



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

**Memoria del Trabajo de Fin de Grado**

# Papel de RhoE en la regulación del citoesqueleto, la adhesión y la motilidad celular en Gliomas

Anika Pupak

**Grado de Bioquímica**

Año académico 2015-16

NIE del alumno: Y0434247-K

Trabajo tutelado por Priam Villalonga Smith  
Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud

Se autoriza a la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Palabras clave del trabajo:

Glioblastoma, RhoE, motilidad celular, citoesqueleto, adhesión



## Resumen

Los gliomas representan los tumores cerebrales primarios más frecuentes, pudiéndose clasificar en cuatro grados de malignidad en función de sus características histológicas. Entre estos tumores se encuentran los glioblastomas, que constituyen los gliomas de mayor grado descritos, caracterizados por ser altamente agresivos y heterogéneos. Uno de los mayores problemas que comportan estas neoplasias es su resistencia a los tratamientos disponibles, considerándose tumores incurables, de forma que la mayoría de los pacientes fallecen al cabo de un año tras el diagnóstico. Parte de esta resistencia es debida a su elevada capacidad invasiva, lo cual dificulta la resección quirúrgica completa de dichos tumores. En este proceso juegan un papel importante las proteínas pertenecientes a la familia de las Rho GTPasas, destacando entre ellas la proteína RhoE, la cual está implicada en control del ciclo celular y de la dinámica del citoesqueleto, promoviendo la motilidad celular. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del silenciamiento de RhoE sobre la estructura del citoesqueleto, la motilidad y la adhesión celular, haciendo uso de dos líneas celulares: U87MG y LN229. Para ello se llevaron a cabo ensayos de motilidad y adhesión celular, además del análisis de las fibras de estrés y las adhesiones focales a través de la microscopía confocal. Así, se observó que la depleción de RhoE provoca la reducción de la motilidad celular, lo cual se atribuye a un cambio en la morfología celular causado por un incremento en las fibras de estrés y las adhesiones focales. Además, también se pudo apreciar que el silenciamiento de RhoE causa una disminución de la plasticidad de las adhesiones focales, dificultando así la adhesión inicial promovida por los complejos focales. En definitiva, se confirma que RhoE juega un papel importante en la capacidad invasiva de los glioblastomas.

## Abstract

Gliomas are the most common primary brain tumours, and they can be classified into four malignancy grades according to their histological characteristics. Among these tumours we can find glioblastomas, the highest-grade gliomas, which are characterized by being highly aggressive and heterogeneous. One of the greatest problems derived from these neoplasms is their resistance to available treatments, leaving them untreatable. As a consequence, most patients die within one year after diagnosis. Part of this resistance is due to their high invasivity, which makes complete surgical resection very difficult. In this process, proteins belonging to the family of Rho GTPases play a crucial role, among which RhoE is very important, as it is involved in cell cycle control and cytoskeletal dynamics, promoting cell motility. The aim of this study was to analyse the effect of downregulation of RhoE on the structure of cytoskeleton, cell motility and adhesion, using two cell lines: U87MG and LN229. To attain these objectives, wound healing and adhesion assays were conducted, as well as the analysis of stress fibres and focal adhesions through confocal microscopy. It was observed that RhoE depletion causes a reduction of cell motility, which is attributed to a modification of cell morphology produced by an increase in stress fibres and focal adhesions. Furthermore, one could also appreciate that silencing of RhoE causes a decrease in the plasticity of focal adhesions, thus hampering the initial adhesion promoted by focal complexes. Hence, it is confirmed that RhoE plays an important role in invasiveness of glioblastoma.

## Abreviaciones

Akt = PKB: proteína quinasa B (del inglés, *Protein Kinase B*)

BSA: albúmina de suero bovino (del inglés, *Bovine Serum Albumin*)

Cdc42: del inglés, *Cell division control protein 42 homolog*

CDK: quinasa dependiente de ciclina (del inglés, *Cyclin-Dependent Kinase*)

DMEM: del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés, *Epidermal Growth Factor Receptor*)

GAPs: proteínas activadoras de la GTPasa (del inglés, *GTPase-Activating Proteins*)

GDIs: inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (del inglés, *Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors*)

GEFs: factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (del inglés *Guanine Nucleotide Exchange Factors*)

KD: del inglés, *knockdown* (disminución de la expresión)

MDM2: del inglés, *Mouse Double Minute 2*

MLC: cadena ligera de la miosina (del inglés, *Myosin Light Chain*)

mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero (del inglés, *mammalian Target Of Rapamycin*)

NHS: suero equino normal (del inglés, *Normal Horse Serum*)

PAK: quinasa activada por p21 (del inglés, *p21-activated kinase*)

PBS: tampón fosfato salino (del inglés, *Phosphate-Buffered Saline*)

PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés, *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*),

PI3K: fosfoinositol 3-quinasa (del inglés, *Phosphoinositide 3-Kinase*)

PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (del inglés, *Phosphatidylinositol 4,5-Biphosphate*)

PIP3: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (del inglés, *Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphate*)

pRB: proteína del retinoblastoma

PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (del inglés, *Phosphatase and Tensin Homolog*)

Rac: del inglés, *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*

ROCK: del inglés, *RhoA/Rho-associated Coiled-Coil Kinase*

RTK: receptor tirosina quinasa (del inglés, *Receptor Tyrosine Kinase*)

SNC: Sistema Nervioso Central

shRNA: del inglés, *short-hairpin RNA*

TRITC: Tetrametilrodamina B Isotiocianato

WASP: del inglés, *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*

WAVE: del inglés, *WASP-family Verprolin-homologous Protein*

# Índice

Introducción .....	5
Tumores del Sistema Nervioso Central: los Gliomas .....	5
Los Glioblastomas .....	6
<i>Tipos y alteraciones moleculares</i> .....	6
Alteraciones de la maquinaria del ciclo celular y los puntos de control .....	7
Alteraciones de las vías de señalización .....	7
<i>Rho GTPasas</i> .....	8
RhoA, Rac y Cdc42 .....	9
RhoE .....	10
<i>Regulación de RhoE</i> .....	11
<i>Tratamiento</i> .....	11
Objetivo .....	12
Materiales y métodos .....	12
Cultivos celulares .....	12
Análisis de la motilidad celular .....	14
Análisis de la morfología del citoesqueleto .....	15
Análisis de la adhesión celular .....	16
Análisis estadístico .....	17
Resultados .....	17
Efecto de RhoE sobre la motilidad celular .....	17
Modificaciones en el citoesqueleto inducidos por el silenciamiento de RhoE .....	20
Efectos de RhoE sobre la adhesión celular .....	23
Discusión .....	25
Conclusiones .....	28
Bibliografía .....	29

## Introducción

### Tumores del Sistema Nervioso Central: los Gliomas

Los tumores cerebrales primarios, es decir, aquellos que se inician en el cerebro, se encuentran entre las 10 primeras causas de muerte relacionadas con el cáncer<sup>1</sup>. El grupo más frecuente de este tipo de neoplasias del sistema nervioso central (SNC) lo constituyen los gliomas, que consisten en tumores derivados de las células gliales (ya sea astrocitos, oligodendrocitos o células ependimarias) o sus precursores<sup>2-6</sup>. Actualmente, los gliomas se clasifican en base a sus características histológicas, inmunohistoquímicas y ultraestructurales, de forma que se puede distinguir entre astrocitomas, glioblastomas (derivados también de los astrocitos), oligodendrogliomas, ependimomas y gliomas mixtos (los oligoastrocitomas, que presentan características morfológicas tanto de astrocitos como de oligodendrocitos), entre otros (ver figura 1)<sup>3,4,6-8</sup>.

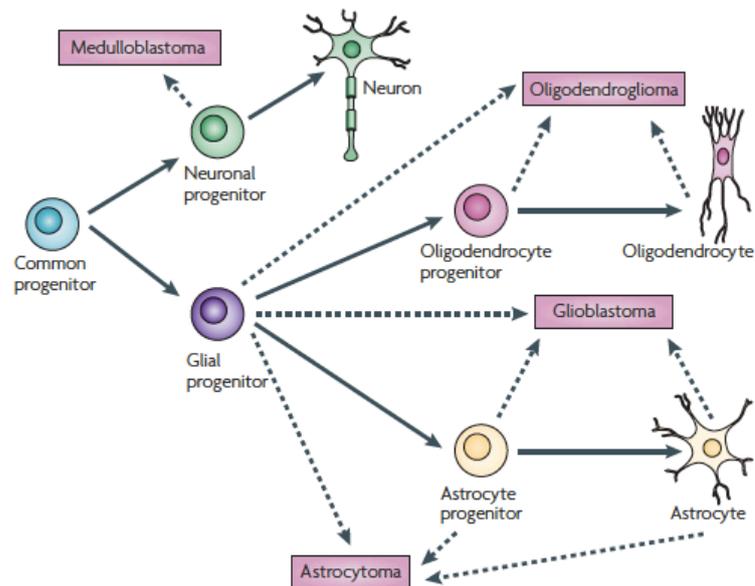


Figura 1. Células del SNC y sus progenitores. Las flechas discontinuas muestran los posibles orígenes de los distintos tipos de gliomas. Extraído de J. Huse y E.Holland<sup>5</sup>

Cada uno de estos tipos de gliomas a su vez se puede dividir en distintos grados de malignidad basados en su comportamiento biológico. Así, la OMS, en el año 1979, propuso una clasificación histológica en 4 categorías de los tumores del SNC, siendo la versión más actual la del año 2007. Esta clasificación aporta toda una serie de criterios que permiten predecir la respuesta al tratamiento de dichos tumores, así como su pronóstico<sup>2,9</sup>. En cuanto al grado I, éste incluye a los tumores que presentan la menor agresividad, considerándose biológicamente benignos debido a su bajo potencial proliferativo y la posibilidad de curación con tan solo la resección quirúrgica. Por otro lado, los tumores de grado II se caracterizan por presentar cierta atipia citológica, así como la capacidad de infiltración al tejido cerebral adyacente. Además, a pesar de su baja actividad proliferativa, es frecuente la recidiva, pudiendo reaparecer en forma de tumores de mayor grado. En tercer lugar, las neoplasias del SNC de grado III ya presentan evidencias histológicas de malignidad, entre las cuales podemos encontrar la atipia nuclear, la anaplasia y la elevada tasa de proliferación, por lo que los pacientes que padecen de este tipo de tumor deben recibir radioterapia y/o quimioterapia adyuvante. Al igual que en el grado II, es frecuente la recidiva en forma de tumores de grado III o IV. Finalmente, las neoplasias de grado IV (es decir, los glioblastomas) se definen por ser altamente malignas, presentando una elevada actividad mitótica, angiogénesis y necrosis en el centro del tumor. Al ser resistentes a los tratamientos

disponibles, presentan una alta tasa de mortalidad, de forma que la mayoría de los pacientes mueren al cabo de un año<sup>7,9,10</sup>.

## Los Glioblastomas

Los glioblastomas constituyen los tumores cerebrales primarios más malignos, así como los más comunes, de forma que se ha observado que representan un 55.1% de todos los gliomas y un 46.1% de todos los tumores malignos del cerebro y el SNC en general (ver figura 2)<sup>2,3</sup>. La incidencia de este tipo de cáncer es de 3 de cada 100.000 personas diagnosticadas al año, detectándose sobre todo en la edad adulta<sup>3,11</sup>. Además, debido a que hasta el momento no se ha descubierto ningún tratamiento eficaz, la tasa de supervivencia de los pacientes diagnosticados es extremadamente baja, siendo la supervivencia a los 5 años de un 5.1%<sup>2,3</sup>.

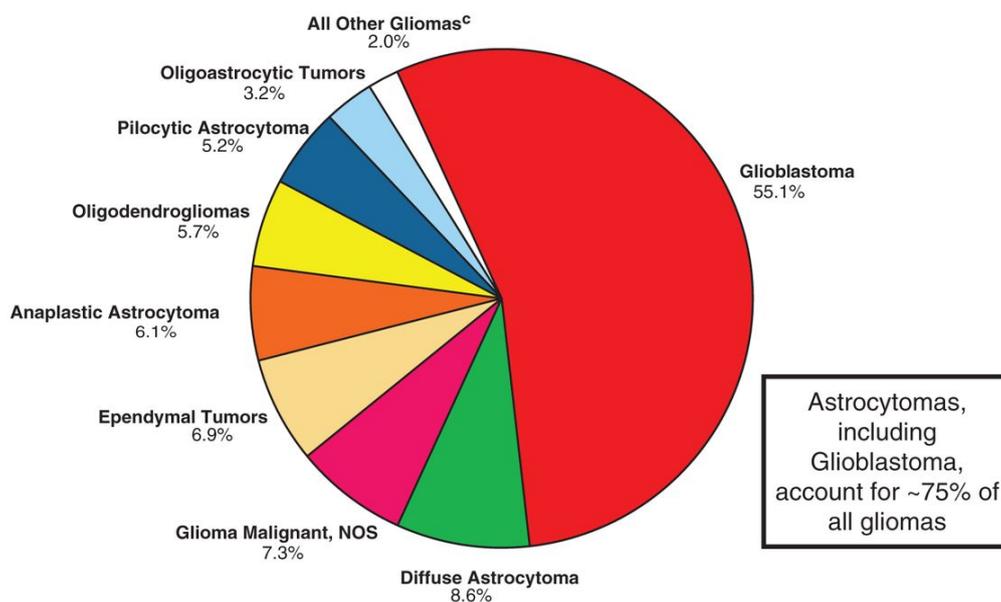


Figura 2. Incidencia de los gliomas en función de su clasificación histológica. Extraído de Q. Ostrom *et al.*<sup>3</sup>

En cuanto a las características histológicas y moleculares de estos tipos de tumores, los glioblastomas presentan un amplio espectro de morfologías, es decir, son pleomórficos (de allí la denominación antigua glioblastoma multiforme). Aún así, generalmente suelen retener ciertas características fenotípicas de los astrocitos<sup>8</sup>. Esta heterogeneidad no se observa sólo a nivel morfológico, sino también a nivel genético<sup>7,11</sup>. Por otro lado, cabe destacar el hecho de que son altamente invasivos dentro del parénquima cerebral, de forma que son capaces de migrar al hemisferio opuesto a través del cuerpo caloso. Sin embargo, los glioblastomas, al igual que otros tumores cerebrales, rara vez metastatizan fuera del SNC<sup>2,11</sup>.

## Tipos y alteraciones moleculares

Los glioblastomas se pueden dividir en dos subtipos clínica y morfológicamente indistinguibles, aunque afecten a pacientes de edades distintas y se originen a partir de mutaciones de genes diferentes<sup>6-8,12</sup>. De esta forma, se puede distinguir entre los glioblastomas primarios, los cuales se desarrollan *de novo* sin evidencias clínicas o histológicas de un precursor de menor malignidad, y los glioblastomas secundarios, que se originan a partir de tumores de menor grado diagnosticados previamente. En cuanto al

primer caso, éstos suelen manifestarse a edades avanzadas y constituyen la mayoría de los casos de glioblastomas diagnosticados (>90%). Por otro lado, los glioblastomas secundarios constituyen patologías menos frecuentes así como menos estudiadas, y se suelen detectar en pacientes más jóvenes<sup>8,11,12</sup>.

Respecto a las alteraciones moleculares de estos dos tipos de glioblastomas, existen una serie de proteínas que parecen ser claves en el inicio y la progresión de dichos tumores (ver figura 3). Éstas a su vez se pueden agrupar en alteraciones de la maquinaria del ciclo celular y los puntos de control (*checkpoints* en inglés) y las alteraciones de las vías de señalización, entre las cuales encontramos la vía RTK/PI3K/Akt.

#### **Alteraciones de la maquinaria del ciclo celular y los puntos de control**

Una de las vías más importantes que se encuentran alteradas en los glioblastomas es la vía del p53, implicada en el control del ciclo celular y la apoptosis en respuesta a estímulos que inducen un estrés celular, como la radiación, las toxinas o las roturas de la cadena de DNA<sup>11</sup>. Así, la mayoría de los glioblastomas (alrededor de un 70%) presentan mutaciones en el gen que codifica para p53 o en aquellos genes encargados de la regulación de esta proteína, como MDM2 (una E3 ubiquitina ligasa implicada en la degradación de p53) y p14ARF (un inhibidor de MDM2)<sup>8,12,13</sup>. Cabe destacar que las alteraciones en esta ruta de señalización constituyen un evento temprano en el desarrollo de los glioblastomas secundarios<sup>7</sup>.

Otra vía inactivada en la mayor parte de los gliomas de grado elevado es la vía de la proteína del retinoblastoma (pRB), la cual puede verse afectada tanto a nivel de la propia pRB como a nivel de sus reguladores<sup>5</sup>. La pRB constituye un supresor tumoral que controla la transición de G1 a S en el ciclo celular mediante la inhibición de la acción de los factores de la familia E2F<sup>11,13</sup>. Dicha proteína es regulada mediante la fosforilación por el complejo formado entre las quinasas dependientes de ciclina 4 o 6 (CDK4/6) y la ciclina D1, lo cual conduce a su inactivación<sup>12,13</sup>. Se han descrito alteraciones en la fosforilación de la pRB causadas por una amplificación del gen de la CDK4 o la CDK6 o por una delección o silenciamiento del locus CDK2A, que contiene tanto a p14ARF como a p16INK4a, siendo este último el encargado de la inhibición de las CDK4 y 6<sup>5,7,8,13</sup>.

#### **Alteraciones de las vías de señalización**

La ruta de señalización RTK/PI3K/Akt, responsable de la regulación de la proliferación, el crecimiento, la apoptosis y la reorganización del citoesqueleto, constituye una vía clave en el desarrollo de los glioblastomas, sobre todo en los primarios<sup>5,12,14</sup>. Una proteína importante en la señalización de esta vía es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un receptor con actividad tirosina quinasa intrínseca estimulado por la unión a factores de crecimiento. Dicha activación permite el reclutamiento de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) hacia la membrana celular, la cual genera fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) a partir de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>), encargado a su vez de la activación de diversos efectores, entre ellos Akt<sup>12</sup>. Una alteración muy frecuente de los glioblastomas primarios es la amplificación del gen codificante para EGFR (alrededor de un 40% de los casos), lo cual conduce a su sobreexpresión<sup>6,7,12</sup>. Además, en la mayoría de los casos esto se ve acompañado por un reordenamiento del gen amplificado, dando lugar a alteraciones estructurales del receptor. La variante mutada más común es la EGFRvIII, asociada a una

activación constitutiva del receptor debido a la pérdida de una parte del dominio de unión al ligando, lo cual tiene un efecto mitogénico importante<sup>6,8,11,12</sup>.

Por otro lado, también se pueden dar alteraciones en otros RTKs implicados en esta vía de señalización, entre ellos el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), de forma que se observa una correlación positiva entre la expresión de dicho receptor y la patogénesis de los gliomas. Así, una mayor actividad de este receptor conduce a una activación de la vía PI3K/Akt, contribuyendo de esta manera al crecimiento del tumor, por lo que constituye una posible diana terapéutica en el tratamiento de los glioblastomas<sup>7,13</sup>. Una alteración muy frecuente, que se ha observado tanto en gliomas de bajo grado de malignidad como en glioblastomas, es la sobreexpresión de dichos receptores conjuntamente con sus ligandos, lo cual conduce al establecimiento de un bucle de activación autocrina o paracrina que favorece la carcinogénesis<sup>5,7</sup>.

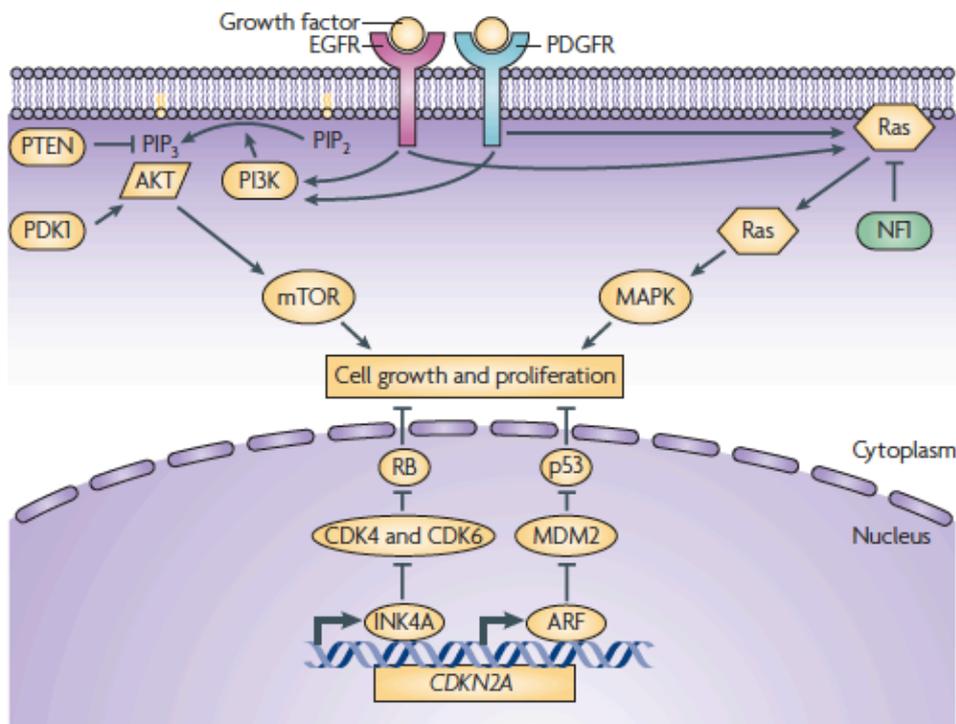


Figura 3. Representación esquemática de las principales vías de señalización implicadas en la patogénesis de los glioblastomas. Extraído de J. Huse y E. Holland<sup>5</sup>

Finalmente, se ha visto que en más de un 90% de los glioblastomas se produce una pérdida de los alelos de una región del cromosoma 10, que entre otros contiene al supresor tumoral PTEN<sup>8</sup>. En condiciones normales, PTEN constituye un regulador negativo de la vía PI3K/Akt/mTOR gracias a que permite la desfosforilación de PIP<sub>3</sub>. Si este control falla debido a la mutación de PTEN, se produce una hiperactivación de dicha vía, favoreciendo así la transformación tumoral<sup>5,8,11,13</sup>.

### Rho GTPasas

Como se ha comentado anteriormente, una de las características definitorias de los glioblastomas es su elevada capacidad invasiva que les permite a las células cancerosas escapar del núcleo hipóxico del tumor, proceso en el cual es importante la reorganización

del citoesqueleto de actina<sup>2,14</sup>. Uno de los mediadores más relevantes en esta migración celular es la familia de las Rho GTPasas, cuya alteración está correlacionada con el desarrollo de gliomas malignos, de forma que tanto estas proteínas como sus reguladores o proteínas efectoras constituyen una posible diana para el tratamiento de dichos tumores<sup>2,15</sup>.

Las Rho GTPasas son una familia de proteínas G monoméricas de bajo peso molecular (20-40 kDa) que pertenecen a la superfamilia Ras. Hasta el momento se han descubierto 20 miembros de la familia Rho en mamíferos, divididos a su vez en distintas subfamilias, entre las cuales encontramos a Rho (A, B y C), Rac (1, 2 y 3), Cdc42, Rnd y RhoH, entre otros, siendo los primeros tres los que se han estudiado en mayor profundidad<sup>2,15-17</sup>. Estas proteínas participan en una diversidad de vías de transducción de señal implicadas en la regulación de la migración celular, pero también en otros procesos como la progresión del ciclo celular o la transcripción de una diversidad de genes<sup>15,16</sup>.

En la mayoría de los casos, las Rho GTPasas presentan dos formas distintas: una forma activa unida a GTP y otra forma inactiva unida a GDP. Así, se deduce que estas proteínas actúan como interruptores moleculares que fluctúan entre su forma activa e inactiva en función de las señales que les llegan. Debido a que esta familia se encarga de controlar una multitud de procesos, su función está altamente regulada por tres tipos de proteínas: el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF), que permite el intercambio de GDP por GTP, activando así a la proteína; las proteínas activadoras de la GTPasa (GAPs) que, como ya lo dice su nombre, estimulan la actividad GTPasa intrínseca de las Rho GTPasas, promoviendo su inactivación; y el inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina (GDI), que secuestra a las Rho GTPasas en su conformación inactiva en el citosol, además de prevenir su degradación<sup>2,15,16</sup>.

Por otro lado, además de estar reguladas por la unión a nucleótidos, se ha visto que la ubiquitinación y la localización subcelular son importantes en el control de su actividad<sup>2,15</sup>. En cuanto a lo último, la mayoría de las Rho GTPasas son modificadas de forma postraduccional mediante la adición de un grupo prenilo, lo cual permite su unión a las membranas celulares, en las cuales son activadas y pueden interactuar con distintos complejos de señalización<sup>2,16</sup>.

### **RhoA, Rac y Cdc42**

Son los miembros de la familia de las Rho GTPasas que más se han estudiado<sup>2</sup>. En primer lugar, RhoA induce la formación de fibras de estrés (constituidas por microfilamentos de actina) y adhesiones focales estables<sup>15,18</sup>. Éstas últimas actúan como puente entre las fibras de actina-miosina y la matriz extracelular, y están constituidas por integrinas y toda una serie de proteínas intracitoplasmáticas que las unen a las fibras de estrés, entre ellas la vinculina<sup>19</sup>. Estos efectos se dan gracias a la activación de la serina/treonina quinasa ROCK I por parte de RhoA, la cual permite la fosforilación y activación de las cadenas ligeras de la miosina (MLC), gracias a que inhibe la fosfatasa de la MLC, además de actuar directamente sobre las MLCs, permitiendo así el ensamblaje de fibras contráctiles de actina-miosina<sup>2,15</sup>.

Por otro lado, Rac y Cdc42 regulan la formación de lamelipodios y filopodios, respectivamente, promoviendo la migración celular, a través de su interacción con WAVE

(Rac), WASP y PAK (Cdc42)<sup>2,15</sup>. En estas protrusiones podemos encontrar a lo que se llama complejos focales (del inglés, *focal complexes*), los cuales también están conformados por integrinas, pero que persisten menos en el tiempo que las adhesiones focales, que son más estables<sup>20</sup>. Aparte de ello, cabe destacar que Rac también está relacionado con el colapso de las fibras de estrés, así como con la formación de invadopodios (del inglés, *invadopodia*), los cuales promueven la degradación de la matriz extracelular, siendo por lo tanto claves durante la invasión tumoral<sup>2</sup>.

Respecto a la regulación de estas tres proteínas, se ha visto que el supresor tumoral PTEN inhibe la invasión celular en los gliomas inhibiendo la actividad de Rac y Cdc42<sup>15</sup>. Por otro lado, también se ha observado que RhoA y Rac se inhiben mutuamente, aunque otros estudios postulan una retroalimentación positiva entre ambos<sup>2,15</sup>.

### RhoE

La familia de las Rho GTPasas incluye a 6 miembros atípicos que están constitutivamente unidos a GTP y que no lo hidrolizan de forma apreciable debido a que son deficientes en aminoácidos importantes para la actividad GTPasa. Entre ellos está la subfamilia Rnd, que incluye a RhoE (también conocido como Rnd3 o Rho8)<sup>16,21</sup>. Esta proteína presenta dos funciones principales: la regulación del citoesqueleto de actina y del ciclo celular, y está frecuentemente alterada en el cáncer<sup>16</sup>.

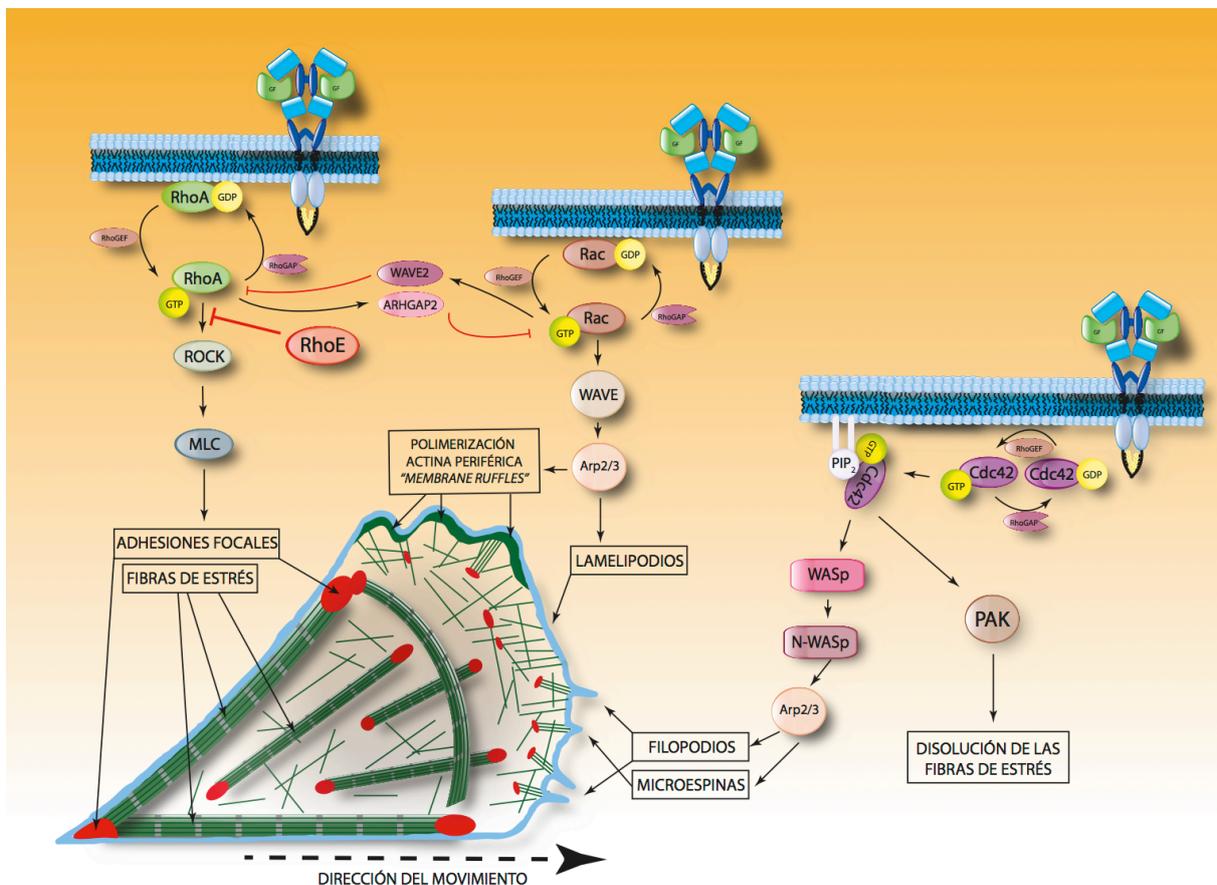
Respecto a su papel en la invasión celular, RhoE antagoniza la señalización mediada por RhoA/ROCK I en cuanto a la contractilidad del complejo actina-miosina, induciendo la pérdida de las fibras de estrés y por lo tanto un fenotipo redondeado en diversos tipos celulares<sup>16,21</sup>. Por un lado, la inhibición de esta vía se consigue gracias a su interacción con p190RhoGAP, la cual incrementa la actividad GTPasa de RhoA, inactivándola<sup>16,17,21</sup>. Por otro lado, RhoE también se une a ROCK I ejerciendo una inhibición competitiva con RhoA y con los sustratos restantes de esta quinasa, evitando la fosforilación de estos últimos (entre ellos la fosfatasa de la MLC) y reduciendo por lo tanto la contractilidad<sup>16-18</sup>. Además, parece que RhoE también es capaz de interactuar con las plexinas, unos receptores de las semaforinas (que son proteínas encargadas de guiar la migración y adhesión celular o la orientación de los axones). Así, RhoE se une al dominio intracelular de estos receptores, estimulando la GAP de R-Ras, de forma que disminuye la actividad de esta proteína, teniendo como resultado una reducción de las adhesiones mediadas por integrinas<sup>16,18,21</sup>. En la figura 4 se muestra una representación esquemática del papel de las Rho GTPasas en la motilidad e invasión celular.

Aparte de ello, RhoE también presenta una función en la regulación del ciclo celular, inhibiendo su progresión en el punto G1 gracias a que provoca la reducción de la expresión de reguladores importantes del ciclo, como la ciclina D1 o Myc<sup>16</sup>. Por otro lado, parece que este bloqueo también se puede deber en parte a la reducción de las adhesiones a la matriz extracelular mediadas por integrinas, que son esenciales para la progresión del ciclo celular<sup>21</sup>. Además, se ha visto que esta Rho GTPasa es capaz de inhibir la transformación de fibroblastos mediada por H-Ras oncogénico<sup>17</sup>. Teniendo en cuenta todo esto, se podría afirmar que RhoE actúa como supresor tumoral. Sin embargo, cuando las mutaciones

sobrepan esta actividad supresora, RhoE podría promover la invasión tumoral gracias a sus efectos sobre el citoesqueleto<sup>16</sup>.

### Regulación de RhoE

Como su actividad no se controla por el intercambio de GTP por GDP, RhoE es regulado por otros mecanismos a través de su expresión, su localización y su fosforilación. En cuanto a su expresión, ésta es inducida por una serie de agentes inductores del daño en el DNA, entre ellos la radiación UV o el cisplatino. Por otro lado, cabe tener en cuenta que parece que RhoE no interacciona con las proteínas GDI, de forma que la mayor parte de esta proteína está asociada a membranas a través de su grupo farnesilo. Finalmente, se ha observado que RhoE puede ser fosforilada por ROCK I, lo cual reduce su afinidad por las membranas y hace que sea más estable<sup>16-18,21</sup>.



**Figura 4. Esquema del papel de las Rho GTPasas en la motilidad e invasión celular en los glioblastomas.** Imagen cedida por el Dr. Guillem Ramis Munar, UIB.

### Tratamiento

A pesar de los avances que se han hecho en los últimos años en el campo de la biología molecular de los glioblastomas, el pronóstico de los pacientes que padecen este tipo de tumor sigue siendo pobre<sup>2</sup>. En cuanto al tratamiento estándar de los glioblastomas, éste se basa sobre todo en la resección quirúrgica que, debido a la capacidad de infiltración de estos tumores en el parénquima cerebral, suele ser incompleta. Además de ello, el tratamiento concomitante con radioterapia y quimioterapia usando gliadel o temozolomida

(ambos agentes alquilantes) permite prolongar el tiempo de supervivencia en varios meses, dando lugar a una supervivencia media de alrededor 14 meses<sup>11</sup>.

El problema principal ante el que se encuentran los médicos y los investigadores es la invasividad de estas neoplasias, así como la resistencia a los tratamientos disponibles, de forma que resulta de elevado interés esclarecer las bases moleculares de los glioblastomas para poder mejorar en este aspecto. Además, aún se desconoce en gran medida el papel de los genes pro-invasivos en estos tumores y su relación con la resistencia al tratamiento, por lo que una mayor profundización en este campo podría llevar al descubrimiento de nuevas dianas para el tratamiento de estos gliomas malignos<sup>2</sup>.

## Objetivo

El objetivo de este trabajo era analizar el efecto de la depleción de RhoE en dos líneas celulares de glioblastoma, con el fin de esclarecer el papel de dicha proteína en la motilidad celular, la estructura del citoesqueleto y la adhesión a la matriz. Para ello se llevó a cabo un análisis detallado del fenotipo invasivo de estas dos líneas celulares en respuesta al silenciamiento de RhoE, haciendo uso de ensayos de motilidad y ensayos de adhesión. Por otro lado, también se realizó un análisis de la morfología celular y del citoesqueleto mediante microscopía confocal, para así correlacionar los cambios en la motilidad celular con los cambios en la estructura del citoesqueleto. De esta forma, el siguiente trabajo se engloba dentro de lo que es el estudio de los genes pro-invasivos como posible diana terapéutica en el tratamiento de los gliomas malignos.

## Materiales y métodos

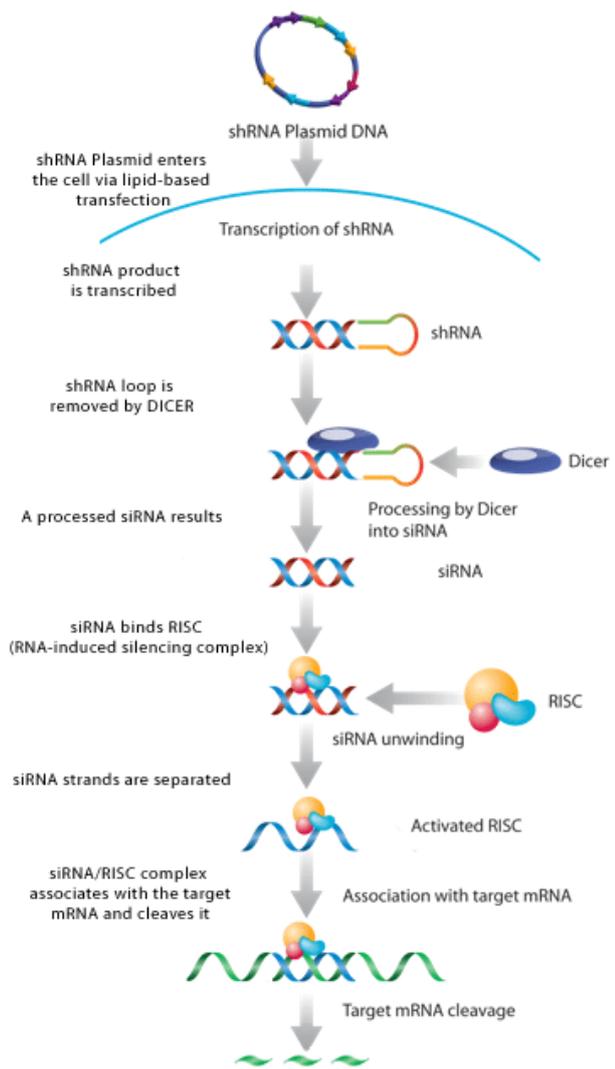
### Cultivos celulares

En este estudio se hizo uso de dos líneas celulares establecidas de glioblastoma humano: U87MG y LN229. Se trata de dos líneas adherentes con morfología epitelial, ambas pertenecientes a un nivel de bioseguridad 1<sup>22,23</sup>. La primera fue establecida en el año 1996 a partir de un tumor cerebral de un hombre de etnia caucásica de 44 años de edad<sup>22</sup>. Desde el punto de vista molecular, las U87MG presentan una mutación homocigota para PTEN, mientras que contienen el fenotipo salvaje para p53<sup>24,25</sup>. Por otro lado, la línea celular LN229 fue establecida en el año 1978 a partir de un glioblastoma de una mujer de 60 años de raza blanca. A diferencia de las U87MG, esta línea se caracteriza por presentar un fenotipo salvaje para PTEN, mientras que contiene una mutación en p53 y una delección en los supresores tumorales p16 y p14ARF<sup>23</sup>.

Como el objetivo de este trabajo fue el estudio del papel de RhoE en la regulación del citoesqueleto, la adhesión y la motilidad celular, se utilizaron una serie de clones de dichas líneas celulares que presentan una expresión reducida de RhoE gracias a que están transfectadas de forma estable con un plásmido integrativo que codifica para un shRNA (Mission<sup>®</sup> shRNA, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), el cual genera un RNA de cadena simple que es capaz de unirse al mRNA codificante para RhoE, promoviendo su degradación y dando lugar por lo tanto a una disminución considerable de su expresión (generándose líneas celulares RhoE

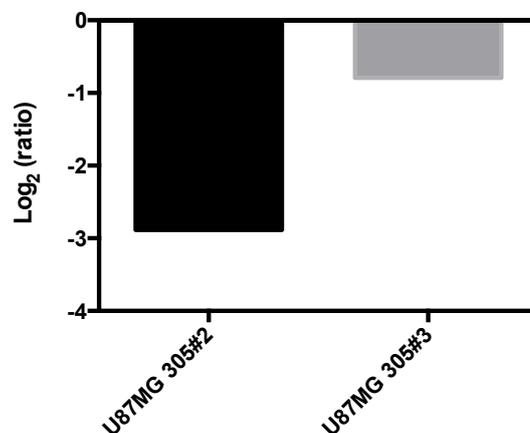
KD, del inglés, *knockdown*) (ver figura 5). Concretamente, en el caso de las U87MG se usaron aquellas transfectadas con el plásmido 305 (305#2 y 305#3, ambas monoclonales), mientras que en el caso de las LN229 se usaron células transfectadas con el plásmido 717 (717PC, policlonales, y 717#4 y 717#5, ambas monoclonales).

Para comprobar si las líneas celulares RhoE KD generadas con anterioridad seguían expresando el plásmido (es decir, si seguía habiendo un silenciamiento de RhoE), integrantes del equipo de investigación efectuaron una PCR cuantitativa de RhoE. Como se puede observar en las figuras 6 A y B, todos los clones usados en este trabajo presentan una reducción considerable en la expresión del mRNA de RhoE con respecto al control. Concretamente, en el caso de la línea celular U87MG, el clon 305#2 presenta una reducción considerablemente mayor que el clon 305#3, mientras que en el caso de las LN229 la infraexpresión más considerable se detecta en el clon 717PC, seguido del clon 717#5 y finalmente el clon 717#4.

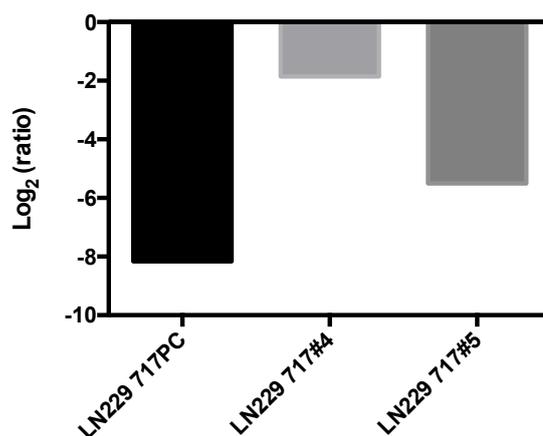


**Figura 5. Proceso de silenciamiento de genes ejercido por un shRNA.** El shRNA es procesado por el Dicer, generándose un siRNA que forma un complejo con RISC, el cual se une a su mRNA diana, degradándolo. Extraído de [http://www.scbt.com/gene\\_silencers.html](http://www.scbt.com/gene_silencers.html)<sup>32</sup>

**A) Cambios en la expresión de RhoE relativa a la línea celular parental (U87MG)**



## B) Cambios en la expresión de RhoE relativa a la línea celular parental (LN229)



**Figura 6. Expresión de RhoE relativa a la línea celular parental en las líneas celulares U87MG (A) y LN229 (B).** Se muestran los resultados obtenidos en el análisis de la expresión de RhoE mediante una PCR cuantitativa, representándose el logaritmo en base 2 del ratio calculado para cada clon con respecto a su respectiva línea celular parental, a la cual se le ha dado un valor de referencia 0. Los valores negativos indican una infraexpresión de RhoE con respecto a la línea celular parental.

El cultivo de estas células se llevó a cabo en un incubador programado a 37 °C y a una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Por otro lado, para su mantenimiento se usó el medio de cultivo DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado y un 0.5% de los antibióticos penicilina y estreptomycin, todos ellos de la casa comercial Sigma-Aldrich®. Para evitar que las células lleguen a la confluencia y dejen de dividirse, se hicieron subcultivos 2-3 veces por semana. Para ello se siguió el siguiente procedimiento: en primer lugar, se debe aspirar el medio de cultivo y hacer dos lavados con tampón fosfato salino (PBS) (Sigma-Aldrich®). Posteriormente, se añade tripsina a la placa (Sigma-Aldrich®) y se incuba durante unos minutos a 37 °C. Pasado este tiempo se debe neutralizar la tripsina con DMEM y resuspender las células, seguida de la siembra en placas de cultivo nuevas, aplicando la dilución correspondiente. Cabe destacar que en el caso de que se requiera sembrar un número concreto de células, se debe efectuar un conteo previo haciendo uso de una cámara de Neubauer. Además, en aquellas células transfectadas con el plásmido, es recomendable ejercer una presión selectiva con puromicina para así evitar que pierdan la expresión del shRNA (pues el plásmido confiere resistencia a dicho antibiótico). De esta forma, se aplicó una dilución 1/10.000 de puromicina a una concentración de 50 mg/mL (Sigma-Aldrich®). Todos estos procedimientos se llevaron a cabo en una cabina de bioseguridad de tipo II.

### Análisis de la motilidad celular

Para poder analizar el efecto del silenciamiento de RhoE sobre la capacidad migratoria e invasiva de las células, se procedió a la realización de un ensayo de motilidad o *Wound Healing Assay*. Este ensayo se puso a punto probando distintas variantes del protocolo, tomándose como más apto el siguiente procedimiento: en primer lugar, se deben sembrar 300.000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos, seguida de una incubación a 37 °C durante las 4 horas siguientes para así permitir la adhesión de las células a la placa. Pasado este tiempo, se hacen tres heridas en la monocapa (una vertical y dos horizontales, como se indica en la figura 7) haciendo uso de una punta estéril. Cabe destacar que es importante hacer las heridas de esta forma para así poder orientarse en la placa. Hecho esto, se

procede a un cambio de medio de cultivo para así eliminar aquellas células que se hayan despegado, y se vuelve a incubar durante 4 horas aproximadamente, permitiendo que las células se adhieran bien a la placa. Llegados aquí, se procede a la captura de imágenes de las heridas en 4 zonas distintas (las cuales se considerarán como tiempo 0h), usando un microscopio de platina invertida de la casa comercial Leica Microsystems® (modelo DM IRB), tomando las fotografías con la cámara digital DFC 360FX de la misma casa comercial. Una vez se tienen las fotografías de las heridas, las placas se vuelven a introducir en el incubador durante 16 horas. Finalmente, se debe tomar la fotografía en la misma zona que en el caso de las cero horas, de forma que la comparación del número de células a los dos tiempos permitirá la cuantificación de la motilidad celular.

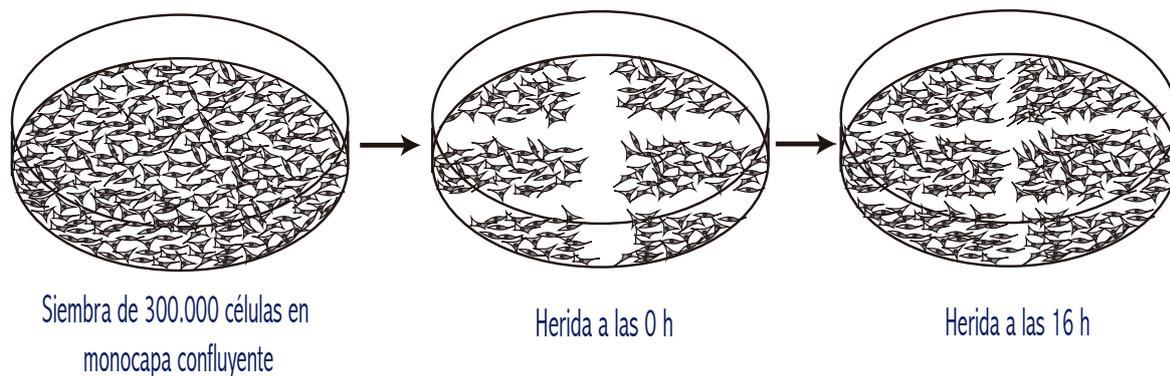


Figura 7. Esquema representativo de los pasos seguidos en un *Wound Healing Assay*.

### Análisis de la morfología del citoesqueleto

Para poder analizar la morfología del citoesqueleto de las distintas líneas celulares usadas, se procedió a la realización de un ensayo de inmunofluorescencia. Para ello, en primer lugar se hizo un cultivo de células en placas de 60 mm que en su interior llevaban cubreobjetos (Sarstedt®) a los cuales se adhirieron las células. Cabe destacar que para favorecer esta adhesión se llevó a cabo un tratamiento previo de los cubreobjetos con 50-100  $\mu$ L de polilisina (*Poly-L-Lysine*, Sigma-Aldrich®), incubándolos durante 1 hora a 37 °C, seguido de dos lavados con PBS (Sigma-Aldrich®). Hecho esto, se sembraron alrededor de 200.000-300.000 células por placa y se dejaron en el incubador hasta el día siguiente.

Pasadas las 24 horas, se procedió a la fijación de las células sobre los cubreobjetos, para lo cual se aspiró primero el medio de cultivo, seguido de dos lavados con PBS 1X frío (4 °C). Posteriormente, los cubreobjetos se sumergieron en paraformaldehído (Sigma-Aldrich®) al 4% (v/v) disuelto en PBS 1X frío durante 20 minutos a temperatura ambiente, y a continuación se hicieron dos lavados con PBS 1X frío. Una vez que se tenían las células fijadas sobre los cubreobjetos, se pasó a la permeabilización de las membranas celulares para así poder llevar a cabo la tinción. Para ello se hizo uso del Tritón X-100 (Sigma-Aldrich®) al 0.5% (v/v), dejándolo actuar a temperatura ambiente durante 5 minutos, seguido de un lavado con PBS 1X frío. Al usarse anticuerpos para la tinción, posteriormente se llevó a cabo un bloqueo de los cubreobjetos con 30-45  $\mu$ L de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich®) al 3% (p/v) disuelto en PBS 1X, incubándolos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Hecho esto, se eliminó el BSA por capilaridad, tocando la esquina del cubreobjetos con un papel de filtro. Cabe mencionar que también se hicieron ensayos

bloqueando los cubreobjetos con un 5% de suero equino normal (NHS) o con un 5% de BSA, lo cual no supuso una mejora de los resultados obtenidos, por lo cual se decidió usar la concentración de BSA establecida por el protocolo (3%).

Llegados aquí, se procedió a la tinción de las células con los distintos anticuerpos. Así, en primer lugar se incubaron los cubreobjetos con el anticuerpo primario producido en ratones dirigido contra la vinculina (Sigma-Aldrich®), que se diluyó en BSA al 1% (p/v), presentando además Tritón X-100 al 0.1% (v/v). De esta preparación se depositaron alrededor de 45 µL sobre el cubreobjetos (un volumen suficiente para cubrir el cubreobjetos entero) y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Una vez pasado este tiempo, se eliminó el anticuerpo por capilaridad y el cubreobjetos se lavó 15 veces sumergiéndolo en PBS 1X frío. Posteriormente, se añadieron 45 µL del anticuerpo secundario dirigido contra la región constante del anticuerpo primario, el cual está marcado fluoresceína (IgG, *Donkey-Antimouse*, Alexa Fluor® 488). Al igual que en el caso anterior, éste se diluyó en BSA al 1% (p/v) y Tritón X-100 al 0.1% (v/v), conteniendo además faloidina, la cual se une a la actina polimerizada, confiriéndole fluorescencia roja debido a que se encuentra unida a TRITC (Sigma-Aldrich®). Como ya se hizo en el caso del anticuerpo primario, los cubreobjetos fueron incubados a 37 °C durante una hora en oscuridad (debido a que los fluorocromos son fotosensibles). Pasado este tiempo, se eliminó el anticuerpo por capilaridad y se volvió a lavar sumergiéndolo 15 veces en PBS 1X frío. Finalmente, se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos de vidrio, haciendo uso del medio de montaje de la casa comercial Dako® (*Fluorescent Mounting Media*), dejándolo a 4 °C durante toda la noche. Cabe destacar que el protocolo de inmunofluorescencia se puso a punto probando distintas diluciones de los anticuerpos. De esta forma, se decidió que las diluciones más adecuadas eran las siguientes: 1/50 del anticuerpo primario, 1/100 del anticuerpo secundario y 1/250 de faloidina.

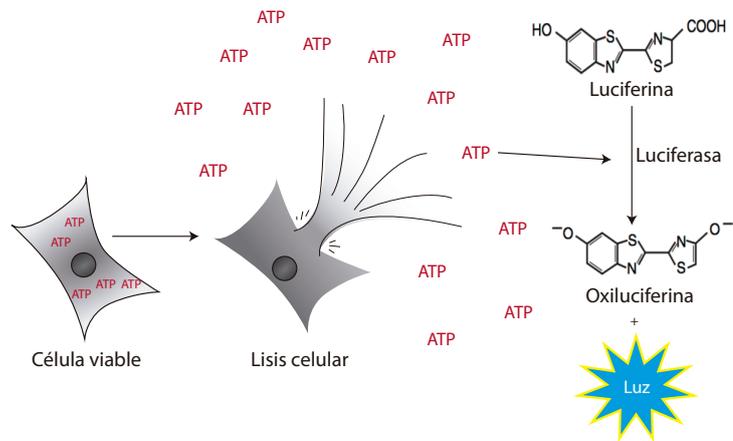
Finalmente, para poder visualizar la tinción llevada a cabo se hizo uso del microscopio confocal TCS SPE de la casa comercial Leica Microsystems®. Las imágenes fueron adquiridas a una resolución de 1024x1024 bytes y a una velocidad de 400 Hz.

### **Análisis de la adhesión celular**

La determinación de la adhesión celular de cada clon usado en este trabajo se hizo mediante el uso de un ensayo de viabilidad celular, para lo cual se empleó el kit comercial *CellTiter-Glo® Luminescent Viability Assay* de Promega®. Para ello, en primer lugar se sembraron 30.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos, con un volumen final de 200 µL de suspensión celular en cada uno de ellos. Hecho esto, se aspiró el contenido de los pocillos a diferentes tiempos, teniendo en cuenta que cada condición se aplicó por triplicado. Los tiempos usados fueron los siguientes: 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 120 y 180 minutos. Una vez aspirado el medio con la suspensión de células, se sustituyó por 200 µL de medio de cultivo. A la hora de aspirar los pocillos correspondientes a los 180 minutos, en vez de sustituirlos por 200 µL de medio, se aplicó un volumen de 25 µL. Posteriormente, se aspiró el medio de los pocillos restantes que presentaban 200 µL de medio y se sustituyó por el mismo volumen que en el caso de los 180 minutos. Llegados aquí, se añadieron 25 µL del reactivo del kit comercial y se procedió a la lectura de la luminiscencia, la cual se cuantificó mediante el *Synergy Mx Microplate reader* de la casa comercial Biotek®. Los

resultados obtenidos se normalizaron para obtener el porcentaje de adhesión y se representaron en función del logaritmo del tiempo.

El kit comercial usado en este ensayo permite la determinación de las células viables (metabólicamente activas) en cada pocillo, gracias a la cuantificación del ATP presente en ellas. Para ello, en primer lugar se produce la lisis celular por parte del reactivo, liberando el ATP del interior celular. Este ATP actúa como cosustrato de una luciferasa termoestable, la cual actúa sobre la luciferina, dando lugar a la emisión de luz, como se puede observar en la figura 8. Esta señal lumínica es



**Figura 8. Ensayo de viabilidad celular basado en la reacción de la luciferasa del kit comercial CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminiscent Viability Assay de Promega<sup>®</sup>.**

proporcional al ATP presente, que a su vez es directamente proporcional al número de células viables presentes en el cultivo<sup>26</sup>.

### Análisis estadístico

Los cálculos de los ratios de motilidad se efectuaron con el programa Excel<sup>®</sup> 2011 de Microsoft Office<sup>®</sup>. Por otro lado, el análisis estadístico de los datos obtenidos en los distintos experimentos se llevó a cabo haciendo uso del programa Prism 6 de GraphPad<sup>®</sup>. Para ello se calcularon las medias con los respectivos errores estándar (SEM) y se procedió a la comparación entre los distintos clones mediante la prueba de *t-Student*, considerando que las diferencias son estadísticamente significativas en los siguientes casos:

p-valor > 0.05	Diferencias no significativas
p-valor < 0.05	Diferencias significativas (*)
p-valor < 0.01	Diferencias muy significativas (**)
p-valor < 0.001	Diferencias extremadamente significativas (***)

## Resultados

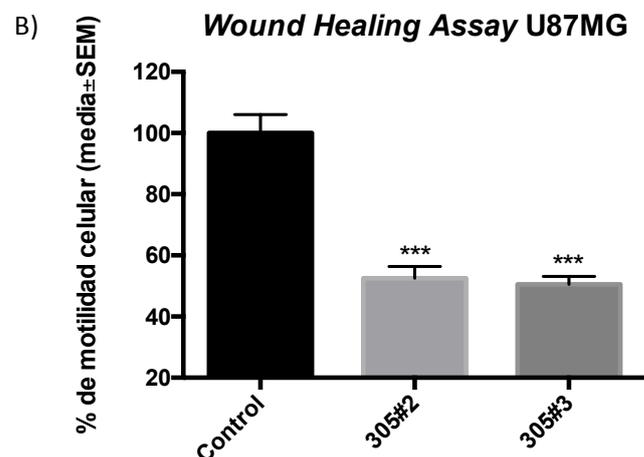
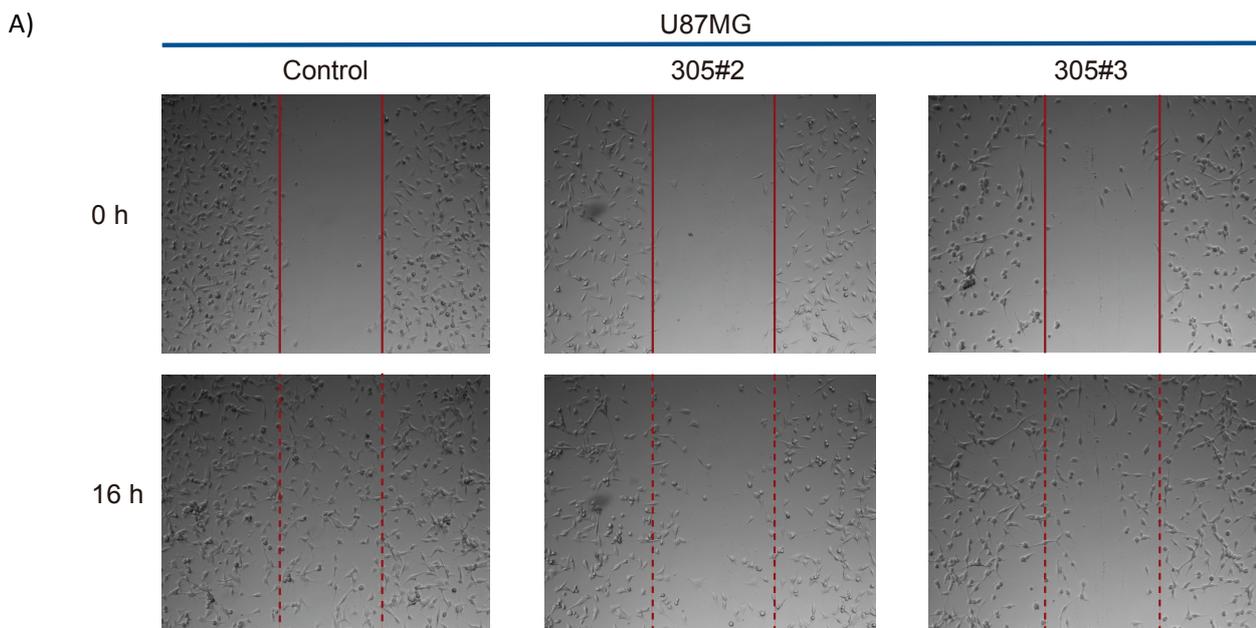
### Efecto de RhoE sobre la motilidad celular

Para determinar cómo afecta el silenciamiento de RhoE a la capacidad migratoria e invasiva de los glioblastomas, se llevó a cabo un *Wound Healing Assay* en las líneas celulares U87MG y LN229 (control y RhoE KD), comparándose el número de células presentes en la herida a las 0 h y las 16 h para así determinar el cierre de la herida. Para ello se calculó el ratio de motilidad, el cual se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Ratio de motilidad} = \frac{\text{Células contadas a las 16h} - \text{Células contadas a las 0h}}{\text{Área de la herida}}$$

Como se puede observar en la figura 9, en el caso de la línea celular U87MG, la disminución de la expresión de esta Rho GTPasa se traduce en una reducción de la migración celular, dando lugar a un menor cierre de la herida con respecto al control de fenotipo salvaje. Así, tanto en el clon 305#2 como en el clon 305#3, se puede observar una disminución extremadamente significativa del ratio de motilidad con respecto al control, apreciándose una reducción de la invasividad de alrededor un 50% en ambos casos.

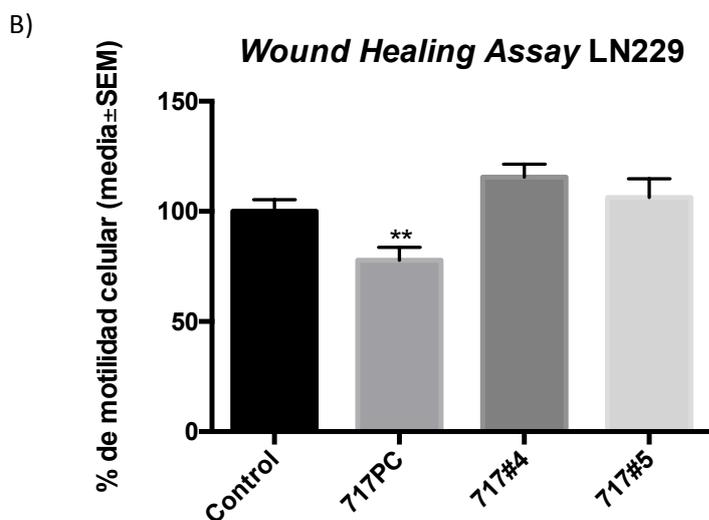
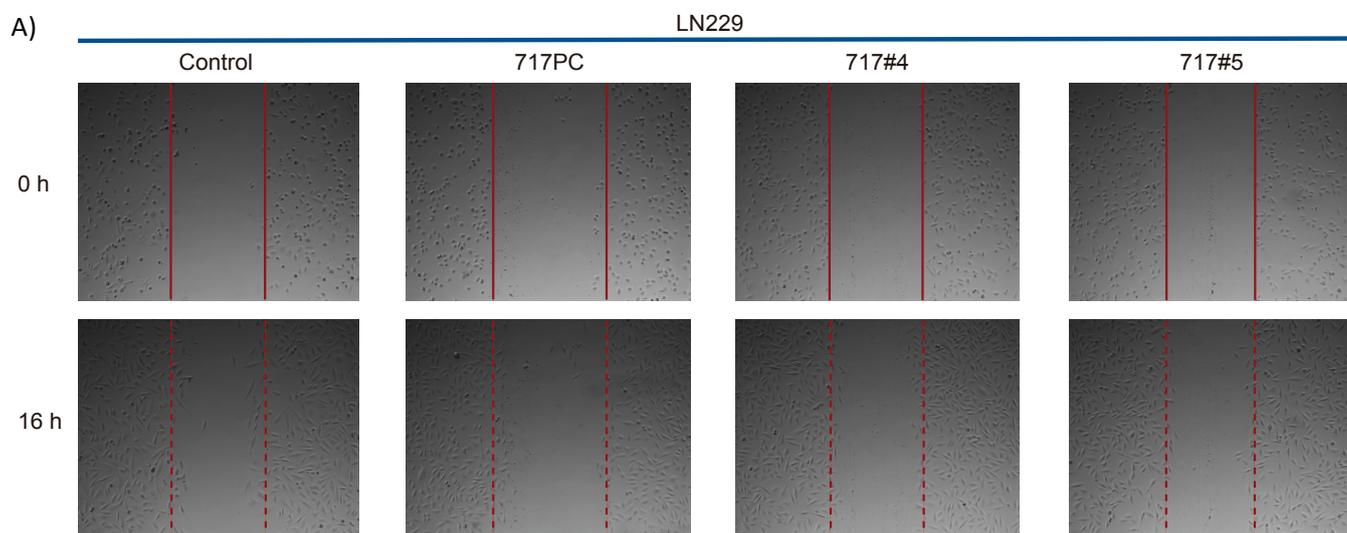
Por otro lado, en cuanto a la línea celular LN229 (figura 10), los efectos de RhoE sobre la invasión celular parecen ser inferiores, observándose diferencias significativas únicamente en el caso de la línea celular RhoE KD policlonal (717PC), con una reducción del 22.2% de la motilidad celular con respecto al control ( $p$ -valor  $< 0.01$ ). En cambio, en las líneas celulares RhoE KD monoclonales no se pudo detectar una reducción del cierre de la herida a las 16 horas con respecto al control ( $p$ -valor  $> 0.05$  en ambos casos). Sin embargo, esta línea celular se caracteriza por una migración más lenta que la de la línea celular U87MG, de forma que podría resultar de interés llevar a cabo ensayos a más largo plazo para determinar si la depleción de RhoE presenta un efecto significativo sobre la disminución de la motilidad celular en las LN229.



C)

U87MG	Control	305#2	305#3
Pocillos independientes	8	7	7
Campos fotográficos/pocillo	4	4	4
Total de células analizadas	5906	3848	4150

**Figura 9. Efecto de la depleción de RhoE sobre la motilidad celular en la línea celular U87MG.** A) Micrografías de contraste de fases de las líneas control y RhoE KD a las 0 y 16 horas tras hacer la herida. Las líneas rojas marcan los bordes de las heridas a las 0 h. B) Representación gráfica de los porcentajes de motilidad celular expresados como media±SEM, tomándose el control como el 100%. Los resultados se han obtenido de los contajes de 7 pocillos independientes (8 en el caso del control) cuantificando 4 campos fotográficos en cada caso C) Tabla de los datos obtenidos en los ensayos de motilidad celular. Las diferencias se consideran significativas respecto al control cuando el p-valor < 0.05 (\*), muy significativas cuando el p-valor < 0.01 (\*\*) y extremadamente significativas cuando el p-valor < 0.001 (\*\*\*) (*t-Student*).



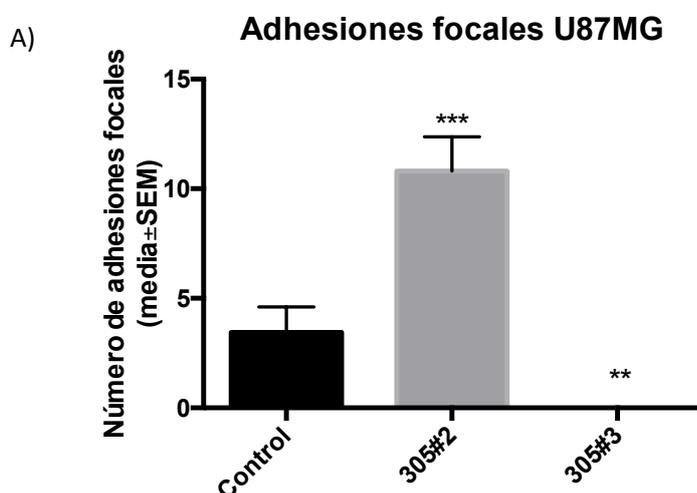
LN229	Control	717PC	717#4	717#5
<b>Pocillos independientes</b>	8	7	7	7
<b>Campos fotográficos/pocillo</b>	4	4	4	4
<b>Total de células analizadas</b>	2911	2498	2876	2809

**Figura 10. Efecto de la depleción de RhoE sobre la motilidad celular en la línea celular LN229.** A) Micrografías de contraste de fases de las líneas control y RhoE KD a las 0 y 16 horas tras hacer la herida. Las líneas rojas marcan los bordes de las heridas a las 0 h. B) Representación gráfica de los porcentajes de motilidad celular expresados como media±SEM, tomándose el control como el 100%. Los resultados se han obtenido de los contajes de 7 pocillos independientes (8 en el caso del control) cuantificando 4 campos fotográficos en cada caso C) Tabla de los datos obtenidos en los ensayos de motilidad celular. Las diferencias se consideran significativas respecto al control cuando el p-valor < 0.05 (\*), muy significativas cuando el p-valor < 0.01 (\*\*) y extremadamente significativas cuando el p-valor < 0.001 (\*\*\*) (*t-Student*).

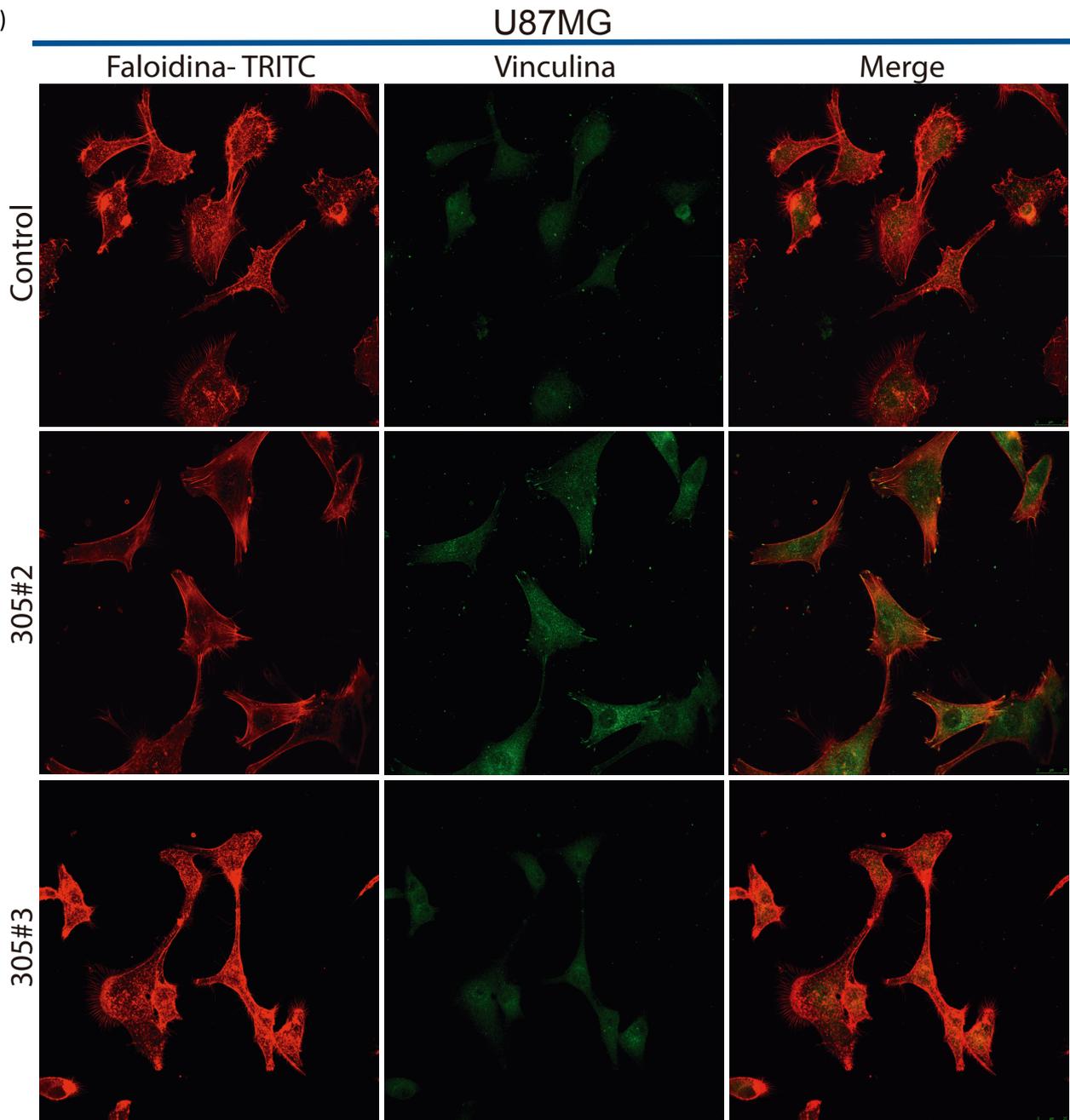
### Modificaciones en el citoesqueleto inducidos por el silenciamiento de RhoE

Con el fin de correlacionar la disminución de la motilidad celular inducida por el silenciamiento de RhoE con los cambios en el citoesqueleto de actina-miosina y en las adhesiones focales, se procedió a una tinción inmunocitoquímica. Para ello, se hizo uso de dos marcadores: faloidina-TRITC (la cual marca la actina polimerizada) y anticuerpos dirigidos contra la vinculina unidos a fluoresceína (marcaje de las adhesiones focales).

Como se puede apreciar en las figuras 11 y 12, la depleción de RhoE provoca cambios en la morfología celular y la estructura del citoesqueleto. Así, en el caso de la línea celular U87MG (figura 11), las células control presentan una morfología heterogénea, con la actina concentrada en la periferia celular y con una elevada cantidad de filopodios y lamelipodios que favorecen la invasión celular. Además, la mayoría de ellas carecen de adhesiones focales. En cambio, en el caso del clon 305#2, éste presenta una morfología más extendida con una mayor superficie de adhesión, así como una mayor cantidad de fibras de estrés y adhesiones focales que le confieren una menor capacidad invasiva. Sin embargo, el clon 305#3 no presenta cambios apreciables que indiquen una menor capacidad de invasión, pues las células observadas carecen de fibras de estrés y de adhesiones focales, además de que presentan una elevada cantidad de filopodios y lamelipodios, lo cual no concuerda con los resultados obtenidos en el *Wound Healing Assay*, en el cual se ha observado una disminución extremadamente significativa de la migración celular con respecto al control.



B)



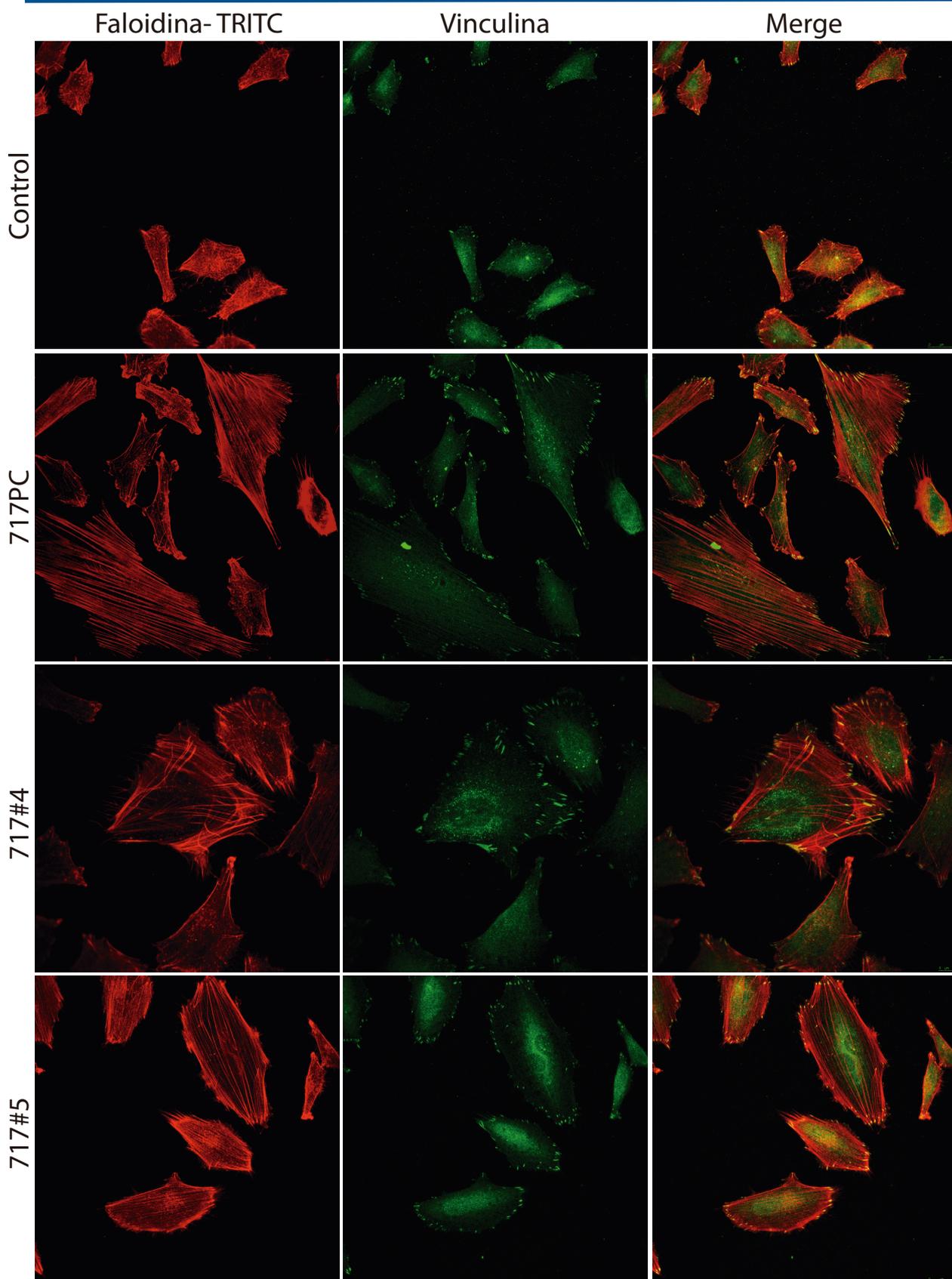
C)

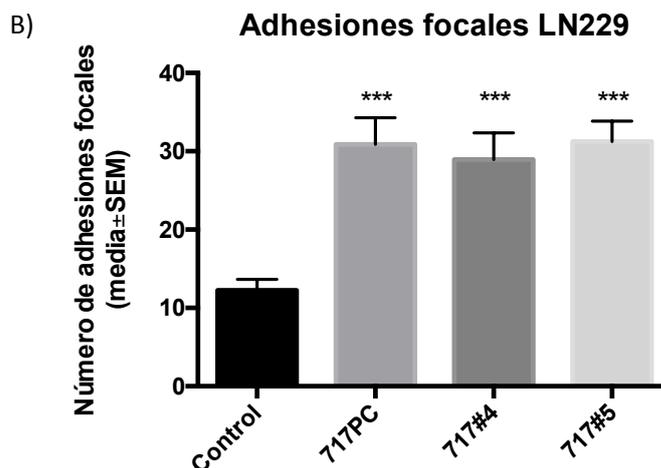
U87MG	Control	305#2	305#3
<b>% de células con fibras de estrés robustas</b>	4.11%	41.9%	0%
<b>Total de células analizadas</b>	73	43	75

**Figura 11. Modificaciones en la morfología celular y la estructura del citoesqueleto de actina-miosina como resultado del silenciamiento de RhoE en la línea celular U87MG.** A) Representación gráfica del número de adhesiones focales por célula (media±SEM). Número de células contadas por condición: control (N=65); 305#2 (N=37); 305#3 (N=71) B) Imágenes tomadas mediante microscopía confocal de células control y RhoE KD de la línea U87MG. Se muestran 3 canales: el primero se corresponde con la tinción de actina mediante faloidina-TRITC (rojo); el segundo se corresponde con el marcaje de la vinculina con fluoresceína (verde); y el último se obtiene como resultado de la superposición de los dos primeros canales (*merge*). La tinción inespecífica de la vinculina se considera un artefacto de la fijación del citoesqueleto con paraformaldehido<sup>33</sup> C) Tabla de los porcentajes de células con fibras de estrés robustas y número de células analizadas en cada caso. Las diferencias se consideran significativas respecto al control cuando el p-valor < 0.05 (\*), muy significativas cuando el p-valor < 0.01 (\*\*), y extremadamente significativas cuando el p-valor < 0.001 (\*\*\*) (*t-Student*).

A)

LN229





C)

LN229	Control	717PC	717#4	717#5
% de células con fibras de estrés robustas	22.7%	85.9%	75.0%	83.7%
Total de células analizadas	44	71	32	49

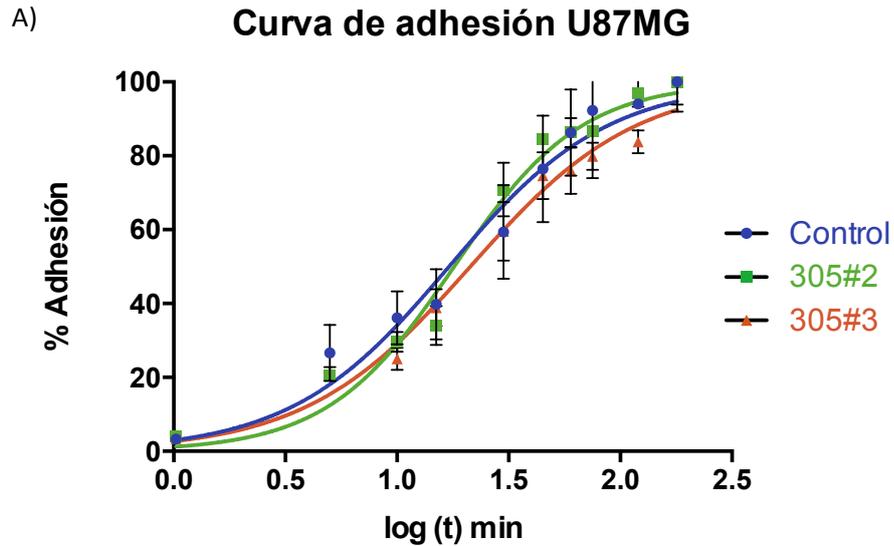
**Figura 12. Modificaciones en la morfología celular y la estructura del citoesqueleto de actina-miosina como resultado del silenciamiento de RhoE en la línea celular LN229.** A) Imágenes tomadas mediante microscopía confocal de células control y RhoE KD. Se muestran 3 canales: el primero se corresponde con la tinción de actina mediante faloidina-TRITC (rojo); el segundo se corresponde con el marcaje de la vinculina con fluoresceína (verde); y el último se obtiene como resultado de la superposición de los dos primeros canales (*merge*). La tinción inespecífica de la vinculina se considera un artefacto de la fijación del citoesqueleto con paraformaldehído<sup>33</sup> B) Representación gráfica del número de adhesiones focales por célula (media ± SEM). Número de células contadas por condición: control (N=38); 717PC (N=42); 717#4 (N=20); 717#5 (N=31) C) Tabla de los porcentajes de células con fibras de estrés robustas y número de células analizadas en cada caso. Las diferencias se consideran significativas respecto al control cuando el p-valor < 0.05 (\*), muy significativas cuando el p-valor < 0.01 (\*\*), y extremadamente significativas cuando el p-valor < 0.001 (\*\*\*) (*t-Student*).

En cuanto a las células de la línea LN229 (figura 12), a diferencia del control, que presenta una morfología epitelial, alargada y fina, los tres clones deplecionados en RhoE son más amplios y tienen una mayor superficie de adhesión, presentando además una mayor cantidad de adhesiones focales y de fibras de estrés, lo cual disminuye la capacidad invasiva de dichas células.

### Efectos de RhoE sobre la adhesión celular

Finalmente, se pretendió estudiar cómo afecta la depleción de RhoE a la adhesión inicial a la matriz extracelular mediada por los complejos focales, cuya formación está regulada por Rac. En una situación en la que disminuye la expresión de RhoE, incrementa la actividad de RhoA debido a que ya no es inhibida por dicha proteína. RhoA a su vez inhibe la actividad de Rac, de forma que disminuye la cantidad de lamelipodios y complejos focales, dificultándose así la unión inicial al sustrato. De esta forma, se esperaría que los clones RhoE *knockdown* tarden más en adherirse a la placa de 96 pocillos que las líneas control, lo cual se determinó mediante la realización de un ensayo de adhesión, midiéndose el tiempo medio de adhesión para cada tipo celular.

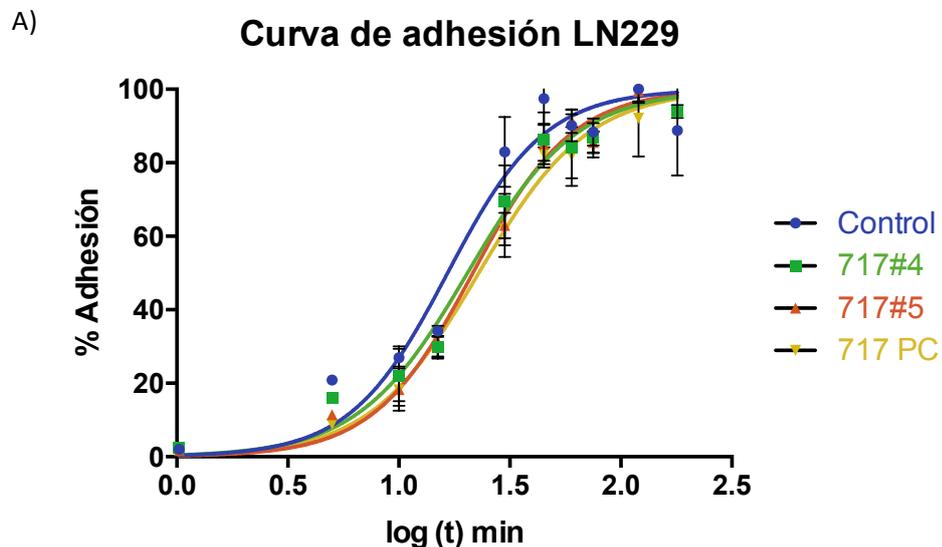
Como se puede observar en las figuras 13 y 14, tanto en la línea celular U87MG como en la línea LN229, se puede apreciar un aumento del tiempo medio de adhesión en los clones RhoE KD con respecto al control. Así, se ha podido ver una diferencia de hasta 6 minutos en el caso del clon 717#5, observándose una clara tendencia en el incremento del tiempo medio de adhesión con el silenciamiento de RhoE. Sin embargo, cada experimento se ha repetido una sola vez (a excepción del control de la línea celular U87MG, que se ha repetido 3 veces), de forma que harían falta más repeticiones para observar si se trata de una diferencia significativa.



B)

U87MG	Control	305#2	305#3
Tiempo medio de adhesión (min)	17.1 min	18.0 min	21.3 min

Figura 13. Cambios en la adhesión celular inducidos por el silenciamiento de RhoE. A) Representación gráfica del porcentaje de adhesión celular en función del logaritmo del tiempo en las líneas control y RhoE KD de U87MG. B) Tabulación de los tiempos medios de adhesión celular (min).



B) LN229	Control	717PC	717#4	717#5
Tiempo medio de adhesión (min)	16.6 min	22.9 min	20.4 min	21.5 min

**Figura 14. Cambios en la adhesión celular inducidos por el silenciamiento de RhoE.** A) Representación gráfica del porcentaje de adhesión celular en función del logaritmo del tiempo en las líneas control y RhoE KD de LN229. B) Tabulación de los tiempos medios de adhesión celular (min).

## Discusión

Los glioblastomas son los tumores de mayor malignidad conocidos hasta la fecha que afectan al SNC. Presentan una elevada incidencia, constituyendo más del 50% de todos los gliomas. Estos tumores se caracterizan por ser altamente invasivos, así como resistentes a los tratamientos disponibles hoy en día, derivándose de ello su elevada tasa de mortalidad<sup>2,3</sup>. De esta forma, existe un interés creciente en esclarecer las bases moleculares de estas neoplasias y en entender la causa primaria de su alta capacidad invasiva, para así avanzar en el campo de su diagnóstico y tratamiento, y mejorar la calidad de vida de los pacientes que padecen de esta patología.

Estudios anteriores llevados a cabo en este campo muestran que las vías implicadas en la regulación del citoesqueleto, y por lo tanto la motilidad celular, están alteradas en los gliomas, constituyendo mediadores importantes en la capacidad invasiva de estos tumores. Así, se ha observado un incremento de los niveles y la actividad de Rac1 a medida que aumenta el grado de malignidad de los astrocitomas, correlacionándose este aumento con la aparición del fenotipo invasivo de los glioblastomas. De la misma forma, se ha visto que la actividad de Cdc42 incrementa conjuntamente con la activación de Rac, y que la disminución del primero resulta en una reducción de la migración celular. Finalmente, en el caso de RhoA (una Rho GTPasa encargada de activar a la quinasa ROCK y por lo tanto la aparición de fibras de estrés), una disminución de esta proteína comporta una elevación en la capacidad invasiva de las células<sup>2</sup>.

Otra proteína perteneciente a esta familia que ha estado cobrando importancia en los últimos años es RhoE, un regulador de la dinámica del citoesqueleto y las adhesiones focales, entre otras acciones, siendo por lo tanto importante en el desarrollo de los glioblastomas<sup>2</sup>. Así, en el presente trabajo se ha perseguido el estudio de los efectos del silenciamiento de esta Rho GTPasa sobre la capacidad invasiva de los gliomas malignos, haciendo uso de diversos clones RhoE KD de las líneas celulares U87MG y LN229.

Durante el desarrollo de este trabajo se han podido observar una serie de cambios en la motilidad y morfología celular atribuibles a la depleción de RhoE. Así, en primer lugar, se llevó a cabo el análisis de la motilidad celular mediante un *Wound Healing Assay*, observándose una reducción significativa en la migración con el silenciamiento de RhoE en ambos clones de U87MG, mientras que en el caso de la línea celular LN229 sólo se observó una reducción significativa en uno de los tres clones analizados. Aún así, como ya se ha comentado anteriormente, la motilidad de esta línea celular es más lenta y uniforme que la de la línea celular U87MG, de forma que se debería repetir el ensayo usando tiempos más

prolongados para determinar si existe alguna diferencia en la migración celular como resultado de la depleción de RhoE en esta línea celular. Además, el hecho de que únicamente se hayan observado diferencias significativas en el clon 717PC con respecto al control podría deberse a que presenta una expresión de RhoE más reducida que los otros dos clones de LN229.

Cabe destacar que en estudios llevados a cabo por Klein *et al.* en células de melanoma que presentaban RhoE silenciado, se obtuvieron resultados semejantes a los descritos en este trabajo, observándose una reducción del 40-50% en la migración celular sobre Matrigel (una matriz comercial de composición semejante a la matriz extracelular) en comparación con los controles<sup>27</sup>, lo cual se vio confirmado por estudios posteriores llevados a cabo por los mismos investigadores<sup>28</sup>.

En concordancia con ello, los ensayos llevados a cabo mediante técnicas de inmunocitoquímica muestran que aquellas células deplecionadas en RhoE presentan una morfología más extendida, con una mayor cantidad de fibras de estrés y adhesiones focales, lo cual conduce a una menor capacidad invasiva. Estos cambios se pudieron observar en todos los clones RhoE KD analizados, a excepción del clon U87MG 305#3 que, contrariamente a lo esperado, no mostraba un incremento en las fibras de estrés e incluso presentaba una reducción significativa de las adhesiones focales con respecto al control, de forma que la disminución de la migración celular observada en el *Wound Healing Assay* no se puede atribuir al cambio en la estructura del citoesqueleto. Sin embargo, los sistemas biológicos son altamente variables, por lo que se debería repetir el experimento para confirmar los resultados. Además, si se compara el nivel de expresión de RhoE de este clon con el observado en el clon 305#2, vemos que la disminución de la expresión de dicha Rho GTPasa no es tan notable como en el caso del segundo, lo cual podría explicar parte de las diferencias observadas en el análisis mediante microscopía confocal. Por otra parte, debido a que en la generación de los clones *knockdown* se da la inserción del plásmido en el genoma nuclear, éste puede haber afectado a otros genes, sumándosele el hecho de que aún no se conoce del todo el papel de RhoE en los glioblastomas.

De forma semejante a lo observado en estos experimentos, en estudios llevados a cabo en líneas celulares de melanoma, se observó que la depleción de B-RAF, un regulador de RhoE en estas células, incrementa la formación de fibras de estrés y el tamaño de las adhesiones focales, reduciendo así la capacidad invasiva de estos tumores<sup>27</sup>. Posteriormente, estos mismos investigadores vieron que el silenciamiento de RhoE en estas líneas celulares promovía el aumento de la formación de fibras de estrés prominentes y adhesiones focales<sup>27,28</sup>. Consistente con ello, en un estudio muy reciente publicado este año, se vio que la sobreexpresión de RhoE en melanomas causada por la activación de una proteína (CD70, expresada también en glioblastomas) conduce a una desaparición de las fibras de estrés y las adhesiones focales, dando lugar a un fenotipo más invasivo<sup>29</sup>.

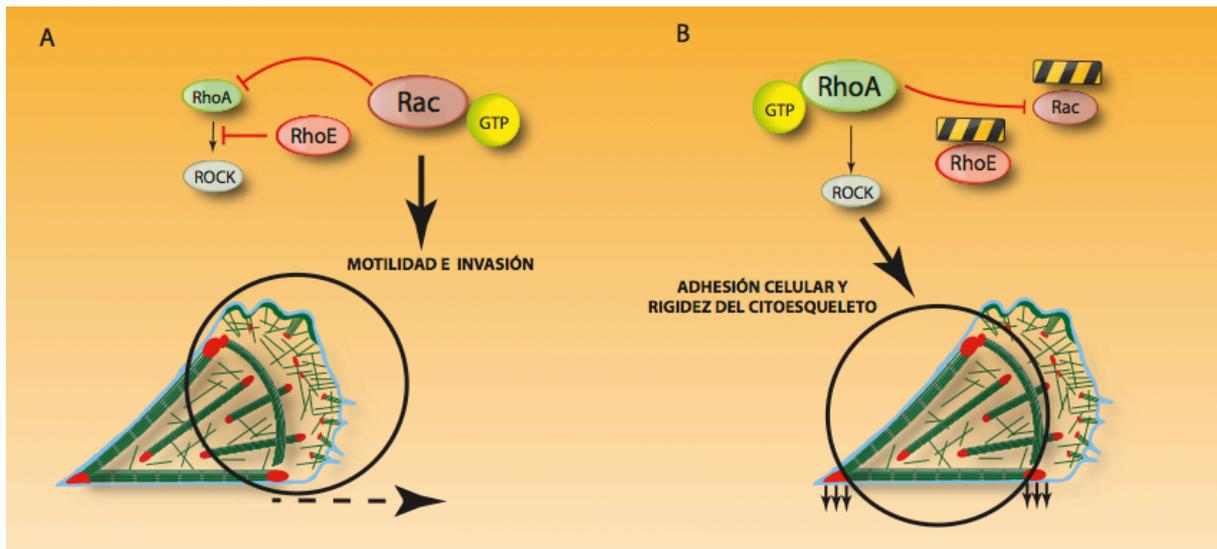
Por otro lado, durante la realización de este trabajo se publicó un artículo de investigación que describe el efecto de RhoE en células de glioblastoma (U87MG), observándose que el silenciamiento de esta proteína conduce a un fenotipo antitumoral en esta línea celular, con una reducción significativa en la capacidad invasiva. Además, también se detectó una

reducción en la expresión de los genes implicados en la comunicación celular y la remodelación de la matriz extracelular, procesos clave en el desarrollo de los glioblastomas<sup>30</sup>. Asimismo, en un estudio llevado a cabo por Poch *et al.*<sup>31</sup> en el que se sobreexpresaba RhoE en la línea celular U87MG, se observó que se producía la desorganización del citoesqueleto de actina y la adquisición de un fenotipo celular más redondeado, lo cual favorece la invasión.

Todos estos cambios observados en el citoesqueleto se explican por el hecho de que la depleción de RhoE retira la inhibición que ejerce éste sobre RhoA. De esta forma, RhoA puede activar a ROCK, la cual a su vez permite la fosforilación y activación de las cadenas ligeras de miosina, incrementando así las fibras contráctiles de actina-miosina y las adhesiones focales, lo cual reduce la capacidad de migración de las células tumorales y las hace menos invasivas<sup>2,15</sup>.

Por último, se llevó a cabo un ensayo de adhesión para determinar cómo afecta la depleción de RhoE a la plasticidad de las adhesiones focales. En los estudios llevados a cabo con melanomas comentados anteriormente, se observó que la disminución de la expresión de RhoE alteraba el recambio de las adhesiones focales, haciéndolas más estables. Así, se monitorizó la dinámica de estas adhesiones y se vio que mientras el control presentaba complejos focales que se ensamblaban y desensamblaban frecuentemente y que además se translocaban por la periferia celular, presentando una elevada plasticidad (lo cual podría estar mediado por Rac), las células que presentaban B-RAF silenciado y como consecuencia una expresión reducida de RhoE, presentaban adhesiones focales más estables y de un mayor tamaño<sup>27</sup>. Así, como la remodelación de las adhesiones focales es más lenta, se esperaría que la adhesión a la placa por parte de las células tras ser desenganchadas es más tardía en los clones RhoE KD con respecto al control. Efectivamente, como se ha podido observar en los resultados, el tiempo medio de adhesión es superior al de las células control, detectándose una clara tendencia en todos los clones analizados. Sin embargo, se trata de experimentos aislados, por lo que se deberían llevar a cabo más pruebas para confirmar estos resultados.

En definitiva, se puede afirmar que el silenciamiento de RhoE genera un fenotipo distinto al observado habitualmente en los glioblastomas, y todo apunta a que la depleción de esta proteína reduce la capacidad invasiva de las células analizadas, como se indica en la figura 15. Así, podría resultar de elevado interés seguir investigando en el papel de RhoE en la progresión tumoral y su posible rol como diana terapéutica en el tratamiento de los glioblastomas. Esta importancia de continuar con las investigaciones se refuerza además en el hecho de que hoy en día aún se desconoce en gran medida la implicación de esta Rho GTPasa en la carcinogénesis, pues se ha detectado una reducción de la expresión de RhoE en el cáncer de próstata, mientras que en el cáncer de páncreas, de pulmón y en los melanomas se ha observado una sobreexpresión de esta proteína<sup>28</sup>.



**Figura 15. Esquema del papel de RhoE en la regulación del citoesqueleto.** En la imagen A se muestra una situación en la que RhoE está activo, favoreciendo la motilidad e invasión celular. En la imagen B se puede observar una situación en la que se da la inhibición de RhoE y Rac, lo cual favorece la adhesión celular y la rigidez del citoesqueleto. Imagen cedida por el Dr. Guillem Ramis Munar, UIB.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten derivar las siguientes conclusiones:

1. El silenciamiento de RhoE reduce la motilidad celular en la línea celular U87MG y en uno de los tres clones RhoE KD analizados de LN229.
2. La depleción de RhoE incrementa la cantidad de fibras de estrés robustas y adhesiones focales en la línea celular LN229 y en el clon U87MG 305#2.
3. La disminución de la expresión de RhoE reduce la plasticidad de las adhesiones focales, aumentando por lo tanto el tiempo medio de adhesión a la placa en las líneas celulares U87MG y LN229.

De esta forma, se concluye que RhoE presenta una elevada importancia en la capacidad invasiva de los glioblastomas, constituyendo una posible diana terapéutica en el tratamiento de gliomas malignos.

## Bibliografía

1. Wensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol.* 2002;4(4):278-299. doi:10.1093/neuonc/4.4.278.
2. 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. doi:10.3389/fonc.2013.00241.
3. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol.* 2015;17(suppl 4):iv1-iv62. doi:10.1093/neuonc/nov189.
4. Glioma - MeSH - NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68005910>. Consultado Mayo 6, 2016.
5. Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(5):319-331. doi:10.1038/nrc2818.
6. Riemenschneider MJ, Jeuken JWM, Wesseling P, Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol.* 2010;120(5):567-584. doi:10.1007/s00401-010-0736-4.
7. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007;21:2683-2710. doi:10.1101/gad.1596707.
8. Collins VP. Brain tumours: classification and genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004;75(Suppl II):ii2-ii11. doi:10.1136/jnnp.2004.040337.
9. 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. doi:10.1007/s00401-007-0243-4.
10. American Brain Tumor Association. Tumor Grade. 2014. <http://www.abta.org/brain-tumor-information/tumor-grade/>. Consultado Abril 29, 2016.
11. Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, et al. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009;18(8):1061-1083. doi:10.1517/13543780903052764.
12. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007;170(5):1445-1453. doi:10.2353/ajpath.2007.070011.
13. 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. doi:10.3109/07357907.2011.630050.
14. Nakada M, Kita D, Watanabe T, et al. Aberrant signaling pathways in glioma. *Cancers (Basel).* 2011;3:3242-3278. doi:10.3390/cancers3033242.
15. Khalil BD, El-Sibai M. Rho GTPases in primary brain tumor malignancy and invasion. *J Neurooncol.* 2012;108(3):333-339. doi:10.1007/s11060-012-0866-8.
16. Riou P, Villalonga P, Ridley AJ. Rnd proteins: multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression. *BioEssays.* 2010;32(11):986-992. doi:10.1002/bies.201000060.
17. Riento K, Villalonga P, Garg R, Ridley A. Function and regulation of RhoE. *Biochem Soc Trans.* 2005;33(Part 4):649-651. doi:10.1042/BST0330649.
18. Jie W, Andrade KC, Lin X, Yang X, Yue X, Chang J. Pathophysiological Functions of Rnd3/RhoE. *Compr Physiol.* 2016;6(January):169-186. doi:10.1002/cphy.c150018.
19. Livne A, Geiger B. The inner workings of stress fibers - from contractile machinery to focal adhesions and back. *J Cell Sci.* 2016;129(7):1293-1304. doi:10.1242/jcs.180927.
20. Zaidel-Bar R, Cohen M, Addadi L, Geiger B. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans.* 2004;32(Pt3):416-420. doi:10.1042/BST0320416.
21. Chardin P. Function and regulation of Rnd proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(1):54-62. doi:10.1038/nrm1788.
22. U-87 MG ATCC ® HTB-14™ Homo sapiens brain glioblastoma. [http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-14.aspx?geo\\_country=es#characteristics](http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-14.aspx?geo_country=es#characteristics). Consultado Febrero 7, 2016.
23. LN-229 ATCC ® CRL-2611™ Homo sapiens brain glioblastoma. <http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2611.aspx#>. Consultado Marzo 6, 2016.
24. Clark MJ, Homer N, O'Connor BD, et al. U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS Genet.* 2010;6(1):e1000832. doi:10.1371/journal.pgen.1000832.
25. Lanzini F, Domann FE, Kosmacek EA, Phillips SL, Mackey MA. Human glioblastoma U87MG cells transduced with a dominant negative p53 (TP53) adenovirus construct undergo radiation-

- induced mitotic catastrophe. *Radiat Res.* 2007;168(2):183-192. doi:10.1667/0033-7587(2007)168[183:HGUCTW]2.0.CO;2.
26. Promega. CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Protocol. <https://www.promega.es/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol/>. Consultado Febrero 23, 2016.
  27. Klein RM, Spofford LS, Abel E V, Ortiz A, Aplin AE. B-RAF regulation of Rnd3 participates in actin cytoskeletal and focal adhesion organization. *Mol Biol Cell.* 2008;19(2):498-508. doi:10.1091/mbc.E07-09-0895.
  28. Klein RM, Aplin AE. Rnd3 regulation of the actin cytoskeleton promotes melanoma migration and invasive outgrowth in three dimensions. *Cancer Res.* 2009;69(6):2224-2233. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3201.
  29. Pich C, Sarrabayrouse G, Teiti I, et al. Melanoma-expressed CD70 is involved in invasion and metastasis. *Br J Cancer.* 2016;114(1):63-70. doi:10.1038/bjc.2015.412.
  30. Clarke K, Daubon T, Turan N, et al. Inference of Low and High-Grade Glioma Gene Regulatory Networks Delineates the Role of Rnd3 in Establishing Multiple Hallmarks of Cancer. *PLoS Genet.* 2015;11(7):e1005325. doi:10.1371/journal.pgen.1005325.
  31. Poch E, Miñambres R, Mocholí E, et al. RhoE interferes with Rb inactivation and regulates the proliferation and survival of the U87 human glioblastoma cell line. *Exp Cell Res.* 2007;313(4):719-731. doi:10.1016/j.yexcr.2006.11.006
  32. Santa Cruz Biotechnology. Gene Silencers. 2016. [http://www.scbt.com/gene\\_silencers.html](http://www.scbt.com/gene_silencers.html). Consultado Febrero 7, 2016.
  33. Wiggan O, Hamel PA. Pax3 regulates morphogenetic cell behavior in vitro coincident with activation of a PCP/non-canonical Wnt-signaling cascade. *J Cell Sci.* 2002;115(3):531-541.