

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Química, Bioquímica y Biología Molecular



**Función de RhoE *in vivo*: la ausencia de
RhoE provoca alteraciones en el desarrollo
del Sistema Nervioso**

TESIS DOCTORAL

Autor: Enric Mocholi Gimeno
Director: Dr. Ignacio Pérez Roger

VALENCIA

2010



CEU

*Universidad
Cardenal Herrera*

Ignacio Pérez Roger, Profesor Agregado del Departamento de Química, Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad CEU-Cardenal Herrera,

INFORMA: que el trabajo titulado “Función de RhoE *in vivo*: la ausencia de RhoE provoca alteraciones en el desarrollo del Sistema Nervioso” ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Química, Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad CEU-Cardenal Herrera por Enric Mocholí Gimeno, Licenciado en Farmacia.

Considero que este trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para que el interesado pueda optar al título de Doctor por la Universidad CEU-Cardenal Herrera.

Valencia, 24 de Junio de 2010

Ignacio Pérez Roger

1	ABREVIATURAS.	3
2	INTRODUCCIÓN.	7
2.1	LA FAMILIA DE LAS PROTEÍNAS RHO.	7
2.1.1	EFEECTO DE LAS PROTEÍNAS RHO SOBRE EL CITOESQUELETO.	10
2.1.2	EFEECTO DE LAS PROTEÍNAS RHO SOBRE EL CICLO CELULAR.	11
2.2	PROTEÍNAS RND.	13
2.2.1	RHOE/RND3.	14
2.3	FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RHO EN EL SISTEMA NERVIOSO.	16
2.4	FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS RHO DERIVADAS DEL ESTUDIO DE RATONES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE.	20
3	OBJETIVOS.	29
4	MATERIAL Y MÉTODOS.	33
4.1	ANIMALES Y ESTABULACIÓN.	33
4.2	OBTENCIÓN DEL RATÓN RHOE GT/GT.	34
4.3	GENOTIPADO DE LOS RATONES.	35
4.3.1	EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE RATÓN.	35
4.3.2	PCR DE GENOTIPADO.	36
4.4	ESTUDIOS DEL DESARROLLO POSTNATAL.	37
4.4.1	SOMATOMETRÍA.	38
4.4.2	DESAPARICIÓN DE LOS REFLEJOS ARCAICOS.	38
4.4.3	APARICIÓN DE RESPUESTAS REFLEJAS.	38
4.4.4	PRUEBAS NEUROSESORIALES.	39
4.4.5	PRUEBAS DE COORDINACIÓN MOTORA.	40
4.5	ENSAYOS DE INDUCCIÓN DE CONVULSIONES.	41
4.5.1	SENSIBILIDAD AL PENTILENTETRAZOL.	41
4.5.2	SENSIBILIDAD A LA NICOTINA.	41
4.5.3	SENSIBILIDAD AL KAINATO.	42
4.6	TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.	42
4.6.1	OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA CRIOSTATO.	42
4.6.2	OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA MICROTOMO.	42
4.6.3	TINCIÓN DE LOS TEJIDOS PARA SU POSTERIOR ESTUDIO MORFOLÓGICO.	43
4.7	TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE RHOE EN MOTONEURONAS.	43
4.8	CONTAJE DE MOTONEURONAS EN LA MÉDULA ESPINAL DE LOS RATONES.	44
4.9	TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LA OSIFICACIÓN DEL RATÓN.	44
4.9.1	RADIOGRAFÍA.	44
4.9.2	TINCIÓN DE LOS HUESOS Y LOS CARTÍLAGOS.	44
4.10	EXTRACCIÓN DE CÉLULAS MEF.	45
4.11	ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE WESTERN-BLOT.	46
4.12	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS	47

5	RESULTADOS.	51
5.1	FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS DE RATONES RHOE GT/GT NO EXPRESAN LA PROTEÍNA.	51
5.2	LOS RATONES DEFICIENTES EN LA EXPRESIÓN DE RHOE MUESTRAN UNA REDUCIDA SUPERVIVENCIA.	52
5.3	LOS RATONES RHOE GT/GT PRESENTAN UN MENOR TAMAÑO Y PROBLEMAS DE MOVILIDAD EN LAS EXTREMIDADES POSTERIORES.	54
5.4	LOS RATONES RHOE GT/GT SUFREN UN RETRASO GENERALIZADO EN EL DESARROLLO.	58
5.5	LOS RATONES RHOE GT/GT PADECEN DEFECTOS EN LAS CAPACIDADES NEUROSENSORIALES.	61
5.6	LOS RATONES RHOE GT/GT PADECEN DEFECTOS EN EL SISTEMA MOTOR, ESPECIALMENTE EN LAS EXTREMIDADES POSTERIORES.	64
5.7	LOS RATONES RHOE GT/GT PRESENTAN HIDROCEFALIA E HIPOCELULARIDAD EN LA CORTEZA CEREBRAL Y EN EL BULBO OLFATORIO.	68
5.8	LA AUSENCIA DE EXPRESIÓN DE RHOE PROVOCA UN RETRASO EN LA OSIFICACIÓN.	70
5.9	LA AUSENCIA DE LA EXPRESIÓN DE RHOE PRODUCE UNA REDUCCIÓN EN EL NÚMERO DE MOTONEURONAS MEDULARES.	72
5.10	LOS RATONES RHOE +/GT SON MÁS SENSIBLES A LOS EFECTOS CONVULSIONANTES DE LA NICOTINA Y EL KAINATO, PERO NO DEL PENTILENTETRAZOL.	74
5.11	LOS RATONES RHOE GT/GT TIENEN AUMENTADOS LOS NIVELES DE NR2B EN EL HIPOCAMPO.	80
6	DISCUSIÓN.	85
7	CONCLUSIONES.	97
8	BIBLIOGRAFÍA.	101

1 Abreviaturas.

- **CA:** mutante constitutivamente activado
- **DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- **DN:** mutante dominante negativo
- **DTT:** 1,4 ditioneitol
- **EEM:** Error Estándar de la Media
- **ERK:** *Extracellular-signal-regulated Kinase*, kinasa regulada por señales extracelulares
- **ESCs:** células madre embrionarias
- **EtOH:** Etanol
- **FBS:** *foetal bovine serum*, suero bovino fetal.
- **GABA:** Ácido Gama Aminobutírico
- **GAP:** Proteína activadora de GTPasa
- **GDP:** Guanosín difosfato
- **GEF:** Factor intercambiador de nucleótidos de guanina.
- **GT:** gene-trap
- **GTP:** Guanosín trifosfato
- **HGF:** factor de crecimiento hepático
- **H₂O_d:** agua destilada
- **H₂O_{bd}:** agua bidestilada
- **IL-2:** interleukina-2
- **IP:** inmunoprecipitación
- **KO:** *Knock-Out*
- **MDCK:** *Madin-Darby canine kidney*, células epiteliales de riñón
- **MEFs:** *Mouse Embryonic Fibroblasts*
- **MEGAP:** desorden mental asociado a GAP
- **MIN:** Minutos
- **MLC:** *Myosin light chain*, cadena ligera de la miosina
- **MLCP:** *Myosin light chain phosphatase*, fosfatasa de la cadena ligera de la miosina
- **O/N:** Toda la noche
- **PB:** Pares de bases
- **PBS:** tampón fosfato salino
- **PBT:** PBS + 0.1% Tween-20
- **PD:** Días posnatales

- **PCR:** *P*olymerase *C*hain *R*eaction, reacción en cadena de la polimerasa
- **PFA:** Paraformaldehído
- **PIP3:** fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato
- **PVDF:** polifluoruro de vinilideno
- **ROCK:** *R*ho-associated *c*oiled-*c*oil-containing *p*rotein *k*inase
- **SA:** Splicing Aceptor
- **SD:** Splicing Donor
- **SDS:** dodecilsulfato sódico
- **SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
- **SEG:** Segundos
- **SNC:** Sistema nervioso central
- **SNP:** Sistema nervioso periferico
- **TA:** temperatura ambiente
- **WT:** *Wild-Type*
- **WB:** Western-blot

INTRODUCCIÓN

2 Introducción.

2.1 La familia de las proteínas Rho.

Las proteínas Rho son GTPasas monoméricas de pequeño tamaño homólogas a Ras, clásicamente vinculadas a la regulación del citoesqueleto de actina (Etienne-Manneville *et al.* 2002). Forman una familia de 20 miembros, que se pueden clasificar por su secuencia y su función (**Figura 1**). En dicha clasificación podemos agruparlas en proteínas similares a RhoA, similares a Rac1 y similares a Cdc42. Además, hay que incluir a las proteínas Rho atípicas, como RhoH y la subfamilia Rnd, que carecen de actividad GTPasa intrínseca (Chardin. 2006).

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 de guanina específico de Rho (Rho-GEF), mientras que la hidrólisis de GTP es estimulada por una proteína activadora de GTPasa (Rho-GAP). Otro mecanismo de regulación se produce a través de unas moléculas capaces de inhibir la disociación de Rho-GDP (Rho-GDIs), produciendo un secuestro de estas proteínas en el citoplasma, evitando su unión a GTP (Moon *et al.* 2003, Olofsson, 1999).

Entre la multitud de RhoGAPs descritos, p190-Rho-GAP junto con p190-B representa una fracción importante de la inhibición total de la actividad de las proteínas de la familia Rho (Burbelo *et al.* 1995, Settleman *et al.* 1992, Vincent *et al.* 1999). La evidencia del efecto inhibitorio de p190-GAP sobre la familia de las proteínas Rho y en consecuencia sobre el citoesqueleto proviene de estudios con cultivos celulares de fibroblastos. Por ejemplo la sobreexpresión de p190-GAP en células induce una forma redondeada que se asocia a una desorganización del citoesqueleto (Tatsis *et al.* 1998).

Muchos de los efectores de proteínas Rho son kinasas, capaces de controlar funciones celulares a través de la fosforilación de otras proteínas. Entre estas kinasas, nos encontramos a las proteínas ROCK (*Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase*), efectoras de RhoA, o a las proteínas PAK (*p21 protein Cdc42/Rac-activated kinase*), efectoras de Cdc42 y Rac. En la **Tabla 1** se describen algunos de los efectores de las proteínas Rho y las funciones conocidas hasta el momento a nivel molecular.

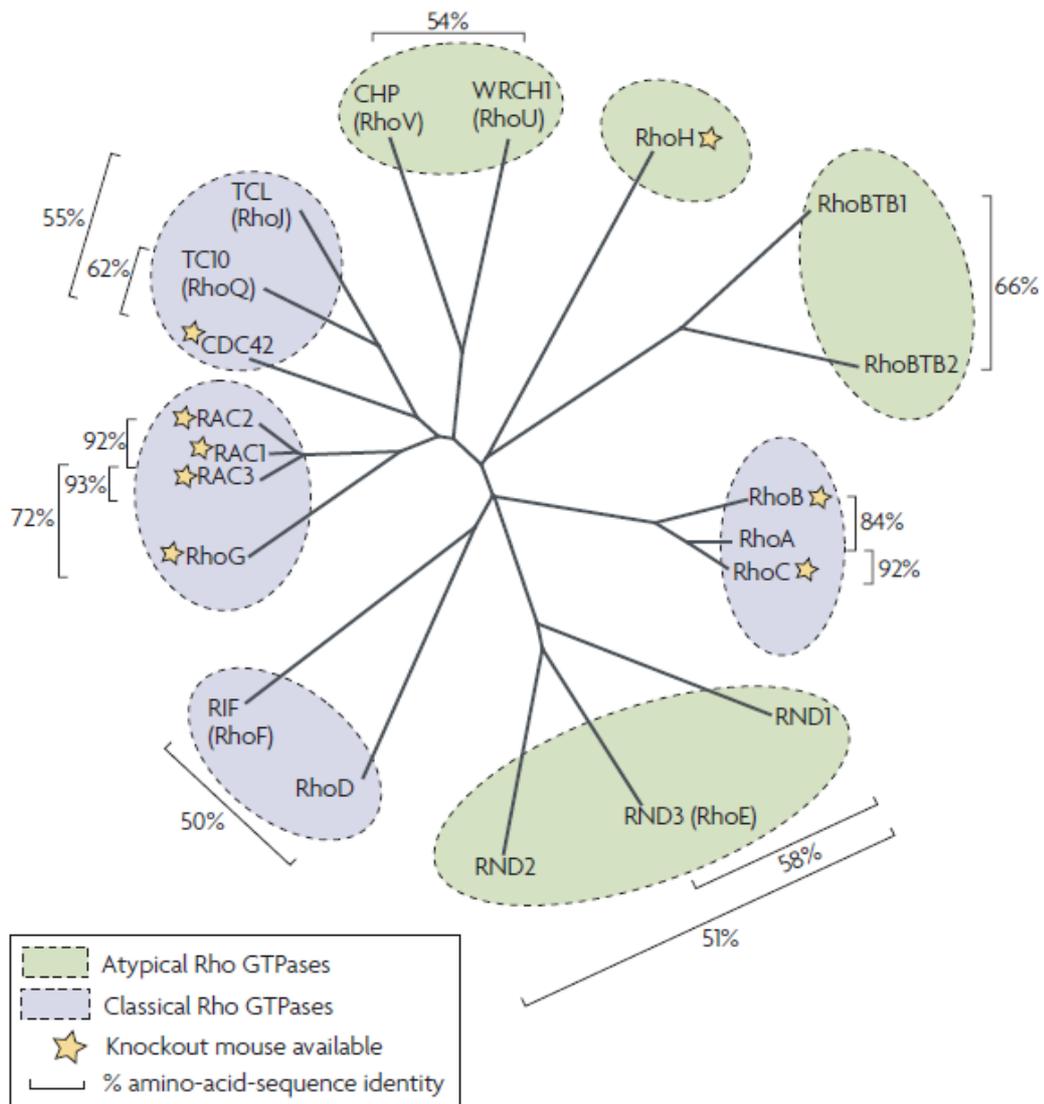


Figura 1: La familia de las proteínas Rho. Diagrama representativo de los miembros de la familia Rho. Se han clasificado los diferentes miembros según sus propiedades bioquímicas y funcionales. La subfamilia Rnd y RhoH se han agrupado en base a su deficiencia en actividad GTPasa. (Esquema extraído de (Vega *et al.* 2007).

Proteína	Efectores	Tipo de Efector	Función
RhoA, RhoC	ROCK I, II PRK1/PKN Citron	Kinasa Kinasa Kinasa	Contracción actomiosina; transformación, transcripción Polimerización actina; transcripción, microtúbulos Endocitosis; activación MAPK Citoquinesis
RhoB	PRK1/PKN	Kinasa	Procesamiento EGFR; motilidad y adhesión celular
RhoD	Desconocido	Desconocido	Transporte de vesículas
Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE	Desconocido	Desconocido	Antagonista RhoA
RhoG	Kinectina Desconocido	Scaffold	Unión de microtúbulos 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, Rac2, Rac3	PAK 1, 2, 3 MLK2, 3 PAR6 P67 ^{PHOX} IQGAP1, 2 POSH IRSp53	Kinasa Kinasa Kinasa Enzima Scaffold/GAP Scaffold Scaffold	Activación de JNK; transformación Activación de JNK Polaridad celular; transformación Oxidación NADPH, transcripción (NF-κB) Uniones adherentes Activación de JNK, transcripción (NF-κB) Polimerización de actina
Cdc42	PAK1, 2, 3, 4 MLK2, 3 PAR6 N-WASP, WASP MRCK1, 2	Kinasa Kinasa Scaffold Scaffold Kinasa	Activación de JNK, transformación Activación de JNK Polaridad celular; transformación Polimerización de actina Organización de actina
TC10	PAK WASP PIST ¹³⁶ Desconocido	Kinasa Scaffold Scaffold Desconocido	Activación de JNK Polimerización de actina 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 (Bishop *et al.* 2000, Sahai *et al.* 2002, van Aelst *et al.* 1997).

2.1.1 Efecto de las proteínas Rho sobre el citoesqueleto.

La habilidad de las células eucariotas para mantener o cambiar de forma y el nivel de adhesión al sustrato en respuesta a señales externas depende en gran parte de la reorganización de su citoesqueleto de actina. Esta dinámica del citoesqueleto es muy relevante en numerosos procesos celulares como la proliferación, movilidad celular, la metástasis en los tumores, citocinesis, fagocitosis y la plasticidad neuronal. 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 (Ahmed *et al.* 1995, Diekmann *et al.* 1995).

RhoA está implicada en la regulación de la formación de fibras de estrés de actina. La microinyección de un mutante activado de RhoA (RhoV14), en fibroblastos quiescentes resulta en la inducción de fibras de estrés y la aparición de adhesiones focales (Ridley *et al.* 1992). Existen numerosas proteínas capaces de unirse a la forma activa de RhoA (RhoA-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 kinasa de la familia ROCK llamadas ROCK I (ROK α o Rho-kinasa) y ROCK II (ROK β o p160 ROCK) (Nakagawa *et al.* 1996). La interacción de Rho con estas proteínas aumenta su actividad kinasa (Leung *et al.* 1995, Ishizaki *et al.* 1996, Kakimoto *et al.* 2004). Estudios con el inhibidor específico de ROCK Y-27632 (Uehata *et al.* 1997) han revelado que ROCK regula varios procesos fisiológicos y patológicos como contracción de músculo liso asociado con la hipertensión y el asma, y la migración celular con la metástasis de los tumores (Shimizu *et al.* 2005). Una de las proteínas diana de la kinasa ROCK I es MLC (*myosin light chain*, cadena ligera de la miosina). ROCK I, tras ser activada por RhoA-GTP, regula los niveles de fosforilación de MLC de forma directa y también indirectamente a través de la fosforilación e inactivación de la fosfatasa de MLC (MLCP). La fosforilación de MLC da lugar a la formación de fibras de estrés (Tan *et al.* 1992, Ikeda *et al.* 2003).

En fibroblastos, Rac induce la formación de lamelipodios y juega un papel en la reorganización del citoesqueleto inducida por factores de crecimiento y la forma activada de Ras (RasV12) (Ridley *et al.* 1992). Además, Rac regula la motilidad inducida por el factor de crecimiento hepático (HGF) y RasV12 en células epiteliales de perro MDCK (Ridley *et al.* 1995). Por otro lado, la sobreexpresión de Cdc42 en fibroblastos desencadena la formación de filopodios en la periferia celular (Kozma *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).

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.

2.1.2 Efecto de las proteínas Rho sobre el ciclo celular.

Además de su papel sobre el citoesqueleto, las proteínas Rho contribuyen a la regulación de otras funciones celulares como la regulación transcripcional o bien la proliferación y transformación celular (Pruitt *et al.* 2001, Danesh *et al.* 2002, Jaffe *et al.* 2002, Besson *et al.* 2004, Poch *et al.* 2007).

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 interleukina-2 (IL-2), que a su vez estimula la progresión de la fase G1 y la expansión clonal de linfocitos específicos para ese antígeno (Arrieumerlou *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 (Olson *et al.* 1995). RhoA induce 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 RhoA es a través de la fosforilación de ERK mediada por 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} (Adamson *et al.* 2002, Zuckerbraun *et al.* 2003).

La activación de RhoA 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, RhoA 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, aumentando la degradación de p21^{Cip1} por una vía ubiquitina-proteosoma independiente (Bao *et al.* 2002). Además, Rac y Cdc42 son capaces de promover la transcripción de *Ciclina D1* y *Ciclina E* a través de diferentes vías dependiendo del tipo celular (Croft *et al.* 2006).

La inhibición de RhoA produce un aumento en los niveles de p27^{kip1} (Weber *et al.* 1997), 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). Aparte, RhoA puede actuar sobre los niveles de p27^{kip1} aumentando la transcripción de Skp2 que induce la degradación de p27^{kip1} (Mammoto *et al.* 2004).

La inducción de la transcripción de *Ciclina D1* mediada por Ras transcurre a través de la activación de la vía Ras-Raf-MEK-ERK (Balmanno *et al.* 1999). La inducción de *Ciclina D1* durante la fase G1 está íntimamente regulada a través de la activación de esta ruta (Roovers *et al.* 2000, Weber *et al.* 1997). 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, 2003). 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).

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.

2.2 Proteínas Rnd.

La subfamilia Rnd (*round*) representa un subgrupo dentro de las proteínas Rho. Está compuesta por Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7 y Rnd3/RhoE. Estas proteínas se caracterizan por poseer unas propiedades inusuales dentro de la familia Rho ya que carecen de actividad GTPasa intrínseca, con lo que no son capaces de unir a GDP permaneciendo constitutivamente activas.

Como se ha visto con el resto de miembros de la familia Rho, las proteínas Rnd también actúan como reguladores de la dinámica del citoesqueleto de actina. Además, también participan en la regulación del ciclo celular y apoptosis, en la transformación mediada por oncogenes y en diversos aspectos del desarrollo y fisiología neuronal (Chardin. 2006).

A diferencia de otros miembros de la familia Rho (Rho, Rac, Cdc42), las proteínas Rnd sólo se han encontrado en animales vertebrados (mamíferos, aves, anfibios y peces). Esto parece indicar una posible relación con funciones más sofisticadas del citoesqueleto, como por ejemplo la plasticidad neuronal (Chardin. 2006).

En todas las líneas celulares estudiadas (fibroblastos, células epiteliales y neuronas), las proteínas Rnd juegan un papel importante en el control del citoesqueleto de actina. Se ha comprobado que la sobreexpresión de Rnd1 y Rnd3 inhibe la formación de fibras de estrés e induce la pérdida de adhesiones focales, de manera que las células resultantes pierden por tanto la capacidad de extenderse y adquieren forma redondeada, fenotipo que da lugar a su nombre (Guasch *et al.* 1998, Nobes *et al.* 1998). En cuanto a Rnd2, poco se conoce sobre sus funciones *in vitro*. Se ha visto que no posee los mismos efectos sobre fibroblastos que los otros miembros de la familia Rnd (Nobes *et al.* 1998) y se ha observado que su unión a p190-Rho-GAP es muy tenue (Wennerberg *et al.* 2003). Está presente en células neuronales realizando su efecto sobre el citoesqueleto mediante efectores como las proteínas pragmina (Tanaka *et al.* 2006) y rapostlin (Fujita *et al.* 2002, Kakimoto *et al.* 2004).

2.2.1 RhoE/Rnd3.

RhoE/Rnd3 (a la que llamaremos RhoE en este trabajo) es uno de los miembros de la subfamilia Rnd de GTPasas atípicas, ya que carece de actividad GTPasa y no une GDP, por lo que se encuentra en un estado constitutivamente activo (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, posiciones correspondientes a la numeración de los aminoácidos en Ras) 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 que transcurren a lo largo de la membrana externa (*actin bundles*) 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 (*hepatocyte growth factor*), mientras que RhoA produce el efecto contrario.

El papel de RhoE como antagonista de RhoA se puede explicar por dos mecanismos moleculares: por un lado, RhoE induce pérdida de fibras de estrés y de adhesiones focales en células Cos7 y en fibroblastos vía la activación de p190-Rho-GAP (Wennerberg *et al.* 2003). Esto produce una disminución de los niveles de RhoA-GTP (activa) y bloquea la ruta de señalización. Los mutantes de RhoE incapaces de unirse a p190-Rho-GAP no inducen el fenotipo "round", demostrando así que el mecanismo de acción de RhoE es a través de dicha proteína.

Por otro lado, RhoE es capaz de unirse e inhibir a ROCK I, el principal efector de RhoA, produciendo pérdida de fibras de estrés de actina y de adhesiones focales y aumentando la migración celular (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 una 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, RhoE es incapaz de unirse, y es necesario que ROCK I se active para adoptar una conformación abierta y permitir así la unión de RhoE (Riento *et al.* 2003). La unión en primera instancia de RhoA a ROCK I podría inducir esta conformación abierta y permitir su posterior unión a RhoE, lo que inhibiría su actividad y produciría la pérdida de fibras de estrés de actina y de las adhesiones focales en fibroblastos.

RhoE es un sustrato fosforilable de ROCK I, pero no de ROCK II, *in vivo* (Riento *et al.* 2005). Dicha fosforilación parece que 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. Además, también se ha demostrado recientemente que PKC fosforila a RhoE, lo que tiene un efecto directo sobre la capacidad de RhoE de bloquear la señalización de la vía Rho-ROCK, además de cambiar su localización celular (Madigan *et al.* 2009).

Además de su efecto sobre el citoesqueleto de actina, RhoE participa en la regulación del ciclo celular, apoptosis y transformación tumoral. 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.

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 (Villalonga *et al.* 2004). 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, en este modelo inducible por tetraciclina, RhoE sólo es capaz de inducir efectos transitorios (<24 h) sobre el citoesqueleto, lo que implicaría que los mecanismos responsables de dichas alteraciones (citoesqueleto y ciclo celular) son independientes. Finalmente, y contrariamente a lo descrito en el párrafo anterior (Hansen *et al.* 2000), en este modelo la inducción de la expresión de RhoE inhibe la transformación de células inducida por Ras y Raf.

En otro modelo, utilizando células tumorales de próstata con una alta capacidad metastática, la sobreexpresión de RhoE induce una parada del ciclo celular en G2/M. 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 (Bektic *et al.* 2005).

En nuestro laboratorio también hemos caracterizado el efecto de RhoE sobre el ciclo celular, utilizando células de astroglioma U87 (Poch *et al.* 2007). Nuestros resultados indican que RhoE interfiere con la activación de ERK, lo que conduce a un defecto en la expresión de Ciclina D1 y en la fosforilación de Rb. Como resultado, se produce un bloqueo del ciclo celular en la fase G1 y un aumento de la muerte celular por apoptosis. Además, este efecto no es específico de las células U87 porque se reproduce también en otras líneas derivadas de tumores (T84, células derivadas de un carcinoma de colon y A375, derivadas de un melanoma maligno humano). Todos estos resultados sugieren que RhoE podría tener un papel como supresor de tumores (Poch *et al.* 2007).

2.3 Función de las proteínas Rho en el sistema nervioso.

Las proteínas Rho, al estar implicadas en la regulación del citoesqueleto como hemos visto en apartados anteriores, juegan un papel importante en el desarrollo neuronal, en la migración neuronal, la formación y crecimiento de neuritas o en la formación y mantenimiento de las espinas dendríticas (Govek *et al.* 2005). El citoesqueleto de las dendritas está compuesto de microtúbulos recubiertos de una corteza de actina (van Aelst *et al.* 2004), mientras que el citoesqueleto de las espinas dendríticas está formado totalmente de actina (Matus *et al.* 1982, Fifkova, 1985, Markham *et al.* 1986). Existen diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que demuestran la implicación de las proteínas Rho en la correcta formación de los circuitos neurales.

Algunos modelos murinos de retraso mental respaldan que anomalías en la arborización de las dendritas y la morfogénesis de las espinas dendríticas contribuyen al retraso mental. Así, el ratón *Knock-Out* (KO) de *FMR1*, que es un modelo del síndrome del cromosoma X frágil (la hipermetilación de este gen es la causa más frecuente del síndrome de X frágil (Heasman *et al.* 2008), manifiesta una disgenesia en las espinas dendríticas (Comery *et al.* 1997, Nimchinsky *et al.* 2001); y el ratón TS65Dn, modelo de Síndrome de Down, presenta menos bifurcaciones y menos espinas dendríticas (Dierssen *et al.* 2003).

Muchos pacientes con diversos retrasos mentales tienen alteraciones en la estructura de las dendritas y en la morfología de las espinas dendríticas, por una regulación deficiente del citoesqueleto producida por una serie de mutaciones en genes que codifican directamente proteínas de la familia Rho o reguladores y efectores de dichas proteínas (van Aelst *et al.* 2004).

Se ha comprobado que Cdc42 y Rac son capaces de estimular el crecimiento axonal (Kozma *et al.* 1997). En oposición a ellas se encuentran RhoA, que induce el colapso del cono del crecimiento y por lo tanto inhibe su formación mediante la activación de su efector ROCK (Gallo, 2006, Wahl *et al.* 2000). Dichas conclusiones se obtuvieron al sobreexpresar construcciones de proteínas Rho mutantes. El efecto de RhoA sobre el crecimiento de las dendritas se demostró al sobreexpresar un mutante constitutivamente activado (CA) en neuronas del hipocampo de rata, reduciendo drásticamente la complejidad del árbol dendrítico (Ahnert-Hilger *et al.* 2004, Pilpel *et al.* 2004). Y dicho efecto se producía a través de ROCK ya que se podía revertir al utilizar un inhibidor específico de ROCK (Li *et al.* 2002, Mehta *et al.* 2002). En el caso de Rac y Cdc42 sucede al contrario que en RhoA, al sobreexpresar un mutante CA de Rac o de Cdc42 se produce un aumento en la complejidad del árbol dendrítico, siendo este efecto más suave en el caso de Cdc42. Por lo tanto la morfología de las dendritas y de las espinas dendríticas está determinada por el equilibrio entre RhoA, Rac y Cdc42 (Govek *et al.* 2005).

Uno de los primeros genes mutados identificados en pacientes con retraso mental ligado al cromosoma X y que está relacionado con la familia de las proteínas Rho, es *OPHN1* que codifica la oligophrenin-1, el cual es un Rho-GAP y por lo tanto regula negativamente a RhoA, Rac y Cdc42 (Bienvenu *et al.* 1997). Estudios posteriores identificaron mutaciones en este gen en familias que sufrían retraso mental asociado a epilepsia (Tentler *et al.* 1999, Bergmann *et al.* 2003, Philip *et al.* 2003). La utilización de siRNAs para inhibir la expresión de *OPHN1* en neuronas piramidales del

hipocampo produce una reducción en la longitud de las espinas dendríticas. Este fenotipo se observó también en las neuronas piramidales del hipocampo de los ratones KO de *OPHN1*. Dichos ratones mostraron defectos en la memoria espacial, conductuales, daños en el comportamiento social e hiperactividad (Khelifaoui *et al.* 2007). El fenotipo observado en las dendritas de las células piramidales es el mismo que se observa al expresar un mutante CA de RhoA y puede ser rescatado con el inhibidor de ROCK (Govek *et al.* 2004).

Otro gen en el cual se han encontrado mutaciones en pacientes que sufren retraso mental ligado al cromosoma X, es *PAK3*. Dicho gen codifica la kinasa activada por Rac1 y Cdc42, que induce desorganización de los filamentos de actina (Miyashita *et al.* 2004). Hay diferentes estudios que demuestran la implicación de las proteínas de la familia PAK en la formación de las dendritas y las espinas dendríticas. Uno de los primeros estudios fue con ratones transgénicos a los cuales se les inhibió la función catalítica de PAK1 y PAK3. En las células corticales de estos ratones hay menos espinas dendríticas y muestran un daño en la memoria consolidada (Hayashi *et al.* 2004). Estudios posteriores demostraron que inhibiendo solo PAK3 utilizando un siRNA o un mutante dominante negativo (DN) de PAK3 en neuronas de hipocampo de rata, se producía un alargamiento anormal de las espinas dendríticas y se reducía la maduración de las sinapsis de estas neuronas (Zhang *et al.* 2005). Sin embargo, en el ratón KO de PAK3 no se observó ningún defecto obvio en la estructura neuronal (Meng *et al.* 2005).

Otro gen implicado en retraso mental y a su vez relacionado con las proteínas de la familia Rho es *ARHGEF6*, el cual codifica para un GEF de Rac1 y Cdc42. Al inhibir su expresión a través de un siRNA se ha demostrado que este gen es necesario para la formación de las sinapsis dendríticas de las neuronas del hipocampo y que su ausencia produce alteraciones en la morfología de las espinas dendríticas (Node-Langlois *et al.* 2006). El fenotipo observado en la morfología de las espinas dendríticas de las neuronas del hipocampo es el mismo que al inhibir a PAK3 y se puede revertir al expresar un mutante constitutivamente activado de PAK3 (Boda *et al.* 2004).

Un ejemplo de retraso mental sindrómico es el desorden mental asociado a GAP (MEGAP). El gen asociado a este retraso, *MEGAP*, codifica un GAP que induce la actividad de Rac1 y Cdc42. La sobreexpresión de *MEGAP* induce pérdida de filopodios y este fenotipo es posible rescatarlo expresando mutantes constitutivamente activados de Cdc42 y Rac1 (Yang *et al.* 2006b).

De especial interés es el hecho de que las motoneuronas (aunque también otros tipos neuronales como las neuronas simpáticas del ganglio cervical craneal) probablemente requieren la correcta expresión de Rho y/o Rac para su supervivencia tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, se ha visto que ratones transgénicos que expresan mutantes dominantes negativos de RhoA o de ROCK muestran un aumento de la apoptosis en las motoneuronas durante el desarrollo (Kobayashi *et al.* 2004b). Igualmente destacable en relación a la fisiopatología de las neuronas motoras es que Alsin, el producto del gen *ALS2*, cuya mutación es causa de algunos casos de esclerosis lateral amiotrófica, es un GEF activador de Rac1 y, al menos *in vitro*, parece que gran parte de la capacidad que Alsin tiene para inducir la supervivencia de las motoneuronas es vía Rac1 (Jacquier *et al.* 2006, Topp *et al.* 2004, Yang *et al.* 2001b). En este sentido, se ha descrito también que la reducción en los niveles de SMN *in vitro* (cuyas mutaciones y deleciones ocasionan la atrofia muscular espinal, enfermedad que presenta características similares a la esclerosis lateral amiotrófica pero que afecta a niños) acaba provocando una activación inapropiada de la vía RhoA/ROCK que altera el citoesqueleto y la neuritogénesis (Bowerman *et al.* 2007).

Con respecto a la relación de las proteínas Rho con las motoneuronas cabe destacar la función de estas proteínas en las células de Schwann, responsables de la mielinización de los axones de las motoneuronas. En ensayos *in vitro*, la expresión de dominantes negativos de Rac1 y Cdc42 reduce la motilidad de células de Schwann (Cheng *et al.* 2000). Estudios con tejidos extraídos de ratones mutantes condicionales de Cdc42 y Rac1 indican que Cdc42 es necesario para la proliferación de las células de Schwann mientras que Rac1 es necesario para la extensión y estabilización de estas células alrededor de los axones (Benninger *et al.* 2007).

En cuanto a las proteínas Rnd poco se sabe de sus funciones a nivel del SNC. Mediante electroporación en el útero de Rnd2 constitutivamente activo y un mutante de Rnd2 inactivo, se ha demostrado que esta proteína está implicada en la migración de las células piramidales que se encuentran en la zona subventricular de la corteza embrional y el hipocampo (Nakamura *et al.* 2006). Más recientemente se ha demostrado también que Rnd2 es el mayor efector de Neurogenina 2, una proteína que controla la neurogénesis en el córtex cerebral de embriones. La sobreexpresión de Neurogenina 2 induce el aumento de Rnd2, y el efecto observado en la migración de las neuronas corticales al silenciar Rnd2 es similar al observado al silenciar Neurogenina 2. Por último, la sobreexpresión de Rnd2 recupera la migración de neuronas en las que Neurogenina 2 se ha silenciado (Heng *et al.* 2008).

Recientemente se ha estudiado el efecto de RhoE sobre la neuritogénesis. La sobreexpresión de RhoE en células PC12 (derivadas de un feocromocitoma de rata) induce el crecimiento de neuritas en ausencia de NGF a través de la inhibición de la vía RhoA/ROCK, ya que este efecto es inhibido al sobreexpresar RhoA o ROCK e induce un aumento en los niveles de N68, un marcador de maduración neuronal (Talens-Visconti *et al.* 2009). Este resultado sugiere que RhoE puede desempeñar un papel importante en el desarrollo del SNC.

2.4 Funciones de las proteínas Rho derivadas del estudio de ratones modificados genéticamente.

La utilización de ratones mutados para el estudio de las funciones de esta familia de proteínas está cada vez más extendida, ya que los anteriores métodos no eran del todo fisiológicos. Por ejemplo, los DN de estas proteínas no son muy específicos ya que secuestran los GEFs que pueden estar actuando sobre otros sustratos y por lo tanto el efecto que se observa en las células puede no ser fruto exclusivamente de la inhibición de la proteína en estudio. En el caso de utilizar proteínas CA éstas pueden perder su especificidad sobre sus sustratos, por lo tanto los efectos observados en las células transfectadas con estos mutantes pueden no ser específicos de las proteínas en estudio. Dichas razones explican por qué se utilizan cada vez más ratones mutados o sus células para el estudio de las funciones de estas proteínas. Por ejemplo estudios con un DN de Rac1 demostraron que esta proteína era esencial para la migración y la formación de lamilopodios (Ridley *et al.* 2003, Ginsberg *et al.* 2005), mientras que en macrófagos de ratones KO de Rac1, la migración y la formación de lamilopodios no están alteradas (Wheeler *et al.* 2006).

En estos últimos años se han generado 8 ratones KO de proteínas de la familia Rho para estudiar sus funciones en un organismo vivo, con resultados muy variables. En la **tabla 2** se muestra una breve descripción del fenotipo mostrado por estos ratones.

	Rho GTPasa	Funciones Celulares	Papeles en Fisiología o Enfermedades	Fenotipos de los Knock Outs
Rho	RhoB	Formación de fibras de estrés, adhesiones focales y transporte endosomal.	Inhibe crecimiento tumoral, migración celular e invasión. Esta disminuido en tumores.	Aumenta la sensibilidad a carcinogénesis inducida en piel.
	RhoC	Formación de fibras de estrés, adhesiones focales y adhesiones célula-célula	Promueve transformación, oncogénesis, invasión y metástasis. Aumentado en tumores.	Dispensable para embriogénesis pero esencial para metástasis.
Rac	Rac1	Formación de lamilopodios, complejos focales. Migración celular estabilidad de microtúbulos, adhesiones célula-célula, tráfico vesicular. Fagocitosis. Activación de la oxidasa NADPH.	Promueve transformación, oncogénesis, metástasis y supervivencia celular. Disminuido en tumores; Rac1b, variante expresada en tumores. Fusión mioblástica.	Mortalidad embrionaria.
	Rac2	Formación de lamilopodios, complejos focales. Activación de la oxidasa NADPH. Migración celular.	Disminuido en tumores.	Defecto en las células hematopoyéticas.
	Rac3	Formación de lamilopodios, complejos focales	Hiperactividad o disminución en cáncer de pecho. Crecimiento de neuritas.	Funciones del sistema nervioso afectadas.
	RhoG	Formación de lamilopodios, membranas onduladas, complejos focales. Migración celular, fagocitosis. Activación de la oxidasa NADPH.	Actividad de transformación débil. Previene la transformación por Ras en fibroblastos. Crecimiento de neuritas.	Defecto inmunológico leve.
Cdc42	Cdc42	Formación de filopodios. Tráfico de vesículas, polaridad celular, migración, citocinesis, fagocitosis.	Actividad de transformación débil. Disminución en cáncer de pecho.	Mortalidad embrionaria temprana. Diferenciación epidérmica, defecto SN.
RhoH	RhoH/TTF	Inhibición de la polimeración de actina, no actividad GTPasa.	Inhibe proliferación y migración. Induce apoptosis. Mutado en linfomas.	Deficiente en células T. Esencial para señal TRC. Maduración de Timocitos.

Tabla 2: Fenotipo de ratones deficientes en la expresión de proteínas de la familia de Rho (Vega, et al. 2007).

- Rho

RhoA es la proteína arquetipo de la familia. Sin embargo, no existen datos en la bibliografía sobre ningún modelo animal de eliminación de su expresión, lo que sugiere que la proteína es esencial desde fases muy tempranas del desarrollo. Los ratones KO tanto de RhoB como de RhoC no presentan excesivos defectos en su desarrollo, y han puesto de manifiesto un papel importante de estas proteínas en el tráfico de vesículas y el desarrollo del cáncer (Liu *et al.* 2001, Hakem *et al.* 2005). Además, el ratón KO de RhoB, que es viable y fértil aunque un poco más pequeño que los ratones *Wild-Type* (WT) (Liu *et al.* 2001), presenta también un defecto en angiogénesis, como es el desarrollo vascular de la retina (Adini *et al.* 2003).

Estudios previos con modelos de células *in vitro* y modelos de cáncer *in vivo* mostraban que RhoB y RhoC parecen tener papeles diferentes en la progresión del cáncer. En el caso de RhoB se le atribuye un papel de supresor de tumores, ya que al sobreexpresar la proteína, se inhibe el crecimiento celular, la supervivencia celular, la invasión y la metástasis (Huang *et al.* 2006, Vega *et al.* 2008). En cambio la sobreexpresión de RhoC se correlaciona con metástasis en varios tipos de cáncer (Wu *et al.* 2004, Vega *et al.* 2008). Además, es suficiente la expresión de un DN de RhoC para reducir la migración e invasión de células cancerígenas de próstata, gástricas y de pecho (Yao *et al.* 2006, Liu *et al.* 2007, Simpson *et al.* 2004). Con el ratón KO de RhoB se ha confirmado el papel que se le había atribuido, ya que dichos ratones tienen una mayor susceptibilidad a la inducción de tumores en la piel (Liu *et al.* 2001). Del mismo modo, los ratones KO de RhoC también confirman su papel en metástasis, ya que presentan reducción en el tamaño y número de las metástasis en ensayos de carcinogénesis inducida (Hakem *et al.* 2005).

Al no ser viable el ratón KO de RhoA cabe fijarse en los ratones KO de proteínas reguladoras, como p190-GAP, y de sus proteínas dianas más directas, como ROCK.

- p190-GAP

El ratón KO de p190-GAP muere en el periodo perinatal. Además, sufre severos daños en el desarrollo neuronal, con anomalías anatómicas en el cerebro y un desorden en las capas celulares del córtex cerebral, lo que sugiere un defecto en la migración neuronal (Brouns *et al.* 2000). Ensayos con neuronas de estos ratones han desvelado que la ausencia de p190-GAP disminuye el número y tamaño de las

dendritas, efecto que revierte con la sobreexpresión de p190-GAP (Brouns *et al.* 2001).

Por otro lado, el KO de p190-B-GAP tiene un fenotipo muy similar al KO del factor de transcripción CREB, incluyendo una reducción sustancial del tamaño. Además muere después del nacimiento por un defecto en los pulmones, tiene reducido el timo y sufre hidrocefalia (Sordella *et al.* 2002).

- **ROCK:**

Aunque los ratones KO de ROCK-I nacen en proporción mendeliana, mueren en los primeros 21 días de vida en gran número. La mayoría de los ratones nacen sin párpados y un 50% nacen con la cavidad abdominal abierta, lo que provoca que sean normalmente devorados por la madre (Shimizu *et al.* 2005). Finalmente, el ratón KO de ROCK-II presenta formación de trombos, disfunción de la placenta, retraso en el crecimiento intrauterino y muerte fetal (Thumkeo *et al.* 2003).

- **Cdc42**

Uno de los primeros genes de la familia de Rho cuya expresión se eliminó en ratones fue *Cdc42*. El ratón *Cdc42* KO es inviable, con muerte embrionaria en estadio E7.5 (Cheng *et al.* 2000). Sin embargo, se han realizado estudios con células de estos embriones y también se han generado ratones *Cdc42* KO condicionales para poder estudiar los efectos de la ausencia de *Cdc42* en ciertos tejidos. Las células madre embrionarias (ESCs) sin *Cdc42* muestran defectos en la organización del citoesqueleto de actina, incluyendo una disminución en el tamaño y número de filopodios (Chen *et al.* 2000), confirmando los datos previos obtenidos con la expresión de mutantes activados y dominantes negativos de esta proteína (Yang *et al.* 2006a). Los fibroblastos embrionarios (MEFs) sin *Cdc42* tiene pérdida total de los filopodios, mientras que los MEFs sin *Cdc42-GAP*, en los que por lo tanto la actividad de *Cdc42* está aumentada, presentan formación de filopodios de forma espontánea (Yang *et al.* 2006a).

Como el KO de *Cdc42* no es viable, para estudiar la función de *Cdc42* en cerebro se ha construido un mutante condicional en este tejido (Garvalov *et al.* 2007). Aunque el ratón muere de forma perinatal, se ha podido estudiar el sistema nervioso en estos animales, observándose una reducción en el tamaño del córtex cerebral. En cuanto a las neuronas, muestran una reducción del número de filopodios y defectos en la axonogénesis, revelando que *Cdc42* es esencial para la generación de axones, pero no para las neuritas (Garvalov *et al.* 2007).

En otro modelo, se ha visto que Cdc42 es importante para la mielinización, tanto en sistema nervioso central (SNC) como en periférico (SNP). Así, se han encontrado defectos en oligodendrocitos (SNC) y en células de Schwann (SNP), dando como resultado vainas de mielina más finas en ausencia de Cdc42 (Benninger *et al.* 2007).

Finalmente, se ha observado que Cdc42 es importante en hematopoyesis, afectando a la proliferación y diferenciación de los precursores hematopoyéticos (Yang *et al.* 2007), así como a la quimiotaxis de estas mismas células y MEFs, pero no a la migración celular independiente de factores quimiotácticos (Yang *et al.* 2006a, 2007, Czuchra *et al.* 2005).

- Rac

La subfamilia de Rac está formada por Rac1, Rac2, Rac3 y RhoG (Boueux *et al.* 2007). Las tres proteínas Rac inducen formación de lamilopodios y membranas onduladas e inducen extensión de la membrana durante la fagocitosis (Jaffe *et al.* 2005), mientras que RhoG sólo estimula la formación de lamilopodios y contribuye a la fagocitosis (Kato *et al.* 2003). Para la comprobación de la función de estas proteínas se han hecho ratones KO de las 4 proteínas. El KO de Rac1 es letal en estado embrionario (Sugihara *et al.* 1998), pero sus tejidos han sido utilizados en múltiples estudios para dilucidar las funciones de Rac1. Los KO de Rac2, Rac3 y RhoG no muestran defectos obvios en el desarrollo, pero en diferentes líneas celulares se les han encontrado múltiples defectos (Heasman *et al.* 2008).

Pese a que los estudios *in vitro* con DN de Rac1 indican que esta proteína es esencial para la formación de lamelipodios y migración de macrófagos (Ridley, 2001), los macrófagos de ratones Rac1 KO pueden formar membranas rugosas y migran igual de rápido que los WT. Sin embargo, tienen una estructura alargada que indica un defecto en la extensión de lamilopodios (Wells *et al.* 2004). En el caso de los neutrófilos, Rac1 no es necesario para la migración pero si para la quimiotaxia (Sun *et al.* 2004).

Una de las evidencias de la importancia de Rac1 en un modelo *in vivo*, se ha encontrado en las células de Schwann que carecen de Rac1 o que se han tratado con un inhibidor de Rac y que pierden la capacidad de generar lamilopodios, que son esenciales para envolver los axones y mielinizarlos (Benninger *et al.* 2007, Nodari *et al.* 2007).

En estudios previos *in vitro* Rac1, Rac3 y RhoG promueven el crecimiento de neuritas, igual que Cdc42. La mutación de Rac1 en *D. melanogaster* causa la

interrupción del crecimiento axonal (Luo *et al.* 1994). También en células corticales de rata al sobreexpresar un DN de Rac1 se produce una interrupción del crecimiento de los axones (Threadgill *et al.* 1997). Sin embargo, estudios en neuronas de ratones KO de Rac1 condicionales muestran un crecimiento axonal normal, aunque muestran un fallo en el entrecruzamiento entre estos axones. Este resultado refleja que Rac1 es más importante para la guía de los axones que para su crecimiento (Chen *et al.* 2007).

Es posible que Rac3 compense la pérdida de Rac1 en el crecimiento axonal ya que la sobreexpresión de Rac3 incrementa el crecimiento de las neuritas y su bifurcación (Albertinazzi *et al.* 1998). Sorprendentemente las neuronas del hipocampo del ratón KO de Rac3 en cultivo tienen una morfología y una polaridad normal. Además, el ratón no tiene ningún defecto estructural destacable en el cerebro (Corbetta *et al.* 2005). Estudios conductuales en estos ratones revelan hiperactividad y cambios en el aprendizaje motor, que sugieren cambios más sutiles en la función neuronal (Corbetta *et al.* 2008).

- Rho atípicas

Las proteínas Rho atípicas lo son por carecer de actividad GTPasa intrínseca. El único modelo KO de éstas, hasta este momento, es el KO de RhoH. Esta proteína sólo está presente en animales vertebrados y predominantemente se expresa en células hematopoyéticas. En estudios *in vitro* a RhoH se le había atribuido la función de inhibir a otras proteínas de la familia Rho: la sobreexpresión de RhoH inhibe a RhoA y a Rac1 (Gu *et al.* 2005).

Los ratones RhoH KO son viables y fértiles (Gu *et al.* 2006), pero presentan defectos en la maduración de las células T, por lo que el ratón tiene menos células T circulantes por el torrente sanguíneo. En estas células se observa además un aumento de la actividad de Rac1 pero no de Rac2, aumentando la migración y quimiotaxia celulares (Dorn *et al.* 2007, Chae *et al.* 2008). En el caso de las células B la diferenciación y proliferación en los ratones KO de RhoH es normal, lo que sugiere que RhoH no regula el desarrollo de las células B (Gu *et al.* 2006, Dorn *et al.* 2007).

- Rnd

En cuanto a la subfamilia de las proteínas Rnd no existen modelos *in vivo*, todo lo que se conoce de sus efectos es a través de la sobreexpresión de las proteínas o de mutantes derivadas de estas.

En cuanto a la localización de estas proteínas *in vivo*, en diversos estudios se ha comprobado mediante la técnica de *Northern blot* la presencia de ARNm en los diferentes órganos de ratas adultas, observándose altos niveles de Rnd1 en encéfalo e hígado y de Rnd2 en testículos (minoritariamente también en encéfalo). En el mismo estudio se describió, mediante hibridación *in situ*, la expresión de Rnd1 en el SNC (Nobes *et al.* 1998). En cuanto a Rnd2, también se ha estudiado mediante hibridación *in situ* su localización a nivel del SNC (Decourt *et al.* 2005). En este caso existe una intensa señal en el cerebelo y en el hipocampo en comparación con el resto de estructuras.

En cuanto a la expresión de RhoE *in vivo*, los datos obtenidos por *Northern blot* indican que es ubicua, siendo más destacable en el encéfalo, páncreas, timo y testículo (Nobes *et al.* 1998). En nuestro laboratorio hemos realizado un estudio más extenso de la expresión de RhoE en el SNC de ratones, mediante inmunohistoquímica (Ballester-Lurbe *et al.* 2009). La expresión de RhoE en el cerebro adulto y médula espinal es generalizada, con niveles más altos en el bulbo y la corteza. Los niveles son más altos en animales recién nacidos y van disminuyendo a lo largo del desarrollo postnatal. Específicamente, en el bulbo olfatorio se detecta en las células granulares, en la capa mitral y en los núcleos olfatorios. En el estriado, diencefalo, mesencefalo, protuberancia, bulbo raquídeo y la médula espinal, RhoE presenta un amplio patrón de distribución, con mayor intensidad en las motoneuronas y en algunos núcleos del tronco cerebral como el núcleo rojo o el núcleo reticulotegmental. Por último, las células piramidales de CA1-3 y la capa de polimorfo, pero no las células granulares del giro dentado en el hipocampo, también muestran un fuerte marcaje.

OBJETIVOS

3 Objetivos.

Los resultados anteriores de nuestro laboratorio y de la bibliografía indican que RhoE no sólo es importante para la regulación del citoesqueleto de actina, sino que también está implicada en la regulación de la supervivencia y proliferación celular. Sin embargo, y pese a que los modelos animales son de gran valor para determinar la función fisiológica de proteínas, no hay ningún modelo *in vivo* para analizar la función de las proteínas Rnd y en particular, de RhoE. En este trabajo nos planteamos generar dicho modelo para caracterizar la función de RhoE *in vivo*. Dado el papel relevante de las proteínas Rho en el desarrollo del sistema nervioso y la implicación de RhoE en la función neuronal, nuestra hipótesis es que RhoE puede ser también importante en el desarrollo del sistema nervioso. Con esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar el fenotipo producido por la ausencia de expresión de RhoE en ratón.
2. Estudiar el papel de RhoE en el neurodesarrollo.
3. Analizar los efectos convulsionantes producidos por la ausencia de RhoE.

MATERIAL Y MÉTODOS

4 Material y Métodos.

4.1 Animales y estabulación.

En este estudio se utilizaron ratones con un fondo genético mixto C57BL/6-129. La cría de ratones se realizó en el estabulario de la Universidad Cardenal Herrera-CEU. Todos ellos tuvieron libre acceso al agua y se alimentaron *ad libitum* con pienso completo para ratones (Harlan Interfauna Ibérica S.L, Barcelona) bajo condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y fotoperiodo de 12 horas de duración. Las instalaciones, el manejo, cuidado y sacrificio de los animales se realizó de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos que se contempla en el Real Decreto 1201/2005, de 10 de Octubre, y la Transposición de la Directiva Comunitaria 86/609/CEE, 2003/65/CE. Todos los experimentos fueron autorizados por el Comité Ético de Bienestar Animal de la Universidad CEU-Cardenal Herrera.

Para los estudios de neurodesarrollo se trasladaron los ratones al estabulario del Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB). Los animales se estabularon en las condiciones ambientales (temperatura $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad 50-70%) recomendadas por la *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA), en grupos de 3-5 ratones por cubeta (460 cm^2) con rejilla para pienso y biberones en acero inoxidable y cubierta filtrante de plástico de polisulfono. Las cubetas se ventilaban individualmente, con presión positiva y filtro HEPA, y estaban situadas en una estantería equipada con motores de impulsión y extracción, también con filtros HEPA. El ciclo de luz/oscuridad se estableció en 12 h y los animales tenían libre acceso al agua y la comida. Todos los experimentos se realizaron siguiendo procedimientos aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del centro y cumpliendo la normativa establecida por las directrices de la Comunidad Europea (EU 86/609, decreto 2001-486), así como la normativa internacional del uso de animales de laboratorio (nº A5388-01 (NIH) para el apropiado cuidado y uso de animales con fines de investigación.

El sacrificio de los animales se realizó por sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (Doletal[®] solución inyectable, Vetoquinol). Tras el sacrificio, se extrajeron inmediatamente los diferentes órganos. En función de la técnica que se fuera a realizar el tejido se congeló o se fijó para evitar su deterioro (ver más adelante).

4.2 Obtención del ratón RhoE gt/gt.

El modelo de ratón que hemos utilizado fue obtenido mediante la técnica de “gene trapping” y lo adquirimos a la empresa Lexicon Pharmaceuticals. El vector VICTR37 se utilizó para infectar células troncales de ratones 129 (Zambrowicz *et al.* 1998, 2003). Por PCR inversa se localizaron las secuencias insertadas en puntos aleatorios del genoma del ratón. En nuestro caso, el punto de inserción se encuentra en el segundo intrón del gen que codifica para RhoE (**Figura 2**). El vector utilizado posee las secuencias SA (Splicing Aceptor) y SD (Splicing Donor), además de un sitio de poliadenilación (pA), que permitirán un procesado anómalo del mRNA de *RhoE*, dando lugar a una proteína truncada no funcional. El vector también posee la secuencia codificante BGEO precedida por una secuencia IRES de inicio de traducción, que proporciona resistencia a Neomicina y da lugar a la expresión de la enzima β -galactosidasa. Como la expresión de esta enzima está controlada por la región promotora del locus *RhoE*, es una herramienta muy útil para detectar el patrón de expresión de RhoE *in vivo*.

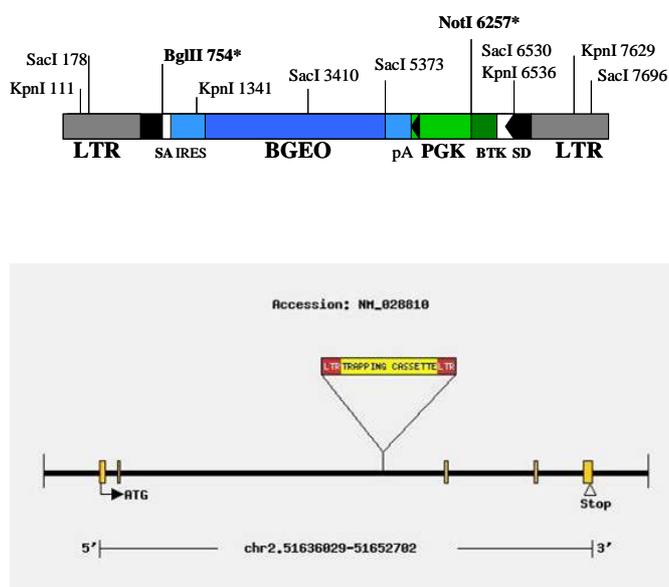


Figura 2: Resumen de la construcción del ratón RhoE gt/gt. Esquema del vector VICTR37 (parte superior de la figura) utilizado para interrumpir la expresión de RhoE. Por PCR inversa se determinó el punto de inserción del vector en el segundo intrón del locus *RhoE* (parte inferior de la figura). En la figura se indican las secuencias más relevantes del vector: LTR: *Long Terminal Repeat*; SA: *Splicing Aceptor*; IRES: *Internal Ribosome Entry Site*; BGEO: β -galactosidasa-Neomicina fosfotransferasa. pA: sitio de poliadenilación; PGK: promotor del gen de la fosfoglicerato-kinasa-1; BTK-SD: *Splicing Donor* de la tirosina kinasa de Bruton.

Las células troncales de ratones 129 que han incorporado el cassette de “gene trapping” se introducen en blastocistos de ratones C57BL/6 y se implantan en hembras pseudopreñadas. Se obtienen así ratones quiméricos, es decir, ratones con células de ratones C57BL/6 y células que derivan de las *Stem Cells* de los ratones 129. Como estas células tienen la capacidad de derivar a cualquier línea celular se espera que algunas de estas células deriven a la línea germinal de estos ratones quiméricos. Una vez se produce esta situación, se cruzan estos ratones con ratones C57BL/6 dando lugar a ratones de fondo genético híbrido C57BL/6-129 y heterocigotos, en los que un alelo es RhoE wt y el otro es RhoE gt, en el que la expresión de la proteína está interrumpida por el cassette de “gene trapping”. Mediante el cruce de ratones heterocigotos entre sí, obtenemos ratones de los tres genotipos, RhoE +/+, RhoE +/gt y RhoE gt/gt.

4.3 Genotipado de los ratones.

4.3.1 Extracción de DNA genómico de ratón.

A partir de una biopsia de la cola del ratón, se digiere el tejido mediante incubación en una solución con 700 ml de SSTE (SDS 1%; 100 mM NaCl; 15 mM EDTA; 50 mM TRIS-base), que contiene el detergente necesario para solubilizar las membranas y disgregar el tejido. Se deja toda la noche a 55°C en agitación suave. Para ayudar a la disgregación se añade proteinasa K (10 mg/ml proteinasa K, Invitrogen, en agua bidestilada, H₂O_{bd}) a una concentración final de 0.5 mg/ml. Al día siguiente se añade RNAsa A (10 mg/ml RNAsa A en Tris-HCl 10 mM, pH=7.5, y NaCl 15 mM) y se deja incubar durante 2 h a 37°C. La purificación del DNA se realizó utilizando solventes orgánicos en tres etapas. En la primera se añade un volumen equivalente de fenol (equilibrado con 100 mM TRIS-HCl pH=8), en la segunda, un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y en la tercera, un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). En cada etapa, después de añadir el solvente orgánico, se incuban las muestras 15 min a temperatura ambiente con agitación constante. Después se centrifuga a 15000 x g durante 15 min para separar las dos fases. Se recupera la fase superior (contiene el DNA) y tras la última centrifugación, se recupera el sobrenadante y se procede a la precipitación del DNA. Para ello se añade un volumen de isopropanol y un 1% de NaCl 5 M. Se invierte suavemente hasta ver la madeja de DNA. Pasados 10 min se centrifuga a 13000 x g y se decanta el sobrenadante. Se lava el precipitado con etanol (EtOH) al 70%, se decanta y después se deja evaporar a temperatura ambiente. Para solubilizar el DNA se añaden 75 µl de TE 10/1 (10 mM TRIS-HCl pH=7.5; 1 mM EDTA pH=8), se resuspende y se deja

incubando a 65°C durante una hora. Finalmente, para resuspender perfectamente el DNA se incubó la muestra a 37°C durante toda la noche. Este protocolo permite obtener entre 75 y 125 µg de DNA genómico purificado.

4.3.2 PCR de genotipado.

El genotipo de los animales obtenidos en cruces entre heterocigotos se determinó mediante una reacción de PCR. Para las reacciones de PCR los cebadores utilizados fueron:

LTR2-2: AAATGGCGTTACTTAAGCTAGCTAGCTTG

Rev3: TGAGCTAGGAAGATGCGGATGT

RhoE gt dir: TTTACACAGTAGGCTGACTC

La estrategia que se siguió se representa en la **Figura 3**. Se utilizan tres *primers*, un *primer* directo (RhoE gt direc) y otro reverso (Rev3) situados en el genoma de RhoE a una distancia entre ellos de 600pb para la identificación del alelo WT y el mismo *primer* directo y un *primer* reverso (LTR 2-2) situado en la secuencia LTR del vector VICTR37, para la identificación del alelo mutante, con una banda de 400pb.

Las condiciones de amplificación empleadas fueron: un primer ciclo de desnaturalización de 15 seg a 94°C, 10 ciclos (desnaturalización: 30 seg a 94°C; alineamiento: 30 seg a 65°C, en cada ciclo desciende 1°C; y polimerización: 40 seg a 72°C), 30 ciclos (desnaturalización: 15 seg a 94°C; alineamiento: 30 seg a 55°C; y polimerización: 40seg a 72°C) y un ciclo de extensión final de 5 min a 72°C, tras el cual se mantenían los tubos a 15°C en el mismo termociclador hasta su recogida. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador iCycler (Bio-Rad). Una vez terminada la reacción, los productos de PCR (5-10 µl de las muestras) se analizaban mediante separación electroforética en un gel de agarosa al 2%. Para la visualización de los fragmentos (de 600 pb y 400 pb) se tñeron los geles de agarosa con bromuro de etidio y se visualizaron bajo la luz ultravioleta del transiluminador.

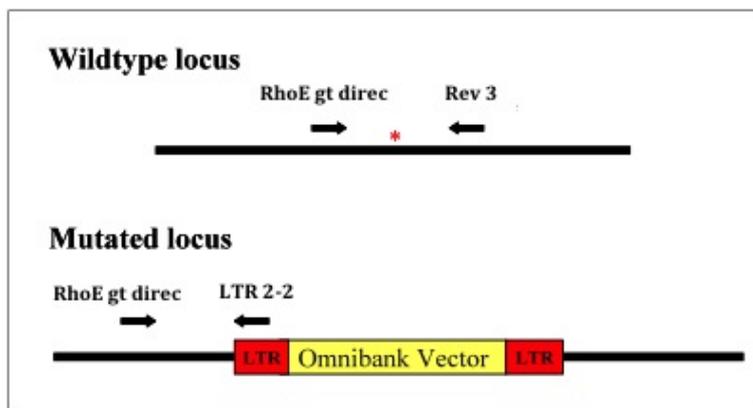


Figura 3: Estrategia para el genotipado de los ratones RhoE gt/gt. Se utilizan tres *primers*: para la detección del alelo WT se utilizan los *primers* RhoE gt direc y Rev 3, dando lugar a una banda de 600pb; y para la detección del alelo mutado los *primers* que se utilizan son RhoE gt direc y LTR 2-2 complementario de la región LTR del vector de *exon trapping*, dando lugar a un amplificado de 400pb.

4.4 Estudios del desarrollo postnatal.

Durante las tres primeras semanas de vida del ratón se desarrollan una serie de rasgos físicos, reflejos y habilidades relacionadas con la maduración psicomotora y neuromotora. El estudio de estos parámetros permite evaluar el desarrollo fisiológico del animal y detectar posibles factores intrínsecos que puedan alterarlo.

A lo largo del desarrollo tienen lugar los principales procesos de crecimiento, desarrollo y maduración del organismo. Este periodo coincide con el periodo de lactancia que, en la mayoría de cepas de ratón, abarca las tres primeras semanas de vida postnatal, entre los días posnatales (PD) PD0 y PD21. En este trabajo se analiza la evolución de los ratones durante este periodo, midiendo el crecimiento, la adquisición de *hitos* del desarrollo y de conductas adultas, a través de una serie de pruebas basadas en la batería de Fox (Fox, 1965, 1966) y el protocolo SHIRPA (Rogers *et al.* 1997; Nolan *et al.* 2000). Todos estos estudios se realizaron en dos cohortes, una de 20 ratones de tres camadas diferentes y otra cohorte de 24 ratones de tres camadas diferentes. Los ratones fueron genotipados al final del ensayo, dando como resultado 7 ratones RhoE +/+, 26 RhoE +/- y 11 RhoE gt/gt.

4.4.1 Somatometría.

Se comprobaron las modificaciones de los índices somatométricos postnatales tempranos en las crías de ratón RhoE gt/gt comparándolas con sus hermanos de camada WT y Heterocigotos. Se registraron las longitudes del cuerpo y de las extremidades traseras, así como el peso de cada ratón utilizando una balanza de precisión (con un error de ± 0.1 g). Esto permitió generar una curva de crecimiento ponderal y somatométrico de los ratones RhoE +/+, RhoE +/gt y RhoE gt/gt.

También se anotaba el día en el cual los ratones superaban los diferentes hitos del desarrollo, procesos muy marcados que nos indican el correcto desarrollo morfológico del ratón. Se observaban los siguientes hitos:

- *Pinna*: día en que las orejas del ratón se separaban totalmente del cráneo.
- *Ear* (apertura del conducto auditivo): se anotaba el día en el cual se producía la apertura total del conducto auditivo.
- *Pelo*: se anotaba el día en el cual se producía la salida del pelo del ratón.
- *Ojos* (apertura de los ojos): día en el cual se producía la apertura de los párpados.

4.4.2 Desaparición de los reflejos arcaicos.

- *Rooting (reflejo de raíz)*: se estimulaba bilateralmente la cabeza del animal desde la punta del hocico hasta la raíz de la oreja. La respuesta se consideró positiva cuando el ratón se estiraba hacia delante y adoptaba una posición denominada "raíz".
- *Crossed extensor (Reflejo extensor cruzado)*: se estimulaba con una pequeña punción una de las dos extremidades inferiores. La respuesta se consideró positiva cuando el ratón flexionaba la extremidad estimulada, mientras que la opuesta se extendía.

4.4.3 Aparición de respuestas reflejas.

- *Placing anterior/posterior* (propiocepción en extremidades anteriores y posteriores) y *Grasp anterior/posterior* (reflejo prensil de las extremidades anteriores y posteriores): consistía en la estimulación del dorso de la pata con una barrita de madera, mientras el animal estaba suspendido sin ninguna extremidad en contacto con una superficie sólida. El reflejo se consideró positivo cuando el animal levantó la extremidad delantera o trasera situándola sobre la superficie de la barrita.

- *Orientación táctil*: se estimulaba suavemente uno de los dos lados del hocico del animal, en la zona perioral. El reflejo se consideró positivo cuando el ratón orientó la cabeza hacia el lado de contacto. También se realizaba el *Vibra placing* dentro de la orientación táctil, que consistía en tener el ratón colgado de la cola y estimularle las vibrisas con una barrita de madera y observar si notaba sensorialmente la presencia del objeto y si intentaba aferrarse a él.

4.4.4 Pruebas neurosesoriales.

Antes del destete es posible realizar diferentes pruebas que permiten determinar el desarrollo psicomotor general de los animales, su reactividad al entorno y las características de su actividad motora general. Las pruebas que realizamos son las siguientes:

- *Geotaxia negativa*: es un tipo de reflejo de respuestas motoras, en el que el animal ha de ser consciente de su propio cuerpo y de la orientación en el espacio. Representa la respuesta inicial para que posteriormente pueda escalar. El ratón se colocaba cabeza abajo sobre una rejilla con una inclinación de 45°. El reflejo se consideró positivo cuando el animal giró 180°, orientó la cabeza hacia arriba y empezaba a escalar, en un tiempo máximo de 35 segundos.

- *Homing test*: esta prueba se basa en una tendencia innata de las crías de ratón a volver al nido guiadas por estímulos olfativos. Esta prueba permite medir la maduración del sistema olfativo, límbico y motor mediante la inclusión de elementos motores y motivacionales. Esta prueba se realizó el día PD14, cuando se ha producido la apertura palpebral, así como el día PD21. En una jaula limpia se colocan dos terceras partes de viruta limpia y una tercera parte de la superficie con viruta procedente del lecho de los ratones, situando a los ratones individualmente en el extremo opuesto y mirando hacia la pared. Se registró la latencia de llegada a la zona que contenía la viruta del nido, con un tiempo límite permitido de 180 seg.

- *Blast response* (reflejo de sobresalto, estremecimiento al soplar al hocico): se soplabla hacia el hocico del ratón desde una distancia de 10 cm. La respuesta se consideraba positiva cuando el animal se estremecía.

- *Reflejo de Preyer*: desde una distancia de 30 cm se aplicaba un estímulo acústico. La respuesta se consideró positiva cuando el animal reaccionó al ruido.

4.4.5 Pruebas de coordinación motora.

- *Pivoting test*: al igual que sucede en otras especies, el desarrollo neuromotor postnatal se produce con un gradiente cráneo-caudal, de forma que la adquisición de competencias motoras de los ratones durante los primeros días de vida postnatal se inicia a nivel de las extremidades anteriores, y de forma progresiva se adquiere la motricidad de las extremidades posteriores. Esto hace que durante los primeros días de vida los ratones se desplacen con la ayuda de las extremidades anteriores y presenten un patrón locomotor inmaduro denominado de pivote, que aporta información acerca de la actividad del animal. La medida del número de *pivotings* por minuto se realizó en siete días del desarrollo (PD3, PD4, PD5, PD6, PD7, PD10 y PD14). Para la cuantificación de éstas se delineó un eje en cruz sobre un soporte de papel. El registro del número de *pivotings* (considerados giros de 90°) se realizó durante 60 seg.

- *Desarrollo del patrón de la marcha*: en el desarrollo de conductas motoras complejas como la marcha, además del sistema nervioso participa el sistema músculo-esquelético. A nivel conductual, esto se ve reflejado con la adquisición progresiva de la movilidad y de la capacidad de tracción que se inicia en las extremidades anteriores y sigue con las extremidades posteriores. Así, la capacidad de iniciar la marcha de forma rectilínea (utilizando las cuatro extremidades) es indicativa de la maduración progresiva del sistema nervioso. La prueba consiste en registrar la latencia de inicio de la marcha tras colocar al ratón sobre una superficie plana y lisa. Se considera inicio de la marcha cuando el ratón se desplaza de forma lineal (sin pivotar) una distancia superior a la longitud de su propio cuerpo. Esta prueba se realiza los días PD3, PD4, PD5, PD6 y PD10 observando, en ratones normales, una reducción de la latencia de inicio de la marcha que es indicativa de un proceso de maduración correcto.

- *Wire suspension test*: Para valorar la adquisición de la motricidad, de la coordinación motora y de la maduración neuromuscular, se realizó la prueba de suspensión a día PD12, PD13, PD14 y PD15. Los ratones se suspendían en una barra de madera (4 mm) por las extremidades anteriores y se medía la latencia de caída. El tiempo máximo permitido de duración de la prueba era de 60 seg.

- *Reach*: Prueba motora consistente en colgar al ratón de la cola y acercarlo hacia el suelo para observar cuándo intenta alcanzarlo. Se anotó el día en el que intentaba alcanzar el suelo.

- *Test de Suspensión Vertical*: Capacidad del ratón de sujetarse a una rejilla que se encuentra en un ángulo de 90°. Se registraba el día que conseguía mantenerse aferrado a la rejilla.

- *Test de Escalada*: La cría se colocaba sobre una rejilla que se inclinaba hasta alcanzar una posición vertical, empezando por una inclinación de 45°. Se anotaba el día que conseguían ascender por la rejilla.

- *Test de Volteo (righting reflex)*: Se situaba al ratón con la espalda pegada al suelo y se registraba el primer día en el cual el ratón conseguía darse la vuelta de forma completa, en un tiempo máximo de 30 segundos.

4.5 Ensayos de inducción de convulsiones.

4.5.1 Sensibilidad al Pentilentetrazol.

El Pentilentetrazol es un fármaco estimulador del sistema nervioso central que se utiliza principalmente en estudios experimentales para inducir ataques epilépticos. Su mecanismo de acción es a través de la inhibición del sistema Gabaérgico, ya que es un inhibidor no competitivo del receptor del Ácido Gama Aminobutírico (GABA). El estudio se realizó en una población de 16 ratones adultos de los cuales 6 ratones eran RhoE +/+ y 10 RhoE +/-gt. El ensayo se hacía en ciego, es decir, el investigador que valoraba el experimento desconocía el genotipo de los ratones tratados. Se inyectaba una dosis de Pentilentetrazol de 60 mg/Kg intraperitonealmente después de haber pesado a cada animal. Tras la inyección se introducían en una circunferencia translúcida de metacrilato, para poder observar las convulsiones que sufría cada ratón durante los primeros 10 min tras la inyección.

4.5.2 Sensibilidad a la Nicotina.

La Nicotina es capaz de unirse a los receptores de la Acetil Colina de tipo Nicotínico y por lo tanto mantener los canales iónicos abiertos e inducir de esta forma las convulsiones. Es uno de los fármacos más utilizados en la inducción de convulsiones en ensayos farmacológicos.

El estudio se realizó en una población de 28 ratones adultos de los cuales 10 eran RhoE +/+ y 18 RhoE +/-gt. Los ensayos se realizaron en ciego. A los ratones se les inyectaba subcutáneamente, tras su pesado, una dosis de Nicotina de 40 mg/kg. Posteriormente se les introducía en una circunferencia translúcida para poder observar su comportamiento durante los primeros 10 min tras la inoculación del fármaco.

4.5.3 Sensibilidad al Kainato.

La inyección de Kainato intraperitoneal en un ratón es uno de los modelos más comunes *in vivo*, utilizados en la inducción de epilepsia del lóbulo temporal. El Kainato es un fármaco que actúa excitando los receptores de Kainato, que es uno de los componentes del sistema sináptico de señalización por glutamato en el sistema nervioso central. Se calcula que en el SNC el 90% de las sinapsis excitadoras utilizan el ácido glutámico como agente neurotransmisor.

El ensayo se realizó en una población de 20 ratones adultos de los cuales 10 ratones eran RhoE +/+ y los otros 10 eran RhoE +/-gt. El ensayo, como los anteriores, se hizo en ciego. Se les inyectó a los ratones, tras pesarlos, una dosis de Kainato de 30 mg/kg intraperitonealmente y se analizó su comportamiento durante las tres primeras horas tras la inoculación del fármaco ya que los efectos del Kainato son más lentos en aparecer.

4.6 Técnicas histológicas.

4.6.1 Obtención de muestras para criostato.

Crías de ratón a día PD21 se sacrificaban con CO₂ y se extraía el cerebro y la médula espinal con cuidado y el tejido se fijaba a 4°C usando paraformaldehído (PFA) 4%, durante 24 h. El tejido fijado se sumergía en una solución de sacarosa al 30% en PBS 0.1M a 4°C hasta que éste dejaba de flotar en la solución (entre 24/48 h) para su crioprotección. Una vez crioprotegido, el tejido se orientaba y congelaba a -80°C en bloques de un criopreservante, el OCT (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound), hasta su utilización. Se obtenían secciones coronales de 16 µm de grosor en criostato (Leica CM3050S). Todas las secciones se almacenaban a -20°C hasta la utilización de las mismas.

4.6.2 Obtención de muestras para microtomo.

Tras la fijación en paraformaldehído (PFA) frió al 4% en PBS 0,1M, se lavaba el tejido mediante EtOH 70%, almacenándolo finalmente en esta solución. Posteriormente, el tejido se deshidratava sumergiéndolo secuencialmente en soluciones con concentraciones crecientes de EtOH. Tras su deshidratación el tejido se sumergía en parafina fundida a 60-62°C, y tras lavar con parafina limpia, se dejaba en parafina O/N. Para el estudio histológico se obtenían secciones seriadas de 9 µm de grosor en un micrótopo de rotación manual (Microm HM310, Leica) que se iban depositando en orden en una caja y posteriormente se recogían y montaban

seriándolas sobre portaobjetos tratados con albúmina al 2.5%. Finalmente se dejaban secar y almacenaban a TA hasta su utilización.

4.6.3 Tinción de los tejidos para su posterior estudio morfológico.

Para estudiar la morfología cerebral de los ratones RhoE gt/gt se ha utilizado la tinción de violeta de cresilo (0.1% en H₂O_{bd}). El violeta de cresilo es un colorante acidófilo que tiñe específicamente el núcleo celular y el retículo endoplásmico rugoso. Las secciones se desparafinaban con calor y un disolvente (xilol), y posteriormente se rehidrataban sumergiéndolas en soluciones decrecientes de EtOH. Los cortes se lavaban con agua destilada (H₂O_d) y se teñían sumergiéndolos en la solución de violeta de cresilo durante 5 min; para retirar el exceso de tinción, las preparaciones eran lavadas en H₂O_d y se deshidrataban sumergiéndolas esta vez en concentraciones crecientes de EtOH. Los portaobjetos se montaban con medio de montaje DPX (Fluka) y se dejaban secar a TA. La visualización de las muestras se realizó en un microscopio Olympus (BX40) y las imágenes se adquirían con una cámara digital (Nikon D5-Fi1) acoplada al microscopio y fueron tratadas utilizando el *software* NIS-Elements BR (Nikon).

4.7 Técnicas inmunohistoquímicas: Estudio de la expresión de RhoE en motoneuronas.

La inmunohistoquímica se realizaba en cortes finos de criostato (16 μm) y montados sobre portaobjetos. Primeramente, se realizaban 3 lavados con PBS y se incubaban las secciones durante 20 min en PBS- 0.075% Tritón (PBST). Como para la detección con el anticuerpo de RhoE se precisaba desenmascarar el antígeno, se realizaban diferentes lavados con H₂O_d, se incubaban los cortes en citrato sódico 0.1M pH=6 (en un microondas a 700W; 4 veces 3 min cada una), y finalmente, se lavaban las secciones con H₂O_d. Después de tres lavados con PBS 0.1M (10 min cada uno), los cortes fueron bloqueados con el preparado PBS 0.1M, gelatina al 0,2%, tritón (0.4%) y lisina (1M) durante 1 h a TA para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario, y se procedía a incubar durante toda la noche con el anticuerpo de RhoE (anti-RhoE, Upstate; 05-723) a una concentración de 1/500 en BSA 3%, a TA en una cámara húmeda y protegida de la luz. Al día siguiente, después de lavar las secciones tres veces en PBST, en agitación suave durante 10 min, se procedió a la inmunodetección con el anticuerpo secundario fluorescente (Anti-Mouse FITC conjugate, Sigma; F8771) incubando las secciones durante 60 min. Seguidamente se realizaron de nuevo 3 lavados de 10 min con PBST. Se montaron con cubreobjetos utilizando la solución acuosa "Vectashield Mounting medium with DAPI" (Vector

Laboratories) y se almacenaron a 4°C protegidos de la luz. Las imágenes fueron captadas con un microscopio confocal (Leica TCS SPE) y una cámara digital acoplada al microscopio. El procesamiento de las imágenes se realizaba con el software ImageJ (National Institutes of Health –NIH-).

4.8 Contaje de motoneuronas en la médula espinal de los ratones.

Se utilizó la tinción de violeta de cresilo (0.1% en H₂O) para evaluar el número de motoneuronas que tienen los ratones en la médula espinal. Para ello las médulas espinales se seccionaron en tres partes, cervical, torácica y lumbar, incluyéndolas en sus cubos de OCT por separado. Los cortes de los cubos se hicieron seriados, en secciones coronales de 16 µm de grosor en criostato (Leica CM3050S). Las motoneuronas morfológicamente son fáciles de distinguir porque se caracterizan por ser grandes y con un núcleo bien definido. Se contaba uno de cada cuatro cortes para no contar la misma motoneurona dos veces. Se contaron por sección 40 cortes. El contaje se hacía con un microscopio Olympus (BX40), en campo claro y con ayuda de una cámara digital. Se contaron las motoneuronas de 9 ratones, 4 RhoE +/+ y 5 RhoE gt/gt.

4.9 Técnicas de estudio de la osificación del ratón.

4.9.1 Radiografía.

Las radiografías fueron tomadas por el Dr. Fernando Liste en el servicio de diagnóstico por imagen del hospital clínico veterinario de la Universidad Cardenal Herrera CEU.

4.9.2 Tinción de los huesos y los cartílagos.

Para observar diferencias en la osificación en los embriones los utilizamos de 17.5 días, contando el día postcoito como día 0.5 y comprobando la presencia de tapón vaginal (proteínas coagulantes presentes en el semen del macho) indicador de la cópula. A los 17.5 días se sacrificaba a las hembras gestantes por dislocación cervical, se extraían los úteros y se recolectaban los embriones con ayuda de material quirúrgico previamente esterilizado. Se ponían los úteros en una placa Petri con PBS, posteriormente se extraía cada uno de los embriones y se pasaban a placas individuales donde se les cortaba la cola para su genotipado por PCR. El resto del embrión se sumergía en etanol 90% durante una semana. Tras la fijación del embrión antes de empezar la tinción se separa la piel y se extraen las vísceras. Después se sumerge el embrión en 20 ml de solución de Alcian Blue (0.1mg/ml alcian blue, disuelto en una solución 80% EtOH y 1% de ácido glaciario) durante 3 días. Los

siguientes pasos son para hidratar el embrión, pasando por diferentes graduaciones de etanol (70%, 40%, 15%) durante dos horas en cada uno y en el último paso de hidratación ya se sumerge en agua. Cuando el embrión está rehidratado se sumerge en una solución de 1% de KOH en H₂O durante dos días, para dejar limpios los huesos del embrión. Pasado este punto se procede a teñir los huesos del embrión sumergiéndolo en la solución de Alizarin Red (0.001mg/ml, en una solución de KOH 1%) durante dos días. Para retirar el exceso de colorante de tinción, se lava el embrión 3 veces con la solución de KOH 1%. Los últimos pasos son para conservar los huesos teñidos. Para ello se pasan por concentraciones crecientes de Glicerol (20%, 50%, 80% y 100%) pasando por lo menos 24 horas en cada solución. Las imágenes se tomaron con una lupa acoplada a una cámara digital (Nikon D5-Fi1).

4.10 Extracción de células MEF.

La obtención de fibroblastos embrionarios (*Mouse Embryonic Fibroblasts*, MEFs) se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente (Perez-Roger *et al.* 1999), a partir de embriones de 13.5 días. Las hembras gestantes se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajeron los úteros y se recolectaron los embriones con ayuda de material quirúrgico previamente esterilizado. Cada embrión se pasó a una placa Petri con PBS y se trató de forma aislada. Se les quitaba la cabeza y el hígado, para no tener contaminación de astrocitos y hepatocitos y también se les cortaba la cola para su genotipado por PCR. El resto del embrión se pasaba a otra placa limpia y se procedía a la trituración del tejido con ayuda de un bisturí. Para conseguir la disgregación total del tejido se añadía 0.5-1ml de Tripsina-EDTA según el tamaño del embrión y se introducía en el incubador a 37°C durante 20 min. Se recogía el tejido disgregado con 5 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de FBS, con ayuda de una pipeta de 5 ml removiendo bien la mezcla para intentar separar más el tejido y se pasaba a un tubo Falcon de 15 ml con 5-10 µl de DNasa (RQ1 DNase, 1u/µl, Promega). Finalmente, el tejido disgregado procedente de cada embrión se sembró en una placa de 10 cm, en un volumen final de 10 ml de DMEM + 10% FBS. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ durante 2 días.

4.11 Análisis de proteínas mediante la técnica de Western-blot.

Para realizar la extracción de proteínas, las células o las muestras de tejido 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 x *g*, 10 min) en una centrifuga 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" (Vahdati-Ben Arieh *et al.* 2003). Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE en geles del 12,5% 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.

La transferencia se hizo a una membrana de PVDF (Immobilon™-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 el anticuerpo primario, 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 anticuerpo secundario y se volvieron a lavar 3 veces con PBT durante 30 min. En la **Tabla 3** se describen los anticuerpos empleados en este trabajo.

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).

Anticuerpos primarios	Casa comercial	Referencia	Concentración	Descripción
<i>anti RhoE</i>	Upstate	05-723	0.5 µg/ml	monoclonal de ratón
<i>anti p-ERK,</i>	Upstate	sc-7383	0.4 µg/ml	monoclonal de ratón
<i>anti ERK-1 C-16,</i>	Upstate	sc-93	0.4 µg/ml	policlonal de conejo
<i>anti CREB-1 C-21,</i>	SantaCruz	sc-186	1 µg/ml	monoclonal de ratón
<i>anti p-CREB-1 Ser 133,</i>	SantaCruz	sc-7978	2 µg/ml	policlonal de conejo
<i>anti NMDAR2B</i>	Upstate	AB1557P	1:500	policlonal de conejo

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

Tabla 3: Lista de anticuerpos empleados en la realización de este trabajo.

4.12 Análisis estadístico de datos.

Dado que no se detectaron diferencias significativas entre ratones machos y hembras de cada genotipo, los resultados fueron combinados. Para determinar diferencias estadísticas en los resultados, los datos se sometieron a un análisis de la varianza de una sola vía (ANOVA), con un post test de Bonferroni. Todos los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico GraphPad Prism (5.0).

RESULTADOS

5 Resultados.

5.1 Fibroblastos embrionarios de ratones RhoE *gt/gt* no expresan la proteína.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio habían sugerido un posible papel de RhoE como oncosupresor, ya que la sobreexpresión de esta proteína reduce la capacidad proliferativa e induce apoptosis en células tumorales U87, A375 y T84 (Poch *et al.* 2007). Puesto que estos resultados apuntaban hacia un nuevo papel de RhoE como regulador de la proliferación y supervivencia celular, decidimos analizar el papel de esta proteína *in vivo*, en un modelo de ratón *gene-trap* en el locus de *RhoE* y adquirido en la empresa Lexicon Pharmaceuticals.

Para la identificación del genotipo de cada individuo se siguió la estrategia de amplificación por PCR, tal y como se describe en Material y Métodos. La **Figura 4** muestra un ejemplo del resultado obtenido, en el que la banda de 600 bp corresponde al alelo silvestre (WT) y la de 400 bp al alelo *gene-trap* (*gt*), utilizando los *primers* RhoE *gt* Dir, Rev3 y LTR2-2 descritos en Material y Métodos.

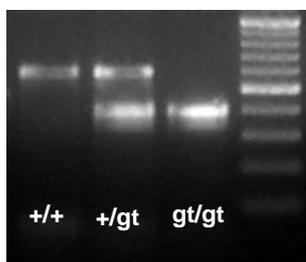


Figura 4: Caracterización del genotipo de los ratones mediante PCR. El protocolo de genotipado y la secuencia de los cebadores utilizados para la reacción de PCR están descritos en Material y Métodos. Los ratones con el alelo silvestre (+/+) presentan una única banda de 600 bp, mientras que en los ratones homocigotos para la inserción de *gene-trap* en el locus RhoE (*gt/gt*) la banda es de 400 bp. Los Heterocigotos (+/gt) muestran las bandas correspondientes a los dos alelos.

Para comprobar que la estrategia de *gene-trap* resulta en la ausencia de expresión de RhoE, analizamos la expresión de la proteína en fibroblastos obtenidos de embriones de 13.5 días (células MEFs) y de los tres posibles genotipos. En la **Figura 5** se muestra el resultado del análisis de la expresión de RhoE mediante Western-blot (ver Material y Métodos): las células obtenidas de embriones RhoE *gt/gt* carecen de expresión de RhoE, ya que tienen los dos alelos mutados, mientras que las células procedentes de ratones Heterocigotos (*+/gt*) tienen una expresión reducida con respecto a la de los ratones silvestres (*+/+*). Este resultado confirma que en nuestro modelo de animales no hay expresión de RhoE.

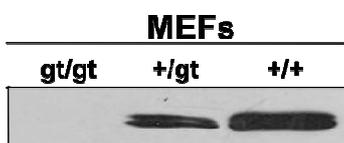


Figura 5: Las células MEF procedentes de ratones con inserción del retrovirus de *gene-trap* en el locus de RhoE no expresan la proteína. La obtención y cultivo de células MEFs y el análisis de la expresión de RhoE por Western-blot utilizando anticuerpos específicos se describen en Material y Métodos. La expresión de RhoE es inexistente en células MEF extraídas de embriones *gt/gt* genotipados previamente, mientras que en las células extraídas de embriones Heterocigotos (*+/gt*) la expresión de RhoE es menor que en las obtenidas de embriones WT (*+/+*) debido a la inserción del retrovirus de *gene-trap* en uno de sus alelos.

5.2 Los ratones deficientes en la expresión de RhoE muestran una reducida supervivencia.

Uno de los efectos más llamativos de la ausencia de expresión de RhoE es la elevada mortalidad observada en los ratones RhoE *gt/gt*, hasta el extremo de que ningún ratón sobrevive más de 21 días. Contabilizando la supervivencia de los ratones en la colonia, observamos que los ratones RhoE *gt/gt* no superan la edad de tres semanas, con una tasa de muerte de más del 50 % en los primeros 5 días de vida, mientras que los ratones RhoE *+/gt* no presentan alteraciones en la supervivencia después del nacimiento (**Figura 6**).

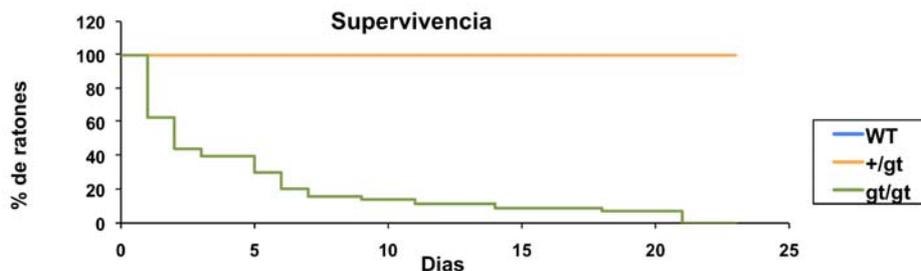


Figura 6: La ausencia de RhoE provoca letalidad en las primeras tres semanas de vida. La gráfica muestra el porcentaje de ratones de los diferentes genotipos que se mantienen vivos durante los primeros 25 días siguientes al nacimiento. En esta gráfica se han contabilizado 176 ratones RhoE +/+, 186 ratones RhoE +/gt y 43 ratones RhoE gt/gt.

Tras esta observación, decidimos analizar si la ausencia de RhoE también produce muerte durante el desarrollo embrionario. Al contabilizar el número de ratones que nace de cada uno de los tres genotipos encontramos que no siguen una distribución mendeliana y que el número de ratones RhoE gt/gt en el momento del nacimiento es menor de lo esperado, indicando que la ausencia de la expresión de RhoE tiene como consecuencia una disminuida supervivencia también en el periodo embrionario (**Tabla 4**). Dado que el porcentaje de ratones RhoE +/gt no aumenta con respecto a lo esperado (48 %), cabría pensar que también una reducción de la expresión de RhoE causa cierto grado de mortalidad embrionaria pero no en el periodo postnatal.

FRECUENCIAS GÉNICAS DE LA COLONIA A P0		
		%
+/+	118	39%
+/gt	143	48%
gt/gt	40	13%
Total	301	

Tabla 4: La ausencia de RhoE provoca mortalidad durante el desarrollo embrionario. Porcentaje de ratones de cada genotipo nacidos en la colonia durante 1 año. El número total de ratones contabilizados en la gráfica es 301 (118 RhoE +/+, 143 RhoE +/gt y 40 RhoE gt/gt).

5.3 Los ratones RhoE gt/gt presentan un menor tamaño y problemas de movilidad en las extremidades posteriores.

Desde el momento del nacimiento se aprecian diferencias fenotípicas entre los ratones RhoE +/+ y los ratones RhoE gt/gt: los ratones que no expresan RhoE son más pequeños que sus hermanos de camada y esta diferencia se mantiene o es más aparente a lo largo del desarrollo postnatal (**Figura 7**). Además, presentan una postura diferente en las extremidades posteriores, que tienen estiradas y no parece que puedan flexionar (**Figura 7**). Como consecuencia, los ratones deficientes en la expresión de RhoE presentan alteraciones en la marcha (ver el **Video 1**). Cuando se suspenden los ratones por la cola normalmente se produce un reflejo que produce la extensión de las extremidades, mientras que en ratones con enfermedades relacionadas con las motoneuronas se produce una retracción (Jaworski *et al.* 2006). Como se aprecia en la **Figura 7**, los ratones RhoE gt/gt encogen las extremidades al ser suspendidos por la cola, lo que indica que la ausencia de la expresión de RhoE puede estar causando algún tipo de problema relacionado con motoneuronas. Esta hipótesis se aborda más adelante en este trabajo.

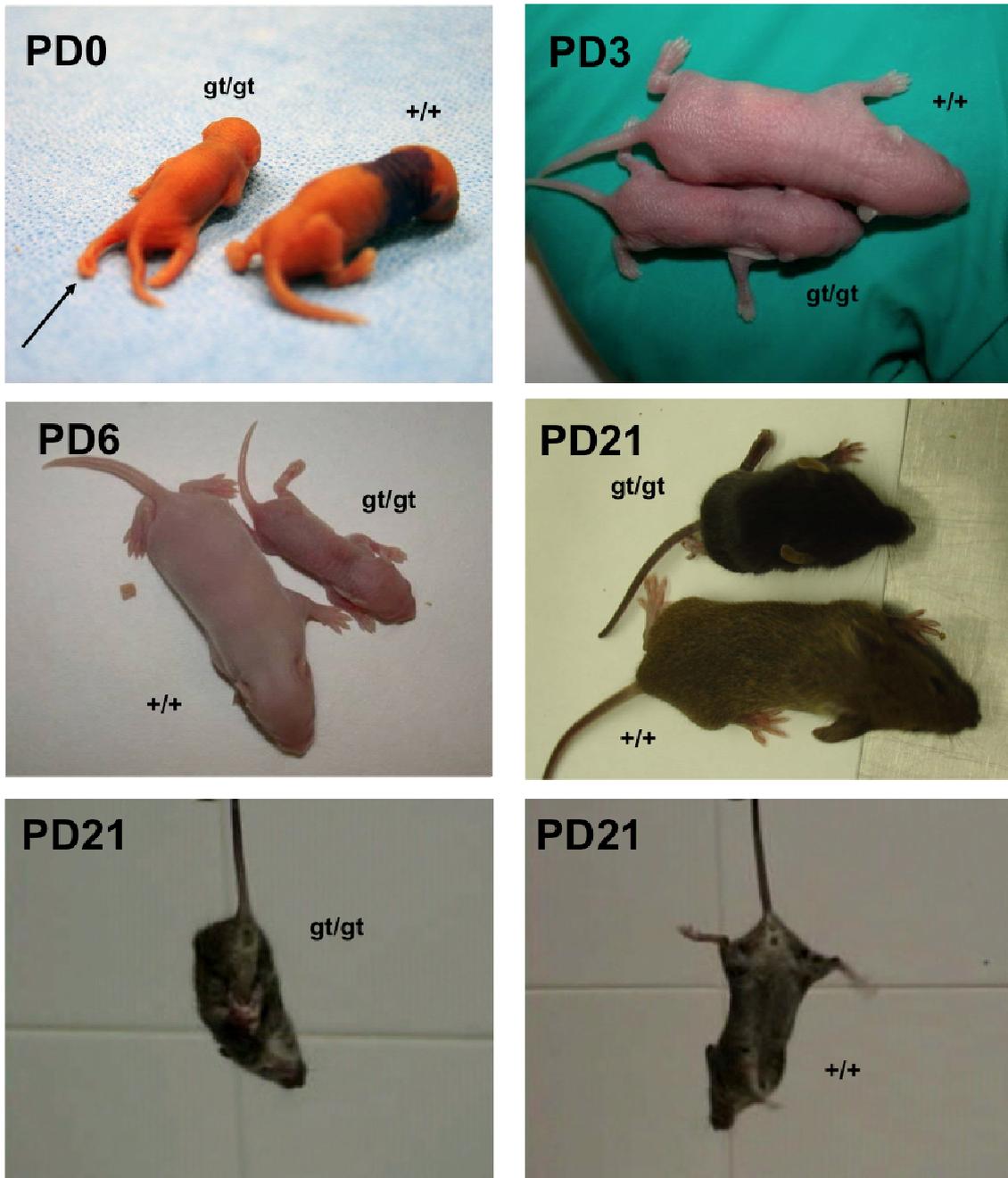


Figura 7: Diferencias fenotípicas entre los ratones RhoE +/+ y RhoE gt/gt. Se muestran fotografías representativas de hermanos de camada con fenotipo silvestre (+/+) y gt/gt a día 0, 3, 6 y 21 postnatal (PD). Los ratones RhoE gt/gt son más pequeños y presentan una postura anómala de las extremidades posteriores. Cuando se les cuelga de la cola adoptan una postura anómala, con las extremidades contraídas, que nos indica que el ratón tiene problemas neuromusculares.

Para evaluar de manera más precisa la diferencia de tamaño, procedimos al pesado de los ratones, desde el día de nacimiento hasta el día 21. Nuestros resultados muestran que los ratones RhoE gt/gt pesan menos que sus hermanos de camada (**Figura 8**). Las diferencias son estadísticamente significativas desde el momento del nacimiento ($p < 0.01$) y se van incrementando a partir del día 4 a lo largo de todo el desarrollo ($p < 0.001$). Sin embargo, no se aprecian diferencias significativas entre los ratones RhoE +/- y los ratones RhoE +/-gt.

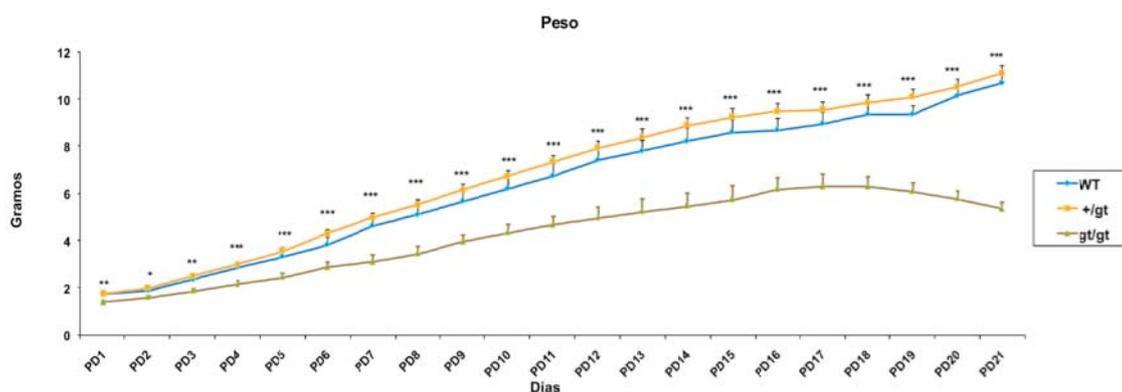


Figura 8: Los ratones RhoE gt/gt pesan significativamente menos que sus hermanos de camada. Se registraron los pesos todos los días desde el nacimiento (PD1) hasta el día 21 (PD21). Los datos se expresan como media + EEM. Mientras que no se aprecian diferencias entre los ratones RhoE +/- (WT) y RhoE +/-gt, los ratones RhoE gt/gt son significativamente más pequeños a lo largo del desarrollo postnatal. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Además de pesar a los ratones, se midieron cada día desde la base de la cola hasta la punta del hocico. Nuestros resultados muestran que los ratones RhoE gt/gt son más pequeños que sus hermanos de camada (**Figura 9**). Estas diferencias son estadísticamente significativas desde el momento del nacimiento ($p < 0.01$) y son más notables a partir del día 5 y a lo largo del resto del desarrollo ($p < 0.001$). Sin embargo, no se aprecian diferencias significativas entre los ratones RhoE +/- y los ratones RhoE +/-gt.

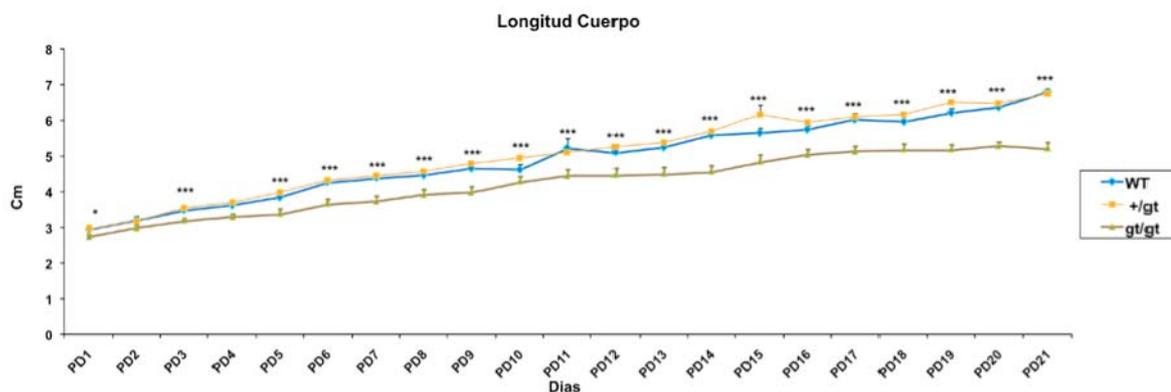


Figura 9: Los ratones RhoE gt/gt son significativamente más pequeños que sus hermanos de camada. Se midió la longitud del cuerpo desde la base de la cola hasta el hocico todos los días desde el nacimiento (PD1) hasta el día 21 (PD21). Los datos se expresan como media + EEM. Mientras que no se aprecian diferencias entre los ratones RhoE +/+ y RhoE +/+, los ratones RhoE gt/gt son significativamente más pequeños a lo largo del desarrollo postnatal. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$.

Para evaluar si los ratones RhoE gt/gt eran morfológicamente proporcionados, procedimos a la medición de las extremidades posteriores desde el día de su nacimiento al día 21, midiendo la longitud desde la rodilla hasta la punta de los dedos. Estos valores los dividimos entre la longitud del cuerpo de cada ratón. Nuestros resultados muestran que los ratones RhoE gt/gt tienen las extremidades más cortas que sus hermanos de camada. Sin embargo, mantienen una relación proporcionada con respecto a su cuerpo, ya que el análisis ANOVA indica que no hay diferencias significativas con respecto a los ratones RhoE +/+ o RhoE +/gt (**Figura 10**).

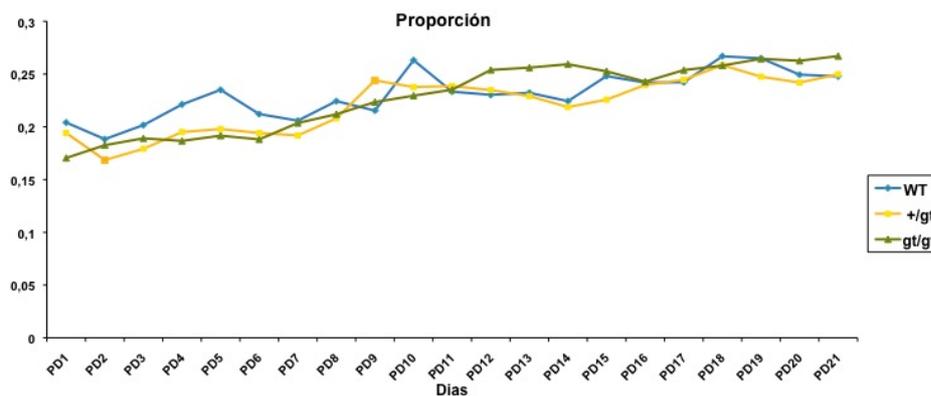


Figura 10: Los ratones RhoE *gt/gt* guardan una proporción morfológica entre la longitud de su cuerpo y la longitud de sus extremidades posteriores. Se midió la longitud de sus extremidades posteriores desde la rodilla hasta la punta de los dedos, desde el día del nacimiento (PD1) hasta el día 21 (PD21). Posteriormente se dividieron estos datos por la longitud de su cuerpo para mostrar la proporcionalidad del ratón. Los datos se expresan como media + EEM y no muestran diferencias significativas entre los distintos genotipos.

5.4 Los ratones RhoE *gt/gt* sufren un retraso generalizado en el desarrollo.

En el proceso de desarrollo se dan una serie de acontecimientos importantes conocidos como “hitos del desarrollo” que se producen en un corto periodo de tiempo (Dierssen *et al.* 2002, Fox, 1965). Estos procesos incluyen la aparición del pelo, la apertura de los ojos, la separación de las orejas del cráneo y la apertura del conducto auditivo. El retraso en alguno de estos procesos indica problemas en el desarrollo del ratón. Para evaluar si existe este retraso en el desarrollo se procedió a registrar el día en el cual se completaban cada uno de los hitos del desarrollo, comparando ratones de los tres genotipos. Nuestros resultados (**Figura 11**) muestran que los ratones RhoE *gt/gt* cumplen significativamente más tarde la apertura del conducto auditivo (Ear) y la apertura de los ojos (Ojos), mientras que no existen diferencias significativas en la separación de las orejas del cráneo (Pinna) y en la salida del pelo (Pelo). No se aprecian diferencias significativas entre los ratones RhoE *+/+* y los ratones RhoE *+/gt* en ninguno de los procesos.

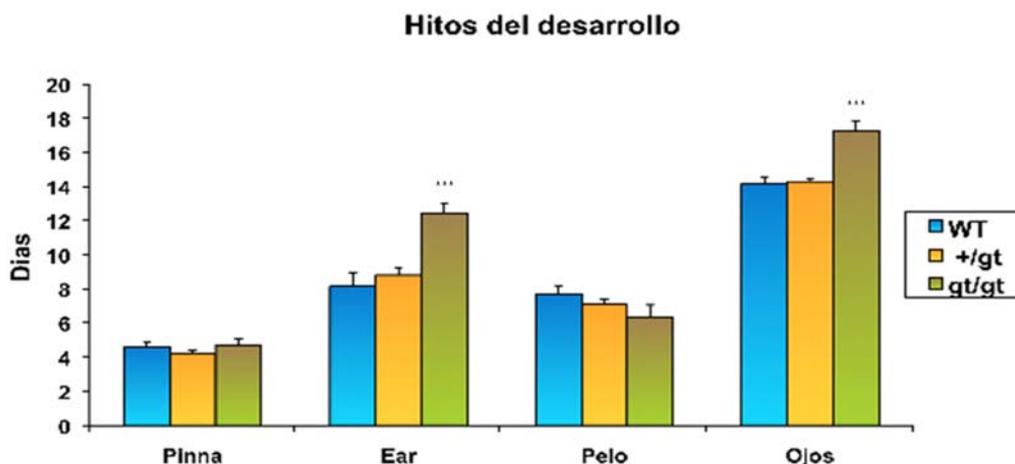


Figura 11: Los ratones RhoE *gt/gt* muestran un retraso en el cumplimiento de los hitos del desarrollo. Se registró el día en el cual cumplían cada uno de los hitos del desarrollo. Los datos se expresan como media + EEM. Mientras que no se aprecian diferencias entre los ratones RhoE *+/+* (WT) y RhoE *+/gt*, los ratones RhoE *gt/gt* muestran un retraso estadísticamente significativo en la apertura del conducto auditivo (Ear) y en la apertura de los ojos (Ojos), pero no en la separación de las orejas del cráneo (Pinna) y en la aparición del pelo (Pelo). *** $p < 0.001$.

Otro de los procesos incluidos en el desarrollo es la desaparición de los reflejos arcaicos. Estos reflejos se tienen desde el nacimiento y se pierden a lo largo de los primeros 21 días, de manera que la comparación del momento en el cual desaparezcan estos reflejos entre los ratones de los distintos genotipos nos puede indicar un retraso en el desarrollo de los ratones. Para su evaluación anotamos el día de desaparición de estos reflejos. Nuestros resultados muestran que ratones RhoE *gt/gt* pierden los reflejos arcaicos más tarde que sus hermanos de camada (**Figura 12**). La diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en la pérdida del *Rooting* (reflejo de raíz), comparable al reflejo de Moro en los humanos, mientras que en la pérdida del *Crossed extensor* (reflejo extensor cruzado), equiparable al reflejo de Babinski en los humanos, no es estadísticamente significativa pero muestra una tendencia clara a perder el reflejo más tarde.

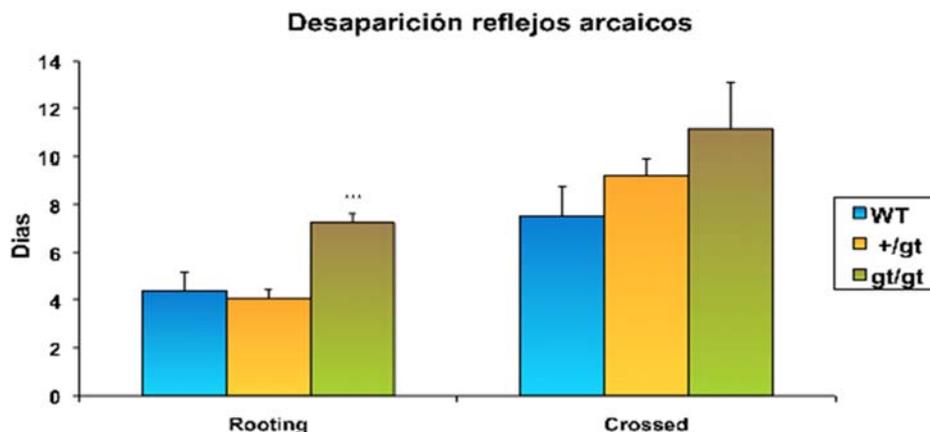


Figura 12: Los ratones RhoE *gt/gt* tienen un retraso en la pérdida de los reflejos arcaicos. Se anotó el día en el cual los ratones perdían los reflejos arcaicos. Los datos se expresan como media + EEM. Mientras que no se aprecian diferencias entre los ratones RhoE *+/+* (WT) y RhoE *+/gt*, los ratones RhoE *gt/gt* muestran un retraso estadísticamente significativo en la pérdida del *Rooting* y una tendencia clara pero no significativa a perder también más tarde el *Crossed Extensor*. *** $p < 0.001$.

Del mismo modo que la desaparición de ciertos reflejos son utilizados para evaluar un retraso en el desarrollo, también son utilizados la aparición de ciertos reflejos adultos. Para su evaluación anotamos el día en que realizaban estas pruebas reflejas por primera vez. Nuestros resultados revelan que los ratones RhoE *gt/gt* muestran un retraso estadísticamente significativo en la aparición de las respuestas reflejas sensoriales en que participan las extremidades posteriores, como el *Grasp posterior* ($p < 0.01$) y el *Placing Posterior* ($p < 0.001$), mientras que en la aparición de las otras respuestas reflejas sensoriales en que no están implicadas las extremidades posteriores no se aprecian diferencias significativas entre los diferentes genotipos (Figura 13).

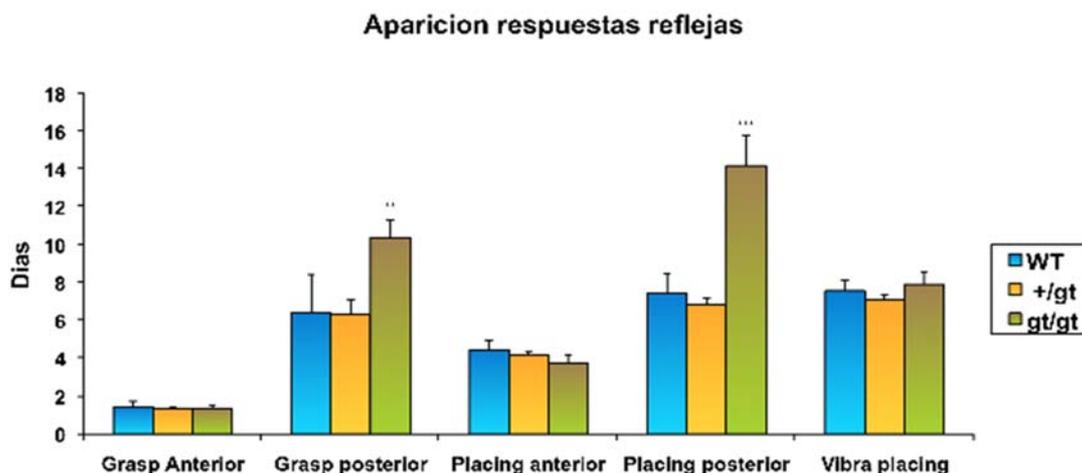


Figura 13: Los ratones RhoE gt/gt muestran un retraso en la aparición de las respuestas reflejas sensoriales en que están implicadas las extremidades posteriores. Se anotó el día en el cual los ratones adquirirían la respuesta refleja. Los datos se expresan como media + EEM. Mientras que no se aprecian diferencias entre los ratones RhoE +/+ (WT) y RhoE +/gt, los ratones RhoE gt/gt muestran un retraso estadísticamente significativo en la aparición de las respuestas reflejas en que están implicadas las extremidades posteriores. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

5.5 Los ratones RhoE gt/gt padecen defectos en las capacidades neurosensoriales.

Una de las capacidades neurosensoriales que se evaluó fue la Geotaxia negativa, que consiste en la capacidad del ratón en reconocer su posición. Para ello se sitúa al ratón en una superficie con un ángulo de 45° con la cabeza hacia abajo y se anota el tiempo que tarda el ratón en darse la vuelta, durante sus primeros 15 días de vida (**Video 2**). Para la adquisición de esta capacidad se precisa del correcto desarrollo del sistema neuromotor, del sistema vestibular y del sistema propioceptivo. Los resultados obtenidos muestran que los ratones RhoE gt/gt adquieren más tarde esta capacidad comparando con sus hermanos de camada; es más, algunos individuos no completan la prueba durante el tiempo de análisis en ninguno de los días evaluados (**Figura 14**). Las diferencias se aprecian a partir del día 6 cuando sus hermanos de camada comienzan a adquirir esta capacidad y se mantiene durante todo el estudio ya que a los ratones RhoE gt/gt les cuesta más tiempo reconocer la posición en la que se encuentran y darse la vuelta.

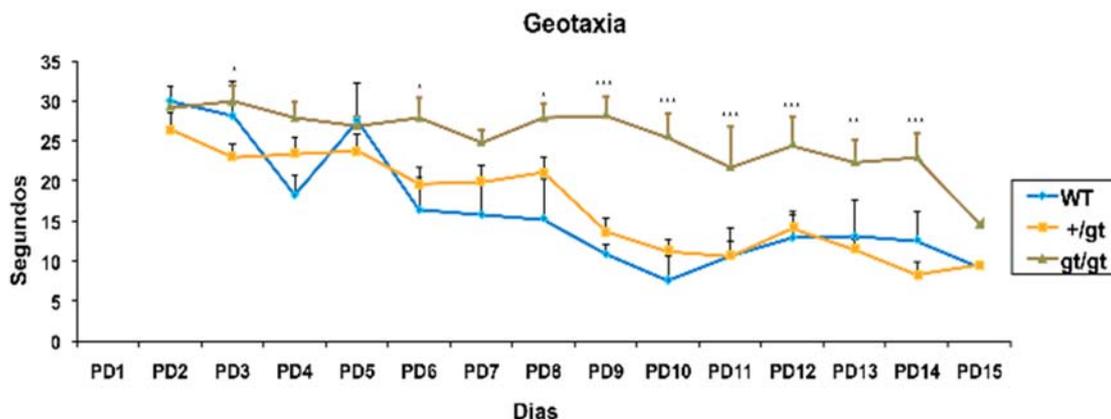


Figura 14: Los ratones RhoE *gt/gt* no adquieren la capacidad geotáctica negativa. Se anotó el tiempo que tardaban los ratones en completar la prueba de geotaxia. Los datos se expresan como media + EEM. Mientras que no se aprecian diferencias entre los ratones RhoE *+/+* (WT) y RhoE *+/gt*, los ratones RhoE *gt/gt* muestran un retraso estadísticamente significativo en la adquisición de esta capacidad. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Otra de las pruebas que se les realizó a los ratones para evaluar sus capacidades neurosensoriales fue el *Homing*, que consiste en situar a los ratones en lecho limpio y registrar el tiempo que tardan en encontrar el lecho de su propia jaula (Video 3). Nuestros resultados muestran que los ratones RhoE *gt/gt* no son capaces de reconocer el lecho *sucio* a PD14 y tardan mucho más en hacerlo a PD21 que sus hermanos de camada (Figura 15). Esto sugiere que los ratones RhoE *gt/gt* pueden tener defectos en el sentido del olfato.

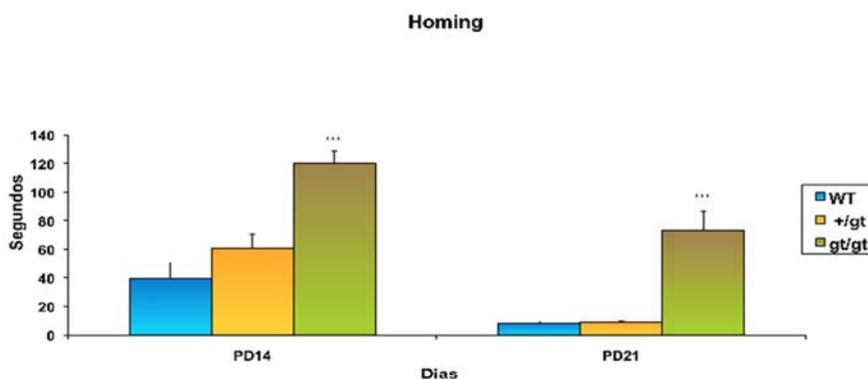


Figura 15: Los ratones RhoE *gt/gt* superan más lentamente la prueba del *homing*, reflejando un posible defecto en el sentido del olfato. Se registraba el tiempo que tardaban los ratones en encontrar el lecho *sucio*. Los datos se expresan como media + EEM. Mientras que no se aprecian diferencias entre los ratones RhoE *+/+* (WT) y RhoE *+/gt*, los ratones RhoE *gt/gt* muestran un retraso estadísticamente significativo en el tiempo que tardan en encontrar el lecho *sucio*. *** $p < 0.001$.

Otras pruebas para evaluar sus capacidades neurosensoriales fueron el test de *Preyer* y el *Blast*. En estas dos pruebas se registra el día en el cual tiene una reacción de alerta a un estímulo externo. En el test de *Preyer* la respuesta se produce como consecuencia de un estímulo auditivo, mientras que en el *Blast* el estímulo es táctil. Nuestros resultados muestran que los ratones RhoE *gt/gt* adquieren la reacción de alerta a un estímulo auditivo (*Preyer*) más tarde que sus hermanos de camada, mientras que en el caso del *Blast* no hay diferencias entre los diferentes genotipos (**Figura 16**). No se aprecian diferencias significativas entre los ratones RhoE *+/+* y los ratones RhoE *+/gt* en ninguna de las dos pruebas.

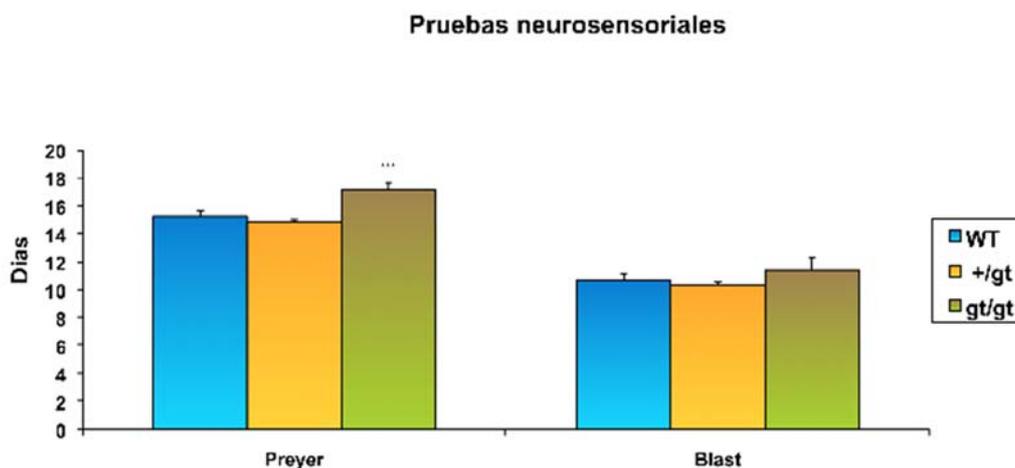


Figura 16: Los ratones RhoE *gt/gt* adquieren días más tarde la reacción de alerta producida por un estímulo auditivo, mientras que la reacción producida por un estímulo táctil la adquieren en el mismo momento que sus hermanos de camada. Se registraba el día en el cual los ratones reaccionaban a un estímulo auditivo (*Preyer*) o táctil (*Blast*). Los datos se expresan como media + EEM. Mientras que no se aprecian diferencias entre los ratones RhoE *+/+* (WT) y RhoE *+/gt*, los ratones RhoE *gt/gt* muestran un retraso en la reacción a un estímulo auditivo pero no a un estímulo táctil. *** $p < 0.001$.

5.6 Los ratones RhoE *gt/gt* padecen defectos en el sistema motor, especialmente en las extremidades posteriores.

A simple vista se observa que los ratones RhoE *gt/gt* padecen un problema en el sistema motor en las extremidades posteriores (ver **Figura 7** y **Vídeo 1**), por lo que se incluyeron en los estudios pruebas para evaluar la coordinación motora de los ratones.

Una de las finalidades más importantes del desarrollo del sistema motor, es otorgarle al ratón la capacidad de desplazarse. En un periodo previo a la adquisición de esta capacidad los ratones *pivotan*, lo cual es un proceso que se equipara al gateo en humanos. El fenómeno consiste en que, teniendo las extremidades posteriores inmóviles por falta de desarrollo y solo moviendo las delanteras, el ratón rota sobre si mismo sin avanzar en ninguna dirección (**Vídeo 5**). Para la evaluación del sistema motor, se registraron el número de *pivotings* que realizan los ratones en un tiempo limitado y a lo largo de su desarrollo. Nuestros resultados muestran que los ratones RhoE *gt/gt* dejan de *pivotar* más tarde que sus hermanos de camada (**Figura 17**). Esto es debido a que aún no han adquirido la capacidad de marcha por un retraso en el desarrollo de las extremidades posteriores. De especial interés son los días PD6 y PD7 que muestran que los ratones RhoE *gt/gt* *pivotan* menos que sus hermanos de la camada, lo que refleja que el retraso del desarrollo no es sólo a nivel de las extremidades posteriores, ya que es necesario el desarrollo de las extremidades anteriores para poder *pivotar*. No se aprecian diferencias significativas entre los ratones RhoE *+/+* y los ratones RhoE *+/gt*.

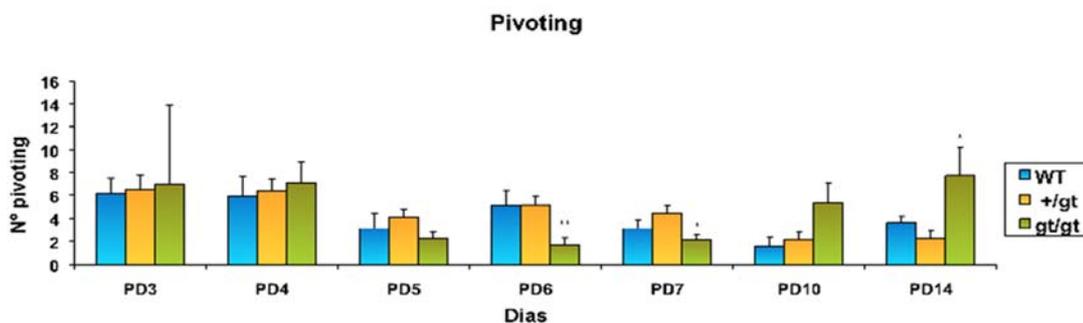


Figura 17: Los ratones RhoE *gt/gt* *pivotan* más tiempo que sus hermanos de camada ya que adquieren más tarde la capacidad de la marcha por un retraso en el desarrollo de las extremidades posteriores. Se registraba el número de *pivotings* que realizaban los ratones en 1 min durante su desarrollo. Los datos se expresan como media + EEM. Mientras que no se aprecian diferencias entre los ratones RhoE *+/+* (WT) y RhoE *+/gt*, los ratones RhoE *gt/gt* dejaban de *pivotar* más tarde que sus hermanos de camada. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Otro de los datos recopilados para la evaluación del sistema neuromotor es el tiempo que tardaban los ratones en comenzar a caminar. Nuestros resultados muestran que los ratones RhoE *gt/gt* son capaces de comenzar la marcha a partir del día 10 mientras que sus hermanos de camada son capaces de hacerlo desde el día 6 (**Figura 18**). Esto puede ser debido al retraso en el desarrollo de las extremidades posteriores que sufren estos ratones.

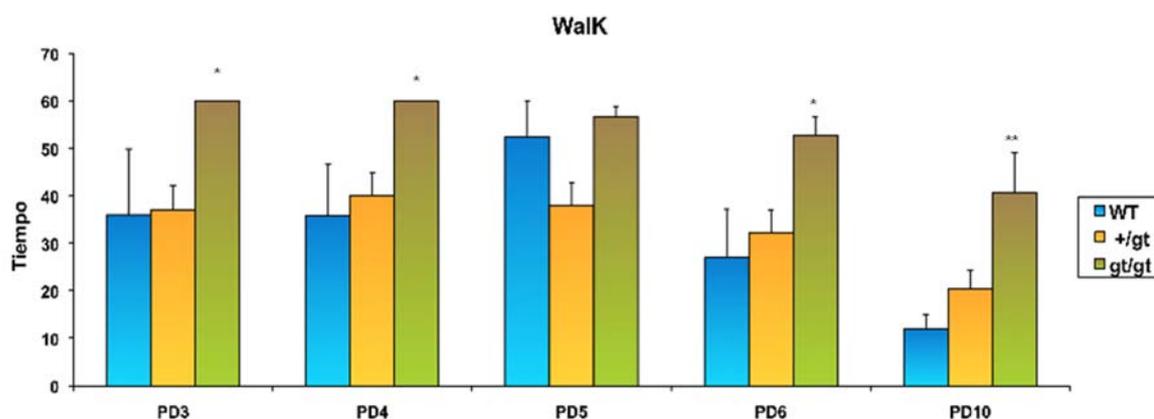


Figura 18: Los ratones RhoE *gt/gt* adquieren la capacidad de caminar más tarde que sus hermanos de camada. Se registró el tiempo que tardaba cada ratón en emprender la marcha durante los días 3, 4, 5, 6 y 10. A los 60 segundos de comenzada la observación se detenía el experimento. Los datos se expresan como media + EEM. Mientras que no se aprecian diferencias entre los ratones RhoE *+/+* (WT) y RhoE *+/gt*, los ratones RhoE *gt/gt* no adquieren la capacidad de emprender la marcha hasta el día 10 mientras que sus hermanos de camada la adquieren a partir del día 6. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Otra de las pruebas para evaluar el funcionamiento del sistema motor es el *Wire Suspension*, prueba en la cual se valora la capacidad muscular del ratón. La prueba consiste en cronometrar cuánto tiempo soporta el ratón aferrado a una barra por las extremidades anteriores (**Video 6**). Nuestros resultados muestran que los ratones RhoE *gt/gt* soportan menos tiempo suspendidos que sus hermanos de camada (**Figura 19**). Esto nos indica que el problema en el sistema motor no solo existe a nivel de las extremidades posteriores sino que parece un problema generalizado.

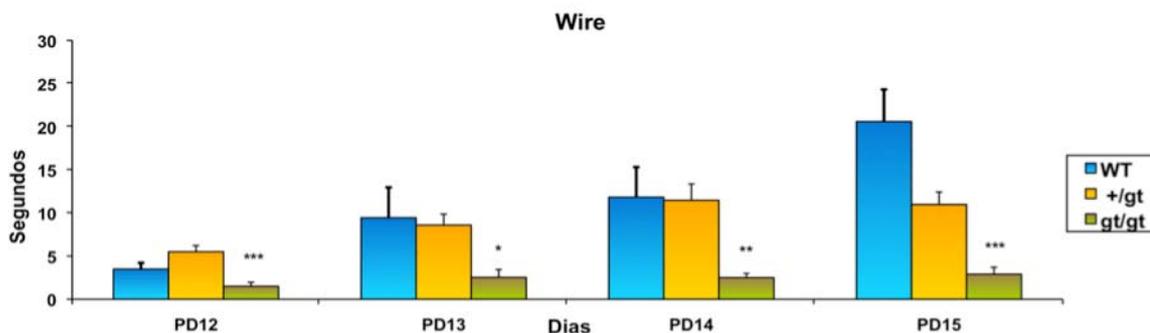


Figura 19: Los ratones RhoE *gt/gt* soportan menos tiempo que sus hermanos de camada en la prueba *Wire Suspension*. Se registraba el tiempo que soportaban los ratones aferrados a una barra por las extremidades anteriores. Los datos se expresan como media + EEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Podemos analizar en su conjunto una serie de pruebas motoras para observar el efecto de la ausencia de la expresión de RhoE en el ratón (**Figura 20**). Mientras que en la prueba *reach* (que consiste en determinar el día en el que el ratón, al ser suspendido por la cola y acercado al suelo, detecta la proximidad de la superficie e intenta alcanzarla) no hay diferencias significativas entre los ratones RhoE *gt/gt* y sus hermanos de camada, el resto de pruebas las superan más tarde o no llegan a conseguirlo. Así sucede con el Volteo y la Geotaxia negativa. En el caso del Volteo, a los ratones RhoE *gt/gt* les cuesta 2 días más superar por primera vez la prueba que a sus hermanos de camada. Con respecto a la geotaxia a los ratones RhoE *gt/gt* les cuesta casi tres días más superar por primera vez esta prueba que los ratones RhoE *+/+* o RhoE *+/gt* de su camada. También muestran un retraso estadísticamente significativo ($p < 0.001$) en la prueba de suspensión vertical, prueba que consiste en situar al ratón en una gradilla metálica e ir poco a poco aumentando el ángulo; se considera que la prueba ha sido superada cuando el ratón se mantiene aferrado a la rejilla en un ángulo de 90° (ver el **Video 7**). Finalmente, la prueba de escalar (el ratón es capaz de subir por una gradilla metálica en un ángulo de 90°) no consiguen realizarla en ningún momento de los 21 días de observación (**Figura 20**).

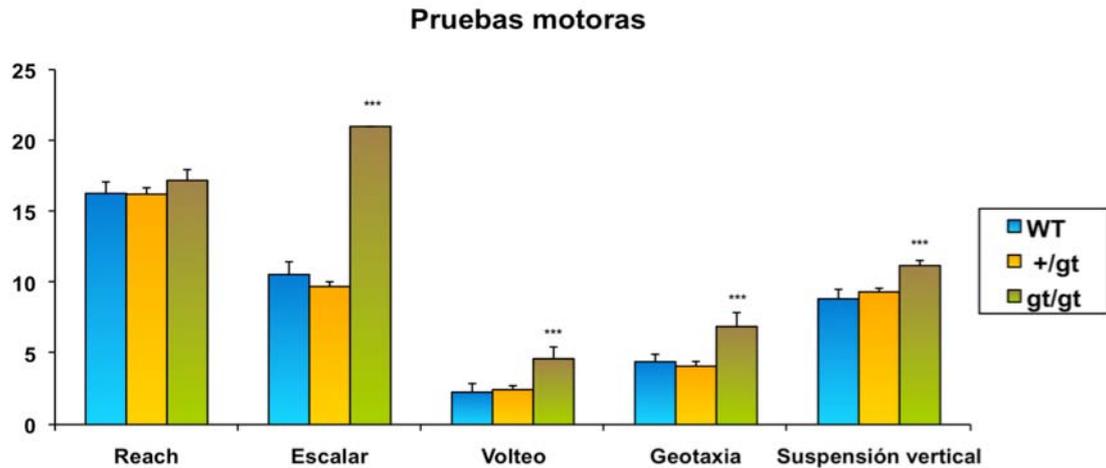


Figura 20: Los ratones RhoE *gt/gt* no consiguen realizar las pruebas motoras hasta días más tarde que sus hermanos de camada, lo que sugiere defectos en el desarrollo del sistema neuromotor. Se registraba el día en el cual los ratones eran capaces de realizar las siguientes pruebas: *Reach* (colgar al ratón de la cola y acercarlo al suelo y ver si intenta alcanzarlo), *Escarlar* (el ratón es capaz de subir por una gradilla metálica en un ángulo de 90°), *Volteo* (el ratón consigue realizar el *righting reflex* completo), *Geotaxia* (el ratón consigue realizar la geotaxia negativa de manera completa) y *Suspensión vertical* (el ratón consigue mantenerse aferrado a una gradilla metálica, en un ángulo de 90°). Los datos se expresan como media + EEM. *** $p < 0.001$.

5.7 Los ratones RhoE gt/gt presentan hidrocefalia e hipocelularidad en la corteza cerebral y en el bulbo olfatorio.

Puesto que observamos un retraso notable en el desarrollo neuromotor en los ratones deficientes en la expresión de RhoE, decidimos estudiar si esto era una consecuencia de alguna alteración estructural en el cerebro. Para ello, realizamos cortes de cerebro de ratones RhoE +/+ y RhoE gt/gt y los analizamos en el microscopio tras teñirlos con cresil violeta. La diferencia más notable es la hidrocefalia, que la padecen un 70% de los ratones RhoE gt/gt (**Figura 21 Panel Superior**), pero con un grado variable entre distintos ratones, incluso hay casos en que sólo se presenta la hidrocefalia en uno de los dos hemisferios. Otra de las diferencias morfológicas apreciadas en los cortes de los cerebros de los ratones RhoE gt/gt es la hipocelularidad en el bulbo olfatorio y la desorganización de sus capas (**Figura 21 Panel Medio**). Finalmente, también se puede apreciar cierta hipocelularidad en la corteza cerebral en los ratones RhoE gt/gt (**Figura 21 Panel Inferior**). Estas alteraciones morfológicas podrían estar relacionadas con algunos de los defectos neurológicos descritos anteriormente, por ejemplo la hipocelularidad en el bulbo olfatorio podría explicar la incapacidad del ratón de realizar el *Homing*, por ausencia de olfato.

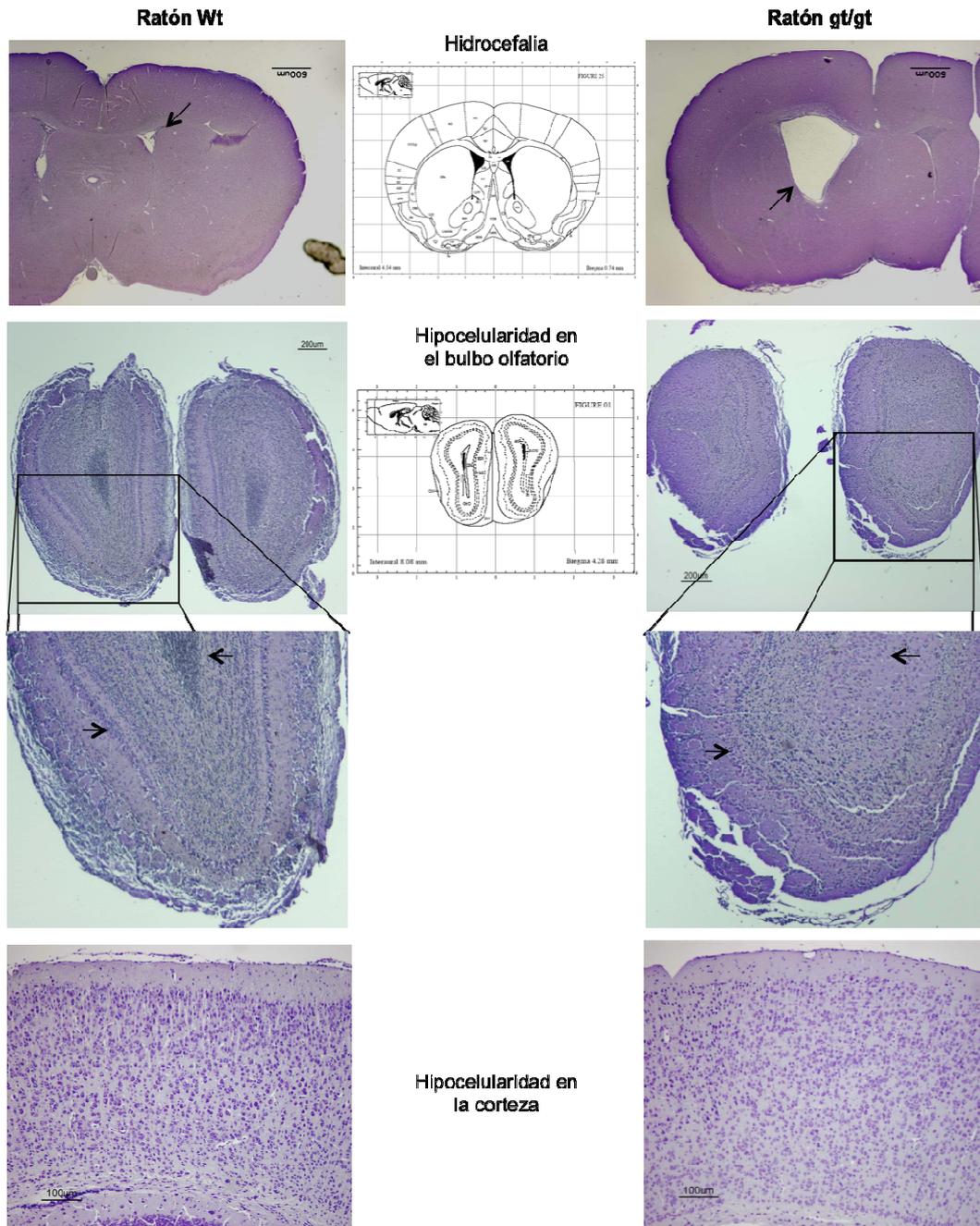


Figura 21: Los ratones RhoE gt/gt muestran hidrocefalia e hipocelularidad en el bulbo olfatorio y en la corteza cerebral. Para el estudio histológico se obtuvieron secciones seriadas de 9 µm de grosor de cerebros de ratones RhoE +/- (WT, imágenes de la izquierda) y de ratones RhoE gt/gt (imágenes de la derecha) de PD21 y se tiñeron con cresil violeta. Todos los cortes para su correcta localización se compararon con las figuras procedentes de un atlas estereotáxico del cerebro de ratón (Paxinos and Franklin, 2001). Panel Superior: las imágenes muestran el 2º ventrículo y se aprecia la hidrocefalia en los ratones RhoE gt/gt. Panel Medio: bulbo olfatorio, donde se aprecia una hipocelularidad y una desorganización de las capas en los ratones RhoE gt/gt, especialmente visible en la ampliación inferior, marcadas por las flechas. Panel Inferior: córtex cerebral, donde se aprecia una hipocelularidad generalizada en los ratones RhoE gt/gt.

5.8 La ausencia de expresión de RhoE provoca un retraso en la osificación.

Puesto que las pruebas neuromotoras revelaron que los ratones en los que no hay expresión de RhoE tenían defectos motores generalizados y a simple vista se apreciaban defectos morfológicos especialmente acentuados en las extremidades posteriores, decidimos analizar si estos defectos pudieran tener un origen estructural. En el estudio radiográfico realizado (**Figura 22**) se observó una osteopenia generalizada por inmadurez musculoesquelética en los individuos RhoE gt/gt de PD21, lo que es compatible con un retraso en el crecimiento comparativo con respecto de un individuo RhoE +/+.

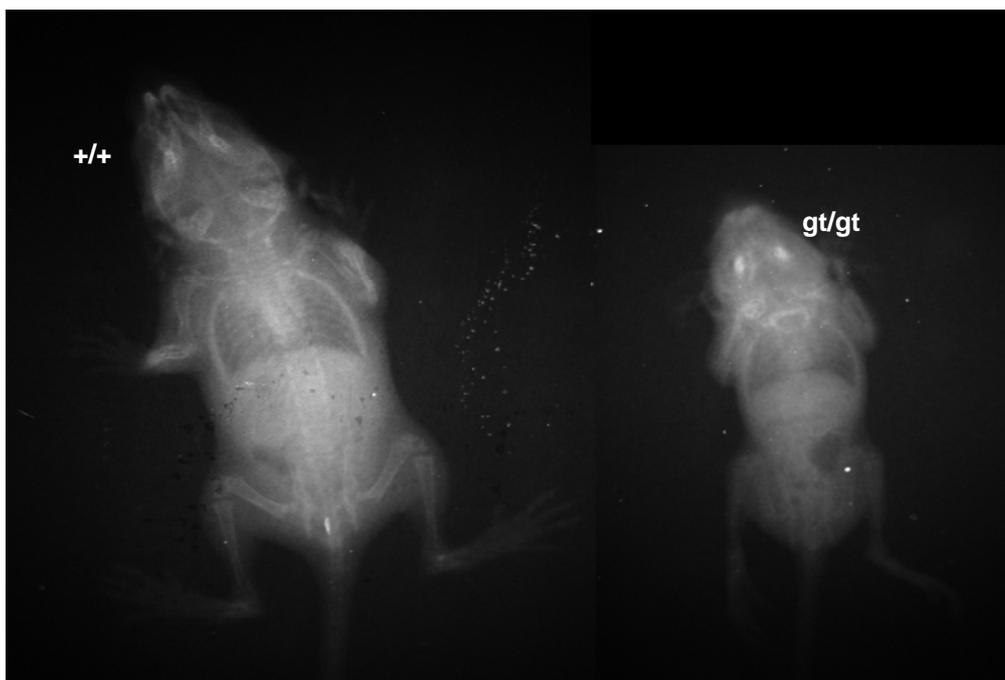


Figura 22: Los ratones RhoE gt/gt presentan una menor densidad ósea. Proyección radiográfica dorsoventral de cuerpo entero en dos individuos de una misma camada. Obsérvese como el ratón RhoE gt/gt (a la derecha de la imagen) presenta una menor densidad ósea debido a una mayor inmadurez esquelética con respecto al ratón RhoE +/+.

Tras comprobar que los animales RhoE *gt/gt* adultos tenían una menor densidad ósea que sus hermanos de camada nos dispusimos a estudiar el desarrollo óseo de los embriones. Para ello realizamos una doble tinción con Alcian Blue y Alizarin Red que permite distinguir cartílago (azul) de hueso maduro (rojo). Tal y como se aprecia en la **Figura 23**, los embriones RhoE *+/+* y RhoE *+/gt* de 17.5 días presentan una tinción roja generalizada, con algunas zonas de color azul que indican que aún no se ha completado el proceso de osificación. Sin embargo, los embriones RhoE *gt/gt* de la misma edad presentan, además de un menor tamaño, una tinción azul generalizada, con solo algunas zonas de color rojo. Esto indica que la ausencia de expresión de RhoE provoca un retraso en el proceso de osificación. Es posible que este retraso lleve a la menor densidad ósea generalizada vista en la anterior figura en ratones de PD21.

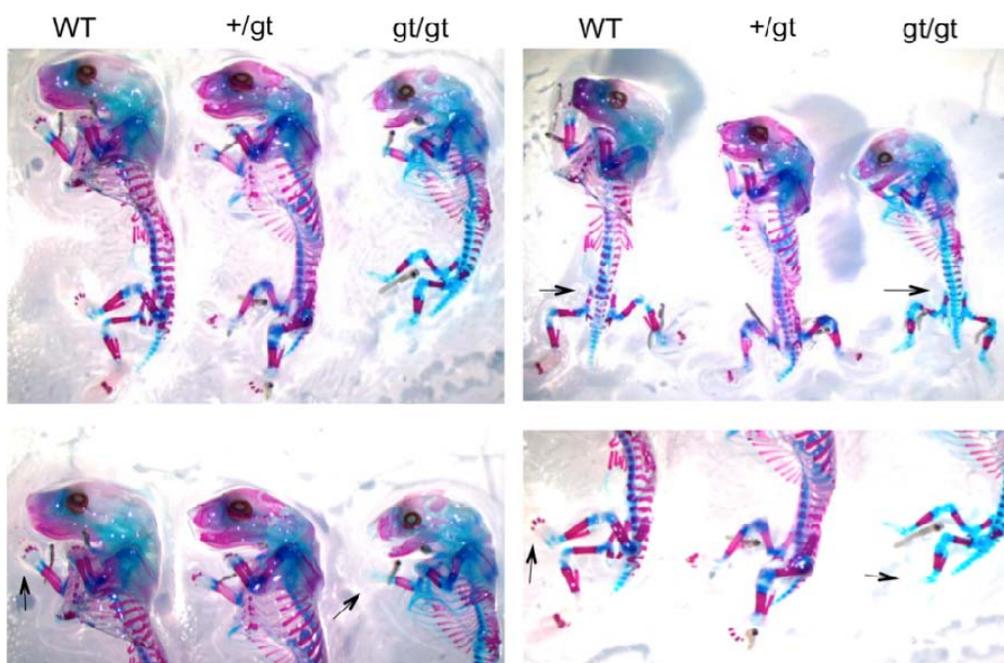


Figura 23: La ausencia de expresión de RhoE provoca un retraso en el proceso de osificación. Embriones RhoE WT, Heterocigotos (*+/gt*) y *gt/gt* de 17.5 días se tiñeron con Alizarin Red (rojo) para hueso y con Alcian Blue para cartílago (azul). Las fotos superiores muestran dos ejemplos diferentes en los que el embrión RhoE *gt/gt* presenta un predominio de tejido cartilaginoso. Las fotos inferiores muestran detalles del cráneo (izquierda) y de las extremidades posteriores (derecha), en los que se aprecian zonas osificadas en los embriones RhoE *+/+* y RhoE *+/gt* que aún son cartílago en el RhoE *gt/gt*. Destacamos con las flechas la falta de osificación de las vértebras de los ratones RhoE *gt/gt* y la ausencia de las falanges tanto en las extremidades posteriores como en las anteriores, para resaltar que el retraso en la osificación es generalizado.

5.9 La ausencia de la expresión de RhoE produce una reducción en el número de motoneuronas medulares.

Todas las pruebas realizadas anteriormente muestran que los ratones RhoE gt/gt padecen defectos generalizados en el sistema motor, por lo que decidimos estudiar el impacto de la ausencia de RhoE en las motoneuronas del ratón RhoE gt/gt. El término motoneurona o neurona motora hace referencia, en vertebrados, a las neuronas del sistema nervioso central que proyectan sus axones hacia los músculos. Las neuronas motoras son eferentes ya que transmiten la información desde el SNC a los músculos. Las motoneuronas morfológicamente son fáciles de distinguir porque se caracterizan por ser grandes y con un núcleo bien definido. La **Figura 24** muestra que las motoneuronas medulares expresan RhoE, lo cual confirma datos previos de nuestro grupo (Ballester-Lurbe *et al.* 2009).

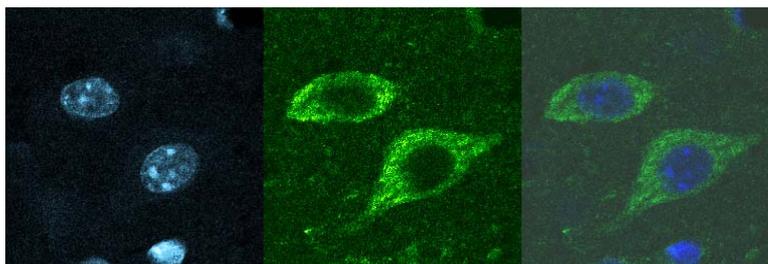


Figura 24: RhoE se expresa en motoneuronas. Inmunofluorescencia con anticuerpos anti-RhoE realizada en cortes de 16 μm de grosor de médula de ratones WT adultos.

Puesto que RhoE se expresa en motoneuronas, pensamos que la ausencia de la proteína podría afectar a este tipo celular y, como consecuencia, provocar los déficits motores de los ratones RhoE gt/gt. Así, procedimos a contar el número de motoneuronas en las médulas de una población de 9 animales PD21 de los cuales 5 ratones eran RhoE gt/gt y 4 RhoE +/+. La médula de estos ratones fue en primer lugar dividida en 3 secciones, la parte cervical, la torácica y la lumbar. En la **Figura 25** se observa la identificación de motoneuronas en cortes de médula teñidos con cresil violeta para su conteo y la diferencia existente en el número de motoneuronas entre los ratones RhoE +/+ y los ratones RhoE gt/gt. Nuestros resultados obtenidos a partir de los conteos de las secciones de la médula muestran que los ratones RhoE gt/gt,

tienen menor número de motoneuronas periféricas en cada una de las secciones de la médula contadas en comparación con los controles WT. También se procesaron los datos en conjunto para apreciar las diferencias generales en el número de motoneuronas: los ratones RhoE *gt/gt* muestran una disminución del 40% en el número total de motoneuronas medulares.

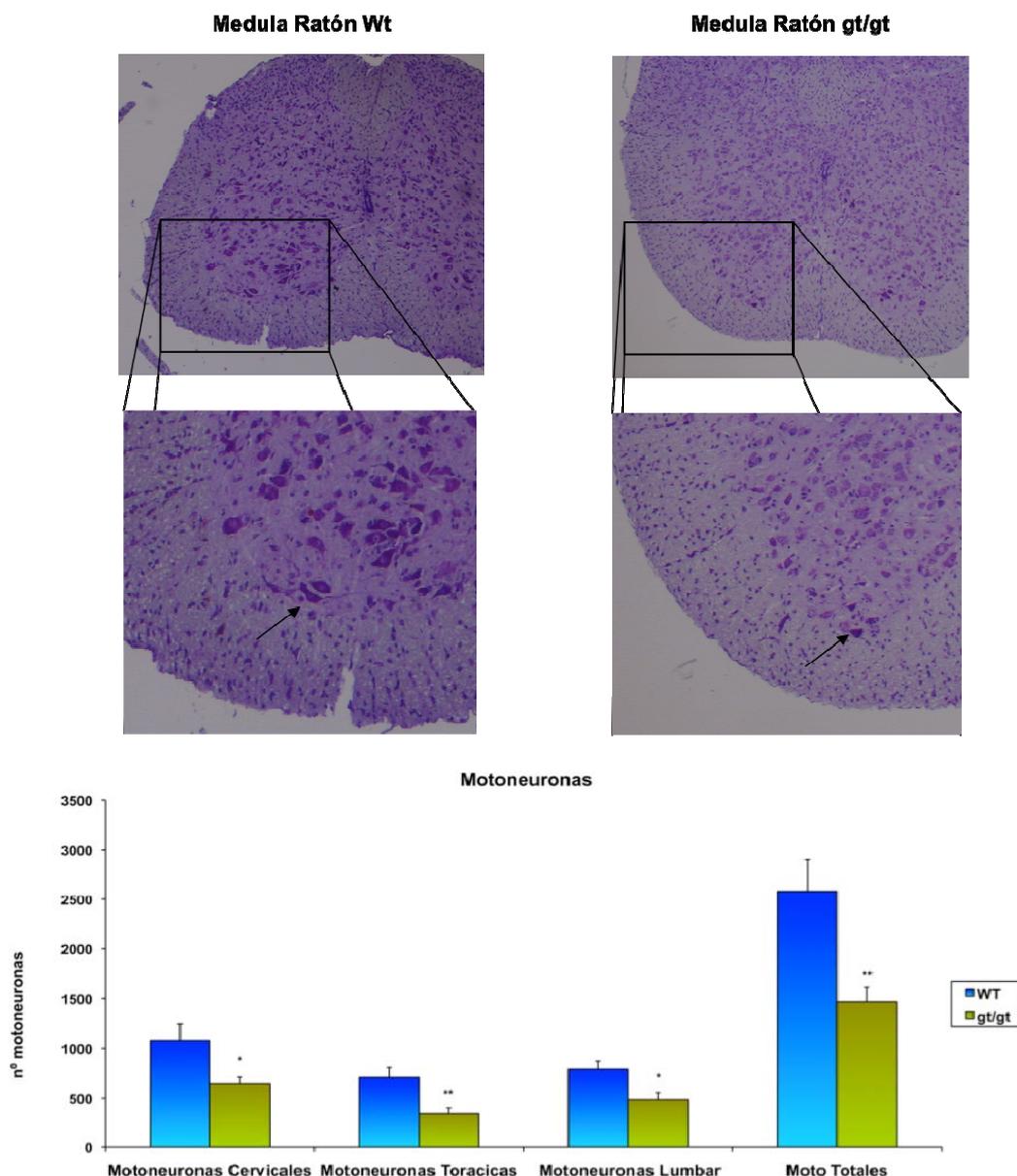


Figura 25: Los ratones RhoE *gt/gt* tienen menor número de motoneuronas periféricas en cada una de las secciones contadas en comparación con sus hermanos de camada. En las imágenes se muestran cortes de médula tanto de ratones RhoE *+/+* (WT) como de ratones RhoE *gt/gt* teñidos con cresil violeta y utilizados para los contajes. El gráfico muestra las diferencias existentes en el número de motoneuronas en la médula espinal de ratones RhoE *+/+* (WT) y ratones RhoE *gt/gt* por secciones y en global de una población de 9 ratones ,5 *gt/gt* y 4 *+/+*. Los datos se expresan como media + EEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

5.10 Los ratones RhoE +/-gt son más sensibles a los efectos convulsionantes de la Nicotina y el Kainato, pero no del Pentilentetrazol.

Durante el proceso de observación de los ratones de la colonia, se apreció que los ratones RhoE gt/gt, sufrían convulsiones espontáneas (**Video 8**), por lo que se procedió al estudio de dichas convulsiones, induciéndolas de forma artificial a través de fármacos específicos. Por el estado físico de los ratones RhoE gt/gt y por su incapacidad de llegar a la fase adulta, los estudios se realizaron comparando las diferencias de sensibilidad a los fármacos que existían entre ratones RhoE +/+ y ratones RhoE +/-gt.

El primer fármaco inductor de convulsiones que se utilizó fue el Pentilentetrazol, el cual es un fármaco estimulador del sistema nervioso central, que se utiliza principalmente en estudios experimentales para inducir ataques epilépticos. Su mecanismo de acción es a través de la inhibición del sistema Gabaérgico, ya que es un antagonista no competitivo del Ácido Gama Aminobutírico (GABA). El GABA es un inhibidor de los receptores de Acetilcolina de tipo nicotínico. Al encontrarse el fármaco unido al sitio de unión del GABA, éste no puede realizar su función inhibitoria y por lo tanto los receptores nicotínicos se encuentran siempre activos e inducen las convulsiones.

Nuestro estudio se realizó en una población de 16 ratones adultos de los cuales 6 ratones eran WT y 10 ratones eran RhoE +/-gt, a los cuales se le inyectaba intraperitonealmente una dosis de 60 mg/Kg de Pentilentetrazol. Posteriormente se les introducía en un recinto circular de paredes translúcidas para poder observar su comportamiento.

En este ensayo los ratones normalmente en una primera fase se quedaban parados, posteriormente sufrían espasmos leves y por ultimo comenzaban las convulsiones. Normalmente empezaban por las convulsiones tónicas, continuaban con las clónicas y por ultimo las mioclónicas. En este proceso se registraban los tiempos que tardaban en llegar cada una de las fases, así como su intensidad. Las intensidades de cada fase se agruparon en la suma de los *Scores*, para tener una idea global de la sensibilidad de los ratones al fármaco. En nuestros resultados se aprecia que no existen diferencias significativas entre los ratones RhoE +/+ y los RhoE +/-gt, ni en los tiempos de latencia de cada fase ni en su intensidad, aunque sí que se observa una tendencia generalizada que indica una posible mayor sensibilidad de los ratones RhoE +/-gt al Pentilentetrazol (**Figura 26**).

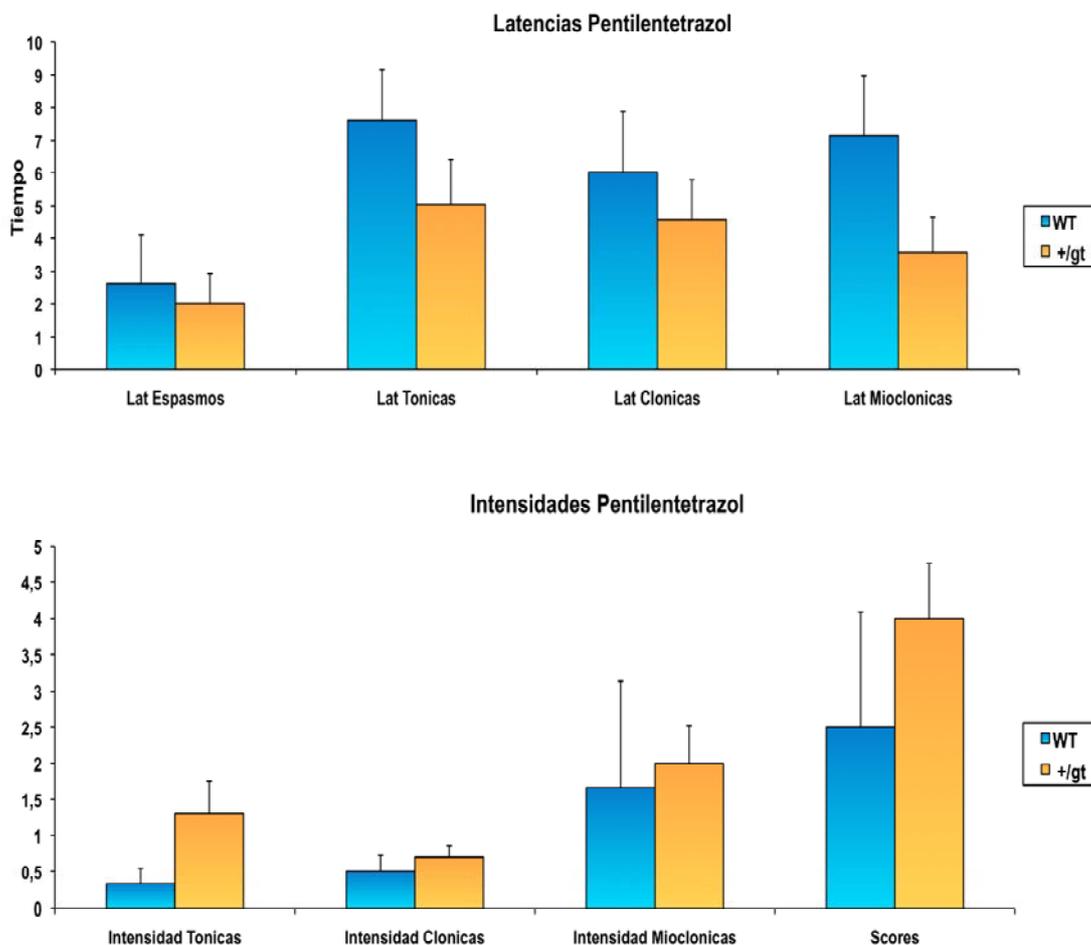


Figura 26: Los ratones Heterocigotos RhoE +/gt no son más sensibles a las convulsiones inducidas por el Pentilentetrazol que los controles WT. Después de inyectarle una dosis de 60mg/Kg intraperitonealmente a una población de 16 ratones adultos (6 WT y 10 RhoE +/gt), se registró el tiempo que tardaban en aparecer las diferentes fases de la convulsión (gráfico superior) y la intensidad de cada una de estas fases (gráfico inferior). Los datos se expresan como media + EEM.

El segundo fármaco utilizado en los ensayos de convulsiones fue la Nicotina, que se une a los receptores de Acetilcolina de tipo Nicotínico y mantiene los canales iónicos abiertos, induciendo de esta forma las convulsiones. Estas convulsiones se producen a nivel del SNC, en el hipocampo o en la corteza frontal por su unión a los receptores NMDA. Nuestro estudio se realizó en una población de 28 ratones adultos de los cuales 10 eran RhoE +/+ y 18 eran RhoE +/gt. Se les inyectó una dosis de 40 mg/Kg subcutánea de Nicotina. Posteriormente se les introducía en un recinto circular de paredes translúcidas para poder observar su comportamiento.

En este ensayo los ratones tenían un comportamiento ligeramente diferente al que se producía al inyectar el Pentilentetrazol: al inyectarles la Nicotina la primera reacción del ratón era comenzar a temblar, en una segunda fase los ratones comienzan a dar vueltas alrededor del recinto con la cabeza pegada al suelo (comportamiento conocido como tigmotaxia) y por último comienzan las convulsiones tónicas, posteriormente las convulsiones clónicas, y el proceso finaliza con las convulsiones mioclónicas.

En este experimento se registraban los tiempos que tardaban en llegar cada una de las fases y la intensidad de cada una de ellas, las intensidades se agruparon en la suma de los *Scores*, para tener una idea global de la sensibilidad de los ratones al fármaco. Nuestros resultados muestran que existen diferencias significativas tanto en las latencias de aparición de cada una de las fases como en sus intensidades entre los ratones RhoE +/+ y los ratones RhoE +/- (Figura 27). Dicho resultado muestra que los ratones RhoE +/- son mas sensibles a los efectos convulsionantes de la Nicotina que los ratones WT.

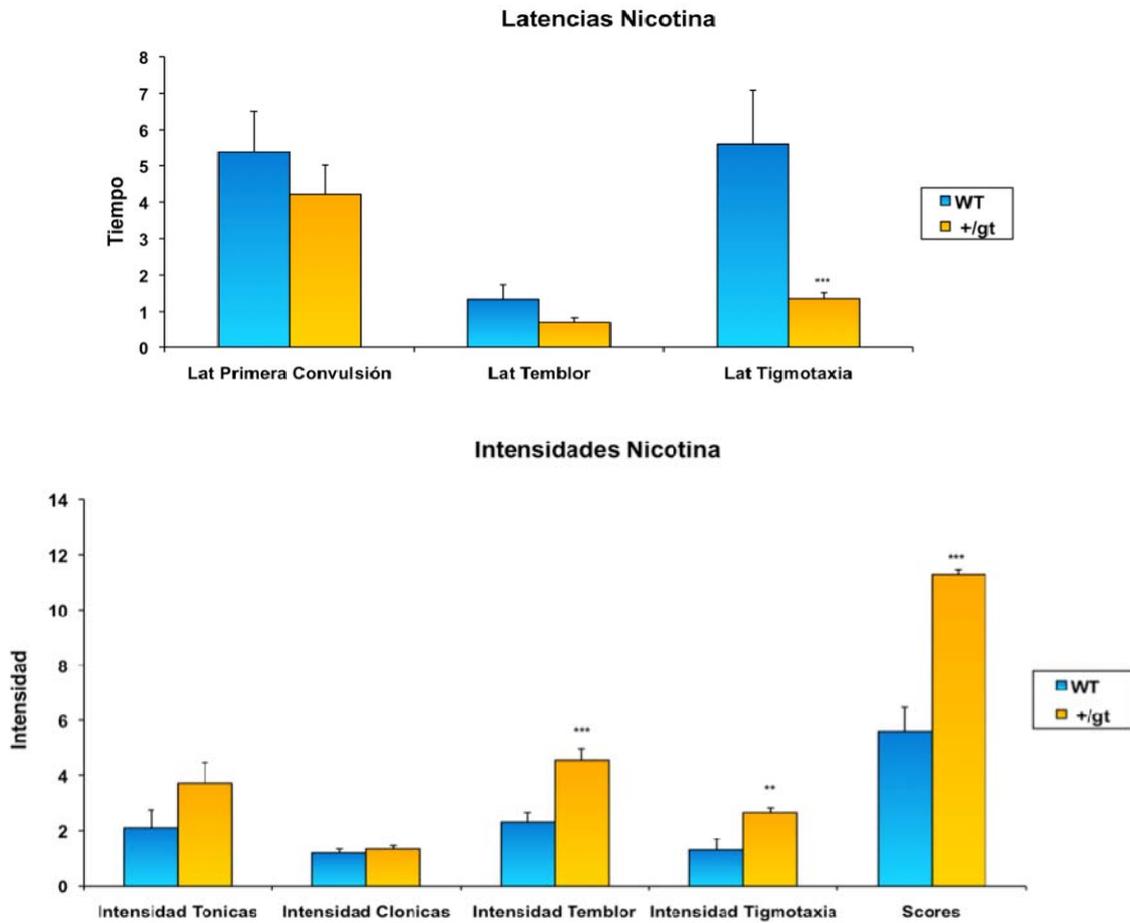


Figura 27: Los ratones Heterocigotos RhoE +/gt son más sensibles a las convulsiones inducidas por la Nicotina que los controles WT. Después de inyectarle una dosis de 40 mg/Kg subcutánea a una población de 28 ratones adultos (10 WT y 18 RhoE +/gt), se registró el tiempo que tardaban en aparecer las diferentes fases de la convulsión y la intensidad de cada una de ellas. Se puede observar que los ratones RhoE +/gt convulsionan antes y con mayor intensidad que los ratones WT. Los datos se expresan como media + EEM. **p<0.01; ***p<0.001.

El último fármaco que ensayamos es el Kainato. La inyección de Kainato intraperitoneal en un ratón es uno de los modelos *in vivo* más comúnmente utilizado en la inducción de epilepsia del lóbulo temporal. El Kainato es un fármaco que actúa excitando los receptores de Kainato (receptores NMDA), que es uno de los componentes del sistema sináptico de señalización por glutamato en el sistema nervioso central. Se calcula que en el SNC el 90% de las sinapsis excitadoras utilizan el ácido glutámico como agente neurotransmisor. Tras los resultados obtenidos con la Nicotina y dado que los dos fármacos inducen las convulsiones en la misma región del cerebro, quisimos probar el fármaco en nuestro modelo. En nuestro estudio utilizamos 20 machos de 2 meses de edad, de los cuales 10 ratones eran RhoE +/+ y los otros 10 eran RhoE +/-gt. Se les inyectó intraperitonealmente una dosis de 30 mg/kg de Kainato. Posteriormente se les introducía en un recinto circular de paredes translúcidas para poder observar su comportamiento durante 3 horas.

En este ensayo los ratones normalmente tenían un comportamiento similar al sufrido por los ratones cuando se le inyectaba Pentilentetrazol, en una primera fase se quedaban quietos, posteriormente sufrían espasmos leves y por ultimo comenzaban las convulsiones, normalmente empezaban por las convulsiones tónicas, continuaban con las clónicas y por ultimo las mioclónicas.

En los estudios realizados con el Kainato se registraban los tiempos que tardaba cada ratón en alcanzar las diferentes fases y las intensidades de cada una de ellas (**Figura 28**). Nuestros resultados muestran que no existen diferencias significativas entre los dos genotipos en cuanto al tiempo que tardan en desencadenarse cada una de las fases del proceso, pero sí en la intensidad de estas fases, ya que los ratones Heterocigotos sufren más intensamente estos procesos. Esto indica que son más sensibles a los efectos del Kainato. Estos resultados confirman que la ausencia de expresión de RhoE está relacionada con la aparición de convulsiones de tipo epiléptico.

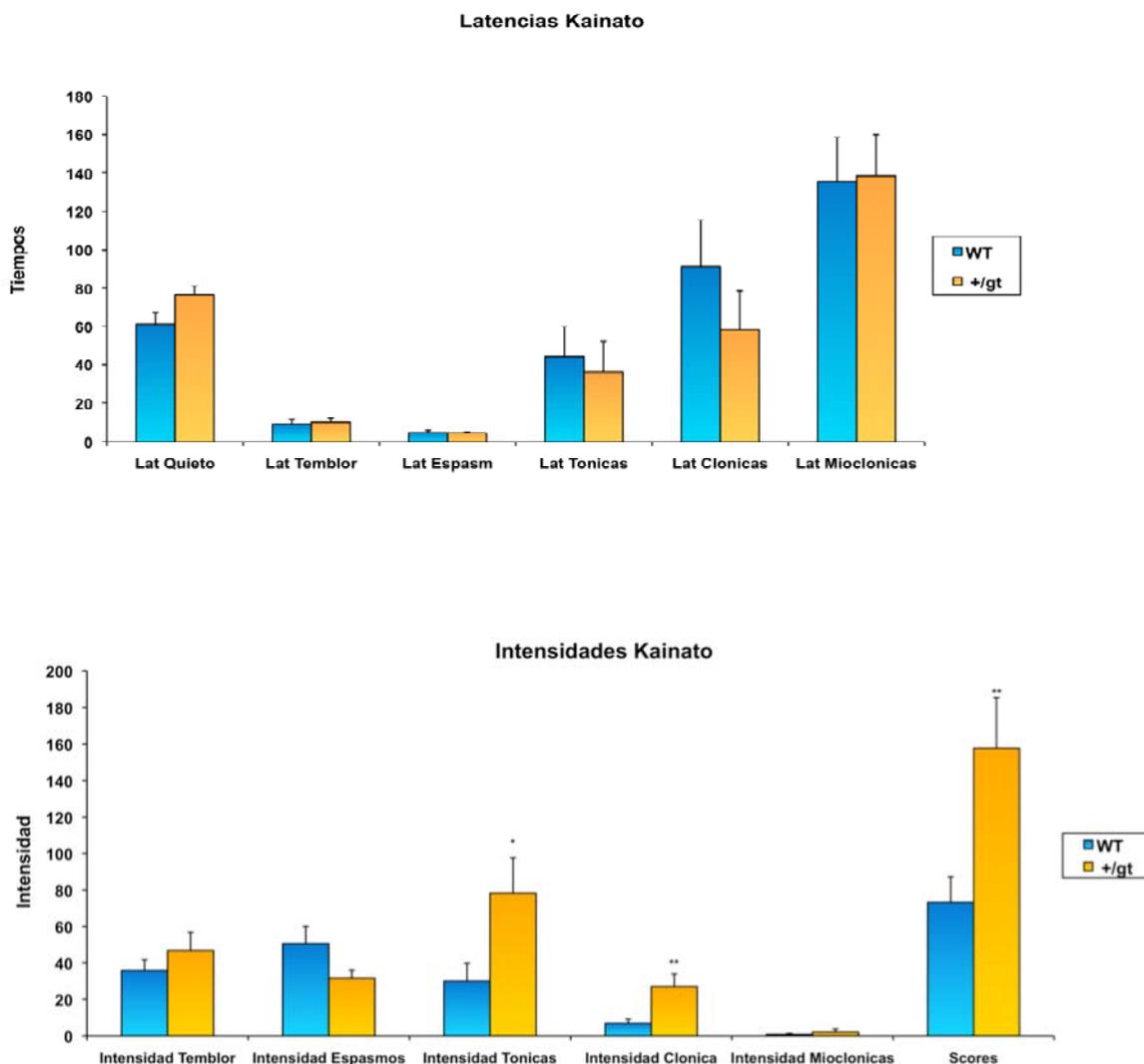


Figura 28: Los ratones Heterocigotos RhoE +/gt son más sensibles a las convulsiones inducidas por el Kainato que los controles WT. Después de inyectarle intraperitonealmente una dosis de 30 mg/Kg a una población de 20 machos adultos (10 WT y 10 RhoE +/gt), se registró el tiempo que tardaban en aparecer las diferentes fases de la convulsión y la intensidad de cada una de estas fases. Se puede observar que los ratones Heterocigotos convulsionan con mayor intensidad que los ratones WT. Los datos se expresan como media + EEM. *p<0.05; **p<0.01

5.11 Los ratones RhoE gt/gt tienen aumentados los niveles de NR2B en el hipocampo.

Hay pruebas sustanciales de que la zona del hipocampo desempeña un papel fundamental en la inducción y mantenimiento en la epilepsia del lóbulo temporal (Spencer *et al.* 1994). La inducción de convulsiones por Kainato es un modelo ampliamente aceptado para el estudio de la epilepsia. El Kainato afecta a muchas áreas del cerebro aunque una de las más afectadas es el hipocampo por su gran cantidad de receptores NMDA (Sperk *et al.* 1983, Turner *et al.* 1991, Yoshihara *et al.* 2003). Los receptores NMDA son receptores heteroméricos, con subunidades de dos tipos, NR1 y NR2, están localizados en las regiones postsinápticas de las neuronas excitadoras y controlan el flujo de los iones de Ca^{2+} (Prybylowski *et al.* 2004). La actividad de dichos receptores se relaciona con la epilepsia, de manera que se ha sugerido que puedan ser dianas terapéuticas (Cull-Candy *et al.* 2001).

Tras los resultados obtenidos en los ensayos de inducción de convulsiones con Nicotina y Kainato, quisimos encontrar una explicación molecular a las convulsiones espontáneas que sufrían los ratones RhoE gt/gt. Se ha demostrado que la kinasa ERK regula los niveles de expresión de la subunidad NR2B de los receptores NMDA y su fosforilación a través de CREB (Nateri *et al.* 2007). Además, resultados anteriores de nuestro laboratorio habían demostrado que la sobreexpresión de RhoE en células U87 (glioblastoma humano) disminuía los niveles de la forma fosforilada (activa) de ERK (pERK) (Poch *et al.* 2007). Con estos antecedentes nos dispusimos a analizar la posible implicación de la vía ERK-CREB-NR2B en las convulsiones espontáneas observadas en los ratones deficientes en la expresión de RhoE. Para ello, estudiamos los niveles de pERK en extractos de hipocampo de ratones RhoE +/+ y RhoE gt/gt de PD21. Como se aprecia en la **Figura 29** los niveles de pERK están aumentados en los hipocampos de los ratones RhoE gt/gt comparados con los de sus hermanos de camada WT, mientras que los niveles de ERK total son similares en todos los individuos estudiados. Siguiendo en la misma ruta de señalización, también se puede observar que en los extractos de hipocampo de los ratones RhoE gt/gt hay un cierto aumento de la fosforilación de CREB, pero no así del nivel total de la proteína. Finalmente, analizamos también los niveles de expresión de la subunidad NR2B de los receptores NMDA. Consistente con los resultados anteriores, la expresión de esta proteína es mayor en las muestras de hipocampo de los ratones RhoE gt/gt que en las de los ratones WT. Además, hay una correlación entre el nivel de fosforilación (actividad) de ERK y el de expresión de NR2B. Ya que la disminución de los niveles de

RhoE en el hipocampo induce un aumento de la expresión de NR2B, presumiblemente como consecuencia del aumento de los niveles de pERK, este resultado podría proporcionar una explicación molecular a las convulsiones espontáneas que sufren los ratones RhoE *gt/gt* y la mayor sensibilidad de los ratones Heterocigotos a la Nicotina y al Kainato.

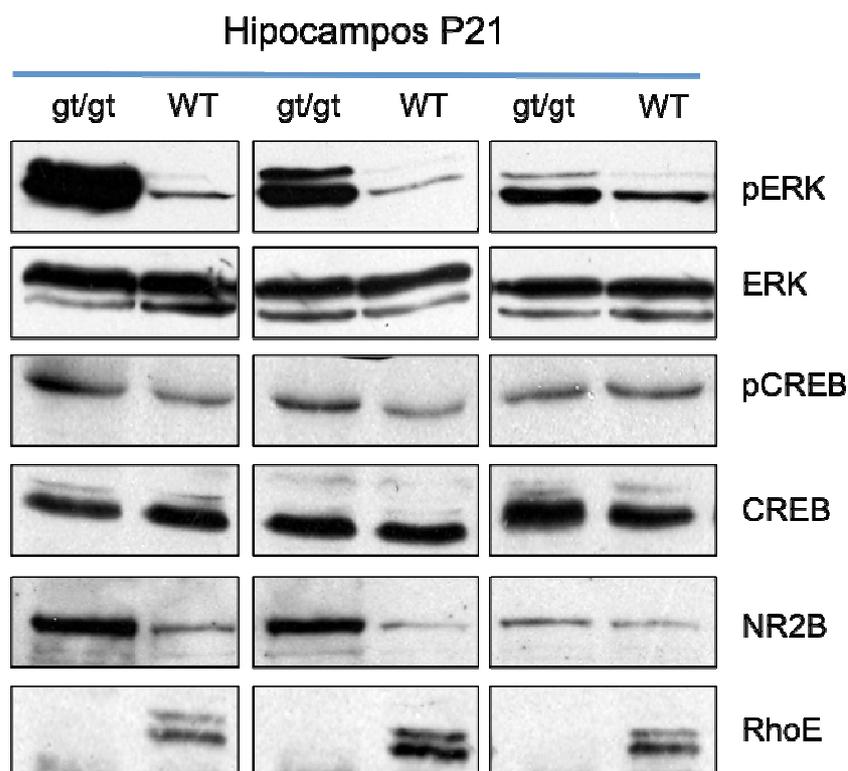


Figura 29: Los extractos de hipocampos procedentes de ratones RhoE *gt/gt* presentan un aumento de la fosforilación de ERK y CREB y de la expresión de NR2B, con respecto a los controles WT. El análisis de la expresión de proteínas por Western blot utilizando anticuerpos específicos se describe en Material y Métodos. La figura muestra que los extractos de los hipocampos de tres ratones RhoE *gt/gt* tienen aumentados los niveles de pERK y de pCREB y, como consecuencia, de NR2B, en relación a sus respectivos controles WT.

DISCUSIÓN

6 Discusión.

Los modelos animales modificados genéticamente son una herramienta cada vez más utilizada para determinar las funciones *in vivo* de una proteína. Estos modelos permiten poner de manifiesto la importancia de una proteína durante el desarrollo y en la función de los distintos órganos y tejidos. En este trabajo hemos utilizado uno de estos modelos para el estudio de la función de RhoE. En nuestro modelo, la expresión de la proteína se ha eliminado mediante la técnica de *gene trap*. Nuestros resultados ponen de manifiesto una función hasta ahora desconocida de RhoE, ya que la expresión de la proteína es necesaria para el correcto desarrollo y función del sistema nervioso.

Desde que RhoE fue clonado de forma independiente en el laboratorio del Dr. Settleman y de la Dra. Ridley (Foster *et al.* 1996, Guasch *et al.* 1998), la mayoría de trabajos se han centrado en investigar el papel de esta proteína en la regulación de la organización del citoesqueleto de actina y de la proliferación celular, usando para ello modelos *in vitro* en los que se sobreexpresa la proteína o se silencia su expresión. Sin embargo, este es el primer trabajo en el que se aborda el estudio de la función de RhoE *in vivo*. Es, además, el primero también en abordar este tipo de estudios en proteínas de la subfamilia Rnd.

Los estudios realizados en nuestro laboratorio (Ballester-Lurbe *et al.* 2009) muestran que RhoE se expresa en el SNC del ratón, con el máximo de expresión en el periodo perinatal y disminuyendo hasta el estado adulto. En el periodo postnatal, cuando se produce el desarrollo del SNC, la expresión de RhoE es generalizada y especialmente marcada el bulbo olfatorio y la corteza. A nivel del SNP RhoE se expresa sobre todo en la médula espinal en las motoneuronas. Anterior a este estudio tan sólo existen algunas referencias en sitios de Internet elaboradas por centros de investigación especializados en análisis de genes a gran escala, que analizan de forma general por hibridación *in situ* la presencia del ARN mensajero (ARNm). Por ejemplo, en el Allen Institute for Brain Science (<http://www.brain-map.org>) se muestran secciones sagitales de cerebros adultos en los que se observa una ligera expresión de RhoE, especialmente destacada en zonas del bulbo olfatorio. También en la página web de Genepaint (<http://www.genepaint.org>) se muestra la presencia de RhoE en embriones de 14.5 días, con un marcaje generalizado tanto en el SNC como en otros órganos. Finalmente, en la página del Hospital Saint Jude (<http://www.stjudebgem.org>) se encuentra la descripción más completa de la expresión de RhoE en el SNC que incluye imágenes de embriones de 11 y 15 días y de cerebros de ratones de 7 días y

adultos. Las imágenes que se muestran en esta página coinciden con la expresión de la proteína observada en nuestro laboratorio.

La distribución de la expresión de RhoE en el sistema nervioso ya permitía predecir que probablemente RhoE tendría un papel importante en el desarrollo y función de este tejido. De hecho, se ha demostrado recientemente que RhoE induce el crecimiento de dendritas en células PC12 en cultivo (Talens-Visconti *et al.* 2009). Así pues, en el estudio del modelo de ratón sin expresión de RhoE nos hemos centrado en neurodesarrollo.

El primer efecto destacable de la ausencia de expresión de RhoE es la escasa supervivencia de los ratones: es letal en un porcentaje de los embriones y para la totalidad de los ratones en estadio postnatal, ya que ninguno supera la fase del destete. La letalidad embrionaria también se da en otros modelos de proteínas de la familia Rho, como Rac1, Cdc42 y RhoA los cuales no son viables (Sugihara *et al.* 1998, Cheng *et al.* 2000). También el KO de p190GAP-B es letal, pero lo es en el momento del nacimiento por incapacidad de hinchar los pulmones (Sordella *et al.* 2002). La letalidad a partir de la tercera semana puede ser debida a la incapacidad de los ratones RhoE *gt/gt* de comer pienso, aunque son capaces de masticar. Esta incapacidad puede ser debida a la ausencia del sentido del olfato. Nuestros resultados aportan pruebas que apoyan esta hipótesis: por un lado, pruebas morfológicas, ya que encontramos hipocelularidad y desestructuración del bulbo olfatorio y, por otro lado, pruebas funcionales, con la incapacidad de los ratones en realizar el *homing*.

Durante el periodo de tres semanas en que los ratones RhoE *gt/gt* viven, se aprecia un retraso en el desarrollo: los ratones son más pequeños al nacer y esta diferencia se agudiza con el tiempo. Esta disminución de tamaño es generalizada, ya que los animales tienen un tamaño proporcionado. También los órganos internos tienen un tamaño proporcionalmente menor que el de los controles WT. Este retraso en el desarrollo se manifiesta también en la apertura del conducto auditivo y en la de los ojos. Además también hay un retraso en el desarrollo de los huesos, ya que los ratones RhoE *gt/gt* presentan una menor densidad ósea a las tres semanas de vida y un retraso generalizado en el proceso de osificación durante el desarrollo embrionario.

El proceso de osificación de los huesos largos en los ratones comienza a partir del día 15 de embriogénesis. La osificación sucede en dos fases. En la primera de ellas, se produce una acumulación de cartílago y se mineraliza por liberación de grandes cantidades de calcio. Esto produce la muerte de los condrocitos. En la segunda fase, se produce invasión de capilares sanguíneos y de células osteogénicas.

Entonces, las células progenitoras se diferencian a osteoblastos. El proceso de desarrollo de los huesos del cráneo es distinto y se denomina osificación intramembranosa. Los dos procesos de osificación están retrasados en los ratones RhoE *gt/gt*, ya que en embriones de 17.5 días predomina el tejido cartilaginoso sobre el óseo, tanto en el cráneo como en el resto del cuerpo.

En el proceso de osificación están implicados múltiples genes, entre ellos se encuentra RhoA: mutaciones en el gen de RhoA están relacionadas con la densidad de la masa ósea (Mullin *et al.* 2009). RhoA regula la dinámica del citoesqueleto de actina y su polimerización y se ha visto que estos procesos son importantes en la biología del hueso (Paterson *et al.* 1990, Norman *et al.* 1994). RhoA también es capaz de diferenciar células madre mesenquimales hacia osteoblastos (McBeath *et al.* 2004). Los osteoclastos son células altamente móviles que dependen de los rápidos cambios en su citoesqueleto para lograr el movimiento y la adhesión que se necesita para la formación del hueso (Kanehisa *et al.* 1988, Lakkakorpi *et al.* 1991, 1996). RhoA regula la formación de fibras de estrés, la movilidad y la reabsorción de huesos en los osteoclastos (Chellaiah *et al.* 2000). También se ha demostrado que RhoA y su mayor efector ROCK están implicados en la condrogénesis (formación del cartílago) (Woods *et al.* 2007b). La señal RhoA/ROCK inhibe la condrogénesis reduciendo la expresión del factor de transcripción SOX9 (Woods *et al.* 2005). La inhibición de ROCK, por otro lado, provoca una sobreexpresión de SOX9 y produce un rescate del fenotipo de los condrocitos (Tew *et al.* 2006). RhoA induce proliferación de condrocitos, pero inhibe su diferenciación (Wang *et al.* 2004). En contraste Rac1 y Cdc42 promueven la condrogénesis (Woods *et al.* 2007a). En cultivo, la sobreexpresión de Rac1 y Cdc42 inhibe la proliferación de los condrocitos. Además, la supresión de la expresión de Rac1 en cartílagos tiene como resultado huesos largos, desorganización e hipocelularidad (Wang *et al.* 2007). Los condrocitos sin Rac1 en placa tienen reducida la adhesión a colágeno y fibronectina. Además de todos estos datos, nuestros resultados demuestran que también RhoE juega un papel importante en el proceso de osteogénesis, lo cual es explicable por la función de RhoE como inhibidor de la actividad de ROCK y como antagonista de RhoA.

Como se ha mencionado anteriormente, datos previos indicaban la posibilidad de que RhoE fuera relevante en el desarrollo y función del sistema nervioso. Una evidencia directa es la postura adoptada por los ratones RhoE *gt/gt* cuando son suspendidos por la cola, recogiendo las extremidades de una forma característica indicativa de problemas neurológicos. Consistente con este fenotipo, los ratones RhoE

gt/gt muestran un retraso en la desaparición de reflejos arcaicos, indicando un retraso en la maduración del sistema nervioso.

Las proteínas de la familia Rho están implicadas en la formación de axones y neuritas, ya que las dendritas están compuestas de microtúbulos recubiertos de una corteza de actina (Van Aelst *et al.* 2004), mientras que el citoesqueleto de las espinas dendríticas está formado totalmente de actina (Matus *et al.* 1982, Fifkova, 1985, Markham *et al.* 1986). Por ejemplo en el caso de RhoA, es capaz de colapsar el crecimiento dendrítico a través de la inducción de su efector ROCK (Ahnert-Hilger *et al.* 2004, Pilpel *et al.* 2004) el cual también es el efector de RhoE (Guasch *et al.* 1998, Riento *et al.* 2003).

Por otra parte, los ratones RhoE gt/gt presentan un defecto en las capacidades sensoriales. Hemos estudiado la aparición de respuestas reflejas sensoriales, observando que existe un retraso en la aparición de los reflejos de las extremidades posteriores. La causa puede estar en la ausencia del nervio peroneo, observada en estos animales y que también es responsable de la postura anómala de las extremidades posteriores y de un defecto en la marcha. Estos son datos de nuestro laboratorio pero no mostrados en este trabajo. Además, también presentan un retraso en la aparición de la respuesta refleja a un estímulo externo auditivo (test de Preyer). Esto puede ser consecuencia del retraso en la apertura del conducto auditivo.

Junto con el estudio de las respuestas reflejas, hemos testado la capacidad del ratón para reconocer su posición. Para ello utilizamos la geotaxia negativa, que consiste en situar al ratón en una gradilla metálica en un ángulo de 45° con la cabeza hacia abajo y medir el tiempo que tarda el ratón en reconocer su posición y darse la vuelta. Esta prueba sirve para evaluar el sistema vestibular y el sistema neuromotor (Fox 1965). A los ratones RhoE gt/gt les cuesta mucho más realizar esta prueba. Esto no es debido a un problema de movilidad, ya que sí que son capaces de darse la vuelta, pero, en vez de quedarse con la cabeza orientada hacia arriba, continúan girando sin reconocer su posición. Esto nos indicaría que el ratón RhoE gt/gt tiene dañado el sistema vestibular.

La última prueba para evaluar los defectos neurosensoriales de los ratones RhoE gt/gt es el *homing*. Dicha prueba sirve para evaluar el sistema motor, ya que tienen que ser capaces de desplazarse desde el lecho limpio al lecho sucio, y el sistema olfatorio, ya que tienen que ser capaces de reconocer el lecho sucio. Los ratones RhoE gt/gt tardan mucho más tiempo en encontrar el lecho sucio que sus hermanos de camada. Esto puede ser debido a defectos en el sistema olfativo ya que estos

animales son capaces de atravesar toda la jaula pero no son capaces de reconocer el lecho sucio. Otro de los datos que nos indican que los ratones podrían tener el sistema olfativo dañado es el estudio histológico que muestra que la estructura del bulbo olfatorio de los ratones RhoE gt/gt está alterada por una desorganización de sus capas y una hipocelularidad en esta zona. Además, estudios realizados en nuestro laboratorio que no se muestran en este trabajo, demuestran una alteración en la corriente migratoria rostral. Esta estructura está formada por un conjunto de neuronas que migran desde el primer ventrículo hasta el bulbo olfatorio y desde allí radialmente formando las capas del bulbo. En los ratones RhoE gt/gt estas neuronas se acumulan en el ventrículo ya que no pueden migrar hacia el bulbo olfatorio, por lo que esta estructura no se forma correctamente. Estos resultados nos sugieren que RhoE juega un papel esencial en la migración de las neuronas de la corriente migratoria rostral.

Cabía esperar resultados como este ya que las proteínas de la familia Rho juegan un papel importante en el desarrollo neuronal, tanto en la migración neuronal, como en la formación y crecimiento de neuritas o la formación y mantenimiento de las espinas dendríticas (Govek *et al.* 2005). Por ejemplo una de las proteínas de la subfamilia Rnd que también está implicada en migración de las neuronas es Rnd2, la cual es el mayor efector de Neurogenin-2, una proteína que controla la neurogénesis en la corteza cerebral. La sobreexpresión de esta proteína induce el aumento de Rnd2. El silenciamiento de la expresión de Rnd2 provoca un defecto sobre la migración de las neuronas corticales similar al observado al deleccionar Neurogenin-2 y la sobreexpresión de Rnd2 en ausencia de Neurogenin-2 recupera la capacidad migratoria (Heng *et al.* 2008).

Este defecto en la migración neuronal podría ser también el responsable de la hipocelularidad observada en la corteza cerebral, aunque no podemos descartar también un efecto de la ausencia de expresión de RhoE sobre la proliferación de estas células, tal y como se ha demostrado previamente en otros modelos celulares (Poch *et al.* 2007, Villalonga *et al.* 2004, Bektic *et al.* 2005). Otras proteínas de la familia Rho están implicadas en la formación del córtex. Por ejemplo, ratones KO condicionales de Cdc42 padecen una reducción en el tamaño del córtex cerebral (Garvalov *et al.* 2007). También en células corticales de rata, la sobreexpresión de un DN de Rac1 produce una interrupción del crecimiento de los axones (Threadgill *et al.* 1997). Estos resultados indican un papel importante de las proteínas de la familia Rho en la formación del córtex cerebral.

Junto con estas alteraciones en el bulbo olfatorio y la corteza cerebral, los ratones RhoE *gt/gt* presentan hidrocefalia en el 70% de los casos. Esta hidrocefalia parece ser del tipo no comunicante u obstructiva ya que normalmente afecta a un solo ventrículo. Este tipo de hidrocefalias ocurre cuando el flujo del líquido cerebroespinal se ve bloqueado a lo largo de una o más de las vías estrechas que conectan los ventrículos. La causa más frecuente de este tipo de hidrocefalia es congénita, por obstrucción del acueducto de Silvio, un pequeño conducto entre el tercero y cuarto ventrículos en la mitad del cerebro, aunque existen otras causas como la malformación de Arnold-Chiari (malformación en la cual se une la parte superior de la columna cervical y el cráneo e impide el correcto drenaje del líquido cefalorraquídeo). La hidrocefalia es muy común en personas con retraso mental y en síndromes asociados al cromosoma X. Uno de los primeros genes mutados identificados en pacientes con retraso mental ligado al cromosoma X y que está relacionado con la familia de las proteínas Rho, es el gen *OPHN1* que codifica la oligophrenin-1, la cual es un Rho-GAP y por lo tanto, regula negativamente a RhoA, Rac y Cdc42 (Bienvenu *et al.* 1997). También el ratón KO de p190GAP-B, presenta hidrocefalias (Sordella *et al.* 2002). Puesto que tanto esta proteína como RhoE regulan negativamente la actividad de RhoA, podría ser que un defecto en la regulación de la señalización de RhoA provocara esta malformación en la estructura del cerebro.

La ausencia de expresión de RhoE no sólo provoca alteraciones en el desarrollo neurosensorial sino también en el neuromotor. En este contexto, los ratones RhoE *gt/gt* muestran un retraso en la aparición del reflejo de volteo (*righting reflex*). Esta prueba consiste en situar al ratón con la espalda pegada al suelo y registrar el tiempo que tarda en recuperar la posición normal. Este defecto puede ser consecuencia de la postura anómala de las extremidades posteriores por la ausencia del nervio peroneo.

En los ratones RhoE *gt/gt* también se ve alterado el desarrollo de la locomoción. La locomoción consiste en un ensamblado de secuencias motoras con diferentes niveles de coordinación (intramuscular, intraarticular, interarticular,...) (Clarac *et al.* 2004). Durante el desarrollo locomotor ontogenético, se distinguen tres estadios. En el primero, la conducta viene dominada por movimientos de las extremidades anteriores, por lo que se produce un patrón denominado de pivote o "pivoting". El patrón locomotor de pivotación o "pivoting" es un patrón locomotor característico de los ratones neonatos, es dependiente de la maduración de las extremidades anteriores que se presenta de forma previa al de las extremidades posteriores que permiten desarrollar un patrón de marcha similar al del adulto y se considera una medida de la actividad motora inmadura en estadios tempranos. El segundo estadio, que en el ratón

corresponde aproximadamente a PD10, se caracteriza por la combinación de movimientos de pivote y movimientos de desplazamiento que incorporan las extremidades posteriores, si bien no se detecta aún un patrón adulto de marcha. En el tercer estadio prácticamente ha desaparecido la pivotación, y la marcha muestra un patrón adulto (PD14).

En ratones RhoE gt/gt durante el desarrollo postnatal se observa un incremento de patrones locomotores inmaduros (*pivoting*) durante la etapa intermedia y tardía del desarrollo. El menor número de “pivotings” observado en ratones RhoE gt/gt en estadios tempranos del desarrollo, muestra un retraso en la maduración de las extremidades anteriores. Por otra parte, el mayor número de “pivotings” observado en ratones RhoE gt/gt en estadios tardíos, indica un retraso en la aparición de un patrón de locomoción maduro, posiblemente dependiente de un retraso subyacente de la maduración cráneo-caudal del sistema motor espinal o por los defectos en el desarrollo de las extremidades posteriores explicados anteriormente. También se aprecia un retraso en la adquisición del patrón normal de marcha, en el que se registra el tiempo que tardan los ratones en comenzar a andar tras ser colocados en una superficie. Los ratones RhoE gt/gt tardan más tiempo en emprender la marcha que sus hermanos de camada hasta PD10, lo que indica un retraso en la maduración del sistema neuromotor.

Otra prueba que realizamos para evaluar el desarrollo neuromotor fue la suspensión (*wire suspension*). Se trata de una prueba que requiere la integridad del reflejo prensil, la coordinación motora y que la fuerza muscular esté conservada. Los ratones RhoE gt/gt soportaban menos tiempo aferrados a la barra que sus hermanos de camada en todas las fases del desarrollo en que se realizó esta prueba. Además, en el último día realizada, también los animales Heterocigotos se mantuvieron agarrados menos tiempo que los WT, lo que podría indicar un efecto de dosis génica. Relacionada con ésta es la prueba de suspensión vertical, sobre una gradilla en un ángulo de 90°. También los ratones RhoE gt/gt realizan peor esta prueba. Como consecuencia de la deficiente propiocepción (observada en la prueba de geotaxia negativa) y control postural y los defectos en el sistema motor, la habilidad de escalar es inexistente en los ratones RhoE gt/gt. Los déficits en coordinación motora observados en los ratones RhoE gt/gt pueden estar relacionados con la disfunción cerebelar o la disrupción de los componentes del movimiento, como el tono muscular o la respuesta de agarre (*grasping*), aunque esta respuesta en las extremidades anteriores en el proceso de desarrollo no parece alterada.

La postura anómala que presentan los ratones RhoE *gt/gt* recogiendo las extremidades al ser suspendidos por la cola, junto con las pruebas discutidas hasta el momento, indican que los ratones RhoE *gt/gt* presentan defectos en el sistema motor de forma generalizada, no sólo a nivel de las extremidades posteriores. Durante el periodo postnatal, hay tres elementos neurales diferentes que juegan un papel muy importante en la maduración de la locomoción y en su control neural: las aferencias sensoriales, las proyecciones descendentes y las motoneuronas (Clarac *et al.* 2004). Tal y como mostramos en estudios anteriores (Ballester-Lurbe *et al.* 2009) y como se muestra en este trabajo, RhoE se expresa en las motoneuronas de la médula espinal. Así pues, esta proteína podría estar jugando un papel importante en estas células. De hecho, tal y como demostramos, los ratones RhoE *gt/gt* tienen menor número de motoneuronas que sus hermanos de camada, en todas las secciones de la médula. No es la primera vez que se relaciona a las proteínas de la familia Rho con las motoneuronas. Por ejemplo RhoA y ROCK están implicadas en la supervivencia de las motoneuronas (Kobayashi *et al.* 2004a), ya que ratones transgénicos condicionales para mutantes DN de RhoA y ROCK muestran mayor apoptosis de motoneuronas en el proceso de embriogénesis. También la expresión de un DN de Rac1 en motoneuronas de la médula espinal de rata, induce muerte celular e inhibición del crecimiento axonal (Linseman *et al.* 2008). Otras evidencias también relacionan a la familia de las proteínas Rho con motoneuronas: mutaciones en el gen *ALS2*, que codifica Alsln, un GEF de Rac1, están implicadas en la esclerosis primaria lateral juvenil (Yang *et al.* 2001a, Eymard-Pierre *et al.* 2002). Además, Alsln promueve la supervivencia de las motoneuronas espinales cultivadas *in vitro* y este efecto es estrictamente dependiente de su actividad GEF sobre Rac1 (Jacquier *et al.* 2006).

El menor número de motoneuronas, causando una disminución en la masa muscular, podría explicar los déficits motores de los ratones RhoE *gt/gt*. Pero también las proteínas Rho están implicadas de forma directa en la formación de músculo. En la miogénesis es esencial la fusión de los mioblastos, en la cual la reorganización del citoesqueleto juega un papel muy importante. De hecho, se ha descrito que RhoE es esencial para la elongación y alineamiento de los mioblastos antes de la fusión y por lo tanto juega un papel importante en la inducción de miogénesis (Fortier *et al.* 2008). Por lo tanto, la ausencia de RhoE podría resultar en un retraso de la miogénesis y por supuesto en la reducción de la masa muscular. Esto también podría explicar el menor número de motoneuronas en los ratones RhoE *gt/gt* ya que un mecanismo que controla la supervivencia o la muerte de las neuronas en el desarrollo es el apoyo trófico de sus tejidos diana (Oppenheim, 1991).

Durante el estudio de los ratones RhoE *gt/gt* observamos que sufrían convulsiones espontáneas. El estudio farmacológico de las convulsiones no pudimos realizarlo con animales RhoE *gt/gt* por su debilidad y porque no llegaban a adultos, así que realizamos los ensayos con ratones heterocigotos, los cuales expresan la mitad de RhoE que los ratones WT. Utilizamos tres fármacos diferentes, Pentilentetrazol, Nicotina y Kainato.

Los resultados obtenidos con el Pentilentetrazol no muestran diferencias significativas entre los ratones RhoE *+/gt* y los WT, por lo que no parece que las convulsiones producidas por la ausencia de RhoE sean mediadas por la inhibición del sistema Gabaérgico. Sin embargo, sí que hay diferencias en los tratamientos con Nicotina y Kainato. En ambos casos, los ratones RhoE *+/gt* muestran una mayor sensibilidad a los fármacos. En el caso de la Nicotina existían diferencias entre los ratones WT y Heterocigotos en cuanto al tiempo que tardaban en aparecer las convulsiones y en la intensidad de éstas, mientras que en el caso del Kainato, las diferencias no eran con respecto al tiempo que tardaban en aparecer las convulsiones sino en cuanto a su intensidad. Estos resultados podrían indicarnos que las convulsiones espontáneas que sufren los ratones RhoE *gt/gt* serían debidas a defectos en los receptores NMDA del hipocampo.

No es la primera vez que se relacionan a las proteínas de la familia Rho o sus efectores con convulsiones. Por ejemplo, inhibidores de ROCK inhiben las convulsiones inducidas por el Pentilentetrazol (Inan *et al.* 2008). RhoA está activado en la corteza y el hipocampo después de una lesión cerebral realizada por convulsiones inducidas por el Kainato (Dubreuil *et al.* 2006). En las neuronas del hipocampo cultivadas, RhoA se asocia a los receptores NMDA en la membrana plasmática de las dendritas (Schubert *et al.* 2006). Los receptores NMDA han sido fuertemente implicados en la epilepsia y se han sugerido como dianas terapéuticas (Cull-Candy *et al.* 2001, Palmer, 2001), especialmente los receptores NMDA de las neuronas del giro dentado del hipocampo (Mody *et al.* 1987). Los receptores NMDA regulan la actividad de diversos Rho-GAPs, por ejemplo la subunidad NR2B interactúa con p250GAP que inactiva a RhoA pero no a Rac1 en las espinas dendríticas (Nakazawa *et al.* 2003).

¿Existe alguna relación molecular entre RhoE y las convulsiones epilépticas dependientes de los receptores NMDA? En un modelo de ratones transgénicos en los que se sobreexpresa un mutante de ERK constitutivamente activado en el hipocampo, se ha comprobado que se producen convulsiones espontáneas por un aumento de la

expresión y fosforilación de la subunidad NR2B del receptor NMDA en las neuronas del hipocampo (Nateri *et al.* 2007). Estudios previos de nuestro laboratorio demostraban que la sobreexpresión de RhoE reduce la fosforilación de ERK y por lo tanto su actividad (Poch *et al.* 2007). Con estos antecedentes, analizamos la expresión de NR2B y la fosforilación de ERK en extractos de hipocampo de los ratones RhoE gt/gt. Nuestros resultados indican que hay una mayor expresión de NR2B y un mayor grado de fosforilación (activación) de ERK en los extractos de hipocampo de los ratones RhoE gt/gt en comparación con sus controles WT. Con estos resultados podemos proponer que la ausencia de expresión de RhoE produce aparición de convulsiones espontáneas debido a un aumento de la activación de ERK en el hipocampo del ratón que conduciría a un aumento de la expresión de NR2B, lo que llevaría a un aumento de la sensibilidad al glutamato por aumento del número de receptores NMDA.

En resumen, nuestro estudio del modelo animal con ausencia de expresión de RhoE indica que esta proteína juega un papel muy importante en el desarrollo del sistema nervioso, poniendo de manifiesto además nuevas funciones hasta el momento desconocidas de esta proteína. El estudio *in vitro* con células en cultivo obtenidas a partir de los ratones RhoE gt/gt nos proporcionará información adicional sobre la función de esta proteína y las rutas de transducción de señales alteradas por su ausencia.

CONCLUSIONES

7 Conclusiones.

1. La ausencia de expresión de RhoE provoca una disminución del crecimiento del ratón y reduce la viabilidad.
2. Los ratones RhoE gt/gt presentan un retraso en el desarrollo del sistema nervioso, tanto a nivel neurosensorial como neuromotor, afectando de forma especial a las extremidades posteriores .
3. La ausencia de RhoE altera el proceso de osificación.
4. Los ratones deficientes en la expresión de RhoE presentan un menor número de motoneuronas espinales.
5. La ausencia de la expresión de RhoE provoca convulsiones espontáneas en el ratón, posiblemente debido a la sobreexpresión de NR2B en el hipocampo.
6. Los resultados de este trabajo sugieren que RhoE es una proteína esencial en el correcto desarrollo del sistema nervioso, así como desvelan nuevas funciones hasta el momento desconocidas de esta proteína.

BIBLIOGRAFÍA

8 Bibliografía.

- Adamson, P., Wilbourn, B., Etienne-Manneville, S., Calder, V., Beraud, E., Milligan, G., Couraud, P. O. and Greenwood, J. Lymphocyte trafficking through the blood-brain barrier is dependent on endothelial cell heterotrimeric G-protein signaling. *Faseb J*, **16**: 1185-1194, 2002.
- Adini, I., Rabinovitz, I., Sun, J. F., Prendergast, G. C. and Benjamin, L. E. RhoB controls Akt trafficking and stage-specific survival of endothelial cells during vascular development. *Genes Dev*, **17**: 2721-2732, 2003.
- Ahmed, S., Kozma, R., Hall, C. and Lim, L. GTPase-activating protein activity of n(alpha 1)-Chimaerin and effect of lipids. *Methods Enzymol*, **256**: 114-125, 1995.
- Ahnert-Hilger, G., Holtje, M., Grosse, G., Pickert, G., Mucke, C., Nixdorf-Bergweiler, B., Boquet, P., Hofmann, F. and Just, I. Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurones. *J Neurochem*, **90**: 9-18, 2004.
- Albertinazzi, C., Gilardelli, D., Paris, S., Longhi, R. and de Curtis, I. Overexpression of a neural-specific rho family GTPase, cRac1B, selectively induces enhanced neuritogenesis and neurite branching in primary neurons. *J Cell Biol*, **142**: 815-825, 1998.
- Arriemerlou, C., Donnadieu, E., Brennan, P., Keryer, G., Bismuth, G., Cantrell, D. and Trautmann, A. Involvement of phosphoinositide 3-kinase and Rac in membrane ruffling induced by IL-2 in T cells. *Eur J Immunol*, **28**: 1877-1885, 1998.
- Balmanno, K. and Cook, S. J. 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**: 3085-3097, 1999.
- Ballester-Lurbe, B., Poch, E., Mocholi, E., Guasch, R. M., Perez-Roger, I. and Terrado, J. RhoE is spatiotemporally regulated in the postnatal mouse CNS. *Neuroscience*, **163**: 586-593, 2009.
- Bao, W., Thullberg, M., Zhang, H., Onischenko, A. and Stromblad, S. Cell attachment to the extracellular matrix induces proteasomal degradation of p21(CIP1) via Cdc42/Rac1 signaling. *Mol Cell Biol*, **22**: 4587-4597, 2002.
- Bektic, J., Pfeil, K., Berger, A. P., Ramoner, R., Pelzer, A., Schafer, G., Kofler, K., Bartsch, G. and Klocker, H. Small G-protein RhoE is underexpressed in prostate cancer and induces cell cycle arrest and apoptosis. *Prostate*, 2005.
- Benninger, Y., Thurnherr, T., Pereira, J. A., Krause, S., Wu, X., Chrostek-Grashoff, A., Herzog, D., Nave, K. A., Franklin, R. J., Meijer, D., Brakebusch, C., Suter, U. and Relvas, J. B. Essential and distinct roles for cdc42 and rac1 in the regulation of Schwann cell biology during peripheral nervous system development. *J Cell Biol*, **177**: 1051-1061, 2007.
- Bergmann, C., Zerres, K., Senderek, J., Rudnik-Schoneborn, S., Eggermann, T., Hausler, M., Mull, M. and Ramaekers, V. T. Oligophrenin 1 (OPHN1) gene mutation causes syndromic X-linked mental retardation with epilepsy, rostral ventricular enlargement and cerebellar hypoplasia. *Brain*, **126**: 1537-1544, 2003.
- Besson, A., Gurian-West, M., Schmidt, A., Hall, A. and Roberts, J. M. p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev*, **18**: 862-876, 2004.
- Bienvenu, T., Der-Sarkissian, H., Billuart, P., Tissot, M., Des Portes, V., Bruls, T., Chabrolle, J. P., Chauveau, P., Cherry, M., Kahn, A., Cohen, D., Beldjord, C., Chelly, J. and Cherif, D. Mapping of the X-breakpoint involved in a balanced X;12 translocation in a female with mild mental retardation. *Eur J Hum Genet*, **5**: 105-109, 1997.
- Bishop, A. L. and Hall, A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*, **348 Pt 2**: 241-255, 2000.
- Boda, B., Alberi, S., Nikonenko, I., Node-Langlois, R., Jourdain, P., Moosmayer, M., Parisi-Jourdain, L. and Muller, D. The mental retardation protein PAK3 contributes to synapse formation and plasticity in hippocampus. *J Neurosci*, **24**: 10816-10825, 2004.

- Boureaux, A., Vignal, E., Faure, S. and Fort, P. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol*, **24**: 203-216, 2007.
- Bowerman, M., Shafey, D. and Kothary, R. Smn depletion alters profilin II expression and leads to upregulation of the RhoA/ROCK pathway and defects in neuronal integrity. *J Mol Neurosci*, **32**: 120-131, 2007.
- Brouns, M. R., Matheson, S. F., Hu, K. Q., Delalle, I., Caviness, V. S., Silver, J., Bronson, R. T. and Settleman, J. The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development*, **127**: 4891-4903, 2000.
- Brouns, M. R., Matheson, S. F. and Settleman, J. p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat Cell Biol*, **3**: 361-367, 2001.
- Burbelo, P. D., Miyamoto, S., Utani, A., Brill, S., Yamada, K. M., Hall, A. and Yamada, Y. p190-B, a new member of the Rho GAP family, and Rho are induced to cluster after integrin cross-linking. *J Biol Chem*, **270**: 30919-30926, 1995.
- Clarac, F., Brocard, F. and Vinay, L. The maturation of locomotor networks. *Prog Brain Res*, **143**: 57-66, 2004.
- Comery, T. A., Harris, J. B., Willems, P. J., Oostra, B. A., Irwin, S. A., Weiler, I. J. and Greenough, W. T. Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**: 5401-5404, 1997.
- Corbetta, S., D'Adamo, P., Gualdoni, S., Braschi, C., Berardi, N. and de Curtis, I. Hyperactivity and novelty-induced hyperreactivity in mice lacking Rac3. *Behav Brain Res*, **186**: 246-255, 2008.
- Corbetta, S., Gualdoni, S., Albertinazzi, C., Paris, S., Croci, L., Consalez, G. G. and de Curtis, I. Generation and characterization of Rac3 knockout mice. *Mol Cell Biol*, **25**: 5763-5776, 2005.
- Croft, D. R. and Olson, M. F. The Rho GTPase effector ROCK regulates cyclin A, cyclin D1, and p27Kip1 levels by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*, **26**: 4612-4627, 2006.
- Cull-Candy, S., Brickley, S. and Farrant, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol*, **11**: 327-335, 2001.
- Czuchra, A., Wu, X., Meyer, H., van Hengel, J., Schroeder, T., Geffers, R., Rottner, K. and Brakebusch, C. Cdc42 is not essential for filopodium formation, directed migration, cell polarization, and mitosis in fibroblastoid cells. *Mol Biol Cell*, **16**: 4473-4484, 2005.
- Chae, H. D., Lee, K. E., Williams, D. A. and Gu, Y. Cross-talk between RhoH and Rac1 in regulation of actin cytoskeleton and chemotaxis of hematopoietic progenitor cells. *Blood*, **111**: 2597-2605, 2008.
- Chardin, P. Function and regulation of Rnd proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**: 54-62, 2006.
- Chardin, P. 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, 1999.
- Chellaiah, M. A., Soga, N., Swanson, S., McAllister, S., Alvarez, U., Wang, D., Dowdy, S. F. and Hruska, K. A. Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption. *J Biol Chem*, **275**: 11993-12002, 2000.
- Chen, F., Ma, L., Parrini, M. C., Mao, X., Lopez, M., Wu, C., Marks, P. W., Davidson, L., Kwiatkowski, D. J., Kirchhausen, T., Orkin, S. H., Rosen, F. S., Mayer, B. J., Kirschner, M. W. and Alt, F. W. Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Curr Biol*, **10**: 758-765, 2000.
- Chen, L., Liao, G., Waclaw, R. R., Burns, K. A., Linqvist, D., Campbell, K., Zheng, Y. and Kuan, C. Y. Rac1 controls the formation of midline commissures and the competency of tangential migration in ventral telencephalic neurons. *J Neurosci*, **27**: 3884-3893, 2007.
- Cheng, H. L., Steinway, M. L., Russell, J. W. and Feldman, E. L. GTPases and phosphatidylinositol 3-kinase are critical for insulin-like growth factor-I-mediated Schwann cell motility. *J Biol Chem*, **275**: 27197-27204, 2000.

- Danesh, F. R., Sadeghi, M. M., Amro, N., Philips, C., Zeng, L., Lin, S., Sahai, A. and Kanwar, Y. S. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors prevent high glucose-induced proliferation of mesangial cells via modulation of Rho GTPase/ p21 signaling pathway: Implications for diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**: 8301-8305, 2002.
- Decourt, B., Bouleau, Y., Dulon, D. and Hafidi, A. Expression analysis of neuroleukin, calmodulin, cortactin, and Rho7/Rnd2 in the intact and injured mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res*, **159**: 36-54, 2005.
- Diekmann, D., Nobes, C. D., Burbelo, P. D., Abo, A. and Hall, A. Rac GTPase interacts with GAPs and target proteins through multiple effector sites. *Embo J*, **14**: 5297-5305, 1995.
- Dierssen, M., Benavides-Piccione, R., Martinez-Cue, C., Estivill, X., Florez, J., Elston, G. N. and DeFelipe, J. Alterations of neocortical pyramidal cell phenotype in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: effects of environmental enrichment. *Cereb Cortex*, **13**: 758-764, 2003.
- Dierssen, M., Fotaki, V., Martinez de Lagran, M., Gratacos, M., Arbones, M., Fillat, C. and Estivill, X. Neurobehavioral development of two mouse lines commonly used in transgenic studies. *Pharmacol Biochem Behav*, **73**: 19-25, 2002.
- Dorn, T., Kuhn, U., Bungartz, G., Stiller, S., Bauer, M., Ellwart, J., Peters, T., Scharffetter-Kochanek, K., Semmrich, M., Laschinger, M., Holzmann, B., Klinkert, W. E., Straten, P. T., Kollgaard, T., Sixt, M. and Brakebusch, C. RhoH is important for positive thymocyte selection and T-cell receptor signaling. *Blood*, **109**: 2346-2355, 2007.
- Dubreuil, C. I., Marklund, N., Deschamps, K., McIntosh, T. K. and McKerracher, L. Activation of Rho after traumatic brain injury and seizure in rats. *Exp Neurol*, **198**: 361-369, 2006.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*, **420**: 629-635, 2002.
- Eymard-Pierre, E., Lesca, G., Dollet, S., Santorelli, F. M., di Capua, M., Bertini, E. and Boespflug-Tanguy, O. Infantile-onset ascending hereditary spastic paralysis is associated with mutations in the alsin gene. *Am J Hum Genet*, **71**: 518-527, 2002.
- Fiegen, D., Blumenstein, L., Stege, P., Vetter, I. R. and Ahmadian, M. R. Crystal structure of Rnd3/RhoE: functional implications. *FEBS Lett*, **525**: 100-104, 2002.
- Fifkova, E. Actin in the nervous system. *Brain Res*, **356**: 187-215, 1985.
- Fortier, M., Comunale, F., Kucharczak, J., Blangy, A., Charrasse, S. and Gauthier-Rouviere, C. RhoE controls myoblast alignment prior fusion through RhoA and ROCK. *Cell Death Differ*, **15**: 1221-1231, 2008.
- Foster, R., Hu, K. Q., Lu, Y., Nolan, K. M., Thissen, J. and Settleman, J. Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Mol Cell Biol*, **16**: 2689-2699, 1996.
- Fox, W. M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim Behav*, **13**: 234-241, 1965.
- Fujisawa, K., Fujita, A., Ishizaki, T., Saito, Y. and Narumiya, S. Identification of the Rho-binding domain of p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase. *J Biol Chem*, **271**: 23022-23028, 1996.
- Fujita, H., Katoh, H., Ishikawa, Y., Mori, K. and Negishi, M. Rapostlin is a novel effector of Rnd2 GTPase inducing neurite branching. *J Biol Chem*, **277**: 45428-45434, 2002.
- Gallo, G. RhoA-kinase coordinates F-actin organization and myosin II activity during semaphorin-3A-induced axon retraction. *J Cell Sci*, **119**: 3413-3423, 2006.
- Garavini, H., Riento, K., Phelan, J. P., McAlister, M. S., Ridley, A. J. and Keep, N. H. Crystal structure of the core domain of RhoE/Rnd3: a constitutively activated small G protein. *Biochemistry*, **41**: 6303-6310, 2002.
- Garvalov, B. K., Flynn, K. C., Neukirchen, D., Meyn, L., Teusch, N., Wu, X., Brakebusch, C., Bamberg, J. R. and Bradke, F. Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J Neurosci*, **27**: 13117-13129, 2007.

- Ginsberg, M. H., Partridge, A. and Shattil, S. J. Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **17**: 509-516, 2005.
- Govek, E. E., Newey, S. E., Akerman, C. J., Cross, J. R., Van der Veken, L. and Van Aelst, L. The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat Neurosci*, **7**: 364-372, 2004.
- Govek, E. E., Newey, S. E. and Van Aelst, L. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev*, **19**: 1-49, 2005.
- Gu, Y., Chae, H. D., Siefiring, J. E., Jasti, A. C., Hildeman, D. A. and Williams, D. A. RhoH GTPase recruits and activates Zap70 required for T cell receptor signaling and thymocyte development. *Nat Immunol*, 2006.
- Gu, Y., Jasti, A. C., Jansen, M. and Siefiring, J. E. RhoH, a hematopoietic-specific Rho GTPase, regulates proliferation, survival, migration, and engraftment of hematopoietic progenitor cells. *Blood*, **105**: 1467-1475, 2005.
- Guasch, R. M., Scambler, P., Jones, G. E. and Ridley, A. J. RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Mol Cell Biol*, **18**: 4761-4771, 1998.
- Hakem, A., Sanchez-Sweetman, O., You-Ten, A., Duncan, G., Wakeham, A., Khokha, R. and Mak, T. W. RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis. *Genes Dev*, **19**: 1974-1979, 2005.
- Hansen, S. H., Zegers, M. M., Woodrow, M., Rodriguez-Viciana, P., Chardin, P., Mostov, K. E. and McMahon, M. 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**: 9364-9375, 2000.
- Hayashi, M. L., Choi, S. Y., Rao, B. S., Jung, H. Y., Lee, H. K., Zhang, D., Chattarji, S., Kirkwood, A. and Tonegawa, S. Altered cortical synaptic morphology and impaired memory consolidation in forebrain-specific dominant-negative PAK transgenic mice. *Neuron*, **42**: 773-787, 2004.
- Heasman, S. J. and Ridley, A. J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**: 690-701, 2008.
- Heng, J. I., Nguyen, L., Castro, D. S., Zimmer, C., Wildner, H., Armant, O., Skowronska-Krawczyk, D., Bedogni, F., Matter, J. M., Hevner, R. and Guillemot, F. Neurogenin 2 controls cortical neuron migration through regulation of Rnd2. *Nature*, **455**: 114-118, 2008.
- Hirai, A., Nakamura, S., Noguchi, Y., Yasuda, T., Kitagawa, M., Tatsuno, I., Oeda, T., Tahara, K., Terano, T., Narumiya, S., Kohn, L. D. and Saito, Y. 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**: 13-16, 1997.
- Hu, W., Bellone, C. J. and Baldassare, J. J. RhoA stimulates p27(Kip) degradation through its regulation of cyclin E/CDK2 activity. *J Biol Chem*, **274**: 3396-3401, 1999.
- Huang, M. and Prendergast, G. C. RhoB in cancer suppression. *Histol Histopathol*, **21**: 213-218, 2006.
- Ikeda, H., Nagashima, K., Yanase, M., Tomiya, T., Arai, M., Inoue, Y., Tejima, K., Nishikawa, T., Omata, M., Kimura, S. and Fujiwara, K. Involvement of Rho/Rho kinase pathway in regulation of apoptosis in rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **285**: G880-886, 2003.
- Inan, S. and Buyukafsar, K. Antiepileptic effects of two Rho-kinase inhibitors, Y-27632 and fasudil, in mice. *Br J Pharmacol*, **155**: 44-51, 2008.
- Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A., Watanabe, N., Saito, Y., Kakizuka, A., Morii, N. and Narumiya, S. 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**: 1885-1893, 1996.

- Jacquier, A., Buhler, E., Schafer, M. K., Bohl, D., Blanchard, S., Beclin, C. and Haase, G. Alsin/Rac1 signaling controls survival and growth of spinal motoneurons. *Ann Neurol*, **60**: 105-117, 2006.
- Jaffe, A. B. and Hall, A. Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv Cancer Res*, **84**: 57-80, 2002.
- Jaffe, A. B. and Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **21**: 247-269, 2005.
- Jaworski, D. M., Soloway, P., Caterina, J. and Falls, W. A. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2)-deficient mice display motor deficits. *J Neurobiol*, **66**: 82-94, 2006.
- Kakimoto, T., Katoh, H. and Negishi, M. Identification of splicing variants of Rapostlin, a novel RND2 effector that interacts with neural Wiskott-Aldrich syndrome protein and induces neurite branching. *J Biol Chem*, **279**: 14104-14110, 2004.
- Kanehisa, J. and Heersche, J. N. Osteoclastic bone resorption: in vitro analysis of the rate of resorption and migration of individual osteoclasts. *Bone*, **9**: 73-79, 1988.
- Katoh, H. and Negishi, M. RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. *Nature*, **424**: 461-464, 2003.
- Khelifaoui, M., Denis, C., van Galen, E., de Bock, F., Schmitt, A., Houbron, C., Morice, E., Giros, B., Ramakers, G., Fagni, L., Chelly, J., Nosten-Bertrand, M. and Billuart, P. Loss of X-linked mental retardation gene oligophrenin1 in mice impairs spatial memory and leads to ventricular enlargement and dendritic spine immaturity. *J Neurosci*, **27**: 9439-9450, 2007.
- Kobayashi, K., Takahashi, M., Matsushita, N., Miyazaki, J., Koike, M., Yaginuma, H., Osumi, N. and Kaibuchi, K. Survival of developing motor neurons mediated by Rho GTPase signaling pathway through Rho-kinase. *J Neurosci*, **24**: 3480-3488, 2004a.
- Kobayashi, K., Takahashi, M., Matsushita, N., Miyazaki, J., Koike, M., Yaginuma, H., Osumi, N., Kaibuchi, K. and Kobayashi, K. Survival of developing motor neurons mediated by Rho GTPase signaling pathway through Rho-kinase. *J Neurosci*, **24**: 3480-3488, 2004b.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A. and Lim, L. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **15**: 1942-1952, 1995.
- Kozma, R., Sarnier, S., Ahmed, S. and Lim, L. Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol Cell Biol*, **17**: 1201-1211, 1997.
- Lakkakorpi, P. T. and Vaananen, H. K. Cytoskeletal changes in osteoclasts during the resorption cycle. *Microsc Res Tech*, **33**: 171-181, 1996.
- Lakkakorpi, P. T. and Vaananen, H. K. Kinetics of the osteoclast cytoskeleton during the resorption cycle in vitro. *J Bone Miner Res*, **6**: 817-826, 1991.
- Laufs, U., Marra, D., Node, K. and Liao, J. K. 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**: 21926-21931, 1999.
- Leung, T., Manser, E., Tan, L. and Lim, L. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem*, **270**: 29051-29054, 1995.
- Li, X., Saint-Cyr-Proulx, E., Aktories, K. and Lamarche-Vane, N. Rac1 and Cdc42 but not RhoA or Rho kinase activities are required for neurite outgrowth induced by the Netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, **277**: 15207-15214, 2002.
- Liberto, M., Cobrinik, D. and Minden, A. Rho regulates p21(CIP1), cyclin D1, and checkpoint control in mammary epithelial cells. *Oncogene*, **21**: 1590-1599, 2002.

- Linseman, D. A. and Loucks, F. A. Diverse roles of Rho family GTPases in neuronal development, survival, and death. *Front Biosci*, **13**: 657-676, 2008.
- Liu, A. X., Rane, N., Liu, J. P. and Prendergast, G. C. RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Mol Cell Biol*, **21**: 6906-6912, 2001.
- Liu, N., Zhang, G., Bi, F., Pan, Y., Xue, Y., Shi, Y., Yao, L., Zhao, L., Zheng, Y. and Fan, D. RhoC is essential for the metastasis of gastric cancer. *J Mol Med*, **85**: 1149-1156, 2007.
- Luo, L., Liao, Y. J., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev*, **8**: 1787-1802, 1994.
- Madigan, J. P., Bodemann, B. O., Brady, D. C., Dewar, B. J., Keller, P. J., Leitges, M., Philips, M. R., Ridley, A. J., Der, C. J. and Cox, A. D. Regulation of Rnd3 localization and function by protein kinase C alpha-mediated phosphorylation. *Biochem J*, **424**: 153-161, 2009.
- Mammoto, A., Huang, S., Moore, K., Oh, P. and Ingber, D. E. Role of RhoA, mDia, and ROCK in cell shape-dependent control of the Skp2-p27kip1 pathway and the G1/S transition. *J Biol Chem*, **279**: 26323-26330, 2004.
- Markham, J. A. and Fikova, E. Actin filament organization within dendrites and dendritic spines during development. *Brain Res*, **392**: 263-269, 1986.
- Matus, A., Ackermann, M., Pehling, G., Byers, H. R. and Fujiwara, K. High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**: 7590-7594, 1982.
- McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K. and Chen, C. S. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell*, **6**: 483-495, 2004.
- Mehta, J. L., Chen, H. J. and Li, D. Y. Protection of myocytes from hypoxia-reoxygenation injury by nitric oxide is mediated by modulation of transforming growth factor-beta1. *Circulation*, **105**: 2206-2211, 2002.
- Meng, J., Meng, Y., Hanna, A., Janus, C. and Jia, Z. Abnormal long-lasting synaptic plasticity and cognition in mice lacking the mental retardation gene Pak3. *J Neurosci*, **25**: 6641-6650, 2005.
- Miyashita, M., Ohnishi, H., Okazawa, H., Tomonaga, H., Hayashi, A., Fujimoto, T. T., Furuya, N. and Matozaki, T. Promotion of neurite and filopodium formation by CD47: roles of integrins, Rac, and Cdc42. *Mol Biol Cell*, **15**: 3950-3963, 2004.
- Mody, I. and Heinemann, U. NMDA receptors of dentate gyrus granule cells participate in synaptic transmission following kindling. *Nature*, **326**: 701-704, 1987.
- Moon, S. Y., Zang, H. and Zheng, Y. Characterization of a brain-specific Rho GTPase-activating protein, p200RhoGAP. *J Biol Chem*, **278**: 4151-4159, 2003.
- Mortazavi, F., Ericson, M., Story, D., Hulce, V. D. and Dunbar, G. L. Spatial learning deficits and emotional impairments in pentylenetetrazole-kindled rats. *Epilepsy Behav*, **7**: 629-638, 2005.
- Mullin, B. H., Prince, R. L., Mamotte, C., Spector, T. D., Hart, D. J., Dudbridge, F. and Wilson, S. G. Further genetic evidence suggesting a role for the RhoGTPase-RhoGEF pathway in osteoporosis. *Bone*, **45**: 387-391, 2009.
- Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., Nakao, K. and Narumiya, S. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett*, **392**: 189-193, 1996.
- Nakamura, K., Yamashita, Y., Tamamaki, N., Katoh, H., Kaneko, T. and Negishi, M. In vivo function of Rnd2 in the development of neocortical pyramidal neurons. *Neurosci Res*, **54**: 149-153, 2006.
- Nakazawa, T., Watabe, A. M., Tezuka, T., Yoshida, Y., Yokoyama, K., Umemori, H., Inoue, A., Okabe, S., Manabe, T. and Yamamoto, T. p250GAP, a novel brain-enriched GTPase-activating

- protein for Rho family GTPases, is involved in the N-methyl-d-aspartate receptor signaling. *Mol Biol Cell*, **14**: 2921-2934, 2003.
- Nateri, A. S., Raivich, G., Gebhardt, C., Da Costa, C., Naumann, H., Vreugdenhil, M., Makwana, M., Brandner, S., Adams, R. H., Jefferys, J. G., Kann, O. and Behrens, A. ERK activation causes epilepsy by stimulating NMDA receptor activity. *EMBO J*, **26**: 4891-4901, 2007.
- Nimchinsky, E. A., Oberlander, A. M. and Svoboda, K. Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. *J Neurosci*, **21**: 5139-5146, 2001.
- Nobes, C. D., Lauritzen, I., Mattei, M. G., Paris, S., Hall, A. and Chardin, P. A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol*, **141**: 187-197, 1998.
- Nodari, A., Zambroni, D., Quattrini, A., Court, F. A., D'Urso, A., Recchia, A., Tybulewicz, V. L., Wrabetz, L. and Feltri, M. L. Beta1 integrin activates Rac1 in Schwann cells to generate radial lamellae during axonal sorting and myelination. *J Cell Biol*, **177**: 1063-1075, 2007.
- Node-Langlois, R., Muller, D. and Boda, B. Sequential implication of the mental retardation proteins ARHGEF6 and PAK3 in spine morphogenesis. *J Cell Sci*, **119**: 4986-4993, 2006.
- Norman, J. C., Price, L. S., Ridley, A. J., Hall, A. and Koffer, A. Actin filament organization in activated mast cells is regulated by heterotrimeric and small GTP-binding proteins. *J Cell Biol*, **126**: 1005-1015, 1994.
- Olofsson, B. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal*, **11**: 545-554, 1999.
- Olson, M. F., Ashworth, A. and Hall, A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science*, **269**: 1270-1272, 1995.
- Oppenheim, R. W. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci*, **14**: 453-501, 1991.
- Palmer, G. C. Neuroprotection by NMDA receptor antagonists in a variety of neuropathologies. *Curr Drug Targets*, **2**: 241-271, 2001.
- Paterson, H. F., Self, A. J., Garrett, M. D., Just, I., Aktories, K. and Hall, A. Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol*, **111**: 1001-1007, 1990.
- Perez-Roger, I., Kim, S. H., Griffiths, B., Sewing, A. and Land, H. Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *EMBO J*, **18**: 5310-5320, 1999.
- Philip, N., Chabrol, B., Lossi, A. M., Cardoso, C., Guerrini, R., Dobyns, W. B., Raybaud, C. and Villard, L. Mutations in the oligophrenin-1 gene (OPHN1) cause X linked congenital cerebellar hypoplasia. *J Med Genet*, **40**: 441-446, 2003.
- Pilpel, Y. and Segal, M. Activation of PKC induces rapid morphological plasticity in dendrites of hippocampal neurons via Rac and Rho-dependent mechanisms. *Eur J Neurosci*, **19**: 3151-3164, 2004.
- Poch, E., Minambres, R., Mocholi, E., Ivorra, C., Perez-Arago, A., Guerri, C., Perez-Roger, I. and Guasch, R. M. RhoE interferes with Rb inactivation and regulates the proliferation and survival of the U87 human glioblastoma cell line. *Exp Cell Res*, 2007.
- Pruitt, K. and Der, C. J. Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Lett*, **171**: 1-10, 2001.
- Prybylowski, K. and Wenthold, R. J. N-Methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. *J Biol Chem*, **279**: 9673-9676, 2004.
- Ridley, A. J. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci*, **114**: 2713-2722, 2001.
- Ridley, A. J., Comoglio, P. M. and Hall, A. Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. *Mol Cell Biol*, **15**: 1110-1122, 1995.

- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D. and Hall, A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, **70**: 401-410, 1992.
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T. and Horwitz, A. R. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, **302**: 1704-1709, 2003.
- Riento, K., Guasch, R. M., Garg, R., Jin, B. and Ridley, A. J. RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol*, **23**: 4219-4229, 2003.
- Riento, K., Totty, N., Villalonga, P., Garg, R., Guasch, R. and Ridley, A. J. RhoE function is regulated by ROCK I-mediated phosphorylation. *Embo J*, 2005.
- Roovers, K. and Assoian, R. K. Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays*, **22**: 818-826, 2000.
- Roovers, K., Davey, G., Zhu, X., Bottazzi, M. E. and Assoian, R. K. Alpha5beta1 integrin controls cyclin D1 expression by sustaining mitogen-activated protein kinase activity in growth factor-treated cells. *Mol Biol Cell*, **10**: 3197-3204, 1999.
- Roovers, K., Klein, E. A., Castagnino, P. and Assoian, R. K. Nuclear translocation of LIM kinase mediates Rho-Rho kinase regulation of cyclin D1 expression. *Dev Cell*, **5**: 273-284, 2003.
- Sahai, E. and Marshall, C. J. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer*, **2**: 133-142, 2002.
- Schubert, V., Da Silva, J. S. and Dotti, C. G. Localized recruitment and activation of RhoA underlies dendritic spine morphology in a glutamate receptor-dependent manner. *J Cell Biol*, **172**: 453-467, 2006.
- Sears, R. C. and Nevins, J. R. Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *J Biol Chem*, **277**: 11617-11620, 2002.
- Settleman, J., Narasimhan, V., Foster, L. C. and Weinberg, R. A. Molecular cloning of cDNAs encoding the GAP-associated protein p190: implications for a signaling pathway from ras to the nucleus. *Cell*, **69**: 539-549, 1992.
- Shimizu, Y., Thumkeo, D., Keel, J., Ishizaki, T., Oshima, H., Oshima, M., Noda, Y., Matsumura, F., Taketo, M. M. and Narumiya, S. ROCK-I regulates closure of the eyelids and ventral body wall by inducing assembly of actomyosin bundles. *J Cell Biol*, **168**: 941-953, 2005.
- Simpson, K. J., Dugan, A. S. and Mercurio, A. M. Functional analysis of the contribution of RhoA and RhoC GTPases to invasive breast carcinoma. *Cancer Res*, **64**: 8694-8701, 2004.
- Sordella, R., Classon, M., Hu, K. Q., Matheson, S. F., Brouns, M. R., Fine, B., Zhang, L., Takami, H., Yamada, Y. and Settleman, J. Modulation of CREB activity by the Rho GTPase regulates cell and organism size during mouse embryonic development. *Dev Cell*, **2**: 553-565, 2002.
- Spencer, S. S. and Spencer, D. D. Entorhinal-hippocampal interactions in medial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, **35**: 721-727, 1994.
- Sperk, G., Lassmann, H., Baran, H., Kish, S. J., Seitelberger, F. and Hornykiewicz, O. Kainic acid induced seizures: neurochemical and histopathological changes. *Neuroscience*, **10**: 1301-1315, 1983.
- Stowers, L., Yelon, D., Berg, L. J. and Chant, J. Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**: 5027-5031, 1995.
- Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A. and Katsuki, M. Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene*, **17**: 3427-3433, 1998.
- Sun, C. X., Downey, G. P., Zhu, F., Koh, A. L., Thang, H. and Glogauer, M. Rac1 is the small GTPase responsible for regulating the neutrophil chemotaxis compass. *Blood*, **104**: 3758-3765, 2004.
- Talens-Visconti, R., Peris, B., Guerri, C. and Guasch, R. M. RhoE stimulates neurite-like outgrowth in PC12 cells through inhibition of the RhoA/ROCK-I signalling. *J Neurochem*, 2009.

- Tan, A., Bolscher, J., Feltkamp, C. and Ploegh, H. Retrograde transport from the Golgi region to the endoplasmic reticulum is sensitive to GTP gamma S. *J Cell Biol*, **116**: 1357-1367, 1992.
- Tanaka, H., Katoh, H. and Negishi, M. Pragmin, a novel effector of Rnd2 GTPase, stimulates RhoA activity. *J Biol Chem*, **281**: 10355-10364, 2006.
- Tatsis, N., Lannigan, D. A. and Macara, I. G. The function of the p190 Rho GTPase-activating protein is controlled by its N-terminal GTP binding domain. *J Biol Chem*, **273**: 34631-34638, 1998.
- Tentler, D., Gustavsson, P., Leisti, J., Schueler, M., Chelly, J., Timonen, E., Anneren, G., Willard, H. F. and Dahl, N. Deletion including the oligophrenin-1 gene associated with enlarged cerebral ventricles, cerebellar hypoplasia, seizures and ataxia. *Eur J Hum Genet*, **7**: 541-548, 1999.
- Tew, S. R. and Hardingham, T. E. Regulation of SOX9 mRNA in human articular chondrocytes involving p38 MAPK activation and mRNA stabilization. *J Biol Chem*, **281**: 39471-39479, 2006.
- Threadgill, R., Bobb, K. and Ghosh, A. Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron*, **19**: 625-634, 1997.
- Thumkeo, D., Keel, J., Ishizaki, T., Hirose, M., Nonomura, K., Oshima, H., Oshima, M., Taketo, M. M. and Narumiya, S. Targeted disruption of the mouse rho-associated kinase 2 gene results in intrauterine growth retardation and fetal death. *Mol Cell Biol*, **23**: 5043-5055, 2003.
- Topp, J. D., Gray, N. W., Gerard, R. D. and Horazdovsky, B. F. Alsin is a Rab5 and Rac1 guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem*, **279**: 24612-24623, 2004.
- Turner, D. A. and Wheal, H. V. Excitatory synaptic potentials in kainic acid-denervated rat CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci*, **11**: 2786-2794, 1991.
- Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M. and Narumiya, S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, **389**: 990-994, 1997.
- Vahdati-Ben Arieh, S., Laham, N., Schechter, C., Yewdell, J. W., Coligan, J. E. and Ehrlich, R. A single viral protein HCMV US2 affects antigen presentation and intracellular iron homeostasis by degradation of classical HLA class I and HFE molecules. *Blood*, **101**: 2858-2864, 2003.
- Van Aelst, L. and Cline, H. T. Rho GTPases and activity-dependent dendrite development. *Curr Opin Neurobiol*, **14**: 297-304, 2004.
- Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*, **11**: 2295-2322, 1997.
- Vega, F. M. and Ridley, A. J. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett*, **582**: 2093-2101, 2008.
- Vega, F. M. and Ridley, A. J. SnapShot: Rho family GTPases. *Cell*, **129**: 1430, 2007.
- Vidal, A., Millard, S. S., Miller, J. P. and Koff, A. 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**: 16433-16440, 2002.
- Villalonga, P., Guasch, R. M., Riento, K. and Ridley, A. J. RhoE inhibits cell cycle progression and Ras-induced transformation. *Mol Cell Biol*, **24**: 7829-7840, 2004.
- Vincent, S. and Settleman, J. Inhibition of RhoGAP activity is sufficient for the induction of Rho-mediated actin reorganization. *Eur J Cell Biol*, **78**: 539-548, 1999.
- Wahl, S., Barth, H., Ciossek, T., Aktories, K. and Mueller, B. K. Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *J Cell Biol*, **149**: 263-270, 2000.
- Wang, G., Woods, A., Agoston, H., Ulici, V., Glogauer, M. and Beier, F. Genetic ablation of Rac1 in cartilage results in chondrodysplasia. *Dev Biol*, **306**: 612-623, 2007.
- Wang, G., Woods, A., Sabari, S., Pagnotta, L., Stanton, L. A. and Beier, F. RhoA/ROCK signaling suppresses hypertrophic chondrocyte differentiation. *J Biol Chem*, **279**: 13205-13214, 2004.

- Weber, J. D., Hu, W., Jefcoat, S. C., Jr., Raben, D. M. and Baldassare, J. J. 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**: 32966-32971, 1997.
- Wells, C. M., Walmsley, M., Ooi, S., Tybulewicz, V. and Ridley, A. J. Rac1-deficient macrophages exhibit defects in cell spreading and membrane ruffling but not migration. *J Cell Sci*, **117**: 1259-1268, 2004.
- Wennerberg, K., Forget, M. A., Ellerbroek, S. M., Arthur, W. T., BurrIDGE, K., Settleman, J., Der, C. J. and Hansen, S. H. Rnd proteins function as RhoA antagonists by activating p190 RhoGAP. *Curr Biol*, **13**: 1106-1115, 2003.
- Wheeler, A. P., Wells, C. M., Smith, S. D., Vega, F. M., Henderson, R. B., Tybulewicz, V. L. and Ridley, A. J. Rac1 and Rac2 regulate macrophage morphology but are not essential for migration. *J Cell Sci*, **119**: 2749-2757, 2006.
- Woods, A., Wang, G. and Beier, F. RhoA/ROCK signaling regulates Sox9 expression and actin organization during chondrogenesis. *J Biol Chem*, **280**: 11626-11634, 2005.
- Woods, A., Wang, G., Dupuis, H., Shao, Z. and Beier, F. Rac1 signaling stimulates N-cadherin expression, mesenchymal condensation, and chondrogenesis. *J Biol Chem*, **282**: 23500-23508, 2007a.
- Woods, G., Miceli, M. H., Graziutti, M. L., Zhao, W., Barlogie, B. and Anaissie, E. Serum Aspergillus galactomannan antigen values strongly correlate with outcome of invasive aspergillosis: a study of 56 patients with hematologic cancer. *Cancer*, **110**: 830-834, 2007b.
- Wu, M., Wu, Z. F., Kumar-Sinha, C., Chinnaiyan, A. and Merajver, S. D. RhoC induces differential expression of genes involved in invasion and metastasis in MCF10A breast cells. *Breast Cancer Res Treat*, **84**: 3-12, 2004.
- Yang, F. C., Atkinson, S. J., Gu, Y., Borneo, J. B., Roberts, A. W., Zheng, Y., Pennington, J. and Williams, D. A. Rac and Cdc42 GTPases control hematopoietic stem cell shape, adhesion, migration, and mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**: 5614-5618, 2001a.
- Yang, H. Y., Wilkening, S. and Iadarola, M. J. Spinal cord genes enriched in rat dorsal horn and induced by noxious stimulation identified by subtraction cloning and differential hybridization. *Neuroscience*, **103**: 493-502, 2001b.
- Yang, L., Wang, L., Geiger, H., Cancelas, J. A., Mo, J. and Zheng, Y. Rho GTPase Cdc42 coordinates hematopoietic stem cell quiescence and niche interaction in the bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**: 5091-5096, 2007.
- Yang, L., Wang, L. and Zheng, Y. Gene targeting of Cdc42 and Cdc42GAP affirms the critical involvement of Cdc42 in filopodia induction, directed migration, and proliferation in primary mouse embryonic fibroblasts. *Mol Biol Cell*, **17**: 4675-4685, 2006a.
- Yang, Y., Marcello, M., Endris, V., Saffrich, R., Fischer, R., Trendelenburg, M. F., Sprengel, R. and Rappold, G. MEGAP impedes cell migration via regulating actin and microtubule dynamics and focal complex formation. *Exp Cell Res*, **312**: 2379-2393, 2006b.
- Yao, H., Dashner, E. J., van Golen, C. M. and van Golen, K. L. RhoC GTPase is required for PC-3 prostate cancer cell invasion but not motility. *Oncogene*, **25**: 2285-2296, 2006.
- Yoshihara, Y., Onodera, H., Iinuma, K. and Itoyama, Y. Abnormal kainic acid receptor density and reduced seizure susceptibility in dystrophin-deficient mdx mice. *Neuroscience*, **117**: 391-395, 2003.
- Zambrowicz, B. P., Friedrich, G. A., Buxton, E. C., Lilleberg, S. L., Person, C. and Sands, A. T. Disruption and sequence identification of 2,000 genes in mouse embryonic stem cells. *Nature*, **392**: 608-611, 1998.
- Zambrowicz, B. P. and Sands, A. T. Knockouts model the 100 best-selling drugs--will they model the next 100? *Nat Rev Drug Discov*, **2**: 38-51, 2003.

Zhang, H., Webb, D. J., Asmussen, H., Niu, S. and Horwitz, A. F. A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *J Neurosci*, **25**: 3379-3388, 2005.

Zuckerbraun, B. S., Shapiro, R. A., Billiar, T. R. and Tzeng, E. RhoA influences the nuclear localization of extracellular signal-regulated kinases to modulate p21Waf/Cip1 expression. *Circulation*, **108**: 876-881, 2003.