

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Ciencias Biomédicas



CEU

*Universidad
Cardenal Herrera*

Implicación de RhoE en supresión tumoral

TESIS DOCTORAL

Autora: Marta Hernández Sánchez

Directores: Dr. Enric Poch Jiménez

Dr. Ignacio Pérez Roger

VALENCIA 2012



CEU

*Universidad
Cardenal Herrera*

Enric Poch Jiménez e Ignacio Pérez Roger, Profesores del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad CEU-Cardenal Herrera,

INFORMAN: que el trabajo titulado “Implicación de RhoE en supresión tumoral” ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad CEU-Cardenal Herrera por **Marta Hernández Sánchez**, Licenciada en Veterinaria.

Consideramos que este trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para que la interesada pueda optar al título de Doctora por la Universidad CEU-Cardenal Herrera.

Valencia, 2 de Mayo de 2012

Enric Poch Jiménez

Ignacio Pérez Roger

RESUMEN

RhoE (también llamada Rnd3) es una GTPasa atípica, ya que se encuentra unida permanentemente a GTP y carece de actividad GTPasa. Pertenece a la familia de proteínas Rho, relacionadas con la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina y con otras funciones celulares como la migración, proliferación y supervivencia. En trabajos previos, describimos que la sobreexpresión de RhoE induce una parada del ciclo celular y también apoptosis en diferentes líneas tumorales. En este estudio nos planteamos abordar el posible papel oncosupresor de RhoE utilizando un modelo de ratón en que la expresión de esta proteína está interrumpida por un cassette *gene trap* (RhoE *gt*).

Con este modelo, hemos caracterizado los fibroblastos primarios derivados de embriones carentes de la expresión de RhoE (RhoE *gt/gt*) con respecto a las distintas funciones que se han asignado previamente a esta proteína, tales como el efecto sobre el citoesqueleto de actina, la inhibición de la vía RhoA/ROCK/MLC, la resistencia a genotóxicos y la proliferación celular. Además, hemos utilizado dos modelos de carcinogénesis inducida para determinar el impacto de la ausencia de RhoE sobre la aparición de tumores. Finalmente, hemos investigado la importancia de RhoE en el proceso de metástasis silenciando la expresión de esta proteína en células MDA-MB-231.

Nuestros resultados indican que la ausencia de RhoE produce un aumento de las fibras de estrés de actina, probablemente a través de la ruta Cdc42/PAK-1/MLC. A diferencia de lo descrito previamente en otros modelos, los fibroblastos carentes de la expresión de RhoE no se diferencian de los silvestres en cuanto a la resistencia a genotóxicos ni a la proliferación celular. Sin embargo, presentan una mayor rapidez de immortalización por pases seriados y pérdida de la inhibición por contacto. Además, la ausencia de RhoE coopera con E1A y Ras^{V12} en la formación de colonias. Finalmente, los ratones heterocigotos RhoE *+gt* tienen una mayor susceptibilidad a la aparición de papilomas y conversión a carcinomas en el modelo de carcinogénesis en piel por DMBA/TPA. Además, al silenciar la expresión de RhoE en células MDA-MB-231 aumenta la capacidad metastática en un modelo de xenotrasplante en ratones inmunocomprometidos *nu/nu*.

Todos estos resultados demuestran la implicación de RhoE en el control de la respuesta proliferativa a diversos estímulos, con especial impacto en la iniciación y progresión tumoral.

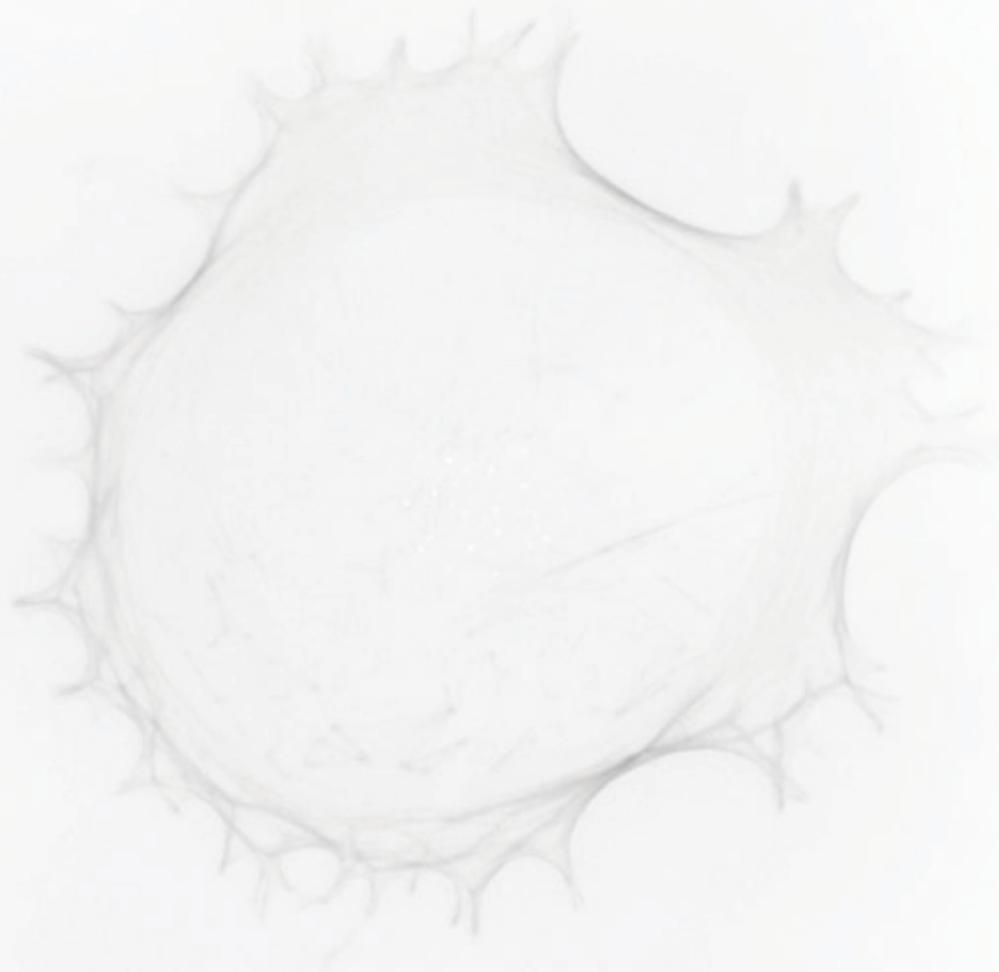
SUMMARY

RhoE (Rnd3) belongs to the Rho family proteins that play a pivotal role in the regulation of actin cytoskeleton dynamics and other cellular functions such as migration, proliferation and survival. RhoE is part of the so-called "atypical Rho proteins" as it lacks GTPase activity and acts by inhibiting the RhoA signaling pathway. In previous studies, we reported that RhoE overexpression induces cell cycle arrest and apoptosis in various tumor cell lines, which led us to propose RhoE as a tumor suppressor. In this study, we address this hypothesis by using a mouse model in which the expression of RhoE is interrupted by a *gene trap* cassette (RhoE *gt/gt*).

First, we have characterized the primary fibroblasts derived from embryos lacking RhoE expression (RhoE *gt/gt*) regarding some functions that have been previously assigned to this protein, such as the effect on the actin cytoskeleton, RhoA/ROCK/MLC pathway inhibition, resistance to genotoxic stress and cell proliferation. In addition, we used two models of carcinogenesis to determine the impact of the absence of RhoE on tumor initiation and progression. Finally, we investigated the importance of RhoE in the process of metastasis silencing its expression in MDA-MB-231 cells.

Our results indicate that the absence of RhoE produces an increase in actin stress fibers and substrate adhesion in mouse embryonic fibroblasts, probably through the Cdc42/PAK-1/MLC pathway. However, unlike previously described in other models, RhoE is not involved in the survival of these cells in response to genotoxic stress or cell proliferation. However, they have a faster immortalization by serial passage and loss of contact inhibition. Furthermore, the absence of RhoE cooperates with E1A and Ras^{V12} in oncogenic transformation. Finally, RhoE *+gt* mice have a greater susceptibility to the development of papillomas and conversion to carcinomas in a DMBA/TPA skin carcinogenesis model. Moreover, silencing of RhoE enhances the metastatic capacity of MDA-MB-231 cells in a model of xenotransplantation in immunocompromised mice *nu/nu*.

All these results demonstrate the relevance of RhoE in the control of the proliferative response to stimuli, highlighting its importance in the initiation and progression.



Índice

ABREVIATURAS.....5

INTRODUCCIÓN.....9

1. Cáncer	11
2. Proteínas Rho	12
2.1. Proteínas Rho y citoesqueleto	14
2.2. Proteínas Rnd.....	15
2.3. Proteínas Rho y ciclo celular.....	17
2.4. Proteínas Rho y cáncer	18
3. RhoE.....	19
3.1. RhoE y citoesqueleto	19
3.2. RhoE, ciclo celular y cáncer.....	21

OBJETIVOS.....25

MATERIAL Y MÉTODOS.....29

1. Animales	31
1.1. Estabulación	31
1.2. Generación de ratones RhoE gt/gt.....	31
1.3. Genotipado	32
2. Cultivos celulares.....	33
3. Infecciones.....	34
3.1. Infección con vectores retrovirales.....	34
3.2. Silenciamiento de RhoE con vectores lentivirales	34
4. Detección de proteínas por inmunoblot	35
5. Análisis de la actividad de proteínas.....	38
5.1. Análisis de la actividad de proteínas Rho (GTP-Pull Down)	38
5.2. Análisis de la actividad de ROCK-I	39
6. Inmunofluorescencia.....	39
7. Inmunohistoquímica.....	40
8. Análisis histológico	41
8.1. Tinción con Hematoxilina-Eosina	41
8.2. Tinción con X-Gal	42
9. Ensayos de adhesión y migración celular.....	43
9.1. Ensayo de adhesión celular	43
9.2. Ensayo de cierre de herida (wound-healing).....	43
9.3. Ensayo de migración utilizando el Cell Observer	43
10. Ensayos de proliferación y supervivencia celular	44
10.1. Curvas de crecimiento	44
10.2. Análisis del ciclo celular	44
10.3. Ensayos de inhibición por contacto.....	45
10.4. Ensayos de supervivencia celular	45
11. Ensayos de transformación <i>in vitro</i>	46
11.1. Ensayo de immortalización por pases seriados (protocolo 3T3)	46
11.2. Ensayo de transformación con oncogenes	46
12. Ensayos de carcinogénesis <i>in vivo</i>	46
12.1. Ensayo de formación de fibrosarcomas	46
12.2. Protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón	47

12.3. Respuesta proliferativa a TPA	47
12.4. Ensayo de tumorigénesis en ratones inmunocomprometidos nu/nu	48
12.4.1. Utilizando células derivadas de fibrosarcomas	48
12.4.2. Utilizando células MEF transformadas con E1A y Ras ^{V12}	48
12.5. Ensayos experimentales de metástasis	48
13. Análisis estadístico	49
RESULTADOS.....	51
1. La ausencia de RhoE produce un aumento del número de fibras de estrés de actina y aumenta la adhesión al sustrato	53
2. La ausencia de RhoE provoca un aumento del fenotipo de fibras de estrés de actina a través de la ruta Cdc42/PAK-1/MLC.....	63
3. RhoE no está implicada en respuesta a genotóxicos	67
4. La ausencia de RhoE no altera la proliferación celular.....	71
5. Los fibroblastos embrionarios RhoE <i>gt/gt</i> presentan una menor inhibición por contacto	73
6. La ausencia de RhoE facilita la inmortalización y la transformación oncogénica	75
7. La ausencia de expresión de RhoE aumenta la inducción de tumores en piel mediante el protocolo de DMBA/TPA.....	78
8. La ausencia de expresión de RhoE favorece la metástasis.....	88
DISCUSIÓN.....	91
CONCLUSIONES.....	99
BIBLIOGRAFÍA.....	103



Abreviaturas

BSA: *Bovine Serum Albumine*, albúmina sérica bovina

D-10: DMEM suplementado con 10% FBS y con 1% de P/S como antibiótico

DAB: Diaminobenzidina

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMBA: 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DTT: 1,4 ditiotreitól

DPX: *Dibutyl Phthalate Xylene*

ECM: Matriz extracelular

EMT: Transición epitelio-mesénquima

FA: Formaldehído

FAK: *Focal Adhesion Kinase*, kinasa de adhesiones focales

FBS: *Foetal Bovine Serum*, suero bovino fetal

GDP: Guanosín difosfato

GTP: Guanosín trifosfato

HGF: *Hepatocyte Growth Factor*, factor de crecimiento de hepatocitos

LPA: *Lysophosphatidic acid*, ácido lisofosfatídico

MEF: *Mouse Embryo Fibroblasts*, fibroblastos embrionarios de ratón

MLC: *Myosin light chain*, cadena ligera de la miosina

MLCK: *Myosin light chain kinase*, kinasa de la cadena ligera de la miosina

MLCP: *Myosin light chain phosphatase*, fosfatasa de la cadena ligera de la miosina

NSCLC: *Non-small-cell lung carcinoma*, carcinoma pulmonar de células no pequeñas

PBS: Tampón fosfato salino

PBS-T: Tampón fosfato salino con 0,5% Tritón X-100

PCR: *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor*, factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDL: *Population Doubling Level*

PFA: Paraformaldehído

PI: *Propidium Iodide*, yoduro de propidio

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

P/S: Penicilina y estreptomina

PVDF: Polivinilidenofluoruro

SDS: Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

SPF: *Specific Pathogen Free*

ROCK: *Rho-associated coiled-coil-forming kinase*

TBS: Tampón tris salino

TBT: Tampón tris salino con 0.1 % tween 20

TPA: Forbol 12-miristato 13-acetato

X-Gal: 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol- β -D-Galactósido

UV-B: Radiación ultravioleta B



Introducción

1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad compleja que resulta de la acumulación de modificaciones genéticas y epigenéticas, que alteran la homeostasis celular, y que confieren a las células algún tipo de ventaja selectiva respecto al entorno, lo que lleva a una conversión progresiva de las células normales en células cancerígenas (Berdasco y Esteller, 2010; Hanahan y Weinberg, 2011). La mayoría de los tejidos humanos adultos mantienen células en división para reparar y regenerar los tejidos. De ahí que el mantenimiento de la homeostasis tisular, de acuerdo a las necesidades de cada tejido, esté estrictamente regulado a través del control de los procesos de los que depende. Tres de estos procesos son la proliferación celular, la apoptosis y la senescencia (Lowe *et al.*, 2004). El fallo de estos mecanismos supone la pérdida de la barrera antitumoral.

El cáncer tiene su origen en alteraciones del genoma que pueden ocurrir a nivel genético, a través de alteraciones a nivel molecular o cromosómico, o a nivel epigenético, a través de un cambio en el patrón de expresión debido a modificaciones secundarias de la cromatina. Tanto las alteraciones genéticas como las epigenéticas causantes del proceso tumoral ocurren sobre tres tipos de genes: los oncogenes, los genes supresores de tumores y los genes de reparación del ADN.

Los oncogenes son alelos hiperactivos o desregulados de protooncogenes, cuyos productos son promotores del crecimiento normal que actúan como inductores de la proliferación celular. La mutación o sobreexpresión de estos genes contribuye a que la célula se convierta en tumoral. Los genes supresores de tumores codifican para proteínas que actúan como un freno para la proliferación celular. Una mutación que inactive uno de estos genes libera a la célula de las restricciones normales a la división y provoca una excesiva proliferación. Los productos de los genes de reparación del ADN se encargan de la detección de alteraciones de la molécula de ADN y de su reparación, proceso que es continuo y esencial en la supervivencia ya que protege la integridad del genoma. La inactivación de estos genes no afecta directamente al proceso de control de la proliferación, pero incrementa la tasa de mutación de otros genes, entre otros, los protooncogenes y los genes supresores de tumores, acelerando la progresión tumoral. La regulación coordinada de estos tres tipos de genes mantiene la homeostasis de los tejidos, el proceso tumoral refleja por tanto una ruptura de ese equilibrio.

En el proceso de tumorigénesis las células adquieren nuevas capacidades biológicas que les permiten escapar a los mecanismos de defensa antitumoral. Existen

ocho alteraciones esenciales en la fisiología celular que dictan el crecimiento maligno (Hanahan y Weinberg, 2011). Los tumores humanos, en general, comparten estas ocho alteraciones fisiológicas celulares: independencia de señales de crecimiento, insensibilidad a señales antiproliferativas, resistencia a la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, promoción de la angiogénesis, promoción de la invasión y metástasis, reprogramación del metabolismo celular y evasión del sistema inmunitario.

El conocimiento de estas capacidades esenciales para la progresión tumoral adquiridas por las células tumorales, así como el conocimiento de las alteraciones genéticas que las originan y de las vías de señalización que intervienen en cada una de estas propiedades tumorales, ayuda al diseño racional de terapias anticancerígenas dirigidas a impedir la progresión tumoral en diferentes estadios.

2. Proteínas Rho

La familia de proteínas Rho (*Ras* *homologue*) está compuesta por pequeñas GTPasas homólogas a Ras, y que, como ésta, funcionan como interruptores moleculares. Sus miembros se dividen en 8 subfamilias, siendo RhoA, Cdc42 y Rac1 los mejor estudiados hasta el momento (**Figura 1**). Esta clasificación incluye proteínas muy similares a RhoA, Rac1 y Cdc42 y finalmente un grupo que carecen de actividad GTPasa denominadas proteínas Rho atípicas (Wherlock y Mellor, 2002; Aspenstrom *et al.*, 2004; Wennerberg y Der, 2004).

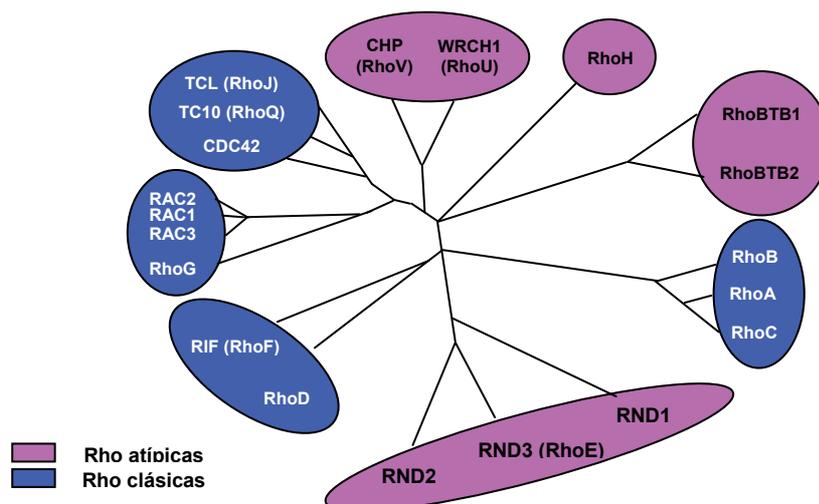


Figura 1. Diagrama representativo de los miembros de la familia Rho. Se han clasificado los 20 miembros según sus propiedades bioquímicas y funcionales. Adaptado de (Heasman y Ridley, 2008).

Las proteínas de la familia Rho contienen modificaciones lipídicas en su estructura que les permiten anclarse a la membrana celular; además, oscilan entre dos estados conformacionales: un estado activo, donde permanecen unidas a GTP, y otro inactivo, unidas a GDP. El paso de un estado activo a inactivo, o viceversa se produce a través de varios mecanismos; en primer lugar, existen las proteínas Rho-GEF (*Guanine nucleotide exchange factors*), que facilitan la unión de GTP y activan a las proteínas Rho (Rossman *et al.*, 2005; Meller *et al.*, 2005). Por otro lado también se encuentran reguladas por las proteínas Rho-GAP (*Rho GTPase activating protein*), encargadas de activar la capacidad GTPasa intrínseca de las proteínas Rho, hidrolizando el GTP a GDP, volviendo a un estado inactivo (Moon y Zheng, 2003; Chardin, 2006; Aspenstrom *et al.*, 2007; Clementi y Polacek, 2010). Cada subfamilia de GTPasas tiene sus propias y específicas GEFs y GAPs lo que refleja la gran complejidad en la regulación de estas proteínas (Bos *et al.*, 2007; Meiri *et al.*, 2009; Hall, 2009; Rittinger, 2009). Finalmente, existe otro nivel de regulación que se produce a través de Rho-GDIs (*Rho GDP-dissociation inhibitor*), que secuestran las proteínas Rho en el citoplasma e impiden su unión a GTP evitando así que puedan ejercer su función (García-Mata *et al.*, 2011).

La activación de receptores de factores de crecimiento e integrinas, por ejemplo, promueve el cambio GDP/GTP en las proteínas Rho, lo que provoca un cambio conformacional activado y su interacción con múltiples efectores, modulando así su actividad y localización. Muchos de los efectores de proteínas Rho, son kinasas capaces de controlar funciones celulares a través de la fosforilación de proteínas como la kinasa activadora de p21 (PAK), capaz de unirse a Cdc42 y Rac1, o las kinasas ROCK (*Rho associated coiled-coil-forming kinases*), que son activadas por RhoA (Govek *et al.*, 2005; Riento *et al.*, 2005a; Riento *et al.*, 2005b).

En cuanto a su función, clásicamente a las proteínas Rho se les ha asignado un papel casi exclusivo en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina, aunque en los últimos años se está viendo la importancia que tienen en otros procesos relevantes para la célula como la migración y la polaridad celular, la adhesión, la endocitosis, el tráfico intracelular, la regulación de la transcripción, el control del ciclo celular y la apoptosis (Chardin, 2006; Villalonga y Ridley, 2006; Aspenstrom *et al.*, 2007; Poch *et al.*, 2007; Vega y Ridley, 2008; Hall, 2009; Parsons *et al.*, 2010).

2.1. Proteínas Rho y citoesqueleto

La habilidad de las células eucariotas para mantener o cambiar su forma y nivel de anclaje al sustrato en respuesta a señales externas depende, en gran parte, de la reorganización de su citoesqueleto de actina. Dicha reorganización juega un papel importante en diversos procesos como la movilidad celular, citoquinesis o fagocitosis (Ridley, 2001; Ridley, 2006; Heasman y Ridley, 2008).

El citoesqueleto de las células está compuesto por filamentos intermedios, microtúbulos y microfilamentos de actina y miosina. Los microfilamentos de actina pueden organizarse para formar diferentes estructuras entre las que se encuentran los filopodios, los lamelipodios y las fibras de estrés (Bailly y Condeelis, 2002).

Se han descrito diversas rutas implicadas en la polimerización de las fibras de actina que dan lugar a dichas modificaciones de la membrana celular. El papel de RhoA en la formación de fibras de estrés se demostró al microinyectar un mutante activado de RhoA, Rho^{V14}, en fibroblastos quiescentes. Su expresión resultó en la inducción de fibras de estrés y la aparición de adhesiones focales (Ridley y Hall, 1992). Existen numerosas proteínas que son capaces de unirse a la forma activa de RhoA y que dan lugar a la formación de fibras de estrés y adhesiones focales en diversos tipos celulares. En particular se ha descrito una serie de proteínas con actividad serina/treonina kinasa de la familia ROCK llamadas ROCK β (ROCK-I o Rho-kinasa) y ROCK α (ROCK-II) (Riento y Ridley, 2003). La interacción de RhoA con estas proteínas aumenta su actividad kinasa (Ishizaki *et al.*, 1996; Leung *et al.*, 1995; Kakimoto *et al.*, 2004) promoviendo la fosforilación de sus efectores.

El análisis de la función de ROCK-I proviene de los estudios realizados *in vitro* con la cadena ligera de miosina (MLC) que forma las fibras de estrés. La MLC presenta dos estados: una forma fosforilada (activa) y una forma no fosforilada (inactiva). La regulación de estos dos estados viene determinada por una kinasa (MLCK) y una fosfatasa (MLCP) que mantienen en unas cantidades determinadas una forma u otra dependiendo de cada momento. ROCK-I es capaz de unirse a la forma activa de RhoA (Rho-GTP) y a su vez a una región de la MLCP, llamada MBS (subunidad de unión a miosina), fosforilándola e inactivándola. De este modo, y sin actividad fosfatasa, la MLCK es capaz de fosforilar a la MLC, aumentando la proporción estequiométrica de esta molécula fosforilada (Ikeda *et al.*, 2003), lo que implica un cambio conformacional que conlleva una mayor afinidad por los filamentos de actina, y que da lugar a la formación de fibras de estrés (Ramocki *et al.*, 1997).

Por otro lado, Cdc42 es capaz de activar a PAK-1 y ésta a su vez de fosforilar a MLC (Sells *et al.*, 1999), produciendo un fenotipo similar al que produce RhoA sobre la formación de fibras de estrés de actina.

Finalmente, la proteína Rac juega un papel importante en la reorganización del citoesqueleto inducida por factores de crecimiento en fibroblastos mediante la activación de PAK-1 y fosforilación de MLC (Brzeska *et al.*, 2004). La microinyección de una forma activada de Rac (Rac^{V12}) es suficiente para inducir la formación de lamelipodios y fibras de estrés (Ridley y Hall, 1992).

En resumen, RhoA, Rac y Cdc42, a través de ROCK y PAK-1, resultan en la fosforilación de la MLC produciéndose una reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de fibras de estrés (**Figura 2**).

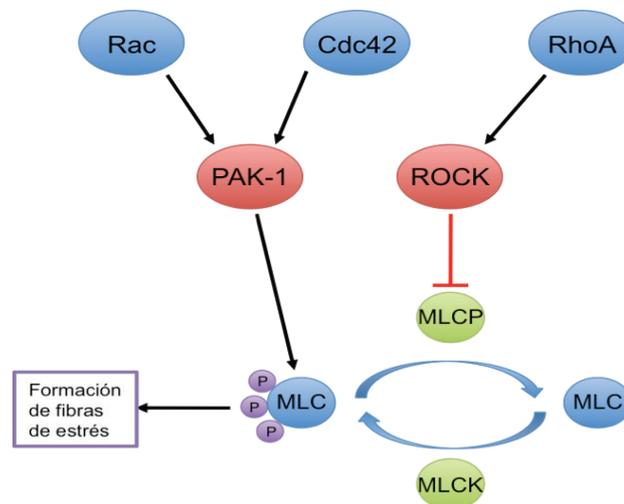


Figura 2. Esquema representativo de la vía de señalización Rac, Cdc42 y RhoA en el citoesqueleto.

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 son conocidas también como Rho atípicas, debido a la carencia de actividad GTPasa intrínseca, por lo que no son capaces de hidrolizar el GTP a GDP permaneciendo, por tanto, constitutivamente activas (Chardin, 2006).

Las proteínas Rnd participan en la regulación del citoesqueleto de actina; su sobreexpresión inhibe la formación de fibras de estrés e induce la pérdida de adhesiones focales, de manera que las células resultantes pierden la capacidad de

extenderse y adquieren forma redondeada, fenotipo celular que da lugar a su nombre, *round*. 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, las proteínas Rnd sólo se han encontrado en animales vertebrados (mamíferos, aves, anfibios y peces), lo que podría indicar una posible relación con funciones más sofisticadas en el citoesqueleto como, por ejemplo, el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso y la plasticidad neuronal (Wherlock y Mellor, 2002; 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. En fibroblastos tratados con ácido lisofosfatídico (LPA) se produce una rápida formación de fibras de estrés (Ridley, 1999). No obstante, la sobreexpresión de Rnd1 inhibe la formación de fibras de estrés en respuesta a la estimulación con LPA, e induce la pérdida de adhesiones focales que anclan las fibras de estrés a la matriz extracelular (Nobes *et al.*, 1998). Además la sobreexpresión de RhoE puede inducir migración celular, probablemente incrementando la plasticidad de las adhesiones focales y las fibras de estrés asociadas (Guasch *et al.*, 1998; Chardin, 2006; Klein y Aplin, 2009).

En general, se considera que las proteínas Rnd juegan un papel antagonista a las proteínas Rho a través de dos mecanismos. Uno de ellos mediante su unión a la proteína p190RhoGAP, una proteína activadora de GTPasas específica para RhoA, de modo que las proteínas Rnd son capaces de aumentar la actividad GTPasa intrínseca de RhoA, teniendo como consecuencia una inactivación de la misma y la inhibición de la formación de fibras de estrés (Wennerberg *et al.*, 2003). Sin embargo, Rnd2 no posee los mismos efectos sobre fibroblastos que los otros miembros de la familia Rnd (Nobes *et al.*, 1998), siendo su unión a p190RhoGAP muy débil (Wennerberg *et al.*, 2003). Como segundo mecanismo se ha descrito que RhoE es capaz de inhibir la función de RhoA uniéndose a ROCK-I, su principal efector, e impidiendo que éste realice su función sobre la cadena ligera de la miosina (MLC) (Riento *et al.*, 2003).

Hasta el momento apenas se sabe nada sobre la expresión y localización de estas proteínas *in vivo*. Se ha comprobado mediante la técnica de Northern-blot la presencia de ARNm en diferentes tejidos, observando altos niveles de Rnd1 en encéfalo e hígado y de Rnd2 en testículos. Por el contrario, la expresión de RhoE se describe como ubicua y en general con bajos niveles, apareciendo en encéfalo,

páncreas, timo y testículo (Nobes *et al.*, 1998). En nuestro laboratorio hemos analizado la expresión y localización de RhoE en el sistema nervioso central, observando una expresión ya en etapas embrionarias. Destaca su presencia en la corriente migratoria rostral, la capa granular externa del cerebelo y en las motoneuronas, sugiriendo un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso, probablemente interviniendo en procesos de migración neuronal y formación de conexiones nerviosas (Ballester-Lurbe *et al.*, 2009). Además, recientemente hemos descrito que los ratones deficientes en RhoE presentan letalidad postnatal, déficits motores profundos y retraso en el neurodesarrollo (Mocholi *et al.*, 2011).

2.3. Proteínas Rho y 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 y Der, 2001; Danesh *et al.*, 2002; Besson *et al.*, 2004b; Poch *et al.*, 2007).

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 durante 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). La activación de RhoA produce una retención en el citoplasma de ERK fosforilado, lo que se traduce en una inhibición de la expresión de p21^{Cip1} (Adamson *et al.*, 2002; Zuckerbraun *et al.*, 2003). RhoA también contribuye a la progresión G1/S a través de la degradación de p27 mediante la activación de ciclina E/CDK2 en fibroblastos (Hu *et al.*, 1999; Vidal *et al.*, 2002; Croft y Olson, 2006), y en células gástricas cancerosas (Zhang *et al.*, 2009). A su vez, p27 citoplasmático, interacciona con RhoA no permitiendo su unión a los GEFs e inhibiéndola (Besson *et al.*, 2004a), lo que promueve un aumento en la migración e invasión celular (Wu *et al.*, 2006).

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 y Olson, 2006).

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.

2.4. Proteínas Rho y cáncer

Las proteínas de la familia Rho también pueden contribuir en la mayoría de las fases de iniciación y progresión del cáncer, incluyendo la adquisición de un potencial ilimitado de proliferación, supervivencia y escape de apoptosis, invasión tisular y establecimiento de metástasis. Las proteínas Rho están mutadas raramente en tumores, mientras que su expresión o actividad están alteradas frecuentemente. Por ejemplo, muchas Rho GTPasas están sobreexpresadas en algunos tumores humanos, incluyendo RhoA, RhoC, Rac1, Rac2, Rac3, Cdc42, RhoV y RhoF (Aronheim *et al.*, 1998; Gomez del Pulgar *et al.*, 2005; Gouw *et al.*, 2005).

La expresión y/o la actividad de RhoA y RhoC está frecuentemente aumentada en tumores humanos (Abraham *et al.*, 2001; Gomez del Pulgar *et al.*, 2005), mientras que la de RhoB está disminuida (Gomez del Pulgar *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2007). RhoA ha sido implicada prácticamente en todas las etapas de la progresión del cáncer. A diferencia de RhoA, RhoC no tiene aparentemente actividad en transformación y el papel de RhoC en la progresión tumoral parece quedar restringido principalmente a las metástasis (Hakem *et al.*, 2005). Al contrario que RhoA y RhoC, RhoB está normalmente reprimido en tumores humanos y su expresión se correlaciona inversamente con su agresividad (Huang y Prendergast, 2006; Bousquet *et al.*, 2009). Se ha propuesto que RhoB puede actuar como un supresor tumoral ya que es activado en respuesta a varios estímulos estresantes incluyendo daño en el ADN o hipoxia (Canguilhem *et al.*, 2005), y se ha descrito que inhibe el crecimiento tumoral, la migración celular y la invasión y posee funciones proapoptóticas en células (Huang y Prendergast, 2006; Kim *et al.*, 2011).

Rac 1 está sobreexpresado en varios tumores y existen evidencias de que la

vía de señalización dependiente de Rac1 es importante para la transformación tumoral, además Rac1 es una de las pocas Rho GTPasas mutadas en algunos tumores (Hwang *et al.*, 2004; Gomez del Pulgar *et al.*, 2005).

Cdc42 está sobreexpresado en algunos tumores de mama (Fritz *et al.*, 1999) sin embargo, el *knock-out* específico de hígado indica que la pérdida de Cdc42 promueve el desarrollo de cáncer de hígado (van Hengel *et al.*, 2008), lo que sugiere que la contribución de Cdc42 a la progresión del cáncer puede ser específica de tejido.

Los conocimientos sobre el papel de las proteínas Rho en cáncer provienen del estudio de los miembros mejor caracterizados de la familia: RhoA, Rac1, Cdc42 y RhoC; pero poco se conoce acerca de otras proteínas de la familia. Por ello son necesarios estudios adicionales que aclaren las funciones de estas proteínas en tumorigénesis *in vivo*.

3. RhoE

La proteína RhoE/Rnd3 forma parte de la subfamilia de proteínas Rnd, dentro de la familia de proteínas Rho. Como el resto de miembros de la subfamilia, RhoE no se regula por la unión a GTP y su hidrólisis, ya que carece de actividad GTPasa, permaneciendo así constitutivamente activa (Foster *et al.*, 1996; Guasch *et al.*, 1998). La estructura molecular de la proteína RhoE presenta 3 mutaciones en el centro activo respecto a la proteína Ras (Ser12Gly, Ser59Ala y Ser61Gln, en la secuencia de Ras) que explicarían la ausencia de actividad GTPasa (Fiegen *et al.*, 2002; Garavini *et al.*, 2002). Al estar constitutivamente activa, su función celular debe estar regulada por otros mecanismos alternativos.

3.1. RhoE y citoesqueleto

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 y provoca la desaparición de fibras de estrés en células epiteliales (MDCK). La localización subcelular de RhoE en estas células, cerca de las membranas laterales, sugiere un posible papel en la formación de adhesiones célula-célula, que también ha sido descrita para RhoA (Kardash *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que RhoE induce un aumento de la migración en células de melanoma (Klein y Aplin, 2009), aumento también observado tras la estimulación con el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, *Hepatocyte Growth*

Factor) en células epiteliales MDCK, mientras que RhoA produce el efecto contrario (Guasch *et al.*, 1998).

La sobreexpresión de RhoE inhibe a ROCK-I produciéndose la pérdida de fibras de estrés de actina y de las adhesiones focales, lo que promueve un aumento de la migración celular (Guasch *et al.*, 1998; Riento *et al.*, 2003). La unión de RhoE a ROCK-I se produce a través de su región N-terminal (Komander *et al.*, 2008), una zona diferente a la que se une RhoA (Nakagawa *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 (dominio kinasa inhibido), RhoE es incapaz de unirse, y es necesario que ROCK-I se active para adoptar una conformación abierta y permitir así su unión a RhoE (Riento *et al.*, 2003). La unión en primera instancia de RhoA a ROCK-I podría inducir esta conformación abierta y permitir su posterior unión a RhoE, inhibiendo su actividad y la pérdida de fibras de estrés de actina y de las adhesiones focales en fibroblastos. Además, la unión de RhoE a ROCK-I impide a dicha kinasa su unión a otros efectores como PDK1, regulando así la motilidad celular (Garg *et al.*, 2008; Pinner y Sahai, 2008).

Otros autores, además, describen que la pérdida de fibras de estrés de actina y de las adhesiones focales producida por RhoE en células Cos7 o fibroblastos es vía la activación de p190RhoGAP (Wennerberg *et al.*, 2003). Además, recientemente se ha descrito que RhoE puede interaccionar e inhibir la función de Syx, un RhoGEF encargado de la activación de RhoA, impidiendo así la formación de fibras de estrés (Goh y Manser, 2010), por lo que probablemente RhoE pueda realizar su función por distintas vías e incluso simultáneamente.

Ya que RhoE carece de actividad GTPasa su activación se debe regular por mecanismos diferentes, tales como la expresión, estabilidad, localización, o modificación postraduccional. Hasta el momento, se han descrito 7 residuos fosforilables de RhoE por ROCK-I, la fosforilación en dichos residuos no afecta a la unión con ROCK-I pero sí altera la localización de RhoE en la célula. La fosforilación de RhoE por ROCK-I en el residuo Ser11 tras la inducción con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *Platelet-Derived Growth Factor*) modula su localización desde la membrana a citosol, aumentando su estabilidad, lo que se correlaciona con su papel inhibitorio en la formación de fibras de estrés así como de la inhibición de la transformación inducida por Ras (Riento *et al.*, 2005a). Recientemente se ha descrito

que RhoE puede ser fosforilado en la Ser240 por otra kinasa, PKC α (Madigan *et al.*, 2009). Sin embargo, esta fosforilación no es suficiente para regular la localización subcelular ni la función de RhoE sobre el citoesqueleto. De igual forma, la fosforilación de RhoE por PKC α en los residuos Ser7 y Ser11 tampoco altera la localización de RhoE lo que sugiere que debe haber otros residuos en RhoE que actúen como diana de PKC α . En nuestro laboratorio hemos estudiado la regulación de RhoE a través de su degradación en el proteasoma, demostrando que la región polibásica situada en el extremo carboxilo terminal es importante para su ubicuilitación y degradación.

3.2. RhoE, ciclo celular y cáncer

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). 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 (Hansen *et al.*, 2000).

La sobreexpresión de RhoE en fibroblastos detiene el ciclo celular en la fase G1 a través de la disminución de ciclina D1 (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 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 una disminución 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 hemos demostrado que RhoE interfiere con la proliferación celular en líneas tumorales, concretamente en células de glioblastoma humano U87. Este efecto tiene lugar en la fase G1 del ciclo celular y está mediado por la disminución de la expresión de ciclina D1, lo que tiene como resultado la incorrecta inactivación de Rb en el punto de restricción. Por último, RhoE no solo bloquea la proliferación celular sino que también induce apoptosis, lo que hemos demostrado en líneas de glioblastoma, melanoma y carcinoma de colon. Estos resultados nos indican que RhoE tiene un papel importante en la regulación del ciclo celular y supervivencia, lo que nos ha llevado a proponer a RhoE como un posible oncosupresor (Poch *et al.*, 2007).

De la subfamilia Rnd, sólo RhoE está claramente ligada a funciones relacionadas con la progresión tumoral (Chardin, 2006). RhoE está reprimido en cáncer de próstata (Bektic *et al.*, 2004; Bektic *et al.*, 2005), cáncer de mama y pulmón (Zhu *et al.*, 2008) y carcinoma hepatocelular (Grise *et al.*, 2012). Sin embargo, está sobreexpresada en cáncer de páncreas (Gress *et al.*, 1996) y cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) (Cuiyan *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). Los diferentes niveles de RhoE en tumores podrían explicarse por el hecho de que es un gen inducible por p53, que se une directamente a su promotor y está inducido por estrés genotóxico (Ongusaha *et al.*, 2006). El daño en el ADN inducido por diversos estímulos como los agentes quimioterápicos y la irradiación ultravioleta provocan la sobreexpresión de RhoE a nivel de ARNm y proteína (Villalonga *et al.*, 2004; Ongusaha *et al.*, 2006; Boswell *et al.*, 2006; Shurin *et al.*, 2008). Sin embargo, la sobreexpresión de RhoE por ultravioleta en queratinocitos no parece depender de p53 (Boswell *et al.*, 2006), y por esto debe haber otros mecanismos de inducción de daño en el ADN que estimulen la transcripción de *RhoE*.

Así como el daño en el ADN, otros mecanismos permiten cambios en la expresión de RhoE en cáncer. Por ejemplo, la inducción de RhoE se ha ligado al factor de transcripción NFκB en células de cáncer de próstata (Nadiminty *et al.*, 2010). Además el oncogén b-Raf induce su expresión en células de melanoma (Hansen *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 2008). También la vía de señalización de mTOR se ha descrito como la responsable del incremento en la expresión de RhoE en astrocitomas de células gigantes subependimales, tumores del cerebro donde los inhibidores de mTOR TSC1 O TSC2 están mutados (Tyburczy *et al.*, 2010). Sin embargo, la expresión de RhoE está reducida en células de cáncer de próstata por el miembro de la familia de TFG-β, MIC-1/GDF15 (Liu *et al.*, 2003), lo que podría explicar los bajos niveles de RhoE observados en este tipo de cáncer (Bektic *et al.*, 2005). Además, la expresión de

RhoE también está reducida al inducirse FOXD3 en células de melanoma (Katiyar y Aplin, 2011). Finalmente, también se ha descrito que el ARN mensajero de *RhoE* podría ser diana de miR-200c, un inhibidor de la migración que se encuentra reprimido en células tumorales epiteliales y células madre de cáncer de mama (Hurteau *et al.*, 2006; Bracken *et al.*, 2009; Shimono *et al.*, 2009).

Numerosos estudios implican a RhoE en la motilidad de células tumorales. RhoE contribuye a la invasión de las células tumorales a través de sus efectos en la regulación de la vía de señalización RhoA/ROCK, pero las consecuencias dependen del tipo celular. Por una parte, la sobreexpresión de RhoE mediada por b-Raf parece promover la invasión de las células de melanoma mediante la reducción de la actividad de la vía RhoA/ROCK (Klein y Aplin, 2009). Por otra parte, la inducción de RhoE mediada por p53 está ligada a la inhibición de la invasión de las células tumorales, y la pérdida de p53 promueve la invasión de células de melanoma y fibroblastos a través de un incremento en la vía de señalización de RhoA/ROCK (Gadea *et al.*, 2007). También se ha descrito que RhoE compite con PDK1 en la unión a ROCK-I: en ausencia de PDK1, la regulación negativa de ROCK-I por RhoE predomina produciéndose una menor contractibilidad de la actomiosina y menor migración en células tumorales (Pinner y Sahai, 2008). La sobreexpresión de RhoE en células epiteliales estimula la formación de multicapas (Braga y Yap, 2005) y aumenta la velocidad de migración (Chardin, 2006). Además, RhoE está reprimido en los cánceres de próstata más agresivos (Bektic *et al.*, 2005). Estas diferencias podrían reflejar el hecho de que las células tumorales pueden presentarse en dos morfologías diferentes en cultivo, mesenquimal/elongada o ameboide/redondeada. La habilidad relativa para invadir de las células elongadas contra las redondeadas depende del tipo de ensayo y de la proteína de matriz extracelular usada (Friedl y Wolf, 2010). Recientemente se ha relacionado a RhoE en la regulación de la invasión de células tumorales mesenquimales. Estas células durante la transformación neoplásica, adquieren una morfología redondeada que les permite una mayor invasión. Este cambio en la morfología se ha correlacionado con unos niveles de expresión de RhoE disminuidos (Belgiovine *et al.*, 2010).

La invasión tumoral también comprende una reducción en las adhesiones célula-célula. RhoE promueve la integridad de las uniones estrechas a través de la inhibición de la vía RhoA/ROCK (Rubenstein *et al.*, 2005), aunque también se ha descrito que RhoE es necesaria para la disminución de la actomiosina en las uniones célula-célula y promueve la migración colectiva celular en células tumorales (Hidalgo-Carcedo *et al.*, 2011); sin embargo, no parece realizar esta función en queratinocitos

(Liebig *et al.*, 2009). La transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso clave en la invasión tumoral, durante la hipoxia se promueve la EMT y se sobreexpresa RhoE, la cual produce una respuesta adaptativa celular que promueve la EMT y la invasión en células tumorales gástricas (Zhou *et al.*, 2011). Sin embargo, recientemente se ha descrito que RhoE está reprimida en el carcinoma hepatocelular, disminuyéndose la expresión de E-Cadherina en las uniones célula-célula, lo que promueve la EMT y la invasión, por ello se ha propuesto a RhoE como gen supresor de metástasis (Grise *et al.*, 2012).

A faint, light-colored illustration of a human skull and brain is visible in the background. The skull is shown in profile, facing right, with the brain's surface and some internal structures visible. The illustration is rendered in a soft, sketchy style with light brown and grey tones.

Objetivos

Resultados previos obtenidos por nosotros y por otros grupos demuestran que la sobreexpresión de RhoE reduce la formación de fibras de estrés de actina del citoesqueleto. Además, RhoE inhibe la progresión a lo largo del ciclo celular e induce apoptosis en diferentes líneas tumorales. Estos últimos datos nos llevaron a proponer que RhoE pudiera tener un papel como supresor de tumores. En este trabajo abordamos esta hipótesis utilizando un modelo de ratón carente de la expresión de RhoE. Con este modelo analizamos el efecto de la ausencia de expresión de RhoE sobre el citoesqueleto de actina y el posible papel oncosupresor de RhoE mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

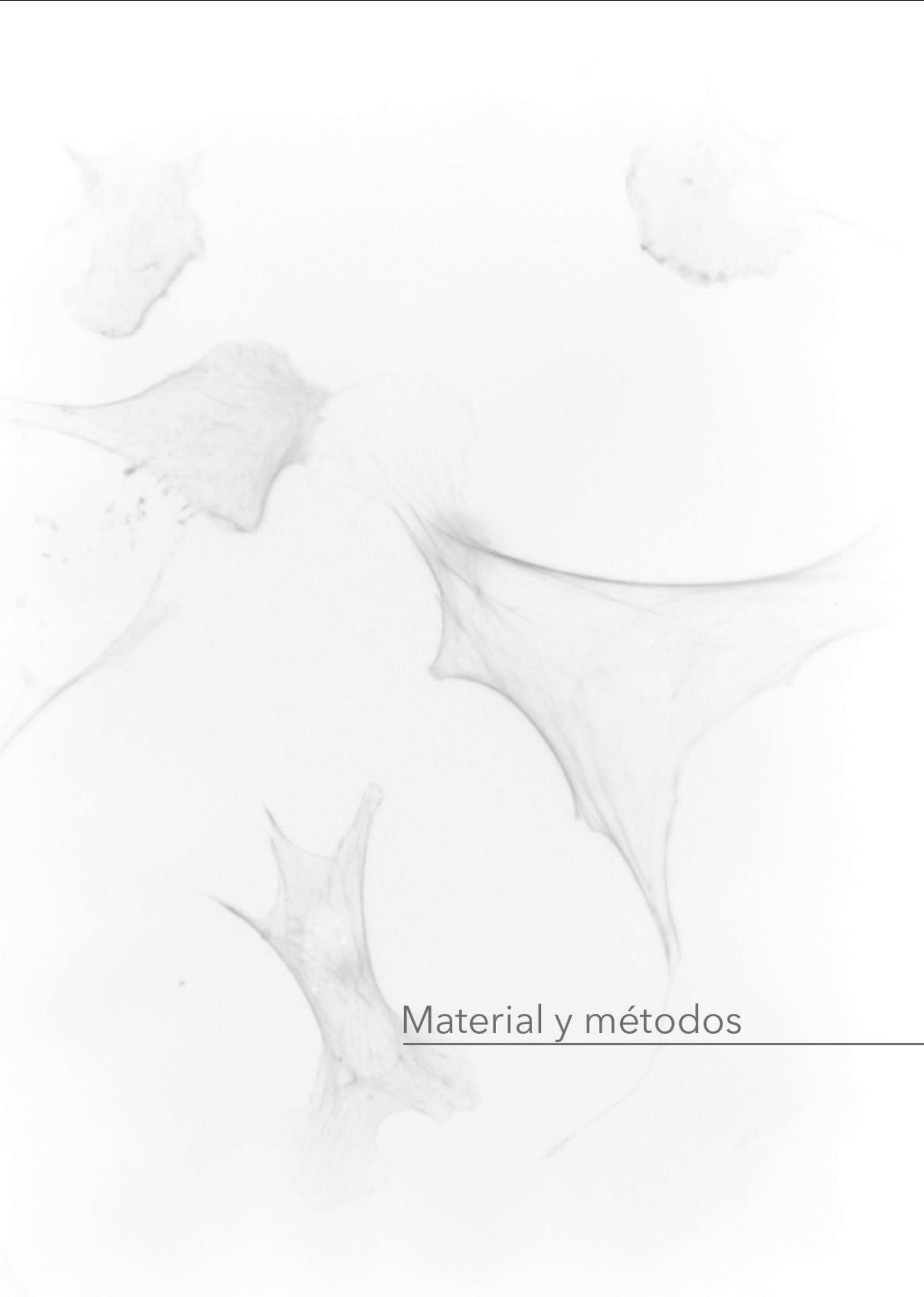
Los objetivos concretos propuestos para este trabajo son:

1. Caracterización de los fibroblastos embrionarios carentes de la expresión de RhoE

- a) Estudio del citoesqueleto de actina y los procesos de adhesión y migración celular.
- b) Determinación de la respuesta a genotóxicos mediada por p53.
- c) Análisis de la proliferación y ciclo celular.

2. Análisis del papel de RhoE como posible oncosupresor *in vitro* e *in vivo*

- a) Estudio del papel de RhoE en la transformación oncogénica *in vitro*.
- b) Caracterización de la implicación de RhoE en ensayos de tumorigénesis *in vivo*.



Material y métodos

1. Animales

1.1. Estabulación

En este estudio se utilizaron ratones RhoE $+/+$, RhoE $+/gt$ y RhoE gt/gt , con un fondo genético mixto C57BL6/129S procedentes de nuestro estabulario y ratones inmunocomprometidos (nu/nu) de 5-8 semanas de edad adquiridos a la empresa Harlan Interfauna Ibérica S.L. Todos ellos se estabularon bajo condiciones controladas de temperatura ($21\pm 1^\circ\text{C}$), humedad (40-45 %) y fotoperíodo de 12 hrs. de duración, teniendo libre acceso al agua y alimento. En el caso de los ratones inmunocomprometidos nu/nu además fueron estabulados en condiciones SPF (*Specific Pathogen Free*).

La estabulación, el manejo, cuidado y sacrificio de los animales se realizaron 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 Directiva 2010-63-UE del 22 de Septiembre. Todos los experimentos fueron autorizados por el Comité Ético de Bienestar Animal de la Universidad CEU-Cardenal Herrera y del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”.

El sacrificio de los animales se realizó por luxación cervical. Tras el sacrificio se extrajeron inmediatamente las diferentes muestras. En función de la técnica que se fuera a realizar el tejido se congeló o se fijó para evitar su deterioro.

1.2. Generación de ratones RhoE gt/gt

La generación del ratón RhoE gt/gt se realizó en los laboratorios de la empresa Lexicon, utilizando la técnica de *gene trapping*, metodología que consiste en eliminar la expresión de un gen (en este caso RhoE) mediante la inserción por recombinación homóloga de un vector retroviral que da lugar a un procesado aberrante del ARN mensajero. Como resultado la síntesis de la proteína no se produce correctamente (Zambrowicz *et al.*, 1998; Zambrowicz y Sands, 2003), obteniendo así un modelo de ratón carente de la proteína RhoE (Mocholi *et al.*, 2011).

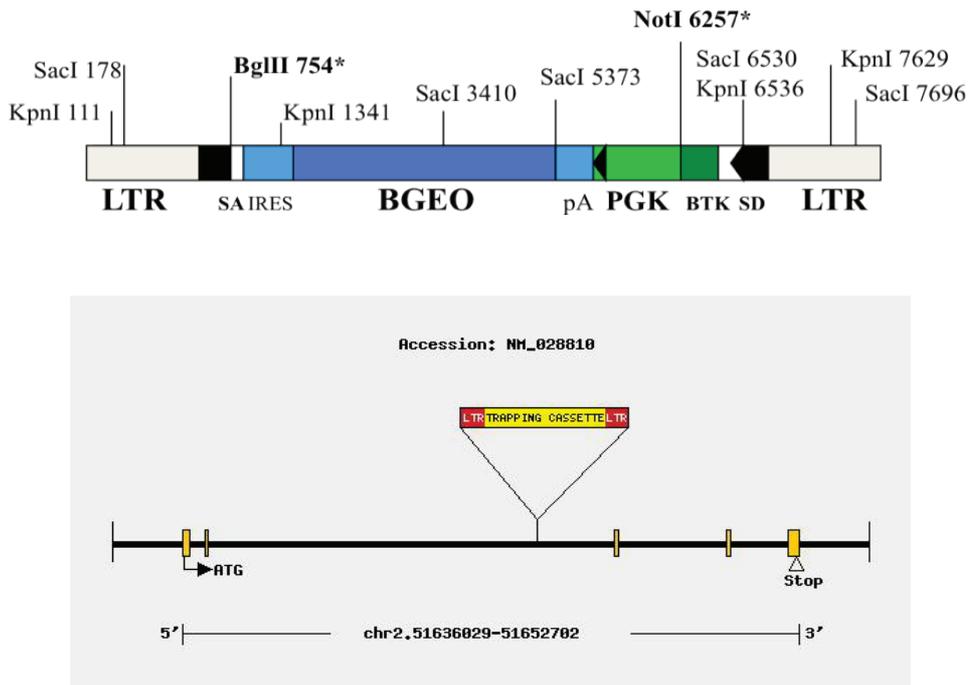


Figura 3. Resumen de la construcción del ratón *RhoE* *gt/gt*. Esquema del vector VICTR37 (parte superior de la figura) utilizado para interrumpir la expresión de *RhoE*. Por PCR inversa se determinó el punto de inserción del vector en el segundo intrón del locus *RhoE* (parte inferior de la figura). En la figura se indican las secuencias más relevantes del vector: LTR: *Long Terminal Repeat*; SA: *Splicing Acceptor*; 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.

1.3. Genotipado

Para la identificación del genotipo de los embriones se realizó la extracción del ADN genómico procedente de una porción de encéfalo. Para el genotipado de los ratones adultos se obtuvo una muestra de cola de aproximadamente 3-5 mm. En ambos casos se procedió a la extracción y posterior amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) utilizando el Kit REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR (Sigma-Aldrich), tal y como se ha descrito previamente (Mocholi *et al.*, 2011).

2. Cultivos celulares

Todas las líneas se mantuvieron en medio DMEM suplementado con un 10% de FBS, y un 1% de P/S como antibiótico (medio D-10). El crecimiento de las líneas celulares se hizo en condiciones constantes de temperatura (37°C) y concentración de CO₂ (5%). Todo el trabajo que ha implicado manipulación de los cultivos celulares, ha sido realizado en una campana de flujo laminar de bioseguridad nivel II-A (HERAEUS).

Si no se menciona lo contrario, para recoger las células se utilizó una centrífuga de cabezal basculante Eppendorf 5810 R a una velocidad de 500 g y durante 5 min.

Las células empleadas en este trabajo han sido fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, *Mouse Embryonic Fibroblasts*). Los MEF se obtuvieron tal y como se ha descrito anteriormente (Perez-Roger *et al.*, 1999; Palmero y Serrano, 2001) a partir de embriones provenientes de cruces entre machos y hembras RhoE *+/-gt*. Las hembras gestantes se sacrificaron a los 13.5 días *post coitum*. Los embriones se manipularon bajo condiciones de esterilidad, procediendo a su separación individual. Seguidamente, se desecharon la cabeza y el hígado y se disociaron mecánicamente con la ayuda de un bisturí, añadiéndoles 1 ml de tripsina durante 20 min. a 37°C. A continuación se recogieron con 2 ml de D-10, se trasladaron a tubos de centrifuga de 15 ml con 10 µl de DNasa (1u/µl Promega) y 7 ml de D-10. Para finalizar se pipeteó arriba y abajo para disgregar las células y se sembraron en placas de 10 cm. Las células obtenidas se mantuvieron a pases tempranos (P1-P5) en el mismo medio de cultivo D-10.

Para los ensayos de metastasis en pulmón se emplearon células basales de carcinoma de mama MDA-MB-231 que contienen el gen reportero TGL (que codifica para la timidina kinasa 1 del virus herpes simplex, la proteína verde fluorescente GFP y la luciferasa de la luciérnaga) y que han sido cedidas por el Dr. Joan Massagué (Minn *et al.*, 2005).

Se utilizaron las líneas empaquetadoras BOSC y 293T, derivadas de células epiteliales de riñón humano infectadas con el Adenovirus Ad5 (Graham *et al.*, 1977), para producir retrovirus y lentivirus, respectivamente.

3. Infecciones

3.1. Infección con vectores retrovirales

Se utilizaron los vectores retrovirales LZRS-RhoE para analizar los cambios en el citoesqueleto de actina en los MEF y los vectores pLPC, pLPC-Ras^{V12}, pLPC-E1A y pLPC-E1A/Ras para analizar la transformación por oncogenes.

Para reexpresar RhoE en MEF *gt/gt*, se cultivaron células empaquetadoras BOSC transfectadas establemente con un vector que codifica para la proteína RhoE y la proteína verde fluorescente GFP (LZRS RhoE). A continuación se recogió el medio conteniendo los retrovirus de las células productoras, se añadió polibreno a una concentración final de 8 µg/ml y se filtró con un filtro de 0.45 µm. Este sobrenadante se añadió al medio de cultivo de los MEF RhoE *gt/gt* sembrados el día anterior a una densidad de 20x10³ células por pocillo en placas de 12 pocillos sobre cubreobjetos. Se repitió esta operación 4 veces a intervalos de 2 hrs. y se mantuvieron las células en medio de cultivo D-10.

Para los ensayos de transformación por oncogenes, células 293T fueron cotransfectadas de forma transitoria mediante la técnica de fosfato cálcico, con 10 µg del vector retroviral pLPC, pLPC-Ras^{V12} o pLPC-E1A/Ras y 10 µg del vector pCLEco. Tras 48 hrs. se recogió el sobrenadante de las células, se filtró con un filtro de 0.45 µm, se diluyó 1:2 con medio D-10 fresco y se añadió polibreno (Sigma) a una concentración final de 8 µg/ml. Este sobrenadante se utilizó como medio de cultivo de MEF sembrados el día anterior a una densidad de 8x10⁵ células en placas de 10 cm. Este procedimiento se repitió a las 12 hrs. utilizando una concentración de polibreno de 4 µg/ml y a las 24 hrs. con una concentración de polibreno de 8 µg/ml. Tras un día de recuperación con medio D-10 fresco, las células fueron seleccionadas con puromicina (2 µg/ml, Sigma) durante 3 días.

3.2. Silenciamiento de RhoE con vectores lentivirales

Para el silenciamiento de la expresión de RhoE utilizamos shRNA en el vector pIKO.1. Utilizamos tres shRNA diferentes (Sigma): pIKO.1-shRhoE TRCN330303 (CCGGATCCTAATCAGAACGTGAAATCTCGAGATTTTACGTTCTGATTAGGATTTTTTG), pIKO.1-shRhoE TRCN330304 (CCGGCGGACAGATGTTAGTACACTTACTCGAGT AATGTACTAACATCTGTCCGTTTTTG) y pIKO.1-shRhoE TRCN330305 (CCGGGAG AGCCACAAAGCGGATTTCTCGAGGAAATCCGCTTTGTGGCTCTTTTTTG). Para producir las partículas lentivirales, células 293T fueron cotransfectadas, de forma

transitoria mediante la técnica del fosfato cálcico, con 10 µg del vector lentiviral de interés y 3.3 µg de cada uno de los vectores pRSV-Rev, pMD-G (VSV-G) y pMDLg/p RRE. Tras 24 hrs. se recogió el sobrenadante de las células, se filtró con un filtro de 0.45 µm, se diluyó 1:2 con medio D-10 y se añadió polibreno a una concentración final de 8 µg/ml. Este sobrenadante se utilizó como medio de cultivo de células MDA-MB-231-TGL. Tras un día de recuperación con medio D-10 fresco, las células fueron seleccionadas con puromicina a una concentración de 2 µg/ml durante 3 días.

4. Detección de proteínas por inmunoblot

Para realizar la extracción de proteínas, las células y las muestras de tejido se resuspendieron en tampón de lisis (150 mM NaCl; 1% Tritón X-100; 1 mM 1,4 ditiotreitól (DTT); 50 mM Tris, pH 8.0) más un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche) y de fosfatasas (10 mM NaF; 1 mM Na₃VO₄) y se incubaron durante 30 min. en hielo. Tras la centrifugación de los lisados (20.800 g, 10 min.) en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5417 R con rotor de ángulo fijo, se procedió a la cuantificación de las proteínas contenidas en la fracción del sobrenadante mediante el método de Bradford utilizando el kit de detección Bio-Rad *Protein Assay* y usando albúmina sérica bovina (BSA, *Bovine Serum Albumine*, Sigma) para establecer una recta patrón.

La metodología de Western-blot empleada ha sido descrita previamente (Poch *et al.*, 2007). Las muestras (40-50 µg de proteína total) se resolvieron mediante geles de poliacrilamida (10-12.5%) en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) tras su desnaturalización a 95°C durante 5 min. en presencia de tampón de carga (15% SDS; 50% glicerol; 0.1% azul de bromofenol; 312.5 mM Tris-HCl, pH 6.8; 16% β-mercaptoetanol). Finalmente, las muestras se resolvieron en un sistema de electroforesis vertical (MiniProtean III, Bio-Rad) a 200 V durante 60 min. con un tampón compuesto por 50 mM Tris, 27 mM Glicina y 0.1% SDS. Como patrón para identificar el peso molecular de las proteínas se utilizó el marcador Bench/Mark™ *Prestained Protein Ladder* (Invitrogen).

A continuación, las muestras fueron transferidas a una membrana de PVDF (Immobilon TM-P *Transfer Membrane*, Millipore) durante 1 hr. a 100 V, utilizando el sistema de transferencia MiniProtean (Bio-Rad), 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 tampón Tris salino (TBS) y se incubaron en solución de bloqueo (5% de leche descremada en polvo en TBS + 0.1% Tween-20, TBT) durante 30 min. a temperatura ambiente y en agitación.

A continuación se procedió a incubar las membranas con los correspondientes anticuerpos primarios (**Tabla 1**), durante 1-16 hrs. y posteriormente se realizaron 3 lavados con TBT durante 10 min. cada uno para eliminar los restos de anticuerpo. Tras estos lavados las membranas se incubaron durante 45 min. con los correspondientes anticuerpos secundarios (**Tabla 2**), y se volvieron a lavar 3 veces con TBT durante 10 min. Los anticuerpos fueron preparados en solución de bloqueo a las concentraciones indicadas. 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 sistema ECL-plus (Amersham). Las membranas se cubrieron con film transparente y se expusieron a films X-OMAT (Kodak).

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

Para la cuantificación de las bandas, los films de autorradiografía se escanearon y se analizaron por densitometría utilizando el programa QuantityOne (Bio-Rad).

Anticuerpos primarios	Casa comercial	Referencia	Dilución	Descripción
Anti-RhoE/Rnd3	Upstate	05-723	WB:1:500 IHQ: 1:100	Monoclonal de ratón
Anti-pMLC	Cell Signaling	3671	1:100	Policlonal de conejo
Anti-MLC	Cell Signaling	3672	1:100	Policlonal de conejo
Anti-RhoA	Santa Cruz	sc-418	1:100	Monoclonal de ratón
Anti-Cdc42	Santa Cruz	sc-87	1:250	Policlonal de conejo
Anti-Rac1	Upstate	05-389	1:15000	Monoclonal de ratón
Anti-pPaxilina (Y-118)	Cell Signaling	2541	1:1000	Policlonal de conejo
Anti-Paxilina	BD Transd. lab.	610051 610052	WB:1:10000 IHQ: 1:200	Monoclonal de ratón
Anti-pPAK-1 (T-423)	Santa Cruz	sc-12925	1:200	Policlonal de cabra
Anti-pERK (Y-204)	Santa Cruz	sc-7383	1:200	Monoclonal de ratón
Anti-ERK	Santa Cruz	sc-93	1:500	Policlonal de conejo
Anti-ciclina D1	Santa Cruz	sc-20044	1:100	Monoclonal de ratón
Anti-pFAK (Y-925)	Cell signalling	3284	1:1000	Policlonal de conejo
Anti-FAK	Santa Cruz	sc-557	5:3000	Policlonal de conejo
Anti-p53	Novocastra	NCL-p53- CM5	1:500	Policlonal de conejo
Anti-p27	Santa Cruz	sc-528	1:200	Policlonal de conejo
Anti- β -Galactosidasa	Abcam	ab116	WB: 1:50 IHQ: 1:100	Monoclonal de ratón
Anti-PCNA	Santa Cruz	sc-56	1:50	Monoclonal de ratón
Anti-Actina HRP	Sigma	A-3854	1: 20000	Monoclonal de ratón

Tabla 1. Lista de anticuerpos primarios empleados en este trabajo. WB: Western-blot. IHQ: Inmunohistoquímica.

Anticuerpos secundarios	Casa comercial	Referencia	Dilución
anti Mouse IgG-HRP (Fc)	Pierce	31437	1:5000
anti Rabbit IgG-HRP (Fc)	Pierce	31463	1:5000
anti Mouse IgG (Fab specific)-FITC	Sigma	F8771	1:100
anti Mouse IgG Biotinilado	Vector Lab.	BA-9200	1:300

Tabla 2. Lista de anticuerpos secundarios empleados en este trabajo.

5. Análisis de la actividad de proteínas

5.1. Análisis de la actividad de proteínas Rho (GTP-Pull Down)

Para poder analizar los niveles de RhoA, Rac1 y Cdc42 activas, se utilizó la técnica de GTP-Pull Down (Pellegri y Mellor, 2008). Para ello, se utilizaron 3 placas de 10 cm con MEF de cada genotipo al 70% de confluencia. Se lavaron las células con TBS frío y sobre hielo, se lisaron con 500 μ l de solución de lisis (1% Tritón X-100; 0.5% Deoxicolato sódico 10%; 0.1% SDS; 50 mM Tris pH 7.5; 500 mM NaCl; 10 mM $MgCl_2$; 10 μ g/ml Aprotinina; 10 μ g/ml Leupeptina; 1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)) y se centrifugaron a 4°C durante 10 min. a 25000 g. A continuación se reservaron 25 μ l de sobrenadante (*Input*) y se utilizaron los 475 μ l restantes para el ensayo. No se cuantificó la cantidad de proteínas en los extractos ya que en estos ensayos es importante trabajar muy rápido y porque la actividad de estas proteínas se calcula como la cantidad de proteína activa (unida a GTP) referida a la proteína total. En el caso del Pull Down de RhoA los extractos celulares se incubaron con 120 μ l de partículas de glutatión unidas al dominio de unión de Rhotekina (*Rhotekin Binding Domain*), fusionado a GST (GST-TRBD). En el caso de Rac1 y Cdc42 los extractos se incubaron con 120 μ l de partículas de glutatión unidas al dominio de unión de PAK-1 (*PAK-1 Binding Domain*, Millipore). Las incubaciones se llevaron a cabo durante 1 hr. y a 4°C en rotación.

Tras la incubación se centrifugaron las muestras a 500g a 4°C y se lavaron las partículas tres veces con 500 μ l de solución de lavado (1% Tritón X-100; 50 mM Tris pH 7.5; 150 mM NaCl; 10 mM $MgCl_2$; 10 μ g/ml Aprotinina; 10 μ g/ml Leupeptina; 0.1 mM PMSF) eliminándose tras cada centrifugación el sobrenadante con una aguja

de 25G. Finalmente las partículas de glutatión se resuspendieron en 25 µl de tampón de carga, se hirvieron y las proteínas se resolvieron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) al 12.5%. Seguidamente, se transfirieron las muestras a una membrana de PVDF (ver técnica de Western-blot) y se detectaron las proteínas RhoA, Cdc42 y Rac1 mediante la incubación con sus anticuerpos específicos (ver **Tabla 1**).

5.2. Análisis de la actividad de ROCK-I

Para determinar la actividad de ROCK-I se utilizó el kit CycLex® Rho-kinase Assay Kit (Cyclex). Como muestras, se utilizaron 4 µg de extractos proteicos provenientes de lisados de MEF RhoE *+/+* y MEF RhoE *gt/gt* al 70% de confluencia. Como control positivo se utilizó la proteína recombinante ROCK-II. Se incubaron las muestras durante 30 min. a 30°C en agitación en pocillos recubiertos con un sustrato correspondiente al extremo C-terminal de la subunidad de unión a la miosina de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP), sustrato capaz de ser fosforilado por ROCK-I. A continuación se lavaron los pocillos con solución de lavado, se añadieron 100 µl de anticuerpo anti-fosfo serina/treonina conjugado a peroxidasa (HRP, *Horseradish Peroxidase*) y se incubaron las muestras durante 1 hr. a temperatura ambiente, en agitación. Seguidamente se añadieron 100 µl de reactivo de sustrato durante 10 min. para permitir la reacción colorimétrica y finalmente 100 µl de solución *stop* para detener la reacción. Se midió la absorbancia de los pocillos a 470 nm en un lector de placas VICTOR™ X3 (Perkin Elmer).

6. Inmunofluorescencia

Mediante esta técnica estudiamos la organización del citoesqueleto de actina y las adhesiones focales en células MEF de los diferentes genotipos. Para ello, se sembraron 3×10^4 células MEF sobre cubreobjetos y se mantuvieron en cultivo 24 hrs., excepto en los ensayos de adhesión a tiempo corto en que el tiempo de cultivo fue de 30 min. Se recogieron los cubreobjetos y se lavaron 3 veces con PBS. A continuación se fijaron con formaldehído al 4% (FA, J.T. Baker) durante 10 min. a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con 0.2% Tritón X-100 en PBS durante 20 min. a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron los cubreobjetos con PBS 2 veces y posteriormente se bloqueó con solución de bloqueo (3% BSA en TBT) para evitar reacciones inespecíficas y se lavaron las células con PBS.

Para la detección de las adhesiones focales se incubaron con el anticuerpo anti-Paxilina (ver **Tabla 1**) diluido en BSA 3% durante 1 hr. a temperatura ambiente. Después se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo anti-mouse FITC (ver **Tabla 2**) en solución de bloqueo (BSA 3% en TBT), 1 hr. a temperatura ambiente. Para la detección de las fibras de estrés de actina se añadió Faloidina conjugada a un fluoróforo rojo (Faloidina-TRITC 1:800, Sigma P1951). Finalmente se lavaron los cubreobjetos con PBS-T (Tampón fosfato salino con 0.5% Tritón X-100) 3 veces, otro lavado con PBS, un último lavado con agua destilada y se montaron en el portaobjetos con una solución de montaje que contiene DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para la tinción de los núcleos (Vectashield, Vector). Una vez hecha la inmunofluorescencia se visualizaron las muestras por microscopía confocal (Nikon Eclipse C1 plus).

Para el análisis del fenotipo de las fibras de estrés, se analizaron muestras de los tres genotipos a ciegas. Se estableció un criterio para clasificar el estado del citoesqueleto, pudiendo ser éste normal, aumentado o disminuido, utilizando como referencia el estado del citoesqueleto de muestras conocidas correspondientes a MEF RhoE +/+ y MEF RhoE *gt/gt*.

7. Inmunohistoquímica

Para estudiar la localización de proteínas en cortes histológicos, se procedió a la fijación de los tejidos con PFA 4% pH 7.3 (en PBS) y se mantuvieron en el fijador durante 16 hrs. A continuación se lavaron en alcohol al 70% para, posteriormente, iniciar la inclusión automática utilizando un inclusor de parafina HMP110 (MYR), programado con los siguientes tiempos de incubación: 2 hrs. en alcohol 80%, 2 hrs. en alcohol 96%, 1 hr. en alcohol 100%, 1 hr. en alcohol 100%, 2 hrs. en alcohol-xilol (1:1), 1 hr. en xilol, 1 hr. en xilol, 2 hrs. en parafina, 2 hrs. en parafina.

Tras incluir las muestras en parafina se realizaron secciones de 4 µm de grosor con un microtomo HM310 (Microm), y se montaron sobre portaobjetos impregnados de poli-L-Lisina (Thermo Scientific). A continuación, se desparafinaron e hidrataron realizando 2 lavados con xilol durante 10 min., 2 lavados de 5 min. con alcohol 100%, 1 lavado de 5 min. con alcohol 96%, 1 lavado de 5 min. con alcohol 60% y, finalmente en agua.

Posteriormente, las secciones de tejido desparafinadas e hidratadas se sumergieron en tampón citrato (Acido cítrico 10 mM a pH 8) y se incubaron a 100°C

durante 15 min. para desenmascarar los epítomos de la proteína de manera que pudiera ser reconocida por el anticuerpo primario.

Tras lavar los cortes se procedió a la inactivación de la peroxidasa endógena incubando las muestras 40 min. en oscuridad con una solución de agua oxigenada 0.3% y metanol 70%. Después se lavaron las muestras 2 veces con PBS durante 10 min.

Para la realización de los siguientes pasos se utilizaron los componentes del Kit Elite ABC (Vector Laboratories). En primer lugar se bloquearon las muestras durante 20 min. con suero de caballo para evitar las reacciones inespecíficas. Luego se eliminó el exceso de suero y, sin lavar, se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario diluido en PBS con 3% BSA a 4°C durante 16-18 hrs. (ver **Tabla 1**). A continuación, se lavaron las secciones 2 veces con PBS durante 10 min. y se incubaron 40 min. con el anticuerpo secundario biotinilado. Posteriormente, se lavaron las muestras 2 veces con PBS durante 10 min. y se incubaron 40 min. con el complejo avidina-biotina-peroxidasa.

Finalmente, se lavaron las preparaciones 2 veces con PBS durante 10 min. y se incubaron con diaminobenzidina (DAB, *Peroxidase substrate kit*, Vector Laboratories) a temperatura ambiente durante 3-5 min. hasta que se produjo la reacción enzimática. Tras esto, se lavaron los cortes durante 5 min. en agua corriente, se deshidrataron pasándolos por los alcoholes de 60%, 96% y 100%, y por último, se montaron las muestras con DPX (*Dibutyl Phthalate Xylene*, Sigma) y se dejaron secar 24 hrs. antes de observarlas al microscopio óptico.

Como control negativo de la reacción se procesaron de igual manera secciones adyacentes en ausencia del anticuerpo primario.

8. Análisis histológico

8.1. Tinción con Hematoxilina-Eosina

Los animales se sacrificaron a las edades referidas y se diseccionó la piel de animales de cada genotipo. Las muestras se procesaron igualmente que para la realización de la inmunohistoquímica (ver apartado anterior). Tras ser desparafinadas e hidratadas se tiñeron con hematoxilina durante 5 min., a continuación se lavaron con abundante agua corriente para retirar el exceso de colorante y finalmente se tiñeron con eosina durante 30 seg.

Seguidamente, se lavaron los cortes durante 5 min. en agua corriente, se deshidrataron pasándolos por los alcoholes de 60%, 96% y 100% y, por último, se montaron las muestras con DPX y se dejaron secar 24 hrs. antes de observarlas al microscopio óptico.

8.2. Tinción con X-Gal

La β -Galactosidasa es una enzima de origen bacteriano que transforma el sustrato X-Gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indol- β -D-Galactósido) en un producto insoluble y de color azul de manera que otorga esta coloración al tejido en que se expresa la enzima. Como se ha descrito anteriormente la construcción insertada para alterar el procesamiento del transcrito de *RhoE* en el ratón incluye el gen de la β -Galactosidasa. Al estar situada dentro de la región codificante, la enzima se expresará en este ratón bajo el control del promotor de *RhoE*, de manera que en animales *RhoE* *+/gt* y *RhoE* *gt/gt*, la expresión de la enzima se producirá en el momento y en la localización en la que *RhoE* debiera estar expresándose.

Para realizar esta técnica, la piel se fijó con PFA 2% + 2 mM $MgCl_2$ durante 16 hrs. y posteriormente se crioprotegió con una solución de sacarosa al 30% en PBS. Una vez sumergido el tejido en sacarosa, se incluyó en medio crioprotector OCT (Diapath), se congeló a $-80^\circ C$ y se almacenó a esta temperatura hasta su uso. A continuación se realizaron secciones de 20-25 μm en el criostato (Microm), que se recogieron en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina y que se almacenaron a $-20^\circ C$ hasta el momento de su uso.

Para realizar la tinción de X-Gal las secciones seleccionadas se descongelaron a temperatura ambiente durante 10-15 min. A continuación se procedió a realizar la postfijación con una solución de PFA 0.2% + 2 mM $MgCl_2$ durante 15-20 min. a $4^\circ C$. Seguidamente se realizaron 2 lavados con PBS + 2 mM $MgCl_2$ durante 10 min. a $4^\circ C$, y 1 lavado con solución de lavado (PBS; 2 mM $MgCl_2$; 0.01% desoxicolato sódico; 0.02% NP-40). A continuación se tiñeron las secciones con solución de tinción (5 mM ferrocianuro potásico * 3 H_2O ; 5 mM ferrocianuro potásico * 6 H_2O ; 0.01% desoxicolato sódico; 0.02% NP-40; 2 mM $MgCl_2$; 1 mg/ml X-Gal ,Biotest; en PBS) y se incubaron las muestras durante toda la noche a $30^\circ C$ en agitación.

Finalmente, las secciones se lavaron varias veces en PBS, se tiñeron 30 seg. con eosina 1% y se deshidrataron en alcoholes de 60%, 96% y 100%. Por último, se

montaron con DPX y se dejaron secar 24 hrs. antes de observarlas al microscopio óptico.

9. Ensayos de adhesión y migración celular

9.1. Ensayo de adhesión celular

Con este ensayo se analizó la capacidad de adhesión al sustrato de MEF provenientes de ratones RhoE +/+, RhoE +/gt y RhoE gt/gt. Para ello, se sembraron las células a una densidad de 2×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos, previamente tratadas con 50 μ l de fibronectina (Sigma, 10 μ g/ μ l) a 4°C durante toda la noche y posteriormente bloqueadas con BSA 2% durante 30 min. Transcurridos los diferentes tiempos, se lavaron los pocillos dos veces con PBS y se fijaron las células con FA 4% en PBS durante 10 min. Seguidamente se lavaron los pocillos de nuevo y se tiñeron las células con cristal violeta (Panreac) al 1% en metanol 10% durante 10 min.

Finalmente se lavaron los pocillos con agua y se dejó secar la placa. Se añadieron 100 μ l de SDS 1% para extraer el cristal violeta de las células y se procedió a la lectura de la absorbancia a 570 nm en un lector de placas VICTOR™ X3.

9.2. Ensayo de cierre de herida (*wound-healing*)

Se sembraron MEF a una densidad de 5×10^4 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se crecieron durante dos días, hasta alcanzar la confluencia. Seguidamente se cambió el medio de cultivo D-10 por medio de cultivo sin suero durante 16 hrs. A continuación se realizó una herida con una punta de pipeta de 20 μ l y se cambió de nuevo el medio por D-10 permitiendo la migración celular hacia el interior de la herida durante 24 hrs. Transcurrido ese tiempo se fijaron las células con FA 4% y se tiñeron los núcleos con DAPI (Vectashield, Vector). Finalmente se realizaron fotografías de las heridas presentando los núcleos de las células migradas y se procedió a su contaje usando el programa informático ImageJ (*National Institutes of Health, USA*).

9.3. Ensayo de migración utilizando el Cell Observer

Se sembraron MEF a una densidad de 2×10^4 células/pocillo en placas de 8 pocillos (ibidi® GmbH) y se crecieron durante 16 hrs. A continuación se grabó el movimiento celular mediante un microscopio Cell Observer (Carl Zeiss Microscopy) y se tomaron fotografías de las células cada 20 min. durante 24 hrs. Para el análisis de

la migración celular se utilizaron los programas informáticos AxioVision y Fiji (*National Institutes of Health*). Se realizó un seguimiento manual de la posición de las células, obteniendo las distancias y la velocidad en μm por min. Posteriormente calculamos la persistencia celular, que equivale a la distancia total recorrida por la célula entre la distancia recorrida en línea recta entre el primer y último punto en micras. La persistencia indica la dirección del movimiento (siendo 0 el valor indicativo de que una célula ha girado sobre sí misma).

10. Ensayos de proliferación y supervivencia celular

10.1. Curvas de crecimiento

Se sembraron MEF a una densidad de 2×10^4 células en pocillos de 35 mm por triplicado. A las 24 hrs. (día 0) se fijaron las células del primer punto y se repitió el proceso cada 48 hrs. cambiando el medio al resto; las células se fijaron con FA 4% y se tiñeron con cristal violeta al 1% durante 30 min. Después de lavar con agua y dejar secar las placas, el cristal violeta se solubilizó en ácido acético al 15% y se cuantificó la absorbancia a 570 nm en un lector de placas VICTOR™ X3. Las medidas de crecimiento se relativizaron al día 0.

10.2. Análisis del ciclo celular

MEF de los diferentes genotipos se sembraron a una densidad de 7×10^5 células en placas de 10 cm y se mantuvieron en cultivo durante 48 hrs. A continuación las células se clasificaron en asincrónicas (cultivadas en D-10), sin suero (cultivadas en DMEM con P/S durante 48 hrs.) y reestimuladas (cultivadas en DMEM con P/S durante 48 hrs. y a continuación durante 16 hrs. con D-10)

Para estudiar el ciclo celular, se recogieron 5×10^5 células por centrifugación, se lavaron con PBS frío y se resuspendieron en un volumen de 1ml de PBS. Para proceder a su fijación, se añadió 4 ml de etanol 100% frío gota a gota mezclando en el vortex al mismo tiempo. Las células se conservaron a -20°C hasta su tinción.

Para la tinción del ADN con Yoduro de Propidio (PI, *Propidium Iodide*) se realizó una primera centrifugación de las células previamente fijadas. Se resuspendieron las células en 1 ml de PBS y se volvieron a centrifugar a temperatura ambiente. Las células se resuspendieron en 25 μl de PBS y se añadieron 500 μl del reactivo *DNA Prep Stain*, (*DNA Prep™ Reagent System*; Beckman Coulter).

Una vez teñidas las células, se analizaron en un citómetro de flujo FC500

(Beckman-Coulter).

10.3. Ensayos de inhibición por contacto

Se sembraron 4×10^4 células por pocillo en placas de 6 pocillos por triplicado. Se cambió el medio cada 48 hrs. y se fijaron las placas 7 días después de alcanzar las células el 100% de confluencia (día 15 postsiembra). Se tiñó con cristal violeta y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas VICTOR™ X3.

Para el análisis de la expresión de RhoE y p27 en alta densidad se sembraron 1×10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos por triplicado. A las 24 hrs. se recogieron las células (día 0). Se cambió el medio cada 48 hrs. y se recogieron las células a día 4 y a día 8 de la siembra.

10.4. Ensayos de supervivencia celular

Para los ensayos de supervivencia a estrés genotóxico, MEF de los diferentes genotipos se sembraron por duplicado a una densidad de 4×10^3 células por pocillo en placas de 96 pocillos. 24 hrs. después, se les administraron los diferentes tratamientos: Adriamicina 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (Farmiblastina, Pfizer), Camptotecina 4 μM (Sigma), Etopósido 100 μM (Sigma), H_2O_2 200 μM (J.T. Baker) y Cisplatino 10 μM (Sigma) durante 24 hrs. y se analizó la tasa de supervivencia celular. Para ello, se lavaron los pocillos dos veces con PBS y se fijaron las células con FA 4% durante 10 min. Seguidamente se lavaron los pocillos de nuevo y se tiñeron las células con cristal violeta al 1% en metanol 10% durante 10 min.

Finalmente se lavaron los pocillos con agua y se dejó secar la placa. Se añadieron 100 μl de SDS 1% para extraer el cristal violeta de las células y se procedió a la lectura de la absorbancia a 570 nm en un lector de placas VICTOR™ X3.

Para los ensayos de supervivencia a ultravioleta, MEF de los diferentes genotipos se sembraron a una densidad de 7×10^5 células por placa de 10 cm. 24 hrs. después, se retiró el medio, se lavaron las células con PBS, se aspiró completamente el líquido y se introdujeron las placas sin tapa en el interior de un UVlink crosslinker (Uvitec). A continuación se irradiaron las células con una dosis de 20 J/m^2 de Ultravioleta-B (312 nm) y se les añadió de nuevo medio D-10. Transcurridas 4 hrs. se recogieron las células y se tiñeron con PI para analizar el grado de muerte celular mediante citometría de flujo (ver apartado 10.2., excepto el proceso de fijación).

11. Ensayos de transformación *in vitro*

11.1. Ensayo de immortalización por pases seriados (protocolo 3T3)

MEF de pase temprano (P1-P5) de los diferentes genotipos se sembraron a una densidad de 17.5×10^4 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Cada tres días se tripsinizaron las células, se contaron y se volvieron a sembrar a la misma densidad. El número de divisiones se calculó utilizando la fórmula $PDL = 3.32 \cdot (\log N_f - \log N_i)$ (Kruse y Patterson, 1973), donde N_i es el número de células sembradas y N_f el número de células recogidas para cada punto. Las células se consideraron senescentes cuando el índice de división celular (PDL, *Population Doubling Level*) dejó de aumentar e inmortalizadas cuando el PDL tras la senescencia aumentó durante tres pases seguidos.

11.2. Ensayo de transformación con oncogenes

Se infectaron MEF RhoE +/+ y MEF RhoE *gt/gt* con las construcciones pLPC (control), pLPC-Ras^{V12} o pLPC-E1A/Ras (ver apartado 3.1.) y se sembraron a una densidad de 2×10^3 células por placa de 10 cm por triplicado. Las células se dejaron crecer en condiciones normales de cultivo durante tres semanas en el caso de los MEF infectados con pLPC-Ras^{V12} y durante una semana en el caso de los MEF infectados con pLPC-E1A/Ras. El medio D-10 se cambió cada 48 hrs. Posteriormente se fijaron con FA 4% y se tiñeron con cristal violeta para la visualización de colonias.

12. Ensayos de carcinogénesis *in vivo*

12.1. Ensayo de formación de fibrosarcomas

Se establecieron grupos de 20 animales por genotipo (RhoE +/+ y RhoE *+gt*), de entre 2 y 4 meses de edad. A los animales se les inyectó intramuscularmente, en el muslo izquierdo, una única dosis de 1 mg de 3-metilcolantreno (Sigma) disuelto en 40 μ l de aceite de sésamo (Sigma). Se monitorizó la aparición de fibrosarcomas realizando mediciones semanales con la ayuda de un calibre. Se consideró fibrosarcoma a tumores de tamaño igual o superior a 1.5 cm; los animales fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron los 3 cm de tamaño. Los tumores fueron congelados directamente en nitrógeno líquido, guardados en formol o utilizados para la derivación de líneas celulares. Para la derivación de líneas celulares a partir de fibrosarcomas, los tumores se trocearon y los fragmentos se dispusieron en placas de

10 cm con medio de cultivo D-10. Una vez obtenidas las células de los tumores y éstas alcanzaron la confluencia, se expandieron y congelaron.

12.2. Protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón

Para el desarrollo del protocolo de carcinogénesis química en piel (Kemp, 2005) se utilizaron animales RhoE *+/+* y RhoE *+gt* de entre 2 y 4 meses de edad. Dos días antes del comienzo del protocolo, se afeitó el lomo de los animales. Los ratones recibieron, de forma tópica, una única dosis de 32 μg de DMBA (9,10-dimetil-1,2-benzantraceno, Sigma) disuelto en 200 μl de acetona, y un tratamiento de dos dosis semanales de 12.5 μg de TPA (forbol 12-miristato 13-acetato, Sigma) disuelto en 200 μl de acetona, durante 15 semanas. La medición de los tumores se realizó semanalmente con la ayuda de un calibre. Los animales fueron sacrificados en la semana 40 de protocolo y se tomaron muestras de piel de la zona tratada con TPA y de una zona sin tratar. Las lesiones recogidas fueron congeladas directamente en nitrógeno líquido o conservadas en FA 4% para su posterior estudio. Los animales moribundos o con lesiones superiores a 2 cm fueron sacrificados antes de concluir el ensayo.

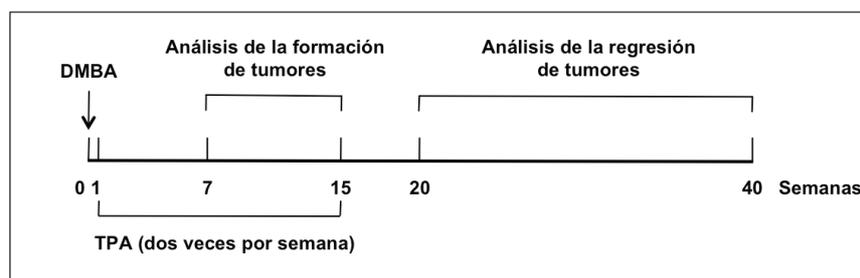


Figura 4. Diseño experimental del protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón. Durante el tratamiento con TPA los animales fueron afeitados periódicamente para asegurar la correcta administración del TPA. Los animales moribundos o con lesiones superiores a 2 cm fueron sacrificados antes de concluir el ensayo.

12.3. Respuesta proliferativa a TPA

Se establecieron grupos de cuatro animales por genotipo (RhoE *+/+*, RhoE *+gt* y RhoE *gt/gt*), de 15 días de edad. Dos días antes de la administración del tratamiento se afeitó parte del lomo de los animales. En la zona afeitada se les administró, de forma tópica, una única dosis de 12.5 μg de TPA disuelto en 200 μl de

acetona. 30 hrs. después del tratamiento los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras de piel de la zona tratada con TPA y de una zona sin tratar. Las muestras fueron congeladas directamente en nitrógeno líquido o conservadas en FA 4% para su posterior estudio.

12.4. Ensayo de tumorigénesis en ratones inmunocomprometidos *nu/nu*

12.4.1. Utilizando células derivadas de fibrosarcomas

Se utilizaron dos líneas celulares derivadas de fibrosarcomas de cada genotipo. 1.5×10^4 células resuspendidas en 100 μ l de PBS se inyectaron subcutáneamente en el costado de animales inmunocomprometidos *nu/nu*. De cada línea celular se realizaron 7 inyecciones independientes en diferentes ratones. El volumen del tumor se calculó cada 4 días a partir de medidas con un calibre, usando la fórmula $V = \frac{A \times B^2}{2}$ (cm^3), donde A es el diámetro mayor y B el diámetro perpendicular del tumor. A las 5 semanas los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los tumores para pesarlos y procesarlos para su análisis histológico.

12.4.2. Utilizando células MEF transformadas con E1A y Ras^{V12}

Células MEF RhoE +/+ y RhoE *gt/gt* previamente infectadas con vector vacío (pLPC) o pLPC-E1A/Ras (ver apartado 3.1.) se tripsinizaron, se contaron y se resuspendieron a una concentración final de 4×10^5 células en 100 μ l de PBS por inyección, y se pincharon subcutáneamente en los costados de 16 ratones *nu/nu*.

El volumen del tumor se calculó cada 4 días a partir de medidas con un calibre, usando la fórmula $V = \frac{A \times B^2}{2}$ (cm^3), donde A es el diámetro mayor y B el diámetro perpendicular del tumor. A las 5 semanas los ratones fueron sacrificados y se les extrajeron los tumores para pesarlos y procesarlos para su análisis histológico.

12.5. Ensayos experimentales de metástasis

Células MDA-MB-231-TGL-pIKO.1 y MDA-MB-231-TGL-shRhoE, infectadas con el vector pIKO.1 vacío o con el shRhoE TRCN330303 respectivamente (ver apartado 3.2.), fueron inyectadas (1×10^6 células en 100 μ l PBS) en la vena de la cola de ratones *nu/nu*. Para medir la bioluminiscencia se inyectaron 200 μ l de D-luciferina (15 mg/ml en PBS) intraperitonealmente a los ratones previamente anestesiados. Las imágenes se obtuvieron pasados 5 min. tras la inyección con un aparato Xenogen IVIS (IVISR Lumina II) acoplado al programa *Living Image Acquisition and Analysis*

Software (Xenogen Corporation). Las medidas se tomaron cada 5 min. hasta que la intensidad de bioluminiscencia comenzó a disminuir. Seguidamente, para analizar la intensidad de la señal, se definió el área de interés y se calculó el flujo de fotones/seg. Este valor se analizó en cada medida realizada durante todo el experimento. La primera medida se realizó a las 24 hrs. post-inyección y posteriormente a la semana siguiente y finalmente cada dos semanas hasta un periodo máximo de 9 semanas post-inyección.

13. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el software GraphPad Prism. Los resultados se expresan como la media + error estándar (EEM). Las diferencias entre los grupos se analizaron a través de un test *t* de Student o un test ANOVA.



Resultados

1. La ausencia de RhoE produce un aumento del número de fibras de estrés de actina y aumenta la adhesión al sustrato

Se han realizado numerosos estudios *in vitro* para determinar la función de RhoE en la regulación del citoesqueleto. Estos estudios han demostrado que la sobreexpresión de RhoE en diferentes líneas celulares provoca una disminución en el fenotipo de las fibras de estrés de actina. Sin embargo, poco se sabe sobre el efecto de RhoE *in vivo*. Por este motivo, nos planteamos caracterizar el efecto de la ausencia de RhoE en un modelo de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) procedentes de ratones RhoE *gt/gt*.

En primer lugar nos planteamos estudiar el efecto de la ausencia de RhoE sobre la organización del citoesqueleto de actina. En la **Figura 5** se muestran fotografías representativas de MEF de los diferentes genotipos tras la doble tinción con Faloidina y DAPI. La cuantificación de los diferentes fenotipos en las fibras de actina (**Figura 5**) muestra que la ausencia de RhoE induce un aumento de las fibras de estrés de actina con respecto a los MEF RhoE *+/+*. Así, en los MEF RhoE *+/+* sólo el 20% de las células mostró un patrón de formación de fibras de estrés aumentado mientras que en los MEF RhoE *gt/gt* dicho fenotipo asciende a más del 70%. Además el fenotipo de fibras de estrés disminuido llega a ser inexistente en los MEF RhoE *gt/gt* mientras que en los MEF RhoE *+/+* alcanza valores del 20%. Los MEF RhoE *+/gt* presentan valores intermedios no observándose diferencias significativas con respecto a los MEF silvestres.

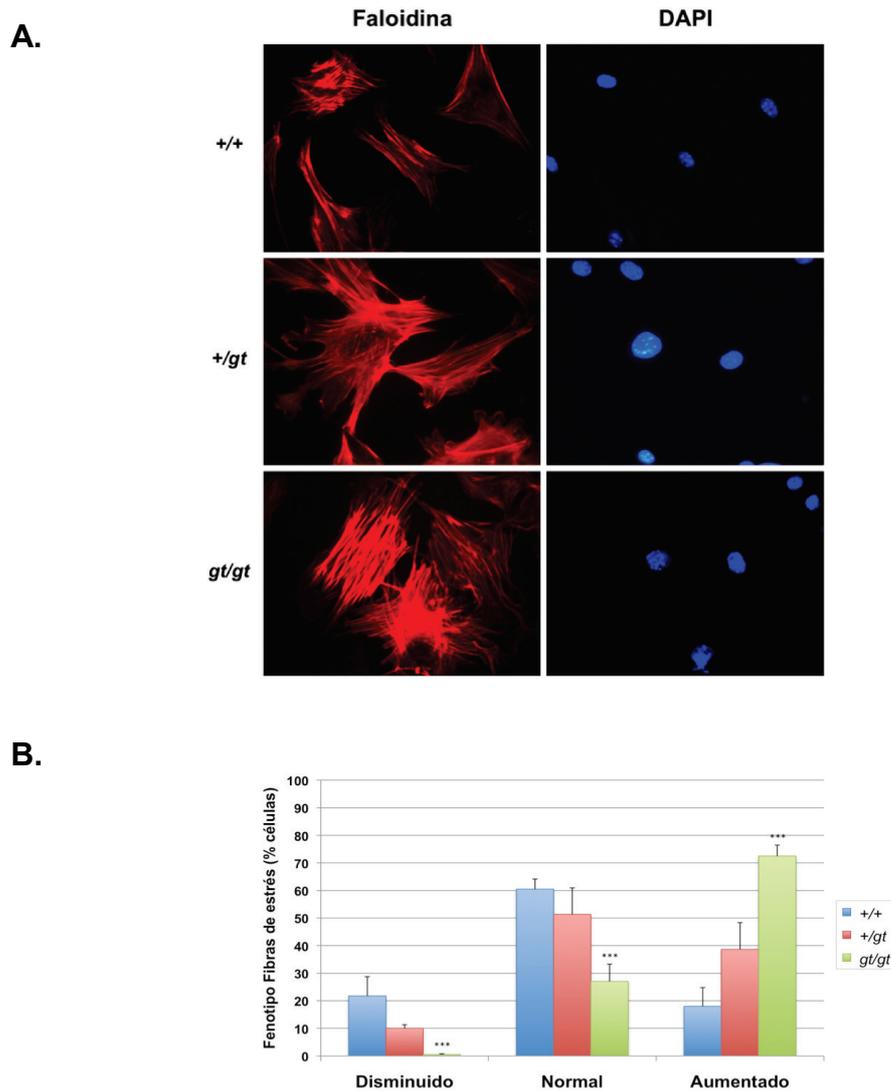


Figura 5. La ausencia de RhoE provoca un aumento en la formación de fibras de estrés de actina.

A. MEF de los tres genotipos (RhoE +/+, RhoE +/gt y RhoE gt/gt) fueron fijadas y teñidas con Faloidina (rojo) para visualizar el citoesqueleto de actina, y con DAPI (azul) para teñir el núcleo de las células. Se muestran imágenes representativas de cada genotipo. **B.** Cuantificación del fenotipo de fibras de estrés de actina. Se analizaron al menos 100 células en diferentes campos de cuatro experimentos independientes. Se contabilizaron como disminuido, normal y aumentado aquellas células con bajo, normal y alto número de fibras de estrés, respectivamente. Los resultados se expresan como la media + EEM. El análisis estadístico se realizó mediante un test ANOVA de doble vía. (***) $p < 0.0001$ vs RhoE +/+).

A continuación, decidimos estudiar los cambios moleculares implicados en el efecto de la ausencia de RhoE sobre el citoesqueleto de actina. Para ello, se cultivaron MEF de los diferentes genotipos hasta alcanzar una confluencia del 60-70%. A continuación se recogieron las células, se lisaron, y se analizaron mediante

Western-blot los niveles de fosforilación de la cadena ligera de la miosina (pMLC) comparándolos con los niveles totales de proteína (MLC).

En la **Figura 6**, observamos que los niveles de pMLC en MEF *+/gt* fueron muy variables, no existiendo diferencias significativas respecto a los MEF RhoE *+/+*. Sin embargo, vimos un aumento significativo en la fosforilación de la MLC en los MEF RhoE *gt/gt* comparado con los MEF RhoE *+/+*, mientras que la expresión de MLC total no variaba entre genotipos.

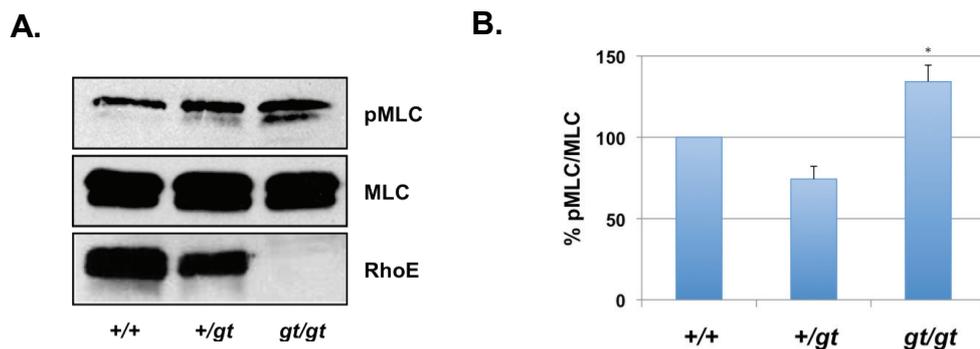


Figura 6. La fosforilación de la cadena ligera de miosina está aumentada en los MEF RhoE *gt/gt*.

A. Análisis de la fosforilación de MLC mediante Western-blot en los diferentes genotipos de MEF. Se muestra una imagen representativa de cuatro experimentos independientes. **B.** Cuantificación de la fosforilación de MLC expresada como la relación entre pMLC y MLC total de cuatro experimentos independientes. Los resultados se expresan como la media + EEM. El análisis estadístico se realizó mediante un Test *t* de Student (**p* < 0.05 vs RhoE *+/+*).

Para corroborar si el aumento de las fibras de estrés de actina era debido a la ausencia de RhoE, se infectaron MEF RhoE *gt/gt* con un vector retroviral que expresa RhoE junto con la proteína verde fluorescente (GFP). Tras 24 hrs. de la infección, se procedió a su fijación y se tiñeron con Faloidina las fibras de actina. Tal y como se observa en la **Figura 7**, la sobreexpresión de RhoE en estas células provoca una disminución en la fosforilación de la cadena ligera de miosina y un menor número de fibras de estrés de actina comparado con las células RhoE *gt/gt* no infectadas. Estos resultados indican que efectivamente la disminución en el fenotipo de fibras de estrés de actina es debido a la función de RhoE.

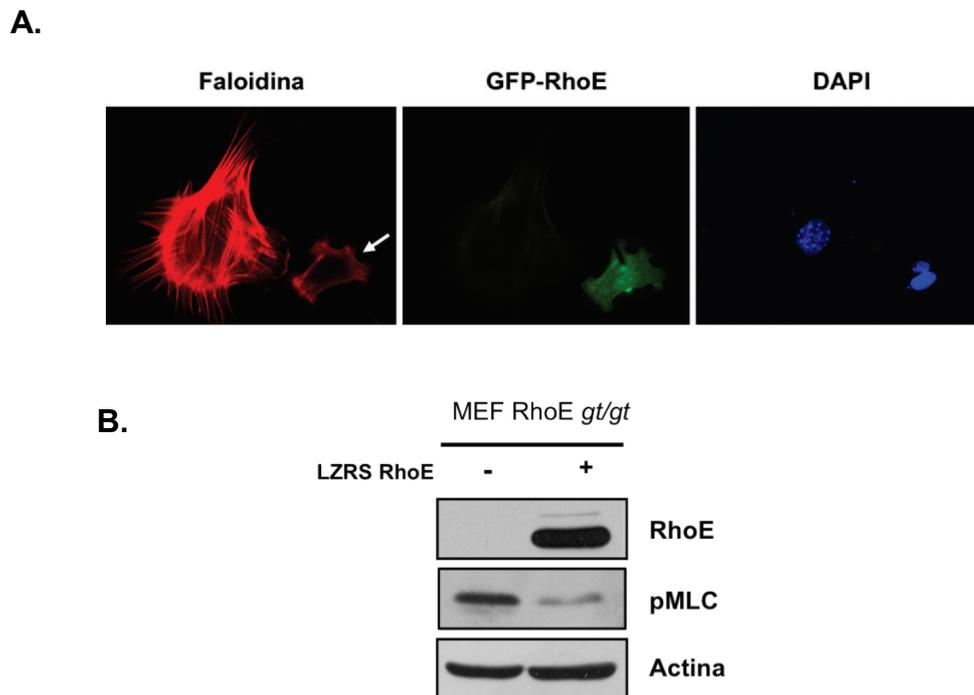


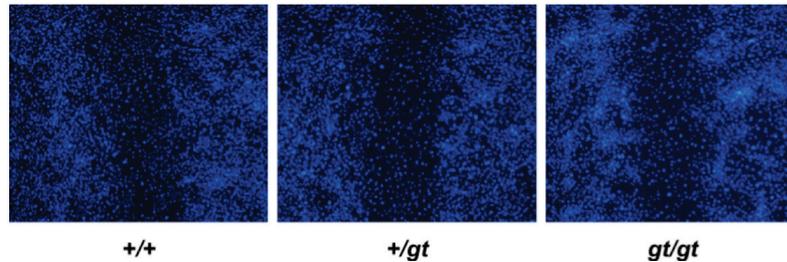
Figura 7. La sobreexpresión de RhoE en MEF RhoE *gt/gt* provoca una disminución de las fibras de estrés y una menor fosforilación de la cadena ligera de la miosina (pMLC). **A.** MEF RhoE *gt/gt* fueron infectados con un vector retroviral que expresa RhoE junto a la proteína verde fluorescente (GFP). La tinción con Faloidina (rojo) marca el citoesqueleto de actina. Se utilizó DAPI (azul) para teñir el núcleo de las células. **B.** Análisis de la expresión de RhoE y fosforilación de MLC por Western-blot en MEF RhoE *gt/gt* infectadas con un vector retroviral que expresa RhoE. Se observa una menor fosforilación de MLC en dichas células, comparado con MEF RhoE *gt/gt* no infectadas.

A continuación estudiamos el efecto de la ausencia de RhoE sobre la migración celular, para ello, utilizamos dos ensayos distintos, el método de cierre de herida (*wound-healing*) y la grabación del movimiento celular mediante el uso del microscopio Cell Observer.

Para el ensayo de cierre de herida, se sembraron MEF de cada genotipo en placas de 6 pocillos dejándolas crecer hasta alcanzar la máxima confluencia tal y como se describe en Material y Métodos. A continuación se realizó una “herida” en la superficie de la placa y se permitió la migración celular hacia el interior de la herida. Para el análisis de la migración celular se realizaron fotografías de las heridas y se procedió al conteo de los núcleos situados dentro de la herida usando el programa informático ImageJ.

Como podemos observar en la **Figura 8**, la ausencia de RhoE no altera la capacidad migratoria de los MEF. Así, el número medio de células que migraban hacia el interior de la herida fue entre unas 150 y 250 células en todos los casos.

A.



B.

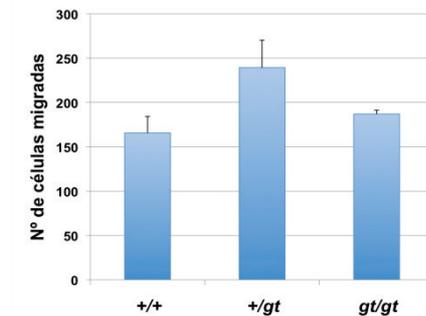


Figura 8. La ausencia de RhoE no altera la capacidad migratoria de MEF en ensayos de *wound-healing*. **A.** Imágenes representativas de células teñidas con DAPI (azul) correspondientes a MEF de los tres genotipos, RhoE +/+, RhoE +/gt y RhoE gt/gt tras un ensayo de *wound-healing*. **B.** Histograma correspondiente a la media + EEM de cuatro experimentos independientes. El conteo de las células se realizó mediante el programa informático ImageJ en diferentes campos.

Para el ensayo en el Cell Observer, se sembraron MEF de cada genotipo en placas de 8 pocillos y se crecieron durante 16 hrs. A continuación se grabó el movimiento celular mediante un microscopio Cell Observer durante 24 hrs. Como podemos observar en la **Figura 9**, la ausencia de RhoE no altera la velocidad celular de los MEF. En cuanto a la persistencia celular, que indica la dirección del movimiento (siendo 0 el valor indicativo de que una célula ha girado sobre si misma), tampoco observamos diferencias entre los diferentes genotipos.

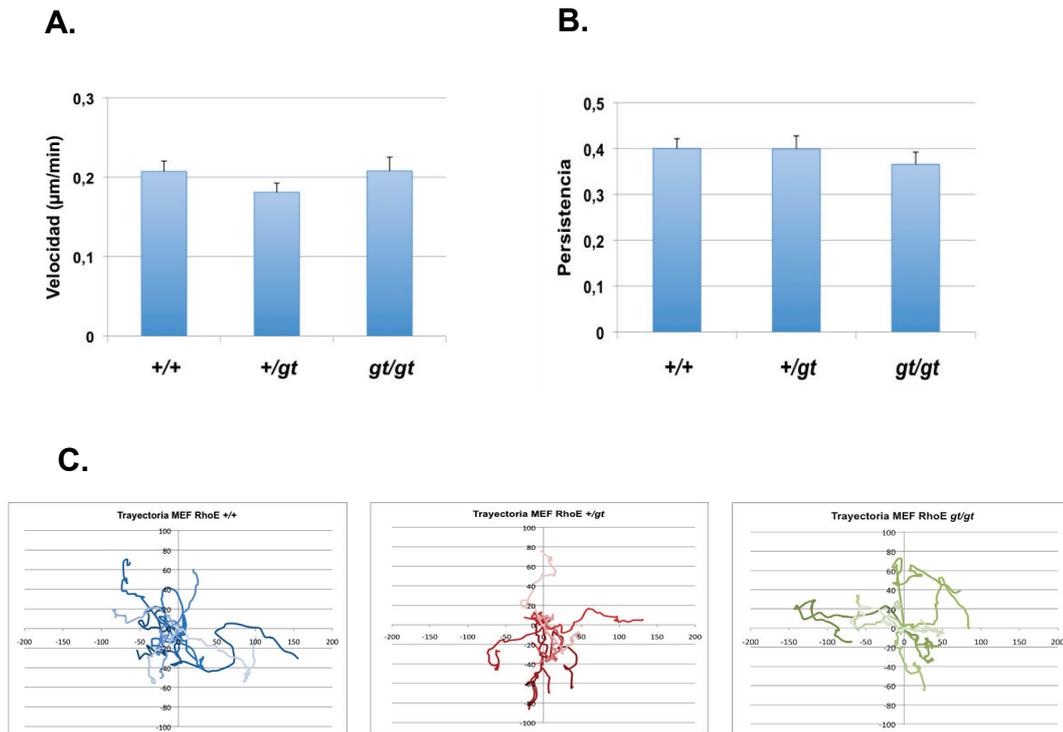


Figura 9. La ausencia de RhoE no altera la capacidad migratoria en MEF. **A.** Cuantificación de la velocidad de MEF de diferentes genotipos, se cuantificaron un total de 60 células por genotipo, de tres clones independientes durante 24 hrs. **B.** Persistencia de MEF calculada como la distancia recorrida total entre la distancia recorrida en línea recta entre el primer y último punto. **C.** Histogramas representativos de diez trayectorias de MEF de los diferentes genotipos en micras.

Los cambios en la dinámica del citoesqueleto de actina, pueden afectar a procesos celulares como la adhesión. Puesto que los MEF RhoE *gt/gt* presentaban un fenotipo aumentado de las fibras de estrés de actina, nos planteamos estudiar si los cambios observados en el citoesqueleto podían afectar a otras funciones celulares como la adhesión al sustrato. Para ello, MEF de cada genotipo se levantaron del sustrato con tripsina o con EDTA y se sembraron en placas de 96 pocillos previamente tratadas con fibronectina. Tras 30 y 90 min., se analizó la cantidad de células adheridas mediante tinción con cristal violeta, tal y como se describe en Material y Métodos. En la **Figura 10** observamos que no hay diferencias en la adhesión en los fibroblastos RhoE *+/gt* respecto a los MEF silvestres. Sin embargo, independientemente del método utilizado, existe una mayor adhesión al sustrato en los MEF RhoE *gt/gt*, siendo las diferencias significativas tanto a los 30 como a los 90 minutos post-siembra.

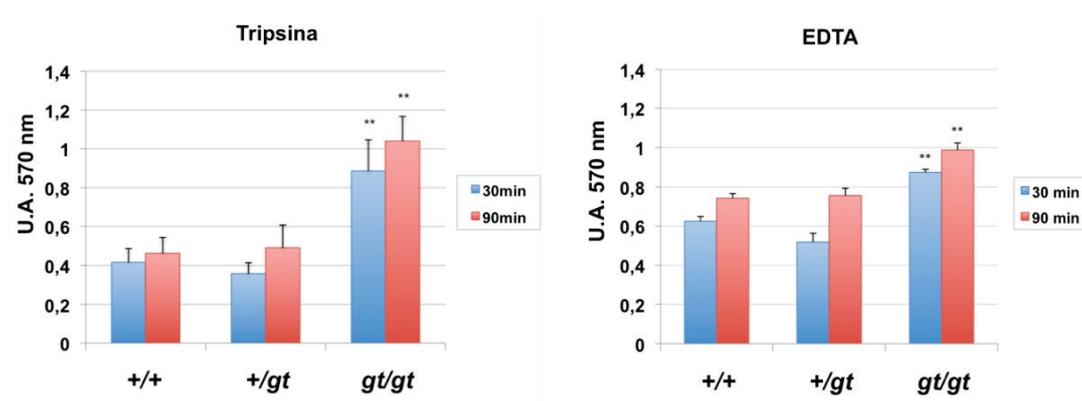


Figura 10. La ausencia de RhoE provoca una mayor adhesión sobre el sustrato. MEF de los diferentes genotipos se levantaron del sustrato mediante tratamiento con tripsina (izquierda) o EDTA (derecha), se sembraron en pocillos con fibronectina y se procedió a su fijación a los tiempos de 30 y 90 minutos. El número relativo de células adheridas se expresa como la media + EEM de cuatro experimentos independientes (U.A.: unidades relativas de absorbancia). El análisis estadístico se realizó mediante un Test ANOVA de doble vía (** $p < 0.001$ vs RhoE +/+).

Posteriormente, realizamos a estos mismos tiempos una inmunofluorescencia con Faloidina para observar el estado del citoesqueleto de actina, así como con Paxilina que marca las adhesiones focales. En la **Figura 11**, se observa que en ambas tinciones a los 30 minutos post-siembra los MEF RhoE *gt/gt* presentan un fenotipo celular más extendido y por lo tanto más adherido al sustrato comparados con los MEF RhoE +/+ y RhoE +/-, los cuales presentan una morfología menos aplanada, confirmando por lo tanto nuestro anterior resultado.

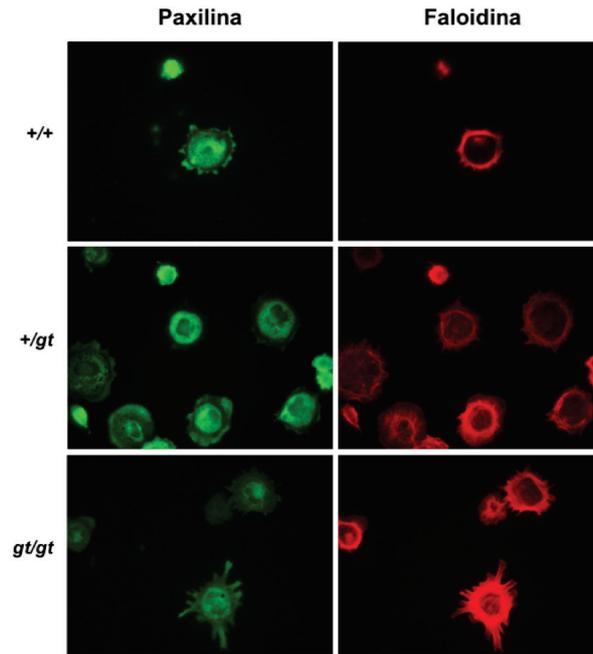


Figura 11. Los MEF RhoE *gt/gt* presentan una adhesión más rápida. MEF de los diferentes genotipos se sembraron sobre cubreobjetos con fibronectina y se procedió a su fijación a los 30 min. La tinción con Faloidina (rojo) marca el citoesqueleto de actina y la tinción con Paxilina (verde) las adhesiones focales.

Para comprobar si el número de adhesiones focales en los MEF RhoE *gt/gt* estaba aumentado, se sembraron células de los diferentes genotipos en asincronía sobre cubreobjetos cubiertos con Fibronectina durante 24 hrs. y se realizó una tinción con Paxilina. En la **Figura 12** se muestran imágenes representativas obtenidas por microscopía de fluorescencia de MEF de los diferentes genotipos tras la tinción con Paxilina. Se puede observar que los MEF RhoE *gt/gt* presentan un mayor número de adhesiones focales con respecto a los MEF RhoE *+/+*, presentando los MEF RhoE *+/-* un patrón intermedio.

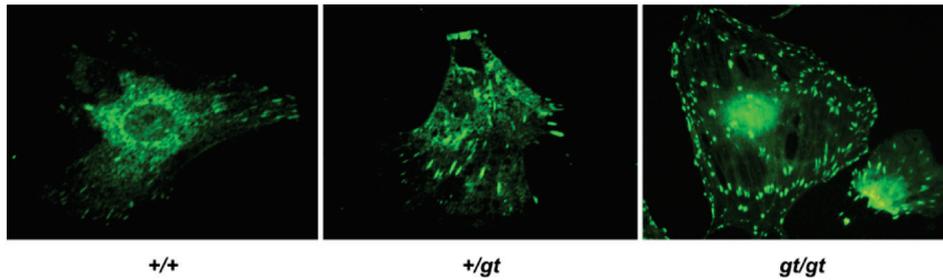


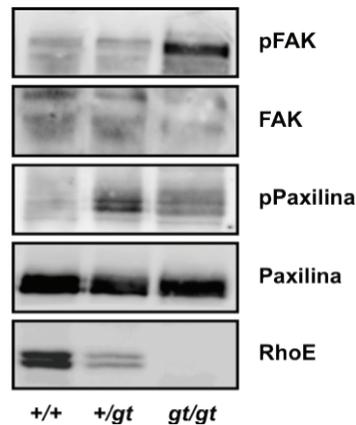
Figura 12. La ausencia de RhoE provoca un aumento de las adhesiones focales. MEF de los diferentes genotipos se sembraron sobre cubreobjetos cubiertos con Fibronectina durante 24 hrs. y se procedió a su fijación. Se utilizó la tinción con Paxilina-FITC (verde) para visualizar las adhesiones focales.

A continuación decidimos analizar los mecanismos moleculares implicados en los cambios del citoesqueleto observados en los fibroblastos deficientes en RhoE.

En primer lugar, quisimos analizar los cambios en algunos de los mediadores moleculares implicados en la adhesión celular, como FAK y Paxilina. Para ello, se cultivaron MEF de los diferentes genotipos, se recogieron las células, se lisaron, y se analizaron mediante Western-blot los niveles de fosforilación de Paxilina (pPaxilina) y de FAK (pFAK).

Los resultados obtenidos (**Figura 13**) muestran una tendencia a un aumento en la fosforilación de FAK y Paxilina en los MEF RhoE *gt/gt* comparado con los MEF RhoE *+/+*, presentado los MEF RhoE *+/gt* un fenotipo intermedio en ambos casos. No obstante los niveles tanto de pFAK como pPaxilina en los MEF RhoE *gt/gt* fueron muy variables, no existiendo diferencias significativas respecto a los MEF RhoE *+/+*.

A.



B.

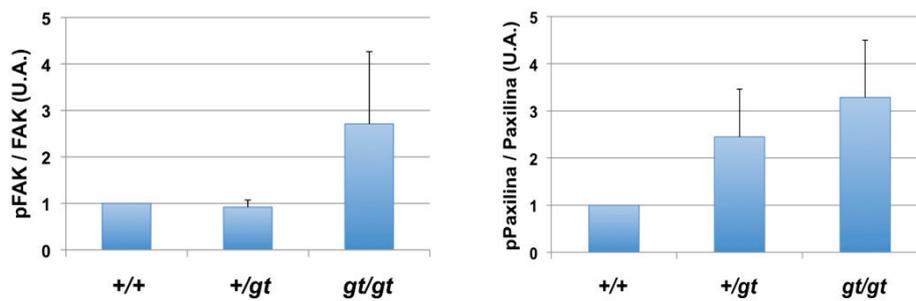


Figura 13. La ausencia de RhoE promueve un aumento de pFAK y pPaxilina. A. Análisis de la fosforilación de FAK y Paxilina mediante Western-blot en los diferentes genotipos de MEF. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes. B. Cuantificación de los niveles de pFAK y pPaxilina expresada como la relación entre la forma fosforilada y la proteína total de tres experimentos independientes (U.A.: unidades arbitrarias). Los resultados se expresan como la media + EEM.

En resumen, la ausencia de RhoE en fibroblastos embrionarios de ratón produce cambios en el citoesqueleto de actina. En primer lugar, observamos un mayor número de fibras de estrés de actina así como un aumento en la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC). Por otro lado, la ausencia de RhoE no altera la migración celular pero sí la adhesión de estas células al sustrato, lo que se relaciona con una mayor formación de adhesiones focales y un aumento en la fosforilación de FAK y Paxilina.

2. La ausencia de RhoE provoca un aumento del fenotipo de fibras de estrés de actina a través de la ruta Cdc42/PAK-1/MLC

Tras observar que los fibroblastos deficientes en RhoE presentan una mayor cantidad de fibras de estrés y un aumento en la fosforilación de MLC, quisimos comprobar si dicho cambio estaba provocado por un aumento en la actividad de la kinasa ROCK-I.

Para ello se utilizaron muestras provenientes de lisados de MEF RhoE *+/+* y MEF RhoE *gt/gt* cultivadas hasta alcanzar un confluencia de un 60-70% y se determinó la actividad de ROCK-I (ver Material y Métodos).

Como podemos observar en la **Figura 14**, la ausencia de RhoE no provoca cambios significativos en la actividad de ROCK-I.

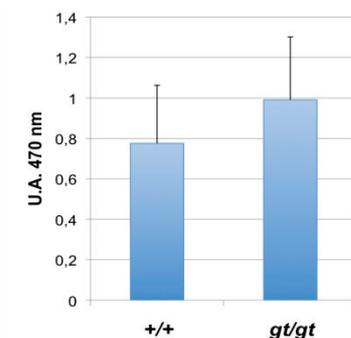


Figura 14. La ausencia de RhoE no provoca cambios en la actividad kinasa de ROCK-I. Extractos de MEF de los diferentes genotipos se incubaron con un sustrato correspondiente al extremo C-terminal de la subunidad de unión a la miosina de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) y se detectó el grado de fosforilación mediante anticuerpos específicos, tal y como se describe en Material y Métodos. Los valores de actividad de ROCK-I corresponden a la media + EEM de cuatro experimentos independientes (U.A.: unidades relativas de absorbancia).

Al no observar cambios en la actividad de ROCK-I en los MEF RhoE *gt/gt*, quisimos estudiar la actividad de otras moléculas implicadas en la fosforilación de MLC, que pudieran dar una explicación al fenotipo de las fibras de estrés observado.

En primer lugar analizamos la activación de RhoA mediante un ensayo de GTP-Pull down, que permite determinar la cantidad de RhoA unido a GTP, y por tanto, en su forma activada.

En la **Figura 15**, se muestran los niveles de RhoA activo (RhoA-GTP) respecto a los niveles totales de proteína (RhoA total). El análisis de la relación RhoA-

GTP/RhoA total muestra que la actividad de RhoA en los MEF RhoE *+ /gt* no presentó diferencias significativas mientras que la actividad de RhoA sí aparece disminuida en los MEF RhoE *gt/gt* comparada con los MEF RhoE *+ /+*.

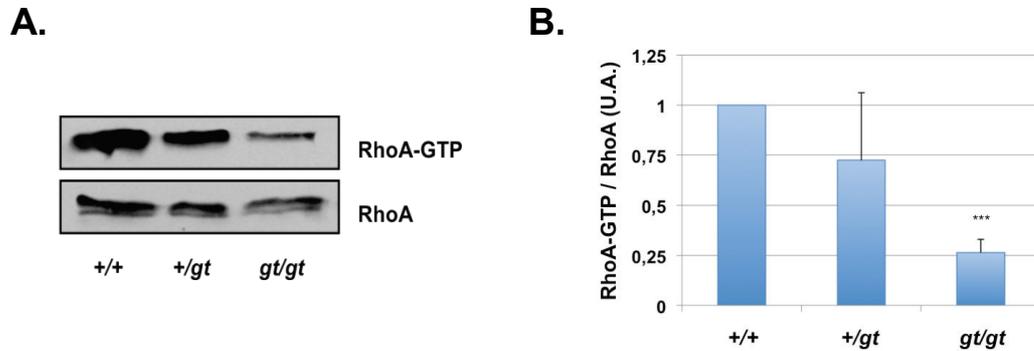


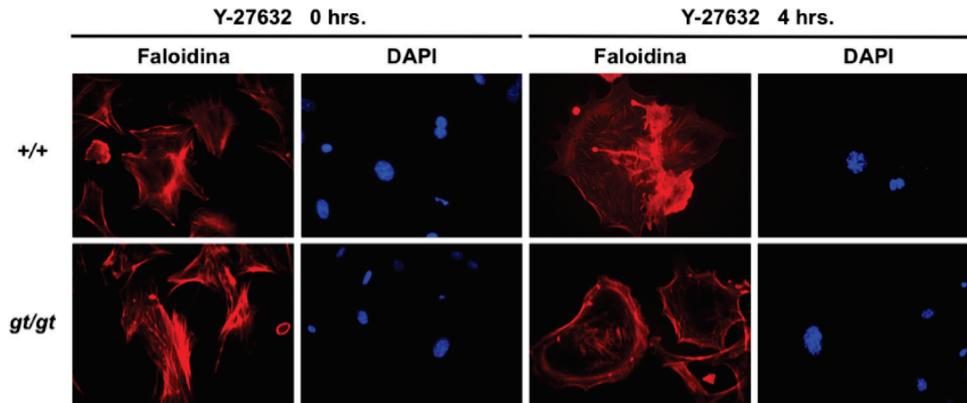
Figura 15. Los niveles de RhoA activo están disminuidos en los MEF RhoE *gt/gt*. Estudio de la actividad de RhoA mediante la técnica de GTP-Pull down. **A.** Extractos de MEF de los diferentes genotipos se incubaron con la proteína de fusión GST-RBD, tal y como se describe en Material y Métodos y se analizó la expresión de RhoA total y la proteína RhoA-GTP (activa) unida a RBD mediante Western-blot. Se muestra una imagen representativa de cuatro experimentos independientes. **B.** La activación de RhoA (media + EEM) se expresó mediante la relación RhoA-GTP/RhoA con respecto al control (MEF RhoE *+ /+*) de cuatro experimentos independientes (U.A.: unidades arbitrarias). El análisis estadístico se realizó mediante un Test *t* de Student (***) $p < 0.0001$ vs RhoE *+ /+*).

Los resultados anteriores muestran una menor actividad de la proteína RhoA en los MEF RhoE *gt/gt*, pero sin embargo no detectamos una disminución en la actividad de su efector directo ROCK-I. Por este motivo decidimos analizar si ROCK-I era funcional. Para ello, se sembraron MEF RhoE *+ /+* y RhoE *gt/gt* y posteriormente se trataron con el inhibidor de ROCK-I Y-27632; a continuación, las células se tiñeron con Faloidina. Seguidamente, se realizó el análisis de las fibras de estrés de los MEF clasificando las células por el estado del citoesqueleto.

En la **Figura 16** se muestran fotografías representativas de MEF de los diferentes genotipos tras la doble tinción con Faloidina y DAPI. Se puede observar que el tratamiento con Y-27632 produce la desaparición de las fibras de estrés y una disposición cortical de actina, tanto en los MEF RhoE *+ /+* como en los MEF RhoE *gt/gt*.

Estos resultados demuestran que en los fibroblastos deficientes en RhoE, ROCK-I es funcional pese a existir unos menores niveles de activación de la proteína RhoA y pese a que los niveles de actividad de ROCK-I no se ven alterados.

A.



B.

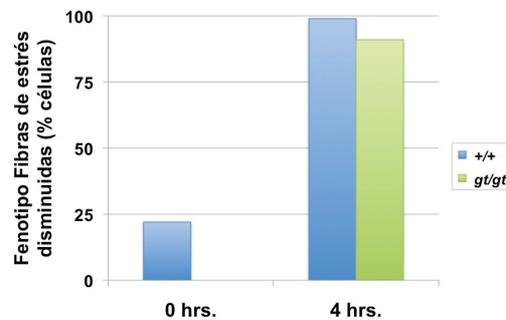


Figura 16. La inhibición de ROCK-I produce una disminución de las fibras de estrés de actina tanto en los MEF RhoE *+/+* como en los RhoE *gt/gt*. **A.** Las células fueron tratadas con el inhibidor de ROCK-I Y-27632 (10 μ M) durante 4 hrs. Se utilizó la tinción con Faloidina (rojo) para visualizar el citoesqueleto de actina, y la tinción con DAPI (azul) para teñir el núcleo de las células. Se muestran imágenes representativas de cada genotipo. **B.** Cuantificación del fenotipo de fibras de estrés de actina disminuidas.

Al descartar que la fosforilación de MLC se produjera a través de la ruta RhoA/ROCK-I, quisimos estudiar la actividad de otros posibles efectores que pudieran fosforilar la MLC explicando así el aumento en el fenotipo de las fibras de estrés observado en los MEF RhoE *gt/gt*. Para ello, analizamos la actividad de Cdc42 y Rac1 mediante un ensayo de GTP-Pull down (ver Material y Métodos).

En la **Figura 17**, se muestran los niveles de Cdc42 y Rac1 activo (Cdc42-GTP y Rac1-GTP) comparado con los niveles totales de proteína. El análisis de los resultados muestra que la actividad de Cdc42 en el caso de los MEF RhoE *+/gt*, presenta un ligero aumento, mientras que aparece aumentada de manera

significativa (27%) en los MEF RhoE *gt/gt* comparados con los MEF RhoE *+/+*. En cuanto a los ensayos realizados con Rac1, observamos una disminución de la actividad en los MEF RhoE *+/gt* (40%) y RhoE *gt/gt* (30%) comparado con los fibroblastos silvestres.

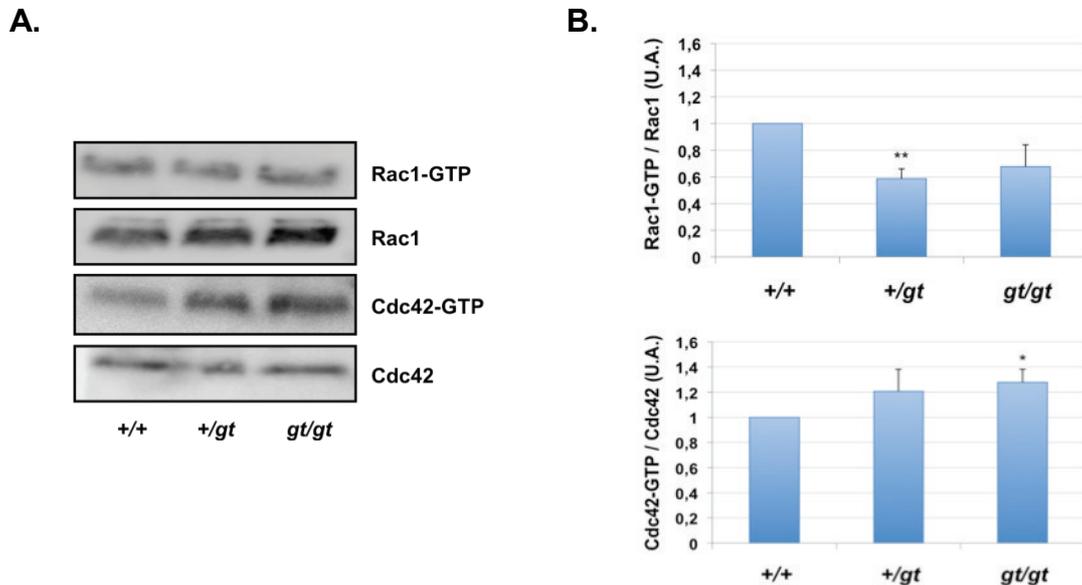


Figura 17. La actividad de Cdc42, pero no de Rac1 se encuentra aumentada en los MEF deficientes en RhoE. **A.** Extractos de MEF de los diferentes genotipos se incubaron con la proteína de fusión PAK, tal y como se describe en Material y Métodos. Detectamos la expresión de Cdc42 y Rac1 total y la proteína Cdc42-GTP y Rac1-GTP mediante Western-blot. Se muestra una imagen representativa de cuatro experimentos independientes. **B.** La activación de las diferentes proteínas Rho (media + EEM) se expresó mediante la relación Cdc42-GTP/Cdc42 y Rac1-GTP/Rac1, respecto al control (RhoE *+/+*) (U.A.: unidades arbitrarias). El análisis estadístico se realizó mediante un Test *t* de Student (**p*<0.05 y ***p*<0.01 vs RhoE *+/+*).

Al observar que la actividad de Cdc42 estaba aumentada en los MEF RhoE *gt/gt* nos dispusimos a comprobar si también existían variaciones en la expresión de su efector directo, PAK-1.

Para ello, se cultivaron MEF de los diferentes genotipos hasta llegar a una confluencia máxima del 60-70%. A continuación se recogieron las células, se lisaron, y se analizaron los niveles de fosforilación (activación) de PAK-1, mediante Western-blot.

En la **Figura 18**, observamos que los MEF RhoE *gt/gt* presentan unos niveles superiores de pPAK-1 comparado con los MEF RhoE *+/+* y RhoE *+/gt*.

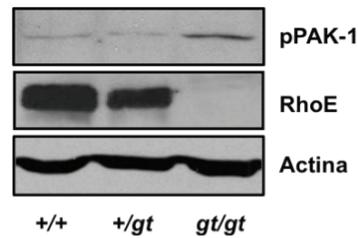


Figura 18. Los niveles de fosforilación de PAK-1 están aumentados en los MEF RhoE *gt/gt*. Análisis de la fosforilación de PAK-1 mediante Western-blot en los diferentes genotipos de MEF. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.

En resumen, los resultados obtenidos muestran que la ausencia de RhoE produce una disminución de la activación de RhoA, pero sin afectar a la actividad kinasa de ROCK-I. Por otro lado, el aumento de la fosforilación de la cadena ligera de miosina y su efecto sobre el citoesqueleto de actina de los MEF RhoE *gt/gt* pueden ser debidos a la activación de la ruta Cdc42/PAK-1/MLC.

3. RhoE no está implicada en respuesta a genotóxicos

Otra de las funciones en las cuales se ha implicado a RhoE es en la respuesta a genotóxicos, habiéndose propuesto que RhoE podría ser un agente pro-supervivencia, por lo que nos propusimos analizar la respuesta de los MEF a estos agentes. Para ello utilizamos varios agentes químicos capaces de producir daño en el ADN. Así, utilizamos agentes inhibidores de las topoisomerasas I (Camptotecina) y II (Adriamicina y Etopósido), agentes oxidantes como el H₂O₂ y finalmente Cisplatino, capaz de intercalarse en la molécula de ADN.

Se sembraron las células de los diferentes genotipos en placas de 96 pocillos, tal y como se describe en Material y Métodos y se sometieron a los diferentes tratamientos durante 24 hrs., analizando por tinción con cristal violeta el efecto en la supervivencia celular. En la **Figura 19** observamos que, en ninguno de los tratamientos utilizados, la deficiencia en RhoE altera significativamente la muerte celular, comparado con las células silvestres o RhoE *+/gt*. Además, en este modelo celular, el tratamiento con H₂O₂ produce una mayor muerte en todos los genotipos, mientras que la Camptotecina no parece tener un efecto biológico nocivo sobre ninguno de los genotipos estudiados en estas condiciones.

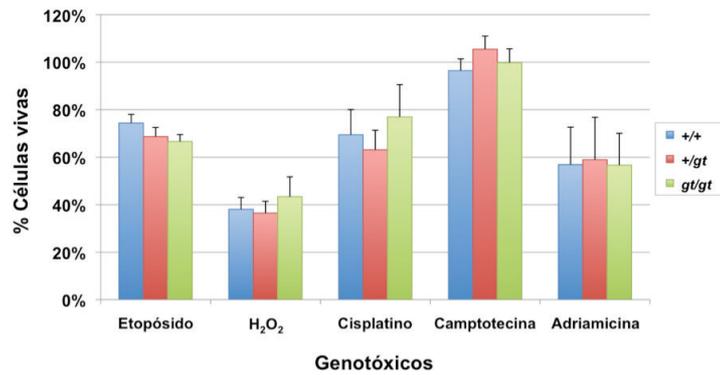


Figura 19. La ausencia de RhoE no aumenta la muerte celular inducida por genotóxicos químicos. Ensayo de supervivencia de MEF de los genotipos indicados tras 24 hrs. de tratamiento con una dosis de 100 μ M de Etopósido, 200 μ M de H₂O₂, 10 μ M de Cisplatino, 4 μ M de Camptotecina y 0,5 mg/ml de Adriamicina. La supervivencia se cuantificó por cristal violeta. Los resultados se representan como la media + EEM de cuatro experimentos independientes.

A continuación, analizamos la expresión de RhoE y p53 en respuesta a estrés genotóxico. Para ello, obtuvimos extractos de MEF sometidos a los tratamientos anteriormente mencionados y analizamos por Western-blot la expresión de las proteínas RhoE y p53. Nuestros resultados muestran que en todos los genotipos la inducción con los diferentes genotóxicos produce un aumento de los niveles de p53 (**Figura 20**). Sin embargo, y pese a no observar cambios en la supervivencia en células de los distintos genotipos tratadas con los diferentes genotóxicos, no detectamos aumentos en la expresión de RhoE ni en los fibroblastos RhoE +/+ ni en los fibroblastos RhoE +/-, disminuyendo incluso la expresión de RhoE en el caso de células tratadas con Etopósido o Camptotecina.

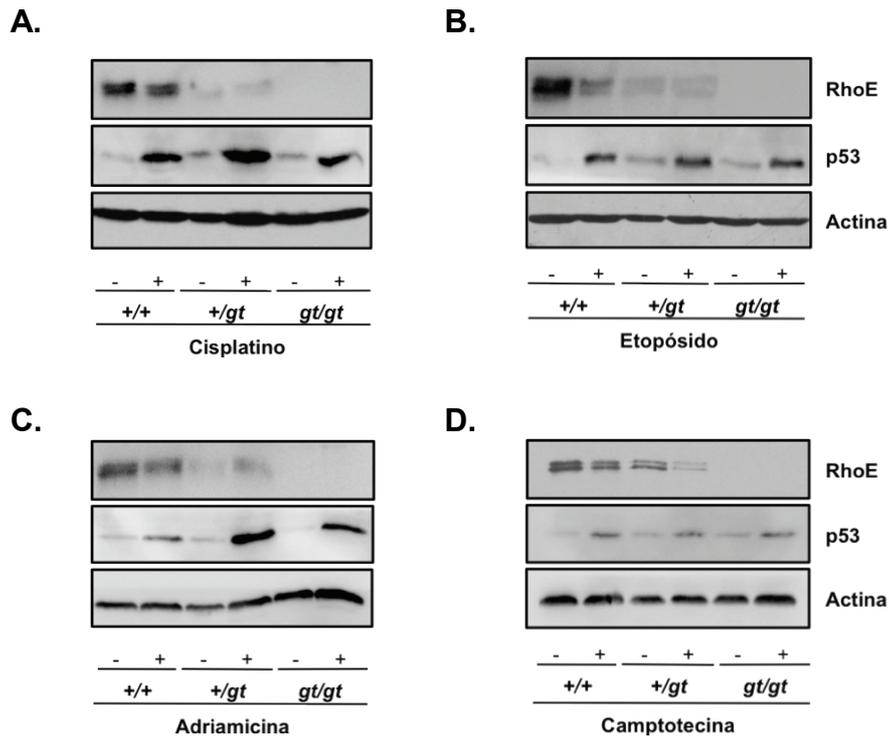


Figura 20. Efecto de la inducción de RhoE y p53 en MEF en respuesta a estrés genotóxico por químicos. Análisis por Western-blot de la inducción de RhoE y p53 en MEF de los genotipos indicados tras 24 hrs. de tratamiento con 10 μ M de Cisplatino (A), 100 μ M de Etoposido (B), 0.5 mg/ml de Adriamicina (C) y 4 μ M de Camptotecina (D).

Finalmente, quisimos analizar la respuesta de los MEF carentes de RhoE al daño en el ADN con radiación ultravioleta B (UV-B).

Para ello irradiamos MEF de los diferentes genotipos con luz UV-B y las mantuvimos en cultivo durante 4 hrs. Seguidamente medimos la pérdida de la integridad de la membrana como indicador de muerte celular mediante la tinción con PI y analizamos por citometría de flujo el número de células positivas para el marcaje con PI. Podemos observar que la ausencia de RhoE no modifica la sensibilidad a radiación por UV-B en fibroblastos, siendo el porcentaje de supervivencia similar al de fibroblastos que expresan RhoE (Figura 21).

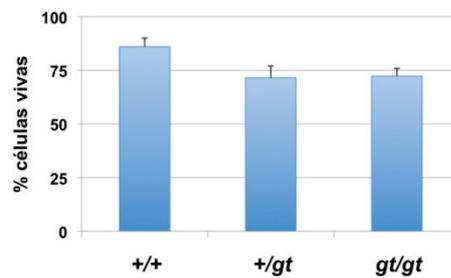


Figura 21. La supervivencia celular tras una exposición a UV-B no se ve afectada por la ausencia de RhoE. Ensayo de supervivencia de MEF de los tres genotipos (RhoE +/+, RhoE +/gt y RhoE gt/gt) transcurridas 4 hrs. tras una dosis de 20 J/m² de UV-B. Las células vivas se detectaron por exclusión de Yoduro de Propidio y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados se representan como la media + EEM de tres experimentos independientes.

Al igual que con el tratamiento con los diferentes agentes químicos, decidimos analizar si este modelo de estrés genotóxico afectaba a la expresión de p53 y RhoE. Para ello recogimos extractos celulares de MEF RhoE +/+ a diferentes tiempos post-radiación y analizamos por Western-blot la expresión de las proteínas RhoE y p53. Tal y como se observa en la **Figura 22**, la exposición a UV-B provoca un aumento de los niveles de p53 a los 90 min. Sin embargo, en ninguno de los tiempos analizados se observa una variación en los niveles de RhoE.

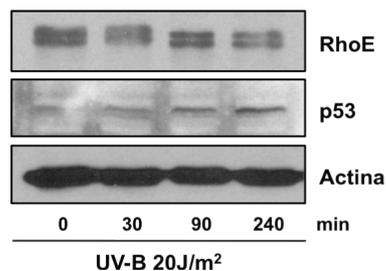


Figura 22. RhoE no se induce en respuesta a estrés genotóxico por UV-B. Análisis por Western-blot de los niveles de RhoE y p53 en MEFs RhoE +/+ transcurridos 0, 30, 90 y 240 min. tras una dosis de 20 J/m² de UV-B.

Todos estos resultados indican que en nuestras condiciones experimentales RhoE no está implicada en la supervivencia en respuesta a daño en el ADN.

4. La ausencia de RhoE no altera la proliferación celular

Nuestro siguiente objetivo fue analizar el efecto de la ausencia de RhoE sobre la proliferación y ciclo celular.

En primer lugar, quisimos analizar el crecimiento de MEF de los diferentes genotipos en cultivo. Para ello se sembraron células y se recogieron a diferentes tiempos para posteriormente cuantificar el número relativo de células, tal y como se describe en Material y Métodos. En la **Figura 23** observamos que la tasa de proliferación no varía entre los diferentes genotipos.

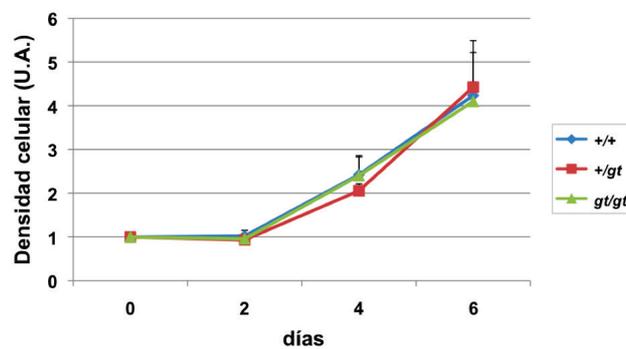
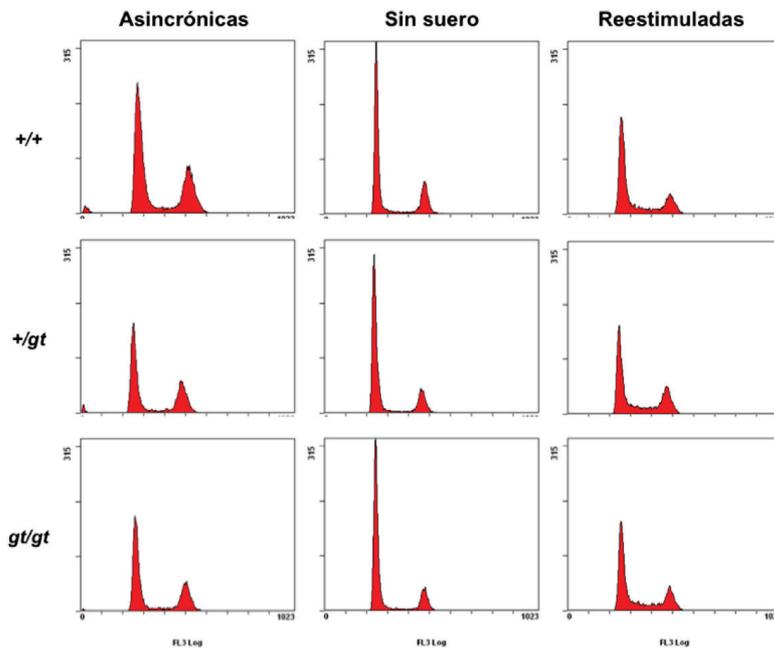


Figura 23. La ausencia de RhoE no afecta al crecimiento en cultivo de los fibroblastos. La tasa de proliferación de MEF RhoE +/+, RhoE +/- y RhoE gt/gt, se relativizó frente al día 0 (24 hrs post-siembra). Se muestra la media + EEM de cuatro experimentos independientes. (U.A.: unidades arbitrarias).

Al no observar diferencias en la tasa de proliferación decidimos analizar las fases del ciclo celular en los MEF de diferentes genotipos en distintas condiciones de crecimiento. Para ello cultivamos células en asincronía, sin suero (48 hrs.) o reestimuladas (48 hrs. sin suero seguida de una reestimulación de medio con suero de 16 hrs.) y las analizamos mediante citometría de flujo tras la tinción del ADN con PI, tal y como se describe en Material y Métodos.

En la **Figura 24** observamos que los perfiles de ADN de los MEF de los tres genotipos no presentan diferencias en ninguna de las distintas condiciones de crecimiento.

A.



B.

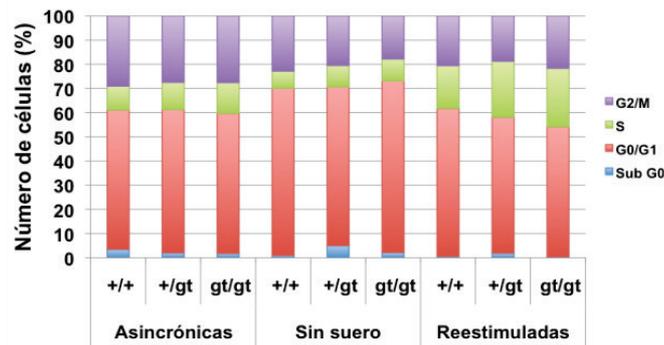


Figura 24. Análisis de la proliferación de las células MEF de diferentes genotipos por citometría de flujo. **A.** MEF de los diferentes genotipos (RhoE +/+, RhoE +/gt y RhoE gt/gt) fueron cultivadas en diferentes condiciones y la proliferación celular fue analizada por citometría de flujo tal y como se describe en Material y Métodos. Se muestra un ejemplo representativo de un total de cuatro experimentos independientes. **B.** Cuantificación del porcentaje de células en las fases Sub G0, G0/G1, S y G2/M del ciclo celular. Los resultados representan la media de cuatro experimentos independientes.

Finalmente, analizamos por Western-blot los niveles de ciclina D1 y pERK, ya que se ha descrito que la sobreexpresión de RhoE afecta a estas proteínas. Para ello cultivamos células en asincronía y analizamos los niveles de proteína tal y como se describe en Material y Métodos.

En la **Figura 25** observamos que la fosforilación de ERK y la expresión de ciclina D1 no varían entre genotipos. Estos resultados indican que la ausencia de la expresión de RhoE no afecta a la proliferación celular en condiciones normales ni a la reentrada en ciclo desde quiescencia.

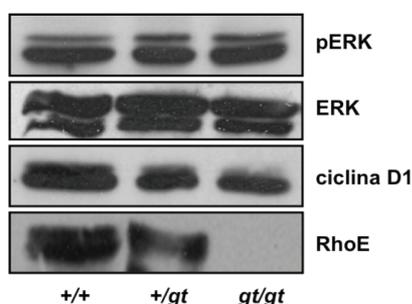


Figura 25. La ausencia de RhoE no altera los niveles de expresión de ciclina D1 ni de fosforilación de ERK. Análisis por Western-blot de los niveles de ciclina D1 y fosforilación de ERK (pERK) en MEF de los diferentes genotipos en asincronía. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.

5. Los fibroblastos embrionarios RhoE *gt/gt* presentan una menor inhibición por contacto

Al mantener en cultivo los fibroblastos de los tres genotipos, observamos que los MEF RhoE *gt/gt* llegaban a mayores densidades tras varios días de cultivo; por ello, nos propusimos entonces analizar el papel de RhoE en el crecimiento de MEF en cultivos a alta densidad.

Para ello, sembramos células de los diferentes genotipos y analizamos la densidad a los 15 días post-siembra, tal y como se describe en Material y Métodos. Nuestros resultados muestran que en ausencia de RhoE, las células son capaces de seguir creciendo tras alcanzar la confluencia presentando una densidad celular 4 veces mayor respecto a los MEF silvestres (**Figura 26**). Además observamos una acumulación de los niveles de RhoE en los MEF silvestres a lo largo del tiempo, en paralelo a un aumento en la expresión del inhibidor de ciclo celular p27. Este aumento de la expresión de p27 también se observa en células RhoE *gt/gt*, indicando que estas células son menos sensibles a la inhibición por contacto aun en presencia de niveles normales de p27. Finalmente, se analizaron los niveles de β -Galactosidasa para determinar si el aumento de la expresión de RhoE se debía a un aumento de la expresión génica o a mecanismos de regulación post-transcripcionales. Los resultados

demuestran que, ni en las MEF RhoE *+ /gt* ni en las RhoE *gt/gt* se produce un aumento de los niveles de β -Galactosidasa, lo que sugiere que la acumulación de RhoE en estas condiciones se produce por un mecanismo de regulación post-transcripcional.

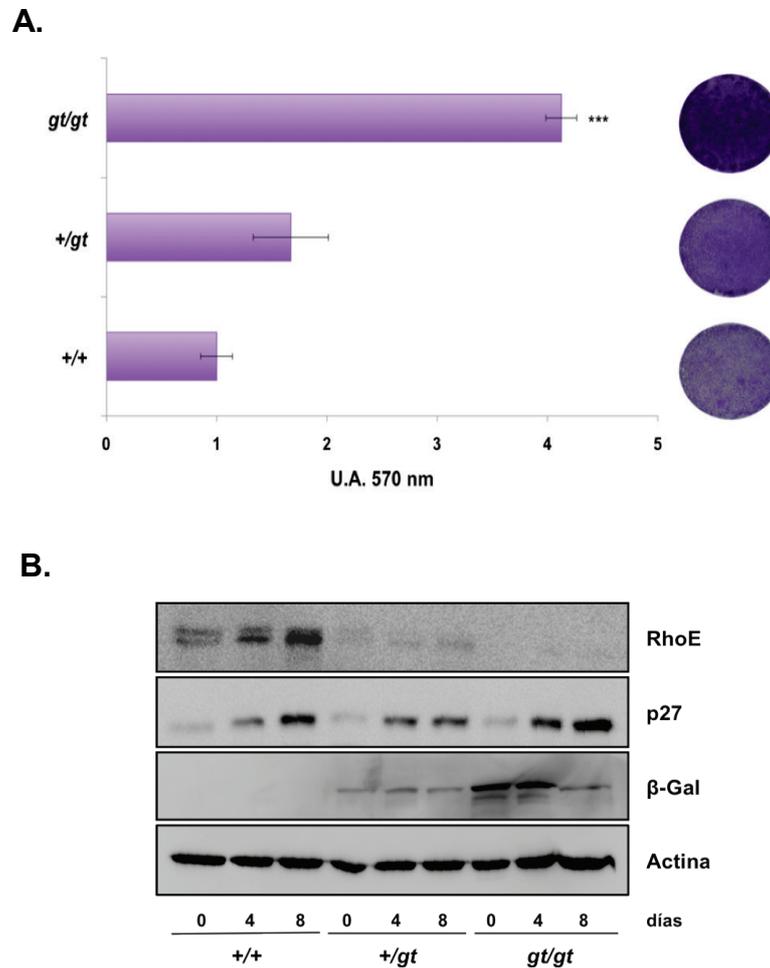
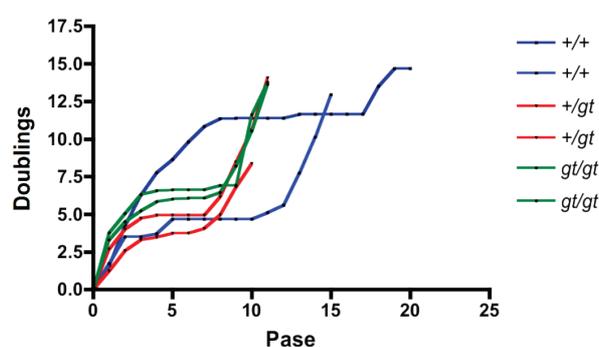


Figura 26. Los MEF RhoE *gt/gt* son menos sensibles a la inhibición por contacto. **A.** Estudio del crecimiento en alta densidad en los diferentes genotipos de MEF. Se muestra la densidad relativa de cada genotipo a día 15 post-siembra. Los resultados se representan como la media \pm EEM de tres experimentos independientes (U.A.: unidades relativas de absorbancia). El análisis estadístico se realizó mediante un Test *t* de Student (***) $p < 0.001$ vs RhoE *+ /+*). **B.** Análisis de la expresión de RhoE, p27 y β -Galactosidasa (β -Gal) mediante Western-blot en los diferentes genotipos de MEF a 0, 4 y 8 días postsiembra. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.

6. La ausencia de RhoE facilita la inmortalización y la transformación oncogénica

La menor inhibición por contacto de las células RhoE *gt/gt* podría estar relacionada con la evasión de senescencia replicativa. Para analizar si la deficiencia en RhoE altera la entrada en senescencia o la inmortalización de los MEF, analizamos su crecimiento realizando un protocolo de pases seriados 3T3. Como se muestra en la **Figura 27** observamos que las células de los diferentes genotipos entran en senescencia replicativa de manera similar (pase 5-6). Sin embargo, la salida de esta fase de senescencia se produce de manera más temprana en los MEF RhoE *+/gt* y RhoE *gt/gt* obteniendo líneas inmortalizadas a pases 9-10, mientras que en los fibroblastos silvestres la inmortalización se produce a partir de pase 16.



Genotipo	Pase	
	Senescencia	Inmortalización
RhoE <i>+/+</i>	6±1.34	16±1.54
RhoE <i>+/gt</i>	5.125±0.58	9.75±0.88*
RhoE <i>gt/gt</i>	5.625±2.73	10.28±0.83**

Figura 27. Senescencia replicativa e inmortalización de los MEF RhoE *gt/gt*. Cinco clones independientes de MEF RhoE *+/+* y ocho de MEF RhoE *+/gt* y RhoE *gt/gt* se sometieron a un protocolo de pases seriados 3T3. Las células se contaron en cada pase, y se analizó el número de duplicaciones tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados se representan como la media ± EEM. El análisis estadístico se realizó mediante un Test *t* de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs RhoE *+/+*).

Puesto que la ausencia de RhoE favorece la salida de senescencia y una temprana inmortalización, quisimos analizar si RhoE estaría también implicado en la transformación por oncogenes.

Para ello realizamos un ensayo de formación de colonias, infectando MEF RhoE *+/+* y RhoE *gt/gt* con retrovirus pLPC-Ras^{V12}. Tras tres semanas cuantificamos la aparición de colonias mediante la tinción con cristal violeta, tal y como se describe en Material y Métodos. Como se observa en la **Figura 28**, la ausencia de RhoE no favorece la transformación oncogénica mediada por Ras^{V12}, puesto que ni los MEF RhoE *+/+* ni los RhoE *gt/gt* infectados son capaces de formar colonias.

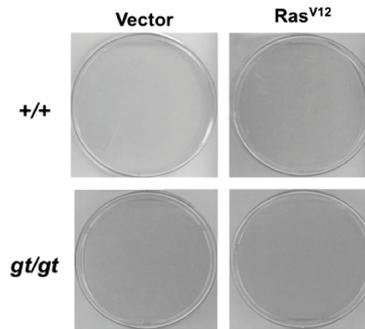


Figura 28. La ausencia de RhoE no facilita la transformación oncogénica por Ras^{V12}. MEF RhoE *+/+* y RhoE *gt/gt* infectados con pLPC o pLPC-Ras^{V12} se sembraron a baja densidad (2×10^3 células en placa de 10 cm), por triplicado, y se mantuvieron en cultivo durante tres semanas, procediendo a su tinción con cristal violeta. Se muestran placas representativas de tres experimentos independientes.

A continuación, volvimos a infectar MEF RhoE *+/+* y RhoE *gt/gt* con retrovirus que coexpresan E1A y Ras^{V12} (pLPC-E1A/Ras) y tras una semana cuantificamos el número de colonias mediante la tinción de las placas con cristal violeta, tal y como se describe en Material y Métodos. En este caso, la ausencia de RhoE sí predispone a la transformación oncogénica mediada por los oncogenes E1A y Ras^{V12}, observando que el número de colonias en los MEF RhoE *gt/gt* infectados con pLPC-E1A/Ras es tres veces superior al de los MEF silvestres infectados con la misma construcción (**Figura 29**).

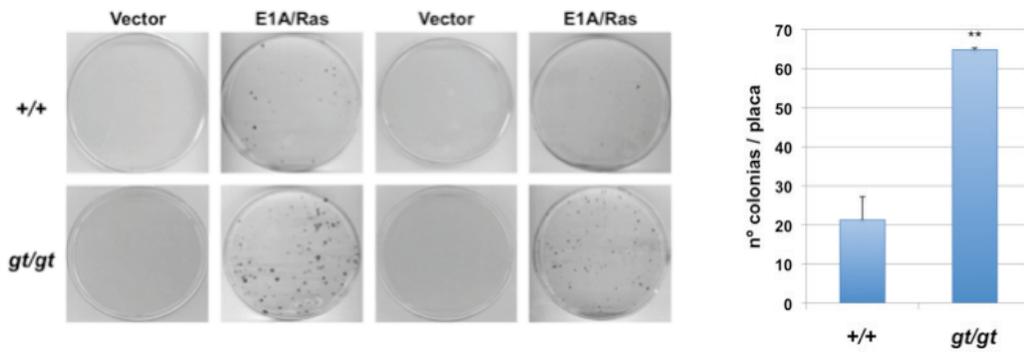


Figura 29. La ausencia de RhoE favorece la transformación oncogénica por E1A y Ras^{V12}. MEF RhoE +/+ y RhoE *gt/gt* infectados con vector vacío (pLPC) o pLPC-E1A/Ras se sembraron a baja densidad (2×10^3 células en placa de 10 cm), por triplicado, y se mantuvieron en cultivo durante una semana, procediendo a su tinción con cristal violeta. Se muestran placas representativas de dos experimentos independientes. Los resultados se representan como la media + EEM de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un Test *t* de Student (** $p < 0.01$ vs RhoE +/+).

Finalmente, quisimos analizar la capacidad tumorigénica *in vivo* de las células transformadas con pLPC-E1A/Ras en presencia y ausencia de RhoE. Con este objetivo, inyectamos subcutáneamente células RhoE +/+ y RhoE *gt/gt* infectadas previamente con pLPC-E1A/Ras en ratones inmunocomprometidos *nu/nu*, y observamos la aparición de tumores en estos ratones durante 40 días. La inyección tanto de MEF RhoE +/+ o RhoE *gt/gt* infectadas con pLPC-E1A/Ras produjo la aparición de tumores; sin embargo, las células RhoE *gt/gt* transformadas produjeron tumores mucho mayores, tal y como se observa en la **Figura 30**.

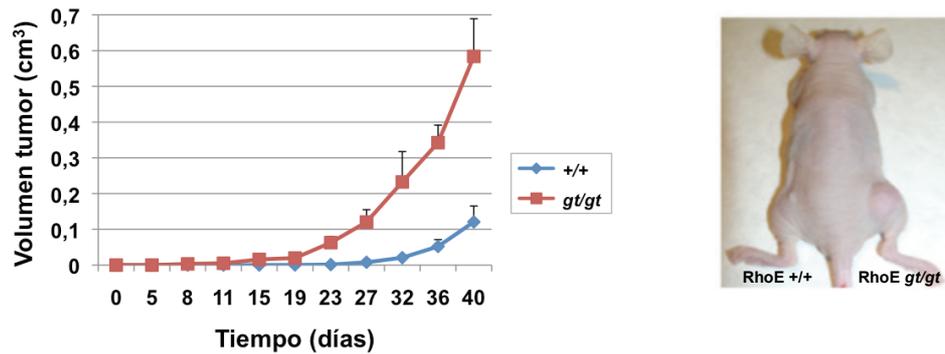


Figura 30. La capacidad tumorigénica de E1A y Ras^{V12} aumenta en ausencia de RhoE. MEF RhoE +/+ y RhoE *gt/gt* se infectaron con pLPC-E1A/Ras o vector vacío, y se inyectaron subcutáneamente en los flancos de ratones inmunocomprometidos *nu/nu* (1×10^5 células por inyección). Se analizó la aparición de lesiones visibles cada 3-5 días, durante un periodo de 40 días. Los resultados se representan como la media + EEM de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un Test ANOVA de doble vía ($***p < 0.0001$ vs +/+). Se muestra un animal representativo con tumores producidos por células RhoE +/+ (flanco izquierdo) y RhoE *gt/gt* (flanco derecho) infectadas con pLPC-E1A/Ras.

En resumen, estos estudios muestran que los fibroblastos deficientes en la expresión de RhoE presentan una menor inhibición por contacto, una inmortalización temprana y una mayor predisposición a la transformación por oncogenes cooperantes. Todo esto sugiere que RhoE pudiera tener una función como oncosupresor.

7. La ausencia de expresión de RhoE aumenta la inducción de tumores en piel mediante el protocolo de DMBA/TPA

Para analizar el posible papel oncosupresor de RhoE *in vivo*, utilizamos dos protocolos de carcinogénesis distintos, el de inducción de fibrosarcomas con 3-metilcolantreno y el de inducción de papilomas con DMBA/TPA. Utilizamos únicamente ratones RhoE +/+ y RhoE +/*gt*, pues los ratones RhoE *gt/gt* presentan una supervivencia máxima de 21 días.

El primer modelo de carcinogénesis utilizado en este trabajo fue la inducción de fibrosarcomas. Para ello, administramos a ratones RhoE +/+ y RhoE +/*gt* adultos (2-4 meses) una única inyección intramuscular de 3-metilcolantreno y analizamos la aparición de los tumores durante 40 semanas. Los resultados muestran que la inyección de 3-metilcolantreno induce la formación de fibrosarcomas de manera similar en ambos genotipos, detectándose la presencia de tumores en el 50% de los ratones RhoE +/+ a las 22 semanas y a las 23 semanas en los ratones RhoE +/*gt* (Figura 31).

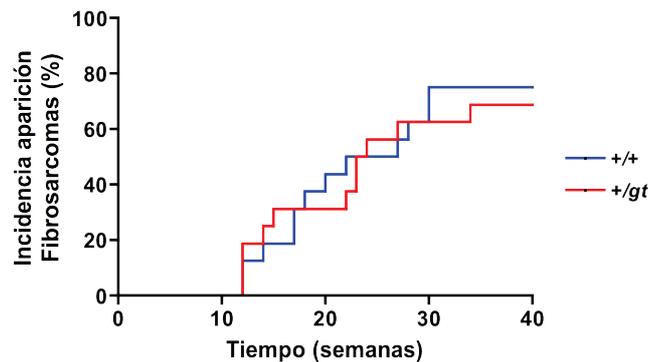


Figura 31. La deficiencia de RhoE no afecta a la inducción de fibrosarcomas. Análisis de la aparición de fibrosarcomas en ratones RhoE +/+ y RhoE +/- (16 ratones de cada genotipo) tras la administración intramuscular de 1 mg de 3-metilcolantreno diluido en 40 μ l de aceite de sésamo. Se representa el porcentaje de ratones con lesiones mayores de 5 mm.

El análisis histopatológico de las lesiones tampoco reveló diferencias entre los dos genotipos, observando que la mayoría de las lesiones se clasificaban como fibrosarcomas de alto grado (**Figura 32**).

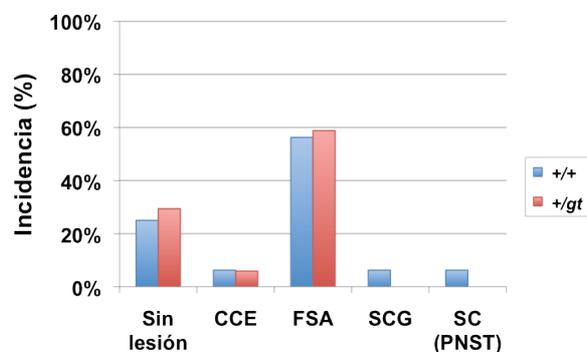


Figura 32. Análisis histológico de las lesiones aparecidas en los ratones tras la administración intramuscular de 3-metilcolantreno. CCE: Carcinoma de células escamosas, FSA: Fibrosarcoma, SCG: Sarcoma de células gigantes, SC (PNST): Sarcoma tipo *peripheral nerve sheath tumour*.

Finalmente, quisimos evaluar la capacidad tumorigénica de células derivadas de fibrosarcomas, inyectándolas subcutáneamente en ratones inmunocomprometidos *nu/nu* y analizando la aparición de tumores cada 3-4 días durante 27 días. Tanto las líneas celulares derivadas de fibrosarcomas RhoE +/+ como las derivadas de

fibrosarcomas RhoE *+gt* fueron capaces de generar tumores; además, el crecimiento de estos tumores fue similar en ambos casos, pero observando unas diferencias en la morfología, siendo los tumores obtenidos a partir de células RhoE *+/+* más esféricos y los de células RhoE *+gt* más desestructurados. Por este motivo decidimos analizar el peso y la histología de dichos tumores, no observando diferencias en el peso (Figura 33) ni en la histología, siendo todos los tumores fibrosarcomas de alto grado.

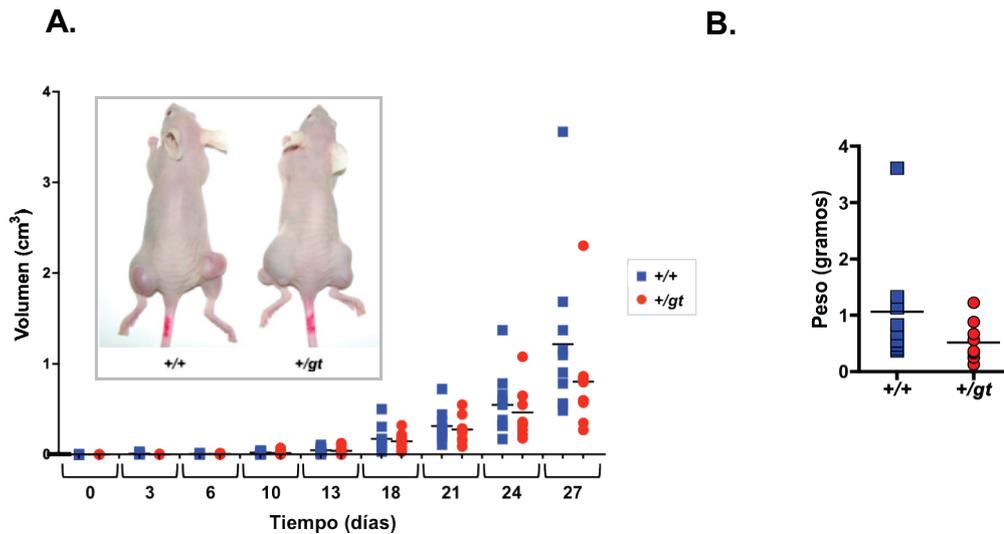


Figura 33. Estudio de la formación y crecimiento de tumores derivados de células de fibrosarcoma.

A. Crecimiento de los tumores (en cm³) derivados de células de fibrosarcoma de ratones RhoE *+/+* y RhoE *+gt* (dos clones independientes de cada genotipo). La fotografía muestra ejemplos de los tumores desarrollados en los ratones inmunocomprometidos *nu/nu*. **B.** Análisis de los pesos de los tumores derivados de fibrosarcomas de ratones de los genotipos indicados.

El segundo modelo utilizado fue la inducción de papilomas con DMBA/TPA que nos permite analizar fácilmente los diferentes estadios en la aparición de un tumor. Previo a realizar el modelo de carcinogénesis química en piel de ratón, y puesto que no hay datos en la bibliografía, decidimos estudiar la expresión de RhoE en piel. Para ello, diseccionamos muestras de ratones RhoE *+/+* y RhoE *gt/gt* a 21 días post nacimiento, y realizamos la inmunohistoquímica contra RhoE en el caso de la piel procedente de animales silvestres y frente a β -Galactosidasa en el caso de los ratones RhoE *gt/gt*. Además, para validar la localización de RhoE en la piel, realizamos la tinción con X-Gal en piel de ratones RhoE *gt/gt* a 15 días post nacimiento y en piel de ratones RhoE *+gt* adultos para analizar si existían variaciones en la expresión de RhoE con la edad.

Como se observa en la **Figura 34**, RhoE se localiza principalmente en el interior y alrededor de los folículos pilosos. Dicha localización coincide tanto utilizando anticuerpo anti-RhoE como anti β -Galactosidasa, lo que nos validó el marcaje con el anticuerpo anti-RhoE. La tinción con X-Gal realizada en ratones RhoE *gt/gt* jóvenes también se localiza de manera generalizada en los folículos pilosos y alrededor del pelo, mientras que la tinción disminuye en la piel de los animales adultos, encontrándose alrededor de los folículos pilosos aunque en muy poca cantidad, lo que indica que la expresión de RhoE en piel disminuye con la edad.

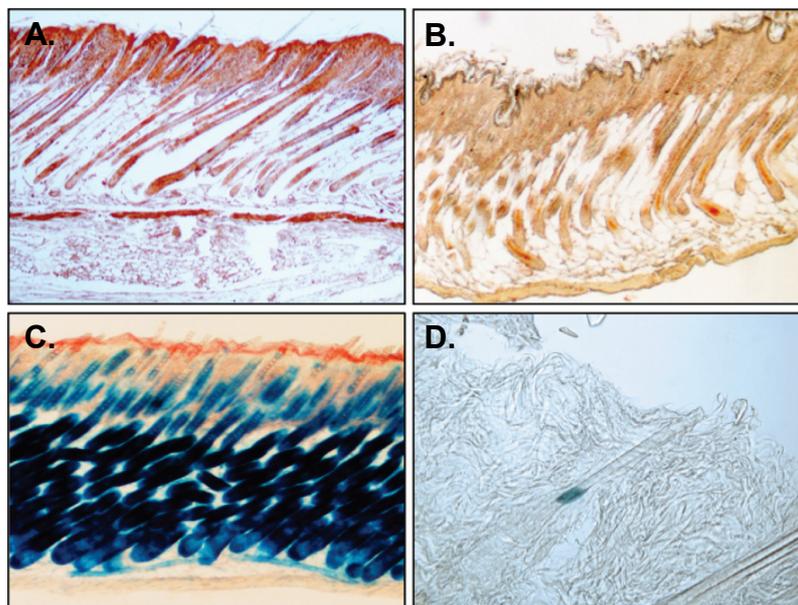


Figura 34. RhoE se localiza en los folículos pilosos y presenta una expresión decreciente con el tiempo. Se muestran imágenes de microscopía de campo claro de: **A.** Inmunohistoquímica contra RhoE en piel de ratones RhoE *+/+* de 21 días post-nacimiento. **B.** Inmunohistoquímica contra β -Galactosidasa en piel de ratones RhoE *gt/gt* de 21 días post-nacimiento. **C.** Tinción con X-Gal en piel de ratones RhoE *gt/gt* de 15 días post-nacimiento. **D.** Tinción con X-Gal en piel de ratones RhoE *+/-gt* de 2 meses de edad. Todas las imágenes se tomaron con el objetivo 10X, excepto la imagen D que se tomó con el objetivo 20X.

A continuación analizamos si existían diferencias en la estructura de la piel en los ratones adultos (2-4 meses) RhoE *+/+* y RhoE *+/-gt*, mediante el análisis de cortes histológicos teñidos con H/E, tal y como se describe en Material y Métodos.

En la **Figura 35** no se observan diferencias histológicas significativas en la piel de ratones silvestres comparada con la de ratones RhoE *+/-gt*.

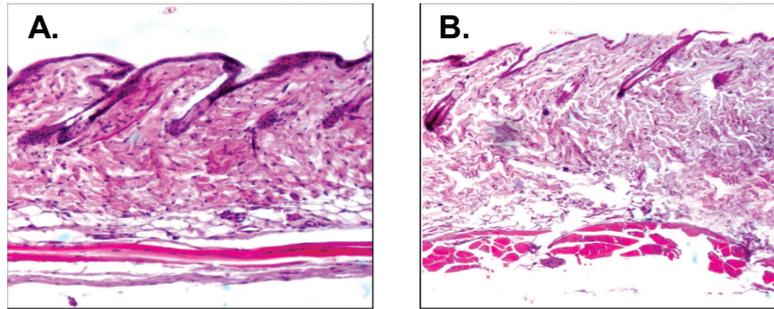
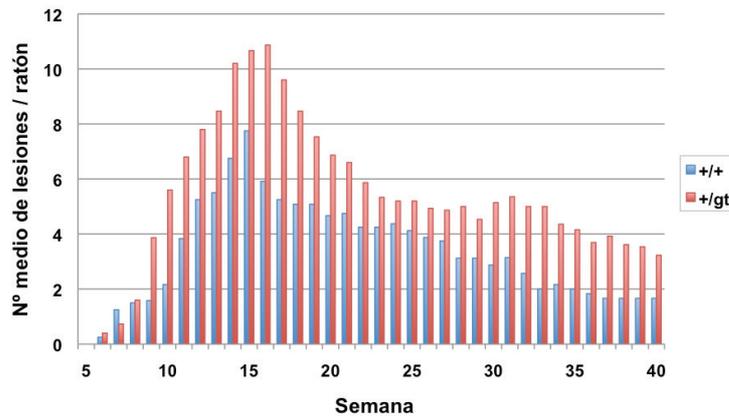


Figura 35. Estructura de la piel de ratones adultos RhoE +/+ y RhoE +/gt. Se muestran imágenes de microscopía de campo claro (objetivo 10X) de muestras teñidas con Hematoxilina/Eosina de piel de ratón de dos meses de edad de genotipo RhoE +/+ (A) y de genotipo RhoE +/gt (B).

El protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón se realizó con 15 ratones RhoE +/+ y 12 ratones RhoE +/gt adultos (2-4 meses de edad) y se encuentra esquematizado en Material y Métodos.

Para estudiar la aparición y el crecimiento de las lesiones premalignas, examinamos semanalmente el estado de los animales durante el tiempo que duró el tratamiento con TPA, realizando mediciones con un calibre del tamaño de las lesiones observadas. Como se muestra en la **Figura 36**, los ratones RhoE +/gt comenzaron a desarrollar papilomas al mismo tiempo que los ratones silvestres (semana 8 de tratamiento con TPA). No obstante, observamos que durante todo el experimento aparece un mayor número de papilomas por ratón en los ratones RhoE +/gt. Además, los papilomas crecieron más rápidamente en los ratones RhoE +/gt (**Figura 36**), donde el 50 % de los ratones presentan papilomas mayores de 2 mm a la semana 12 de tratamiento, mientras que en los ratones silvestres no se alcanza este porcentaje hasta la semana 17.

A.



B.

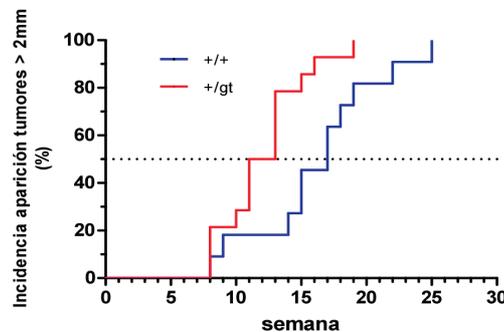


Figura 36. Los ratones RhoE *+/gt* presentan un mayor número y crecimiento de papilomas durante el protocolo de carcinogénesis química en piel con DMBA/TPA. A. Análisis del número de las lesiones aparecidas en animales RhoE *+/+* y RhoE *+/gt*, durante el protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón. Se representa el número medio de lesiones por ratón para cada genotipo agrupando tres experimentos independientes (RhoE *+/+*, n=12, RhoE *+/gt*, n=15). **B.** Incidencia de aparición de tumores mayores de 2 mm durante el protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón. El análisis estadístico (Mantel-Cox) reveló diferencias significativas entre los genotipos analizados ($p < 0.05$).

Una vez terminado el tratamiento con TPA analizamos la tasa de regresión de los papilomas, así como la evolución de las lesiones persistentes, realizando mediciones del tamaño de las lesiones con un calibre cada 2 semanas. Observamos que, tanto en los animales RhoE *+/+* como en los RhoE *+/gt*, las lesiones revirtieron a una velocidad similar al dejar de administrar TPA (**Figura 37**).

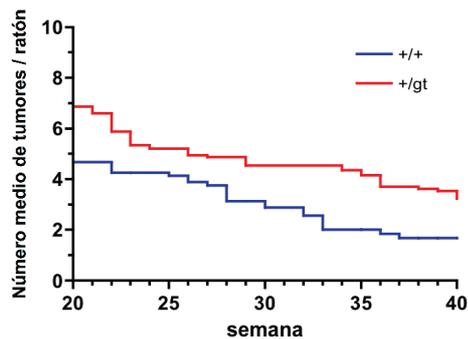


Figura 37. La regresión de las lesiones es similar en los ratones RhoE *+gt* y en los silvestres, durante el protocolo de carcinogénesis química en piel con DMBA/TPA. Análisis del número de las lesiones de animales RhoE *+/+* y RhoE *+gt*, durante la fase de regresión del protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón. Se representa el número medio de lesiones por ratón para cada genotipo agrupando tres experimentos independientes (RhoE *+/+*, n=6, RhoE *+gt*, n=13).

Con el fin de estudiar el grado de malignidad de cada lesión realizamos un análisis histopatológico de las muestras. Los datos de este análisis se recogen en la **Figura 38**. Como cabía esperar, la mayoría de las lesiones obtenidas tanto de los animales RhoE *+/+* como RhoE *+gt* fueron papilomas cutáneos. En cuanto a la progresión de dichos papilomas a otras lesiones malignas, observamos que los carcinomas obtenidos de estos ensayos, tanto de animales RhoE *+/+* como RhoE *+gt*, presentaban el mismo grado de diferenciación, siendo en todos los casos carcinomas de células escamosas bien diferenciados (**Figura 38**). Finalmente, quisimos analizar el porcentaje de papilomas que progresaron a carcinomas, mediante el cálculo de la tasa de conversión de papilomas a carcinomas obtenidos respecto al número máximo de papilomas para cada genotipo. Los resultados muestran que la progresión de estas lesiones a carcinomas fue superior en los ratones RhoE *+gt* (4.62 %) que en los animales RhoE *+/+* (2.15 %) (**Figura 38**).

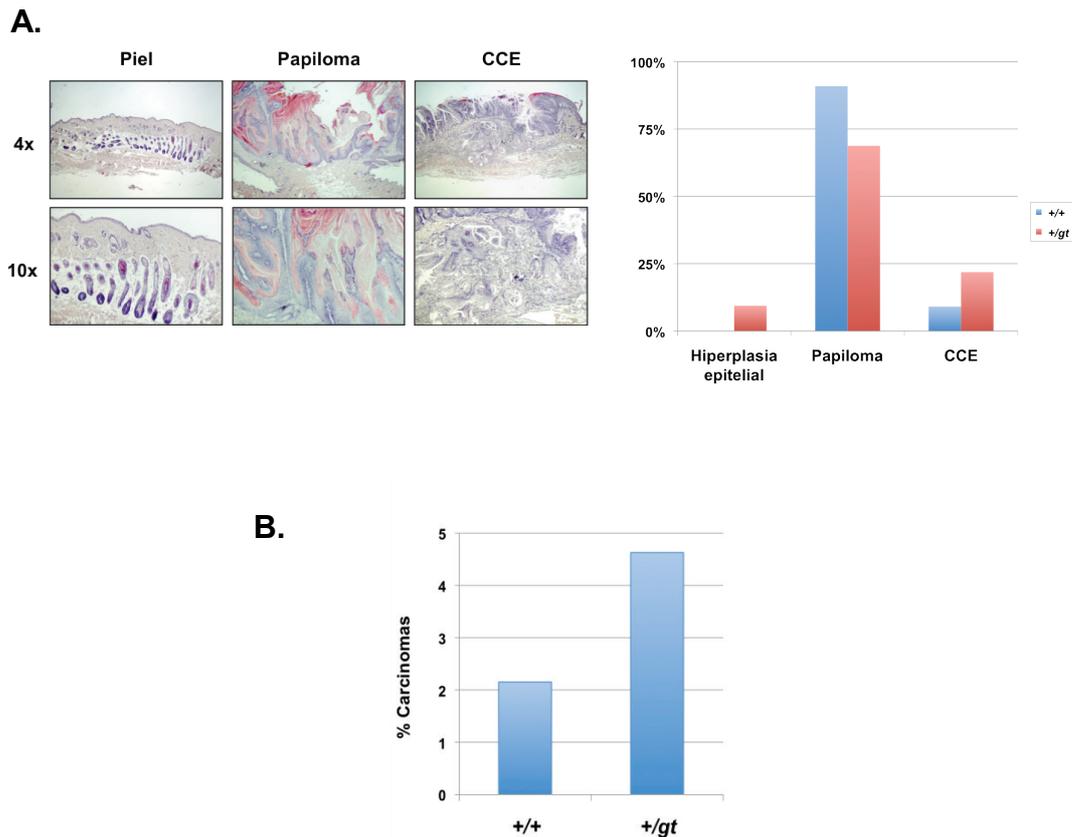


Figura 38. Los ratones *RhoE* *+gt* presentan una mayor tasa de conversión de papilomas a carcinomas durante el protocolo de carcinogénesis química en piel con DMBA/TPA. **A.** Se muestran imágenes de microscopía de campo claro de muestras teñidas con Hematoxilina/Eosina de piel, papiloma y carcinoma de células escamosas (CCE) (objetivos 4X y 10X). En el gráfico se representa la clasificación histológica de las lesiones, expresada en porcentaje. **B.** Tasa de conversión de papilomas a carcinomas obtenidos respecto al número máximo de papilomas para cada genotipo.

A continuación, analizamos la expresión de la proteína RhoE en extractos proteicos obtenidos a partir de muestras de piel, papiloma y carcinoma de animales *RhoE* *+/+* y *RhoE* *+gt*. Como se observa en la **Figura 39**, los niveles de RhoE en piel normal eran indetectables. Sin embargo, en todas las lesiones procedentes tanto de los animales *RhoE* *+/+* como en los *RhoE* *+gt* se observa un aumento, aunque variable, de la expresión de RhoE.

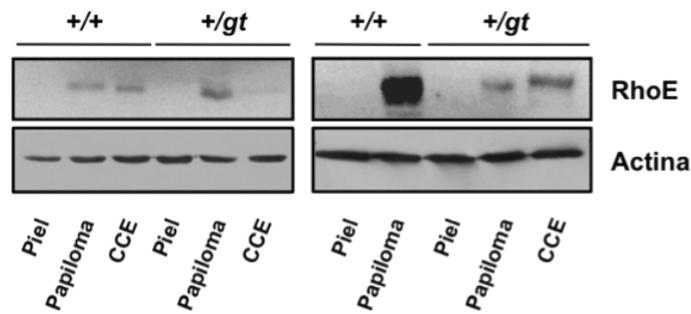


Figura 39. La expresión de RhoE aumenta en las lesiones tras el protocolo de carcinogénesis química en piel de ratón con DMBA/TPA. Análisis mediante Western-blot de la expresión de RhoE en extractos de piel normal, papiloma y carcinoma de células escamosas (CCE) de ratones RhoE +/+ y RhoE +/gt.

Puesto que la ausencia de RhoE provocaba un aumento del número de papilomas tras el tratamiento crónico con DMBA/TPA quisimos estudiar si también la ausencia de RhoE producía alteraciones en la respuesta proliferativa de las células epidérmicas tras un tratamiento agudo con TPA. Para ello, administramos tópicamente una única dosis de 12.5 μ g de TPA a ratones RhoE +/+, RhoE +/gt y RhoE gt/gt de 15 días de edad; 24 hrs. después del tratamiento los ratones fueron sacrificados, recogimos muestras y las analizamos mediante tinciones inmunohistoquímicas frente al marcador de proliferación PCNA.

Como observamos en la **Figura 40**, el tratamiento con TPA induce la proliferación de las células de la epidermis en todos los genotipos. Sin embargo, el número de células positivas para el marcador PCNA resultó ser mayor en las muestras de piel tratada de los ratones RhoE +/gt y RhoE gt/gt, comparado con muestras procedentes de ratones RhoE +/+.

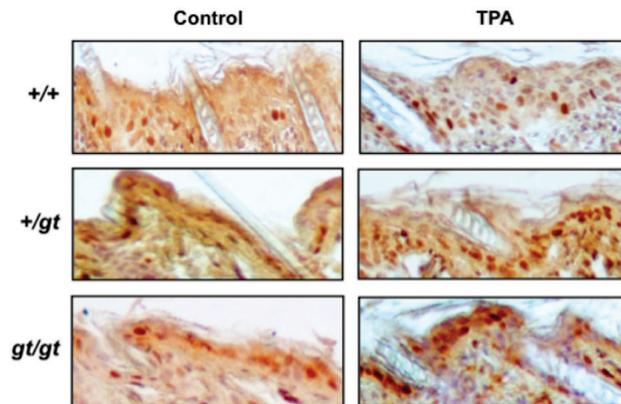
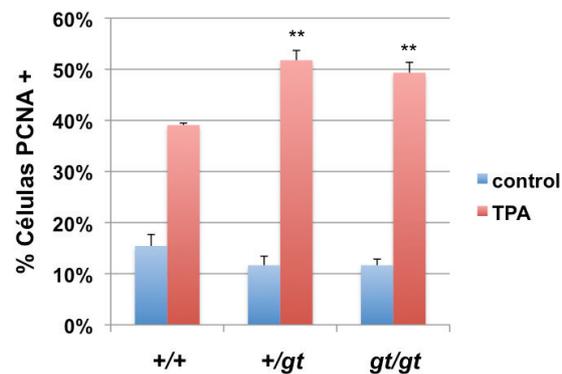
A.**B.**

Figura 40. La ausencia de RhoE produce una mayor proliferación de las células epidérmicas tras un tratamiento agudo con TPA. **A.** Tinción inmunohistoquímica para PCNA en cortes de piel de animales de los genotipos indicados no tratados (control) y tratados con una única dosis de 12.5 μ g de TPA. Fotografías de microscopía de campo claro representativas, tomadas con un objetivo 40X. **B.** Cuantificación de las células PCNA positivas, representada como la media + EEM de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un Test *t* de Student (***p* < 0.01 vs RhoE +/+ tratados con TPA).

Por último, quisimos analizar los posibles cambios en la expresión de la proteína RhoE en respuesta al tratamiento agudo con TPA. En la **Figura 41** podemos observar que la expresión de RhoE aumentó en respuesta a una única dosis de TPA en la piel de ratones RhoE +/+.

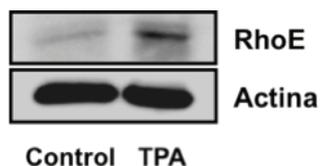


Figura 41. RhoE se induce en piel tras una única administración de TPA. Análisis de la expresión de RhoE mediante Western-blot en la piel de animales RhoE +/+ tratados con una única dosis de TPA. Se muestra imagen representativa de tres experimentos independientes.

En resumen, la ausencia de RhoE produce un mayor aumento de papilomas y de conversión a carcinomas durante el protocolo de carcinogénesis química. Además, una única administración de TPA induce la expresión de RhoE y su ausencia produce mayor proliferación de los queratinocitos, corroborando que RhoE regula la proliferación *in vivo*, al menos en piel.

8. La ausencia de expresión de RhoE favorece la metástasis

Por último, decidimos analizar el efecto de la ausencia de RhoE en la capacidad metastática mediante inyección en la vena de la cola de células basales de carcinoma de mama MDA-MB-231-TGL, que expresan luciferasa, lo que permite realizar análisis por bioluminiscencia no invasivos.

En primer lugar, silenciamos RhoE en estas células utilizando vectores lentivirales que expresan diferentes shRNA de RhoE. Tras la infección, analizamos los niveles de RhoE observando una disminución en la expresión de RhoE alrededor de un 50 %, siendo el clon shRhoE-TRCN-330303 el más efectivo, con un 68 % de disminución de la expresión de RhoE comparado con el vector vacío. Además observamos que el silenciamiento de RhoE en las células MDA-MB-231-TGL produce cambios en la morfología, siendo más fusiformes que las células control (**Figura 42**).

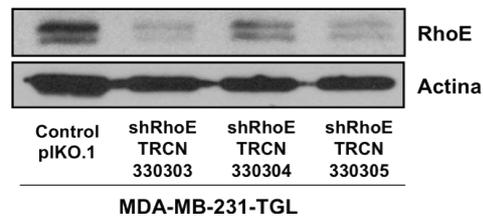
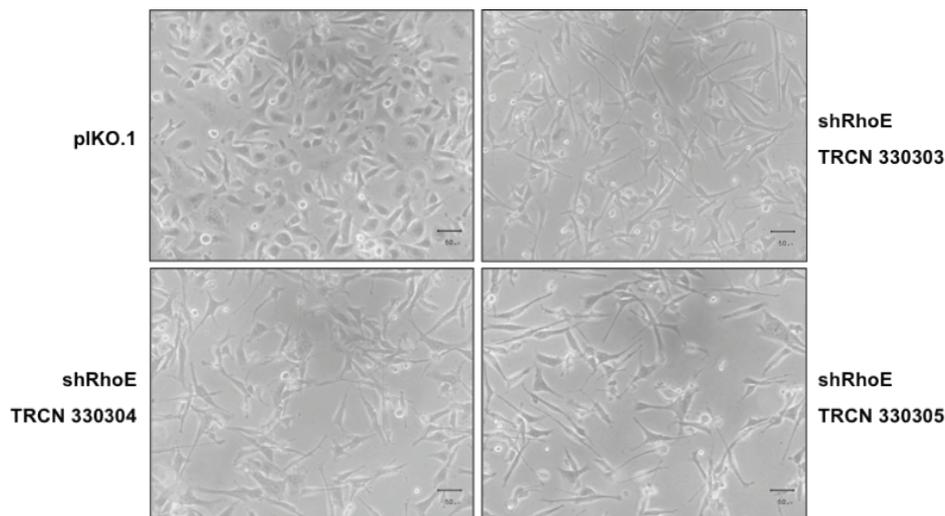
A.**B.**

Figura 42. Silenciamiento de RhoE en células MDA-MB-231-TGL. **A.** Análisis mediante Western-blot de los niveles de RhoE en células MDA-MB-231-TGL tras la infección con el vector control pIKO.1 y los diferentes silenciadores de RhoE: shRhoE TRCN 330303, shRhoE TRCN 330304 y shRhoE TRCN 330305. **B.** Se muestran imágenes de microscopía de contraste de fases de las células MDA-MB-231-TGL control (pIKO.1) e infectadas con los diferentes silenciadores de RhoE (shRhoE).

Tras comprobar la eficacia del silenciamiento, decidimos escoger las células silenciadas con el shRhoE TRCN 330303 para los ensayos de metástasis. Las células MDA-MB-231-TGL-shRhoE y células control infectadas con el vector pIKO.1 vacío (1×10^6) se pincharon en la vena de la cola de ratones inmunocomprometidos *nu/nu* y se observó el desarrollo de metástasis en pulmón a lo largo de nueve semanas mediante bioluminiscencia no invasiva (ver Material y Métodos). Como observamos en la **Figura 43** el silenciamiento de RhoE resulta en un gran incremento de la colonización en pulmón de las células MDA-MB-231-TGL. Los ratones inyectados tanto con células control como con células MDA-MB-231-TGL-shRhoE comienzan a presentar actividad luciferasa detectable en la región del pulmón a las tres semanas

de la inyección intravenosa. Sin embargo, a las 9 semanas los ratones inyectados con células que no expresan RhoE muestran un aumento de la señal bioluminiscente en pulmón, comparado con las células control.

La inspección pulmonar en la necropsia reveló macrometástasis en todos los pulmones derivados de ratones inyectados con las células MDA-MB-231-TGL-shRhoE, mientras que los inyectados con las células control no presentaban estas lesiones. Estos resultados muestran que el silenciamiento de RhoE en células MDA-MB-231-TGL favorece en gran manera la colonización tumoral pulmonar y/o el crecimiento eficiente de los focos pulmonares de metástasis.

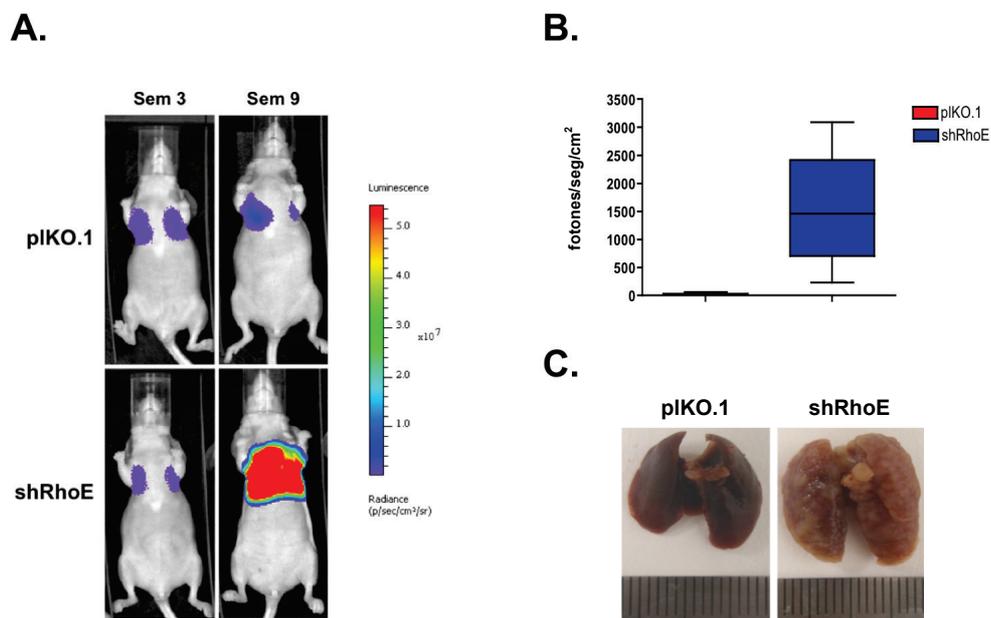


Figura 43. El silenciamiento de RhoE aumenta la capacidad metastática de células MDA-MB-231-TGL. **A.** Imágenes de bioluminiscencia representativas de ratones inyectados intravenosamente (i.v.) con 1×10^6 células control MDA-MB-231-TGL-pIKO.1 (arriba) o con células MDA-MB-231-TGL-shRhoE (clon TRCN 330303) (abajo) obtenidas tras 3 y 9 semanas de la inyección en la vena de la cola. La escala de color representa el flujo de fotones (fotones por segundo) emitido desde la región pulmonar del ratón. **B.** Histograma en el que se muestran los niveles de bioluminiscencia de los pulmones de ratones al final del ensayo (semana 9 post-inyección) relativizados respecto a la semana 3 post-inyección (primera señal bioluminiscente). **C.** Imágenes macroscópicas representativas de los pulmones de ratones inyectados i.v. con células control MDA-MB-231-TGL-pIKO.1 (izquierda) y células MDA-MB-231-TGL-shRhoE (derecha).

Todos estos resultados indican que la ausencia de RhoE produce una mayor capacidad metastática en células basales de carcinoma de mama, poniendo de relieve su importancia como gen supresor de metástasis.



Discusión

La proteína RhoE/Rnd3 forma parte del grupo de proteínas Rnd, dentro de la familia de proteínas Rho implicadas en la remodelación del citoesqueleto de actina, lo que, a su vez, influye sobre importantes procesos celulares, tales como la migración, la proliferación, supervivencia, tráfico intracelular, polaridad y ciclo celular (Vega y Ridley, 2008). Los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación demuestran que RhoE regula la proliferación celular en líneas tumorales, concretamente en células de glioblastoma humano. Este efecto tiene lugar en G1 y está mediado por la disminución de la expresión de ciclina D1, lo que tiene como resultado la incorrecta inactivación de Rb en el punto de restricción. Además, RhoE no sólo bloquea la proliferación celular sino que también induce apoptosis, lo que hemos demostrado en líneas de glioblastoma, melanoma y carcinoma de colon (Poch *et al.*, 2007). En este trabajo nos hemos planteado abordar directamente el estudio del posible papel de RhoE como supresor tumoral. Para ello, hemos utilizado un modelo de ratón modificado genéticamente en el que la expresión de RhoE está interrumpida por un cassette *gene trap*. Nuestros resultados, tanto *in vitro* como *in vivo*, demuestran que, efectivamente, la ausencia de expresión de RhoE favorece la transformación oncogénica, la aparición de tumores inducidos y la metástasis. Todo ello confirma que RhoE está relacionada con la supresión tumoral.

El papel de RhoE como posible supresor tumoral estaría apoyado por resultados de otros grupos que indican que *RhoE* está reprimido en cáncer de próstata (Bektic *et al.*, 2004; Bektic *et al.*, 2005), cáncer de mama y pulmón (Zhu *et al.*, 2008) y carcinoma hepatocelular (Grise *et al.*, 2012), aunque no se han descrito mutaciones de RhoE en tumores humanos. RhoB, otro miembro de la familia, puede actuar como un supresor tumoral ya que es activado en respuesta a varios estímulos estresantes incluyendo daño en el ADN o hipoxia (Canguilhem *et al.*, 2005), y se ha descrito que inhibe el crecimiento tumoral, la migración celular y la invasión y posee funciones propapoptóticas en diversas líneas celulares de carcinoma de páncreas, osteosarcoma, y carcinoma de cervix (Chen *et al.*, 2000; Huang y Prendergast, 2006). El ratón *knock-out* de RhoB posee un desarrollo normal pero presenta un aumento en la formación de tumores de piel inducido por carcinógenos, corroborando el papel de RhoB como supresor tumoral (Liu *et al.*, 2001).

En otros casos, como p27, los ratones deficientes en la expresión de un oncosupresor desarrollan tumores de manera espontánea y son más susceptibles a la carcinogénesis inducida (Nakayama *et al.*, 1996; Fero *et al.*, 1998; Philipp *et al.*, 1999; Philipp-Staheli *et al.*, 2002). En nuestro caso, el fenotipo de los ratones RhoE *gt/gt* es sorprendente y opuesto, ya que tienen un tamaño más pequeño y graves defectos en

el desarrollo, fundamentalmente en el sistema nervioso central. Además, no pudimos observar la aparición de tumores espontáneos por la muerte prematura de estos ratones, que no superan las tres semanas de vida y presentan déficits motores profundos, ausencia de nervio peroneo y alteraciones en diversos ensayos de neurocomportamiento (Mocholi *et al.*, 2011).

El fenotipo inesperado observado en los ratones RhoE *gt/gt* nos llevó a plantearnos el estudio de las funciones asignadas a RhoE hasta el momento, utilizando células derivadas de ratones RhoE *gt/gt* y que, por tanto, son deficientes en la expresión de esta proteína. Nuestros conocimientos sobre la función de RhoE provienen de los estudios *in vitro* realizados con mutantes dominantes negativos o constitutivamente activados en diversas líneas celulares o el silenciamiento de la proteína, en cualquier caso, cambios en la expresión de RhoE de forma puntual en un momento determinado. No obstante, estos métodos pueden tener deficiencias en cuanto a definir la función individual de las proteínas Rho, así como las vías de transducción de señales mediadas por estas proteínas. Con nuestro modelo, tenemos una herramienta de eliminación inicial y permanente de la expresión de RhoE. Así, decidimos analizar estas células en relación a las diversas funciones asignadas a RhoE, tales como la regulación del citoesqueleto de actina, la resistencia a genotóxicos y la regulación de la proliferación celular.

Los MEF RhoE *gt/gt* presentan un aumento de las fibras de estrés de actina y de las adhesiones focales, lo que tiene como resultado un aumento de la adhesión al sustrato. Esto confirma los resultados previos que indican que RhoE actúa induciendo la despolimerización de la actina, dando lugar al fenotipo redondeado de las células (Guasch *et al.*, 1998). A nivel molecular, se ha descrito que RhoE regula principalmente la vía RhoA/ROCK-I, inhibiendo por un lado la actividad kinasa de ROCK-I (Guasch *et al.*, 1998; Riento *et al.*, 2003) y activando por otro a p190RhoGAP (Wennerberg *et al.*, 2003), lo que en conjunto tiene como resultado la inhibición de la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC) mediada por ROCK-I. En nuestras células observamos que en ausencia de RhoE hay un aumento de la fosforilación de MLC y también de FAK y Paxilina, lo que tiene relación con el fenotipo que observamos de fibras de estrés y de adhesiones focales. Sin embargo, la actividad de ROCK-I no varía en estas células. Sorprendentemente, observamos una menor proporción de RhoA activa. Esto puede deberse a un equilibrio en la regulación de la actividad de ROCK-I en las células: en ausencia del inhibidor RhoE, una menor actividad de RhoA es suficiente para mantener niveles “fisiológicos” de actividad ROCK-I. De hecho, ROCK-I en estas células es totalmente funcional y puede inhibirse

farmacológicamente, observando el efecto esperado de desaparición de las fibras de estrés de actina de la misma forma que en MEF RhoE +/+.

En contraste con la actividad de ROCK-I, si que observamos un aumento de Cdc42 unido a GTP (activo) y un aumento de la fosforilación (activación) de PAK-1, kinasa que también fosforila a MLC en respuesta a la activación de Rac1 o Cdc42 (Sells *et al.*, 1999; Parrini *et al.*, 2002; Bokoch, 2003; Zhao y Manser, 2005) produciendo un fenotipo similar al que produce RhoA sobre la formación de fibras de estrés de actina. Así, los cambios que observamos en el citoesqueleto en ausencia de RhoE pueden deberse a esta vía alternativa. Se ha descrito recientemente que en células PC12, en ausencia del factor de crecimiento nervioso (NGF, *Nerve Growth Factor*) la sobreexpresión de RhoE produce un descenso en la activación de RhoA y Cdc42, sugiriendo que la inactivación de estas GTPasas debe estar implicada en el crecimiento de las neuritas inducido por RhoE (Talens-Visconti *et al.*, 2010). En nuestro modelo el aumento de los niveles de Cdc42, sin alterar la funcionalidad de ROCK-I, sugiere que la vía alternativa Cdc42/PAK-1/MLC es más sensible a la ausencia de RhoE, mientras que la vía clásica RhoA/ROCK-I/MLC lo es a un aumento de los niveles de RhoE. Estos resultados demuestran que RhoE está implicada en las dos vías principales de regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina.

En fibroblastos con alto número de fibras de estrés, el alto nivel de adhesión al sustrato a través de adhesiones focales asociadas a estas fibras inhibe la migración celular (Cox y Huttenlocher, 1998; Cox *et al.*, 2001). La migración celular es un proceso complejo que engloba cambios en el citoesqueleto, en las adhesiones célula-sustrato y en la matriz extracelular (Ridley, 2001). Sin embargo, en nuestro modelo de deficiencia de RhoE la migración no se ve afectada, contrariamente a lo descrito anteriormente, donde la sobreexpresión de RhoE induce un aumento de la migración (Guasch *et al.*, 1998; Klein y Aplin, 2009; Hidalgo-Carcedo *et al.*, 2011); aunque también se ha demostrado que la sobreexpresión de RhoE puede disminuir la migración celular (Gadea *et al.*, 2007; Pinner y Sahai, 2008). Esto indica que aunque la sobreexpresión de RhoE regula de una forma u otra la movilidad celular, su presencia no es necesaria para este proceso, al menos en nuestras condiciones experimentales. Esta aparente contradicción en el papel de RhoE sobre la migración celular podría deberse tanto al origen celular (células primarias o células transformadas), como al entorno extracelular que contiene señales moduladoras para la migración. El ambiente ideal para que se produzca la migración celular es la matriz extracelular (ECM), que permite un movimiento en una estructura tridimensional que es bioquímicamente complejo y posee alta flexibilidad dinámica. Los modelos de

cultivo celular en tres dimensiones (3D) imitan el entorno de la ECM permitiendo estudiar el proceso de migración similar al que ocurre *in vivo* y permiten por tanto esclarecer el papel de RhoE y otras proteínas Rho este proceso complejo (Sahai y Marshall, 2003; Gadea *et al.*, 2007; Vega *et al.*, 2011).

En segundo lugar, realizamos ensayos de supervivencia a genotóxicos en las células RhoE *gt/gt*, ya que se ha descrito que la expresión de RhoE es inducida por p53 en respuesta a daño en el ADN (Ongusaha *et al.*, 2006; Boswell *et al.*, 2007). Para evitar la propagación de alteraciones genéticas originadas por agentes genotóxicos, las células son capaces de inducir tanto mecanismos de reparación del ADN como de apoptosis y de senescencia celular. En estos procesos se encuentra implicado el factor de transcripción p53 (Reinhardt y Schumacher, 2012). En este modelo, se sugiere que RhoE podría tener un papel protector frente a estos agentes, por lo que nos propusimos analizar este tipo de respuesta celular en nuestras células. Sin embargo, en nuestros experimentos, no observamos que los tratamientos utilizados, tanto químicos (H₂O₂, Adriamicina, Camptotecina, Cisplatino y Etopósido) como físicos (UV-B), induzcan la expresión de RhoE en MEF ni tampoco observamos que la ausencia de RhoE suponga una mayor sensibilidad a estos agentes genotóxicos.

En cuanto a la regulación de la proliferación por RhoE, se ha demostrado que la sobreexpresión de RhoE detiene el ciclo celular en la fase G1 a través de la disminución de ciclina D1 (Villalonga *et al.*, 2004; Poch *et al.*, 2007). Sin embargo, esta proteína no es imprescindible para la correcta regulación del ciclo celular en nuestro modelo, ya que los MEF *gt/gt* presentan las mismas curvas de crecimiento y perfiles de ADN que los MEF silvestres, tanto en condiciones de asincronía como en quiescencia o reestimulación. Además, a nivel molecular, tampoco observamos diferencias en los niveles de fosforilación de ERK ni de ciclina D1.

Sin embargo, pese a que la ausencia de RhoE no afecta a la proliferación celular normal, los MEF RhoE *gt/gt* son capaces de crecer a mayores densidades que los silvestres. Esto indica que la correcta expresión de RhoE es necesaria para detener el crecimiento excesivo. Este mecanismo, la inhibición por contacto, está mediado por el aumento de expresión del inhibidor del ciclo celular p27 (Rivard *et al.*, 1996; Lwin *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2008). La inhibición de la proliferación por contacto mediada por p27 es iniciada por la activación de cadherinas e inducida por el establecimiento de contactos célula-célula (St Croix *et al.*, 1998; Levenberg *et al.*, 1999; Motti *et al.*, 2005; Theard *et al.*, 2008). La expresión de RhoE, tanto en MEF silvestres como en MEF RhoE *gt/gt*, aumenta cuando se induce la inhibición por contacto, en paralelo a la de p27, por lo que la ausencia de RhoE no afecta a la

expresión de p27. La acumulación de RhoE en estas condiciones no se debe a un aumento de la transcripción, lo que implica que es el resultado de un aumento de la estabilidad de la proteína. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que RhoE se degrada en el proteasoma tras su ubiquitilación por Skp2 (Lonjedo *et al.*, en revisión). Siendo RhoE una GTPasa que carece de actividad GTPasa, la regulación de esta proteína se debe a otros mecanismos y su degradación puede ser uno de los más importantes. En este contexto, hemos estudiado la expresión de RhoE a lo largo del ciclo celular, demostrando que se acumula a lo largo de G1 y se degrada de forma rápida en la transición G1/S. Este perfil de expresión también es idéntico al de p27.

Así pues, por un lado, RhoE se expresa en G1 y en células que están saliendo del ciclo celular y se degrada rápidamente en la transición G1/S, y por otro lado, la sobreexpresión de RhoE inhibe el ciclo celular en G1/S. Con estos resultados, podemos proponer que RhoE participa en los mecanismos de control del ciclo celular, inhibiendo la proliferación excesiva en determinadas circunstancias relacionadas bien con la función de p27 y la inhibición por contacto o bien con la de p53 en procesos de reparación del ADN. En cualquier caso, la degradación de RhoE parece un evento crucial en la progresión del ciclo celular y el inicio de la fase S.

En consonancia con estos resultados, los MEF RhoE *gt/gt* se immortalizan más rápidamente que los MEF silvestres y son más susceptibles a la transformación oncogénica inducida por E1A y Ras^{V12}. Los MEF responden a la expresión de Ras oncogénico llegando a una parada irreversible de la proliferación celular que se asemeja a la senescencia replicativa (Serrano *et al.*, 1997; Palmero y Serrano, 2001), que actúa como un mecanismo de supresión tumoral en este contexto. La senescencia celular es una respuesta a un estrés que bloquea la proliferación celular establemente, apareciendo en los tumores premalignos, por lo que la progresión a tumores malignos, requiere su evasión (Collado *et al.*, 2007; Collado y Serrano, 2010). La immortalización es el evento crítico hacia la transformación oncogénica completa porque los eventos de la immortalización alteran la respuesta normal antioncogénica de señalización de Ras (vom Brocke *et al.*, 2006). En nuestros experimentos, la ausencia de RhoE no afecta al proceso de entrada en senescencia replicativa ni evita la senescencia inducida por Ras. Sin embargo, en el experimento de formación de colonias por oncogenes cooperantes E1A y Ras^{V12}, la ausencia de RhoE favorece la transformación. Este resultado coincide con lo anteriormente publicado por otros autores, donde la transformación por Ras en células NIH 3T3 está reducida al sobreexpresar RhoE (Villalonga *et al.*, 2004). Finalmente, la inyección subcutánea de los MEF transformados con E1A/Ras en ratones inmunodeprimidos produce una

mayor formación de tumores. Por tanto, RhoE es un importante regulador de la proliferación celular en determinadas condiciones, de modo que solo en presencia del inductor adecuado la ausencia de RhoE favorece la proliferación celular. Estas son características propias de proteínas con actividad supresora de tumores.

Para corroborar esta hipótesis *in vivo* decidimos estudiar la susceptibilidad de los ratones deficientes en RhoE a la formación de tumores. Debido a la mortalidad temprana de los ratones RhoE *gt/gt*, utilizamos los ratones heterocigotos. En estos animales, no se observa la aparición espontánea de tumores, así que utilizamos dos modelos de inducción de tumores, la inducción de fibrosarcomas con 3-metilcolantreno y la inducción de papilomas mediante el tratamiento con DMBA/TPA. Mientras que en el ensayo con 3-metilcolantreno no observamos diferencias, los ratones RhoE *+gt* presentan una mayor susceptibilidad a la aparición de papilomas y de progresión a carcinomas inducidos por DMBA/TPA. Además, el análisis de la expresión de RhoE en las lesiones obtenidas de animales RhoE *+/+* y RhoE *+gt* sometidos al protocolo de carcinogénesis química en piel muestra aumento de la expresión de RhoE en las lesiones benignas. La administración aguda de TPA también se usa para inducir activación de Ras y oncogénesis en la piel (Kemp, 2005). El tratamiento agudo con TPA induce la expresión de RhoE en piel y los ratones RhoE *gt/gt* presentan una mayor respuesta proliferativa al tratamiento con TPA.

Todos estos resultados sugieren que la presencia de RhoE o, más concretamente, la inducción de la expresión de RhoE, contribuye a limitar la proliferación celular frente a un agente carcinogénico, al menos en piel.

Finalmente, ya que numerosos estudios implican a RhoE en la motilidad de células tumorales (Belgiovine *et al.*, 2010; Grise *et al.*, 2012), hemos utilizado un modelo de metástasis y hemos comprobado que la ausencia de RhoE aumenta la capacidad metastática de las células MDA-MB-231 xenotrasplantadas, lo que indica que RhoE también puede actuar limitando la progresión tumoral.

Todos estos resultados revelan una importante función de RhoE como regulador de la proliferación celular. La expresión de RhoE no es necesaria en condiciones normales, pero su ausencia resulta en un aumento de la proliferación celular en situaciones de estrés proliferativo, de modo que RhoE contribuye a la inhibición de la iniciación y progresión de tumores o, lo que es lo mismo, RhoE participa en el proceso de supresión tumoral.

A microscopic image showing a dense network of thin, fibrous structures, likely biological or synthetic fibers, arranged in a somewhat organized, overlapping pattern. The fibers are light-colored and appear to be interconnected, forming a mesh-like structure. The background is a light, uniform color.

Conclusiones

1. Las células carentes de la expresión de RhoE presentan un aumento de las fibras de estrés de actina y de la adhesión al sustrato.
2. RhoE regula la vía de señalización Cdc42/PAK-1/MLC en la remodelación del citoesqueleto de actina.
3. RhoE no está implicada en la supervivencia de MEF en respuesta al tratamiento con genotóxicos.
4. RhoE regula la inhibición por contacto, sin alterar la expresión de p27.
5. La ausencia de RhoE facilita la inmortalización espontánea y coopera con E1A y Ras^{V12} en la transformación oncogénica.
6. Los ratones deficientes en la expresión de RhoE presentan una mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores en piel inducidos por DMBA/TPA.
7. RhoE reduce la proliferación celular en piel en respuesta al tratamiento agudo con TPA.
8. El silenciamiento de RhoE aumenta la capacidad metastática de las células MDA-MB-231.

En resumen, este trabajo muestra la importancia de RhoE en el control de la respuesta a estímulos proliferativos, poniendo de manifiesto su implicación en la iniciación y progresión tumoral.



Bibliografía

- Abraham, M. T., Kuriakose, M. A., Sacks, P. G., Yee, H., Chiriboga, L., Bearer, E. L. & Delacure, M. D. (2001). Motility-related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer. *Laryngoscope*, **111**, 1285-9.
- Adamson, P., Wilbourn, B., Etienne-Manneville, S., Calder, V., Beraud, E., Milligan, G., Couraud, P. O. & Greenwood, J. (2002). Lymphocyte trafficking through the blood-brain barrier is dependent on endothelial cell heterotrimeric G-protein signaling. *Faseb J*, **16**, 1185-94.
- Aronheim, A., Broder, Y. C., Cohen, A., Fritsch, A., Belisle, B. & Abo, A. (1998). Chp, a homologue of the GTPase Cdc42Hs, activates the JNK pathway and is implicated in reorganizing the actin cytoskeleton. *Curr Biol*, **8**, 1125-8.
- Aspenstrom, P., Fransson, A. & Saras, J. (2004). Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J*, **377**, 327-37.
- Aspenstrom, P., Ruusala, A. & Pacholsky, D. (2007). Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases. *Exp Cell Res*, **313**, 3673-9.
- Bailly, M. & Condeelis, J. (2002). Cell motility: insights from the backstage. *Nat Cell Biol*, **4**, E292-4.
- Ballester-Lurbe, B., Poch, E., Mocholi, E., Guasch, R. M., Perez-Roger, I. & Terrado, J. (2009). RhoE is spatiotemporally regulated in the postnatal mouse CNS. *Neuroscience*, **163**, 586-93.
- Bao, W., Thullberg, M., Zhang, H., Onischenko, A. & Stromblad, S. (2002). Cell attachment to the extracellular matrix induces proteasomal degradation of p21(CIP1) via Cdc42/Rac1 signaling. *Mol Cell Biol*, **22**, 4587-97.
- Bektic, J., Pfeil, K., Berger, A. P., Ramoner, R., Pelzer, A., Schafer, G., Kofler, K., Bartsch, G. & Klocker, H. (2005). Small G-protein RhoE is underexpressed in prostate cancer and induces cell cycle arrest and apoptosis. *Prostate*.
- Bektic, J., Wrulich, O. A., Dobler, G., Kofler, K., Ueberall, F., Culig, Z., Bartsch, G. & Klocker, H. (2004). Identification of genes involved in estrogenic action in the human prostate using microarray analysis. *Genomics*, **83**, 34-44.
- Belgiovine, C., Frapolli, R., Bonezzi, K., Chiodi, I., Favero, F., Mello-Grand, M., Dei Tos, A. P., Giulotto, E., Tarabozzi, G., D'Incalci, M. & Mondello, C. (2010). Reduced expression of the ROCK inhibitor Rnd3 is associated with increased invasiveness and metastatic potential in mesenchymal tumor cells. *PLoS One*, **5**, e14154.
- Berdasco, M. & Esteller, M. (2010). Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell*, **19**, 698-711.
- Besson, A., Assoian, R. K. & Roberts, J. M. (2004a). Regulation of the cytoskeleton: an oncogenic function for CDK inhibitors? *Nat Rev Cancer*, **4**, 948-55.
- Besson, A., Gurian-West, M., Schmidt, A., Hall, A. & Roberts, J. M. (2004b). p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev*, **18**, 862-76.
- Bokoch, G. M. (2003). Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem*, **72**, 743-81.
- Bos, J. L., Rehmann, H. & Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, **129**, 865-77.
- Boswell, S. A., Ongusaha, P. P., Nghiem, P. & Lee, S. W. (2006). The protective role of a small GTPase RhoE against UVB induced DNA damage in keratinocytes. *J Biol Chem*.
- Boswell, S. A., Ongusaha, P. P., Nghiem, P. & Lee, S. W. (2007). The protective role of a small GTPase RhoE against UVB-induced DNA damage in keratinocytes. *J Biol Chem*, **282**, 4850-8.
- Bousquet, E., Mazieres, J., Privat, M., Rizzati, V., Casanova, A., Ledoux, A., Mery, E., Couderc, B., Favre, G. & Pradines, A. (2009). Loss of RhoB expression promotes migration and invasion of human bronchial cells via activation of AKT1. *Cancer Res*, **69**, 6092-9.

- Bracken, C. P., Gregory, P. A., Khew-Goodall, Y. & Goodall, G. J. (2009). The role of microRNAs in metastasis and epithelial-mesenchymal transition. *Cell Mol Life Sci*, **66**, 1682-99.
- Braga, V. M. & Yap, A. S. (2005). The challenges of abundance: epithelial junctions and small GTPase signalling. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 466-74.
- Brzeska, H., Szczepanowska, J., Matsumura, F. & Korn, E. D. (2004). Rac-induced increase of phosphorylation of myosin regulatory light chain in HeLa cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **58**, 186-99.
- Canguilhem, B., Pradines, A., Baudouin, C., Boby, C., Lajoie-Mazenc, I., Charveron, M. & Favre, G. (2005). RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem*, **280**, 43257-63.
- Chardin, P. (2006). Function and regulation of Rnd proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 54-62.
- Chen, Z., Sun, J., Pradines, A., Favre, G., Adnane, J. & Sebti, S. M. (2000). Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice. *J Biol Chem*, **275**, 17974-8.
- Chu, I. M., Hengst, L. & Slingerland, J. M. (2008). The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **8**, 253-67.
- Clementi, N. & Polacek, N. (2010). Ribosome-associated GTPases: the role of RNA for GTPase activation. *RNA Biol*, **7**, 521-7.
- Collado, M., Blasco, M. A. & Serrano, M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*, **130**, 223-33.
- Collado, M. & Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer*, **10**, 51-7.
- Cox, E. A. & Huttenlocher, A. (1998). Regulation of integrin-mediated adhesion during cell migration. *Microsc Res Tech*, **43**, 412-9.
- Cox, E. A., Sastry, S. K. & Huttenlocher, A. (2001). Integrin-mediated adhesion regulates cell polarity and membrane protrusion through the Rho family of GTPases. *Mol Biol Cell*, **12**, 265-77.
- Croft, D. R. & Olson, M. F. (2006). The Rho GTPase effector ROCK regulates cyclin A, cyclin D1, and p27Kip1 levels by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*, **26**, 4612-27.
- Cuiyan, Z., Jie, H., Fang, Z., Kezhi, Z., Junting, W., Susheng, S., Xiaoli, F., Ning, L., Xinhua, M., Zhaoli, C., Kang, S., Bin, Q., Baozhong, L., Sheng, C. & Meihua, X. (2007). Overexpression of RhoE in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) is Associated with Smoking and Correlates with DNA Copy Number Changes. *Cancer Biol Ther*, **6**.
- Danesh, F. R., Sadeghi, M. M., Amro, N., Philips, C., Zeng, L., Lin, S., Sahai, A. & Kanwar, Y. S. (2002). 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**, 8301-5.
- Fero, M. L., Randel, E., Gurley, K. E., Roberts, J. M. & Kemp, C. J. (1998). The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature*, **396**, 177-80.
- Fiegen, D., Blumenstein, L., Stege, P., Vetter, I. R. & Ahmadian, M. R. (2002). Crystal structure of Rnd3/RhoE: functional implications. *FEBS Lett*, **525**, 100-4.
- Foster, R., Hu, K. Q., Lu, Y., Nolan, K. M., Thissen, J. & Settleman, J. (1996). Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Mol Cell Biol*, **16**, 2689-99.
- Friedl, P. & Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol*, **188**, 11-9.
- Fritz, G., Just, I. & Kaina, B. (1999). Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer*, **81**, 682-7.

- Gadea, G., de Toledo, M., Anguille, C. & Roux, P. (2007). Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices. *J Cell Biol*, **178**, 23-30.
- Garavini, H., Riento, K., Phelan, J. P., McAlister, M. S., Ridley, A. J. & Keep, N. H. (2002). Crystal structure of the core domain of RhoE/Rnd3: a constitutively activated small G protein. *Biochemistry*, **41**, 6303-10.
- Garcia-Mata, R., Boulter, E. & Burridge, K. (2011). The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**, 493-504.
- Garg, R., Riento, K., Keep, N. H., Morris, J. D. & Ridley, A. J. (2008). N-terminus-mediated dimerization of ROCK-I is required for RhoE binding and actin reorganization. *Biochem J*.
- Goh, L. L. & Manser, E. (2010). The RhoA GEF Syx is a target of Rnd3 and regulated via a Raf1-like ubiquitin-related domain. *PLoS ONE*, **5**, e12409.
- Gomez del Pulgar, T., Benitah, S. A., Valeron, P. F., Espina, C. & Lacal, J. C. (2005). Rho GTPase expression in tumorigenesis: evidence for a significant link. *Bioessays*, **27**, 602-13.
- Gouw, L. G., Reading, N. S., Jenson, S. D., Lim, M. S. & Elenitoba-Johnson, K. S. (2005). Expression of the Rho-family GTPase gene RHOF in lymphocyte subsets and malignant lymphomas. *Br J Haematol*, **129**, 531-3.
- Govek, E. E., Newey, S. E. & Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev*, **19**, 1-49.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**, 59-74.
- Gress, T. M., Muller-Pillasch, F., Geng, M., Zimmerhackl, F., Zehetner, G., Friess, H., Buchler, M., Adler, G. & Lehrach, H. (1996). A pancreatic cancer-specific expression profile. *Oncogene*, **13**, 1819-30.
- Grise, F., Sena, S., Bidaud-Meynard, A., Baud, J., Hiriart, J. B., Makki, K., Dugot-Senant, N., Staedel, C., Bioulac-Sage, P., Zucman-Rossi, J., Rosenbaum, J. & Moreau, V. (2012). Rnd3/RhoE is down-regulated in hepatocellular carcinoma and controls cellular invasion. *Hepatology*.
- Guasch, R. M., Scambler, P., Jones, G. E. & Ridley, A. J. (1998). RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Mol Cell Biol*, **18**, 4761-71.
- Hakem, A., Sanchez-Sweatman, O., You-Ten, A., Duncan, G., Wakeham, A., Khokha, R. & Mak, T. W. (2005). RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis. *Genes Dev*, **19**, 1974-9.
- Hall, A. (2009). The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev*, **28**, 5-14.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**, 646-74.
- Hansen, S. H., Zegers, M. M., Woodrow, M., Rodriguez-Viciana, P., Chardin, P., Mostov, K. E. & McMahon, M. (2000). Induced expression of Rnd3 is associated with transformation of polarized epithelial cells by the Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase pathway. *Mol Cell Biol*, **20**, 9364-75.
- Heasman, S. J. & Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 690-701.
- Hidalgo-Carcedo, C., Hooper, S., Chaudhry, S. I., Williamson, P., Harrington, K., Leitinger, B. & Sahai, E. (2011). Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6. *Nat Cell Biol*, **13**, 49-58.
- Hu, W., Bellone, C. J. & Baldassare, J. J. (1999). RhoA stimulates p27(Kip) degradation through its regulation of cyclin E/CDK2 activity. *J Biol Chem*, **274**, 3396-401.

- Huang, M. & Prendergast, G. C. (2006). RhoB in cancer suppression. *Histol Histopathol*, **21**, 213-8.
- Hurteau, G. J., Spivack, S. D. & Brock, G. J. (2006). Potential mRNA degradation targets of hsa-miR-200c, identified using informatics and qRT-PCR. *Cell Cycle*, **5**, 1951-6.
- Hwang, S. L., Hong, Y. R., Sy, W. D., Lieu, A. S., Lin, C. L., Lee, K. S. & Hwang, S. L. (2004). Rac1 gene mutations in human brain tumours. *Eur J Surg Oncol*, **30**, 68-72.
- Ikeda, H., Nagashima, K., Yanase, M., Tomiya, T., Arai, M., Inoue, Y., Tejima, K., Nishikawa, T., Omata, M., Kimura, S. & Fujiwara, K. (2003). Involvement of Rho/Rho kinase pathway in regulation of apoptosis in rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **285**, G880-6.
- Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A., Watanabe, N., Saito, Y., Kakizuka, A., Morii, N. & Narumiya, S. (1996). The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *Embo J*, **15**, 1885-93.
- Kakimoto, T., Kato, H. & Negishi, M. (2004). 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**, 14104-10.
- Kardash, E., Reichman-Fried, M., Maitre, J. L., Boldajipour, B., Papusheva, E., Messerschmidt, E. M., Heisenberg, C. P. & Raz, E. (2010). A role for Rho GTPases and cell-cell adhesion in single-cell motility in vivo. *Nat Cell Biol*, **12**, 47-53; sup pp 1-11.
- Katiyar, P. & Aplin, A. E. (2011). FOXD3 regulates migration properties and Rnd3 expression in melanoma cells. *Mol Cancer Res*, **9**, 545-52.
- Kemp, C. J. (2005). Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells. *Semin Cancer Biol*, **15**, 460-73.
- Kim, B. K., Kim, H. M., Chung, K. S., Kim, D. M., Park, S. K., Song, A., Won, K. J., Lee, K., Oh, Y. K., Song, K. B., Simon, J. A., Han, G. & Won, M. (2011). Upregulation of RhoB via c-Jun N-terminal kinase signaling induces apoptosis of the human gastric carcinoma NUGC-3 cells treated with NSC12618. *Carcinogenesis*, **32**, 254-61.
- Klein, R. M. & Aplin, A. E. (2009). Rnd3 regulation of the actin cytoskeleton promotes melanoma migration and invasive outgrowth in three dimensions. *Cancer Res*, **69**, 2224-33.
- Klein, R. M., Spofford, L. S., Abel, E. V., Ortiz, A. & Aplin, A. E. (2008). B-RAF regulation of Rnd3 participates in actin cytoskeletal and focal adhesion organization. *Mol Biol Cell*, **19**, 498-508.
- Komander, D., Garg, R., Wan, P. T., Ridley, A. J. & Barford, D. (2008). Mechanism of multi-site phosphorylation from a ROCK-I:RhoE complex structure. *Embo J*.
- Kruse, P. F. & Patterson, M. K. 1973. *Tissue culture : methods and applications*, New York [etc.], Academic Press.
- Leung, T., Manser, E., Tan, L. & Lim, L. (1995). A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem*, **270**, 29051-4.
- Levenberg, S., Yarden, A., Kam, Z. & Geiger, B. (1999). p27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry. *Oncogene*, **18**, 869-76.
- Liberto, M., Cobrinik, D. & Minden, A. (2002). Rho regulates p21(CIP1), cyclin D1, and checkpoint control in mammary epithelial cells. *Oncogene*, **21**, 1590-9.
- Liebig, T., Erasmus, J., Kalaji, R., Davies, D., Loirand, G., Ridley, A. & Braga, V. M. (2009). RhoE is required for keratinocyte differentiation and stratification. *Mol Biol Cell*, **20**, 452-63.
- Liu, A. X., Rane, N., Liu, J. P. & Prendergast, G. C. (2001). 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**, 6906-12.

- Liu, T., Bauskin, A. R., Zaunders, J., Brown, D. A., Pankhurst, S., Russell, P. J. & Breit, S. N. (2003). Macrophage inhibitory cytokine 1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res*, **63**, 5034-40.
- Lowe, S. W., Cepero, E. & Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*, **432**, 307-15.
- Lwin, T., Hazlehurst, L. A., Dessureault, S., Lai, R., Bai, W., Sotomayor, E., Moscinski, L. C., Dalton, W. S. & Tao, J. (2007). Cell adhesion induces p27Kip1-associated cell-cycle arrest through down-regulation of the SCFSkp2 ubiquitin ligase pathway in mantle-cell and other non-Hodgkin B-cell lymphomas. *Blood*, **110**, 1631-8.
- 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. & Cox, A. D. (2009). Regulation of Rnd3 localization and function by protein kinase C alpha-mediated phosphorylation. *Biochem J*, **424**, 153-61.
- Meiri, D., Greeve, M. A., Brunet, A., Finan, D., Wells, C. D., LaRose, J. & Rottapel, R. (2009). Modulation of Rho guanine exchange factor Lfc activity by protein kinase A-mediated phosphorylation. *Mol Cell Biol*, **29**, 5963-73.
- Meller, N., Merlot, S. & Guda, C. (2005). CZH proteins: a new family of Rho-GEFs. *J Cell Sci*, **118**, 4937-46.
- Minn, A. J., Gupta, G. P., Siegel, P. M., Bos, P. D., Shu, W., Giri, D. D., Viale, A., Olshen, A. B., Gerald, W. L. & Massague, J. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, **436**, 518-24.
- Mocholi, E., Ballester-Lurbe, B., Arque, G., Poch, E., Peris, B., Guerri, C., Dierssen, M., Guasch, R. M., Terrado, J. & Perez-Roger, I. (2011). RhoE deficiency produces postnatal lethality, profound motor deficits and neurodevelopmental delay in mice. *PLoS ONE*, **6**, e19236.
- Moon, S. Y. & Zheng, Y. (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol*, **13**, 13-22.
- Motti, M. L., Califano, D., Baldassarre, G., Celetti, A., Merolla, F., Forzati, F., Napolitano, M., Tavernise, B., Fusco, A. & Viglietto, G. (2005). Reduced E-cadherin expression contributes to the loss of p27kip1-mediated mechanism of contact inhibition in thyroid anaplastic carcinomas. *Carcinogenesis*, **26**, 1021-34.
- Nadiminty, N., Dutt, S., Tepper, C. & Gao, A. C. (2010). Microarray analysis reveals potential target genes of NF-kappaB2/p52 in LNCaP prostate cancer cells. *Prostate*, **70**, 276-87.
- Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., Nakao, K. & Narumiya, S. (1996). ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett*, **392**, 189-93.
- Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I. & Loh, D. Y. (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*, **85**, 707-20.
- Nobes, C. D., Lauritzen, I., Mattei, M. G., Paris, S., Hall, A. & Chardin, P. (1998). A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol*, **141**, 187-97.
- Olson, M. F., Ashworth, A. & Hall, A. (1995). An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science*, **269**, 1270-2.
- Ongusaha, P. P., Kim, H. G., Boswell, S. A., Ridley, A. J., Der, C. J., Dotto, G. P., Kim, Y. B., Aaronson, S. A. & Lee, S. W. (2006). RhoE is a pro-survival p53 target gene that inhibits ROCK I-mediated apoptosis in response to genotoxic stress. *Curr Biol*, **16**, 2466-72.
- Palmero, I. & Serrano, M. (2001). Induction of senescence by oncogenic Ras. *Methods Enzymol*, **333**, 247-56.
- Parrini, M. C., Lei, M., Harrison, S. C. & Mayer, B. J. (2002). Pak1 kinase homodimers are autoinhibited in trans and dissociated upon activation by Cdc42 and Rac1. *Mol Cell*, **9**, 73-83.

- Parsons, J. T., Horwitz, A. R. & Schwartz, M. A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**, 633-43.
- Pellegrin, S. & Mellor, H. (2008). Rho GTPase activation assays. *Curr Protoc Cell Biol*, **Chapter 14**, Unit 14 8.
- Perez-Roger, I., Kim, S. H., Griffiths, B., Sewing, A. & Land, H. (1999). Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *Embo J*, **18**, 5310-20.
- Philipp, J., Vo, K., Gurley, K. E., Seidel, K. & Kemp, C. J. (1999). Tumor suppression by p27Kip1 and p21Cip1 during chemically induced skin carcinogenesis. *Oncogene*, **18**, 4689-98.
- Philipp-Staheli, J., Kim, K. H., Payne, S. R., Gurley, K. E., Liggitt, D., Longton, G. & Kemp, C. J. (2002). Pathway-specific tumor suppression. Reduction of p27 accelerates gastrointestinal tumorigenesis in Apc mutant mice, but not in Smad3 mutant mice. *Cancer Cell*, **1**, 355-68.
- Pinner, S. & Sahai, E. (2008). PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE. *Nat Cell Biol*.
- Poch, E., Minambres, R., Mocholi, E., Ivorra, C., Perez-Arago, A., Guerri, C., Perez-Roger, I. & Guasch, R. M. (2007). RhoE interferes with Rb inactivation and regulates the proliferation and survival of the U87 human glioblastoma cell line. *Exp Cell Res*, **313**, 719-31.
- Pruitt, K. & Der, C. J. (2001). Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Lett*, **171**, 1-10.
- Ramocki, M. B., Johnson, S. E., White, M. A., Ashendel, C. L., Konieczny, S. F. & Taparowsky, E. J. (1997). Signaling through mitogen-activated protein kinase and Rac/Rho does not duplicate the effects of activated Ras on skeletal myogenesis. *Mol Cell Biol*, **17**, 3547-55.
- Reinhardt, H. C. & Schumacher, B. (2012). The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet*, **28**, 128-36.
- Ridley, A. J. (1999). Rho family proteins and regulation of the actin cytoskeleton. *Prog Mol Subcell Biol*, **22**, 1-22.
- Ridley, A. J. (2001). Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci*, **114**, 2713-22.
- Ridley, A. J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol*, **16**, 522-9.
- Ridley, A. J. & Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, **70**, 389-99.
- Riento, K., Guasch, R. M., Garg, R., Jin, B. & Ridley, A. J. (2003). RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol*, **23**, 4219-29.
- Riento, K. & Ridley, A. J. (2003). Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 446-56.
- Riento, K., Totty, N., Villalonga, P., Garg, R., Guasch, R. & Ridley, A. J. (2005a). RhoE function is regulated by ROCK I-mediated phosphorylation. *Embo J*.
- Riento, K., Villalonga, P., Garg, R. & Ridley, A. (2005b). Function and regulation of RhoE. *Biochem Soc Trans*, **33**, 649-51.
- Rittinger, K. (2009). Snapshots form a big picture of guanine nucleotide exchange. *Sci Signal*, **2**, pe63.
- Rivard, N., L'Allemain, G., Bartek, J. & Pouyssegur, J. (1996). Abrogation of p27Kip1 by cDNA antisense suppresses quiescence (G0 state) in fibroblasts. *J Biol Chem*, **271**, 18337-41.
- Rossman, K. L., Der, C. J. & Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 167-80.

- Rubenstein, N. M., Chan, J. F., Kim, J. Y., Hansen, S. H. & Firestone, G. L. (2005). Rnd3/RhoE induces tight junction formation in mammary epithelial tumor cells. *Exp Cell Res*, **305**, 74-82.
- Sahai, E. & Marshall, C. J. (2003). Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol*, **5**, 711-9.
- Sato, N., Fukui, T., Taniguchi, T., Yokoyama, T., Kondo, M., Nagasaka, T., Goto, Y., Gao, W., Ueda, Y., Yokoi, K., Minna, J. D., Osada, H., Kondo, Y. & Sekido, Y. (2007). RhoB is frequently downregulated in non-small-cell lung cancer and resides in the 2p24 homozygous deletion region of a lung cancer cell line. *Int J Cancer*, **120**, 543-51.
- Sells, M. A., Boyd, J. T. & Chernoff, J. (1999). p21-activated kinase 1 (Pak1) regulates cell motility in mammalian fibroblasts. *J Cell Biol*, **145**, 837-49.
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, **88**, 593-602.
- Shimono, Y., Zabala, M., Cho, R. W., Lobo, N., Dalerba, P., Qian, D., Diehn, M., Liu, H., Panula, S. P., Chiao, E., Dirbas, F. M., Somlo, G., Pera, R. A., Lao, K. & Clarke, M. F. (2009). Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell*, **138**, 592-603.
- Shurin, G. V., Tourkova, I. L. & Shurin, M. R. (2008). Low-dose chemotherapeutic agents regulate small Rho GTPase activity in dendritic cells. *J Immunother*, **31**, 491-9.
- St Croix, B., Sheehan, C., Rak, J. W., Florenes, V. A., Slingerland, J. M. & Kerbel, R. S. (1998). E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1). *J Cell Biol*, **142**, 557-71.
- Talens-Visconti, R., Peris, B., Guerri, C. & Guasch, R. M. (2010). RhoE stimulates neurite-like outgrowth in PC12 cells through inhibition of the RhoA/ROCK-I signalling. *J Neurochem*, **112**, 1074-87.
- Theard, D., Raspe, M. A., Kalicharan, D., Hoekstra, D. & van, I. S. C. (2008). Formation of E-cadherin/beta-catenin-based adherens junctions in hepatocytes requires serine-10 in p27(Kip1). *Mol Biol Cell*, **19**, 1605-13.
- Tyburczy, M. E., Kotulska, K., Pokarowski, P., Mieczkowski, J., Kucharska, J., Grajkowska, W., Roszkowski, M., Jozwiak, S. & Kaminska, B. (2010). Novel proteins regulated by mTOR in subependymal giant cell astrocytomas of patients with tuberous sclerosis complex and new therapeutic implications. *Am J Pathol*, **176**, 1878-90.
- van Hengel, J., D'Hooge, P., Hooghe, B., Wu, X., Libbrecht, L., De Vos, R., Quondamatteo, F., Klempt, M., Brakebusch, C. & van Roy, F. (2008). Continuous cell injury promotes hepatic tumorigenesis in cdc42-deficient mouse liver. *Gastroenterology*, **134**, 781-92.
- Vega, F. M., Fruhwirth, G., Ng, T. & Ridley, A. J. (2011). RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets. *J Cell Biol*, **193**, 655-65.
- Vega, F. M. & Ridley, A. J. (2008). Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett*, **582**, 2093-101.
- Vidal, A., Millard, S. S., Miller, J. P. & Koff, A. (2002). Rho activity can alter the translation of p27 mRNA and is important for RasV12-induced transformation in a manner dependent on p27 status. *J Biol Chem*, **277**, 16433-40.
- Villalonga, P., Guasch, R. M., Riento, K. & Ridley, A. J. (2004). RhoE inhibits cell cycle progression and Ras-induced transformation. *Mol Cell Biol*, **24**, 7829-40.
- Villalonga, P. & Ridley, A. J. (2006). Rho GTPases and cell cycle control. *Growth Factors*, **24**, 159-64.
- vom Brocke, J., Schmeiser, H. H., Reinbold, M. & Hollstein, M. (2006). MEF immortalization to investigate the ins and outs of mutagenesis. *Carcinogenesis*, **27**, 2141-7.

- Wennerberg, K. & Der, C. J. (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci*, **117**, 1301-12.
- Wennerberg, K., Forget, M. A., Ellerbroek, S. M., Arthur, W. T., Burridge, K., Settleman, J., Der, C. J. & Hansen, S. H. (2003). Rnd proteins function as RhoA antagonists by activating p190 RhoGAP. *Curr Biol*, **13**, 1106-15.
- Wherlock, M. & Mellor, H. (2002). The Rho GTPase family: a Racs to Wrchs story. *J Cell Sci*, **115**, 239-40.
- Wu, F. Y., Wang, S. E., Sanders, M. E., Shin, I., Rojo, F., Baselga, J. & Arteaga, C. L. (2006). Reduction of cytosolic p27(Kip1) inhibits cancer cell motility, survival, and tumorigenicity. *Cancer Res*, **66**, 2162-72.
- Zambrowicz, B. P., Friedrich, G. A., Buxton, E. C., Lilleberg, S. L., Person, C. & Sands, A. T. (1998). Disruption and sequence identification of 2,000 genes in mouse embryonic stem cells. *Nature*, **392**, 608-11.
- Zambrowicz, B. P. & Sands, A. T. (2003). Knockouts model the 100 best-selling drugs--will they model the next 100? *Nat Rev Drug Discov*, **2**, 38-51.
- Zhang, C., Zhou, F., Li, N., Shi, S., Feng, X., Chen, Z., Hang, J., Qiu, B., Li, B., Chang, S., Wan, J., Shao, K., Xing, X., Tan, X., Wang, Z., Xiong, M., *et al.* (2007). Overexpression of RhoE Has a Prognostic Value in Non-Small Cell Lung Cancer. *Ann Surg Oncol*.
- Zhang, S., Tang, Q., Xu, F., Xue, Y., Zhen, Z., Deng, Y., Liu, M., Chen, J., Liu, S., Qiu, M., Liao, Z., Li, Z., Luo, D., Shi, F., Zheng, Y. & Bi, F. (2009). RhoA regulates G1-S progression of gastric cancer cells by modulation of multiple INK4 family tumor suppressors. *Mol Cancer Res*, **7**, 570-80.
- Zhao, Z. S. & Manser, E. (2005). PAK and other Rho-associated kinases--effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem J*, **386**, 201-14.
- Zhou, J., Li, K., Gu, Y., Feng, B., Ren, G., Zhang, L., Wang, Y., Nie, Y. & Fan, D. (2011). Transcriptional up-regulation of RhoE by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes epithelial to mesenchymal transition of gastric cancer cells during hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*, **415**, 348-54.
- Zhu, Y., Xu, F., Zhou, J., Liu, S., Huang, J., Luo, D., Qiu, M., Jin, B. & Bi, F. (2008). [Expression of RhoE in lung and breast cancer and its clinical significance.]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, **11**, 85-9.
- Zuckerbraun, B. S., Shapiro, R. A., Billiar, T. R. & Tzeng, E. (2003). RhoA influences the nuclear localization of extracellular signal-regulated kinases to modulate p21Waf/Cip1 expression. *Circulation*, **108**, 876-81.