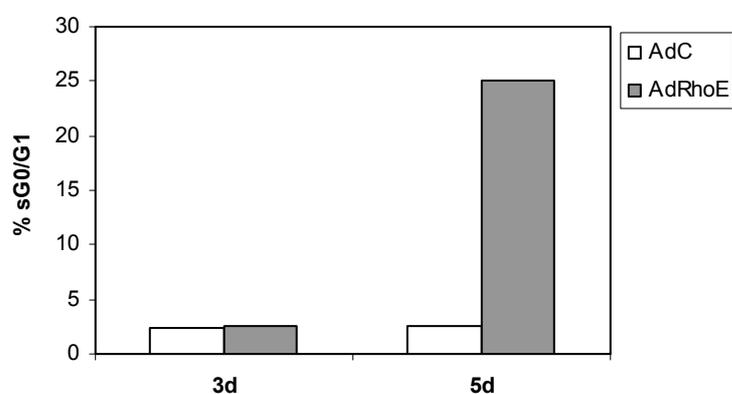


Figura 17. RhoE induce la muerte de células U87. (A) Fotografías obtenidas por microscopía de contraste de fases en campo claro de células infectadas con AdC y AdRhoE a los 5 días post-infección. (B) Análisis mediante citometría de flujo de la población sub-G0/G1 en células infectadas con AdC y AdRhoE a los 3 y 5 días post-infección. Los resultados son la media de tres experimentos realizados de forma independiente para cada construcción adenoviral y tiempo de infección.

4.10 La ruta de supervivencia de Akt no está implicada en la muerte celular inducida por RhoE

Para estudiar si existe interacción de RhoE con la ruta de supervivencia PI3 Kinasa-AKT (PI3K/AKT), descrita como la vía más importante para la inhibición de la muerte celular programada en células nerviosas, coinfectamos células U87 con la construcción AdRhoE y con las construcciones adenovirales denominadas Ad-HA-MyrAkt y Ad-HA-dnAkt, previamente descritas en Material y Métodos.

En primer lugar, nos interesó caracterizar el sistema adenoviral y para ello se infectaron células U87 con cantidades crecientes de las dos construcciones adenovirales de Akt (MOIs 5, 20 y 50). Tras 48 horas de infección, se recogieron las células y se obtuvieron extractos para Western Blot, tal y como se describe en Material y Métodos. En la **Figura 18** podemos observar que tanto la infección con Ad-HA-MyrAkt como con Ad-HA-dnAkt producen una sobreexpresión de las construcciones exógenas de Akt, tal y como revela la hibridación de las muestras con un anticuerpo anti-HA. La infección con la construcción activa de Akt es capaz de producir un ligero aumento de los niveles de fosfo-Akt. Por otra parte, la infección con la construcción Ad-HA-dnAkt es capaz de inhibir la activación de Akt endógeno, disminuyendo los niveles de fosfo-Akt respecto a U87 control, lo que demuestra que el mutante es funcional.

Se analizaron también los niveles de expresión de las proteínas ciclina D y p21^{Cip1} y se observó que ni la forma activa ni el dominante negativo de Akt afectaban a la expresión de estas proteínas.

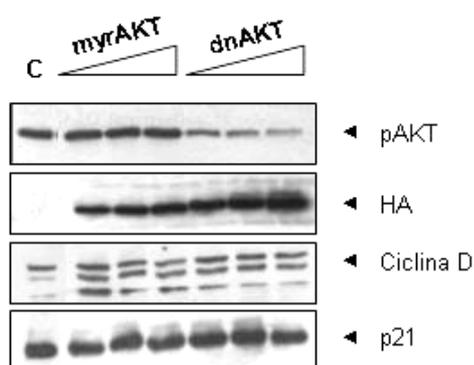


Figura 18. Caracterización del sistema adenoviral para la sobreexpresión de Ad-HA-myrAkt y Ad-HA-dnAkt en células U87. Análisis de la expresión de una forma constitutivamente activada de Akt (myrAkt) o un mutante catalíticamente inactivo de Akt (dnAkt) mediante infección adenoviral. En la figura se muestra el análisis de la expresión mediante la técnica de Western Blot de fosfo-Akt (pAkt), ciclina D y p21^{Cip1} (p21) en extractos procedentes de células infectadas con cantidades crecientes de las dos construcciones adenovirales (MOIs 5, 20 y 50) y tras 48 hrs. de infección.

Una vez comprobado el sistema adenoviral de expresión de los mutantes de Akt, se coinfectaron células con AdRhoE y las distintas construcciones de Akt. Se sembraron las células a una densidad de 10^5 células por pocillo en una placa de 6 pocillos y una vez adheridas al sustrato, se procedió a infectarlas con las distintas construcciones de Akt a unos MOIs de 1, 5, 20 y 50. Transcurridas 24 hrs. de la infección, se procedió a infectar las células con AdRhoE a un MOI 30. Se hizo un seguimiento de las células durante los 3 días siguientes y se tomaron fotografías cada 24 horas. Transcurridos los 4 días tras la primera infección, se recogieron las células y se obtuvieron extractos para Western Blot, tal y como se describe en Material y Métodos. El esquema general de la infección se detalla en la **Figura 19-A**.

Para analizar a nivel molecular el papel que juega RhoE sobre la ruta de supervivencia mediada por Akt, se analizaron por la técnica de Western Blot los niveles de expresión de las proteínas Akt, ciclina D1 y Rb en células coinfectadas con AdRhoE y AdHA-MyrAkt o AdHA-dnAkt, tal y como se ha descrito anteriormente. En la **Figura 19-B** podemos observar que la sobreexpresión de la forma activa de Akt provoca un ligero aumento de los

niveles de fosfo-Akt. En el caso de la coinfección con RhoE y el dominante negativo de Akt, se observa que los niveles de fosfo-Akt disminuyen a medida que aumenta el título de virus de la forma catalíticamente inactiva de Akt. Esto indica que las construcciones son funcionales incluso en presencia de RhoE. Los paneles representando la hibridación de las muestras con anticuerpos específicos contra los epítomos Myc y HA demuestran la eficacia de infección obtenida con las diferentes construcciones adenovirales.

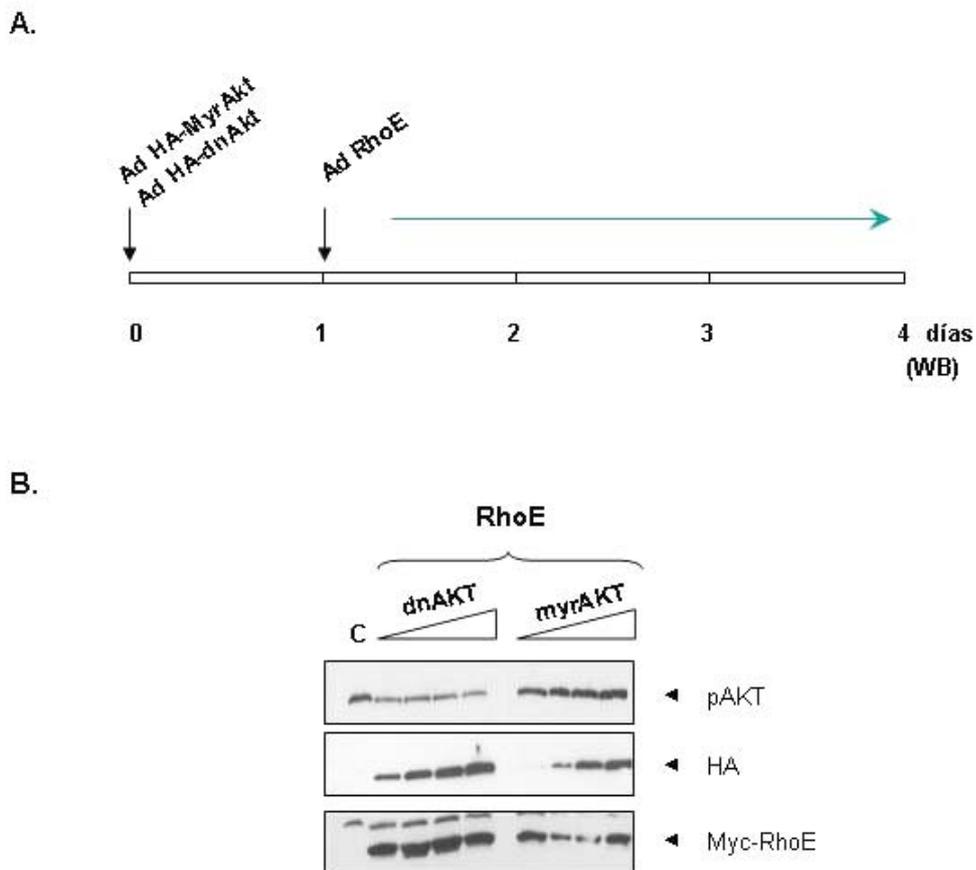


Figura 19. Coinfección de células U87 con AdRhoE y las distintas construcciones adenovirales de Akt. (A) Protocolo utilizado para la coinfección de células U87 con las construcciones Ad-HA-myrAkt o Ad-HA-dnAkt y AdRhoE. Transcurridas 24 hrs tras la primera infección se procedía a realizar la segunda infección y se monitorizaban las células por microscopía hasta los 4 días post-infección. **(B)** Análisis de la expresión por Western Blot de pAkt y RhoE en células coinfectadas con las distintas construcciones de Akt (MOIs 1, 5, 20 y 50) y RhoE (MOI 30) y a los 4 días post-infección, tal y como se describe en (A).

En la **Figura 20-A** se muestran fotografías representativas tanto de células infectadas con RhoE como de células coinfectadas con las distintas construcciones de Akt (MOI 50) y RhoE (MOI 30). Las células infectadas con RhoE presentan a los 4 días un fenotipo redondeado y muchas de ellas están despegadas del sustrato. Las células infectadas con Ad-HA-MyrAkt crecen más rápidamente y a los 4 días tras la infección la densidad celular es mucho mayor que en cualquiera de los otros casos. En cambio, la forma catalíticamente inactiva de Akt produce una disminución del número de células a partir de los dos días tras la infección. La activación de la ruta Akt parece disminuir el efecto causado por RhoE, pero no es suficiente para contrarrestarlo por completo. Así, células coinfectadas con estas dos construcciones adenovirales crecen a una menor velocidad que en el caso de las células infectadas sólo con Akt, pero quizás no se ven tan afectadas como en el caso de las células infectadas con RhoE. Finalmente, cuando sobreexpresamos RhoE junto al dominante negativo de Akt, el efecto parece ser aditivo, no quedando prácticamente células en el pocillo tras los 4 días de experimento.

Si analizamos los niveles de fosforilación de Rb en las distintas muestras (**Figura 20-B**), observamos como la activación de la ruta Akt con Ad-HA-MyrAkt produce una mayor fosforilación de Rb, que disminuye al coinfectar con AdRhoE. En células infectadas con la construcción dominante negativa de Akt, Ad-HA-dnAkt, los niveles de fosforilación de Rb son mucho menores que en células infectadas con Ad-HA-MyrAkt. Esta fosforilación disminuye aún más en células doblemente infectadas con AdRhoE y Ad-HA-dnAkt lo que sugeriría un efecto acumulativo en la inhibición de la fosforilación de Rb.

En resumen, RhoE induce la muerte celular en células de glioblastoma humano, U87. El mecanismo molecular a través del cual RhoE induce dicha vía es independiente de la ruta Akt, tal y como demuestran los experimentos de coinfección con las diferentes construcciones adenovirales de Akt.

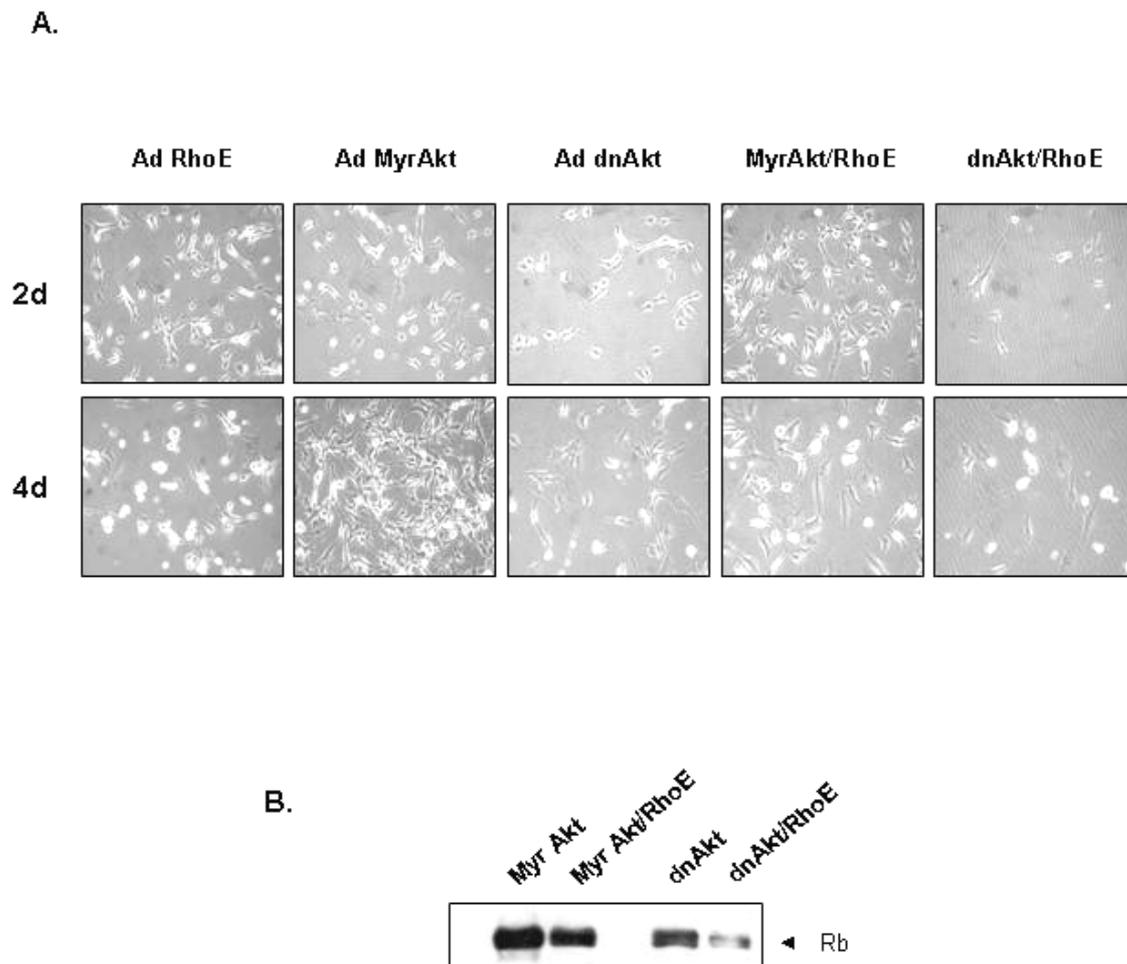


Figura 20. La ruta de supervivencia de Akt no está implicada en la muerte celular inducida por RhoE. (A) Fotografías obtenidas por microscopía de contraste de fases en campo claro de células co-infectadas con las distintas construcciones de Akt y AdRhoE a los 2 y 4 días post-infección. Las fotografías rotuladas como AdRhoE, Ad MyrAkt y Ad dnAkt corresponden a células infectadas únicamente con las respectivas construcciones adenovirales. **(B)** Análisis de la expresión de la proteína de retinoblastoma (Rb) en células co-infectadas con Ad-HA-myrAkt, Ad-HA-dnAkt y RhoE (myrAkt/RhoE y dnAkt/RhoE, respectivamente). Los carriles rotulados como MyrAkt y dnAkt corresponden a células infectadas únicamente con las respectivas construcciones adenovirales de Akt.

4.11 RhoE también induce la muerte celular a través de una vía Akt-independiente en astrocitos primarios de rata

Dado que RhoE es capaz de inducir la muerte celular a través de alguna vía independiente de la ruta de supervivencia de Akt, incluso en una línea celular como la de glioblastoma humano (U87) que tiene constitutivamente activada dicha ruta, nos interesó estudiar el efecto de RhoE en células que no tienen la ruta PI3K/Akt activa, como son los astrocitos primarios de rata. Estas células se obtuvieron según lo descrito en Material y Métodos y se sembraron a una densidad de 10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Una vez adheridas al sustrato, se infectaron las células con cantidades crecientes de AdRhoE (MOIs 5, 10 y 30) y se observó su comportamiento durante 48 hrs. post-infección. Así, observamos (**Figura 21**) que, en astrocitos primarios de rata, el efecto mediado por RhoE es dosis dependiente y que ya a un MOI 3 y a 48 hrs. empiezan a observarse células con el citoesqueleto alterado y con una morfología distinta a los astrocitos sin infectar. Si continuamos aumentando la dosis de RhoE, las células empiezan a perder su adhesión al sustrato y finalmente entran en una fase apoptótica, incluso a las 24 hrs. post-infección, como en el caso de la infección a MOI 30.

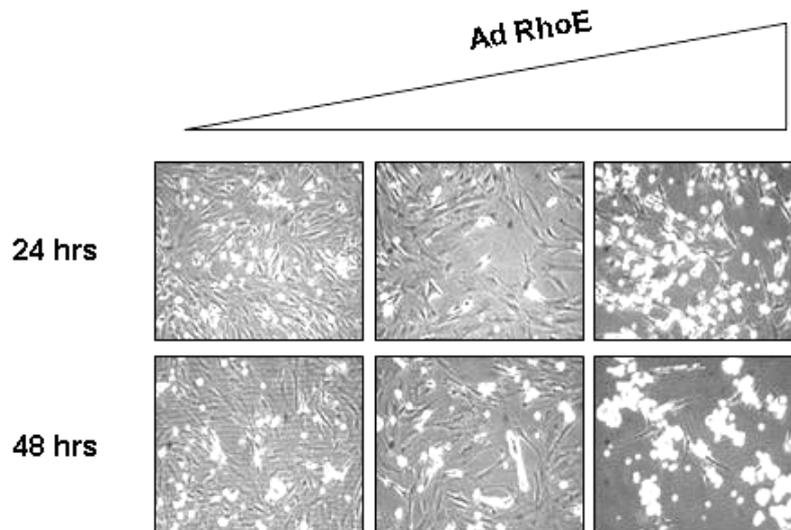


Figura 21. RhoE también induce la muerte celular en astrocitos primarios de rata. Fotografías obtenidas por microscopía de contraste de fases en campo claro de células infectadas con cantidades crecientes de virus AdRhoE (MOIs 5, 10 y 30) durante 48 hrs.

Una vez comprobado que RhoE induce muerte celular en astrocitos primarios, nos planteamos estudiar el posible papel que la vía de Akt podría jugar en este efecto, para lo que se infectaron las células con cantidades crecientes (MOIs 5, 20 y 50) de las dos construcciones adenovirales, Ad-HA-MyrAkt y Ad-HA-dnAkt, anteriormente utilizadas. Tras 48 hrs. de infección, se recogieron las células y se obtuvieron extractos para Western Blot, tal y como se describe en Material y Métodos. En la **Figura 22** podemos observar que la sobreexpresión de la forma activada de Akt produce un aumento de los niveles de fosfo-Akt respecto al control y que dicho aumento es superior al observado en células U87. Por otro lado, la sobreexpresión de la construcción mutante de Akt es capaz de disminuir de manera eficaz los niveles de fosfo-Akt respecto a astrocitos control.

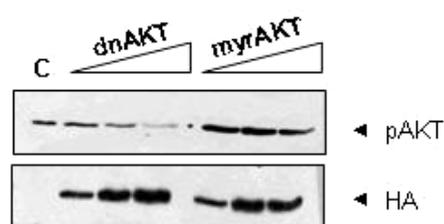


Figura 22. Caracterización del sistema adenoviral para la sobreexpresión de Ad-HA-myrAkt y Ad-HA-dnAkt en astrocitos primarios de rata. Análisis de la expresión una forma constitutivamente activada de Akt (myrAkt) o un mutante catalíticamente inactivo de Akt (dnAkt) mediante infección adenoviral. En la figura se muestra el análisis de la expresión mediante la técnica de Western Blot de fosfo-Akt (pAkt) en extractos procedentes de células infectadas con cantidades crecientes de las dos construcciones adenovirales (MOIs 5, 20, 50) y tras 48 hrs de infección.

Una vez caracterizado el sistema procedimos a estudiar si la muerte inducida por RhoE en astrocitos primarios de rata era rescatada por una activación de la ruta Akt. Se coinfectaron células con AdRhoE (MOI 10) y las distintas construcciones de Akt (MOI 50). El esquema general de la infección fue el mismo que el utilizado anteriormente para las células U87 (**Figura 19-A**).

Tal y como se observa en las fotografías de la **Figura 23-A**, las células infectadas con RhoE presentan a los 4 días un fenotipo redondeado y muchas de ellas están despegadas del sustrato. Las células infectadas con Ad-HA-MyrAkt no parecen experimentar cambios fenotípicos notables a los 4 días tras la infección, siendo la densidad celular mucho mayor que en cualquiera de los otros casos. En cambio, la forma catalíticamente inactiva de Akt afecta de una manera clara a estas células a partir de los dos días tras la infección, observando un aumento del número de células apoptóticas a lo largo del tiempo. Cuando sobreexpresamos RhoE junto al dominante negativo de Akt, el efecto resulta dramático, no quedando prácticamente células en el pocillo tras los 4 días de experimento. La activación de la ruta Akt no parece contrarrestar, ni tan siquiera disminuir, el efecto causado por RhoE, ya que células coinfectadas con las dos construcciones adenovirales presentan una tasa de

muerte celular similar a la observada en el caso de astrocitos primarios infectados sólo con RhoE.

Finalmente, quisimos comprobar si la activación de la ruta Akt era capaz de bloquear el efecto de RhoE a dosis más bajas. Para ello, coinfectamos las células con cantidades crecientes de AdRhoE (MOIs 1, 5 y 10), tal y como se ha descrito anteriormente, y un MOI fijo (50) de Ad-HA-MyrAkt. Como se ve en la **Figura 23-B**, la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de Akt no es capaz de rescatar el fenotipo inducido por RhoE y, ni tan siquiera cuando las dosis son menores, evitar la aparición de alteraciones en el citoesqueleto.

Así pues, y en resumen, las vías de señalización celular mediadas por RhoE que determinan la muerte celular son independientes de la ruta de supervivencia PI3K/Akt, tal y como sugieren los experimentos realizados con la forma constitutivamente activa de Akt así como con el dominante negativo.

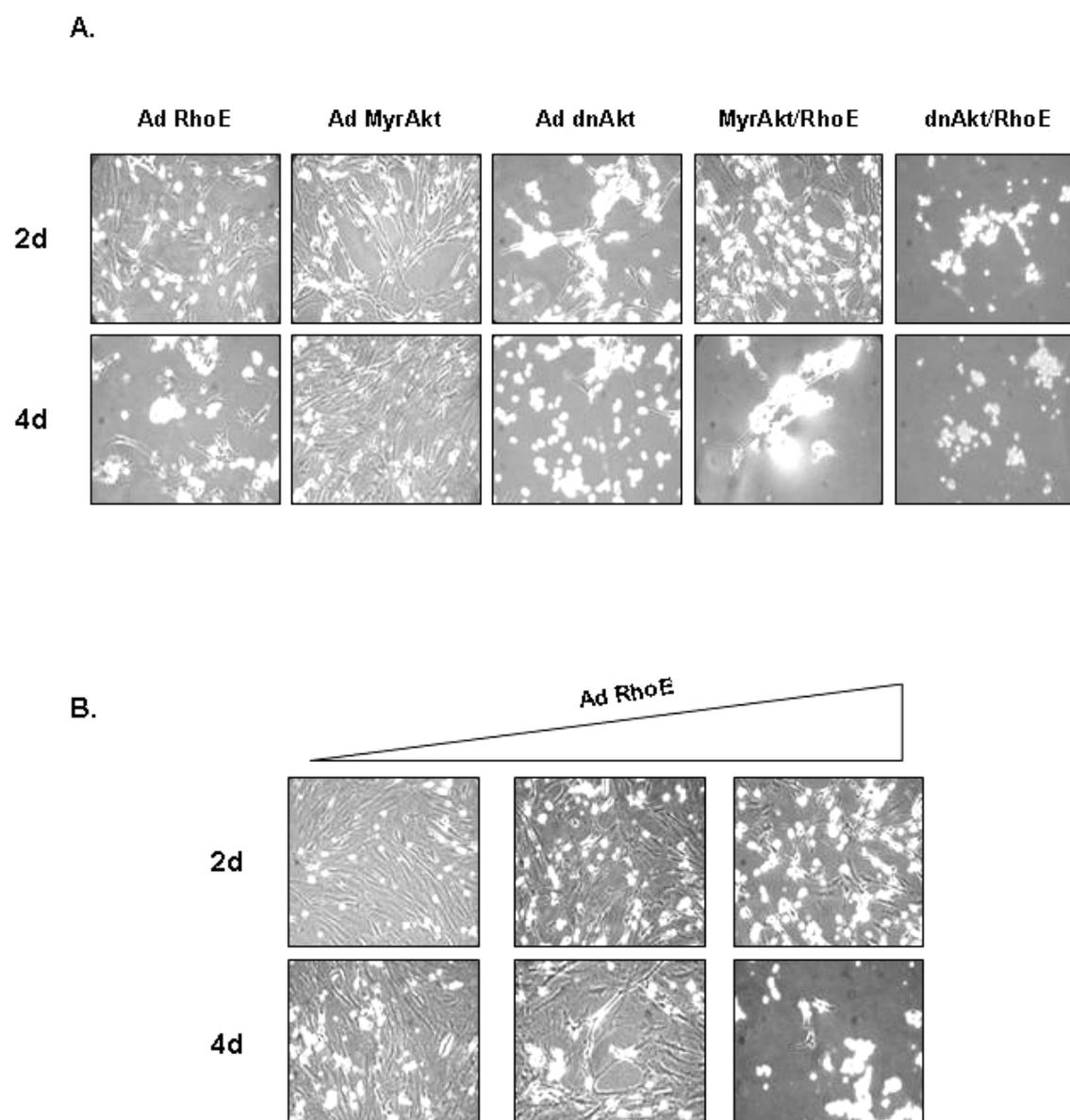


Figura 23. La muerte inducida por RhoE en astrocitos primarios de rata también se produce a través de una vía Akt-independiente. **(A)** Fotografías obtenidas por microscopía de contraste de fases en campo claro de células co-infectadas con las distintas construcciones de Akt y AdRhoE a los 2 y 4 días post-infección. Las fotografías rotuladas como AdRhoE, Ad MyrAkt y Ad dnAkt corresponden a células infectadas únicamente con las respectivas construcciones adenovirales. **(B)** Fotografías obtenidas por microscopía de contraste de fases en campo claro de células co-infectadas con la construcción Ad Myr Akt (MOI 50) y cantidades crecientes de AdRhoE (MOIs 1, 5 y 10) a los 2 y 4 días post-infección.

4.12 RhoE y RhoA producen efectos antagónicos sobre el crecimiento y supervivencia celular

Está descrito en la bibliografía que RhoA es capaz de inducir la progresión G1/S mediante la inducción de la expresión de ciclina D1 y la inhibición de la de p21^{Cip1}. Por este motivo, estudiamos si RhoA era capaz de revertir el bloqueo en G1 producido por RhoE en células U87. Para ello generamos una construcción adenoviral que contenía un mutante constitutivamente activado de RhoA y comprobamos los niveles de expresión de RhoA en células U87. Tal y como se observa en la **Figura 24**, la infección con cantidades crecientes de AdRhoA provoca un aumento de los niveles de expresión de dicha proteína, así como los niveles de ciclina D1. La sobreexpresión de RhoA no altera los niveles de pAkt ni ERK.

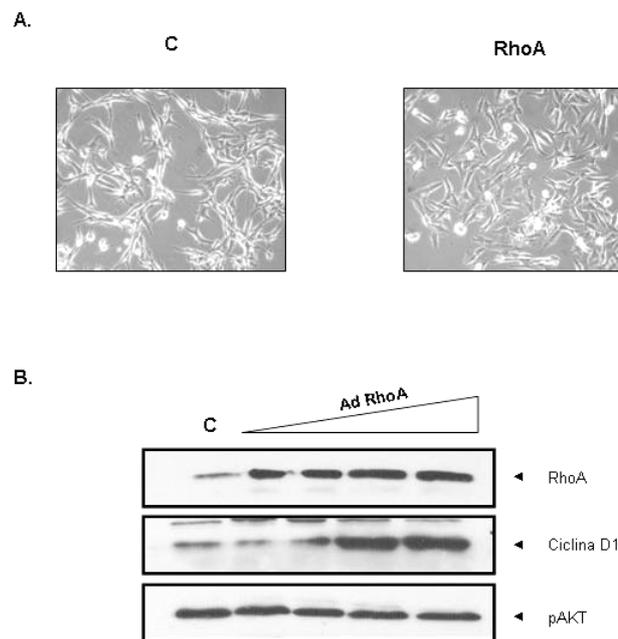


Figura 24. Caracterización del sistema adenoviral para la sobreexpresión de AdRhoA en células U87. **(A)** Fotografías obtenidas por microscopía de contraste de fases en campo claro de células infectadas con AdC (C) y AdRhoA (RhoA) a un MOI 30 a las 48 hrs post-infección. **(B)** Análisis de la expresión de las proteínas RhoA, ciclina D1, pAkt y ERK en extractos de células U87 infectadas con AdC o AdRhoA a las 48 hrs. post-infección.

Para comprobar si existe un efecto antagónico entre RhoA y RhoE, se sembraron 30×10^4 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Una vez adheridas al sustrato, se infectaron con AdRhoA (MOI 30). A las 24 horas post-infección se re infectaron los pocillos correspondientes con AdRhoE (MOI 30) y se hizo un seguimiento de las células durante los 3 días siguientes, tomando fotografías cada 24 horas. Transcurridos los 4 días tras la primera infección, se recogieron las células, se realizó un conteo celular y se obtuvieron extractos para Western Blot, tal y como se describe en Material y Métodos. El esquema general de la infección es el mismo descrito en la **Figura 19-A**.

En la **Figura 25-A** se observa que las células infectadas con AdRhoA crecen de manera similar a las células control, mientras que las células infectadas con RhoE muestran una disminución en el número de células, a los cuatro días post-infección. Sin embargo, las células co-infectadas con AdRhoA y AdRhoE muestran un crecimiento similar a las células control, lo que indica que la sobreexpresión de RhoA revierte el efecto causado por RhoE sobre la proliferación celular. Respecto a la muerte inducida por RhoE, RhoA es capaz de contrarrestar ese efecto ya que las células doblemente infectadas presentan una morfología similar a las control, tal y como se muestra en las fotografías (**Figura 25-B**).

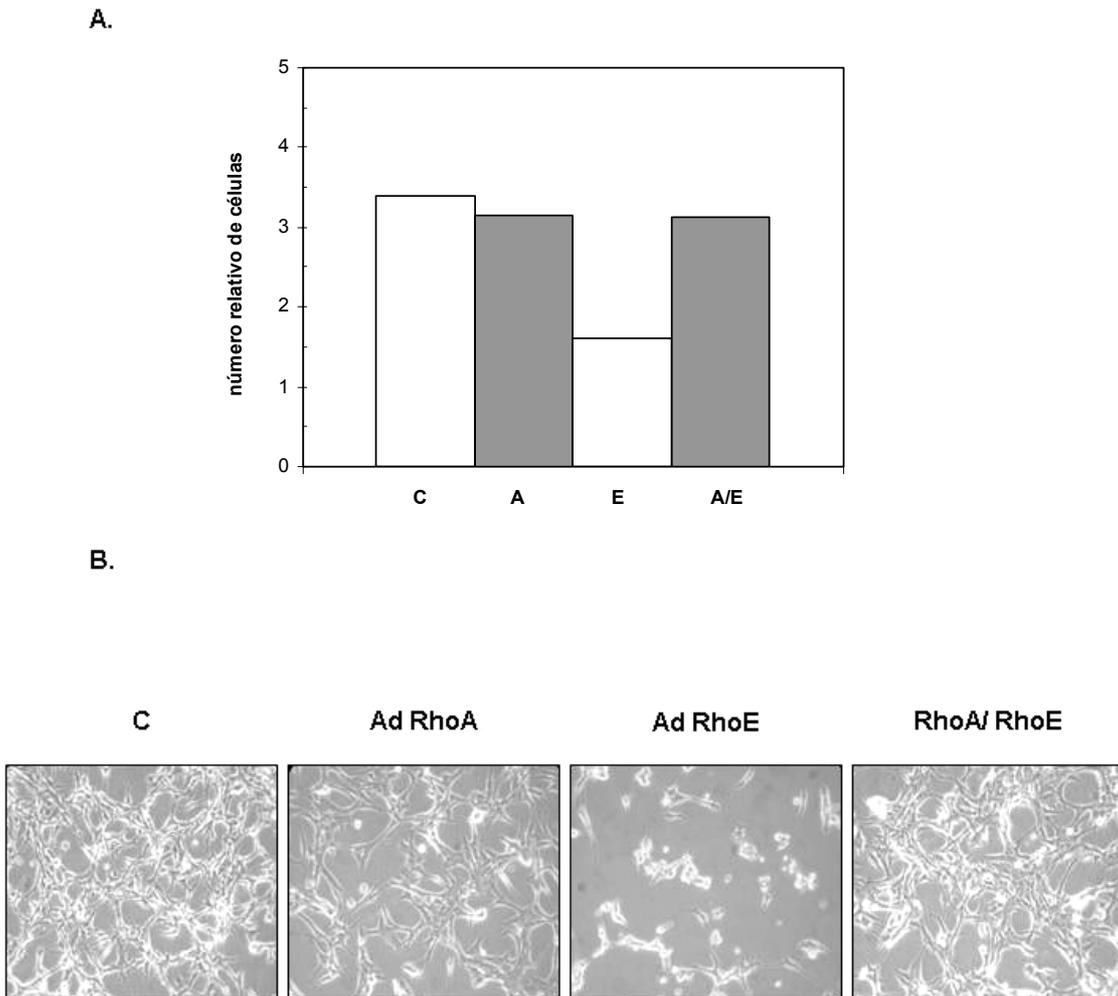


Figura 25. RhoE y RhoA producen efectos antagónicos sobre el crecimiento y supervivencia celular. (A) Número de células control o infectadas con AdRhoA, AdRhoE o co-infectadas con ambos adenovirus (RhoA/RhoE) 4 días después de la infección. Se representa el número relativo de células, expresado respecto al número inicial (=1), de 2 experimentos realizados de manera independiente. (B) Fotografías obtenidas por microscopía de contraste de fases en campo claro de células U87 infectadas con AdRhoA, AdRhoE o co-infectadas con ambos adenovirus (RhoA/RhoE) durante 4 días tal y como se describe en el protocolo de la **Figura 19-A**.

Para explicar cómo RhoA es capaz de inducir la progresión del ciclo celular incluso en presencia de RhoE, se analizaron los niveles de fosforilación de Rb. Tal y como se muestra en la **Figura 26**, RhoA mantiene los niveles de fosforilación de Rb, incluso en presencia de RhoE.

Todos estos resultados demuestran que RhoA es capaz de antagonizar los efectos causados por RhoE y promover el crecimiento celular normal a través del restablecimiento de los niveles de fosforilación de Rb.

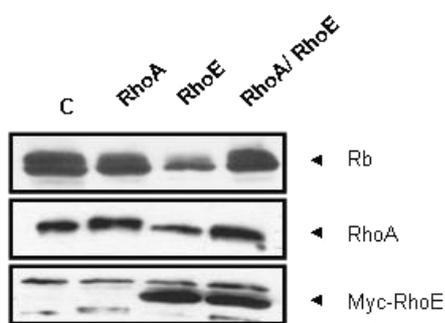


Figura 26. RhoA es capaz de rescatar la fosforilación de Rb inhibida por RhoE. Análisis de la expresión de las proteínas de retinoblastoma (Rb) en extractos de células U87 infectadas con AdRhoA, AdRhoE o co-infectadas con ambos adenovirus (RhoA/RhoE) a los cuatro días post-infección.

5. DISCUSIÓN

La transformación tumoral implica cambios fenotípicos atribuibles a alteraciones del citoesqueleto (Ridley, A. 2000). En la actualidad, está ampliamente aceptado que la formación y la preservación adecuada de las uniones intercelulares es imprescindible para el mantenimiento de la diferenciación celular y que su desestabilización facilita la dediferenciación y adquisición de la capacidad invasiva de los diferentes tumores. En consecuencia, cada vez es más importante la implicación de las proteínas reguladoras del citoesqueleto en cáncer (Pruitt *et al.* 2001; Sahai *et al.* 2002; Besson *et al.* 2004a).

La familia de GTPasas Rho engloba a un grupo de proteínas que constituye el mayor regulador de la dinámica del citoesqueleto en células eucariotas, y juegan un papel crucial en los procesos biológicos relacionados con el citoesqueleto, como la movilidad o el cambio en la forma celular (Etienne-Manneville *et al.* 2002). Además de su papel sobre el citoesqueleto, las proteínas Rho contribuyen a la regulación de otras respuestas celulares como la regulación transcripcional o bien la proliferación y transformación celular (Westwick *et al.* 1997; Pruitt *et al.* 2001; Sahai *et al.* 2002; Jaffe *et al.* 2002; Besson *et al.* 2004a).

En este trabajo hemos querido caracterizar el papel de una de estas proteínas, RhoE, sobre la proliferación y supervivencia de células U87, una línea de glioblastoma humano deficiente en la expresión de PTEN y por tanto con la ruta PI3K/Akt constitutivamente activada.

En nuestro modelo celular, la sobreexpresión de RhoE produce una alteración del citoesqueleto de actina con pérdida de filamentos de actina (**Figura 6**). Dicha desorganización del citoesqueleto conduce a una contracción del citoplasma y a un cambio en la forma celular, dando un fenotipo más pequeño y redondeado respecto a las células control, fenómeno que ya había

sido descrito por otros autores en otros tipos celulares y que da el nombre alternativo de Rnd3 a esta proteína (Nobes *et al.* 1998; Guasch *et al.* 1998; Wennerberg *et al.* 2003). Estos efectos son atribuibles a la inhibición de ROCK I, tal y como está descrito en la bibliografía (Riento *et al.* 2003; Riento *et al.* 2005). Estos resultados nos confirman que nuestra construcción de AdRhoE es funcional y provoca los mismos efectos que los descritos por otros autores hasta la fecha.

La expresión de RhoE en células U87 mediante la utilización de un sistema adenoviral causa una reducción en la proliferación (**Figuras 7 y 8**) y un retraso en la reentrada en S desde la quiescencia (**Figura 12**), lo que nos hizo analizar cuáles eran los elementos reguladores de G1 implicados en dicho efecto. Nuestros resultados demuestran que RhoE produce una bajada en la fosforilación de Rb tanto en células asincrónicas (**Figura 9**) como en células reestimuladas (**Figura 13**). La fosforilación de Rb marca el punto de restricción antes de S y por tanto es un punto central de regulación de la proliferación.

Está descrito en la bibliografía que la fosforilación de Rb es la que define a nivel molecular la transición de G1/S (Sherr 1994, 1996). Los complejos activos ciclina D/Cdk4,6 y ciclina E/Cdk2 son los principales responsables de la fosforilación de Rb durante la fase G1 (Morgan 1997; Sherr *et al.* 1999; Murray 2004). A finales de la fase G1 los complejos ciclina E/Cdk2 continúan con este proceso de fosforilación en distintos residuos de Rb (Matsushime *et al.* 1994).

Los inhibidores p21^{Cip1} y p27^{Kip1} también participan activamente en el ciclo celular. Por una parte, p21^{Cip1} es necesario para la estabilización de los complejos ciclina D/Cdk4,6 facilitando la formación de estos complejos, aumentando su estabilidad y su transporte al núcleo (LaBaer *et al.* 1997) (Cheng *et al.* 1999). Una segunda actividad de las proteínas Cip/Kip es la inhibición de los complejos ciclina-cdk activos. Este es el caso de p27^{Kip1}, que es capaz de unirse a los complejos ciclina E/Cdk2 e inactivarlos (Perez-Roger *et al.* 1997), induciendo un bloqueo en G1.

Sin embargo, y a pesar de que hay recientes trabajos que evidencian la relación entre proteínas Rho y p27^{Kip1} (Besson *et al.* 2004b), no vemos cambios en la expresión de esta proteína (datos no mostrados), lo que la descarta como responsable de esta parada en ciclo. Este dato no nos sorprende, ya que las células U87 tienen constitutivamente activada la ruta PI3K/Akt y eso hace que tengan unos niveles bajos de este inhibidor debido a varios mecanismos: por una parte, evitando su transporte al núcleo, por fosforilación en la posición Thr 157 (Viglietto *et al.* 2002) (Liang *et al.* 2002) (Shin *et al.* 2002); por otro lado, regulando su transcripción a través de los factores FoxO (Medema *et al.* 2000) y, por último, aumentando su tasa de degradación en el proteasoma por inducción de la ubiquitina-ligasa Skp2 (Montagnoli *et al.* 1999; Andreu *et al.* 2005).

En nuestro modelo celular, la disminución de la fosforilación de Rb inducida por RhoE es atribuible a una disminución de la expresión de ciclina D1 y p21^{Cip1} (**Figuras 9 y 13**). La fosforilación de Rb en la fase G1 corresponde a los complejos activos ciclina D1/Cdk4-6 (Sherr 1993) y se ha descrito que Rb es el sustrato principal de estos complejos, ya que células que no poseen Rb no necesitan de ciclina D para proliferar (Sherr 2004), lo cual coincide con la relación directa ciclina D1-Rb descrita en este trabajo.

Así pues, el eje ciclina D1-Rb se postula como el mayor regulador de señales que marca la progresión en G1 en nuestro modelo y su expresión está modulada por diversas señales, tanto intra como extracelulares. Se ha descrito que la inducción de la transcripción de *ciclina D1* mediada por Ras transcurre a través de la activación de la vía Raf-MEK-ERK (Lavoie *et al.* 1996; Balmanno *et al.* 1999), y que en dicha vía intervienen diferentes reguladores entre los que se encuentran miembros de la familia Rho (Aktas *et al.* 1997) (Gille *et al.* 1999; Coleman *et al.* 2004). Sin embargo, dicha regulación de los niveles de ciclina D1 no implica necesariamente una síntesis *de novo* de proteína si no un aumento de la estabilidad de la proteína, tal y como lo demuestran los experimentos de Guo *et al.* (Guo *et al.* 2002). Esto apoyaría nuestros resultados

obtenidos con el análisis de los niveles de mRNA en células infectadas con RhoE, donde pese a una disminución de la proteína los niveles de mRNA no varían e incluso aumentan respecto a células control (**Figuras 10 y 14**).

También la expresión de p21^{Cip1} depende de la ruta Ras-Raf-MEK-ERK, por lo que la expresión de ambas proteínas estaría coordinada, aunque en el caso de p21^{Cip1} la duración y la intensidad de la señal de la ruta Raf-MEK-ERK determina su papel en la progresión del ciclo (Sewing *et al.* 1997; Woods *et al.* 1997). Así, si la señal es corta y poco intensa, la síntesis de p21^{Cip1} es baja pero suficiente para unirse a los complejos ciclina D/Cdk4,6 y estabilizarlos, permitiendo la progresión G1/S. En cambio, si la intensidad de la señal mediada por Raf es intensa o de larga duración, se sintetiza mucha cantidad de p21^{Cip1}, que es capaz de unirse tanto a los complejos ciclina D/Cdk4,6 como a los complejos ciclina E/Cdk2 produciendo un bloqueo del ciclo.

En este trabajo hemos descrito como la sobreexpresión de RhoE no bloquea completamente la reentrada en ciclo. A este efecto hemos observado como estas células consiguen progresar, aunque en menor medida, en el ciclo probablemente por un aumento de la actividad ciclina E/Cdk2 (**Figura 15**), lo cual concuerda con el hecho de que no haya p21^{Cip1}. Dichos complejos serían capaces de fosforilar a Rb durante la fase final de G1 hasta la entrada en S, siendo entonces degradados (Ohtsubo *et al.* 1995). Diversos estudios demuestran que la sobreexpresión de la ciclina E causa un moderado aumento de la entrada en fase S, pero si se sobreexpresan ambas ciclinas, D y E, se produce un incremento importante de la transición G1/S, lo que sugiere que los complejos ciclina D/Cdk4-6 y ciclina E/Cdk2 regulan aspectos distintos de esta transición (Resnitzky *et al.* 1994; Resnitzky *et al.* 1995). Y lo más importante, ciclina E es capaz de asumir el papel de ciclina D1 en ratones con dicho gen deletado (Geng *et al.* 1999) lo que encajaría perfectamente con el modelo propuesto en este trabajo.

Por tanto, en estas células, debe existir algún mecanismo alternativo, regulado o no por proteínas Rho, que compense la inhibición de ciclina D1 por

parte de RhoE y aumente la activación de los complejos ciclina E/Cdk2. Futuros estudios deben confirmar qué mecanismos alternativos permiten mantener dicha ligera capacidad proliferativa.

Al igual que con ciclina E, quisimos ver si otras ciclinas D jugaban algún papel en nuestro modelo. Recientemente se ha descrito el papel de ciclina D3 en el desarrollo de leucemias (Sicinska *et al.* 2003). Sin embargo, en nuestro modelo, ciclina D3 no parece jugar un papel importante, ya que sus niveles de expresión no varían entre células que sobreexpresan RhoE y control (**Figura 9**).

Diversas son las evidencias que apuntan que la activación de la vía Ras-Raf-MEK-ERK y posterior regulación de los niveles de ciclina D1 requiere tanto de la participación de receptores de factores de crecimiento como de señales provenientes de moléculas de adhesión, que operan a través de proteínas Rho (Roovers *et al.* 1999) (Welsh *et al.* 2001; Roovers *et al.* 2003b). Sin embargo, Rho no parece ser un activador directo de ERK, sino que más bien modula la magnitud y duración de la activación de ERK en respuesta a Ras (Welsh *et al.* 2001) (Coleman *et al.* 2001a). Así pues, cuando Rho está activo, la señal de ERK a través de su activación por ROCK I (Roovers *et al.* 2003a) conduce a la correcta expresión de ciclina D1 y p21^{Cip1}, de manera que las células proliferan. (Olson *et al.* 1998; Sahai *et al.* 2001; Coleman *et al.* 2003; Coleman *et al.* 2004). Puesto que RhoE inhibe la actividad de ROCK I (Riento *et al.* 2003; Riento *et al.* 2005), proponemos que la interferencia que observamos de RhoE con la ruta de Ras-Raf-MEK-ERK (**Figura 16**) se debe a la inhibición de ROCK I. Esto conduciría a la disminución de los niveles de ciclina D1 que lleva a la parada del ciclo celular.

Villalonga *et al.* (Villalonga *et al.* 2004) han estudiado la parada del ciclo por RhoE en fibroblastos murinos mediante un sistema inducible de la expresión de RhoE. A diferencia de lo descrito en este trabajo, el efecto de RhoE es sólo transitorio, restableciéndose la morfología celular normal tras las

24 hrs. de la inducción. Pese a ello, también observan una disminución de los niveles de ciclina D1 y p21^{Cip1}, y confirman que la regulación de ciclina D1 no se produce a nivel transcripcional si no post-transcripcional. Por otra parte, el hecho de que E1A y la ciclina E sean capaces de rescatar el bloqueo en G1 inducido por RhoE confirma que la parada del ciclo se produce a nivel de Rb, ya que E1A secuestra e inactiva a Rb y también la sobreexpresión de la ciclina E lleva a la fosforilación e inactivación de Rb. Esto pone de manifiesto la importancia de ciclina D1 y su papel clave en la fosforilación de Rb durante este proceso. Nuestros resultados indican que en presencia de RhoE, la ciclina E es aún capaz de fosforilar a Rb, lo que coincide con los resultados de Villalonga, aunque en nuestro caso lo observamos como efecto compensatorio “natural” y no como resultado de la sobreexpresión exógena de ciclina E.

En el trabajo de Villalonga *et al.* también analizan las posibles rutas de transducción de señales (ERK, FAK, AKT y FoxOs) implicadas en la expresión de ciclina D1 y en la parada del ciclo celular y no observan alteraciones en ninguna de ellas. Esto podría ser consecuencia de la corta duración del efecto de RhoE, ya que el fenotipo del citoesqueleto desaparece a las 24 hrs. Nosotros sí observamos una disminución en la activación de FAK (datos no mostrados), lo que es posible que esté relacionado con la larga duración del efecto sobre el citoesqueleto. En el trabajo de Villalonga *et al.*, probablemente el efecto transitorio sobre el citoesqueleto hace difícil establecer la relación entre citoesqueleto y ciclo celular.

Muy recientemente, se ha descrito como RhoE es capaz de inducir el bloqueo del ciclo celular en células tumorales de próstata (Bektic *et al.* 2005). En ese caso la parada es en G2, a través de la inhibición de la expresión de dos proteínas claves en esta etapa del ciclo celular: Cdk1 y ciclina B. También nosotros hemos observado que las células que sobreexpresan RhoE presentan una ligera y progresiva acumulación en G2, aunque no hemos profundizado en el/los mecanismos responsables de dicha acumulación. Sin embargo, el efecto sobre Rb y ciclina D1 en la fase G1 nos parece crítico para la progresión en el

ciclo celular. La parada en G2 se podría atribuir a un efecto sobre el propio mecanismo de división celular (citoquinesis), lo que implicaría que, aquellas células que han conseguido progresar hacia la fase M, se encuentren ahora ante un impedimento físico, la desorganización del citoesqueleto inducida por RhoE, para dividirse y dar lugar a dos células hijas. En este aspecto, se ha descrito ampliamente el papel de diversas proteínas de la familia Rho, como RhoA o Cdc42 en la formación del huso mitótico en células de mamífero (Etienne-Manneville *et al.* 2002; Mishima *et al.* 2004). RhoE, como antagonista de RhoA, podría jugar un papel importante durante este proceso.

Durante la realización de este trabajo hemos observado de manera repetitiva que RhoE induce la muerte de células U87 (**Figura 17**). Este fenotipo también lo hemos observado en astrocitos primarios de rata (**Figura 21**), con la ruta de supervivencia de Akt normalmente regulada. La inducción de la muerte celular por RhoE es superior a los mecanismos de supervivencia inducidos por Akt. Esta afirmación se basa en que, por una parte, RhoE es capaz de inducir muerte en células U87 que tienen *per se* la ruta de Akt constitutivamente activada. Por otra parte, los experimentos realizados con el AdMyrAkt demuestran que ni la sobreactivación de dicha ruta es capaz de compensar el efecto pro-apoptótico de RhoE (**Figuras 20-A y 23**). Además la construcción dominante negativa de Akt (dnAkt) actúa de forma aditiva sobre estas células que sobreexpresan RhoE (**Figuras 20-A y 23-A**), lo que nos confirma que la muerte inducida por RhoE funciona por una ruta diferente a la de Akt e independiente de ella. En ningún caso hemos observado que RhoE altere el estado de fosforilación de Akt (**Figuras 11, 16 y 19-B**) ni los niveles de p27^{Kip1} (datos no mostrados), lo que nos confirma una vez más la independencia entre el efecto de RhoE y la ruta de Akt. También es importante destacar, que a diferencia de lo descrito en la bibliografía (Weng *et al.* 2001), la sobreexpresión de Akt en células U87 no produce un aumento de los niveles de ciclina D (**Figura 18**).

El balance entre las señales de supervivencia y las de muerte celular juega un papel clave para la prevención de la apoptosis. Mientras que en células normales las primeras han de sobreponerse a las segundas, en células tumorales existe una mayor capacidad de resistencia a señales apoptóticas, lo que les hace tener una mayor capacidad adaptativa al entorno. Por otra parte, la pérdida de adhesión al sustrato en células normales conduce a la inducción de procesos apoptóticos, mientras que en células tumorales, dicha pérdida de la adhesión es necesaria para la migración, invasión y metástasis (Ridley, A. 2000). Las proteínas Rho han sido implicadas tanto en señales pro como anti-apoptóticas en multitud de tipos celulares, (Joneson *et al.* 1999; Tang *et al.* 1999; Costello *et al.* 2000; Schurmann *et al.* 2000; Subauste *et al.* 2000; Yang *et al.* 2000; Liu, Ax *et al.* 2001; Pervaiz *et al.* 2001; Prendergast 2001), siendo Rac y FAK unas de las proteínas más importantes en este efecto (Sonoda *et al.* 1999; Tamura *et al.* 1999; Coniglio *et al.* 2001; Zugasti *et al.* 2001; Coleman *et al.* 2002; Natarajan *et al.* 2003; Westhoff *et al.* 2004). En células neuronales, el papel de Rac parece depender del tipo celular. Así, Rac es capaz de inducir apoptosis en células U87 de glioblastoma humano, pero no en astrocitos (Senger *et al.* 2002). En nuestro caso, RhoE es capaz de inducir la muerte en ambos tipos celulares pero queda por investigar que papel juega Rac en dicho proceso.

Otros autores también describen la inducción de la muerte en células tumorales de próstata en presencia de RhoE (Bektic *et al.* 2005). En este trabajo los autores observan un aumento de un subproducto de la digestión de PARP por la caspasa-3, en extractos de células que sobreexpresan RhoE. Sin embargo, los autores sugieren que dicho aumento es independiente de los efectos sobre la adhesión al sustrato y que podría tener más relación con el bloqueo en G2/M y el inicio de la apoptosis, como se ha descrito en diversos trabajos (Chen *et al.* 1999; Ueda *et al.* 1999). Sin embargo, otros autores (Liu, T. *et al.* 2003) analizan por *microarrays* la expresión de genes en células de próstata tratadas con el inhibidor de citocinas MIC-1. A pesar de que este inhibidor no afecta a la proliferación celular, se produce una pérdida de

adhesión y una apoptosis dependiente de caspasa. En el grupo de genes involucrados en la adhesión, RhoE disminuye más de dos veces con el tratamiento de MIC-1.

A nivel de citoesqueleto, RhoE actúa de manera antagónica a RhoA, inhibiendo la formación de fibras de estrés y de adhesiones focales mediada por ROCK I (Guasch *et al.* 1998; Riento *et al.* 2003; Wennerberg *et al.* 2003). El análisis de la unión de estas dos proteínas a ROCK I muestra que RhoE se une por regiones diferentes a las de RhoA (Riento *et al.* 2003). Sin embargo, se ha descrito que RhoE y RhoA no son capaces de unirse a la vez: parece que ROCK I debe estar en una conformación desplegada para permitir que RhoE se le pueda unir. RhoA es capaz de unirse a ROCK I y desplegar su estructura, dejando el sitio de unión a RhoE accesible para que ahora se pueda unir. También se ha descrito que caspasa-3 corta a ROCK I y la activa (Coleman *et al.* 2001b; Sebbagh *et al.* 2001). A nivel de proliferación celular, la expresión conjunta de RhoA y RhoE hace que las células U87 crezcan más y evita la aparición de la muerte inducida por RhoE (**Figura 25**). En células coinfectadas con AdRhoA y AdRhoE, los niveles de fosforilación de RB y de expresión de ciclina D1 son superiores a los observados en células infectadas sólo con AdRhoE y similares a los de las células infectadas con AdRhoA (**Figura 26**). Estos resultados apoyan una vez más este antagonismo RhoA/RhoE y confirman el posible papel de RhoE como inhibidor del ciclo celular.

Recientes estudios describen por primera vez que una proteína Rho, RhoE, es un sustrato fosforilable por ROCK I *in vivo* (Riento *et al.* 2005). Dicha fosforilación provoca un aumento de la estabilidad de RhoE e inhibe la transformación inducida por Ras en fibroblastos. Curiosamente, y a diferencia de RhoA, RhoE no es sustrato de ROCK II, y a su vez es el único miembro de la familia Rnd que es capaz de unirse a ROCK I e inhibir la fosforilación de otros sustratos (Riento *et al.* 2005), lo que significa que existen regiones específicas que permiten dicha unión. A diferencia de la forma no fosforilada,

fosfo-RhoE se encuentra únicamente en el citosol, lo que sugiere que el grado de fosforilación afecta a su localización y posiblemente a su función.

En resumen, parece que RhoE afecta tanto a la organización del citoesqueleto como a la proliferación celular, y en ambos casos ROCK I parece estar jugando un importante papel (ver **Figura 27**). En el caso de la proliferación, lo haría modulando la actividad de la ruta Ras-Raf-MEK-ERK; la alteración del citoesqueleto se debe a la interacción de RhoE con ROCK I, inhibiendo su actividad sobre la MLCP y la posterior desorganización de los filamentos de actina y pérdida de las adhesiones focales. En nuestro caso, la conjunción de ambos fenómenos conduce a la muerte celular, aunque no sabemos si éste es un efecto secundario o si RhoE es capaz de inducir de forma directa el proceso de apoptosis. De hecho, todos los fenotipos observados con la expresión de RhoE en células U87 son revertidos por la expresión conjunta de RhoA: en este caso, la señal de RhoA sería dominante sobre la de RhoE, tanto con respecto a la morfología, como en el reestablecimiento del control sobre el ciclo celular, lo que aumenta la supervivencia de las células.

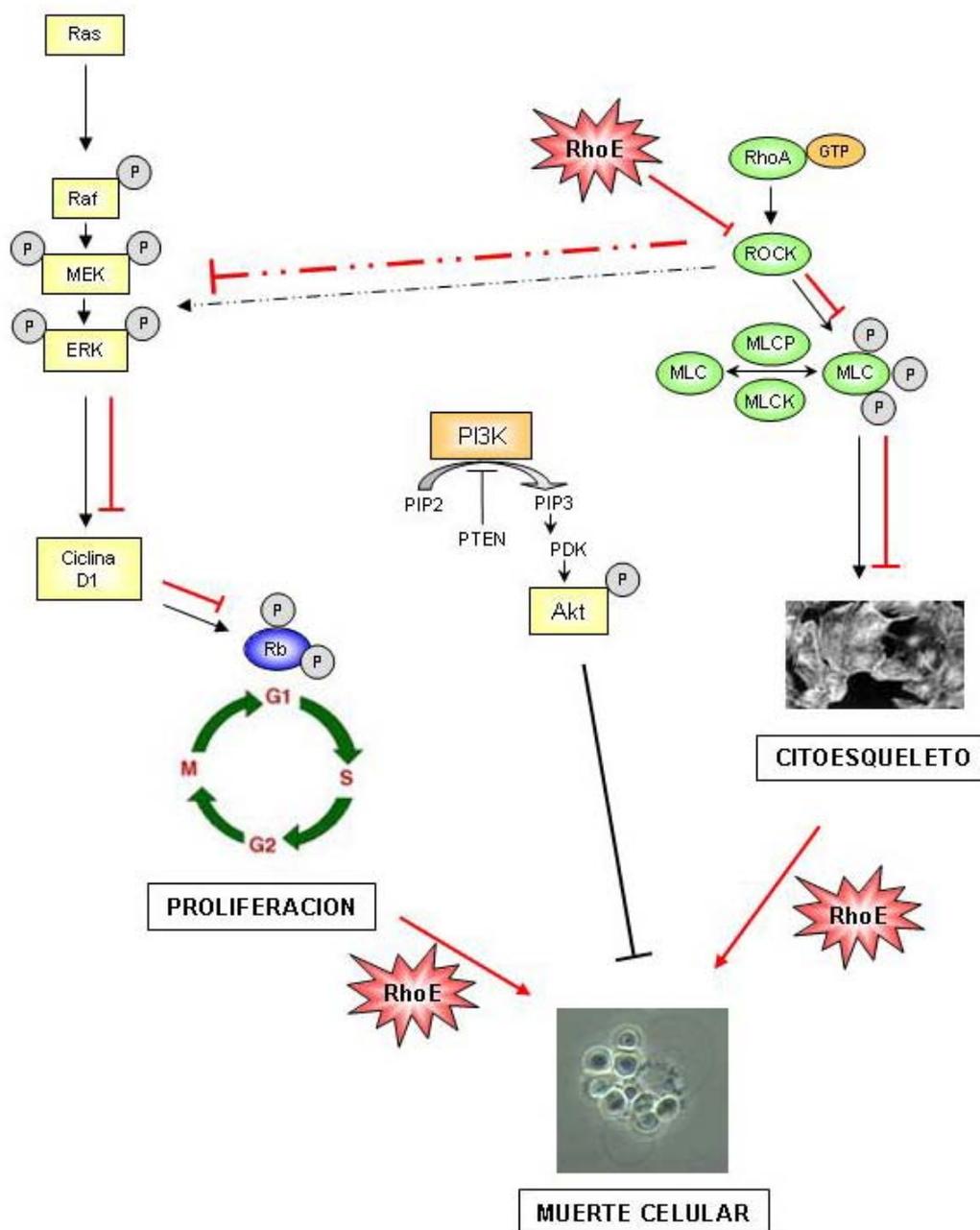


Figura 27. Posibles mecanismos de acción de RhoE sobre la proliferación y supervivencia celulares discutidos en este trabajo.

Estudios previos han sugerido que RhoE podría estar implicado en la transformación tumoral: Raf es capaz de inducir la despolarización de células epiteliales MDCK, a través de un aumento de los niveles de RhoE mediados por la ruta ERK. Dicho aumento de RhoE provoca la desorganización del citoesqueleto y un cambio fenotípico celular que recuerda a células transformadas (Hansen *et al.* 2000). Sin embargo, cada vez son más abundantes y claras las evidencias sobre el papel de RhoE como antagonista de la proliferación y transformación celular. RhoE inhibe el crecimiento de distintos tipos celulares, como fibroblastos, células de próstata DU-145, células nerviosas y células epiteliales, MDCK (Guasch, comunicación personal). Esto indica que RhoE interfiere con la proliferación celular y lo hace mediante el control de la transición G1/S, inhibiendo la expresión de ciclina D1 y de p21^{Cip1}, lo que resulta en la no fosforilación de Rb. Otros resultados apuntan a un control sobre la progresión G2/M, inhibiendo la expresión de ciclina B y Cdk1. Por otro lado, los resultados de Villalonga *et al.* (Villalonga *et al.* 2004) indican que RhoE interfiere con la transformación celular inducida por Ras. Además, nuestros resultados y los publicados por Bektic *et al.* (Bektic *et al.* 2005) muestran que RhoE detiene el crecimiento de células tumorales e induce su muerte por apoptosis. Estos resultados contradictorios podrían explicarse por los distintos tipos celulares usados en los experimentos o por los diferentes sistemas de expresión de RhoE y los distintos métodos de evaluación de los resultados.

Los datos obtenidos en este trabajo indican que en células de origen nervioso, tanto normales (astrocitos) como derivadas de un tumor (U87), la expresión exógena de RhoE mediante un sistema adenoviral resulta en una parada del ciclo celular en la fase G1 que conduce a la muerte de las células. Esta parada se debe a una alteración del sistema de control del punto de restricción y está mediada por una interferencia con la ruta de señalización que conduce a la activación de ERK y a la expresión de ciclina D1 y p21^{Cip1}. La inducción de la apoptosis es independiente de la ruta de supervivencia de Akt. Por último, todos estos efectos pueden ser contrarrestados por la

sobreexpresión de un mutante activado de RhoA. Esto indica una vez más que RhoE tiene un papel antagonista con el de RhoA.

El hecho de que RhoA sea considerado un inductor de la proliferación celular, junto con el conjunto de resultados aquí expuestos, nos lleva a proponer a RhoE como un posible oncosupresor, cuya sobreexpresión conduce a la muerte de las células. Según esta hipótesis, deberían aparecer tumores en los que RhoE presentara una expresión disminuida. Por último, la delección de este gen conduciría a una mayor susceptibilidad a la aparición de tumores. Vamos a explorar esta posibilidad con la generación de un ratón deficiente en RhoE con el que pensamos probar el papel de RhoE en transformación tumoral y que nos permitirá profundizar en la estrecha relación existente entre todas las distintas funciones celulares por dispares que parezcan, como son la organización del citoesqueleto y el control de la proliferación celular.

6. CONCLUSIONES

1. RhoE induce la desorganización del citoesqueleto de actina en células U87, de forma similar a lo descrito para otras líneas celulares.
2. RhoE inhibe el crecimiento de células U87, a través de un bloqueo en la fase G1. Dicho bloqueo se produce por una inhibición de la expresión de ciclina D1 y p21^{Cip1} que resulta en una reducción del grado de fosforilación de Rb.
3. RhoE interfiere con la activación de ERK inducida por suero.
4. RhoE induce muerte celular a través de mecanismos independientes de la ruta de supervivencia PI3K/ Akt, tanto en células U87 como en astrocitos primarios de rata.
5. RhoA es capaz de revertir el efecto sobre el crecimiento y supervivencia inducido por RhoE en células U87.
6. Con los datos presentados en este trabajo proponemos un nuevo papel para RhoE como proteína supresora de tumores.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aktas, H., H. Cai y G. M. Cooper (1997). Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol Cell Biol*, **17**(7): 3850-7.
- Alberts, A., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y P. Walter (2002). *Molecular Biology of the Cell*. New York, Garland Science.
- Andreu, E. J., E. Lledó, E. Poch, C. Ivorra, M. Albero, J. Martinez-Climent, C. Montiel-Duarte, J. Rifon, J. Perez-Calvo, C. Arbona, F. Prosper y I. Perez-Roger (2005). BCR-ABL induces the expression of Skp2 through the PI3K pathway to promote p27kip1 degradation and proliferation of CML cells. *Cancer Res*, **65**(8): 3264-72.
- Assoian, R. K. y M. A. Schwartz (2001). Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. *Curr Opin Genet Dev*, **11**(1): 48-53.
- Bagui, T. K., S. Mohapatra, E. Haura y W. J. Pledger (2003). P27Kip1 and p21Cip1 are not required for the formation of active D cyclin-cdk4 complexes. *Mol Cell Biol*, **23**(20): 7285-90.
- Balmanno, K. y S. J. Cook (1999). Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21Cip1 and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells. *Oncogene*, **18**(20): 3085-97.
- Bandara, L. R. y N. B. La Thangue (1991). Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature*, **351**(6326): 494-7.
- Bao, W., M. Thullberg, H. Zhang, A. Onischenko y S. Stromblad (2002). Cell attachment to the extracellular matrix induces proteasomal degradation of p21(CIP1) via Cdc42/Rac1 signaling. *Mol Cell Biol*, **22**(13): 4587-97.
- Barnard, D., B. Diaz, D. Clawson y M. Marshall (1998). Oncogenes, growth factors and phorbol esters regulate Raf-1 through common mechanisms. *Oncogene*, **17**(12): 1539-47.
- Bektic, J., K. Pfeil, A. P. Berger, R. Ramoner, A. Pelzer, G. Schafer, K. Kofler, G. Bartsch y H. Klocker (2005). Small G-protein RhoE is underexpressed in prostate cancer and induces cell cycle arrest and apoptosis. *Prostate*.
- Besson, A., R. K. Assoian y J. M. Roberts (2004a). Regulation of the cytoskeleton: an oncogenic function for CDK inhibitors? *Nat Rev Cancer*, **4**(12): 948-55.

- Besson, A., M. Gurian-West, A. Schmidt, A. Hall y J. M. Roberts (2004b). p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev*, **18**(8): 862-76.
- Biggs, W. H., 3rd, J. Meisenhelder, T. Hunter, W. K. Cavenee y K. C. Arden (1999). Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(13): 7421-6.
- Bishop, A. L. y A. Hall (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*, **348 Pt 2**: 241-55.
- Brazil, D. P., J. Park y B. A. Hemmings (2002). PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell*, **111**(3): 293-303.
- Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmond, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis y M. E. Greenberg (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, **96**(6): 857-68.
- Cantrell, D. (1998). Lymphocyte signalling: a coordinating role for Vav? *Curr Biol*, **8**(15): R535-8.
- Cardone, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch y J. C. Reed (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, **282**(5392): 1318-21.
- Chardin, P. (1999). Rnd proteins: a new family of Rho-related proteins that interfere with the assembly of filamentous actin structures and cell adhesion. *Prog Mol Subcell Biol*, **22**: 39-50.
- Chau, B. N. y J. Y. Wang (2003). Coordinated regulation of life and death by RB. *Nat Rev Cancer*, **3**(2): 130-8.
- Chen, F. W. y Y. A. Ioannou (1999). Ribosomal proteins in cell proliferation and apoptosis. *Int Rev Immunol*, **18**(5-6): 429-48.
- Cheney, I. W., D. E. Johnson, M. T. Vaillancourt, J. Avanzini, A. Morimoto, G. W. Demers, K. N. Wills, P. W. Shabram, J. B. Bolen, S. V. Tavtigian y R. Bookstein (1998). Suppression of tumorigenicity of glioblastoma cells by adenovirus-mediated MMAC1/PTEN gene transfer. *Cancer Res*, **58**(11): 2331-4.
- Cheng, M., P. Olivier, J. A. Diehl, M. Fero, M. F. Roussel, J. M. Roberts y C. J. Sherr (1999). The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *Embo J*, **18**(6): 1571-83.

- Chiarle, R., Y. Fan, R. Piva, H. Boggino, J. Skolnik, D. Novero, G. Palestro, C. De Wolf-Peeters, M. Chilosi, M. Pagano y G. Inghirami (2002). S-phase kinase-associated protein 2 expression in non-Hodgkin's lymphoma inversely correlates with p27 expression and defines cells in S phase. *Am J Pathol*, **160**(4): 1457-66.
- Chihara, K., M. Amano, N. Nakamura, T. Yano, M. Shibata, T. Tokui, H. Ichikawa, R. Ikebe, M. Ikebe y K. Kaibuchi (1997). Cytoskeletal rearrangements and transcriptional activation of c-fos serum response element by Rho-kinase. *J Biol Chem*, **272**(40): 25121-7.
- Chrzanowska-Wodnicka, M. y K. Burridge (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol*, **133**(6): 1403-15.
- Clark, E. A., T. R. Golub, E. S. Lander y R. O. Hynes (2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature*, **406**(6795): 532-5.
- Coleman, M. L. y C. J. Marshall (2001a). A family outing: small GTPases cyclin' through G1. *Nat Cell Biol*, **3**(11): E250-1.
- Coleman, M. L., E. A. Sahai, M. Yeo, M. Bosch, A. Dewar y M. F. Olson (2001b). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol*, **3**(4): 339-45.
- Coleman, M. L. y M. F. Olson (2002). Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. *Cell Death Differ*, **9**(5): 493-504.
- Coleman, M. L., C. J. Marshall y M. F. Olson (2003). Ras promotes p21(Waf1/Cip1) protein stability via a cyclin D1-imposed block in proteasome-mediated degradation. *Embo J*, **22**(9): 2036-46.
- Coleman, M. L., C. J. Marshall y M. F. Olson (2004). RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**(5): 355-66.
- Coligan, J. E., B. M. Dunn, H. L. Ploegh, D. W. Speicher y P. T. Wingfield (2003). Current Protocols in Protein Science. U.S.A., John Wiley & Sons, Inc.
- Coniglio, S. J., T. S. Jou y M. Symons (2001). Rac1 protects epithelial cells against anoikis. *J Biol Chem*, **276**(30): 28113-20.
- Coqueret, O. (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol*, **13**(2): 65-70.

- Costello, P. S., S. C. Cleverley, R. Galandrini, S. W. Henning y D. A. Cantrell (2000). The GTPase rho controls a p53-dependent survival checkpoint during thymopoiesis. *J Exp Med*, **192**(1): 77-85.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich y B. A. Hemmings (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, **378**(6559): 785-9.
- Danen, E. H. y K. M. Yamada (2001). Fibronectin, integrins, and growth control. *J Cell Physiol*, **189**(1): 1-13.
- Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh y M. E. Greenberg (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, **91**(2): 231-41.
- Di Cristofano, A., B. Pesce, C. Cordon-Cardo y P. P. Pandolfi (1998). Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet*, **19**(4): 348-55.
- Diehl, J. A., M. Cheng, M. F. Roussel y C. J. Sherr (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*, **12**(22): 3499-511.
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **3**(1): 11-22.
- Drechsel, D. N., A. A. Hyman, A. Hall y M. Glotzer (1997). A requirement for Rho and Cdc42 during cytokinesis in *Xenopus* embryos. *Curr Biol*, **7**(1): 12-23.
- Du, W., P. F. Lebowitz y G. C. Prendergast (1999). Cell growth inhibition by farnesyltransferase inhibitors is mediated by gain of geranylgeranylated RhoB. *Mol Cell Biol*, **19**(3): 1831-40.
- Dutartre, H., J. Davoust, J. P. Gorvel y P. Chavrier (1996). Cytokinesis arrest and redistribution of actin-cytoskeleton regulatory components in cells expressing the Rho GTPase CDC42Hs. *J Cell Sci*, **109** (Pt 2): 367-77.
- Elledge, S. J. y J. W. Harper (1994). Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr Opin Cell Biol*, **6**(6): 847-52.
- Etienne-Manneville, S. y A. Hall (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature*, **420**(6916): 629-35.
- Fiegen, D., L. Blumenstein, P. Stege, I. R. Vetter y M. R. Ahmadian (2002). Crystal structure of Rnd3/RhoE: functional implications. *FEBS Lett*, **525**(1-3): 100-4.

- Foster, R., K. Q. Hu, Y. Lu, K. M. Nolan, J. Thissen y J. Settleman (1996). Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Mol Cell Biol*, **16**(6): 2689-99.
- Franke, T. F., C. P. Hornik, L. Segev, G. A. Shostak y C. Sugimoto (2003). PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene*, **22**(56): 8983-98.
- Friend, S. H., R. Bernards, S. Rogelj, R. A. Weinberg, J. M. Rapaport, D. M. Albert y T. P. Dryja (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, **323**(6089): 643-6.
- Frost, J. A., H. Steen, P. Shapiro, T. Lewis, N. Ahn, P. E. Shaw y M. H. Cobb (1997). Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. *Embo J*, **16**(21): 6426-38.
- Fujisawa, K., A. Fujita, T. Ishizaki, Y. Saito y S. Narumiya (1996). Identification of the Rho-binding domain of p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase. *J Biol Chem*, **271**(38): 23022-8.
- Fukumoto, S., C. M. Hsieh, K. Maemura, M. D. Layne, S. F. Yet, K. H. Lee, T. Matsui, A. Rosenzweig, W. G. Taylor, J. S. Rubin, M. A. Perrella y M. E. Lee (2001). Akt participation in the Wnt signaling pathway through Dishevelled. *J Biol Chem*, **276**(20): 17479-83.
- Fung, Y. K., A. L. Murphree, A. T'Ang, J. Qian, S. H. Hinrichs y W. F. Benedict (1987). Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science*, **236**(4809): 1657-61.
- Furnari, F. B., H. Lin, H. S. Huang y W. K. Cavenee (1997). Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(23): 12479-84.
- Garavini, H., K. Riento, J. P. Phelan, M. S. McAlister, A. J. Ridley y N. H. Keep (2002). Crystal structure of the core domain of RhoE/Rnd3: a constitutively activated small G protein. *Biochemistry*, **41**(20): 6303-10.
- Geng, Y., W. Whoriskey, M. Y. Park, R. T. Bronson, R. H. Medema, T. Li, R. A. Weinberg y P. Sicinski (1999). Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E. *Cell*, **97**(6): 767-77.
- Gille, H. y J. Downward (1999). Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression. *J Biol Chem*, **274**(31): 22033-40.
- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell y R. Nairn (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**(1): 59-74.

- Guasch, R. M., P. Scambler, G. E. Jones y A. J. Ridley (1998). RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Mol Cell Biol*, **18**(8): 4761-71.
- Guo, Y., D. W. Stacey y M. Hitomi (2002). Post-transcriptional regulation of cyclin D1 expression during G2 phase. *Oncogene*, **21**(49): 7545-56.
- Hamilton, R. A., R. C. Russo y R. V. Thurston (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays, ". *Environ. Sci. Technol.*, **11**(7): 714-19.
- Hansen, S. H., M. M. Zegers, M. Woodrow, P. Rodriguez-Viciano, P. Chardin, K. E. Mostov y M. McMahon (2000). Induced expression of Rnd3 is associated with transformation of polarized epithelial cells by the Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase pathway. *Mol Cell Biol*, **20**(24): 9364-75.
- Harbour, J. W., R. X. Luo, A. Dei Santi, A. A. Postigo y D. C. Dean (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*, **98**(6): 859-69.
- Harbour, J. W. y D. C. Dean (2000a). Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol*, **2**(4): E65-7.
- Harbour, J. W. y D. C. Dean (2000b). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*, **14**(19): 2393-409.
- Haslam, R. J., H. B. Koide y B. A. Hemmings (1993). Pleckstrin domain homology. *Nature*, **363**(6427): 309-10.
- He, T. C., S. Zhou, L. T. da Costa, J. Yu, K. W. Kinzler y B. Vogelstein (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(5): 2509-14.
- Hengst, L. y S. I. Reed (1998). Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr Top Microbiol Immunol*, **227**(2): 25-41.
- Hesselager, G. y E. C. Holland (2003). Using mice to decipher the molecular genetics of brain tumors. *Neurosurgery*, **53**(3): 685-94; discussion 695.
- Hirai, A., S. Nakamura, Y. Noguchi, T. Yasuda, M. Kitagawa, I. Tatsuno, T. Oeda, K. Tahara, T. Terano, S. Narumiya, L. D. Kohn y Y. Saito (1997). Geranylgeranylated rho small GTPase(s) are essential for the degradation of p27Kip1 and facilitate the progression from G1 to S phase in growth-stimulated rat FRTL-5 cells. *J Biol Chem*, **272**(1): 13-6.

- Holland, E. C. (2001a). Brain tumor animal models: importance and progress. *Curr Opin Oncol*, **13**(3): 143-7.
- Holland, E. C. (2001b). Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet*, **2**(2): 120-9.
- Horowitz, J. M., S. H. Park, E. Bogenmann, J. C. Cheng, D. W. Yandell, F. J. Kaye, J. D. Minna, T. P. Dryja y R. A. Weinberg (1990). Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**(7): 2775-9.
- Hu, W., C. J. Bellone y J. J. Baldassare (1999). RhoA stimulates p27(Kip) degradation through its regulation of cyclin E/CDK2 activity. *J Biol Chem*, **274**(6): 3396-401.
- Huang, H. J., J. K. Yee, J. Y. Shew, P. L. Chen, R. Bookstein, T. Friedmann, E. Y. Lee y W. H. Lee (1988). Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science*, **242**(4885): 1563-6.
- Hurford, R. K., Jr., D. Cobrinik, M. H. Lee y N. Dyson (1997). pRB and p107/p130 are required for the regulated expression of different sets of E2F responsive genes. *Genes Dev*, **11**(11): 1447-63.
- Ishizaki, T., M. Maekawa, K. Fujisawa, K. Okawa, A. Iwamatsu, A. Fujita, N. Watanabe, Y. Saito, A. Kakizuka, N. Morii y S. Narumiya (1996). The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *Embo J*, **15**(8): 1885-93.
- Jaffe, A. B. y A. Hall (2002). Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv Cancer Res*, **84**: 57-80.
- Joneson, T. y D. Bar-Sagi (1999). Suppression of Ras-induced apoptosis by the Rac GTPase. *Mol Cell Biol*, **19**(9): 5892-901.
- Kimura, K., M. Ito, M. Amano, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, J. Feng, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu y K. Kaibuchi (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, **273**(5272): 245-8.
- King, A. J., H. Sun, B. Diaz, D. Barnard, W. Miao, S. Bagrodia y M. S. Marshall (1998). The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature*, **396**(6707): 180-3.
- Kleihues, P. y H. Ohgaki (1997). Genetics of glioma progression and the definition of primary and secondary glioblastoma. *Brain Pathol*, **7**: 1131-1136.

- Kleihues, P. y H. Ohgaki (1999). Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-oncol*, **1**(1): 44-51.
- Kleihues, P. y L. H. Sobin (2000). World Health Organization classification of tumors. *Cancer*, **88**(12): 2887.
- Kozma, R., S. Ahmed, A. Best y L. Lim (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **15**(4): 1942-52.
- Kudo, Y., S. Kitajima, S. Sato, M. Miyauchi, I. Ogawa y T. Takata (2001). High expression of S-phase kinase-interacting protein 2, human F-box protein, correlates with poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Res*, **61**(19): 7044-7.
- LaBaer, J., M. D. Garrett, L. F. Stevenson, J. M. Slingerland, C. Sandhu, H. S. Chou, A. Fattaey y E. Harlow (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev*, **11**(7): 847-62.
- Lai, J. M., S. Wu, D. Y. Huang y Z. F. Chang (2002). Cytosolic retention of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase and a Rho-associated kinase-mediated signal impair expression of p21(Cip1/Waf1) in phorbol 12-myristate-13-acetate-induced apoptotic cells. *Mol Cell Biol*, **22**(21): 7581-92.
- Latres, E., R. Chiarle, B. A. Schulman, N. P. Pavletich, A. Pellicer, G. Inghirami y M. Pagano (2001). Role of the F-box protein Skp2 in lymphomagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(5): 2515-20.
- Laufs, U., D. Marra, K. Node y J. K. Liao (1999). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *J Biol Chem*, **274**(31): 21926-31.
- Lavoie, J. N., G. L'Allemain, A. Brunet, R. Muller y J. Pouyssegur (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem*, **271**(34): 20608-16.
- Lee, W. H., R. Bookstein, F. Hong, L. J. Young, J. Y. Shew y E. Y. Lee (1987). Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science*, **235**(4794): 1394-9.
- Leung, T., E. Manser, L. Tan y L. Lim (1995). A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem*, **270**(49): 29051-4.

- Li, D. M. y H. Sun (1998). PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(26): 15406-11.
- Liang, J., J. Zubovitz, T. Petrocelli, R. Kotchetkov, M. K. Connor, K. Han, J. H. Lee, S. Ciarallo, C. Catzavelos, R. Beniston, E. Franssen y J. M. Slingerland (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med*, **8**(10): 1153-60.
- Liberto, M., D. Cobrinik y A. Minden (2002). Rho regulates p21(CIP1), cyclin D1, and checkpoint control in mammary epithelial cells. *Oncogene*, **21**(10): 1590-9.
- Lipinski, M. M. y T. Jacks (1999). The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene*, **18**(55): 7873-82.
- Liu, A., G. J. Cerniglia, E. J. Bernhard y G. C. Prendergast (2001). RhoB is required to mediate apoptosis in neoplastically transformed cells after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(11): 6192-7.
- Liu, T., A. R. Bauskin, J. Zaunders, D. A. Brown, S. Pankhurst, P. J. Russell y S. N. Breit (2003). Macrophage inhibitory cytokine 1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res*, **63**(16): 5034-40.
- Livak, K. J. y T. D. Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**(4): 402-8.
- Maier, D., G. Jones, X. Li, A. H. Schonthal, O. Gratzl, E. G. Van Meir y A. Merlo (1999). The PTEN lipid phosphatase domain is not required to inhibit invasion of glioma cells. *Cancer Res*, **59**(21): 5479-82.
- Mamillapalli, R., N. Gavrilova, V. T. Mihaylova, L. M. Tsvetkov, H. Wu, H. Zhang y H. Sun (2001). PTEN regulates the ubiquitin-dependent degradation of the CDK inhibitor p27(KIP1) through the ubiquitin E3 ligase SCF(SKP2). *Curr Biol*, **11**(4): 263-7.
- Masuda, T. A., H. Inoue, H. Sonoda, S. Mine, Y. Yoshikawa, K. Nakayama y M. Mori (2002). Clinical and biological significance of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) gene expression in gastric carcinoma: modulation of malignant phenotype by Skp2 overexpression, possibly via p27 proteolysis. *Cancer Res*, **62**(13): 3819-25.
- Matsui, T., M. Amano, T. Yamamoto, K. Chihara, M. Nakafuku, M. Ito, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu y K. Kaibuchi (1996). Rho-associated

- kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *Embo J*, **15**(9): 2208-16.
- Matsui, T., L. Li, F. del Monte, Y. Fukui, T. F. Franke, R. J. Hajjar y A. Rosenzweig (1999). Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro. *Circulation*, **100**(23): 2373-9.
- Matsushima, H., D. E. Quelle, S. A. Shurtleff, M. Shibuya, C. J. Sherr y J. Y. Kato (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **14**(3): 2066-76.
- Mayer, B. J., R. Ren, K. L. Clark y D. Baltimore (1993). A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell*, **73**(4): 629-30.
- Medema, R. H., G. J. Kops, J. L. Bos y B. M. Burgering (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*, **404**(6779): 782-7.
- Mendelsohn, J., P. M. Howley, M. A. Israel y L. A. Liotta (2001). The Molecular Basis of Cancer. Philadelphia, W.B. Saunders Company.
- Mettouchi, A., S. Klein, W. Guo, M. Lopez-Lago, E. Lemichez, J. K. Westwick y F. G. Giancotti (2001). Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Mol Cell*, **8**(1): 115-27.
- Mishima, M., V. Pavicic, U. Gruneberg, E. A. Nigg y M. Glotzer (2004). Cell cycle regulation of central spindle assembly. *Nature*, **430**(7002): 908-13.
- Montagnoli, A., F. Fiore, E. Eytan, A. C. Carrano, G. F. Draetta, A. Hershko y M. Pagano (1999). Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev*, **13**(9): 1181-9.
- Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**: 261-91.
- Morris, J. D., T. Crook, L. R. Bandara, R. Davies, N. B. LaThangue y K. H. Vousden (1993). Human papillomavirus type 16 E7 regulates E2F and contributes to mitogenic signalling. *Oncogene*, **8**(4): 893-8.
- Muñoz, A. (1997). Cáncer. Madrid, Editorial Hélice.
- Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, **116**(2): 221-34.

- Nakagawa, O., K. Fujisawa, T. Ishizaki, Y. Saito, K. Nakao y S. Narumiya (1996). ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett*, **392**(2): 189-93.
- Nakamura, N., S. Ramaswamy, F. Vazquez, S. Signoretti, M. Loda y W. R. Sellers (2000). Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. *Mol Cell Biol*, **20**(23): 8969-82.
- Narumiya, S., T. Ishizaki y N. Watanabe (1997). Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett*, **410**(1): 68-72.
- Natarajan, M., T. P. Hecker y C. L. Gladson (2003). FAK signaling in anaplastic astrocytoma and glioblastoma tumors. *Cancer J*, **9**(2): 126-33.
- Nelson, D. L. y M. M. Cox (2000). Lehninger. Principles of Biochemistry. New York, Worth Publishers.
- Nevins, J. R., G. Leone, J. DeGregori y L. Jakoi (1997). Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control. *J Cell Physiol*, **173**(2): 233-6.
- Ng, J. y D. Cantrell (1997). STAT3 is a serine kinase target in T lymphocytes. Interleukin 2 and T cell antigen receptor signals converge upon serine 727. *J Biol Chem*, **272**(39): 24542-9.
- Nobes, C. D. y A. Hall (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, **81**(1): 53-62.
- Nobes, C. D., I. Lauritzen, M. G. Mattei, S. Paris, A. Hall y P. Chardin (1998). A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol*, **141**(1): 187-97.
- Ohtsubo, M., A. M. Theodoras, J. Schumacher, J. M. Roberts y M. Pagano (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol*, **15**(5): 2612-24.
- Olson, M. F., A. Ashworth y A. Hall (1995). An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science*, **269**(5228): 1270-2.
- Olson, M. F., H. F. Paterson y C. J. Marshall (1998). Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature*, **394**(6690): 295-9.

- Ozes, O. N., L. D. Mayo, J. A. Gustin, S. R. Pfeffer, L. M. Pfeffer y D. B. Donner (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, **401**(6748): 82-5.
- Pagano, M., R. Pepperkok, F. Verde, W. Ansorge y G. Draetta (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J*, **11**(3): 961-71.
- Perez-Roger, I., D. L. Solomon, A. Sewing y H. Land (1997). Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27(Kip1) binding to newly formed complexes. *Oncogene*, **14**(20): 2373-81.
- Perez-Roger, I., S. H. Kim, B. Griffiths, A. Sewing y H. Land (1999). Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *Embo J*, **18**(19): 5310-20.
- Pervaiz, S., J. Cao, O. S. Chao, Y. Y. Chin y M. V. Clement (2001). Activation of the RacGTPase inhibits apoptosis in human tumor cells. *Oncogene*, **20**(43): 6263-8.
- Ponten, J. y E. H. Macintyre (1968). Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand*, **74**(4): 465-86.
- Prendergast, G. C. (2001). Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. *Nat Rev Cancer*, **1**(2): 162-8.
- Pruitt, K. y C. J. Der (2001). Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Lett*, **171**(1): 1-10.
- Qin, X. Q., D. M. Livingston, M. Ewen, W. R. Sellers, Z. Arany y W. G. Kaelin, Jr. (1995). The transcription factor E2F-1 is a downstream target of RB action. *Mol Cell Biol*, **15**(2): 742-55.
- Qiu, R. G., A. Abo, F. McCormick y M. Symons (1997). Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for Ras transformation. *Mol Cell Biol*, **17**(6): 3449-58.
- Ramaswamy, S., N. Nakamura, I. Sansal, L. Bergeron y W. R. Sellers (2002). A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell*, **2**(1): 81-91.
- Reif, K. y D. A. Cantrell (1998). Networking Rho family GTPases in lymphocytes. *Immunity*, **8**(4): 395-401.
- Renau-Piqueras, J., R. Zaragoza, P. De Paz, R. Baguena-Cervellera, L. Megias y C. Guerri (1989). Effects of prolonged ethanol exposure on the glial fibrillary acidic protein-containing intermediate filaments of astrocytes in

- primary culture: a quantitative immunofluorescence and immunogold electron microscopic study. *J Histochem Cytochem*, **37**(2): 229-40.
- Resnitzky, D., M. Gossen, H. Bujard y S. I. Reed (1994). Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol*, **14**(3): 1669-79.
- Resnitzky, D. y S. I. Reed (1995). Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. *Mol Cell Biol*, **15**(7): 3463-9.
- Ridley, A. y A. Hall (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, **70**(3): 389-99.
- Ridley, A., P. M. Comoglio y A. Hall (1995). Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. *Mol Cell Biol*, **15**(2): 1110-22.
- Ridley, A. (2000). Molecular switches in metastasis. *Nature*, **406**(6795): 466-7.
- Riento, K., R. M. Guasch, R. Garg, B. Jin y A. J. Ridley (2003). RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol*, **23**(12): 4219-29.
- Riento, K., N. Totty, P. Villalonga, R. Garg, R. Guasch y A. J. Ridley (2005). RhoE function is regulated by ROCK I-mediated phosphorylation. *Embo J*.
- Roovers, K., G. Davey, X. Zhu, M. E. Bottazzi y R. K. Assoian (1999). Alpha5beta1 integrin controls cyclin D1 expression by sustaining mitogen-activated protein kinase activity in growth factor-treated cells. *Mol Biol Cell*, **10**(10): 3197-204.
- Roovers, K. y R. K. Assoian (2000). Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays*, **22**(9): 818-26.
- Roovers, K. y R. K. Assoian (2003a). Effects of rho kinase and actin stress fibers on sustained extracellular signal-regulated kinase activity and activation of G(1) phase cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol*, **23**(12): 4283-94.
- Roovers, K., E. A. Klein, P. Castagnino y R. K. Assoian (2003b). Nuclear translocation of LIM kinase mediates Rho-Rho kinase regulation of cyclin D1 expression. *Dev Cell*, **5**(2): 273-84.
- Rutka, J. T., C. Ackerley, S. L. Hubbard, A. Tilup, P. B. Dirks, S. Jung, S. Ivanchuk, M. Kurimoto, A. Tsugu y L. E. Becker (1998). Characterization

- of glial filament-cytoskeletal interactions in human astrocytomas: an immuno-ultrastructural analysis. *Eur J Cell Biol*, **76**(4): 279-87.
- Sahai, E., M. F. Olson y C. J. Marshall (2001). Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *Embo J*, **20**(4): 755-66.
- Sahai, E. y C. J. Marshall (2002). RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer*, **2**(2): 133-42.
- Sambrook, J. y D. W. Russell (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scheid, M. P. y J. R. Woodgett (2003). Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett*, **546**(1): 108-12.
- Schmidt, M., S. Fernandez de Mattos, A. van der Horst, R. Klompaker, G. J. Kops, E. W. Lam, B. M. Burgering y R. H. Medema (2002). Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Mol Cell Biol*, **22**(22): 7842-52.
- Schurmann, A., A. F. Mooney, L. C. Sanders, M. A. Sells, H. G. Wang, J. C. Reed y G. M. Bokoch (2000). p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. *Mol Cell Biol*, **20**(2): 453-61.
- Sears, R. C. y J. R. Nevins (2002). Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *J Biol Chem*, **277**(14): 11617-20.
- Sebbagh, M., C. Renvoize, J. Hamelin, N. Riche, J. Bertoglio y J. Breard (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol*, **3**(4): 346-52.
- Senger, D. L., C. Tudan, M. C. Guiot, I. E. Mazzoni, G. Molenkamp, R. LeBlanc, J. Antel, A. Olivier, G. J. Snipes y D. R. Kaplan (2002). Suppression of Rac activity induces apoptosis of human glioma cells but not normal human astrocytes. *Cancer Res*, **62**(7): 2131-40.
- Sewing, A., B. Wiseman, A. C. Lloyd y H. Land (1997). High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*, **17**(9): 5588-97.
- Sherr, C. J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell*, **73**(6): 1059-65.
- Sherr, C. J. (1994). The ins and outs of RB: coupling gene expression to the cell cycle clock. *Trends Cell Biol*, **4**(1): 15-8.

- Sherr, C. J. y J. M. Roberts (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, **9**(10): 1149-63.
- Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science*, **274**(5293): 1672-7.
- Sherr, C. J. y J. M. Roberts (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, **13**(12): 1501-12.
- Sherr, C. J. y F. McCormick (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, **2**(2): 103-12.
- Sherr, C. J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell*, **116**(2): 235-46.
- Shibasaki, F., Y. Homma y T. Takenawa (1991). Two types of phosphatidylinositol 3-kinase from bovine thymus. Monomer and heterodimer form. *J Biol Chem*, **266**(13): 8108-14.
- Shin, I., F. M. Yakes, F. Rojo, N. Y. Shin, A. V. Bakin, J. Baselga y C. L. Arteaga (2002). PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med*, **8**(10): 1145-52.
- Sicinska, E., I. Aifantis, L. Le Cam, W. Swat, C. Borowski, Q. Yu, A. A. Ferrando, S. D. Levin, Y. Geng, H. von Boehmer y P. Sicinski (2003). Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell*, **4**(6): 451-61.
- Small, J. V. (1994). Lamellipodia architecture: actin filament turnover and the lateral flow of actin filaments during motility. *Semin Cell Biol*, **5**(3): 157-63.
- Sonoda, Y., S. Watanabe, Y. Matsumoto, E. Aizu-Yokota y T. Kasahara (1999). FAK is the upstream signal protein of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt survival pathway in hydrogen peroxide-induced apoptosis of a human glioblastoma cell line. *J Biol Chem*, **274**(15): 10566-70.
- Stevaux, O. y N. J. Dyson (2002). A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol*, **14**(6): 684-91.
- Stossel, T. P. (1993). On the crawling of animal cells. *Science*, **260**(5111): 1086-94.
- Stowers, L., D. Yelon, L. J. Berg y J. Chant (1995). Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(11): 5027-31.
- Subauste, M. C., M. Von Herrath, V. Benard, C. E. Chamberlain, T. H. Chuang, K. Chu, G. M. Bokoch y K. M. Hahn (2000). Rho family proteins modulate

- rapid apoptosis induced by cytotoxic T lymphocytes and Fas. *J Biol Chem*, **275**(13): 9725-33.
- Sun, H., R. Lesche, D. M. Li, J. Liliental, H. Zhang, J. Gao, N. Gavrilova, B. Mueller, X. Liu y H. Wu (1999). PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(11): 6199-204.
- Swanton, C. (2004). Cell-cycle targeted therapies. *Lancet Oncol*, **5**(1): 27-36.
- Tamura, M., J. Gu, E. H. Danen, T. Takino, S. Miyamoto y K. M. Yamada (1999). PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*, **274**(29): 20693-703.
- Tan, J. L., S. Ravid y J. A. Spudich (1992). Control of nonmuscle myosins by phosphorylation. *Annu Rev Biochem*, **61**: 721-59.
- Tang, Y., J. Yu y J. Field (1999). Signals from the Ras, Rac, and Rho GTPases converge on the Pak protein kinase in Rat-1 fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **19**(3): 1881-91.
- Toguchida, J., K. Ishizaki, M. S. Sasaki, Y. Nakamura, M. Ikenaga, M. Kato, M. Sugimoto, Y. Kotoura y T. Yamamuro (1989). Preferential mutation of paternally derived RB gene as the initial event in sporadic osteosarcoma. *Nature*, **338**(6211): 156-8.
- Ueda, K., Y. Miyoshi, T. Tokino, M. Watatani y Y. Nakamura (1999). Induction of apoptosis in T98G glioblastoma cells by transfection of GML, a p53 target gene. *Oncol Res*, **11**(3): 125-32.
- Van Aelst, L. y C. D'Souza-Schorey (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*, **11**(18): 2295-322.
- van der Geer, P., T. Hunter y R. A. Lindberg (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol*, **10**: 251-337.
- Vazquez, F. y W. R. Sellers (2000). The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Biochim Biophys Acta*, **1470**(1): M21-35.
- Vidal, A., S. S. Millard, J. P. Miller y A. Koff (2002). Rho activity can alter the translation of p27 mRNA and is important for RasV12-induced transformation in a manner dependent on p27 status. *J Biol Chem*, **277**(19): 16433-40.

- Viglietto, G., M. L. Motti, P. Bruni, R. M. Melillo, A. D'Alessio, D. Califano, F. Vinci, G. Chiappetta, P. Tschlis, A. Bellacosa, A. Fusco y M. Santoro (2002). Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med*, **8**(10): 1136-44.
- Villalonga, P., R. M. Guasch, K. Riento y A. J. Ridley (2004). RhoE inhibits cell cycle progression and Ras-induced transformation. *Mol Cell Biol*, **24**(18): 7829-40.
- Vojtek, A. B. y J. A. Cooper (1995). Rho family members: activators of MAP kinase cascades. *Cell*, **82**(4): 527-9.
- Weber, J. D., W. Hu, S. C. Jefcoat, Jr., D. M. Raben y J. J. Baldassare (1997a). Ras-stimulated extracellular signal-related kinase 1 and RhoA activities coordinate platelet-derived growth factor-induced G1 progression through the independent regulation of cyclin D1 and p27. *J Biol Chem*, **272**(52): 32966-71.
- Weber, J. D., D. M. Raben, P. J. Phillips y J. J. Baldassare (1997b). Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *Biochem J*, **326** (Pt 1): 61-8.
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81**(3): 323-30.
- Welsh, C. F., K. Roovers, J. Villanueva, Y. Liu, M. A. Schwartz y R. K. Assoian (2001). Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nat Cell Biol*, **3**(11): 950-7.
- Weng, L. P., J. L. Brown y C. Eng (2001). PTEN coordinates G(1) arrest by down-regulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model. *Hum Mol Genet*, **10**(6): 599-604.
- Wennerberg, K., M. A. Forget, S. M. Ellerbroek, W. T. Arthur, K. Burrige, J. Settleman, C. J. Der y S. H. Hansen (2003). Rnd proteins function as RhoA antagonists by activating p190 RhoGAP. *Curr Biol*, **13**(13): 1106-15.
- Westermarck, B., J. Ponten y R. Hugosson (1973). Determinants for the establishment of permanent tissue culture lines from human gliomas. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]*, **81**(6): 791-805.
- Westhoff, M. A., B. Serrels, V. J. Fincham, M. C. Frame y N. O. Carragher (2004). SRC-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase couples actin and adhesion dynamics to survival signaling. *Mol Cell Biol*, **24**(18): 8113-33.

- Westwick, J. K., Q. T. Lambert, G. J. Clark, M. Symons, L. Van Aelst, R. G. Pestell y C. J. Der (1997). Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol Cell Biol*, **17**(3): 1324-35.
- Woods, D., D. Parry, H. Cherwinski, E. Bosch, E. Lees y M. McMahon (1997). Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*, **17**(9): 5598-611.
- Wymann, M. P. y L. Pirola (1998). Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta*, **1436**(1-2): 127-50.
- Xiao, Z. X., J. Chen, A. J. Levine, N. Modjtahedi, J. Xing, W. R. Sellers y D. M. Livingston (1995). Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature*, **375**(6533): 694-8.
- Yamamoto, M., N. Marui, T. Sakai, N. Morii, S. Kozaki, K. Ikai, S. Imamura y S. Narumiya (1993). ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle. *Oncogene*, **8**(6): 1449-55.
- Yang, F. C., R. Kapur, A. J. King, W. Tao, C. Kim, J. Borneo, R. Breese, M. Marshall, M. C. Dinauer y D. A. Williams (2000). Rac2 stimulates Akt activation affecting BAD/Bcl-XL expression while mediating survival and actin function in primary mast cells. *Immunity*, **12**(5): 557-68.
- Zhou, B. P., Y. Liao, W. Xia, B. Spohn, M. H. Lee y M. C. Hung (2001a). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol*, **3**(3): 245-52.
- Zhou, B. P., Y. Liao, W. Xia, Y. Zou, B. Spohn y M. C. Hung (2001b). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol*, **3**(11): 973-82.
- Zhu, L., S. van den Heuvel, K. Helin, A. Fattaey, M. Ewen, D. Livingston, N. Dyson y E. Harlow (1993). Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein. *Genes Dev*, **7**(7A): 1111-25.
- Zigmond, S. H. (1996). Signal transduction and actin filament organization. *Curr Opin Cell Biol*, **8**(1): 66-73.
- Zuckerbraun, B. S., R. A. Shapiro, T. R. Billiar y E. Tzeng (2003). RhoA influences the nuclear localization of extracellular signal-regulated kinases to modulate p21Waf/Cip1 expression. *Circulation*, **108**(7): 876-81.

Zugasti, O., W. Rul, P. Roux, C. Peyssonnaud, A. Eychene, T. F. Franke, P. Fort y U. Hibner (2001). Raf-MEK-Erk cascade in anoikis is controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt. *Mol Cell Biol*, **21**(19): 6706-17.