



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de ciències

**Memòria del Treball de Fi de Grau**

# Anàlisi mitjançant RNAi del paper de RhoE en el control de la morfologia i migració cel·lular en cèl·lules de Gliomes malignes

Joan Domingo Reinés

**Grau de bioquímica**

Any acadèmic 2013-14

DNI de l'alumne: 41536676X

Treball tutelat per Priam Villalonga  
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línea, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:  
Glioblastoma, RhoE, shRNA, motilitat, morfologia, citoesquelet d'actina.



## Resum

El glioblastoma es el tumor primari del sistema nerviós central més freqüent i que presenta major malignitat i pitjor pronòstic. Un cop diagnosticat el glioblastoma, la mitjana de supervivència està entre els 9-12 mesos. Aquesta gran mortalitat ve determinada per la seva invasivitat i capacitat per estendre's per tot el cervell i a més la seva gran resistència als tractaments habituals en càncer. Tot això desperta un gran interès en entendre els mecanismes moleculars que confereixen a aquest tipus de tumor una gran malignitat. Per això s'ha estudiat en profunditat com funciona i quines alteracions provoquen la gran capacitat de difondre dins el cervell del glioblastoma i en aquest treball en hem centrat en estudiar l'efecte d'una proteïna en concret que participa en tot aquest procés, RhoE. Aquesta Rho GTPasa se li atribueixen efectes en la organització del citoesquelet i en la regulació del cicle cel·lular. Aquí hem intentat mitjançant la depleció d'aquesta proteïna, generant línies *knockdown* estables, entendre amb més profunditat quina funció té en quant a la morfologia i mobilitat cel·lular realitzant anàlisis del citoesquelet d'actina per microscòpia confocal i assajos de motilitat tipus *wound healing*. En definitiva s'ha trobat que RhoE, al ser deplecionat existeix un canvi en la morfologia cel·lular al augmentar el nombre de fibres d'estrès, provocant una major rigidesa a la cèl·lula i major nombre de contactes focals i en conseqüència una menor mobilitat.

Introducció .....	5
Informació general sobre gliomes .....	5
Evolució clínica .....	5
Alteracions moleculars.....	7
Tractament .....	8
Rho GTPases .....	9
Rho, Rac, Cdc42 .....	10
Regulació de Rho .....	10
Funcions de RhoE.....	12
Rellevància de RhoE i hipòtesi.....	12
Objectius .....	12
Materials i mètodes .....	13
Línia cel·lular .....	13
Cultius cel·lulars.....	13
Transfecció .....	13
Transfecció siRNA .....	14
Transfecció amb plasmidis .....	14
Lisat cel·lular.....	17
Western blot.....	17
Immunofluorescència .....	18
Microscopi confocal .....	18
<i>Wound healing Assay</i> .....	19
Resultats.....	20
Generació de línies de glioma <i>knockdown</i> estables per a RhoE .....	20
Una reducció important dels nivells de RhoE provoca un canvi de morfologia així com canvis en el citoesquelet d'actina .....	22
Un canvi de morfologia i un major nombre de fibres d'estrès provoquen una disminució de la motilitat en glioblastoma.....	25
Discussió.....	28
Conclusió .....	31
Bibliografia .....	32

## Introducció

### Informació general sobre gliomes

La Organització mundial de la Salut (OMS), classifica els tumors primaris del cervell en funció del seu origen cel·lular i histològic. D'aquesta manera es poden dividir en cinc classes: tumors neuroepitelials, tumors dels nervis cranials i paraespinals, tumors de les meninges, limfomes i neoplàsies hematopoètiques i un grup que inclou tumors de les cèl·lules mare del cervell i tumors de la regió selar.<sup>1</sup>

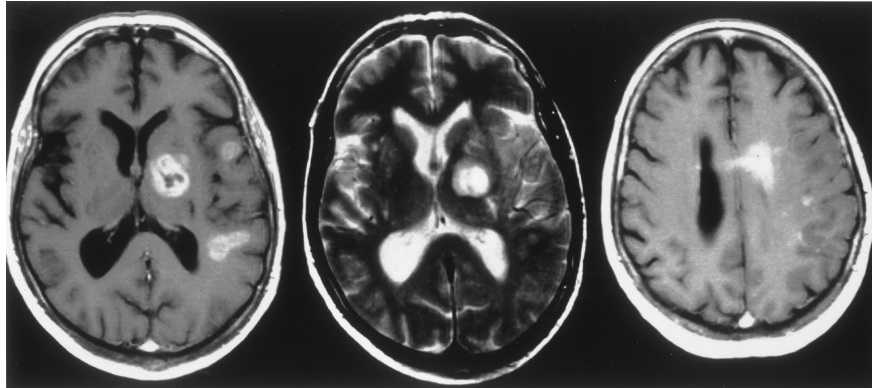
Els gliomes són el tipus de tumor primari del sistema nerviós central (SNC) més freqüent. Són un tipus de tumor neuroepitelial i dins ell s'inclouen tres subgrups histopatològics, diferenciats pel seu nivell d'invasivitat i agressivitat. El nom de cada membre del subgrup prové de la hipotètica línia de diferenciació, on tenim els ependimomes, oligodendrogliomes i astrocitomes cada un amb una freqüència de <10%, 10-30% i 60-70% respectivament.<sup>1</sup>

La gran majoria dels tumors glials són malignes exceptuant una petita part de menys d'un 10% on s'inclouen un conjunt ampli de distints tumors cerebrals. Els més freqüents són els astrocitomes com hem vist i també són el que presenten major invasivitat i malignitat. Depenent d'aquestes característiques es classifiquen entre els graus I a IV, amb els IV com els més invasius. Aquesta gradació dóna informació sobre el pronòstic del pacient així com la evolució del tumor, ja que aquests tumors cerebrals no solen metastatitzar fora del SNC a causa de la barrera hematoencefàlica, el grau del tumor es determinant per seguir la malaltia.<sup>2-5</sup>

### Evolució clínica

Els tumors de **grau I** són biològicament benignes i són curables a través de la cirurgia i la seva resecció completa si es procedeix en el moment del diagnòstic. Els de **grau II** presenten baixa malignitat i solen anar acompanyats d'un llarg seguiment clínic al no ser curables a través de la cirurgia. Els de **grau III** són molt invasius i provoquen la mort en pocs anys mentre que els de **grau IV** també són molt invasius i a més resisteixen la quimioteràpia i radioteràpia i són letals als 9-12 mesos. El 70% dels gliomes de grau II es transformen en gliomes de grau III i IV dins els 5-10 anys següents del diagnòstic on a més la supervivència a 5 anys dels de grau IV es inferior al 10%.<sup>2,6</sup>

Els gliomes comuns que afecten als hemisferis cerebrals són coneguts com gliomes difusos al tenir la capacitat d'infiltració a través del cervell, sobretot en la matèria blanca i fins i tot pot passar d'un hemisferi a un altre travessant el cos callós (fig. 1).<sup>6,7</sup> La capacitat invasiva així com la resistència a alguns tractaments són els punts principals que caracteritzen la malignitat del glioma.<sup>2</sup>



**Figura 1:** Ressonància magnètica amb contrast en T1 que mostra zones de distinta densitat, el que representa edema i infiltració per part del tumor (esquerra). En T2 apareixen més zones de distinta densitat (centre). En la darrera imatge (dreta) es pot observar com el tumor ha traspassat el cos callós canviant de hemisferi.<sup>7</sup>

Els gliomes difusos, són classificats depenent de la seves característiques histològiques com a astrocitomes, oligodendrogliomes i tumors que presenten característiques d'ambdós, els oligoastrocitomes. Els tumors astrocítics, els més freqüents, són classificats com astrocitomes pilocítics o de grau I, astrocitomes o de grau II, astrocitomes anaplàsics o de grau III i glioblastoma multiforme (GBM) o de grau IV. Aquesta classificació ve determinada pels trets histològics que proporcionen malignitat com la alta cel·lularitat, pleomorfisme, activitat mitòtica, proliferació microvascular i necrosi.<sup>2</sup>

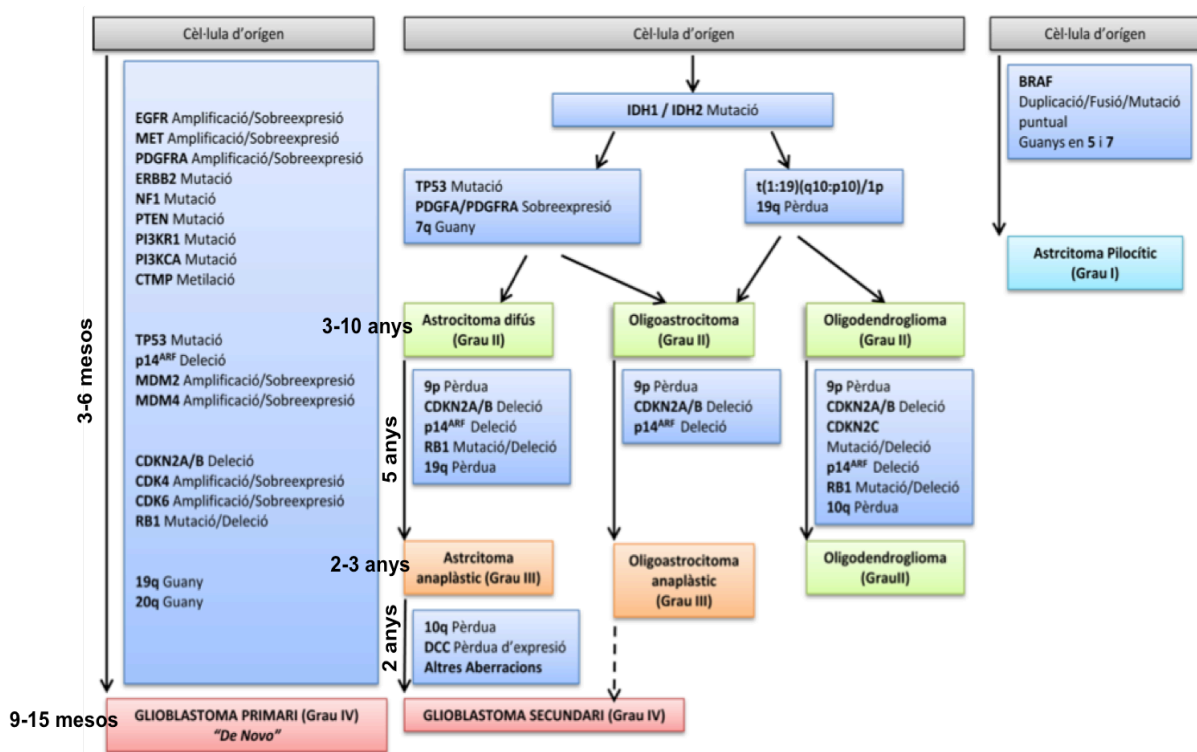
Els gliomes de grau superior a I presenten alta cel·lularitat i invasivitat. Els de grau II a més presenten pleomorfisme i els de grau III activitat mitòtica. Els de grau IV mostren proliferació microvascular i/o necrosi.<sup>2,6</sup>

Els GBM són la forma més agressiva i amb més prevalença i a aquest cas els GBM apareixen de dues formes distintes; *de novo* o a partir d'astrocitomes de grau inferior.<sup>2,3,8</sup>

Els GBM primaris o *de novo* es presenten típicament en pacients d'edat avançada sent altament agressius i invasius sense evidències anteriors de malaltia. En canvi els GBM secundaris es troben en pacients més joves que inicialment presentaven astrocitomes de grau inferior i que no han respost bé a les teràpies.<sup>2,8</sup>

### Alteracions moleculars

Les diferències genètiques entre aquests dos tipus de gliomes són considerables ja que presenten perfils de mutacions distints amb penetrància distinta. Per això s'ha proposat que els GBM primaris i secundaris representen dues entitats patològicament iguals formades a través de dos camins mutagènics distints. El problema rau en que els dos tipus de GBM presenten moltes característiques en comú que a simple vista els fan indistingibles com en la morfologia, la histopatologia i la simptomatologia. La mitja de supervivència quan els dos GBM són diagnosticats és molt similar, al igual que les taxes de proliferació i invasió. Els dos són resistents als tractaments i presenten les mateixes vies de senyalització mutades encara que les freqüències de mutació variïn en llocs específics del genoma.<sup>2,9</sup>



**Figura 2:** Esquema que representa les mutacions més importants que condueixen una cèl·lula progenitora gials cap a GBM primaris, secundaris i oligodendrogliomes anaplàstics. En horitzontal apareixen les mitjanes de supervivència dels gliomes més freqüents i en vertical el temps que transcorre en la aparició de cada tipus de tumor. Imatge extreta i modificada de<sup>8-10</sup>

Això demostra que es important conèixer quines són les vies alterades. En el cas del GBM secundari, les mutacions ocorren gradualment seguint un patró típic dels tumors (fig. 2).

Durant aquest procés hi ha certes mutacions que augmenten la malignitat del tumor. Entre les més freqüents esta la sobre expressió del receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR), un receptor tirosina quinasa, així com en alguns casos una activació constitutiva d'ell mateix on rep el

nom de EGFRvIII. Aquesta mutació provoca una deleció entre els exons 2 a 7 que genera un receptor sense la zona d'unió al lligand provocant que estigui contínuament fosforilat i activi vies de proliferació, angiogènesi i evitant l'apoptosi, tot generant un creixement cel·lular descontrolat.<sup>3,11,12</sup>

Aquest receptor al unir-se al seu lligand dimeritza i s'autofosforila activant distintes vies entre les que es troben Raf/MEK/ERK i a través del PI3K activarà altres vies com Akt. Un fet important es la pèrdua de *Phosphatase and Tensin Homology* (PTEN) que regula negativament a PI3K i controlant la proliferació i migració cel·lular.<sup>3,11,12</sup>

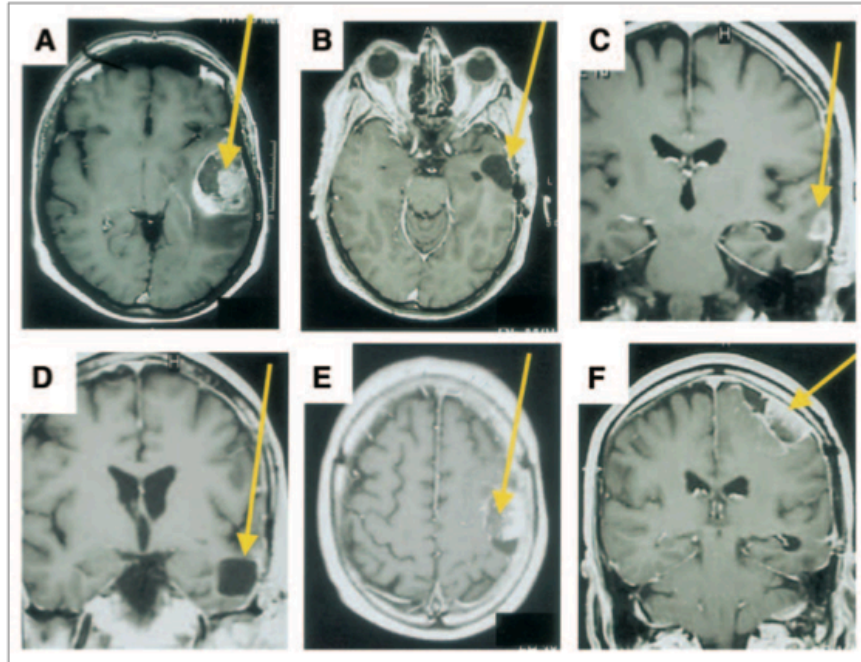
També muten distints supressors tumorals i proteïnes de control del cicle cel·lular. El primer que muta com en molts tumors es p53 que promou la aparició d'altres mutacions. També la proteïna del Retinoblastoma (Rb) que regula l'entrada en el cicle cel·lular. En condicions normals es troba hiperfosforiliada i unida a E2F evitant la transcripció de factors per la mitosi. Una activació de Raf/MEK provoca la transcripció de la ciclina D1 provocant que les quinases dependents de ciclina 4 i 6 (CDK4/6) fosforilin a pRB i es separi de E2F, promovent la mitosi. Tots aquest factors es poden veure mutats en gliomes.<sup>11-14</sup>

## Tractament

Per últim cal destacar que l'interès en conèixer aquestes vies en gliomes es degut a que aquest tipus de tumors són resistents a tot tipus de teràpies. Antigament s'intentava extirpar una part del cervell intentant eliminar tot el tumor però la capacitat disseminant del tumor fa que aquest pugui ressorgir (fig. 3). En el 95% del casos de extirpació de tumors de alt grau, el tumor es torna a manifestar a uns 2-3 centímetres de la cavitat de resorció.<sup>4,7</sup>

Per tant s'ha intentat combinar la cirurgia amb altres tractaments com la radioteràpia i la quimioteràpia. La cirurgia resulta més efectiva combinada amb la radioteràpia a l'hora de reduir la mida del tumor però en molts casos no es suficient. La quimioteràpia en canvi només serveix per eradicar els oligodendrogliomes i no suposa un gran avanç en el tractament dels altres tipus de gliomes.<sup>4,7</sup>





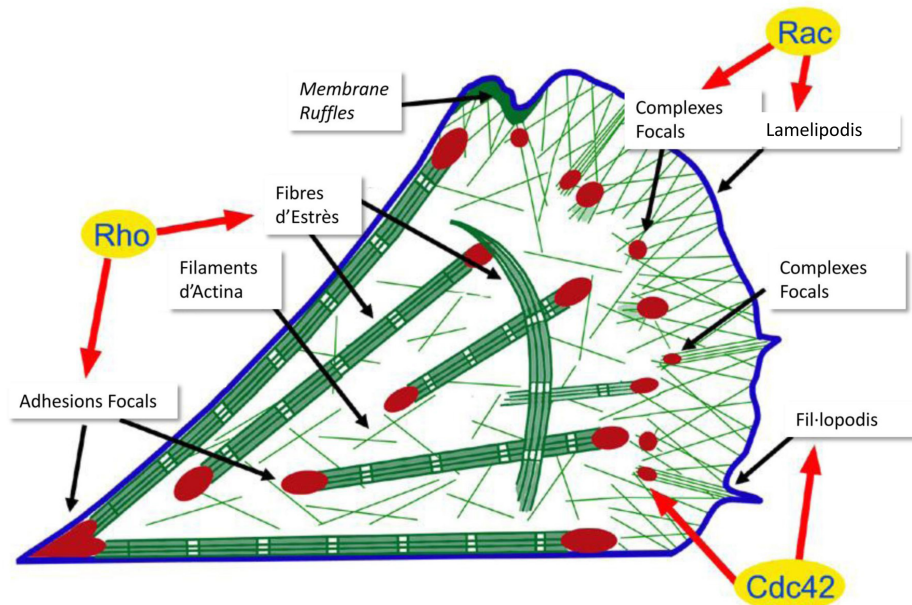
**Figura 3:** Imatges de glioblastoma en el nucli temporal per ressonància magnètica nuclear. (A): Imatge del preoperatori, s'observa una massa de distinta densitat identificada com un tumor; (B): Zona de la resorció, ja no s'observa cap indicati de tumor; (C): 4 mesos després de la cirurgia, reaparició del tumor; (D): Zona de resorció de la segona operació; (E) i (F): 3 mesos després de la operació, reaparició del tumor.<sup>4</sup>

### Rho GTPases

La família Rho de GTPases pertany a la superfamília Ras i es troben en tots els eucariotes. El gen Ras va ser descobert com l'oncogen v-Ras en el virus del Sarcoma de Rous en el 1980. Es coneixen més de 130 membres de la superfamília Ras entre el que s'inclouen Ras, Rho, Arf/Sar1 i Rab/Ran. Participen en multitud de processos cel·lulars, principalment en la regulació dinàmica del citoesquelet.<sup>1,15</sup>

Són monòmers de baix pes molecular i es coneixen a mamífers uns 20 membres de la família Rho, aquestes al mateix temps estan subdividits en subfamílies incloent Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RhoD, RhoF, RhoH i RhoBTB.<sup>1</sup>

Les Rho GTPases són petites molècules que s'uneixen a GTP, per tant proteïnes G de entre 20-40 KDa. Els tres membres més ben caracteritzats i estudiats de la família Rho són RhoA, Rac i Cdc 42. Inicialment es va pensar que aquestes proteïnes regulaven la formació dels filaments d'actina-miosina formant lamelipodis i fil·lopodis. En estudis més recents, s'ha vist que aquesta visió es molt simplista, ja que aquestes molècules poden interactuar amb moltes altres vies.<sup>1</sup>



**Figura 3:** Esquema de la participació de Rho, Rac i Cdc42 en la estructura del citoesquelet d'actina. Es mostren les estructures que es formen com els lamelipodis, fil·lopodis i fibres d'estress. Extreta i modificada de <sup>16</sup>

### Rho, Rac, Cdc42

La proteïna *Cell Division Control protein 42 Homolog* (Cdc42) induïx la polimerització d'actina generant els fil·lopodis a través de la l'activació de proteïnes de la família WASp. Per un altre costat trobem a Rac que promou la polimerització d'actina en la perifèria cel·lular formant lamelipodis o plecs a la membrana gràcies a la *p21 activated kinase* (PAK), tot això afavorint la migració i motilitat cel·lular. A part la proteïna Rho provoca la formació de fibres d'estress, que no són més que l'empaquetament de la actina amb els filament de miosina II juntament amb integrines que generen adhesions focals disminuint la capacitat motriu de la cel·lula. Rho activa ROCK que es una quinasa que fosforila la cadena lleugera de miosina (MLC) desencadenant el procés. <sup>1,12,17</sup>

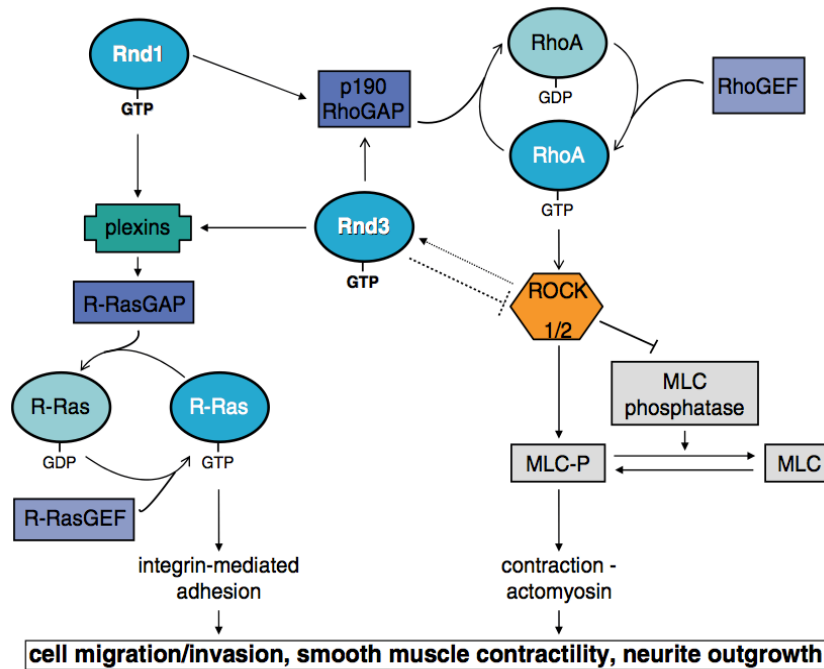
En els tumors com per exemple els gliomes, es troben molt activades les vies de Cdc42 i Rac a través de la sobre activació de EGFR provocant una gran invasió d'aquestes cèl·lules. <sup>1</sup>

### Regulació de Rho

La majoria de les Rho GTPases són regulades a través de l'intercanvi d'un nucleòtid de guanina passant de la forma inactiva unida a GDP a la forma activa amb GTP. La activació es estimulada a través dels factors d'intercanvi de nucleòtids de guanina (GEFs) i inhibida per les proteïnes activadores de GTPases (GAPs). Però la família inclou distints membres que estan constitutivament

units a GTP i no l'hidrolitzen, ja que els falten aminoàcids del centre catalític GTPasa, per tant segueixen un altre sistema de regulació. Aquests membres són sis: Rnd1, Rnd2, Rnd3 (RhoE), RhoH, RhoBTB1 i RhoBTB2.<sup>15,17,18</sup>

La majoria de les Rho GTPases són modificades en l'extrem C-terminal amb un grup prenil que afavoreix la seva interacció amb les membranes. Mentre Rho sembla ser també citoplasmàtica.<sup>17</sup>



**Figura 3:** Esquema de les interaccions entre RhoA, ROCK, Rnd1 i Rnd3 (RhoE) a l'hora de regular el citoesquelet d'actina i la adhesió per integrines.<sup>19</sup>

Rnd1 i RhoE se'ls hi ha determinat una acció oposada a RhoA evitant la formació de fibres d'estrès, també s'ha observat la participació de RhoE en la regulació del cycle cel·lular.<sup>17</sup>

RhoE es pot regular a diversos nivells. Com a resposta davant d'estrès p53 es pot unir al promotor de RhoE i activar la seva transcripció. A més també s'activa a través del receptor d'estradiol, el NFκB i mTOR així com altres factors. L'altre mecanisme és a través de la fosforilació de certes serines de RhoE a través de la activació de quinases com ROCK i PKCα activats per PDGF. RhoE al ser fosforilat es separa de la membrana plasmàtica i viatja al citosol on fa la seva funció o es degradat per el proteosoma. ROCK pot ser inhibit per PDK1 al competir amb RhoE evitant que aquest es fosforili.<sup>17,18,20-22</sup>

## **Funcions de RhoE**

Com ja s'ha dit anteriorment, RhoA afavoreix la aparició de fibres d'estrès al induir a la serin/treonin quinasa ROCK. Aquesta quinasa fosforila la MLC afavorint la contracció de l'actina i miosina i a més inhibeix la fosfatasa de MLC augmentant la proporció de MLC-P.<sup>17,20</sup>

En aquest procés RhoE participa inhibint a ROCK evitant la formació de fibres d'estrès. A més activa a la p190 RhoGAP que augmenta la activitat GTPasa de RhoA desactivant-la i en conseqüència reduint la activació de ROCK.<sup>17,18,23</sup>

A més RhoE s'uneix a les plexines activant la GAP de R-Ras desactivant-la tot provocant un descens en el nombre de adhesions on participen les integrines.<sup>19</sup>

En la regulació del cicle cel·lular, RhoE també presenta certa rellevància ja que esta involucrada en la activació de la fosfatasa PP2A que s'encarrega de desfosforilar el factor E4BP1. Aquest es un inhibidor del factor d'iniciació eIF4E, per tant quan E4BP1 esta fosforilat, eIF4E permet la transcripció de factors necessaris per la progressió del cicle cel·lular. Per tant RhoE, en concentracions elevades es un inhibidor de la progressió del cicle cel·lular.<sup>1,19</sup>

## **Rellevància de RhoE i hipòtesi**

Com ja s'ha dit, RhoE participa en la regulació del citoesquelet d'actina evitant la formació de fibres d'estrès al inhibir a ROCK. Per això es de vital importància per tal de entendre el funcionament de la invasió en gliomes poder veure quins efectes té exactament RhoE en aquest procés.

Per això aquí es planteja que si es pogués eliminar de forma significativa RhoE, es podria aconseguir que desaparegués la inhibició de ROCK així com la inhibició de RhoA i es produiria la fosforilació de la MLC arribant a la generació de fibres d'estrès.

## **Objectius**

En aquest treball es pretén analitzar la funció de RhoE a través de la seva depleció total o parcial mitjançant tècniques de manipulació dels nivells de RNA missatger. Això es produirà emprant RNA de interferència o shRNA damunt línies de glioma. Tot seguit s'haurà d'analitzar el citoesquelet d'actina a través d'un anàlisi estructural i per últim s'han de realitzar assajos de motilitat per confirmar si aquests canvis en el citoesquelet d'actina i formació de fibres d'estrès afecten a la capacitat invasiva dels glioblastomes.

## Materials i mètodes

### Línia cel·lular

S'ha utilitzat la línia U87MG, una línia cel·lular de glioma obtinguda d'un pacient de 44 anys.

### Cultius cel·lulars

El cultiu de les cèl·lules s'ha fet exclusivament en cabina de bioseguretat de nivell II. El medi de cultiu emprat ha estat DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Sigma-Aldrich®): 4500mg glucosa/l, 110mg de piruvat sòdic/l i amb L-glutamina. Suplementat amb un 10% de sèrum boví inactivat, penicil·lina, estreptomina i plasmocin® (InvivoGen®).

Les cèl·lules s'ha mantingut en incubador humit a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> i 96% d'humitat.

### Transfecció

Per poder introduir dins la cèl·lula els siRNA i plasmidis es van realitzar transfeccions emprant un producte comercial anomenat lipofectamina (Invitrogen®).

Per realitzar la transfecció s'ha de preparar una MIX amb tots els components necessaris. Les quantitats de cada component venen determinades per el rati entre el DNA (o RNA) i la lipofectamina que es:  $x \text{ ul Lipofectamina} = 2.5x \text{ ug DNA (o RNA)}$ . Aquestes quantitats van dissoltes dins OPTI-MEM (Invitrogen®).

La transfecció es va realitzar en placa de 6 pous, per tant a cada pou es posaven 500ul de MIX i s'afegien les cèl·lules. En aquest cas es varen posar 300.000 cèl·lules per pou per poder tenir una elevada confluència. Al final s'ajusta el volum de cada pou a 2ml amb el DMEM emprat normalment però sense suplementar amb penicil·lina i estreptomina. A les 24 hores es realitzà un canvi de medi amb DMEM complet.

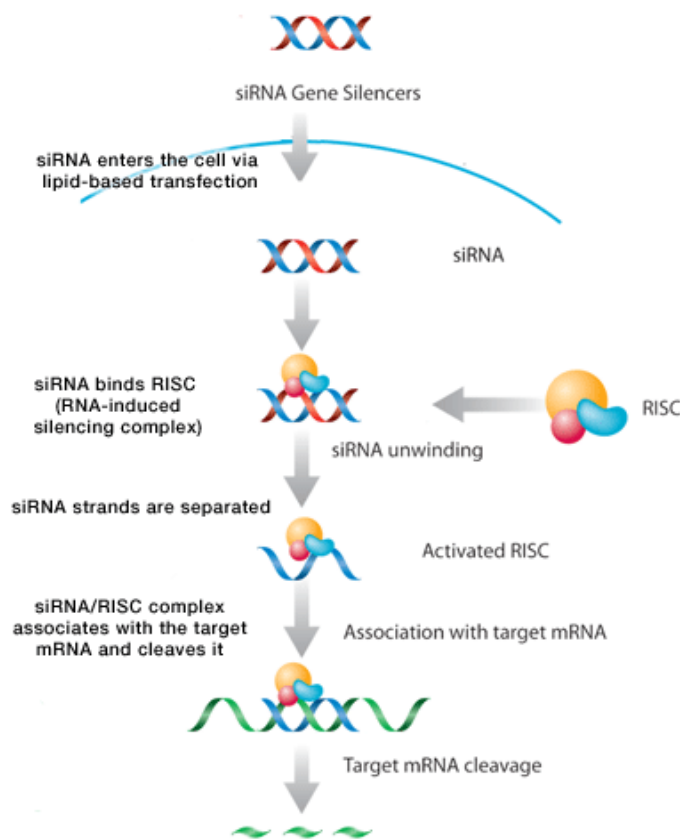
Aquest mètode esta basat en la utilització de lípids catiónics que es conjuguen amb el RNA o DNA que es vulgui transfectar. Tot seguit es suficient introduir la mescla dins el medi amb les cèl·lules en estat de quasi confluència i esperar el temps establert.

## Transfecció siRNA

Es va utilitzar un conjunt d'oligonucleòtids de RNA de interferència de RhoE (Thermo scientific® Smartpool) que forma un complexa RNA-proteïna que degrada el RNA complementari de la cèl·lula.

A l'hora de transfectar amb siRNA es va tenir en compte la seva concentració, 50uM. la MIX a preparar va ser la següent: 500ul d'OPTI-MEM amb 10ul de lipofectamina i 4ul de siRNA.

Amb això aconseguim que el siRNA pugui entrar dins la cèl·lula i pugui realitzar la seva funció i bloquejar la expressió d'una determinada proteïna. (fig. 4)



**Figura 4:** Esquema de l'efecte que té l'entrada d'un RNA de cadena doble (dsRNA) dins la cèl·lula. El siRNA forma una complexa amb RISC (RNA-induced silencing complex), aquest separa les dues cadenes de siRNA i per complementarietat s'uneix al mRNA endogen i provoca la seva degradació. Extreta de <sup>24</sup>

L'efecte del siRNA es comença a apreciar quan la proteïna es degrada i no es pot resintetitzar. El siRNA té efecte fins que sigui totalment degradat i això aproximadament s'estén de forma significativa fins les 96 hores.

## Transfecció amb plasmidis

Es van emprar un conjunt de plasmidis que generen un RNA "shorthairpin" que s'uneix i promou la degradació del RNA. Aquests plasmidis són integratius, per tant s'inserten dins el DNA de la cèl·lula i per aquest motiu s'obtenen clons estables que repliquen el plasmidi.

Es va utilitzar el mateix sistema i procediment que amb els siRNAs, però en aquest cas es varen transfectar plasmidis.

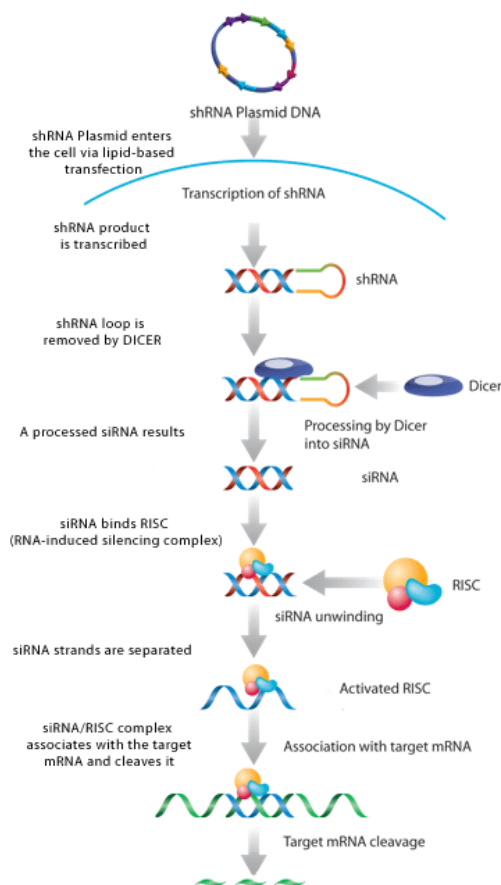
Els plasmidis eren els 303, 305, 713, 715, 717 Mission® shRNA (Sigma-Aldrich®)

Per tant es va tenir en compte la concentració de tots el plasmidis per transfectar 2ug DNA per pou (taula 1). Es varen transfectar els plasmidis per separat i es varen realitzar les combinacions 303/713 i 303/715.

Nom del plasmidi	Concentració de DNA	Volum emprat
303	1,28mg/dl	1,56ul
305	1,74mg/dl	1,15ul
713	1,2mg/dl	1,66ul
715	1,12mg/dl	1,79ul
717	1,39mg/dl	1,44ul

**Taula 1:** Concentracions de DNA de cada stock dels plasmidis i el volum emprat per tal de transfectar 2ug de DNA per pou.

El plasmidi al introduir-se dins la cèl·lula es linealitzava i s'integra dins el genoma i per tant es replicat contínuament. L'expressió del plasmidi produeix un shRNA (shorthairpin RNA) que provoca la degradació del RNA cel·lular desitjat. (fig. 5)



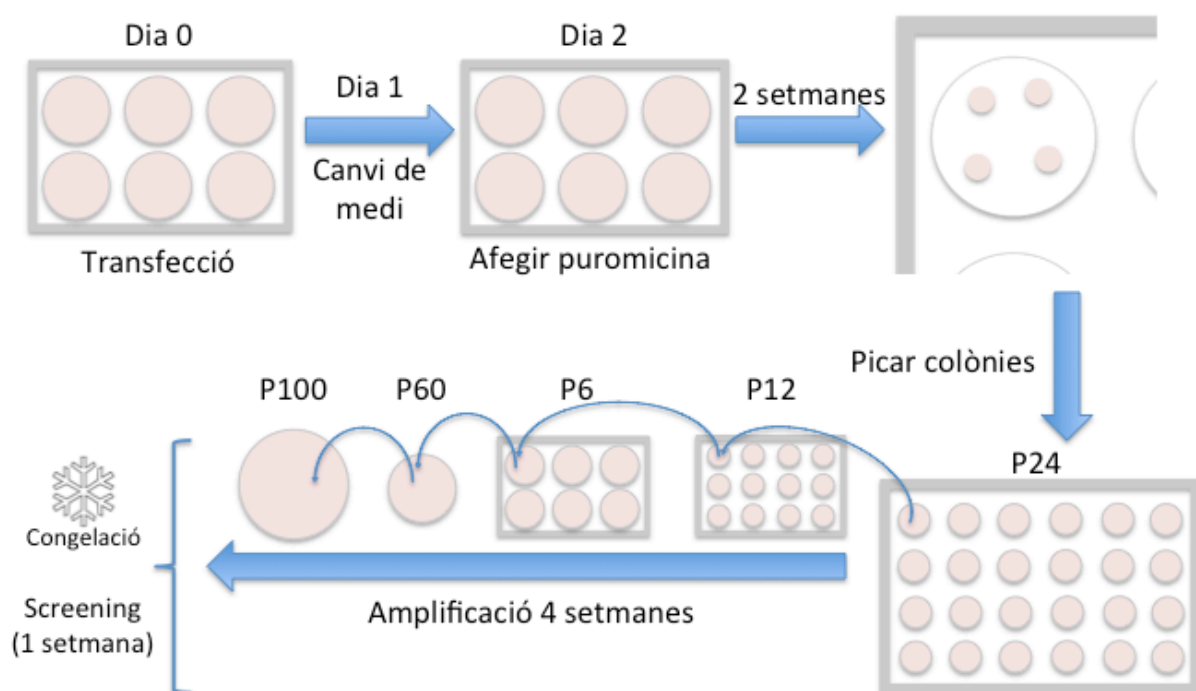
**Figura 5:** Esquema de l'entrada d'un plasmidi codificant per un shRNA. Quan el shRNA es transcrit, una proteïna anomenada DICER el processa i elimina un loop de la seva estructura, en conseqüència es genera un siRNA que forma un complex amb RISC (RNA-induced silencing complex), aquest separa les dues

cadena de siRNA i per complementarietat s'uneix al mRNA endogen i provoca la seva degradació. Extreia de <sup>24</sup>

Després d'haver-se produït la transfecció, s'han de seleccionar els clons que hagin incorporat correctament el plasmidi.

En aquest cas, s'ha emprat puromicina, un antibiòtic capaç de matar les cèl·lules eucariotes. Els plasmidis porten incorporat a la seva seqüència un gen de resistència a la puromicina que s'expressa constitutivament. A les 48 hores post-transfecció es va incorporar puromicina al medi a una concentració de 10ug/ml i les cèl·lules que no van incorporar el plasmidi van morir realitzant una selecció positiva.

Les cèl·lules que sobreviuen queden aïllades i s'ha de esperar que es divideixin fins formar colònies. Tot seguit aquestes colònies són capturades a través d'uns discs de clonatge (Invitrogen®). Els discs són banyats en tripsina i col·locats damunt les colònies. Es fa el procés de tripsinització, quedant les cèl·lules al disc de clonatge. Llavors transferim els discs a plaques de 24 pous posant 1 disc per pou amb medi més puromicina a la concentració abans determinada per aconseguir l'amplificació de cada clon, o en el cas de que no sigui possible aïllar-los, es van generar línies policlonals (PC) de cada plasmidi.



Temps total → 8 setmanes

**Figura 6:** Esquema de la producció dels clons RhoE *knockdown* estables. Està representat cada passa i els temps transcorregut entre elles.



En el cas de les cèl·lules transfectades amb el plasmidi, per mantenir-lo integrat en el genoma, les cèl·lules es varen cultivar en presència de 1 ug/ml de puromicina.

### **Lisat cel·lular**

Per poder analitzar l'expressió proteica de les cèl·lules, primer hem d'obtenir les proteïnes que contenen a través de la seva lisis controlada.

1. Recollim les cèl·lules d'una placa p100 casi confluent. Tripsinitzem la placa i posem les cèl·lules en eppendorfs i centrifuguem 5min a 1750rpm.
2. Aspiram el sobrenadant (SN) i rentam el pellet amb PBS 1X. Tornam a centrifugar 5min a 1750rpm
3. Aspiram el SN i lisam el pellet cel·lular introduint 50ul de tampó de lisis (Tris 50mM pH4, NaCl 150mM, EDTA 1mM, Tritón X-100 1%, aigua, Complete Mini protease inhibitor cocktail (Roche®), inhibidor de fosfatases  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , NaF, beta-glicerofosfat, PMSF 1mM), deixant que actuï 5min en gel.
4. Centrifugació de 10min a 14000rpm per tal de purificar la fracció proteica, quedant el DNA i la fracció lipídica al pellet. Transferim el SN a tubs nous.
5. Quantificam la concentració de proteïna de totes les mostres obtingudes amb el mètode de Bradford amb el reactiu Bio-Rad® protein Assay
6. Preparam la mostra en sample buffer 4x (Tris HCl 50mM pH 6.8, Glicerol 10% (v/v), SDS 2.5%, beta-mercaptoetanol 5% (v/v), bromophenol blue, Aigua) per tenir 40ug de proteïna en cada mostra.

### **Western blot**

Per comprovar el descens de l'expressió de RhoE tant amb els siRNA com amb els plasmidis es va emprar el western blot.

Es va realitzar una electroforesi SDS-PAGE amb les proteïnes extretes de les transfeccions i separar-les per pes molecular. El pes molecular de RhoE és de 29 KDa per això es va emprar un gel del 12% de poliacrilamida per tal de fer una separació adequada.

Les mostres varen ser preparades amb tampó de mostra com esta establert i es va córrer el gel a 120V durant una hora. Després es realitzà la transferència a una membrana de polifluorur de vinilidè

(PVDF) mitjançant el Trans-blot Turbo® (BioRad®). Tot seguit la membrana es bloquejà amb Odyssey Blocking Buffer (Li-cor bioscience®) i s'incubà amb l'anticòs primari anti-RhoE (Cell Signaling®) amb una dilució 1:1000 o anti-tubulina (Sigma-Aldrich®) a 1:5000 com a control de càrrega, incubant 24 hores a 4°C en agitació contínua.

Després es realitzaren una sèrie de rentats amb PBS-T i PBS i s'incubà amb l'anticòs secundari, en el cas de RhoE Donkey anti-mouse-IRDye 680 1:1000 i per la tubulina Donkey anti-mouse-IRDye 680 1:10000 (Li-cor bioscience®) durant 1 hora a Temperatura ambient.

La membrana es revelada amb l'escaner d'infrarojos Odyssey (Li-cor bioscience®)

### **Immunofluorescència**

Tècnica emprada per marcar algun component cel·lular i poder observar-lo al microscopi. Concretament s'ha emprat per analitzar l'estructura del citoesquelet d'actina.

En primer lloc es varen sembrar 30.000 cèl·lules per pou en plaques de 6 pous on prèviament s'havien col·locat dos cobreobjectes (Sarstedt®).

Després de 24 hores es du a terme el protocol de la immunofluorescència.

1. Aspiració del medi i rentats amb PBS 1X
2. Fixació de les cèl·lules amb formaldehid 4% en PBS 30 min
3. Rentats amb PBS 1x
4. Permeabilització amb tritó x-100 0.2% 20 min
5. Rentats amb PBS 1x
6. Incubació amb una solució de fal·loïdina-TRITC (1:250) (Sigma-Aldrich®) i DAPI (1:500) (Invitrogen®) en BSA al 0.5% en PBS durant 1 hora a 37°C. Aquesta passa es fa en obscuritat per evitar pèrdua de fluorescència.
7. Rentats amb PBS 1x
8. Muntatge amb Mounting media (Dako®) sobre portaobjectes.

### **Microscopi confocal**

Per analitzar els resultats de les immunofluorescències es va emprar el microscopi confocal LEICA TS-SPE (Leica®) utilitzant el làser ultraviolat per analitzar el DAPI i el làser d'argó de 532nm de longitud d'ona per analitzar la fal·loïdina.

**Wound healing Assay**

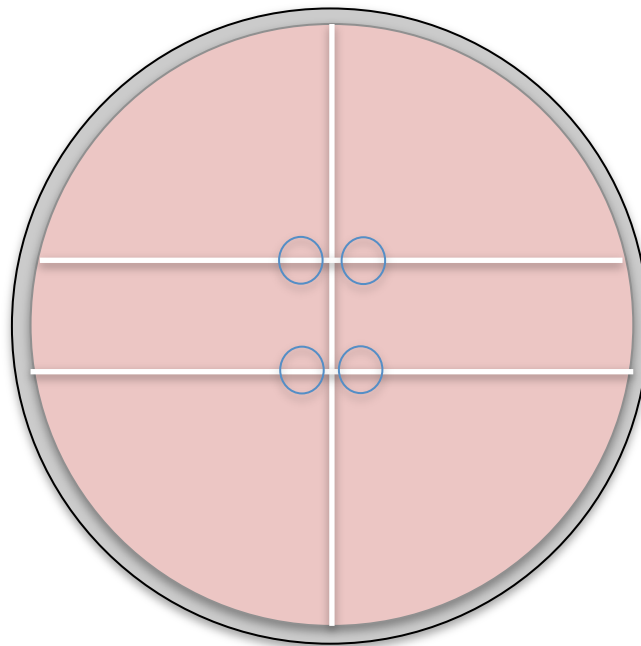
Aquest assaig serveix per quantificar la motilitat de les cèl·lules.

En primer lloc, es sembren 300.000 cèl·lules en pous de una placa de 6 pous. És necessari que les cèl·lules estiguin adherides per tal de realitzar l'experiment, per això s'han de esperar entre 2-6 hores abans de fer la marca.

En haver transcorregut el temps, emprant un material prim i resistent, en aquest cas una punta de pipeta, es procedeix a realitzar una sèrie de marques o "ferides" damunt la monocapa de cèl·lules generant un carril on amb el microscopi no s'observen cèl·lules.

En haver fet les marques s'han de enregistrar imatges d'aquest moment, a les 0 hores. Després per observar els resultats es realitzaran més fotografies a les 16 hores en els mateixos llocs on es varen realitzar les primeres.

Per tal de localitzar els mateixos lloc on es varen fer les fotografies, les marques es fan seguint un ordre. Es realitza una marca vertical i dues horitzontals, tal com indica la figura 7. Les imatges s'adquireixen en els punts de intersecció, així després del temps d'espera, es més senzill fer la fotografia en el mateix punt.



**Figura 7:** Esquema de la realització de l'assaig de motilitat *wound healing*. Les línies verticals i horitzontals representen les marques que es fan a la placa. Els cercles representen les zones on es fan les fotografies.

## Resultats

### Generació de línies de glioma *knockdown* estables per a RhoE

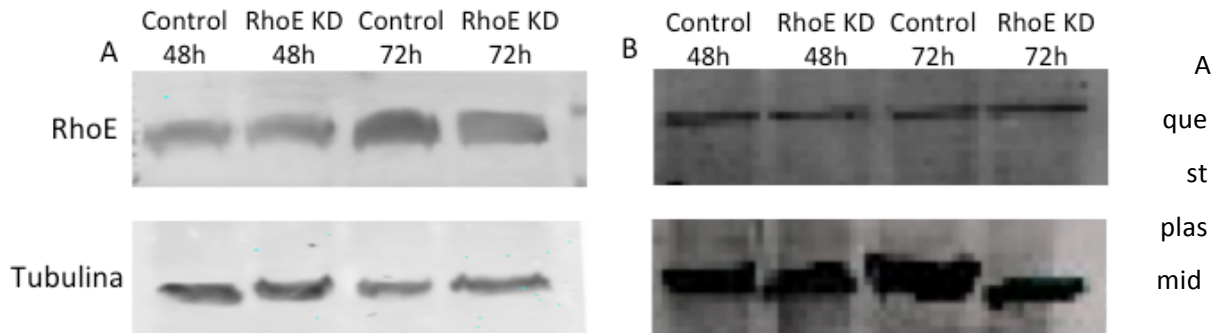
Per tal d'analitzar la funció que té RhoE en el citoesquelet d'actina es van intentar reduir la quantitat de RNA missatger (mRNA) de RhoE i així aconseguir una reducció significativa de la seva expressió.

En un primer moment, per realitzar la depleció de RhoE es va fer la transfecció d'oligonucleòtids que al entrar dins la cèl·lula s'uneixen al complex RISC (RNA-induced silencing complex) que separa les dues cadenes de siRNA transfectades. Tot seguit el complexa siRNA-RISC s'uneix per complementarietat amb el mRNA de RhoE i el romp en distints fragments (fig. 4). Així s'aconsegueix una reducció temporal del nombre de mRNA missatgers funcional. L'efecte en teoria s'allarga varis dies, fins que tot el siRNA transfectat desapareix.

D'aquesta manera els nivells de mRNA de RhoE són reduïts de forma dràstica. Els efectes es poden observar a distints temps ja que per tenir nivells baixos de proteïna s'ha d'esperar que aquesta es degradi. Per tant al eliminar el mRNA s'haurà de esperar entre 24 i 72 hores a observar canvis en la quantitat de proteïna i els experiments funcionals es realitzaran en aquest període de temps.

Per demostrar que la depleció es va realitzar amb èxit es va procedir a fer un western blot tenint com a objectiu RhoE. Es varen realitzar dos intents per tal de deplecionar RhoE mitjançant siRNAs, però en cap dels dos casos es va observar una reducció de l'expressió de la proteïna (Fig. 8)

Al no detectar cap baixada en l'expressió de la proteïna mitjançant la utilització de siRNAs, es va optar per un canvi de estratègia i es va intentar a través de la generació de línies *knockdown* estables per RhoE. Això es va realitzar emprant uns plasmidis que codificaven per un shRNA que acabava realitzant una funció similar als siRNAs i degradaven el RNA missatger de RhoE, però amb la diferència que la reducció de la expressió de la proteïna es perllonga al llarg del temps ja que es va transfectar un plasmidi integratiu.



**Figura 8:** Imatges dels Western blot realitzats per determinar l'expressió de RhoE, a 48 o 72 hores post-transfecció amb siRNAs complementaris al mRNA de RhoE. És va emprar com a control de càrrega la beta-tubulina. RhoE *knockdown* (RhoE KD).

i a més confereix resistència a la puromicina. Quan la transfecció es va realitzar, es va afegir puromicina al medi de cultiu, per el que la majoria de cèl·lules varen morir. Només les que varen incorporar adequadament el plasmidi en el seu genoma podien sobreviure en un medi amb una elevada concentració de puromicina (1mM). En definitiva això provoca que al final tinguem un conjunt de cèl·lules resistents a la puromicina, i que per tant transcriuen part del plasmidi i que potencialment poden haver suprimit la expressió de RhoE.

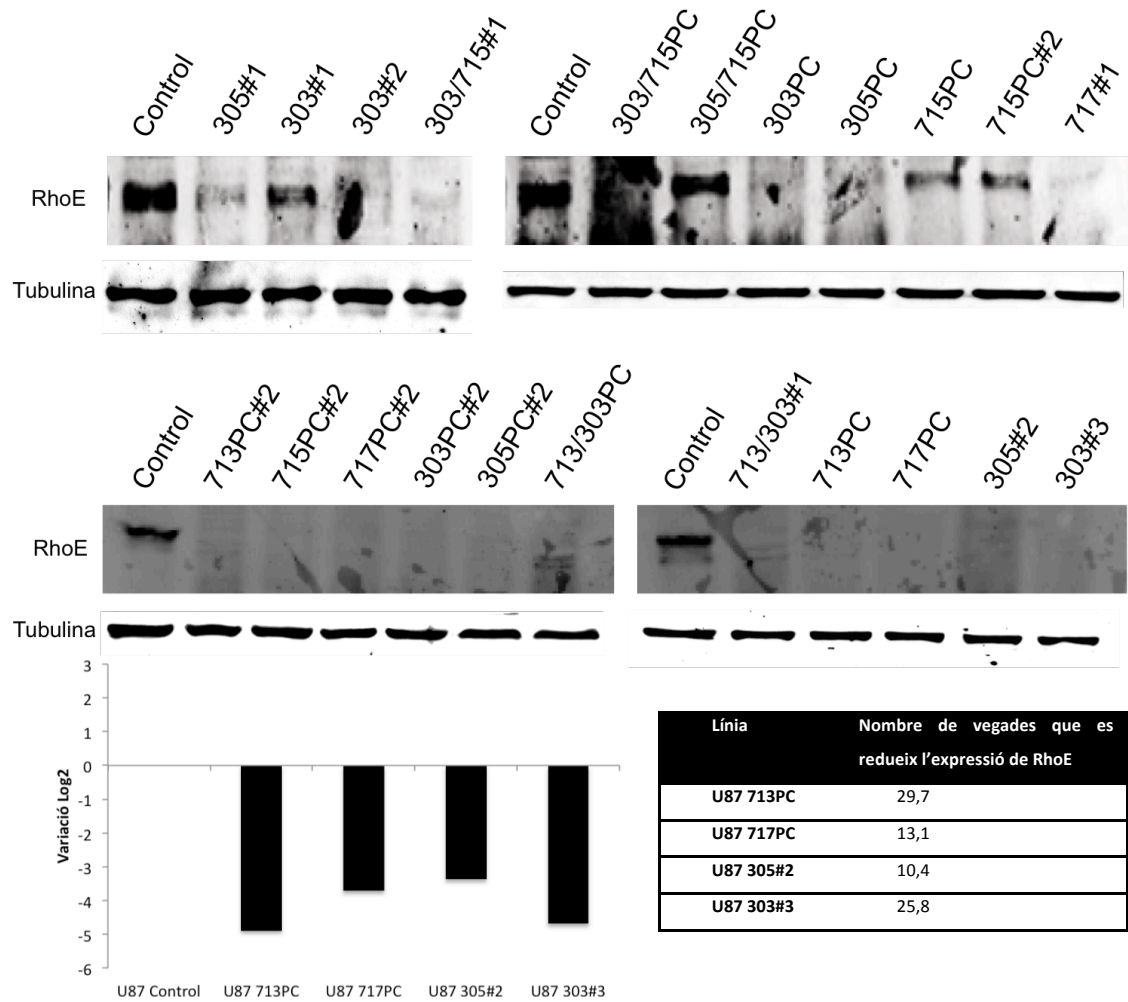
Després, les cèl·lules es van separar i expandir per separat, aconseguint distints clons amb el mateix plasmidi, fent que obtinguéssim una gran varietat de línies cel·lulars que en principi no expressen RhoE (fig. 6)

Els plasmidis emprats varen ser els 303, 305, 713, 715 i 717 Mission® shRNA (Sigma-Aldrich®) i després de la selecció vàrem obtenir les línies mostrades a la taula 2.

De tots aquests clons, els que ens varen interessar, es va realitzar una sèrie de westerns blots (fig. 9) per tal de comprovar si efectivament, apart d'adquirir resistència a la puromicina també transcrivien el shRNA i reduïen l'expressió de RhoE.

<b>Línies generades resistents a puromicina</b>	<b>32</b>
<b>Policlonals</b>	14
<b>Monoclonals</b>	18
<b>Línies analitzades per western blot</b>	22
<b>Línies analitzades amb una òptima depleció</b>	15
<b>Taxa d'èxit</b>	68
	%
<b>Línies emprades en experiments funcionals</b>	4

**Taula 2:** Nombre de línies generades i emprades per els distints experiments.



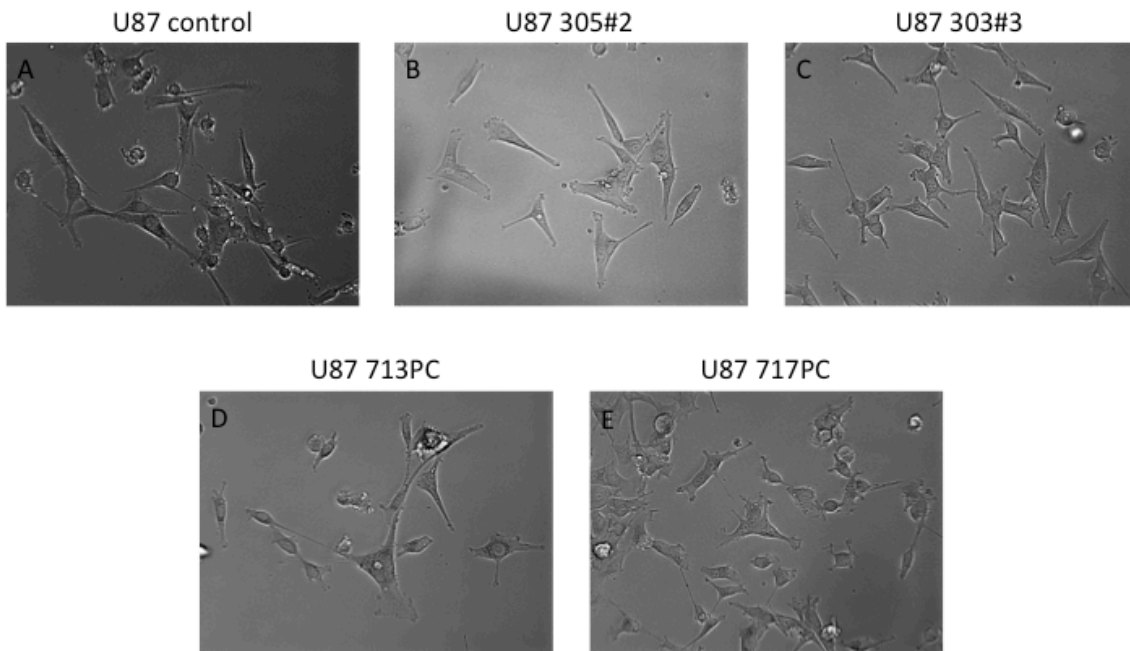
**Figura 9:** Imatges dels Western blot realitzats per determinar l'expressió de RhoE de diversos clons transfectats amb els plasmidis. Es va emprar com a control de càrrega la beta-tubulina. Les imatges inferiors representen la baixada d'expressió dels clons seleccionats respecte el control en log<sub>2</sub> i en nombre de vegades que es redueix l'expressió.

Els clons que mostren una reducció evident són nombrosos, per això a l'hora de realitzar els experiments funcionals es varen utilitzar 4: 713PC, 717PC, 305#2 i 303#3.

Per poder conèixer l'efectivitat de la reducció de l'expressió de RhoE, es va realitzar la quantificació de les bandes del western blot dels clons seleccionats (fig. 9 inferior).

### Una reducció important dels nivells de RhoE provoca un canvi de morfologia així com canvis en el citoesquelet d'actina

Al haver confirmat que tenim clons amb una reducció de RhoE, vàrem passar a analitzar distints aspectes que poden veure's afectats per aquesta proteïna.



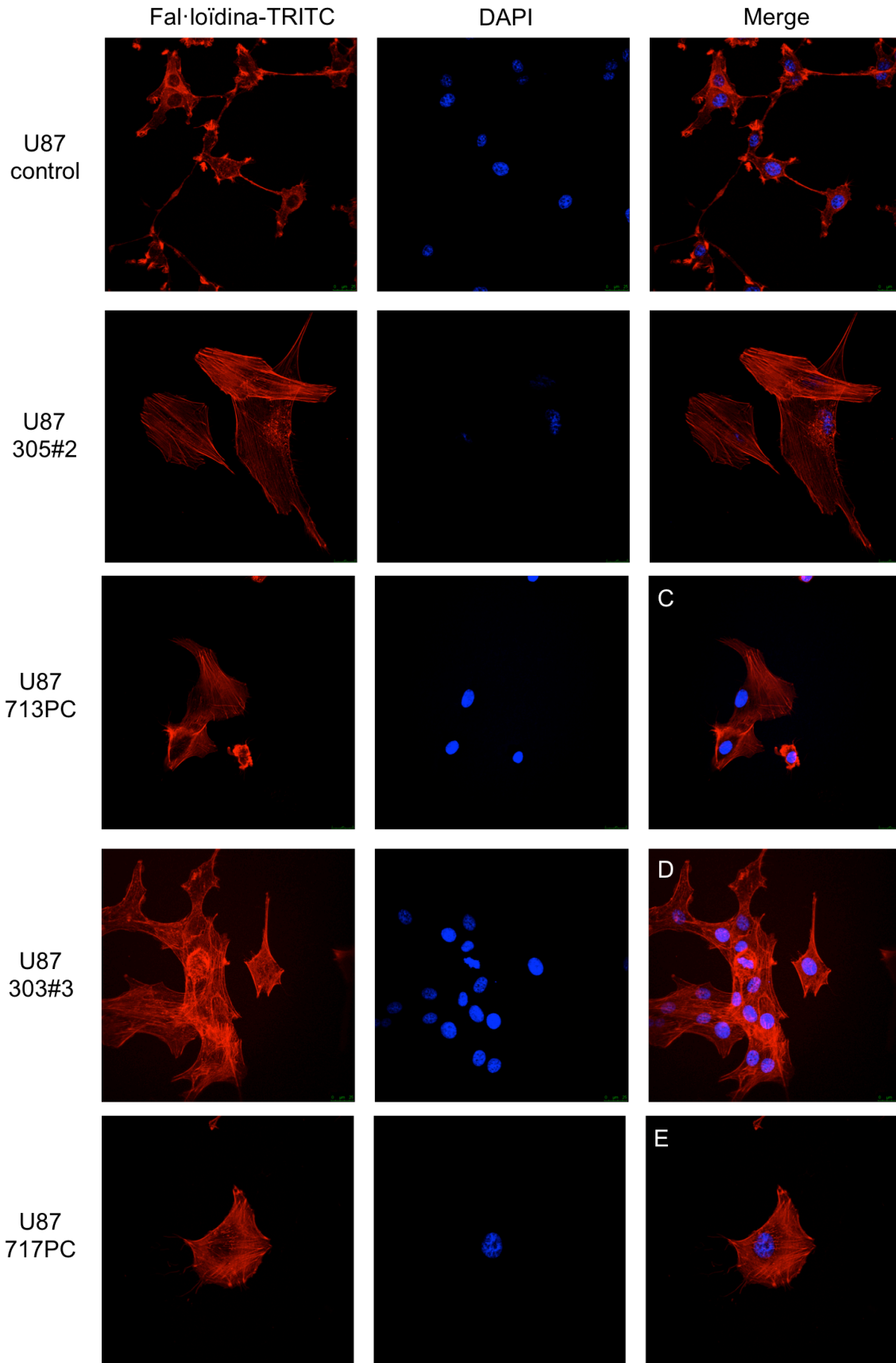
**Figura 10:** Imatges captades al microscopi òptic de cèl·lules U87 control i dels distints clons seleccionats (305#2; 303#3; 713PC; 717PC). Tots les imatges estan captades amb l'objectiu 20x.

El primer que es va analitzar va ser la morfologia de la cèl·lula a simple vista a través del microscopi comparades amb les cèl·lules control.

Les cèl·lules U87MG tenen morfologia semblant a fibroblasts i al provenir de astròcits presenten característiques típiques d'aquest tipus cel·lular. Les U87 són cèl·lules relativament petites i molt heterogènies morfològicament però de forma freqüent presenten llargues extensions que poden arribar a connectar amb altres cèl·lules (fig. 10A).

En canvi les cèl·lules que presenten un reducció important en la expressió de RhoE, semblen més aplanades mostrant una mida major i menors protuberàncies (fig. 10B-E).

La següent passa, era cercar per quin motiu esta causat aquest canvi de morfologia, per això es va procedir amb l'anàlisi de l'estructura del citoesquelet d'actina mitjançant microscopia confocal. Ja que ha estat documentada la participació de RhoE en la organització del citoesquelet d'actina es va voler determinar l'efecte que hi té la falta de RhoE.



**Figura 11:** Imatges d'immunofluorescència on s'analitza la organització del citoesquelet d'actina. La imatge es presnetja a través de tres canals: El de l'esquerra es representa la actina mostrant la fal·loïdina-TRITC, en el del centre el nucli mostrant el DAPI i en el de la dreta una superposició dels altres dos canals, el merge.



Per això es va realitzar una immunofluorescència de tots els clons seleccionats. El que es pretenia trobar era la formació de fibres d'estrès d'actina ja que RhoE està implicada en aquest procés a través de la fosforilació de les cadenes lleugeres de miosina causada per ROCK.

Les cèl·lules U87 control, mostren una organització perifèrica de l'actina generant fil·lopodis i lamelipodis augmentant així la motilitat cel·lular i per tant la capacitat invasiva (fig. 11A). En canvi els clons analitzats, que ja mostraven certes diferències en la morfologia al microscopi òptic també mostren diferències clares en la organització del citoesquelet (fig. 11B-E).

Els efectes de la disminució de RhoE en quant a la organització del citoesquelet d'actina són evidents amb una gran formació de fibres d'estrès per tota la cèl·lula.

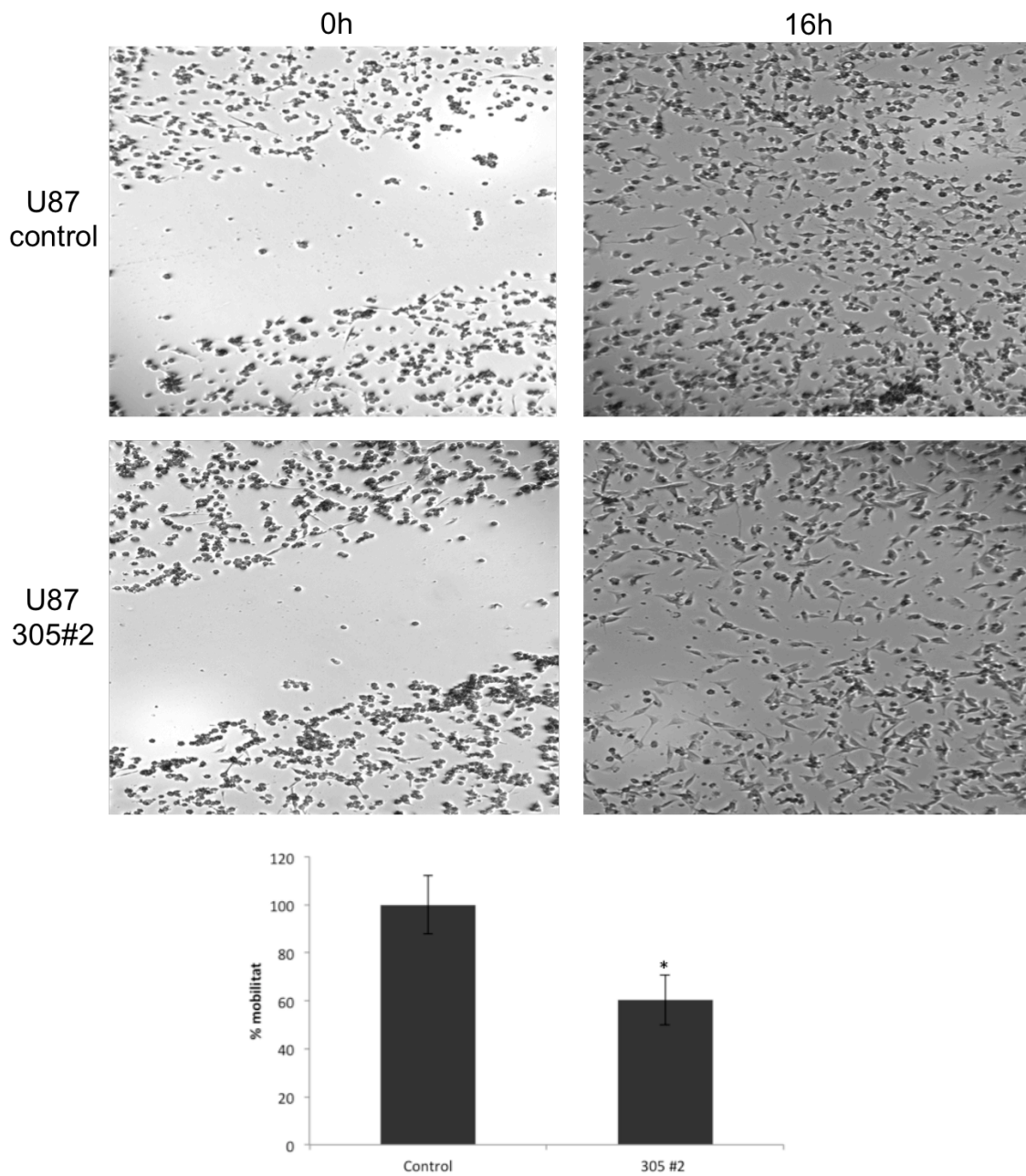
En les cèl·lules amb nivells disminuïts de RhoE no mostren acumulacions d'actina a la perifèria de la cèl·lula, per tant menys presència de lamelipodis i fil·lopodis.

Els clons que respecte del control mostren una morfologia més aplanada i amb major nombre de fibres d'estrès són el 305#2 i són els emprats per les proves de motilitat.

### **Un canvi de morfologia i un major nombre de fibres d'estrès provoquen una disminució de la motilitat en glioblastoma.**

Com indiquen les nostres evidències en quant a la estructura del citoesquelet d'actina, un dèficit en RhoE provoca un augment de les fibres d'estrès i això podria afectar a la motilitat de la cèl·lula, ja que aquestes no afavoreixen la motilitat cel·lular, afavoreixen l'adhesió al substrat mitjançant contactes focals.

Per això una vegada observat un canvi en la morfologia de la cèl·lula, volíem saber si aquest canvi també podia afectar a la capacitat de migració del glioblastoma, per això vàrem realitzar un assaig de motilitat tipus *wound healing*. Aquest només el vàrem realitzar amb el clon que semblava presentar un major nombre de fibres d'estrès, el 305#2, i així poder observar millor l'efecte damunt la motilitat cel·lular.



**Figura 12:** Imatges d'una assaig de motilitat *wound healing*. Estan representades les imatges de U87 control i 305#2 a les 0 hores i a les 16 hores. Es varen captar 4 imatges de cada línia i es va calcular la mitja del nombre de cèl·lules que apareixen al centre de la imatge mostrant la capacitat mòbil de les cèl·lules de les 4 imatges. \*: p-valor<0.05 emprant el test t de student.

Després de esperar les 16 hores establertes, es varen captar imatges en els mateixos punts que en el moment de fer la “ferida” intentant tenir una sèrie de imatges representatives. En el cas de les U87 control, la ferida es trobava pràcticament tancada amb alta motilitat cel·lular,

com ja es coneix (fig. 12). En canvi en el cas de les cèl·lules amb l'expressió de RhoE disminuïda, la motilitat ha estat un poc menor, ja que la densitat cel·lular en la zona de la ferida, 16 hores després, es lleugerament menor.

A l'hora de realitzar una anàlisi més exhaustiu de la imatge, es varen contar les cèl·lules dins la ferida en el temps 0 i a les 16 hores, per calcular la quantitat de cèl·lules que s'han desplaçat per tancar la ferida. En aquest cas, es pot observar com comparat amb el control, hi ha hagut un 40% menys de motilitat per part de les cèl·lules amb nivells baixos de RhoE amb una significança de  $p < 0,05$ , encara que farien falta més repeticions (fig. 12 inferior).

## Discussió

Els glioblastomes, la forma més maligna de glioma, presenten alta motilitat i invasivitat, el que provoca que puguin infiltrar-se dins el cervell i faci molt difícil la seva curació a través de la cirurgia. La cirurgia és l'única forma efectiva de tractament ja que són quimioresistents i radioresistents, encara que l'efectivitat de la cirurgia ve condicionada per la recurrència del tumor uns mesos després de la resecció.<sup>2,7,10</sup>

Tot això provoca un gran interès per conèixer el motiu d'aquesta capacitat invasiva, per això en les darreres dècades s'han fet grans esforços per entendre els mecanismes moleculars que intervenen en la motilitat cel·lular augmentada en gliomes.

En estudis anteriors s'ha arribat a la conclusió que en el gliomes, sobretot en els de grau elevat, les vies de senyalització encarregades de la motilitat estan alterades provocant que els nivells i grau d'activació d'intermediaris com Rho, Rac i Cdc42 estiguin modificats. En definitiva existeix un augment en les vies on participen Rac i Cdc42 fent que la cèl·lula sigui més mòbil i un descens en la activitat de Rho, ja que són vies oposades.<sup>1,12</sup>

En aquest treball hem intentat entendre una mica més l'efecte de Rho en tot aquest procés, per això hem deplecionat una proteïna integrant de la via de senyalització, RhoE.

En les línies emprades, confirmant que la expressió de RhoE es mínima comparada amb el control, podem confirmar que hem generat un conjunt de almenys 15 línies *knockdown* estables per RhoE tenint un bon model per veure l'efecte d'aquesta proteïna en la morfologia i mobilitat cel·lular.

Per tant a l'hora de provocar la depleció de RhoE, en experiments previs del grup d'investigació la utilització de siRNAs va funcionar, però ja que es una tècnica amb moltes variables que poden afectar al resultat final, al no funcionar es va decidir emprar un mètode més laboriós però un cop posat a punt es té un model d'estudi més vàlid, ja que els nivells disminuïts de RhoE són constants.

A l'hora de determinar l'expressió de RhoE, he vist que en els clons analitzats, la taxa d'èxit d'un 68% es bastant elevada obtenint 15 clons que expressen de forma suficientment disminuïda RhoE.

Els 4 clons emprats pels estudis morfològics mostren a simple vista a través del microscopi una sèrie de canvis. Comparats amb els controls, els clons RhoE *knockdown* presenten una estructura

més quadriculada i amb més adhesions mostrant una morfologia més aplanada. Això es correlaciona perfectament amb les evidències de la generació de fibres d'estrès i contactes focals provocats per la inhibició de RhoE i de les vies implicades en aquests processos.

Per tant es va confirmar si aquest canvi de morfologia era degut a la formació de fibres d'estrès i definitivament a través d'un anàlisi a través de immunofluorescència. Així s'ha confirmat que el canvi de morfologia es degut a la formació de fibres d'estrès ja que les cèl·lules amb RhoE deplecionat mostren una gran presència d'aquestes estructures correlacionant la morfologia a camp clar i l'estructura del citoesquelet d'actina.

En definitiva des del punt de vista morfològic podem assegurar que RhoE té un efecte damunt la organització del citoesquelet d'actina, ja que la seva eliminació de la cèl·lula provoca la formació de fibres d'estrès, morfologia molt diferent de la actina acumulada a la perifèria i la formació de extensions típiques de les cèl·lules de glioblastoma.

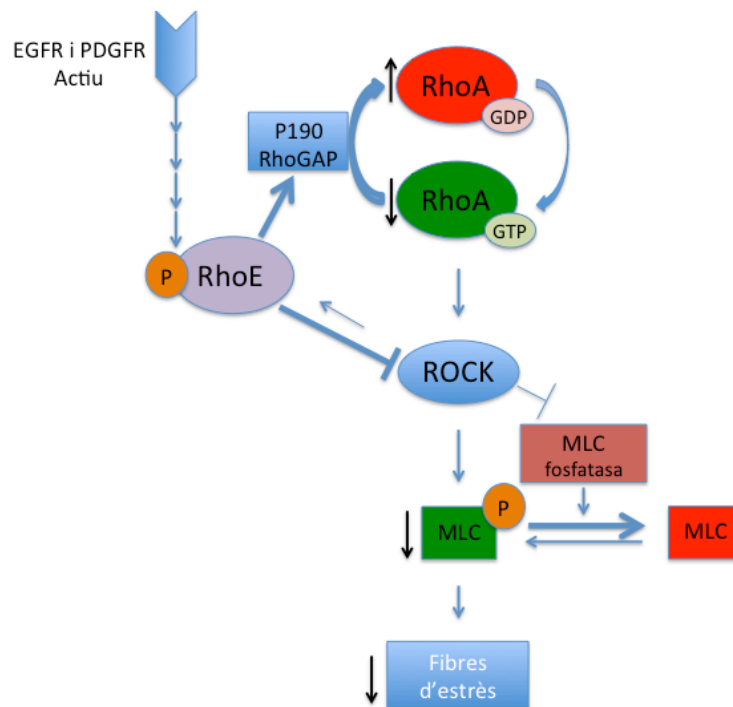
Per últim cal destacar que la formació de fibres d'estrès genera un major nombre de contactes focals amb el substrat provocant, en principi, una menor motilitat i això es va voler correlacionar amb el canvi de morfologia. Per tant es va fer un assaig de motilitat *in vitro* confirmant que el canvi de morfologia amb major nombre de contactes focals i major adherència sembla afectar a la motilitat de la cèl·lula. Aquests ha estat un estudi preliminar emprant només un dels clons generats i només realitzant un estudi independent, per tant caldria en un futur realitzar més repeticions d'aquest assaig així com fer-lo amb altre clons de RhoE deplecionat.

Per tant en definitiva podem afirmar que la falta de RhoE acaba generant una morfologia distinta a la típica de glioblastoma, més aplanada i adherida que a través de la formació de fibres d'estrès, en darrer terme, pareix que dificulta la motilitat de la cèl·lula.

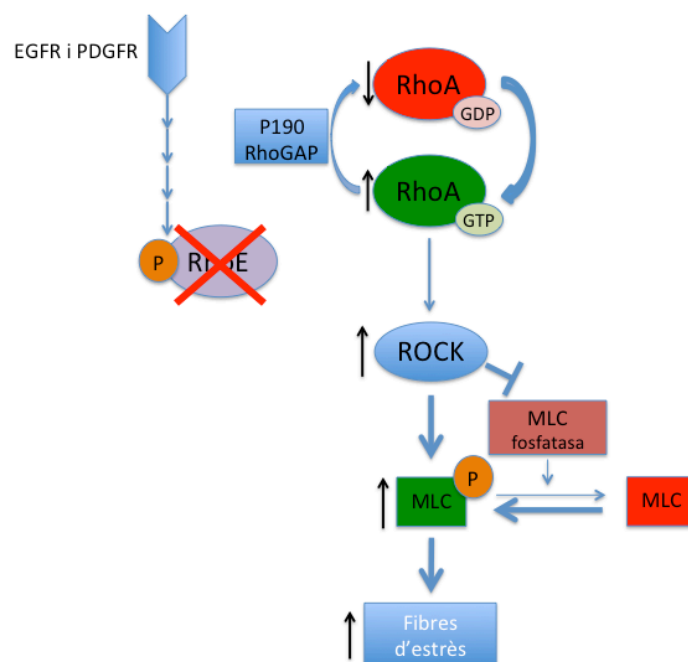
A nivell molecular, en resum, caldria dir que en condicions normals quan RhoE es expressada en nivells elevats, aquesta inhibeix a ROCK i per tant ROCK no fosforila a la cadena lleugera de la miosina evitant la formació de fibres contràctils amb l'actina, les fibres d'estrès. En la condició que hem generat, en absència de RhoE, aquesta ja no pot inhibir a ROCK i per tant ROCK pot fosforilar la cadena lleugera de miosina aconseguint que aquesta pugui polimeritzar amb la actina i formin les fibres d'estrès.<sup>21-23</sup>

Per acabar, proposo la via normal, on RhoE esta activat en GBM i la via que hem provocat deplecionant RhoE.

**Via normal de RhoE**



**Via amb RhoE deplecionat**



## **Conclusió**

1. Mitjançant la transfecció de plasmidis que contenen un shRNA hem aconseguit deplecionar de forma considerable la expressió de RhoE de cèl·lules U87MG de glioblastoma.
2. Aquesta depleció té efectes lleus damunt la morfologia cel·lular analitzada a camp clar del microscopi òptic amb cèl·lules més adherides al substrat i un canvi de morfologia cap a cèl·lules menys allargades.
3. Es poden observar gran canvis en l'estructura del citoesquelet d'actina a través de la formació de fibres d'estrès així com una morfologia molt més aplanada amb major nombre de contactes focals.
4. Aquests canvis en la estructura d'actina semblen afectar a la motilitat cel·lular encara que aquest només es un estudi preliminar i es necessiten més evidències al respecte.

## Bibliografia

1. Fortin Ensign SP, Mathews IT, Symons MH, Berens ME, Tran NL. Implications of rho GTPase signaling in glioma cell invasion and tumor progression *Front Oncol.* 2013;3:241.
2. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, et al. Malignant glioma: Genetics and biology of a grave matter *Genes Dev.* 2001;15(11):1311-1333.
3. Kapoor GS, O'Rourke DM. Receptor tyrosine kinase signaling in gliomagenesis: Pathobiology and therapeutic approaches *Cancer Biol Ther.* 2003;2(4):330-342.
4. Lefranc F, Brotchi J, Kiss R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: Special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis *J Clin Oncol.* 2005;23(10):2411-2422.
5. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97-109.
6. Louis DN. Molecular pathology of malignant gliomas *Annu Rev Pathol.* 2006;1:97-117.
7. Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: Invasion of malignant gliomas and implications for treatment *J Clin Oncol.* 2003;21(8):1624-1636.
8. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma *Clin Cancer Res.* 2013;19(4):764-772.
9. Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: State of the art *Acta Neuropathol.* 2010;120(5):567-584.
10. Kpalanichamy. Molecular and genetic profiling in human gliomas *Kamalakaran Palanichamy.* 2009.
11. Mao H, Lebrun DG, Yang J, Zhu VF, Li M. Deregulated signaling pathways in glioblastoma multiforme: Molecular mechanisms and therapeutic targets *Cancer Invest.* 2012;30(1):48-56.
12. Nakada M, Kita D, Watanabe T, et al. Aberrant signaling pathways in glioma *Cancers (Basel).* 2011;3(3):3242-3278.
13. Bralten LB, French PJ. Genetic alterations in glioma *Cancers (Basel).* 2011;3(1):1129-1140.
14. Ohgaki H. Genetic pathways to glioblastomas *Neuropathology.* 2005;25(1):1-7.
15. Khalil BD, El-Sibai M. Rho GTPases in primary brain tumor malignancy and invasion *J Neurooncol.* 2012;108(3):333-339.
16. MIT - massachusetts institute of technology <http://www.mit.edu/>. Accessed 6/13/2014, 2014.
17. Chardin P. Function and regulation of rnd proteins *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(1):54-62.
18. Riento K, Villalonga P, Garg R, Ridley A. Function and regulation of RhoE *Biochem Soc Trans.* 2005;33(Pt 4):649-651.
19. Riou P, Villalonga P, Ridley AJ. Rnd proteins: Multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression *Bioessays.* 2010;32(11):986-992.
20. Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins *Biochem J.* 2000;348 Pt 2:241-255.
21. Riento K, Guasch RM, Garg R, Jin B, Ridley AJ. RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling *Mol Cell Biol.* 2003;23(12):4219-4229.
22. Riento K, Totty N, Villalonga P, Garg R, Guasch R, Ridley AJ. RhoE function is regulated by ROCK I-mediated phosphorylation *EMBO J.* 2005;24(6):1170-1180.
23. Riento K, Ridley AJ. Inhibition of ROCK by RhoE *Methods Enzymol.* 2006;406:533-541.
24. Gene silencers [http://www.scbt.com/gene\\_silencers.html](http://www.scbt.com/gene_silencers.html). Accessed 6/13/2014, 2014.