

Central
Biblioteca
21

PAPEL DE LA GTPasa RHOA EN LA INVASIÓN TUMORAL DE
CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS.

Tesis entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular

Facultad de Ciencias
Mónica Andrea Cáceres Lluch.



Director de Tesis Dr. Jorge Martínez W.

UCH-FC
Biotecnología
C 118
C-1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



“PAPEL DE LA GTPasa RHOA EN LA INVASION TUMORAL DE CÉLULAS EPITELIALES”

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

MONICA ANDREA CACERES LLUCH

Director de Memoria de Título
Dr. Jorge Martínez Winkler

Handwritten signature of Jorge Martínez Winkler in black ink, written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Miguel Allende Connelly
Presidente Comisión

Handwritten signature of Miguel Allende Connelly in blue ink, written over a horizontal line.

Dr. Cristian González Billault

Handwritten signature of Cristian González Billault in blue ink, written over a horizontal line.

AGRADECIMIENTOS

Hace 2 años murió uno de mis grandes amigos de cáncer, sus ganas de vivir hicieron que estuviera con nosotros el mayor tiempo posible. Meses después, mi director de tesis Dr. Jorge Martínez, había aceptado que trabajara junto a él en su laboratorio de Biología celular del INTA. Solo me queda agradecerle por su apoyo y formación científica durante todo este tiempo.

A todos mis compañeros del laboratorio, quienes hicieron mas grato el transcurso de mi tesis, sobre todo a Javier y Juan Francisco, porque siempre estuvieron ahí para responder alguna duda que me fuera surgiendo.

Agradezco a mis padres y mi hermano por su amor incondicional a lo largo de mi vida.

A los que creyeron que esta tesis resultaría perfecta.

INDICE

• RESUMEN	1
• INTRODUCCIÓN	5
El problema general.....	5
La adhesión focal.....	7
GTPasas de la familia Rho.....	8
Hipótesis.....	11
Objetivo General.....	11
Objetivos específicos.....	11
• MATERIALES	12
Instrumentos y equipos.....	12
Reactivos.....	12
Anticuerpos generales.....	13
Inhibidores.....	13
• METODOS	14
1. Cultivo celular.....	14
2. Método de transfección.....	15
3. Separación de la GTPasa activa.....	16
4. Western Blot.....	17
5. Fraccionamiento por solubilidad a detergente.....	18
6. Inmunoprecipitación.....	19
7. Zimografías.....	19
8. Ensayo de adhesión.....	20
9. Estiramiento celular.....	22
10. Inmunofluorescencia.....	22
11. Ensayo de adhesión.....	23
• RESULTADOS	24
I Obtención de células que sobre-expresan RhoA activo.....	24

II Caracterización de las células transfectadas.....	26
II.1 Caracterización del citoesqueleto de Actina.....	26
II.2 Expresiones de Vinculina y Actina.....	29
III. Adhesión focal.....	30
III.1 Efecto de Y-27632 sobre la adhesión celular.....	31
III.2 Estiramiento celular.....	32
III.3 Efecto de Y-27632 sobre la morfología celular y la polimerización Actina.....	34
III.4 Quinasa de adhesión focal.....	35
III.5 Localización y expresión de Cad-E.....	36
IV Capacidad de invasión.....	37
IV.1 Expresión de marcadores de malignidad.....	38
IV.1.1 Activación de EGFR.....	38
IV.1.2 Localización de proteínas fosforiladas en tirosinas.....	40
IV.1.3 Producción de proteasas tumorales.....	41
IV.1.4 Activación de ERK1,2.....	42
V Efecto de inhibidores específicos sobre la expresión de marcadores de malignidad.....	43
V.1 Efecto de inhibidores específicos en la ruta de ERK1,2 y la producción de uPA.....	44
V.2 Efecto del inhibidor Y-27632 sobre la activación de ERK1,2 y la secreción de uPA.....	45
V.3 Efecto de Y-27632 en la activación de EGFR.....	46
V.4 Efecto de Y-27632 sobre el patrón de proteínas fosforiladas en tirosinas.....	47
• DISCUSIÓN	48
• CONCLUSIONES	56
• BIBLIOGRAFÍA	60

Lista de Abreviaturas

BSA	Albúmina de suero bovino
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EDTA	Ácido Etilen- diamino- Tetra-acético.
Fn	Fibronectina
IPTG	Isopropil- beta-tiogalactosidasa
NaCl	Cloruro de Sodio
MEC	Matriz extracelular
NaF	Fluoruro de Sodio
PMSF	Fenil-metil-sulfonil- fluoruro
rpm	Revoluciones por minuto
PBS	Tampón fosfato salino
SDS	Dodecilsulfato de sodio

Técnicas

PAGE	Electroforesis en geles de acrilamida
IF	Inmunofluorescencia
IP	Inmuprecipitación

Lista de figuras

1. Inmunofluorescencia para RhoA en células controles y células transfectadas con la versión activa de RhoA.
2. Pull Down de las células controles y células transfectadas RhoGTP.
3. Inmunofluorescencia para Actina y Vinculina de una célula control y una RhoGTP.
4. IF para Actina y Vinculina de un conjunto de células controles y células RhoGTP.
5. Expresión de Actina y Vinculina en células controles y RhoGTP.
6. Fraccionamiento por solubilidad a Tritón X-100 de Actina y Vinculina.
7. Adhesión a distintas matrices durante 90 minutos de células controles y RhoGTP.
8. Adhesión a tiempos de 45, 90 y 200 minutos sobre matrices de Fn, Colágeno y MEC SaOS.
9. Efecto del inhibidor de ROCK (Y-27632) en la adhesión celular.
10. Estiramiento celular en condiciones normales y con el inhibidor Y-27632.
11. Inmunofluorescencia para F-Actina en células adheridas controles y RhoGTP en presencia y ausencia de Y-27632.
12. Inmunoprecipitación de FAK en condiciones basales en células controles y RhoGTP.
13. IP de FAK en células controles y RhoGTP durante un tiempo de adhesión de 4 horas.
14. Localización y expresión de Cad-E en células controles y RhoGTP.

15. Ensayo de Invasión en células controles y RhoGTP.
16. Inmunoprecipitación de EGFR en ambos tipos celulares.
17. IF para fosfo-tirosina y colocación de esa marca con Actina , en ambos tipos celulares.
18. Producción de MMP-9 y MMP-2 en los medios condicionados de células controles y RhoGTP.
19. Actividad y expresión de uPA en los medios condicionados por células controles y RhoGTP.
20. Activación de ERK1,2 en condiciones basales en ambos tipos celulares.
21. Activación de ERK1,2 en células controles y RhoGTP no adheridas a sustrato (suspensión).
22. Efecto los distintos inhibidores específicos de la ruta ERK1,2 sobre la producción de uPA.
23. Efecto de Y-27632 sobre la activación de ERK1,2 y la secreción de uPA.
24. Efecto de Y-27632 sobre la activación del Receptor de EGF en células controles y RhoGTP.
25. Inmunofluorescencia para fosfo-tirosina y F-Actina en células controles y RhoGTP adheridas durante 24 horas en condiciones normales y en presencia de Y-27632 durante 30 minutos.

RESUMEN

La expresión de propiedades malignas en células epiteliales supone la puesta en marcha de una serie de cambios fenotípicos, que confieren a las células propiedades específicas que permiten la migración y degradación de matrices, características funcionales que constituyen un atributo propio de las células metastásicas. La adquisición de propiedades migratorias implica la reorganización del citoesqueleto de Actina a través de un fenómeno regulado por las GTPasas de la familia Rho.

En el presente trabajo, utilizando una línea celular mamaria poco invasiva (MCF-7) estudiamos el efecto de la sobre-expresión de la versión activa de RhoA en una gama de propiedades funcionales comprometidas en la malignidad celular. Nuestros datos muestran que las células transfectadas (RhoGTP) expresan un mayor potencial invasivo asociado a una menor adhesividad a diferentes matrices, una disminución de la activación de la quinasa de adhesión focal y un aumento en la expresión de proteasas tumorales como uPA y MMP-9. La sobre-expresión de Rho-GTP también implica un importante aumento en la polimerización de Actina cortical y la co-localización de esta molécula con Vinculina.

Del mismo modo, las células RhoGTP expresan un nivel basal aumentado de activación de EGFR y en consecuencia de ERK1,2. La inhibición de la quinasa responsable de la auto-activación de EGFR trae como consecuencia el bloqueo en la producción de uPA, lo que permite sugerir que la expresión de la proteasa es regulada por una ruta de señalización que incluye a EGFR y ERK1,2.

La inhibición de la actividad de la quinasa ROCK, efector preferente de RhoA bloquea el efecto de la sobre-expresión de Rho-GTP sobre la adhesión y el estiramiento celular como también la activación del receptor de EGF, la activación de ERK1,2 y la producción de uPA. Este hallazgo sugiere que los cambios en el citoesqueleto regulados por el par Rho-ROCK activan una ruta de señalización que, previa activación del receptor de EGF, provoca un cambio fenotípico que incluye el aumento en la expresión de uPA y la activación de la ruta de las MAP quinasas.

ABSTRACT

The expression of malignant properties in epithelial cells involves a whole sequence of phenotypic changes which give these cells some specific characteristics that allow migration and matrix degradation, two properties typical of metastatic cells. The acquisition of migratory properties involves a complete rearrangement of the actin cytoskeleton regulated by GTPases of the Rho family.

In this work we use a mildly invasive mammary tumor cell line (MCF-7) to study the effect of over-expression of the active version of RhoA (RhoGTP) in a set of functional properties involved in cellular malignancy.

Our data suggest that transfected cells (RhoGTP) express a higher invasive potential associated with a lower adhesivity to a variety of matrices, a decrease in the activation of Focal Adhesion Kinase (FAK) and an increase in the expression of tumoural proteins as uPA and MMP-9. The over-expression of Rho-GTP also involves a significative increase in cortical actin polymerization and its co-localization with vinculin.

In this direction, Rho-GTP cells express a higher basal activation level for EGFR and consequently, for ERK1,2. The inhibition of the kinase which is responsible of self-activation of EGFR blocks the production of uPA allowing us to suggest that expression of this protease is regulated by a signaling pathway which includes EGFR and ERK.

The inhibition of the ROCK kinase activity which is a primary effector of RhoA blocks the effect of over-expression of Rho-GTP over adhesion and cellular stretching as well as activation of its receptor, ERK1,2 activation and uPA production. This finding suggests that cytoskeleton rearrangement regulated by Rho-ROCK activates a signaling pathway which together prior activation of EGF receptor, generates a phenotypic change that includes the increase in uPA expression and the activation of the MAP kinase pathway.

INTRODUCCIÓN

Problema general

Un porcentaje mayoritario de los cánceres humanos corresponden a carcinomas, es decir, afectan a células epiteliales (1). En Chile el cáncer de mama corresponde al 17% del total de casos de cáncer que afectan a las mujeres y en los últimos años ha ido aumentando desde 7,5 mujeres por cada 10.000 a 12,5 mujeres (INE).

En los estados avanzados de la enfermedad, las células que proceden de un carcinoma *in situ* pierden muchas de sus propiedades epiteliales (2). Por ejemplo, pierden su adhesión y posición restringida dentro de un tejido organizado, su polaridad, adquieren la propiedad de dirigirse hacia localizaciones adyacentes y desarrollan la capacidad de invadir territorios distantes (3). Una de las propiedades que determinan la capacidad invasiva la constituye la producción de proteasas que degradan la MEC (4). Este concepto de célula invasiva-célula degradadora ha sufrido modificaciones con la descripción (para la familia de serín-proteasas de uroquinasa) de receptores de membrana donde la enzima (uPA) localizaría su actividad proteolítica pericelular y además activaría una ruta de señalización que, dependiendo del tipo celular, constituiría un estímulo para la proliferación o la migración (5). De este modo, el receptor de uPA (uPAR) pasa a cumplir una función clave en el proceso metastásico dado su potencial de unir uPA generada desde diversas fuentes y desencadenar un conjunto de reacciones que estimulan la expresión del fenotipo

invasivo, razón por la que se otorga a su expresión un potencial de mal pronóstico (6).

El proceso mediante el cual la célula adquiere propiedades migratorias se conoce con el nombre genérico de Transición Epitelio – Mesénquima (TEM). Este fenómeno está relacionado con la modulación de propiedades funcionales que permitan que la célula invasiva se movilice y sobreviva en un ambiente distinto al que le dio origen. De este modo, junto con la reestructuración del citoesqueleto que permitiría la movilización, se producen también, como parte de la TEM, una reorganización de complejos de adhesión y cambio en el patrón de expresión de la maquinaria invasiva – degradativa que caracteriza a la célula metastásica (3,7).

La degradación de la matriz extracelular es un proceso necesario tanto para la migración de las células endoteliales y mesenquimales, como para la invasión y metástasis tumoral a distancia. Junto a las proteasas de la familia uroquinasa, la de las metaloproteasas, que incluyen las colágenasas, gelatinasas A y B (MMP-9 de 92 KDa), metaloelastasa, estromelesina y matrisilina también desempeñan una función clave en el proceso invasivo tumoral (4).

La expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) se ha asociado también a los estados avanzados de tumores específicos como el de mama (8). En nuestro laboratorio hemos descrito recientemente que la unión de uPA a su receptor provoca la transactivación de EGFR a través de un mecanismo que incluye el procesamiento de un ligando insoluble de EGFR por una metaloproteína de membrana. Esta reacción permite el inicio de una ruta señalización que activa MAP quinasas y estimula la migración celular (Guerrero et al 2004). Es importante

destacar que en células mamarias invasivas ambos receptores se encuentran sobre-expresados por lo que se asume que este mecanismo juega un papel central en la mantención del fenotipo invasivo (9).

La adhesión focal

La adhesión celular a moléculas de matriz se realiza a través de la interacción de la MEC con un complejo de proteínas estructurado en la membrana celular en torno a receptores específicos de adhesión, como las integrinas y a un conjunto de proteínas cuya función se define en el establecimiento de una interacción entre el microambiente extracelular y el citoesqueleto de Actina (10). Las integrinas en contacto con la MEC se agrupan formando un complejo supramolecular con proteínas asociadas a citoesqueleto (Talina, Vinculina, α Actinina) y numerosas moléculas de señalización (c-Src, FAK, P130cas y Paxilina) (11).

En la mayoría de las células, los componentes descritos en el párrafo anterior constituyen las adhesiones focales, estructuras dinámicas que se ensamblan, dispersan y reciclan permitiendo que la célula se adhiera, cambie de forma y, eventualmente, migre. El ensamblaje y desensamblaje de estas estructuras requiere de la regulación coordinada de las GTPasas de la familia Rho, a través de la interacción con las integrinas y numerosos receptores de adhesión como Cadherinas, presentes en las uniones célula - célula, moléculas de adhesión celular (CAM), receptores acoplados a proteínas G y receptores con actividad tirosina quinasa (11,12).

Uno de los componentes moleculares de mayor importancia en la adhesión focal lo constituye la quinasa de adhesión focal (FAK), una tirosina quinasa asociada a integrinas que se activa en respuesta al estímulo adhesivo. Como resultado de la fosforilación de FAK se activa una ruta de señalización que es responsable en gran medida de la regulación de la motilidad celular y la adhesión (13,14).

GTPasa de la familia Rho

Los cambios de forma que permiten la adquisición del fenotipo móvil suponen cambios en la organización del citoesqueleto de Actina que dependen de la activación de una familia de proteínas importantes en la señalización celular conocidas como GTPasas de la familia *Rho* (15).

Las GTPasas de la familia Rho son parte de la superfamilia Ras, la cual está formada por más de 100 pequeñas proteínas monoméricas (20-30 KDa) de unión al nucleótido guanina, entre ellas están : Ras, Rho, Arf, Rab, Ran y Rad. Dentro de los miembros de la familia Rho, se encuentran Rho (A-H), Rac y Cdc42 (16). Los miembros más relevantes de esta familia son:

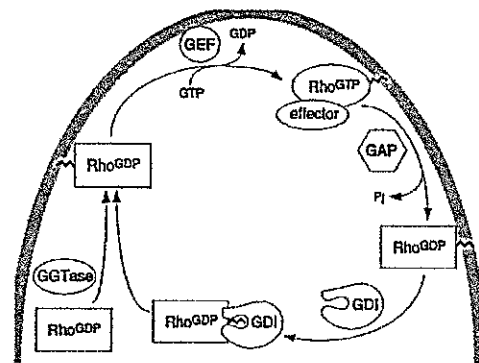
Rac, cuya activación está asociada a la formación de lamelipodios y es responsable de la motilidad celular, polimerización de actina y la adhesión célula-célula mediada por cadherina.

Cdc 42, que participa en la formación de filopodios, la adhesión célula-célula, la desaparición de las fibras de estrés (usando como efector a PAK) .

Rho, que ha sido implicada en la formación de fibras de estrés y adhesiones focales, morfología celular, agregación celular, motilidad celular, contracción de músculo esquelético y citoquinesis (17,18).

La forma activa de Rho (Rho unido a GTP) tiene como uno de sus efectores a Rho-quinasa, (ROCK) que inhibe la actividad de la miosin fosfatasa, lo que resulta en un aumento de la fosforilación de la cadena liviana de miosina, promoviéndose el empaquetamiento de F-actina en fibras de estrés y la subsiguiente formación de adhesiones focales (19,20). Otro de los efectores de Rho es Rhoquinasa, cuya función aun se desconoce, pero cuyo dominio de unión a Rho se utiliza para medir por afinidad la fracción de Rho-GTP.

RhoA, es una proteína de la familia Rho que tiene un peso de 21 KDa y en la célula oscila entre dos conformaciones extremas: una activa unida a GTP y otra inactiva que une a GDP. EL ciclo entre la conformación activa y la inactiva está regulada por factores de intercambio



GDP/GTP (**GEF**), proteínas que favorecen la conversión hacia la forma activa y proteínas del tipo **GAP** que estimulan la propiedad GTPasa intrínseca permitiendo la conversión al estado inactivo. También moléculas del tipo **GDI** estabilizan la forma inactiva de la GTPasa al inhibir la disociación de GDP (21).

Se le ha asignado a RhoA una variedad de funciones, entre las que podemos citar: el control de la adhesión celular, la formación de fibras de estrés, la motilidad, a través de la organización del citoesqueleto de Actina y la regulación de la contractilidad de la actomiosina (22).

La función específica de esta proteína es muy dependiente del contexto celular y en células tumorales es muy controversial. Así, se ha demostrado que la

disminución de RhoA tiene dos efectos opuestos: promover la migración al disminuir la adhesión y también disminuir la migración por inhibición de la contracción (23).

La relación entre la actividad de Rho y FAK se ha estudiado en células mutantes embrionarias de ratón que no expresan FAK. En estas células se ha observado un aumento en el número de contactos focales y una actividad supresora de FAK sobre la actividad de RhoA que promueve la adhesión focal (24,25). La activación de FAK se produce por fosforilación de residuos de tirosina como resultado de la interacción del extremo aminoterminal de la molécula con el tallo citoplasmático de la cadena β de integrinas (26). Temporalmente la fosforilación de FAK coincide con el estiramiento (spreading) de las células (25). Se ha demostrado que inhibidores de la polimerización del citoesqueleto bloquean la fosforilación de FAK.

En el presente trabajo, se realizaron experimentos para demostrar el papel de la GTPasa RhoA en la adquisición de propiedades malignas en células epiteliales mamarias humanas débilmente invasivas (MCF-7), que si bien aún conservan características de células epiteliales (expresan el receptor de estrógenos), de igual manera muestran débilmente rasgos de célula invasiva.

Dado que se ha sugerido que en los tumores de mama invasivos es posible detectar una sobre-expresión de RhoA (27) transfectamos células MCF-7 con la versión activa de RhoA, de modo de obtener células con ésta proteína sobre-expresada y analizar los cambios funcionales que conlleva esta intervención.

Hipótesis

La conducta migratoria de las células epiteliales está modulada por los niveles de activación de la GTPasa RhoA. La expresión de la forma activa de RhoA en células débilmente invasivas tiene como consecuencia la adquisición de un fenotipo invasivo que secreta niveles aumentados de proteasas tumorales.

Objetivo General

Demostrar que la expresión de la forma activa de RhoA en células mamarias, afecta la funcionalidad de la célula hacia una configuración celular más invasiva que expresa niveles aumentados de proteasas tumorales.

Objetivos específicos

1. Obtener células transfectadas con la versión activa de RhoA (V14 RhoA).
2. Evaluar la actividad de RhoA, mediante ensayos de pull-down.
3. Caracterizar la organización del citoesqueleto de Actina.
4. Analizar los contactos focales en relación a la adhesión y su composición.
5. Evaluar la conducta invasiva, la capacidad productora de proteasas tumorales y la expresión de moléculas que caracterizan al fenotipo invasivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Instrumentos y equipos

Los instrumentos y equipos utilizados para realizar todos los procedimientos necesarios para dar respuesta a la hipótesis planteada son: Campana de bioseguridad forma Scientific modelo 1129, incubador Lab-Line CO₂ automático, cámaras de transferencia Bio-Rad, centrifuga Biofuge prime R Heraeus, liofilizador Savant modelo RT 100A, microscopio de fluorescencia Nikon labophot-2, microscopio invertido de contraste de fase Nikon modelo TMS-F y lector de ELISA modelo Elx-806. Además se utilizó el Programa Kodak Digital Science, 1D Image Análisis Software versión 3.0 para el análisis densitométrico de las bandas obtenidas por Western Blot.

Reactivos

- DMSO, Hepes, MTT, NEM, Temed, β -mercaptoetanol, Albumina de Suero Bovino (BSA), Glicina, TEMED, Tris, Acrilamida, Bis-acrilamida, Agarosa, Glutation Sepharosa, Acido Lisofosfatidico (LPA) y Ortovanadato de sodio (SIGMA).
- Formaldehído, Glicina, Dodecil sulfato de sodio (SDS), Cloruro de sodio, Bicarbonato de Sodio, Cloruro de Magnesio, Cloruro de Potasio, Fosfato dibásico de Potasio, (Merck Damstadt, Alemania).
- Metanol y Ácido acético (TCL).
- Membranas PDVF y estándar de peso molecular preteñido broad range (BioRad).
- Antibióticos Penicilina - Estreptomina y Fungizona (BiosChile).
- Leupeptina hemisulfato, Pepstatina A (US Biological).

Anticuerpos generales:

- **Monoclonales:** anti RhoA ratón (cytoskeleton) , anti CD87 (uPAR) ratón (Pharmingen), anti P-ERK1,2 ratón (Santa Cruz), anti P-Tyr ratón (Santa Cruz), anti Vinculina ratón (Sigma), anti EGF-R (donado por el Dr. Alfonso González, PUC), anti β Actina ratón (Sigma), anti uPA ratón (Oncogene), y anti ratón conjugado con peroxidasa IgG (Rockland).
- **Policlonales:** anti Cad-E (Calbiochem), anti FAK conejo (Santa Cruz), anti ERK 1,2 conejo (Santa Cruz), anti C-Src conejo (Santa Cruz) y anti conejo conjugado con peroxidasa (Rockland).
- **Para inmunofluorescencia :** Alexa fluor 594 Falloidina-rodamina (Molecular Probes), anti ratón conjugado con FITC (Rockland) y anti conejo conjugado a FITC (Sigma).

Inhibidores:

Inhibidor de Rho-kinasa Y-27632 (Mitsubishi Pharma Corp), inhibidor de la actividad tirosina quinasa del receptor de EGF AG1478 (Calbiochem), inhibidor de Src PP2 (Calbiochem) e inhibidor de tirosinas quinasas Genisteína (Sigma).

Métodos

1. Cultivo celular

Células MCF-7 (adquiridas en ATCC¹, Manassas, VA, USA) fueron cultivadas en ambiente húmedo con 5% de CO₂, con medio de cultivo DMEM-F12 (Sigma) suplementadas con 10% de suero fetal bovino (Gibco) con una dosis de Gentamicina de 2mg/L (Best Pharma) que se renovó cada dos días.

Células osteoblásticas SaOS también compradas en ATCC fueron cultivadas en las mismas condiciones que las MCF-7.

Las células se subcultivaron antes que alcanzaran la confluencia por tratamiento con Tripsina-EDTA (Gibco) seguida de una corta incubación con suero fetal para frenar la actividad proteolítica.

Crio-preservación de las células:

Las células se liberaron de la placa con tripsina-EDTA (Gibco), en la cual se agregaron 4 volúmenes del medio de cultivo y se centrifugaron durante 5 minutos a 1800 rpm. El pellet resultante se resuspendió con mezcla de criopreservación (90% suero fetal bovino y 10% DMSO) a una densidad de 1×10^6 células/mL. Se distribuye 1 mL de la solución en criotubos rotulados y se congela mediante el descenso gradual de la temperatura hasta alcanzar -196 °C. Las células criopreservadas se almacenan sumergidas en el N₂ líquido.

¹ American Type Culture Collection

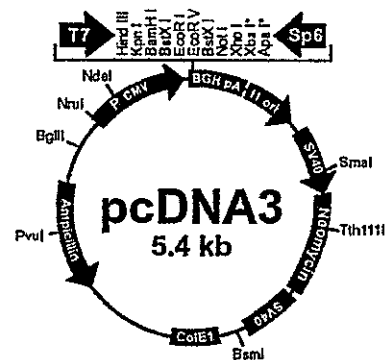
2. Método de transfección:

Para este procedimiento se utilizaron 400.000 células que fueron transfectadas con 2µg del vector pcDNA3 (5.4kb) que contenía el cDNA de la proteína RhoA activa ubicado entre sitio de restricción Bam H1 y Eco R1 del vector o el vector vacío (grupo control). Para la transfección se utilizó el método de Lipofectamina 2001 (Invitrogen) mediante el cual se incubaron las células por 6 horas con la mezcla DNA : Lipofectamina en una proporción 1:2.

Para transfecciones transitorias, luego de la incubación con la mezcla DNA-Lipofectamina, las células se incuban en un medio con 10 % suero fetal y al cabo del tercer día son utilizadas para los experimentos.

A continuación las células transfectadas con la versión activa de RhoA se nombraran como **RhoGTP** y las células **controles** son aquellas transfectadas con el vector vacío.

Los plásmidos fueron donados por el Dr. Miguel Quintanilla, Instituto de Investigaciones Biomédicas Madrid, España.



3. Separación de GTPasas activas por ensayo de pull-down:

Este procedimiento tiene por objeto separar la fracción de GTPasas en su forma activa de la población total. Para ello, se recurre a la afinidad por efectores específicos de la forma activa (unida a GTP) de la GTPasa respectiva. En el caso de Rho utilizamos un fragmento de la Rotequina fusionada con Glutación Transferasa (RBD-GST).

Obtención proteína de fusión RBD-GST: Las bacterias DH5a (Amp^R) con el plásmido que contiene el cDNA de la proteína de fusión fueron donadas por el Dr. Keith Burrige (University of North Caroline). Las bacterias que contenían el plásmido pGEX4T fueron crecidas a 37°C con agitación en 40 mL de medio LB que contenía 100 µg/mL del antibiótico de selección Ampicilina durante toda la noche. Luego el cultivo se amplificó a un volumen final de 500 mL con el mismo medio de cultivo creciendo hasta una DO₆₀₀ de 1.8. Luego, las bacterias se indujeron con 0.3mM IPTG por 16horas. Finalmente, las bacterias se separaron por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se resuspenden en 10 mL de tampón de lisis B (50mM Tris 7.4, 50mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM PMSF, 1% Tritón X-100 y 10 µg/ml de Aprotinina y Leupeptina). El lisado bacteriano se sonicó 6 veces por 20 segundos y se centrifugó a 4°C por 10 minutos a 12000 rpm. El volumen total del sobrenadante que contenía la proteína de fusión se incubó mediante rotación por una hora con 1 mL de Glutation Sefarosa diluida al 50% en PBS, se lavó 3 veces en tampón de lisis B, luego 2 veces con tampón de lisis B sin Tritón X-100 y se almacenó en 50% glicerol a -70°C.

Ensayo de Actividad: Cultivos de $1,2 \times 10^7$ de células fueron sembradas en 2 placas de 100cm² e incubadas en ausencia de suero por 12 horas. Luego, las células

fueron lavadas 2 veces con tampón (Hepes 20mM, NaCl 0.15M) para luego ser lisadas con tampón A (50mM Tris pH 7.6, 500mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% DOC, 1% Tritón x-100, 0.5 mM MgCl₂ e inhibidores 0,150 mg/mL PMSF, 10ug/mL Leupeptina y 10ug/mL Aprotinina). A continuación, el lisado se centrifugó por 5 minutos a 14.000 rpm y el sobrenadante se incubó en rotación a 4°C por una hora con la proteína de fusión purificada previamente y unida a Glutati3n-Sefarosa. Luego de esta incubaci3n se separ3 la fracci3n de lisado unida a Sefarosa por centrifugaci3n durante 1 minuto a 1400rpm, se lav3 2 veces con tamp3n de lisis y luego se mezcl3 con tamp3n de carga concentrado (4x). La mezcla se calent3 por 5 minutos a 100°C y el sobrenadante se carg3 en un gel al 15 % SDS-PAGE siguiendo el protocolo convencional de un Western Blot el que se revel3 con un anticuerpo monoclonal anti RhoA.

4. Western Blot:

Las c3lulas fueron raspadas desde la placa de cultivo con un volumen peque1o de tamp3n C (Hepes 50mM, NaCl 150mM, EGTA 1mM, glicerol 10%, 1% Trit3n x-100, MgCl₂ 2mM e inhibidores de proteasas PMSF 0.15mg/mL, Ortovanadato 2mg/mL, Leupeptina 5µg/mL y Pepstatina 10µg/mL).

La concentraci3n de prote3nas de cada muestra se determin3 por el m3todo de Bio Rad y se normalizaron entre ellas por diluci3n. Cada muestra (con igual concentraci3n de prote3nas) se les agreg3 tamp3n de carga 4X con 1% de β-mercaptoetanol. La mezcla se calent3 a 100°C por 5 minutos, se centrifug3 por 2 minutos a 14000 rpm y el sobrenadante se carg3 en un gel SDS-PAGE que se corri3 a 80V hasta pasar el gel concentrador y luego a 120V. Dependiendo del tama1o de la prote3na a identificar, la transferencia se realiz3 en lapsos entre 1 hora a 100 V o 12

horas a 30V. Finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon con leche o BSA al 5%, después se incubó con los respectivos anticuerpos primarios y secundarios conjugados con peroxidasa. El revelado de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit de Pierce.

Algunas membranas fueron utilizadas para detectar otras formas de proteínas de interés para lo cual las membranas se sometieron a *stripping* con una solución que contenía 10 mL de una solución Tris 50mM y 2% SDS y 70 μ L de β -mercaptoetanol, durante 20 minutos a 55°C en un horno de hibridación. A continuación, la membrana se lavó por 1 hora en PBS y se procedió con la técnica de Western Blot de acuerdo a lo descrito en el párrafo anterior.

5. Fraccionamiento por solubilidad a detergente:

Las células fueron crecidas durante 72 horas en placas de 60mm, luego se lavaron con PBS y se trataron con 400 μ L de tampón de lisis C durante 20 minutos. A continuación, se retiró esta fracción y se centrifugó durante 10 minutos a 14000 rpm, el sobrenadante corresponde a la **fracción soluble**.

El residuo adherido a la placa se lavó con PBS e inhibidores de proteasas PMSF 0.15mg/mL, Ortovanadato 1mg/mL, Leupeptina 5 μ g/mL y Pepstatina 5 μ g/mL, después se retiró el PBS y mediante rompimiento mecánico con 100 μ L de tampón de lisis RIPA (NaCl 150mM, Tris 50mM pH 8, 0.1% SDS, 0.5% DOC, 1% NP-40, 0.15mg/mL, Ortovanadato 1mg/mL, Leupeptina 5 μ g/mL y Pepstatina 5 μ g/mL, se obtuvo una nueva fracción que después de ser centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante pasó a constituir la **fracción insoluble**.

6. Procedimiento de Inmunoprecipitación:

En primer lugar, se prepara una mezcla de 40 μ L de la proteína A (Sigma), diluida 1/10 en tampón de hidratación con 3 μ g del anticuerpo policlonal dirigido contra la proteína a inmunoprecipitar y se somete a rotación por 12 horas a 4°C.

Las células se lisan con el tampón C previamente descrito y el lisado es centrifugado durante 15 minutos a 14000 rpm. Al sobrenadante de esta centrifugación se le determinó la concentración de proteínas de modo de incubar durante toda la noche, igual cantidad de proteínas de lisado con la mezcla de proteína A-anticuerpo. Una vez finalizada la incubación, la mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 1400 rpm y el pellet se lavó 2 veces con tampón de lisis C para luego agregar tampón de carga con β -mercaptoetanol y calentar a 100°C por 5 minutos. Finalmente, las muestras se cargaron en un gel 10% SDS-PAGE y se sigue el protocolo de un Western Blot.

7. Zimografías:

Este procedimiento se llevó a cabo en medios condicionados por células provenientes de diversos ensayos experimentales. Para ello, las células se incubaron en medio libre de suero por 24 horas, se colectaron y concentraron 10 veces por liofilización.

Para evaluar las actividades las metaloproteinasas MMP-9 y MMP-2 presentes en los medios condicionados. Estas muestras se separaron en un gel al 10% SDS-PAGE que contenía 1mg/ml de gelatina (Sigma). Luego de corrido el gel, éste se lavó 2 veces con Tritón X-100 al 2.5% durante 20 minutos cada vez y se incubó a 37°C en

tampón de activación que contenía 10mM Tris Cl pH 7,5, Tritón X-100 al 1.25% y 5mM CaCl₂ durante 24 o 48 horas.

Finalizada la activación, el gel se tiñó con azul de Coomassie (50 % metanol, 10% Ácido acético, 40% agua destilada y 0.25 g azul de Coomassie), por 15 min. Finalmente el gel se destiñó parcialmente con una solución (10% metanol, 80 % agua destilada y 10% ácido acético) que permite la detección de bandas de digestión de el sustrato gelatina.

Para evaluar la actividad de Uroquinasa (uPA), las muestras de medio condicionado se separaron en un gel al 10% SDS-PAGE, el que al final de la corrida se lavó 2 veces con Tritón X-100 2.5% durante 20 minutos cada vez. El gel lavado de esta manera se pone en contacto con otro preparado en Baño María en que contiene 10mL Tris 50mM pH 8,0, 0.05 g de caseína, 0,1g de Agarosa, 10µg de Plasminógeno (Sigma) y 600 µl CaCl₂ 1M. Ambos geles en contacto se incubaron a 37°C toda la noche. La actividad se hace visible por la aparición de bandas de degradación del caseinato de calcio. Cuando la degradación de hizo visible se detuvo la reacción con CuSO₄ al 2% en agua destilada.

8. Ensayos de adhesión:

- Preparación de las MEC : Las matrices extracelulares derivadas de una línea celular osteoblástica (SaOS-2) se prepararon con el procedimiento descrito por Globus *et al* (1989). En placas de 48 pozos se agregó 500 µl de gelatina (193µg/mL) entrecruzada con 500 µl de Carbodimida (4,2µg/mL) y se incubó por 3 horas a temperatura ambiente. Luego, las placas se lavaron con agua

destilada y se esterilizaron con UV por 2 horas. Se sembraron 5×10^4 células SaOS y se incubaron por 7 días luego de alcanzada la confluencia. Durante este tiempo las células fueron suplementadas con Ácido Ascórbico ($50\mu\text{g/ml}$).

- Matrices con Fibronectina (Fn) y Colágeno tipo I : Alícuotas que contenían $10\mu\text{g}$ por mL de Fn o Colágeno I (Gibco BRL) disueltas en PBS se incubaron por 2 horas a 37°C o 12 horas a 4°C .

Como control de adhesión se utilizó albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) al 5% disuelto en PBS, previamente denaturado térmicamente (60°C) durante 30 minutos. La solución resultante se filtró y se agregó a los pocillos en las mismas condiciones que las otras matrices. Una solución diluida al 1% de BSA se utilizó para bloquear los sitios de unión inespecíficos de las matrices de Fn y Col I.

Las células a adherir (25×10^3) se liberaron de la placa de cultivo con Tripsina-EDTA y se dejaron en reposo por 30 minutos en medio con suero. Luego se sembraron en las distintas matrices y se incubaron a 37°C por tiempos que varían desde 45 minutos hasta 200 minutos.

El recuento de células adheridas se hizo mediante tinción con cristal violeta (0.2% p/v y 10 % etanol) seguida de 3 lavados con PBS y solubilización del colorante en las células con una solución que contenía una proporción 50:50 de NaH_2PO_4 0.1M y etanol 50% v/v. La intensidad de coloración se evaluó midiendo la densidad óptica a 570 nm. A los valores obtenidos se les restó el blanco de BSA (Li Liu 2002).

9. Estiramiento ("spreading") celular:

Sobre una matriz de Fn preparada de la misma forma que se hiciera para los ensayos de adhesión, se realizaron experimentos en los que se evaluó el estiramiento de las células recientemente adheridas. Para ello, se incubaron por 90 min. células controles y RhoGTP en presencia y ausencia del inhibidor de Rho kinasa Y-27632. A continuación, las células no adheridas se retiraron por lavados sucesivos con PBS y las células adheridas se fijaron con metanol frío (2 min) y luego se tiñeron con tinción May Grünwalg (MERCK) durante 5 minutos seguido de lo cual las placas se lavaron con abundante agua para eliminar el exceso de colorante y después se agregó una solución Giemsa (MERCK) diluida 1/20 en dH₂O durante 15 minutos. Finalmente, las placas se lavaron intensamente con agua destilada y se fotografiaron con una maquina Sony DSC 575 (3,3Mpixeles) en el microscopio invertido Zeiss, Axiovert 25.

10. Inmunofluorescencia:

Células controles y células RhoGTP fueron sembradas sobre cristales de vidrio redondos de 13mm previamente incubados con una solución de Fn 5µg/ml y sembradas durante 24 horas a 37°C. A continuación, las células se lavaron una vez con PBS y posteriormente se fijaron con Paraformaldehido 4% por 10 minutos a temperatura ambiente. Con el propósito de permitir el acceso del anticuerpo al interior de la célula, éstas se permeabilizaron con Tritón X-100 0.025% durante 2 minutos. Luego se realizaron 2 lavados con PBS y se bloqueó durante una hora con BSA 5%. Posteriormente se incubaron los cristales con el anticuerpo primario diluido en BSA al 1% en PBS, durante una hora. Se realizaron 2 lavados con PBS durante 5 minutos

y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a FITC también disuelto en BSA al 1% durante otra hora. Finalmente, los cristales se montan sobre un portaobjeto con una gota de reactivo de montaje (Kodak) y se observaron en un microscopio de epifluorescencia.

Para la tinción de F-actina con Faloidina incubamos por 30 min. células previamente fijadas y bloqueadas según el procedimiento descrito, con Alexa fluor 594 Falloidina-rodamina (Molecular Probes) diluido 5/200 en BSA/PBS 1%. Las células se lavaron con PBS y se montaron sobre el portaobjeto, para poder ser observadas al microscopio.

11. Ensayo de invasión:

Con el propósito de evaluar la capacidad invasiva de las células, utilizamos el ensayo de invasión en cámaras Transwell (Costar Corp.) de tamaño de poro $8\mu\text{m}$. Brevemente, el filtro poroso de las cámaras se incubó previamente durante 12 horas con $10\mu\text{g}$ de Matrigel y luego se sembraron en medio libre de suero 5×10^4 células en contacto con la proteína de MEC. La incubación se realizó por 48 hrs y las células fueron estimuladas a migrar al estímulo quimiotáctico de la solución de SF al 10% del compartimiento inferior de la cámara de Transwell (40). Luego de la incubación, se evaluó las células viables presentes en cada cámara mediante el ensayo MTT durante una hora. Las células que incorporaron el formazán se soltaron con una solución de tripsina-EDTA en ambos lados de las cámaras durante 30 minutos a 37°C . Finalmente se solubiliza el formazán con una solución 3:2 de isopropanol y DMSO y se mide la densidad óptica de la solución resultante a 570 nm. A los valores obtenidos se les restó el blanco de la solución de isopropanol y DMSO.

RESULTADOS

I. Obtención de células que sobre-expresan RhoA-activo.

Para la obtención de células que sobre-expresan RhoA activo, se utilizaron células epiteliales mamarias MCF-7 que fueron transfectadas con concentraciones que van desde 2 hasta 10 μg (dependiendo de la cantidad de células) del plásmido pcDNA3 que contenía el cDNA de una forma de RhoA que posee una mutación que inhibe la actividad GTPasa intrínseca de la molécula lo que resulta en una acumulación de la forma activa unida a GTP (16). Del mismo modo, se obtuvieron células controles por transfección con el vector vacío.

Al identificar RhoA mediante inmunofluorescencia en células controles y transfectadas, se observa que los cultivos de estas últimas aparecen enriquecidos en el antígeno correspondiente. A lo largo de este trabajo, las células transfectadas se identificarán por cambios evidentes en su citoesqueleto de Actina.

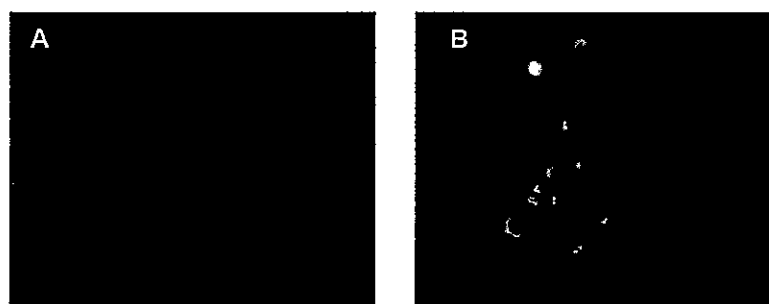


Fig1. Inmunofluorescencia para RhoA con anticuerpo anti-RhoA y anticuerpo secundario unido a FITC, en células controles (A) y en células transfectadas con RhoA activo (B). Aumento 100X

Con el propósito de corroborar si la expresión del cDNA contenido en nuestro inserto, correspondía a la proteína activa, se realizó un ensayo de Pull Down para reconocer la fracción de Rho-GTP presente en células transfectadas. En este tipo de experimento se utilizó la capacidad de la proteína de fusión GST-RBD (Rho Binding Domain) de reconocer la forma activa de Rho.

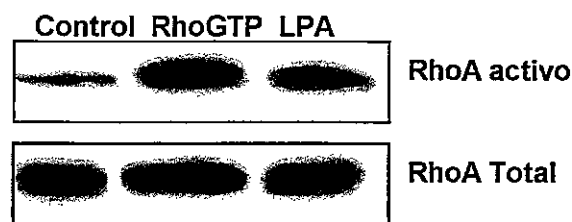


Fig 2. Pull Down de células controles y transfectadas con Rho activo (RhoGTP). La fila superior corresponde a la fracción de RhoA activo (unido a GTP) obtenida por precipitación con la proteína de fusión GST-RBD. Las bandas de la fila inferior corresponden al control de carga e identifica la masa total de RhoA en una fracción del lisado. Como control de activación utilizamos LPA 10 μ M durante 2 minutos.

De la Figura 2 , podemos deducir que mediante la transfección se obtiene un nivel de sobre-expresión de la proteína RhoA superior al que obtenemos con el LPA, que es un conocido activador de Rho. Esto nos permite trabajar con un grupo de células que tienen una mayor proporción de la proteína activa versus la totalidad de Rho. A continuación las células transfectadas con la versión activa de RhoA se nombrarán como **RhoGTP** y las células transfectadas con el vector vacío serán nuestro grupo **control**.

II. Caracterización de las células transfectadas

II.1. Caracterización del citoesqueleto de Actina

La activación de RhoA, se ha asociado a un cambio en el remodelamiento del citoesqueleto de Actina que trae como consecuencia la estructuración de fibras de estrés (28). La formación de estas fibras es un evento de escasa ocurrencia en células epiteliales, características por su polarización y muy baja movilidad (29). Con esos antecedentes, exploramos si la sobre-expresión de RhoA en células epiteliales MCF-7 induce la formación de fibras de estrés y de Vinculina, ésta última es una proteína característica de las adhesiones focales de expresión predominantemente mesenquimal.

Los contactos focales constituyen el sitio especializado de unión de la célula a una matriz extracelular estructurados en los extremos de haces de fibras de estrés. Dado que Vinculina es una proteína constituyente normal de las adhesiones focales que expresa dominios de unión a Actina (30) y que colocaliza con ésta en las adhesiones focales, estudiamos si la sobre-expresión de la forma activa de Rho trae como consecuencia la colocalización de Actina y Vinculina.

La sobre-expresión de RhoA aumenta la polimerización de Actina, formando fibras de Actina corticales. La formación de estas fibras se colocalizan con Vinculina.

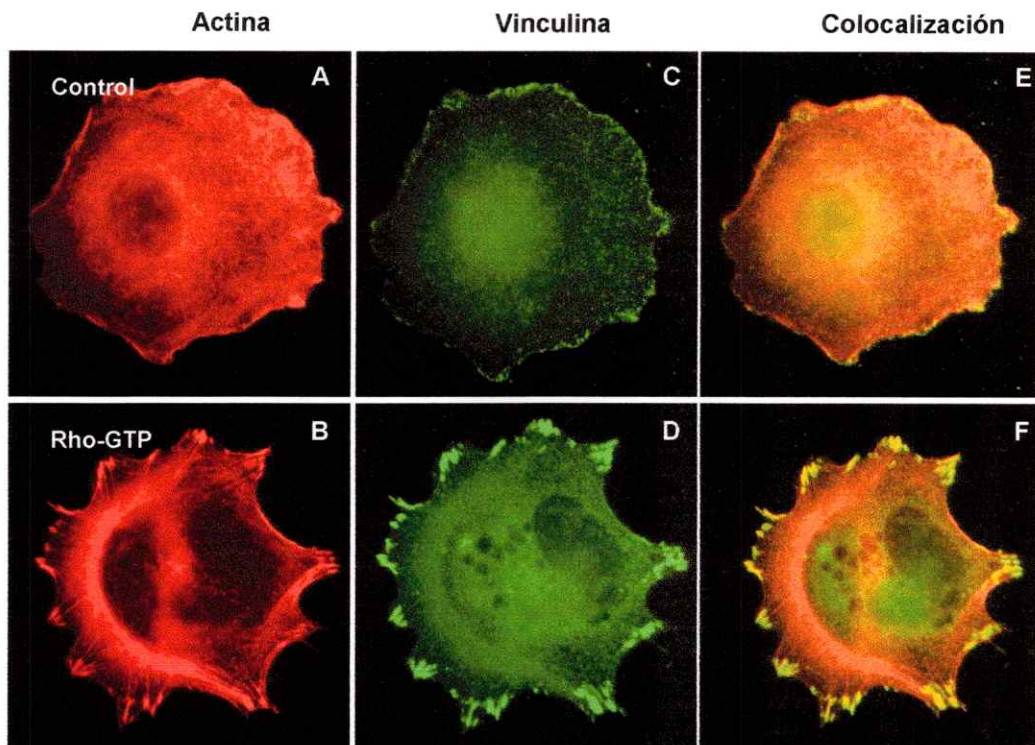


Fig3. Inmunofluorescencia doble para F-actina identificada con Phalloidina unida a Rhodamina (A,B) y Vinculina con anticuerpo anti-Vinculina y un secundario conjugado a FITC (C,D) de una célula control (fila superior) y una RhoGTP (fila inferior) sembradas sobre una matriz de Fibronectina. La colocalización de ambas proteínas (E,F) se representa con el color amarillo. Aumento 100X.

Como se observa en la Figura 3, células aisladas del grupo control expresan una señal de Actina dispersa y homogénea, en conjunto con una baja expresión de Vinculina. Por su parte, células RhoGTP muestran cordones de fibras de Actina organizadas en forma cortical y una expresión de Vinculina concentrada en los puntos de adhesión focal.

También quisimos estudiar si estos cambios morfológico-estructurales observados en células aisladas también se observaban en colonias de células y si estos cambios morfológicos nos permitían identificar cultivos enriquecidos en células en la proteína RhoA activa.

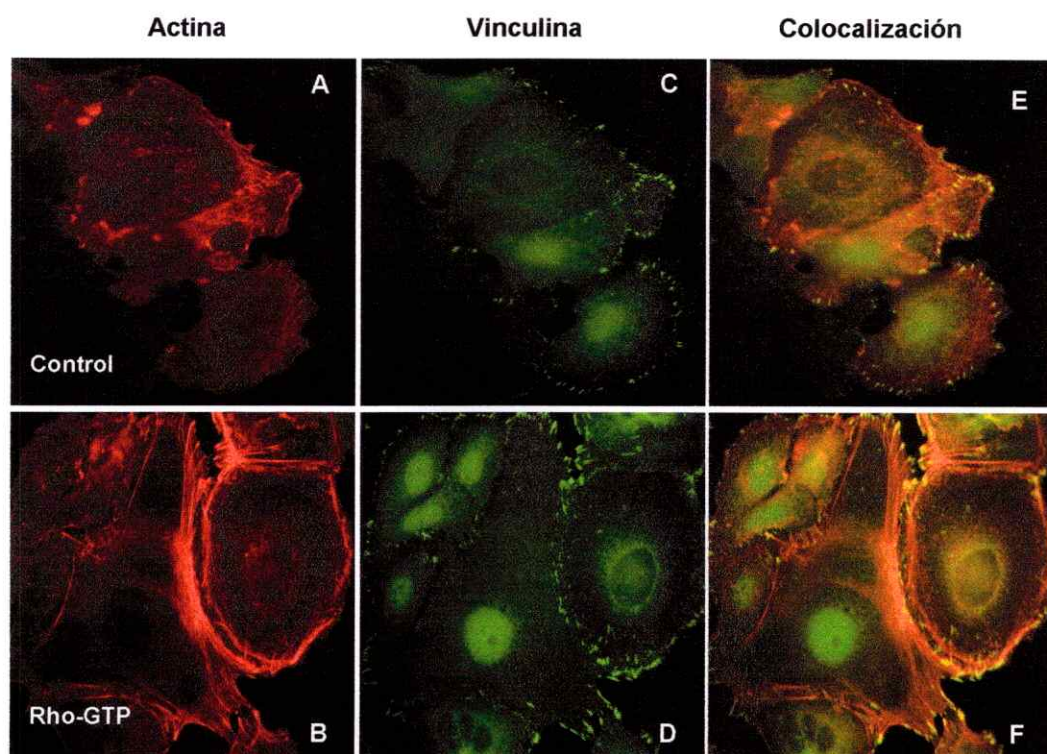


Fig 4. Inmunofluorescencia doble para F-actina (A,B) y Vinculina (C,D) de colonias células controles (fila superior) y RhoGTP (fila inferior) sembradas sobre una matriz de Fibronectina. El color amarillo representa la colocalización de ambas proteínas (E,F). Aumento 100X.

Como se observa en la Figura 4, la formación de haces corticales de fibras de Actina, y la sobre-expresión de Vinculina también se aprecian en las células RhoGTP agrupadas en colonias. Estos rasgos fenotípicos se observan mayoritariamente en los cultivos de células transfectadas.

II.2 Expresiones de Vinculina y Actina

Con el propósito de analizar si los cambios en la reactividad a Vinculina y Actina observados en las células Rho-GTP, eran atribuibles a cambios en su expresión evaluamos el contenido de ambas proteínas por Western Blot.

La masa total de Vinculina y β Actina no aumenta significativamente en las células RhoGTP en comparación con las células controles. La distribución de Vinculina en la fracción insoluble aumenta significativamente en las células RhoGTP

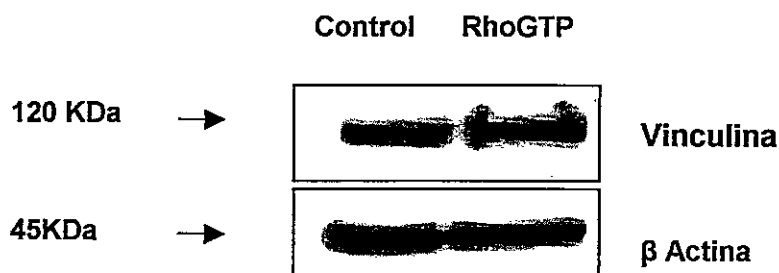


Fig5. Inmunoblot para Vinculina total (fila superior) y Actina (fila inferior), que actúa como control de carga, en células controles y RhoGTP.

Considerando que las adhesiones focales constituyen una organización molecular que permite la asociación de las células con la MEC quisimos estudiar si la adhesión a MEC provocaba en las células RhoGTP un reclutamiento aumentado de Vinculina identificable por su insolubilidad a detergente. Para ello, tratamos en frío cultivos semiconfluentes de células controles y RhoGTP con un tampón que contenía 1% Tritón X-100 y analizamos la distribución de Vinculina y Actina en las fracciones solubles e insolubles a Tritón X-100.

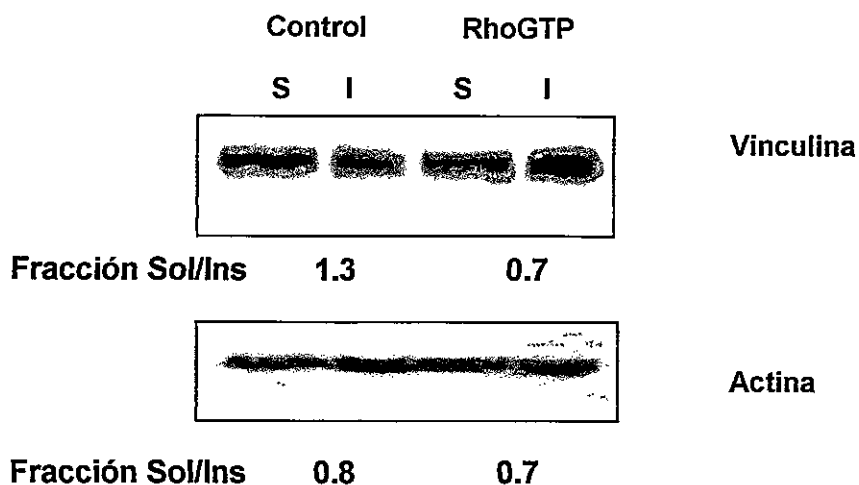


Fig6. Inmunodetección de Vinculina (fila superior) y Actina (fila inferior) en las fracciones soluble e insoluble a Tritón X-100 en células controles y RhoGTP. En la parte inferior de cada inmunoblot se indica la razón numérica de la fracción soluble/insoluble producto del análisis densitométrico de las bandas.

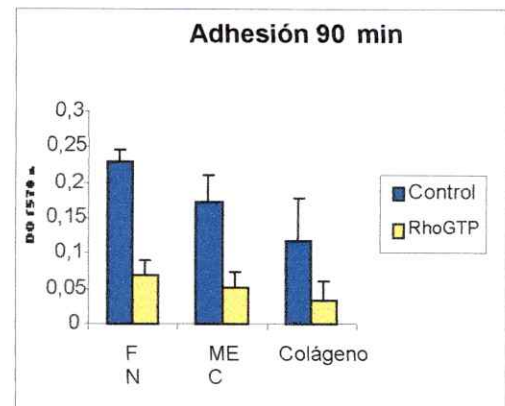
Como se observa en la Figura 6, las células controles muestran una mayor proporción de Vinculina en la fracción soluble, sin embargo las RhoGTP muestran una redistribución de Vinculina a la fracción insoluble, lo que confirma los resultados de co-localización analizados previamente.

III. Adhesión celular

Como se analizó anteriormente, las células transfectadas Rho-GTP presentan una importante reestructuración del citoesqueleto de Actina que, con toda probabilidad, tiene un marcado efecto en la adhesión celular. Para probar esta hipótesis, ensayamos la capacidad adhesiva de ambos tipos celulares sobre una matriz preformada por células óseas, Fn y Colágeno tipo I.

Las células RhoGTP presentan una menor adhesividad a las distintas matrices en comparación con las células controles.

Fig 7. Adhesión celular sobre matrices de Fibronectina (FN), matriz de células osteoblásticas SaOS (MEC) y colágeno. Las barras amarillas corresponden a las células RhoGTP y las barras azules a las células controles. Se graficaron los valores de D.O. (570nm) obtenidos luego de solubilizar las células adheridas teñidas con cristal violeta.



Como se aprecia en la Figura 7, en un tiempo de

90 minutos en contacto con las diferentes matrices, las células controles expresaron una capacidad adhesiva muy superior a las RhoGTP, propiedad que también se expresa en experimentos realizados con tiempos de adhesión superiores (200 min) o inferiores (45 min).

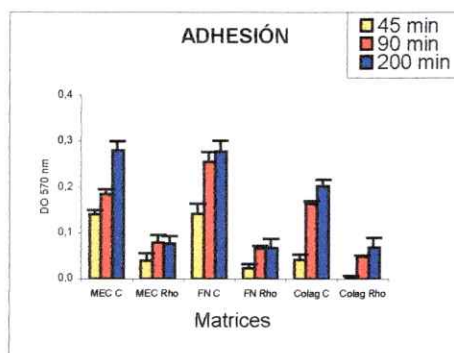


Fig 8. En el gráfico de adhesión se muestra una mayor adhesividad de las células controles a las distintas matrices, en comparación con las células RhoGTP. Siendo la matriz de Fibronectina la que permite que se adhieran con mayor facilidad las células controles.

III.1 Efecto del inhibidor Y-27632 en la adhesión celular

Uno de los efectores más estudiados de RhoA, es la Rho-quinasa (ROCK), que inhibe una miosín fosfatasa que remueve los grupos fosfatos de la cadena liviana de la miosina y bloquea la actividad miosina (19). El resultado neto de la actividad de ROCK, es por tanto, un aumento de fosforilación de miosina por inhibición de la desfosforilación, produciéndose la contracción de las fibras de estrés (31).

Con estos antecedentes, evaluamos el efecto de un inhibidor específico de Rho-quinasa (Y-27632) en la adhesión celular, de modo de dilucidar si una disminución de la fosforilación de miosina celular provoca cambios significativos en la adhesión celular y si este fenómeno afecta de modo diferencial a las células controles y RhoGTP.

El efecto de la menor adhesividad en las células RhoGTP, se bloquea al utilizar el inhibidor de Rho-quinasa (Y-27632).

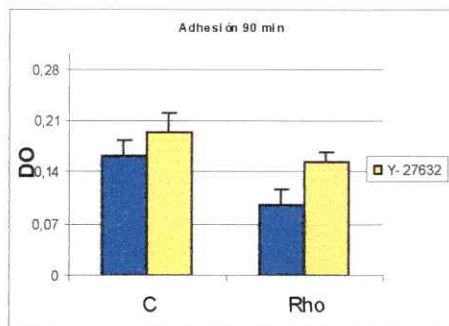


Fig 9. Adhesión a Fibronectina durante 90 minutos en células controles y células RhoGTP en condiciones normales (barras azules) y en presencia del inhibidor Y- 27632 [25 μ M] (barras amarillas).

Como se observa en la Figura 9, el inhibidor de ROCK provoca un cambio en el patrón adhesivo de ambos tipos celulares hacia un fenotipo más adhesivo. En el caso de las células RhoGTP, el efecto del inhibidor permite que estas células alcancen valores de adhesión similares a las controles no tratadas.

III.2 Estiramiento celular y el posible efecto del inhibidor de ROCK sobre esta función celular.

En los experimentos de adhesión se observó que además de una diferencia en la capacidad adhesiva, ambos tipos celulares mostraban diferencias morfológicas que eran objeto de modificación por el inhibidor de ROCK. Con el objeto de cuantificar estos cambios, analizamos los niveles de estiramiento ("spreading") de ambos tipos celulares bajo el estímulo de Y- 27632.

Las células controles muestran un mayor grado de estiramiento (spreading) celular a un tiempo de 90 minutos de adhesión a Fibronectina en comparación con las células RhoGTP. El inhibidor de ROCK aumenta en ambas células el estiramiento celular.

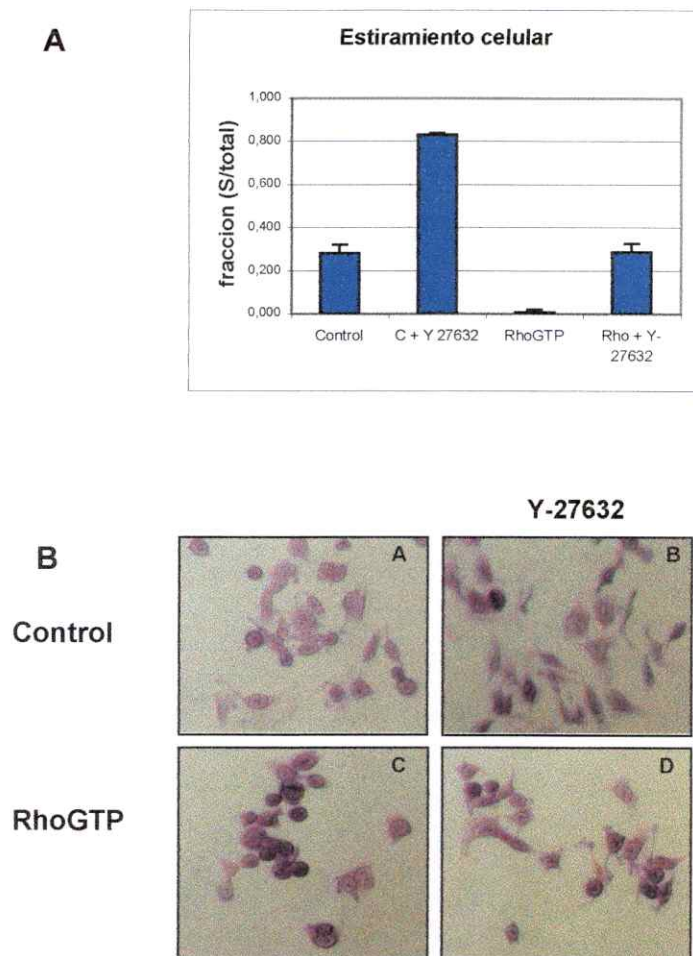


Fig10. **A.** Proporción de células estiradas versus el total de células adheridas en un tiempo de 90 minutos de adhesión a Fibronectina, en presencia y ausencia del inhibidor Y-27632 [25 μ M]. **B.** Microfotografía de un campo elegido al azar que muestra células sólo adheridas (redondas) y las estiradas durante 90 minutos, (a) Células controles, (b) células control con el inhibidor de ROCK Y-27632 [25 μ M], (c) células RhoGTP y (d) células RhoGTP con el inhibidor de ROCK [25 μ M]. Aumento 20X. Para cada caso se contaron la totalidad de las células de cada pocillo. Cada situación experimental estaba representada por 4 pocillos.

III.4 Quinasa de adhesión focal

Como vimos anteriormente, la estructuración de adhesiones focales definidas, producto de la expresión de RhoA activo, tiene como consecuencia una menor adhesión a matrices. Con el propósito de investigar si esta propiedad se correlaciona con niveles diferenciales de activación de la quinasa de adhesión focal (FAK), tirosina quinasa activada por la adhesión mediada por integrinas y localizada en las adhesiones focales (26,32), estudiamos la fosforilación en tirosina de FAK en células controles y RhoGTP sembradas sobre plástico.

La Quinasa de Adhesión Focal (FAK) presenta un nivel de activación menor en las células RhoGTP que en las células controles.

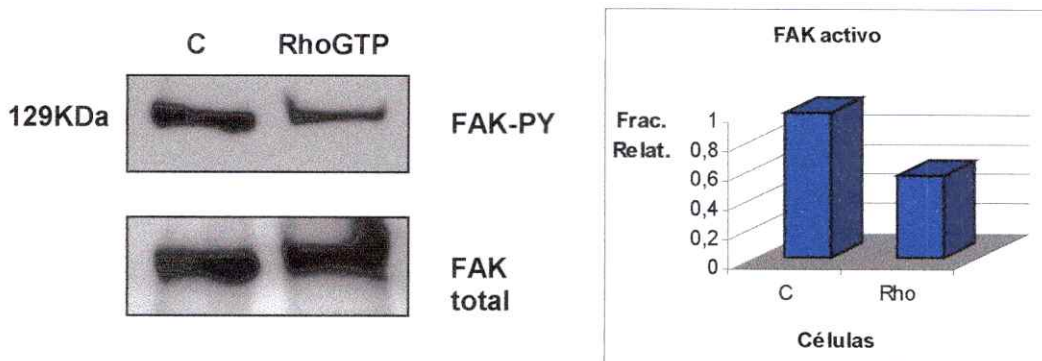


Fig12. Immunoprecipitación de FAK en condiciones basales. A) se muestra FAK en su forma fosforilada identificada con un anticuerpo anti-fosfo tirosina (banda superior) y la expresión total (banda inferior). En el carril derecho se muestran las dos especies correspondientes a las células transfectadas Rho-GTP. B) Análisis densitométrico de las bandas correspondientes a ambos tipos celulares expresado como la fracción de FAK activa relativa al total.

Como se observa en la Figura 12, condiciones basales (sembradas durante 24 horas y cultivadas en medio sin suero fetal por 12 horas), las células controles expresan el doble de FAK activo que las transfectantes. La expresión de FAK no es la que varía sino su activación por fosforilación en tirosinas.

A tiempos cortos de adhesión, la activación de FAK en células RhoGTP sigue siendo menor a la de células controles. Esta situación se revierte utilizando una matriz de Fn.

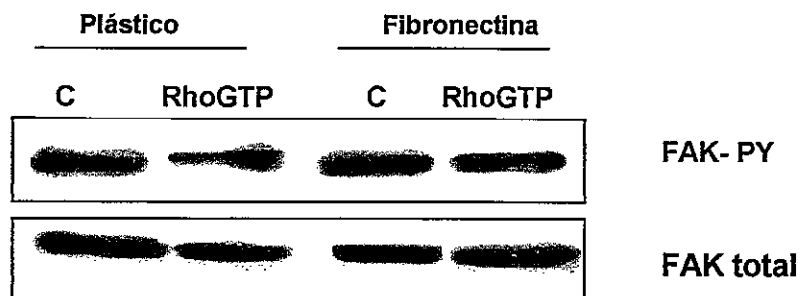


Fig13. Inmunoprecipitación de FAK a un tiempo de adhesión por 4 horas en células sembradas sobre plástico y Fibronectina. Las bandas superiores corresponden a la forma fosforilada en tirosinas de FAK y las inferiores a FAK total que actúa como control de carga.

De la Figura 13 podemos deducir que la inhibición de la activación de FAK observada en las células RhoGTP es susceptible de ser revertida ofreciendo a las células una matriz de Fn, condición ésta en la que las células RhoGTP se adhieren más firmemente. No obstante, el análisis cuantitativo de las bandas sugiere que la adhesión a Fn no revierte completamente la menor activación observada sobre plástico.

III.5 Expresión y localización de Cad-E

La adhesión célula-célula dependiente de Cad-E es un componente esencial de la morfología epitelial. Datos de distintos autores han mostrado que la activación de RhoA tiene un efecto controversial sobre la expresión y localización de Cad-E (30,33). Por tanto, con el fin de estudiar si en nuestras células que sobre-expresan Rho se afectaba la interacción cel-cel dependiente de Cad-E, analizamos por inmunofluorescencia y western blot la expresión de Cad-E.

La sobre-expresión de RhoA en células MCF-7 no afecta la expresión y localización de Caderina E

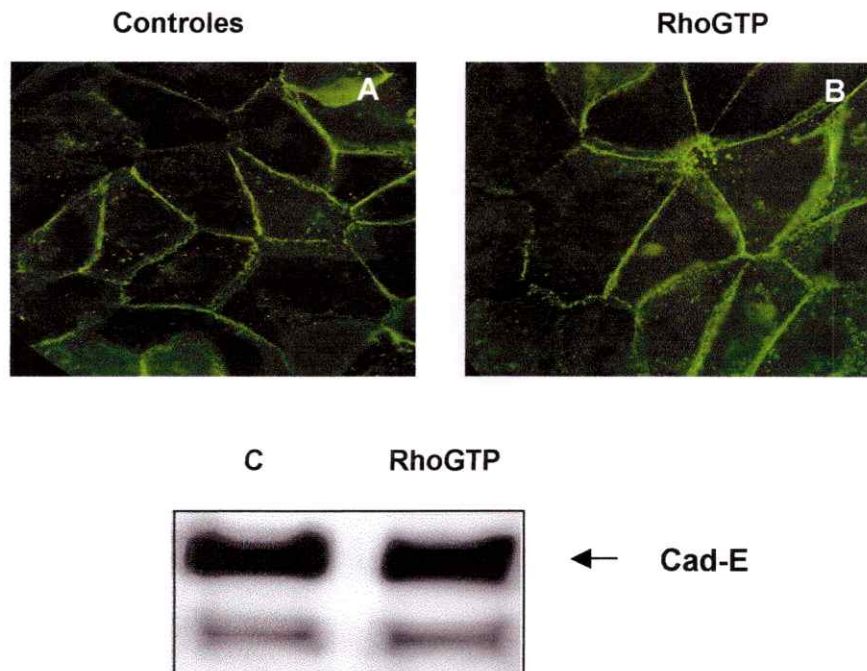


Fig14. En la parte superior se muestra una Inmunofluorescencia para CaderinaE de células controles (A) y las células RhoGTP (B). Aumento 100X.

En la parte inferior se muestra un Western Blot para Caderina E, la banda de la izquierda son las células controles y banda de la derecha es el clon RhoGTP.

Estos resultados revelan que RhoA no ejerce cambios a nivel de localización, ni expresión de Cad-E.

IV. Capacidad de invasión

La migración celular de las células tumorales es un elemento crucial para la adquisición de propiedades invasivas asociadas al fenómeno metastásico (22). La habilidad de migrar de ambos tipos de células a través de filtros incubados con Matrigel constituye una buena aproximación a este fenómeno pues la célula pone en operación su capacidad de movilización y la de degradar componentes de la MEC.

Las células epiteliales mamarias que sobre-expresan RhoA-GTP poseen una capacidad invasiva superior a las células controles.

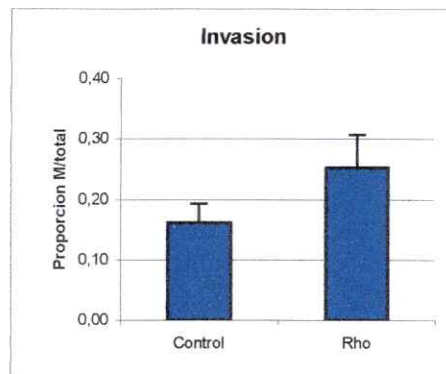


Fig15 Ensayo de invasión en células controles y células transfectadas con RhoA-GTP. En el gráfico se muestra la proporción de células que migraron a través de filtros con Matrigel versus el total de células.

IV.1 Expresión de marcadores de malignidad

Con el propósito de estudiar si la sobre-expresión de RhoA promueve la expresión del fenotipo invasivo, estudiamos en ambos tipos celulares la expresión de una serie de marcadores específicos de malignidad.

IV.1.1 Activación de EGFR

En tumores epiteliales de diverso origen se ha descrito una correlación entre la activación del receptor de EGF y la adquisición de propiedades malignas. Con el fin de analizar si la expresión de Rho-GTP modula el patrón de activación de EGFR, analizamos el nivel basal de fosforilación en tirosinas de esta molécula en ambos tipos celulares mediante un procedimiento de inmunoprecipitación y análisis de las formas fosforiladas con un anticuerpo que reconoce fosfo-tirosinas.

La sobre-expresión de RhoA en células MCF-7, provoca un aumento en la activación del receptor de EGF (EGFR)

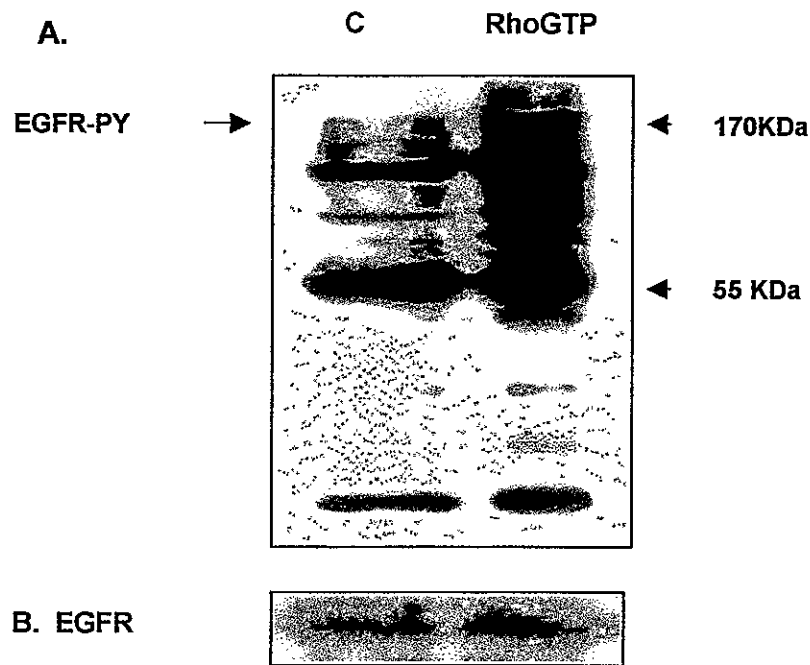


Fig16. A Inmunoblot para las fosfo-tirosín proteínas asociadas a la inmunoprecipitación del receptor de EGF en células controles y en las transfectadas RhoGTP. La parte superior muestra un revelado contra fosfotirosina en el que se observan las fosfo-tirosín proteínas que co-inmunoprecipitan junto al receptor. *B* Control de carga que corresponde a una fracción del inmunoprecipitado revelada con un anticuerpo anti EGFR.

Junto con la observación del aumento en la fosforilación de EGFR en células RhoGTP en condiciones basales (12 horas con medio sin suero fetal) pudimos observar un aumento en el nivel de fosforilación en tirosina de un conjunto de proteínas que co-inmunoprecipitan junto a EGFR.

IV.1.2 Localización de las proteínas fosforiladas en tirosina.

Dado que observaciones previas habían mostrado que las células RhoGTP expresaban un nivel aumentado de proteínas fosforiladas en tirosina, decidimos investigar por inmunofluorescencia, la localización de estas proteínas sobre una imagen de la distribución de F-actina.

Las células RhoGTP presentan una mayor concentración de proteínas fosforiladas en la superficie celular.

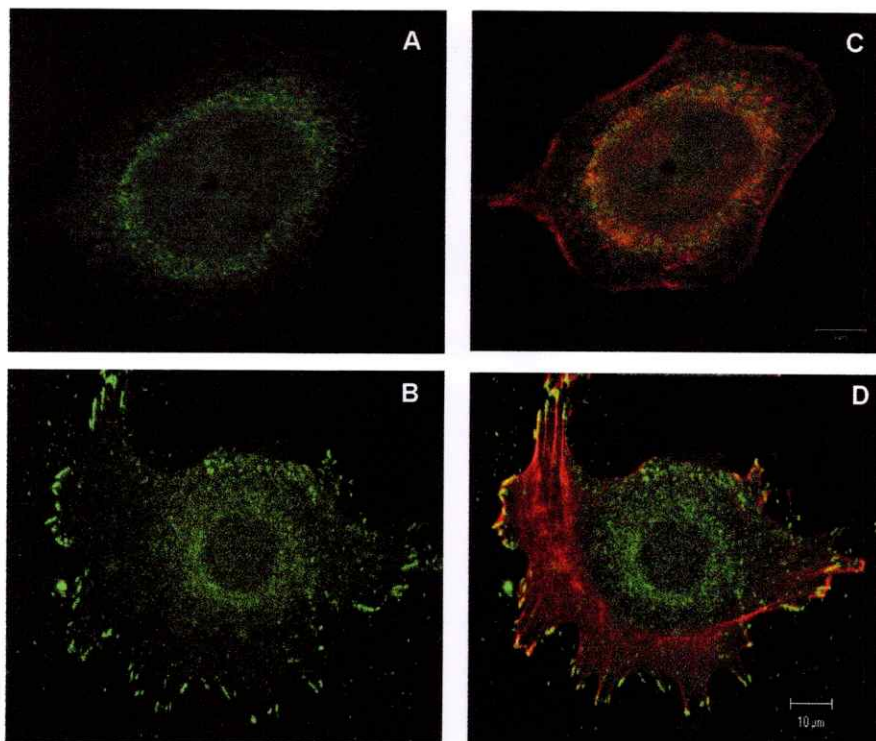


Fig 17. Inmunofluorescencia doble para fosfotirosina, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-p-Tyr y un anticuerpo secundario conjugado a FITC y para F-Actina utilizando Phalloidina-Rhodamina. Se observa la distribución de p-Tyr inmunoreactiva en células controles (A) y Rho-GTP (B) y también la colocalización de esa marca con F-Actina en células controles (C) y Rho-GTP (D). Aumento 63 X.

En la inmunofluorescencia observamos que las células RhoGTP presentan mayor expresión de proteínas fosforiladas en tirosinas y una localización preferente de éstas en la superficie de la célula donde muestran una colocalización con Actina.

IV.1.3 Producción de proteasas tumorales.

La degradación de la matriz extracelular es un proceso necesario para la migración de las células tumorales a la que se le ha atribuido importancia en el fenómeno metastásico. Entre estas proteasas las que se asocian más directamente con la invasividad tumoral son la metaloproteínasa B (MMP-9) y Uroquinasa (uPA)

La sobre-expresión de RhoA activo, provoca un aumento en la secreción de MMP-9 y Uroquinasa al medio de cultivo.

- Actividad de MMP-9 y MMP-2

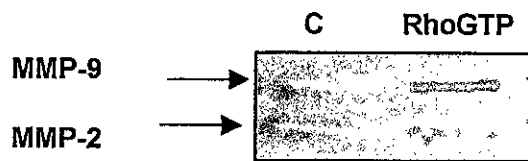


Fig18. Zimograma de gelatina para MMP-9 (92KDa) y para MMP-2 (72 KDa) en los medios condicionados de células controles y células RhoGTP.

Como se observa en la Figura 17 la actividad de MMP-2 es similar en ambos tipos celulares, sin embargo la actividad de MMP-9 se ve aumentada en las células RhoGTR.

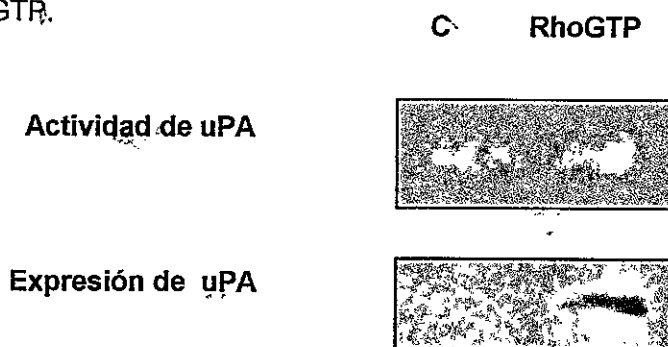


Fig19. En la parte superior se observa la actividad de uPA evaluada por zimografía inversa y en la parte inferior se muestra la expresión de uPA en el medio condicionado mediada por Western Blot.

Se observa que Uroquinasa aumenta notablemente en las células Rho-GTP evaluada como actividad caseinolítica o expresión de proteína inmunoreactiva.

IV.1.4 Activación de ERK1,2

La activación de la ruta de las MAP quinasas se ha asociado al progreso de la invasión y a la expresión de malignidad (34-36). Con el propósito de evaluar si la sobre-expresión de Rho-GTP provoca una activación basal de la ruta, evaluamos el nivel de activación de ERK 1,2 productos finales de la activación de la vía.

Las células RhoGTP expresan un nivel de fosforilación basal de ERK1,2 mucho mayor que las células controles

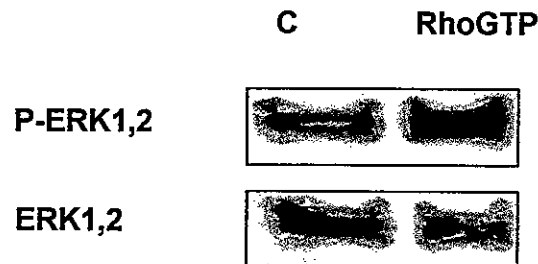


Fig20. En la parte superior se observa la forma fosforilada de ERK1,2. La banda de la izquierda corresponde a las células controles y la banda a la derecha corresponde a las células RhoGTP. En la parte inferior se observa la carga total de ERK1,2.

Para corroborar si el aumento en la activación de ERK1,2 era proporcional a la activación de RhoA, se realizaron transfecciones transitorias ($4,0 \times 10^5$ células) con concentraciones crecientes de DNA, observándose un aumento de la activación de ERKs proporcional a la concentración de DNA. Las concentraciones de DNA superiores a $3 \mu\text{g}$ generaron una alta mortalidad celular (datos no mostrados).

Dado que ha sido demostrado que la adhesión celular mediada por integrinas es también responsable de la activación de ERK1,2, evaluamos el nivel de fosforilación de las células en estudio utilizando células en suspensión.

El aumento en fosforilación de ERK1,2 en las células RhoGTP se mantiene en células no adheridas a sustrato.

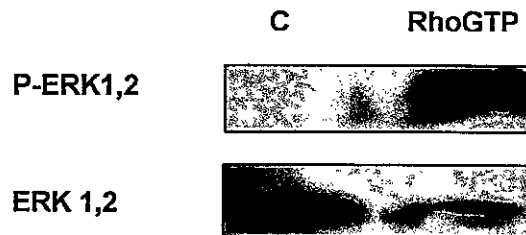


Fig 21. Expresión de P-ERK1,2 (fila superior) y ERK 1,2 (fila inferior) de células en suspensión controles y células RhoGTP.

V. Efecto de inhibidores específicos sobre la expresión de marcadores de malignidad.

De los resultados presentados se puede deducir que el aumento de expresión de marcadores de malignidad podría ser resultado de un cambio en la activación de rutas de señalización o producto de la activación de efectores propios del citoesqueleto. Con el propósito de dilucidar entre estas dos opciones utilizamos inhibidores específicos de ambos mecanismos alternativos.

V.1 Efecto de inhibidores específicos de la ruta ERK1,2 sobre la producción de uPA.

Con el propósito de estudiar si la activación de la vía de las MAP quinasas afecta la producción de uPA, bloqueamos esta vía con el inhibidor de la actividad tirosín quinasa intrínseca de EGFR AG1498, el inhibidor de la actividad de Src PP2 y con Genisteína, inhibidor genérico de tirosinas quinasas. Determinamos a continuación la activación de ERK1,2 y la actividad uPA en los medios condicionados por esas mismas células.

El nivel basal de activación de ERK1,2 en las células RhoGTP es sensible al inhibidor específico de la actividad quinásica del receptor de EGF (AG1478) y al inhibidor de c-Src (PP2). Al bloquear la activación de ERK1,2 se produce una disminución de la producción de uPA.

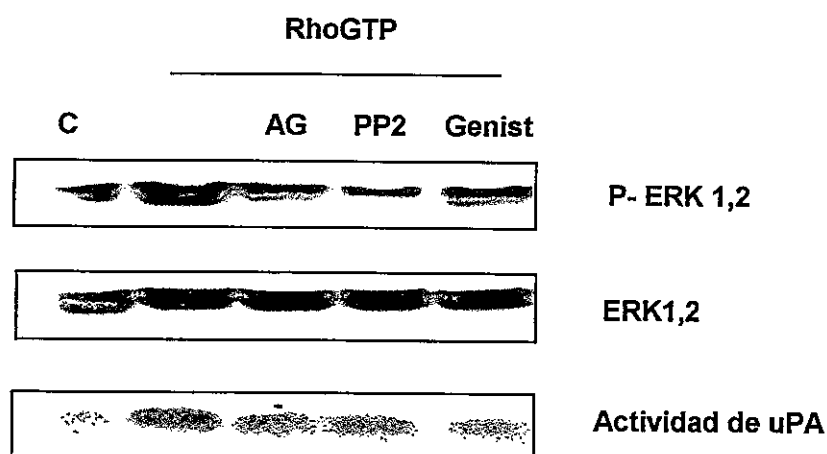


Fig 22. Activación de ERK1,2 y producción de uPA en células controles y RhoGTP cultivadas por 24 horas en medio sin suero fetal en presencia y ausencia de los inhibidores AG 1478 1 μ M (AG) , PP2 25 μ M y Genisteína 25 μ M (Genist). En la fila superior se observa la forma fosforilada de ERK1,2, en la situada al centro, la carga de ERK1,2 y en la inferior la actividad uPA en los medios condicionados por estas células.

En la Figura 22 se observa que tanto la inhibición de la actividad quinásica intrínseca de EGFR con AG 1478, como el tratamiento con Genisteína y la inhibición de c-Src con PP2 resultan en una disminución de la activación de ERK1,2 y una consecuente disminución de la producción autocrina de uPA por las células RhoGTP.

V.2 Efecto de Y-27632 sobre la activación de ERK1,2 y la secreción de uPA

Con el propósito de evaluar si los cambios observados en el citoesqueleto de Actina en células RhoGTP tenían alguna responsabilidad en la activación de ERK1,2 y en la secreción de uPA, inhibimos la contracción celular incubando durante 24 horas las células RhoGTP en presencia de Y-27632, inhibidor específico de ROCK que previamente había mostrado que revertía el efecto de inhibición de la adhesión tanto en células controles como en las RhoGTP.

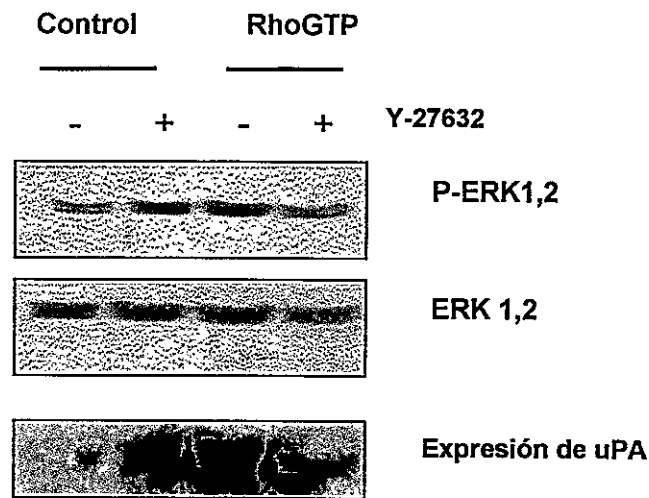


Fig 23. Activación de ERK1,2 y expresión de uPA en células controles y RhoGTP, en condiciones normales y con el inhibidor Y-27632 10 μ M durante 24 hrs.

Como se observa en la Figura 23, la capacidad de las células RhoGTP de activar ERK 1,2 y de producir una cantidad aumentada de uPA se anula con la incubación previa de las células con el inhibidor de ROCK. Del mismo modo, se observa también que en células controles el inhibidor produce un aumento de P-ERK y de uPA

V.3 Efecto de Y-27632 sobre la activación del Receptor de EGF

Anteriormente observamos que el inhibidor de ROCK era capaz de anular los efectos en la actividad de ERK1,2 y la producción de uPA. Con el propósito de evaluar una posible interconexión entre la activación de rutas de señalización y la activación de efectores propios del citoesqueleto, como ROCK, es que utilizamos células RhoGTP y controles en presencia del inhibidor Y-27632 y evaluamos la activación del receptor de EGF.

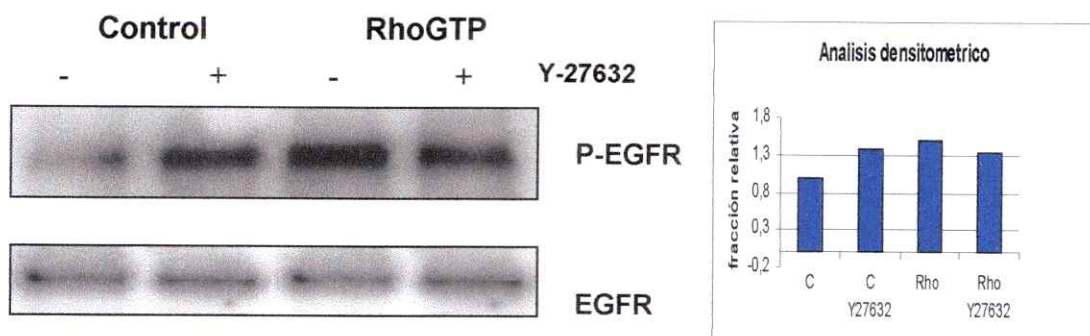


Fig 24 Inmunoprecipitación del receptor de EGF en condiciones normales y en presencia del inhibidor Y-27632. En la parte superior se encuentra la forma fosforilada del receptor y en la inferior la masa total de EGFR. A la derecha se encuentra graficado el análisis densitométrico de las bandas

Como se observa en la figura 24, el inhibidor de ROCK es capaz de activar al receptor de EGF en las células controles, sin embargo en las células que sobreexpresan RhoA, ejerce un efecto inhibitorio, concordante con el efecto en la activación de ERK1,2 y la producción de uPA.

Cuando evaluamos la expresión de uPA en los medios condicionados de las células de la figura 24, observamos que en las células RhoGTP el inhibidor disminuye su expresión, sin embargo en las células controles hay un leve aumento. Al evaluar la activación de ERK1,2 en estas mismas células, el inhibidor bloquea la activación en las células RhoGTP, sin embargo en las células controles produce un aumento en la activación.

V.4 Efecto de Y-27632 sobre el patrón de proteínas fosforiladas en tirosinas

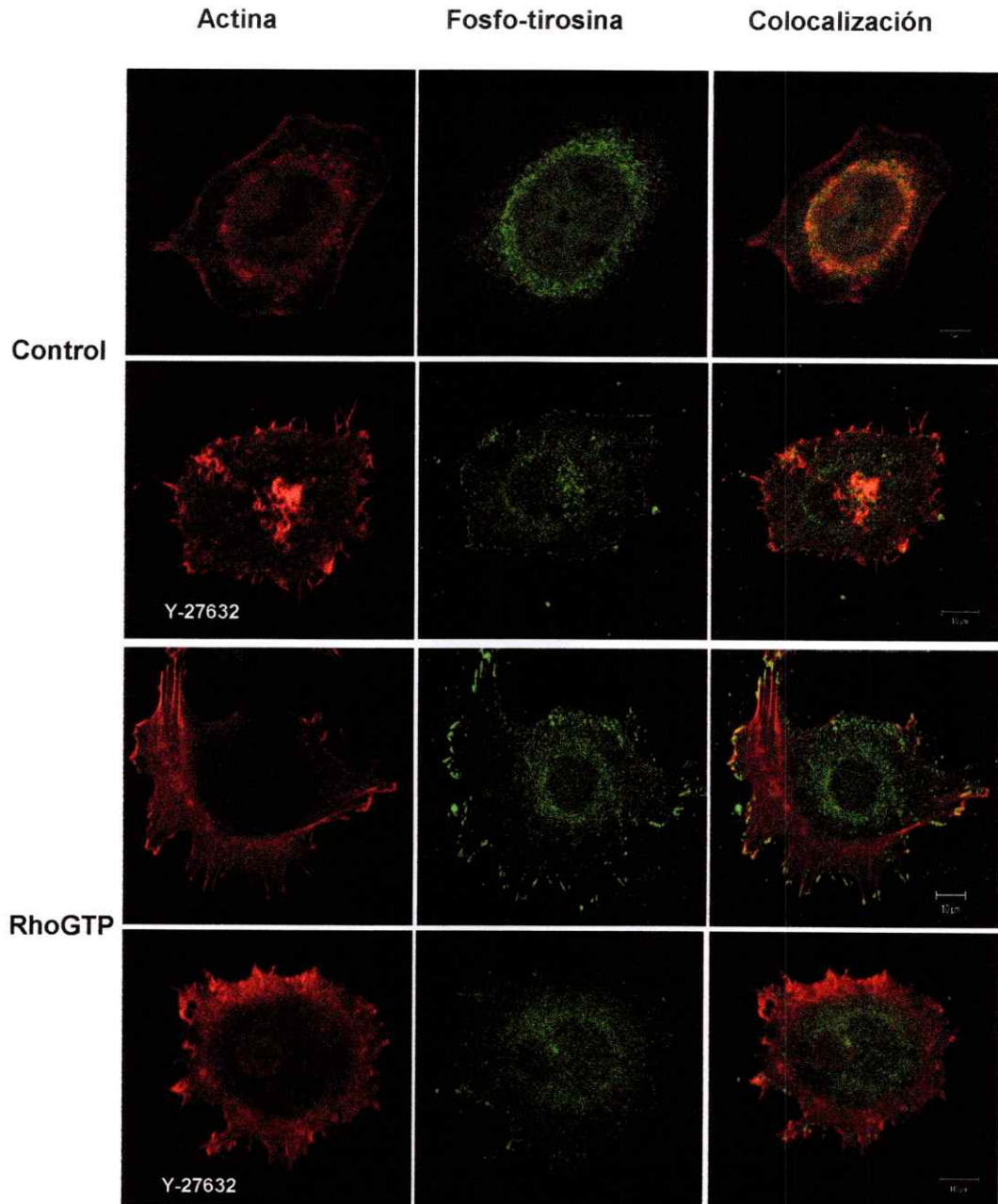


Fig 25 Inmunofluorescencia para F-Actina con Phalloidina unida a Rhodamina y para fosfotirosina con anticuerpo secundario conjugado a FITC de una célula control y una RhoGTP sembradas sobre una matriz de Fibronectina en presencia y ausencia de Y-27632. La tercera columna corresponde a la colocalización de ambas proteínas. Aumento 63X

DISCUSIÓN

Los procesos de malignización de tumores epiteliales suponen la pérdida de algunas propiedades que definen la morfo-funcionalidad del epitelio y la adquisición de otras funciones que permiten el desarrollo de una conducta migratoria (29). De este modo, las células junto con perder su morfología cuboidal, su polaridad y la fuerte adhesión célula-célula adquieren otras propiedades que inducen un aumento de la motilidad, elemento clave en la adquisición de características metastásicas (37). Además de la adquisición de propiedades móviles, y producto de la transformación, la célula epitelial comienza también a producir un conjunto de enzimas proteolíticas cuya actividad se suma a las propiedades migratorias intrínsecas con lo que se constituye el fenotipo metastásico (38).

Sobre la base de estas consideraciones, en el presente trabajo establecimos un modelo de estudio utilizando las células MCF-7, que constituyen una línea celular de características epiteliales, débilmente invasiva. En estas células, intentamos evaluar el papel de la GTPasa Rho que regula la funcionalidad del citoesqueleto de actina, en la adquisición de propiedades invasivas, para lo cual sobre-expresamos la versión activa de RhoA (RhoGTP) y estudiamos un conjunto propiedades funcionales que definen la adquisición de propiedades malignas como un modo de evaluar la participación de esta molécula en la progresión tumoral. Nuestras observaciones nos permiten establecer una relación funcional entre la actividad de RhoA y la adquisición de propiedades malignas.

Los principales resultados de esta tesis sugieren que las células MCF-7 que sobre-expresan Rho-GTP, expresan un fenotipo celular más invasivo que es el resultado de la expresión de algunas propiedades funcionales.

Células RhoGTP expresan un nivel elevado de polimerización de actina que se manifiesta en la estructuración de fibras de estrés corticales que colocalizan con Vinculina, proteína característica de la adhesión focal (Fig 3,4) La nítida detección de Vinculina no se asocia a un aumento de la expresión puesto que la masa de Vinculina no se modifica sustancialmente como producto de la sobre-expresión de la forma activa de RhoA (Fig 5,6) No obstante lo anterior, cuando se analiza la proporción de Vinculina que se mantiene insoluble al tratamiento con un detergente no iónico (Tritón X-100) y que constituye una representación aproximada de la Vinculina residente en la adhesión focal, detectamos que las células Rho-GTP depositan en esa fracción una proporción mayor que las controles transfectadas con el control vacío lo que permite suponer que, efectivamente, la sobre-expresión de Rho-GTP induce un fortalecimiento de la adhesión focal.

Una de las manifestaciones de los cambios en la dinámica del citoesqueleto es la modificación de la conducta adhesiva celular (10) El fenómeno adhesivo no se reduce al mero contacto de las células con la matriz insoluble sino, además, incluye cambios importantes en la forma que permiten que la célula amplifique el número de contactos con la matriz y de este modo module la adhesividad. Sobre la base de ese principio, evaluamos el efecto de la sobre-expresión de RhoA activo sobre la adhesión y detectamos que las células RhoGTP expresan una menor adhesividad a todas las moléculas de matriz que se ensayaron (Fig 7,8) Del mismo modo, al hacer un recuento de la proporción de células que habían extendido su superficie de contacto con la matriz, detectamos que en las células Rho-GTP el nivel de

estiramiento celular era significativamente menor que en las controles lo que reforzaba nuestra observación hecha sobre la adhesividad (40) Con el propósito de evaluar el compromiso de RhoA y sus efectores celulares en este fenómeno, incubamos las células con Y-27632, un inhibidor de la quinasa dependiente de Rho (ROCK), blanco molecular primario de la actividad de Rho. Como se aprecia en las figuras 9 y 10, el inhibidor de ROCK cuyo efecto global apunta hacia una disrupción de las fibras de estrés, aumenta la adhesividad y nivel de estiramiento celular lo que constituye una potente sugerencia en el sentido que la sobre-expresión de Rho activo genera un fenotipo con un mayor nivel de tensión en el cuerpo celular, fruto de un incremento de la actividad de ROCK, lo que predispone a la célula a un menor nivel de adhesión y, en consecuencia, un menor estiramiento. Estos resultados están de acuerdo con datos de la literatura que sostienen que la actividad de Miosina –que depende en forma directa de la fosforilación de su cadena liviana- se relaciona en forma inversa con la tasa de estiramiento celular (39-42).

Con el propósito de evaluar si las células RhoGTP, que se comportan como menos adhesivas, también expresan una alteración de la ruta de señalización dependiente de integrinas, evaluamos el nivel de activación de la quinasa de adhesión focal (FAK). La figura 12 muestra que, en condiciones basales, células que han permanecido adheridas por 24 h sobre plástico en medio libre de suero, expresan una menor proporción de FAK fosforilado. Sin embargo, cuando las células se adhieren por un período de 4 h sobre una matriz de Fn, las células Rho-GTP alcanzaron un nivel de activación similar al de las controles las que no modifican su nivel de activación por la adhesión a Fn (Fig 13) Este resultado permite sugerir que la adhesión de las células Rho-GTP a una matriz “enriquecida” en ligandos de integrinas revierte la condición de inactivación de FAK inducida por Rho-GTP. Este

resultado también está de acuerdo a datos de la literatura reciente que indican que animales nulos para FAK presentan una activación constitutiva de Rho (25). Además en células tumorales (A431) que expresan muchas copias de EGFR y que en respuesta a EGF se produce una desfosforilación de FAK con la consiguiente pérdida de adhesión. La activación de FAK por integrinas (matriz de Fn) bloquea la desfosforilación de FAK inducida por EGF(45).

El potencial invasivo celular depende en forma directa de la capacidad del citoesqueleto de remodelarse favoreciendo la migración celular (29). Con el fin de evaluar si los cambios generados en el citoesqueleto que resultan de la activación de RhoA producen cambios en la invasividad celular, realizamos ensayos de invasión utilizando insertos de doble cámara de acuerdo a los protocolos establecidos en nuestro laboratorio. Como la figura 14 muestra, las células Rho-GTP muestran el doble de potencial invasivo que las controles en un ensayo de 48 h. Estos resultados concuerdan también con el aumento de la expresión de uPA y MMP-9 -rasgos funcionales directamente asociados con la migración asociada con la degradación de MEC (28,38,43)- observado en las mismas células (Fig 18, 19). En resumen, la sobre-expresión de Rho-GTP en células débilmente invasivas induce una menor adhesividad, una disminución de la activación de FAK, un aumento de la invasividad y un incremento de la expresión de proteasas tumorales, todos estos, rasgos característicos del fenotipo invasivo.

Uno de los rasgos característicos de las células invasivas es la activación constitutiva de algunas rutas de señalización y receptores de factores de crecimiento. Es el caso de la ruta ERK-MAP quinasas y el receptor de EGF (EGFR) que se encuentran fosforilados en muchos tumores epiteliales (46). Las células Rho-GTP muestran

niveles aumentados de ERK 1,2 fosforilado (independiente de la adhesión a un sustrato) como lo muestran las figuras 20 y 21, además expresan un nivel de activación de EGFR (Fig 16,24) sustancialmente aumentado respecto de las células controles lo que, nuevamente, confirma que la sobre-expresión de RhoGTP induce un nivel de activación de importantes rutas de señalización características de un fenotipo maligno. Concordante con esos datos, las células RhoGTP expresan en su superficie proteínas fosforiladas en Tirosina que se asocian parcialmente con Actina (Fig 17).

Trabajos recientes realizados en células A431 han mostrado que la invasividad celular estimulada por EGF es la consecuencia directa de la desfosforilación de FAK . El estímulo de EGF produce cambios morfológicos que generan células retráctiles, capaces de liberarse de la MEC, que incrementan la motilidad tumoral, invasión y metástasis (45).

La inhibición de la actividad quinásica intrínseca de EGFR con Tirfostina (AG 1478), la inhibición de las fosforilaciones en tirosina con Genisteína y la inhibición de c-Src con PP2 resultan en una disminución de la activación de ERK y una consecuente disminución de la producción autocrina de uPA por las células RhoGTP (Fig 22).

Trabajos previos demostraron que la promoción de la migración provocada por uPA requiere de la unión de la enzima a uPAR y la activación de Ras/ERK. Se ha sugerido que uPA también es responsable de la activación de MLCK en un evento corriente abajo de Ras/ERK y que es esencial para la estimulación de la migración por uPA (46) Los mismos autores propusieron la existencia de una cooperatividad entre la ruta Ras-Erk y Rho-Rho quinasa en la activación de la migración por Uroquinasa (47,48).

Los datos presentados en este trabajo permiten sostener que la activación de Rho produce en las células efectos que se ejercerían a través de dos vías diferentes: por una parte la activación de rutas de señalización y por otra, la activación de efectores propios del citoesqueleto de actina, como es el caso de ROCK (49). La interconexión de ambas rutas fue puesta a prueba evaluando la activación del EGFR, de ERK y la producción de uPA, en presencia del inhibidor específico de ROCK. En células RhoGTP todos estos parámetros, que expresaban una activación basal aumentada, resultaron inhibidos por Y-27632 lo que sugiere que el status de activación de miosina y su consecuente posibilidad de estructurar fibras de estrés es capaz de regular la activación de rutas de señalización a nivel de EGFR (Fig 23,24). Sorprendentemente, en las células controles, que expresan niveles bajos de RhoGTP, este inhibidor provoca un estímulo a la activación de EGFR, ERK 1,2 y un aumento en la producción de uPA. Este resultado permite confirmar que el estatus previo de organización del citoesqueleto de Actina determina la respuesta del inhibidor de ROCK. Esta sugerencia se ve reforzada por el análisis de la inmunofluorescencia para actina y P-Tyr de células controles tratadas con inhibidor en las que se observa un aumento discreto de la marca de P-Tyr (Fig 25).

Es interesante destacar que se ha demostrado que la inhibición de la actividad catalítica de EGFR por Tirfostina (AG 1478) reduce significativamente la formación de fibras de estrés en respuesta a LPA en fibroblastos Swiss 3T3 (51) lo que propone una activa conversación cruzada entre la integridad del citoesqueleto de Actina y la activación de EGFR (52,53).

Finalmente, es importante destacar que, al revés de lo que ocurre en fibroblastos (49), el aumento de la expresión de Rho activo en las células mamarias produce un estímulo a la invasividad. Evidencias similares que asocien la motilidad celular con la activación de RhoA han sido reportados para células prostáticas , monocitos (49) entre otras células. En fibroblastos de ratón, se ha descrito que la adhesión a Fibronectina provoca una disminución transitoria de la activación de Rho, evaluada por pull-down (54). Esta evidencia coloca la capacidad adhesiva de las células en oposición a la activación de Rho lo que hace razonable sostener que en células que sobre-expresan Rho-GTP la capacidad adhesiva (evaluada a tiempos cortos) esté disminuida. En nuestros resultados, el papel de RhoA-GTP fortaleciendo la adhesión focal queda demostrado en células en las que, luego de permanecer adheridas por 24 horas, la proporción de Vinculina asociada a la MEC aumenta significativamente en las células transfectantes. Estos dos resultados no son excluyentes ni contradictorios, se producen como manifestación de una secuencia temporal que define el papel de RhoA en los procesos adhesivos y migratorios.

MECANISMOS POSIBLES

Los cambios morfo-funcionales provocados por la sobre-expresión de la forma activa de RhoA son en su mayoría, producto de la activación de ROCK y muestran como rasgo distintivo una activación basal de el receptor de EGF. Este fenómeno trae como consecuencia la activación de la ruta ERK1,2 y un aumento en la producción de uPA. La activación de EGFR provocada sin el estímulo de la adición de su ligando natural (EGF) se puede explicar por dos mecanismos posibles:

1. El fenotipo Rho-GTP expresa en forma constitutiva un ligando para el receptor de EGF. Esta molécula, muy probablemente, se expresa unida a membrana y su procesamiento depende de una actividad metaloproteásica.
2. La forma activa de ROCK es capaz de fosforilar directamente al receptor de EGF de modo similar a como lo hace con el sustrato IRS-1 del receptor de insulina (55).

CONCLUSIONES

Esta tesis muestra evidencias sobre algunos aspectos de la regulación de la GTPasa de la familia Rho en células epiteliales no descritos previamente.

- a. La sobre-expresión de la forma activa de RhoA (RhoGTP) en células epiteliales mamarias afecta su patrón adhesivo como resultado de un aumento de la tensión intracelular que, creemos, redundará en una menor exposición de sitios de unión a matriz.
- b. La menor adhesión es posible revertirla utilizando Y-27632, un inhibidor de ROCK, principal efector de Rho y trae como consecuencia una menor activación basal de FAK. Esta menor activación de FAK también es posible revertirla adhiriendo las células a Fibronectina.
- c. Las células MCF-7 transfectadas (RhoGTP) también expresan un nivel aumentado de activación de la ruta de las MAP quinasas lo que, al parecer, es consecuencia de la activación por fosforilación en Tirosina del receptor de EGF que además promueve la expresión de Uroquinasa (u-PA), ambos fenómenos inhibidos por Tirfostina (AG 1478), inhibidor específico de la actividad quinásica de EGFR.
- d. La inhibición de ROCK por Y-27632 provoca una respuesta diferencial en las células controles comparadas con las RhoGTP. Mientras en las primeras activa la fosforilación de ERK1,2 y la producción de u-PA, en las células RhoGTP bloquea ambos parámetros.

Nuestro aporte a la comprensión del rol de la GTPasa Rho en el cáncer epitelial.

El fenotipo tumoral invasivo se constituye luego que la célula "iniciada" adquiere un conjunto de propiedades funcionales asociadas a cambios celulares específicos como alteraciones de la dependencia al suero, pérdida de la inhibición del crecimiento por contacto, cambios en la adhesividad, adquisición de motilidad, y cambios morfológicos atribuidos en su mayoría a modificaciones en la organización del citoesqueleto.

Estas últimas propiedades morfológico-funcionales incluyen mayoritariamente cambios en el citoesqueleto de actina el que, entre otros factores, está regulado por la actividad de las GTPasas de la familia Rho. En experimentos en los que, luego de seleccionar *in vivo* clones metastáticos provenientes de una línea celular de melanoma débilmente invasiva, se analizó el patrón de expresión génica mostraron que uno de los miembros de la familia Rho (RhoC) figuraba entre los tres genes cuya sobre-expresión diferenciaba de manera más clara los clones invasivos de los no invasivos (56). Por otra parte, en estudios realizados en especímenes tumorales humanos, se ha observado que RhoA se encuentra sobre-expresada en tumores de pulmón, colon y mamas (23,27,57). Estos datos permiten asignar a Rho un papel fundamental en los cambios de forma y motilidad en células epiteliales lo que contrasta con los datos obtenidos en células de tipo mesenquimal en las que la activación de Rho sugiere la constitución de un fenotipo menos móvil.

Basados en estos antecedentes que asociaban la sobre-expresión de RhoA con la progresión tumoral, nuestros datos provenientes de células epiteliales débilmente

invasivas MCF-7 permiten sugerir que la forma activa de RhoA desencadena un conjunto de cambios celulares asociados a la malignidad celular que, además de modular la organización del citoesqueleto de actina y la estructuración de las adhesiones focales, activa una ruta de señalización que depende de la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

También este trabajo de Tesis permite sugerir que la Rho quinasa (ROCK), principal efector de Rho en la mayoría de las células estudiadas, está asociada funcionalmente a los cambios descritos.

Perspectiva biotecnológica

La adquisición de propiedades invasivas constituye el evento decisivo en el desarrollo de metástasis en el proceso canceroso. En este fenómeno, la re-estructuración del citoesqueleto de Actina es un requerimiento esencial pues otorga a la célula características migratorias. En este trabajo de tesis hemos descrito que la sobre-expresión de la forma activa de la proteína RhoA que regula la formación de fibras de estrés, induce la invasividad celular y la expresión de marcadores de malignización. Estos datos permiten sugerir que este proceso iniciado por la activación de Rho cumple con algunos de los requisitos necesarios para convertirse en un blanco terapéutico potencial para tratar tumores invasivos.

BIBLIOGRAFIA

1. Holleb A.I, Fink D.J and Murphy G.P. 1991. Clinical Oncology American Cancer Society ed.
2. Woodhouse E.C, Chuaqui R.F. and Liotta L.A.1997. General mechanisms of metastasis. *Cancer (phila)* 80:1529 – 1537.
3. Thiery J.P, Chopin D. 1999. Epithelial cell plasticity in development and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* Vol18, 1: 31-42.
4. Liu J.F , Crépin M, Liu J.M, Barritault D and Ledoux D. 2002. FGF-2 and TPA induce Matrix Metalloproteinase-9 secretion in MCF-7 cells through PKC activation of the ras/ERK pathway. *Biochemical and Biophysical Research communications* 293:1174-1182.
5. Blasi, F., and Carmeliet, P. 2002. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3: 932-943.
6. Kruger A, Soelt R, Lutz V, Wilhelm O, Magdolen V and Schmitt M. 2000. Reduction of breast carcinoma tumor and lung colonization by overexpression of the soluble urokinase type plasminogen activator receptor (CD87). *Cancer gene therapy* Vol 7, 2:292-299
7. Alberola V, Juan O. 2001. Oxigenación tumoral, angiogénesis y metástasis. *Rev Cáncer* Vol 15, 2:8-18.
8. Yarden Y and Sliwkowski M. 2001. Untangling the ErbB signaling network. *Nature rev. mol. cell Biology* 2:127-37.

BIBLIOGRAFIA

1. Holleb A.I, Fink D.J and Murphy G.P. 1991. Clinical Oncology American Cancer Society ed.
2. Woodhouse E.C, Chuaqui R.F. and Liotta L.A.1997. General mechanisms of metastasis. *Cancer (phila)* 80:1529 – 1537.
3. Thiery J.P, Chopin D. 1999. Epithelial cell plasticity in development and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* Vol18, 1: 31-42.
4. Liu J.F , Crépin M, Liu J.M, Barritault D and Ledoux D. 2002. FGF-2 and TPA induce Matrix Metalloproteinase-9 secretion in MCF-7 cells through PKC activation of the ras/ERK pathway. *Biochemical and Biophysical Research communications* 293:1174-1182.
5. Blasi, F., and Carmeliet, P. 2002. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3: 932-943.
6. Kruger A, Soelt R, Lutz V, Wilhelm O, Magdolen V and Schmitt M. 2000. Reduction of breast carcinoma tumor and lung colonization by overexpression of the soluble urokinase type plasminogen activator receptor (CD87). *Cancer gene therapy* Vol 7, 2:292-299
7. Alberola V, Juan O. 2001. Oxigenación tumoral, angiogénesis y metástasis. *Rev Cáncer* Vol 15, 2:8-18.
8. Yarden Y and Slivkowski M. 2001. Untangling the ErbB signaling network. *Nature rev. mol. cell Biology* 2:127-37.

9. Liu D, Aguirre G , Estrada Y, Ossowski L.2002. EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma *Cancer Cell* 5:445-57.
10. Huttenlond A, Sandborg R and Horwitz A. 1995. Adhesion in cell migration. *Current opinion in Cell Biology* 7:697-706.
11. Sastry S and Burridge K. 2000. Focal Adhesions: A Nexus for intracellular Signaling and Cytoskeletal Dinamics *Experimental Cell Research* 261: 25-36.
12. Cox E and Huttenlocher A, 1998. Regulation of integrin-Mediated adhesion during cell migration. *Microsc Res Tech* 43:412-419.
13. Sachary I. 1997. Focal adhesion Kinase. *Int J Biochem Cell Biology* 29,929-934.
14. J:sieg D, Hauck C.R , Illic D, Klingbeil C.K, Schaefer E, Damsky C.H and Schlaepfer D. 2000. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nature Cell Biology* Vol 2, 249-257.
15. Schoenwaelder SM, and Burridge K. 1999. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrin. *Curr Opinion in Cell Biology*. 11:274-286.
16. Oxford G, Theodorescu D. 2003. Ras superfamily monomeric proteins in carcinoma cell motility. *Cancer letters* 189:117-128.
17. Kaibuchi K, Kuroda S and Amano M. 1999. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu.Rev.Biochem.* 68:459 – 486.
18. Hall A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* Vol 279,23:509-514.
19. Burridge K. 1999. Crosstalk between Rac and Rho. *Science* 288:2028-2029.

20. Amano M, Ito M, Kimura K, Chihara Y.F, Nakona T, Matsuura Y and Kaibuchi Y. 1996. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated Kinase (Rho-kinase). *The Journal of Biological Chemistry* Vol 271, 34:20246-20249.
21. Smith A and Hall M.N. 1998. Signalling to the actin cytoskeleton. *Annu.Rev.Biol.* 14:305 – 338.
22. Yoshioka K, Nakamori S and Itoh K. 1999. Overexpression of small GTP binding protein RhoA promotes invasion of tumour cells. *Cancer research* 59: 2004 – 2010.
23. Ridley A.R. 2001. Rho GTPases and cell migration. *Journal of Cell Sciences.* 114: 2713 – 2722.
24. Komberg L.R. 1998. Focal adhesion kinase and its potential involvement in tumor invasion and metastasis. *Basic Science review* 20:745-752
25. Ren X, Kiosses W.B, Schlaepfer D.D, and Schawartz M.A. 2000. Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover. *Journal of Cell Science* 113:3673-3678.
26. Giacotti F.G and Ruoslahti E.1999. Integrin Signaling. *Science* 285:1028-1033.
27. Sahai E and Marshall C.J. 2002. Rho GTPases and cancer. *Nature reviews of cancer* 21:133-142.
28. Nobes C.D and Hall A. 1999. Rho GTPases control polarity, Protrusion and Adhesion during cell Movement. *The Journal of Cell Biology* Vol 144, 6:1235-1244.
29. Lozano E, Betson M, and Braga V.M. 2003.Tumor progression:small GTPases and loss of cell-cell. *BioEssays* 25:452-463.
30. Aplin A.E , Howe A and Juliano R.L. 2002. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of Integrins, Cadherins,

- Inmunoglobulin- Cell adhesion Molecules, and Selectins. *Pharmacological reviews* Vol 50 2:197-263.
31. Katoh K, Kano Y, Amno M, Onishi H, Kaibuchi K and Fujiwara K. 2001. Rho. Kinase mediated contraction of isolated stress fibers. *The Journal of Cell Biology* Vol 3, 3: 567-583.
32. Kornberg LJ, Earp HS, Parsons JT, Schaller M, Juliano RL. 1992. Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 267:23439-23442.
33. Braga V.M . 2002. Cell-cell adhesion and signalling. *Current Opinion in Cell Biology* 14:546-556.
34. Seger Rand Krebs E.G.1995.The MAPK signaling cascade *FASEB J.* 9: 726-735.
35. Bos JL.1989. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Research* 49: 4682-4689.
36. Hoshino R. Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-i S, Wada H, Fujimoto J, Kohno M.1999. Constitutive activation of the 41/43 -Kda mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 18: 813-822.
37. Pawlak G and Helfman D.M. 2001.Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Current Opinion in Genetics & Development* 11:41-47
38. Santibáñez J.F, Guerrero J, Quintanilla M, Fabra A and Martínez J. 2002. Transforming growth factor- β 1 modulates matrix metalloproteinase-9 production through the Ras/MAPK signaling pathway in transformed keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296:267-273.
39. Schoenwaelder S.M and Burridge K. 1999. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Current Opinion in Cell Biology* 11:274-286.

40. Liu L, Schwarts B.R, Lin N, Winn R.K and Harlan J.M. 2002. Requirement for RhoA activation in leukocyte De-Adhesion. *The Journal of Immunology* 169:2332-2336.
41. Wakatsuki T, Wysolmerski R.B and Elson E.L. 2003. Mechanism of cell spreading: role of myosin II. *Journal of Cell Science* 116:1617-1625.
42. Tsuji T, Ishizaki T, Okamoto M, Narumiya S. 2002. ROCK and mDia antagonize in Rho- dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblast. *The Journal of Cell biology* Vol 157, 5:819-830.
43. Muller S.M, Okan E and Jones P. 2000. regulation of Urokinase Receptor transcription by Ras and Rho family GTPases. *Biochemical and Biophysical Research communications*. 270: 892-898.
44. Kinch M.S, Clark G.J, Der C.J and Burridge K. 1995. Tyrosine phosphorylation regulates the adhesions of Ras-transformed breast Epithelia. *The Journal of Cell Biology* Vol 133, 2:461-471.
45. Lu Z, Jiang G, Jensen P.B and Hunter T. 2001. Epidermal Growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Molecular and Cellular Biology* Vol 21, 12:4016-4031.
46. Ma Z, Webb D.J, Jo M and Gonias S.L. 2001. Endogenously produced urokinase-type plasminogen activator is mayor determinant of the basal level of activated ERK/MAP kinase and prevents apoptosis in MDA-MB 231 breast cancer cells. *Journal of Cell Science* 114:3387-3396.

47. Nguyen D.H.D, Catling A.D, Webb D.J, Sankovic M, Walker L.A and Gonias S.L. 1999. Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ERK to promote migration of Urokinase-type Plasminogen activator- stimulated cells in an Integrin-selective manner. *The Journal of Cell Biology* Vol 146 1:149-164.
48. Jo M, Keene S. Somlyo T.A and Gonias S.L. 2002. Cooperativity between the ras/erk and Rho-Rho kinase pathways in urokinase-type plasminogen activator – stimulated cell migration. *The Journal of Biological Chemistry* 277:12479-12485.
49. Riento K and Ridley A.J. 2003. ROCKS: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature* 4:446-456
50. Moro L, Dloce M, Cabodi S “y col”. 2001. Integrin- induced Epidermal Growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *The Journal of Biological Chemistry* Vol 277 11:9405-9414.
51. Gohla A, Harhammer R and Schultz G. 1998. The G-protein G₁₃ but not G₁₂ mediates signaling from Lysophosphatidic acid Receptor via Epidermal Growth Factor Receptor to Rho. *The Journal of Biological Chemistry* Vol 273, 8:4653-4659.
52. van Bergen en Henegouwen PM, den Hartigh LC, Romeyn P, Verkleij AJ, Boonstra J. 1992. The epidermal growth factor receptor is associated with actin filaments. *Exp Cell Research* Vol 199,1:90-7.
53. Malliri A, Symons M, Hennigan R.F, Hurlstone A, Lamb R.F, Wheeler T and Ozanne B.W. 1998. The AP-1 is required for EGF-induced activation of Rho-like GTPases, Cytoskeletal Rearrangements, Motility and in vitro invasion of A431 Cells. *The Journal of Cell Biology* Vol 143, 4:1087-1099.

54. Arthur W.T, Noren N.K and Burridge K. 2002. Regulation of Rho family GTPases by Cell-Cell and Cell Matrix Adhesion. *Biological Research* 35:239-246.
55. Sordella R, Jiang W, Chen G.C, Curto M and Settleman J. 2003. Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between Adipogenesis and Myogenesis. *Cell* Vol 113,147-158.
56. Clark E.A, Golub T.R, Lander E.S and Hynes R.O. 2003. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* Vol 406:532-535.
57. Sahai E and Marshall C.J. 2003. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signaling and extracellular proteolysis. *Nature Cell Biology* Vol 3, 8:711-719.