

UCH-FC
Biotecnología
1539
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

“PAPEL DE LA PROTEÍNA RAB5 EN EL RECAMBIO DE ADHESIONES FOCALES Y LA MIGRACIÓN CELULAR”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

PABLO ALEXIS MENDOZA SOTO

Director de Seminario de Título: Dr. Vicente Torres Gómez
Patrocinante de Seminario de Título: Dra. María Rosa Bono

MAYO 2013
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Pablo Alexis Mendoza Soto.

“PAPEL DE LA PROTEÍNA RAB5 EN EL RECAMBIO DE ADHESIONES FOCALES Y LA MIGRACIÓN CELULAR”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Vicente Torres Gómez
Director Seminario de Título

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Vicente Torres', written over a horizontal line.

Dra. María Rosa Bono
Patrocinante

Comisión de Evaluación

Dr. Juan Fernández H.
Presidente Comisión

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Juan Fernández', written over a horizontal line.

Dra. María Rosa Bono M.
Evaluador



Santiago de Chile, 27 de junio de 2013



INDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|-----|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | iv |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | v |
| RESUMEN..... | vi |
| ABSTRACT..... | vii |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 8 |
| 1.1 Patología del cáncer como enfermedad neoplásica..... | 8 |
| 1.2 Los Hallmarks del cáncer..... | 9 |
| 1.3 Alteraciones celulares que sustentan la malignidad celular..... | 11 |
| 1.4 Migración celular..... | 12 |
| 1.5 La Metástasis..... | 12 |
| 1.6 Capacidad invasiva..... | 14 |
| 1.7 Adhesión celular e integrinas..... | 15 |
| 1.8 Adhesiones focales..... | 16 |
| 1.9 Recambio de adhesiones focales..... | 19 |
| 1.10 Migración celular y tráfico endosomal mediado por proteínas Rab..... | 20 |
| 1.11 Clasificación de las proteínas Rab..... | 21 |
| 1.12 Ciclo de regulación de las Rabs..... | 21 |
| 1.13 Endocitosis en el tráfico de moléculas de adhesión..... | 24 |
| 1.14 Participación de Rab5 en el recambio de receptores de adhesión..... | 24 |
| 1.15 Rab5 es un potencial regulador de la migración celular..... | 25 |
| 2. HIPÓTESIS..... | 26 |
| 3. OBJETIVOS..... | 26 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 27 |
| 4.1 Materiales..... | 27 |
| 4.2 Plasmidios..... | 28 |
| 4.3 Cultivo celular..... | 29 |
| 4.4 Inmunofluorescencia..... | 29 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.5 | Análisis de imágenes..... | 31 |
| 4.6 | SDS-PAGE y Western blot..... | 32 |
| 4.7 | Inmunoprecipitación..... | 33 |
| 4.8 | Ensayo de precipitación por afinidad de Rab5-GTP | 34 |
| 4.9 | Ensayo de trans-migración (Boyden-Chamber, Transwell™)..... | 35 |
| 4.10 | Ensayo de invasión (Matrigel assay)..... | 35 |
| 4.11 | Preparación de fracciones enriquecida en adhesiones focales..... | 36 |
| 4.12 | Ensayo de adhesión..... | 36 |
| 4.13 | Análisis de niveles superficiales de integrina β 1..... | 37 |
| 4.14 | Ensayo de <i>spreading</i> | 37 |
| 4.15 | Ensayo de Pull-Down durante el cierre de multiherida..... | 37 |
| 4.16 | Ensayo de Pull-Down durante el <i>spreading</i> | 38 |
| 4.17 | Silenciamiento mediante shRNA..... | 38 |
| 4.18 | Análisis estadístico..... | 39 |
| 5 | RESULTADOS..... | 40 |
| 5.1 | Rab5 se activa durante el cierre de multiherida..... | 40 |
| 5.2 | Rab5 se activa durante el <i>spreading</i> | 42 |
| 5.3 | Visualización de la actividad localizada de Rab5 mediante biosensor..... | 44 |
| 5.4 | Rab5 es requerida para la migración celular..... | 49 |
| 5.5 | La invasión celular es dependiente de Rab5..... | 55 |
| 5.6 | Modelo celular complementario: carcinoma pulmonar..... | 57 |
| 5.7 | La re-expresión de Rab5 funcional, recupera la migración celular..... | 60 |
| 5.8 | Rab5 se asocia con componentes de adhesiones focales durante la migración | 62 |
| 5.9 | Participación de Rab5 en el recambio de adhesiones focales..... | 68 |
| 5.10 | Rab5 y la regulación del recambio de adhesiones focales..... | 71 |
| 5.11 | El silenciamiento de Rab5 retrasa la dinámica de desfosforilación de FAK..... | 77 |
| 5.12 | Videomicroscopía confirma retraso del desensamblaje de adhesiones focales..... | 79 |
| 5.13 | La actividad de Rab5 es requerida para el recambio de adhesiones focales..... | 82 |

| | | |
|---|-------------------|----|
| 6 | DISCUSIÓN..... | 84 |
| 7 | CONCLUSIONES..... | 92 |
| 8 | BIBLIOGRAFÍA..... | 93 |

INDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1. | Sellos del Cáncer..... | 9 |
| Figura 2. | Desarrollo de la Metástasis | 14 |
| Figura 3. | Ensamblaje de Adhesiones Focales..... | 17 |
| Figura 4. | Segregación de Dominios Rab..... | 21 |
| Figura 5. | Ciclo de Activación de las Rab..... | 23 |
| Figura 6. | Activación de Rab5 Durante el Cierre de Multiherida..... | 41 |
| Figura 7. | Activación de Rab5 Durante el <i>Spreading</i> | 43 |
| Figura 8. | Control de Especificidad del Biosensor mCherry-R5BD..... | 45 |
| Figura 9. | Control de Inespecificidad del Biosensor mCherry-R5BD..... | 47 |
| Figura 10. | mCherry-R5BD se acumula en la periferia celular durante el <i>spreading</i> | 48 |
| Figura 11. | Silenciamiento parcial (<i>Knock-Down</i>) de Rab5..... | 50 |
| Figura 12. | Nivel activo remanente de Rab5 en estado estacionario..... | 50 |
| Figura 13. | La reducción de Rab5 Retarda el Cierre de Herida..... | 52 |
| Figura 14. | La Transmigración Celular es Dependiente de Rab5..... | 52 |
| Figura 15. | El <i>spreading</i> celular es dependiente de Rab5..... | 54 |
| Figura 16. | La reducción de Rab5 no modifica la viabilidad..... | 56 |
| Figura 17. | La invasividad celular es dependiente de Rab5..... | 56 |
| Figura 18. | Silenciamiento parcial (<i>Knock-Down</i>) de Rab5 en células A549..... | 58 |
| Figura 19. | La transmigración es dependiente de Rab5 en células A549..... | 58 |
| Figura 20. | La invasividad celular es dependiente de Rab5 en células A549..... | 59 |
| Figura 21. | La transmigración se recupera al re-expresar Rab5 en células A549..... | 61 |
| Figura 22. | La transmigración se recupera al re-expresar GFP-Rab5 en células A549..... | 61 |
| Figura 23. | Inmunoprecipitación de Rab5 con componentes de adhesiones focales..... | 63 |
| Figura 24. | Inmunoprecipitación de componentes de adhesiones focales con Rab5..... | 63 |

| | |
|--|----|
| Figura 25. Rab5 co-localiza con paxilina durante el cierre de herida..... | 65 |
| Figura 26. Rab5 se asocia con adhesiones focales al sincronizar con nocodazol..... | 65 |
| Figura 27. Rab5(GTP) co-localiza con paxilina durante el cierre de herida..... | 67 |
| Figura 28. Rab5 está en adhesiones focales de células inducidas a adherirse..... | 67 |
| Figura 29. La expresión de integrina $\beta 1$ no sufre cambios al reducir Rab5..... | 69 |
| Figura 30. No hay diferencias en el anclaje a la matriz al reducir Rab5..... | 69 |
| Figura 31. Análisis microscópico del ensayo de adhesión celular..... | 70 |
| Figura 32. El Nocodazol induce la depolimerización de la red de microtúbulos..... | 72 |
| Figura 33. El silenciamiento de Rab5 retarda el desensamblaje de adhesiones focales. | 74 |
| Figura 34. La reducción de Rab5 retarda el desensamblaje de adhesiones en A549 ... | 76 |
| Figura 35. El silenciamiento de Rab5 retarda la defosforilación de FAK..... | 78 |
| Figura 36. Videomicroscopía muestra retardo del desensamblaje de AFs | 80 |
| Figura 37. Videomicroscopía muestra asociación Rab5-AFs en el tiempo..... | 81 |
| Figura 38. Sólo Rab5 activable recupera la capacidad de desensamblaje..... | 83 |
| Figura 39. Modelo de desensamblaje de adhesiones focales promovido por Rab5..... | 91 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------|---|
| shRNA | Short hairpin Ribonucleic Acid |
| AF | Adhesión Focal |
| GTP | Guanosín Tri-Fosfato |
| GDP | Guanosín Di-Fosfato |
| FAK | Kinasa de Adhesión Focal |
| MEC | Matriz Extra-celular |
| R5BD | Dominio de Unión a Rab5 activo |
| GST | Glutación-S-Transferasa |
| GFP | Proteína Fluorescente Verde |
| EEA1 | Antígeno Endosomal Temprano 1 |
| GEF | Intercambiador de Nucleótidos de Guanosina |
| GAP | Proteína activadora de la hidrólisis de GTP |



RESUMEN

La migración celular tumoral ha sido relacionada con una pérdida en la regulación del tráfico endocítico de moléculas involucradas en la adhesión, sin embargo, los mecanismos que subyacen esta regulación permanecen pobremente estudiados. En este trabajo, se muestra que la actividad de la GTPasa pequeña Rab5, un regulador maestro de la endocitosis, es requerida para el recambio de adhesiones focales (AFs), promoviendo de esta manera, la migración celular. La presencia y actividad de Rab5 fue estudiada en líneas celulares derivadas de cáncer mamario y carcinoma pulmonar, evaluándose la ubicación subcelular de la forma activa de la GTPasa mediante el uso de un biosensor fluorescente, mediante el cual se observó una activación temporal de Rab5 periférica durante la migración. Además, se detectó un ligero grado de asociación entre Rab5 y componentes de adhesiones focales. La expresión endógena de Rab5 se atenuó mediante shRNA y se observó un fuerte retardo en la migración de éstas células. Se cuantificó la dinámica de recambio de adhesiones focales en células sincronizadas con nocodazol, encontrándose un retraso en la cinética de desensamblaje de focos de adhesión al reducir Rab5 en estas células. Finalmente, se realizaron experimentos de recuperación, re-expresando las versiones silvestre y mutante inactivable de Rab5, encontrándose que la migración celular sólo se recupera al re-expresar la versión silvestre, mientras que la versión inactivable resultó ineficaz en recuperar el fenotipo. Estos resultados indican que el tráfico endocítico regulado por la activación de Rab5 es esencial para la migración celular tumoral y el recambio de adhesiones focales, eventos importantes en la metástasis tumoral.

ABSTRACT

Tumor cell migration has been associated with enhanced endocytic traffic of adhesion molecules. However, the mechanisms underlying such regulation remain elusive. Here, we show that the activity of the small GTPase Rab5, a master regulator of endocytosis, is required for focal adhesion (FA) turnover in order to promote migration. Rab5 requirement and activity were studied in human breast cancer and lung carcinoma cell lines, where spatio-temporal activation was determined with a fluorescent biosensor during migration, thus, peripherally-localized Rab5 activation was observed in migrating cancer cells. Also, Rab5 association with FA components was detected. Endogenous Rab5 was knocked-down by shRNA and down-regulation was followed by reduced cell migration and FA turnover. Finally, recovery experiments were performed by re-expressing wild-type Rab5 and the inactive mutant of Rab5. Cell migration and focal adhesion turnover were recovered by transfecting wild-type Rab5, but not the inactive mutant. These results indicate that regulation of endocytic traffic mediated by Rab5 activation is essential for cell migration and FA turnover, both important events for cancer cell metastasis.

INTRODUCCIÓN.

El cáncer es una patología que afecta a millones de personas a nivel mundial, y presenta diversos grados de malignidad dependiendo de su origen y velocidad de dispersión. Es responsable de la muerte de 7,6 millones de personas al año en el mundo mientras que en Chile, 22 mil personas al año mueren a causa de cáncer (Ferlay et al., 2010). Aunque hoy en día existen tratamientos de alta efectividad, dentro de los cuales se cuentan la cirugía, la quimioterapia, radioterapia y combinaciones de estos tratamientos, el éxito de éstos depende de múltiples factores como el tipo de cáncer, los órganos comprometidos, el diagnóstico temprano y la disponibilidad del tratamiento, entre otros (Hanahan and Weinberg, 2000).

Patología del Cáncer Como Enfermedad Neoplásica.

A grandes rasgos la enfermedad se origina por una alteración de un grupo células del organismo, que adquieren características que les permiten crecer de manera anormal (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011). Se trata de un proceso que incluye múltiples etapas, durante las cuales células normales sufren un proceso de transformación adquiriendo propiedades que les permiten convertirse en células tumorigénicas y finalmente malignas. En general, se describen varias características subyacentes al desarrollo del cáncer, características que han emergido producto de la observación de esta enfermedad en humanos y en modelos animales, y que fundamentan que el desarrollo tumoral procede mediante un proceso formalmente análogo a la

evolución Darwiniana. Según esto, una sucesión de cambios genéticos y epigenéticos, que confieren algún tipo de ventaja de crecimiento a su portador, induce a la conversión progresiva, desde células humanas normales a células cancerígenas.

Estas cualidades se han sistematizado dentro de un principio organizador denominado los sellos (“*Hallmarks*”) del cáncer, que por medio de una generalización permite la racionalización de la patología neoplásica (Hanahan and Weinberg, 2000).

Los “*Hallmarks*” del Cáncer.

Dentro de los sellos del cáncer se encuentran, señalización proliferativa sostenida y evasión a supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular programada e inmortalidad replicativa, inducción de la angiogénesis, y activación de los mecanismos de invasión y metástasis (Figura 1, Los sellos del cáncer).

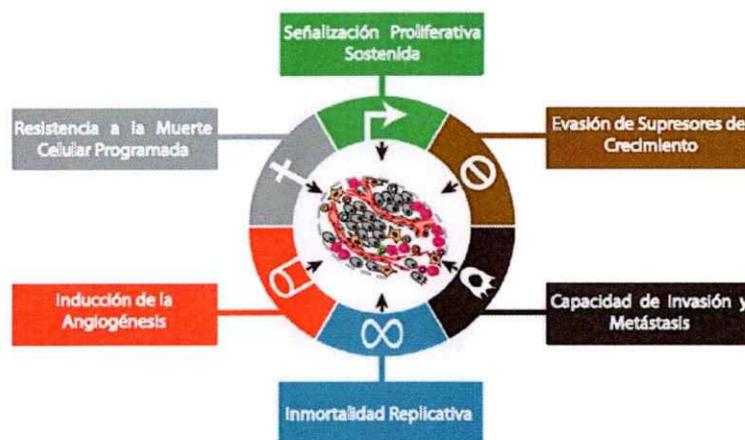


Figura 1: Los Sellos del Cáncer. La ilustración muestra una representación de 6 capacidades biológicas adquiridas durante las múltiples etapas del desarrollo de un tumor. (Modificado de (Hanahan and Weinberg, 2000)).

Originando estas características está la inestabilidad genómica, la cual genera la diversidad genética que agiliza la adquisición de estos sellos, mientras que la inflamación fomenta funciones anormales, y directamente implica la presencia de un activo microambiente tumoral. Ambas características han sido incorporadas como nuevos sellos del cáncer en una revisión reciente de este conjunto de propiedades, a las cuales también se suma la evasión de la respuesta inmune y la alteración del metabolismo energético (Hanahan and Weinberg, 2011). Si bien muchos de estos procesos ocurren continuamente en los organismos pluricelulares, no todos facultan a la célula para sobrevivir de forma autónoma, produciéndose una selección de los fenotipos mejor adaptados y generando sub-poblaciones con mayor aptitud para evadir los procesos normales de supresión del crecimiento (Nowell, 1976). A medida que los carcinomas provenientes de tejidos epiteliales progresan hacia grados patológicos superiores de malignidad, reflejados en la invasión local y el desarrollo de metástasis distantes, las células tumorales desarrollan alteraciones, tanto en su morfología como en su interacción con otras células y con su matriz extracelular (Aplin et al., 1998). Este conjunto de cambios se asocia a un programa celular denominado Transición Epitelio-Mesénquima (*epithelial-to-mesenchymal transition, EMT*), el cual confiere a las células tumorales atributos asociados con altos grados de malignidad (Yang and Weinberg, 2008). La alteración mejor caracterizada corresponde a la pérdida - en células de carcinoma - de E-cadherina, una molécula clave en la adhesión célula-célula, perdiéndose consecuentemente las uniones adherentes y desmosomas que mantienen la integridad del epitelio (Berx and van Roy, 2009).

Por otro lado, se expresan moléculas de adhesión normalmente asociadas con migración celular durante el desarrollo embrionario. Por ejemplo, en varios carcinomas agresivos se expresa N-cadherina, la cual es normalmente expresada en neuronas migratorias y células mesenquimáticas durante la organogénesis (Cavallaro and Christofori, 2004). Además, se han encontrado: a) alteraciones en la expresión de otras moléculas involucradas en la adhesión, como las integrinas, (encargadas de conectar el citoesqueleto a la red de proteínas que conforman la matriz extracelular), y b) alteraciones en la expresión de elementos secretados responsables del remodelamiento de la matriz (como las metaloproteasas de matriz que participan en procesos de invasión).

Alteraciones Celulares que Sustentan La Malignidad Celular.

Las células tumorales presentan cambios morfológicos a nivel microscópico, que llevan a la pérdida en la organización propia del tejido que componen. En su lugar las células se polarizan, observándose una disposición del citoesqueleto propia de células migratorias, donde existe un extremo de avance que se remodela continuamente, y un extremo posterior que se retrae periódicamente (Zallen, 2007). Esta morfología polarizada está involucrada en una cualidad esencial de las células tumorales malignas: La migración celular (Muthuswamy and Xue, 2012).

Migración Celular

La migración celular, como característica del cáncer, y su direccionalidad dependen del recambio constante de las adhesiones célula-matriz, permitiendo el dinamismo de la adhesividad celular requerido para la migración (Yamaguchi et al., 2005). Este proceso se caracteriza por un equilibrio entre ensamblaje y desensamblaje de complejos de adhesión, y es crucial en el desarrollo de la metástasis, ya que las células somáticas generalmente establecen adhesiones definitivas una vez diferenciadas, formando parte de un tejido con plasticidad limitada; sin embargo, cuando las células tumorales recuperan la capacidad migratoria, pueden salir del tumor y dispersarse dentro del organismo, lo cual hace la patología más compleja y desfavorable para el paciente (Talmadge and Fidler, 2010).

La Metástasis.

Tarde o temprano, durante el desarrollo de la mayoría de los tipos de cáncer humanos, las masas tumorales primarias originan células pioneras que, valiéndose de su capacidad migratoria, emigran del tumor, invaden tejidos adyacentes, y consecuentemente viajan a sitios distantes donde pueden formar nuevas colonias. Estos asentamientos de células tumorales, distantes al tumor primario, son denominados metástasis, y son responsables del 90% de las muertes a causa del cáncer (Sporn, 1996).

El desarrollo de la metástasis es también un proceso multifactorial que requiere de varias etapas, que han sido descritas en un modelo simplificado (Figura 2, Metástasis) (Talmadge and Fidler, 2010). Luego de un evento primario de transformación, el

crecimiento de células neoplásicas es progresivo y frecuentemente lento. Para que una masa tumoral supere 2 mm de tamaño se requiere vascularización, por lo que la síntesis y secreción de factores angiogénicos juega un rol crítico en establecer una red vascular alrededor del tejido huésped (Folkman, 1985). Luego, la invasión local del estroma del tejido huésped por las células tumorales ocurre por múltiples mecanismos, incluyendo vénulas de pared delgada y canales linfáticos, los cuales ofrecen poca resistencia a la invasión (Liotta and Clair, 2000). Luego, desde las ramificaciones del tumor que invaden el sistema circulatorio, se liberan émbolos conteniendo células tumorales, permitiendo la circulación de éstas en el torrente sanguíneo, y además el aumento de su tamaño vía interacción con células hematopoiéticas circulantes. Los émbolos viajan a través de la circulación tanto sanguínea como linfática, en donde aquellas células tumorales que sobreviven a la circulación tienen la posibilidad de adherirse en la pared de capilares distantes del tumor primario, y establecerse en un nicho secundario. Desde este nicho secundario, y por mecanismos similares a aquellos involucrados a la invasión inicial del tejido, las células tumorales pueden extravasarse desde el émbolo de vuelta al parénquima. La proliferación de estas células tumorales origina un foco metastásico que establece su propia vascularización y protección contra la respuesta inmune, pudiendo dar lugar al desarrollo de una nueva metástasis (Talmadge and Fidler, 2010).

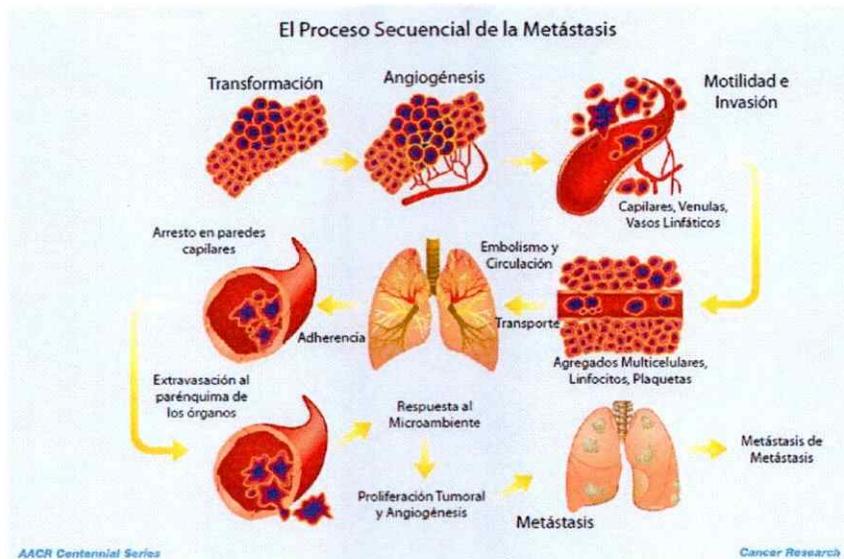


Figura 2: Desarrollo de la Metástasis. Modificado desde (Talmadge and Fidler, 2010).

Capacidad Invasiva.

Aunque la capacidad migratoria favorece la dispersión de las células tumorales dentro de su microambiente, esta característica por sí sola no sustenta la capacidad invasiva y metastásica, por lo que adicionalmente se requiere un remodelamiento de la matriz extracelular circundante al tumor para permitir la invasión. Además de migratorias, las células tumorales que prevalecen y establecen metástasis distantes han tenido que invadir localmente el micro-ambiente que rodea el tumor, denominado estroma, y salir de éste, ingresando al torrente sanguíneo (Liotta and Kohn, 2001). En este último, las células tumorales deben sobrevivir al ataque del sistema inmune y ser capaces de anclarse a la pared interna de los vasos para proliferar y nuevamente invadir el tejido, pudiendo llegar a colonizar un órgano y establecer un tumor secundario o micrometástasis dispersas por todo el organismo (Gupta and Massagué, 2006). Por lo tanto, la capacidad invasiva es también un punto crítico en el desarrollo de la metástasis,

el cual permanece pobremente estudiado. **Tanto la migración como la invasión tumoral dependen de la interacción de la célula con su matriz extracelular.**

Adhesión Celular e Integrinas.

La interacción entre la célula y su matriz extracelular ocurre en sitios específicos, denominados adhesiones focales (Burridge et al., 1988). Estos sitios corresponden a un agrupamiento de receptores de superficie que se unen a proteínas de la matriz extracelular. Estos receptores de adhesión a la matriz son genéricamente denominados integrinas, y corresponden a heterodímeros de proteínas transmembrana conformadas por la asociación de una subunidad α con una sub-unidad β . Se han caracterizado 18 tipos diferentes de subunidades α y 8 tipos diferentes de subunidades β y se han observado 24 combinaciones entre éstas, capaces de unirse a la totalidad de las proteínas conocidas de la matriz extracelular conocidas (Hynes, 2002). Las integrinas actúan como puente entre el interior y exterior de la célula, ya que mientras la porción expuesta al medio extracelular interactúa con proteínas de la matriz extracelular, el extremo citoplasmático de las integrinas se asocia al citoesqueleto de actina a través de proteínas adaptadoras, suministrando el soporte estructural para la adhesión estable entre las células y su matriz correspondiente (Burridge et al., 1988; Hynes, 2002).

La asociación de las integrinas con la matriz extracelular provoca un cambio conformacional en éstas, que sumado a la tensión del citoesqueleto durante la expansión activa las integrinas, originando una cascada de señalización restringida espacialmente, que lleva a la aglomeración y activación de más integrinas, formando complejos

específicos de adhesión denominados adhesiones focales (Pellinen and Ivaska, 2006).

Adhesiones Focales.

Las adhesiones focales corresponden a complejos formados por el agrupamiento de las integrinas ancladas a la matriz, sobre las cuales son reclutadas una serie de proteínas accesorias, que permiten el anclaje al citoesqueleto y la apropiada transducción de señales requerida para el ensamblaje coordinado de estas estructuras en función de la homeostasis celular (Critchley, 2000). Dentro de estas proteínas accesorias podemos mencionar: a la kinasa de adhesión focal (FAK), talina, paxilina, vinculina y zixina, entre otras proteínas presentes en adhesiones focales y reclutadas a medida que la formación del complejo progresa (Petit and Thiery, 2000). También participan en estos complejos proteínas involucradas en el remodelamiento del citoesqueleto de actina, como las GTPasas pequeñas RhoA, Rac1 y las proteínas Arp2/3 y α -actinina (Ridley et al., 2003; Critchley, 2000). El proceso de formación de las adhesiones focales se ha estudiado en detalle y a partir de múltiples observaciones se ha propuesto un modelo simplificado de como esto ocurre (Figura 3 Ensamblaje de Adhesiones focales) (Tomar and Schlaepfer, 2009).

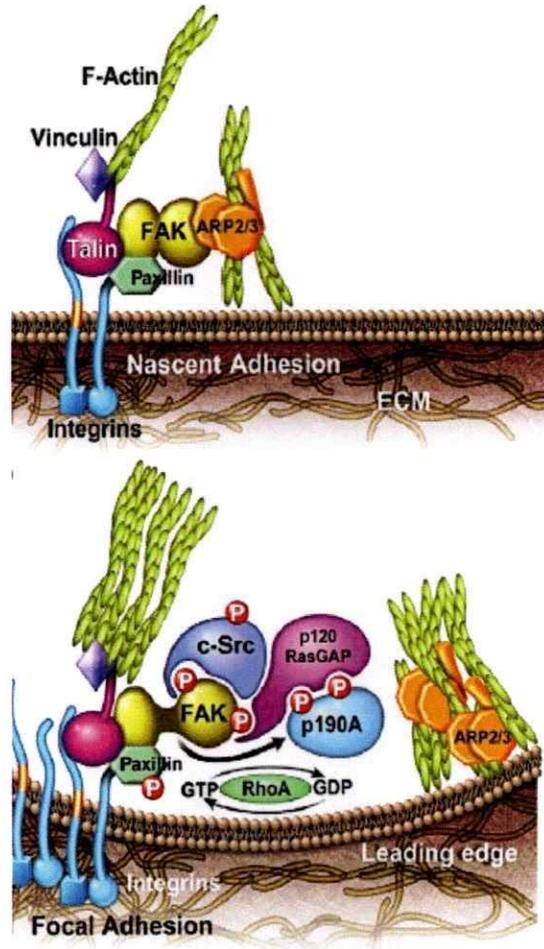


Figura 3: Ensamblaje de adhesiones focales. (Tomar and Schlaepfer, 2009)

Este modelo considera a la Kinasa de adhesión focal como responsable de facilitar la formación de un frente de adhesión estable. La proteína citoesquelética talina se une al mismo tiempo a FAK y a las colas citoplasmáticas de las integrinas, iniciando y promoviendo la activación de las integrinas. Este complejo integrina-talina promueve el aumento localizado en la tensión en la membrana de la célula, resultando en el desplegamiento de un dominio barra de talina que se une directamente a vinculina y a

filamentos de actina, promoviendo el ensamblaje de adhesiones focales nacientes (Tomar and Schlaepfer, 2009). Paxilina es también una proteína citoesquelética y de andamiaje importante en el proceso, reclutada a las adhesiones focales tempranas. FAK es reclutada en los contactos focales a través de su dominio FAT (*Focal Adhesion Targeting*) que se une a talina y paxilina (Tomar and Schlaepfer, 2009). Estudios estructurales y de mutagénesis han mostrado que FAK existe en una conformación auto-inhibida, donde su dominio N-terminal FERM (del inglés *protein 4.1 ezrin, radixin and moesin homology*) interactúa con el dominio kinasa. En esta conformación auto-inhibida es posible que el dominio FERM pueda también unirse a la proteína nucleadora de actina Arp3, que participa en la nucleación dendrítica de los filamentos de actina que moldean la forma del extremo de avance de la célula (Tomar and Schlaepfer, 2009). De esta forma, interacciones específicas mediadas por los dominios FAT y FERM pueden unir integrinas con la maquinaria celular encargada de la polimerización de actina, consecuentemente facilitando la expansión del frente de adhesión. La progresión en la formación y maduración del complejo es debida a la activación de la GTPasa pequeña RhoA la cual, una vez activada genera la polimerización local de filamentos de actina, aumentando la tensión y promoviendo la generación de fibras de estrés. Estas están constituidas por polímeros de actina agrupados en los sitios de maduración de los contactos focales (Burridge et al., 1988).

Recambio de Adhesiones Focales.

Las adhesiones focales son consideradas “los pies” de células creciendo en cultivos *in vitro* (Burridge, 2005). Estas estructuras están presentes en la mayoría de los tipos celulares y proveen un fuerte anclaje a la matriz extracelular (MEC) que subyace a la superficie ventral de las células. En condiciones de mantenimiento *in vitro*, esta matriz extracelular puede ser depositada sobre las placas de cultivo de manera artificial, al precubrir placas tratadas para cultivo celular con proteínas de matriz purificadas (Cukierman et al., 2002). Por otro lado, las células en cultivo secretan continuamente al medio de cultivo proteínas de matriz, que se depositan sobre la placa y forman una matriz heterogénea que permite la adhesión por medio de diversas integrinas (McDonald, 1988). Las integrinas se activan una vez que se unen a la matriz y son sometidas a tensión, llevando al reclutamiento de una serie de proteínas accesorias que forman el complejo de adhesión focal (Petit and Thiery, 2000).

Mientras que el ensamblaje de complejos de adhesión focal es un proceso bien estudiado, poco se conoce sobre la manera como se desensamblan. Se ha visto que las integrinas que están expuestas a la superficie celular son internalizadas mediante endocitosis, acumulándose en vesículas recubiertas de clatrina y circulando por la vía endocítica (Ezratty et al., 2005). Las vesículas cargadas con integrinas son luego fusionadas con endosomas tempranos, desde los cuales son principalmente recicladas hacia la membrana más que destinadas a rutas de degradación (Pellinen and Ivaska, 2006; Caswell and Norman, 2006).

Nuevos hallazgos en el campo, han mostrado el requerimiento de la maquinaria endocítica para que este proceso de internalización de adhesiones focales ocurra. Específicamente se ha observado que la proteína dinamina, una GTPasa responsable de la separación de las invaginaciones de membrana recubiertas de clatrina, es requerida para que este proceso se desarrolle con normalidad (Ezratty et al., 2005). Además se ha comprobado el requerimiento de otros adaptadores de la endocitosis mediada por clatrina, como lo son AP2 y Dab2, en el recambio de adhesiones focales (Chao and Kunz, 2009). Estos hallazgos alzan una interrogante y plantean una investigación emergente acerca del requerimiento de la maquinaria endocítica para la efectiva internalización de los complejos de adhesión y el papel de este sistema en la regulación del tráfico y reciclaje de los elementos de adhesión, cuya dinámica es responsable de la movilidad celular.

Migración Celular y Tráfico Endosomal Mediado por Proteínas Rab.

En el contexto de la regulación del reciclaje de adhesiones célula-matriz, se ha propuesto que las proteínas Rab juegan un papel fundamental en la regulación del tráfico endosomal (Caswell and Norman, 2008). Las proteínas Rab son GTPasas pequeñas monoméricas, que coordinan el tráfico subcelular de vesículas entre diferentes organelos y compartimentos citoplasmáticos recubiertos de membrana (Zerial and McBride, 2001). Estas proteínas existen en dominios específicos de membrana dentro de un mismo compartimiento endosomal, dando la especificidad necesaria para diferenciar distintos organelos, (Figura 4).

Clasificación de las Proteínas Rab.

Las proteínas Rab se clasifican de acuerdo a su ubicación y función. Por ejemplo Rab5, Rab21 y Rab22 regulan eventos de la endocitosis temprana, mientras que Rab4 dirige un ciclo corto de reciclaje desde los endosomas tempranos directamente hacia la membrana plasmática y Rab11 coordina el ciclo largo a través del compartimiento de reciclaje perinuclear. Rab7 y Rab9 funcionan en la vía de los endosomas tardíos, dirigiendo la ruta de degradación de las cargas internalizadas. (Figura 4.)

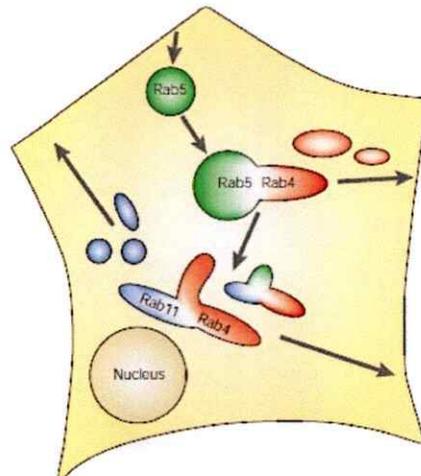


Figura 4: Segregación de dominios endosomales mediado por GTPasas de la familia Rab. (Zerial and Stenmark, 1993)

Ciclo de Regulación de las Rabs.

Las proteínas Rab están sujetas a mecanismos de regulación similares y propios de las GTPasas pequeñas. Una vez expresadas y sintetizadas, las Rab se asocian a proteínas escolta denominadas *Rab escort protein (REP)*, las cuales en conjunto con geranylgeranyl transferasas catalizan una modificación post-traducciona de unión covalente a 2 moléculas hidrofóbicas de geranylgeranilo, las cuales median la asociación estable de las Rab con bicapas de membrana (Maltese et al., 1996). Posteriormente, estas Rab pasan a formar parte de una fracción móvil dentro del citoplasma, que puede estar asociada a sus membranas correspondientes, formando dominios de membrana identificados por la función de la respectiva proteína Rab, las cuales reclutan efectores que median su asociación a membranas y definen la identidad de los compartimentos sub-celulares (Figura 5). Una característica de las proteínas Rab es su capacidad de actuar como interruptores moleculares, ciclando entre un estado basal unido a GDP (considerado estado inactivo), y un estado unido a GTP (considerado estado activo). Estas transiciones son reguladas por interacción con proteínas accesorias que favorecen cambios conformacionales en las Rabs (Torres and Stupack, 2011).

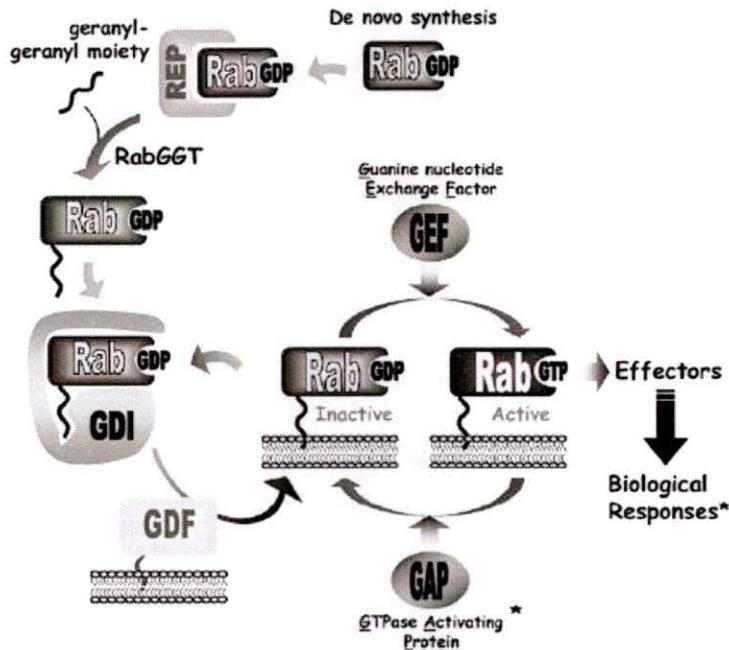


Figura 5: Ciclo de activación de GTPasas de la familia Rab. (Torres and Stupack, 2011).

Por un lado la activación es favorecida por proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanosina, GEF, al favorecer la salida del GDP desde el sitio de unión al nucleótido, permitiendo la entrada de GTP (debido a su elevada concentración intracelular en relación a GDP). De esta forma, las GEFs activan a las Rabs (Bos et al., 2007). Por otro lado, las proteínas Rab poseen una baja actividad intrínseca de hidrólisis de GTP, la cual es favorecida por la asociación con proteínas promotoras de la actividad GTPasa intrínseca (GAPs), las cuales asisten la transición desde el estado activo al inactivo (Bos, 2007). En su forma inactiva, las proteínas Rab se encuentran en estado citosólico, asociadas a proteínas que impiden la disociación del GDP, denominadas GDI (*GDP Dissociation Inhibitor*), las cuales estabilizan las colas de geranyl-geranilo altamente hidrofóbicas, (Maltese et al., 1996). Además se requiere que una proteína GDF (*GDI*

Displacement Factor) desplace a la GDI y libere a la Rab de la inhibición, permitiendo la exposición de la cola hidrofóbica, la cual se embebe en la membrana de destino, produciendo una transición desde el estado soluble asistido por GDIs a un estado de unión a membrana, previo a la interacción con proteínas GEF que producen un cambio conformacional en la Rab que contribuye a la salida de GDP y la entrada al sitio de unión a nucleótido de GTP (Sivars et al., 2003). Esta unión de GTP produce el reclutamiento de efectores, por lo que al complejo Rab-GTP se le denomina estado activo (Pfeffer and Aivazian, 2004). Esta clasificación de actividad no es reflejo de la propia actividad GTPásica de la proteína, la cual es responsable de la hidrólisis del GTP, y que sólo toma lugar luego de la asociación con efectores y posterior asociación con GAPs, las cuales vuelven la Rab a su estado inactivo, completando el ciclo (Stenmark et al., 1994).

Endocitosis en el tráfico de moléculas de adhesión.

Como se ha indicado anteriormente, el tráfico de integrinas es un aspecto esencial de la migración celular y metástasis. En este contexto, se identificó a la maquinaria endocítica como elemento crucial en el recambio de adhesiones focales (Chao and Kunz, 2009; Ezratty et al., 2005) aunque la regulación que gobierna este proceso sigue siendo un misterio.

Participación de Rab5 en el Recambio de Receptores de Adhesión.

Rab5 es la proteína Rab más ampliamente estudiada (Stenmark et al., 1994; Bucci et al.,

1992). Como función canónica, Rab5 coordina los eventos de la endocitosis temprana. En este contexto, se ha observado que Rab5 es responsable de la formación de invaginaciones de la membrana plasmática, la formación de vesículas recubiertas de clatrina, el transporte de estas vesículas a lo largo de la red de microtúbulos, al asociarse con motores moleculares, y la asignación de destino y fusión, tanto homotípica como heterotípica entre vesículas endocíticas y endosomas tempranos (Bucci et al., 1992).

Se ha observado que la activación de las integrinas promueve la activación de la proteína Rab5 en células de neuroblastoma (Torres et al., 2010). Además se observó que Rac1, una GTPasa importante en el remodelamiento del citoesqueleto, es activada en compartimentos endosomales, de manera dependiente de Rab5 (Palamidessi et al., 2008).

Estos antecedentes sugieren la participación de Rab5 como un regulador clave en la migración celular, razón por la cual sería interesante evaluar el rol de esta GTPasa pequeña durante la migración de células derivadas de cáncer metastásico.

Rab5 es un potencial regulador de la migración celular.

Con los antecedentes revisados, vemos que existe una relación causal entre el tráfico endosomal, la endocitosis de receptores de adhesión a la matriz extracelular y la migración celular responsable de la propagación de células tumorales y la metástasis. Sin embargo, el nexos que une estos procesos permanece desconocido y es de vital importancia develar los mecanismos que median esta relación, para entender de mejor manera cómo las células tumorales adquieren su capacidad migratoria. Es por este

motivo que el presente trabajo investiga el papel que cumple la GTPasa pequeña Rab5 en la migración celular tumoral, intentando aclarar la participación de esta proteína en procesos de migración inducida en modelos *in vitro*, y si de alguna manera se requiere su presencia. Asimismo, se investigará el rol de Rab5 como interruptor molecular en la endocitosis, sobre el recambio de complejos de adhesión célula-matriz, específicamente de las adhesiones focales. Este trabajo intenta comprender de que manera Rab5 participa como un regulador en la cascada de señalización que permite la movilidad de las células cancerosas.

HIPÓTESIS

Rab5 promueve la migración celular tumoral acelerando el recambio de adhesiones focales.

OBJETIVOS

1. Determinar el requerimiento de la GTPasa pequeña Rab5 en la migración e invasión de líneas celulares derivadas de cáncer metastásico.
2. Determinar la actividad y la localización subcelular de la forma activa de esta proteína durante la migración.
3. Estudiar el rol que cumple Rab5 y su activación en el proceso de recambio de adhesiones focales y su impacto en la migración celular.

MATERIALES Y METODOS

Materiales.

El anticuerpo monoclonal anti-Rab5 (catalogo N°. sc46692), policlonal anti-Rab5 (catalogo N°. sc28570), policlonal anti-Rab7 (catalogo N°: sc10767) y policlonal anti-EEA1 (catalogo N°: sc33585) provienen de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). El anticuerpo policlonal anti-fosfo-FAK (Y397) (catalogo N°: 3283) proviene de Cell Signaling Technology. El anticuerpo monoclonal anti-vinculina (catalogo N°: V4505) proviene de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina (catalogo N°. CP06) proviene de Calbiochem (La Jolla, CA). El anticuerpo monoclonal anti-integrina β 1 (catalogo N°: MAB1981) proviene de Millipore (Temecula, CA). El anticuerpo monoclonal anti-paxillina (catalogo N°. 610620) proviene de BD Biosciences (San Diego, CA). Todos los anticuerpos monoclonales utilizados fueron desarrollados en ratón y todos los anticuerpos policlonales utilizados fueron desarrollados en conejo. Los anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo acoplados a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) y el anticuerpo monoclonal anti-actina (catalogo N°: A5316) provienen de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Faloidina-Tetrametilrhodamina, y los anticuerpos secundarios conjugados con los fluoróforos Alexa Fluor488 y Alexa Fluor546, además de la Geneticina (G418 sulfato, catalogo N°: 11811) provienen de Invitrogen (Carlsbad, CA).

Los medios de cultivo celular y antibióticos provienen de GIBCO Life Technologies (Grand Island, NY). El suero fetal bovino proviene de HyClone Laboratories (Logan,

UT). Las perlas de Glutación-Sefarosa provienen de GE Healthcare (Piscataway, NJ). El sustrato de quimioluminiscencia EZ-ECL y las perlas acopladas a proteína A provienen de Pierce Chemical (Rockford, IL). Las construcciones codificantes para short hairpin RNAs (shRNA) lentivirales provienen de Open Biosystems (Huntsville, AL). El Inhibitor #14 de FAK proviene de Tocris Bioscience (R&D Systems).

Plasmidios.

Los plasmidios pcDNA3.1(+) que codifican las variedades de Rab5 wild-type y los mutantes S34N (de alta afinidad por GDP) y Q79L (actividad GTPásica deficiente) fueron descritos previamente (Torres, 2008). Los plasmidios pEGFP-C1 que codifican Rab5 wild-type, Rab5/S34N y Rab5/Q79L fueron gentilmente facilitados por la Dra. Francisca Bronfman (Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile). El plasmidio modificado pEGFP-C1-mCherry al cual se le realizó una delección de la secuencia codificante de GFP, y en su lugar lleva sub-clonada la secuencia codificante para mCherry fue gentilmente otorgado por el Dr. David Schlaepfer (Moore UCSD Cancer Center, University of California San Diego, USA). El dominio de unión a Rab5 activo (*Rab5 Binding Domain*; R5BD) descrito previamente (Torres, 2008; Vitale, 1998; Liu, 2007) fue sub-clonado en el vector modificado pEGFP-C1-mCherry mediante amplificación por PCR. Para esto, el plasmidio pCMV-SPORT6 que codifican a Rabaptina5 humana (Invitrogen) fue usado como molde en la amplificación junto a los siguientes partidores: 5'-cgccgggagctaaggctaccgtgaaca-3' (sentido, sitio de restricción para Sal I) y 5'-

ccccccgggtcatgtctcaggaagctggt-3' (antisentido, sitio de restricción para BamH I). EL producto de PCR fue digerido, sub-clonado y ligado en el plasmidio pEGFP-mCherry. La orientación fue confirmada mediante secuenciación.

Cultivo Celular.

Las líneas celulares MDA-MB-231 y A549 fueron cultivadas en medio DMEM-F12 y DMEM-high glucose, respectivamente, suplementados con 10% FBS y antibióticos (penicilina 10,000 U/ml y estreptomina 10 µg/ml) a 37°C y 5% CO₂. El silenciamiento de Rab5 fue realizado como se describió previamente (Torres et al, 2010). Las células control fueron infectadas con un lentivirus codificante para una secuencia shRNA inespecífica (plasmidio 1864; Addgene, Cambridge, MA). El silenciamiento de Rab5 en MDA-MB-231 fue realizado usando el shRNA secuencia #F10 (Open Biosystems), mientras que en A549 se utilizaron tanto las secuencias #B5 como #F10 (Open Biosystems). La secuencia #B5 no pudo ser usada en MDA-MB-231 ya que las células no sobrevivieron la transducción con éste shRNA. Las líneas celulares establemente transducidas fueron seleccionadas y mantenidas en medio de cultivo conteniendo puromicina.

Inmunofluorescencia.

El protocolo de inmunofluorescencia fue básicamente el mismo para todos los experimentos. Las células fueron crecidas sobre cubreobjetos de vidrio de 12-mm de diámetro, lavadas con PBS, fijadas con paraformaldehído al 4% en solución PIPES

100 mM, pH 6.8, conteniendo KOH 40 mM, EGTA 2 mM y MgCl₂ 2 mM durante 15 minutos. Posteriormente, las células fueron lavadas 3 veces con solución de lavado (Tris 50 mM pH 7.6, conteniendo NaCl 0.15N y NaN₃ 0.1%). Las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.1% en solución de lavado durante 10 minutos, lavadas 2 veces y luego bloqueadas, incubándolas con seroalbúmina de bovino (BSA) al 1% durante 30 minutos. Las muestras fueron incubadas con anticuerpos primarios, seguido de la incubación con los respectivos anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos. Los núcleos celulares y las fibras de F-actina fueron teñidas con DAPI y faloidina-Tetrametilrodamina, respectivamente. Las muestras fueron visualizadas mediante microscopía confocal, usando un microscopio spinning disk *Olympus IX81* o un microscopio confocal *Carl Zeiss LSM-Pascal 5*.

Para la sincronización de adhesiones focales, las células fueron crecidas sobre cubreobjetos de vidrio, privadas de suero durante la noche en medio de cultivo conteniendo FBS 1% y tratadas con Nocodazol a una concentración de 10 µM en medio libre de suero durante 4 horas, de manera de inducir la despolimerización de los microtúbulos, como se ha descrito previamente (Ezratty *et al.*, 2005). El Nocodazol luego fue removido del medio de cultivo mediante lavado y reemplazo con medio libre de suero y las células fueron incubadas a 37°C durante los períodos de tiempo indicados. Subsecuentemente, las células fueron fijadas y luego preparadas para inmunofluorescencia. Para la evaluación de ensamblaje y desensamblaje de adhesiones focales, las estructuras puntiformes observadas en la periferia celular, mediante tinción de vinculina y paxilina, fueron cuantificadas en los períodos de tiempo indicados, y el

número total fue normalizado con respecto al número total de células en el campo analizado. Para los ensayos de expansión (*spreading*), las células fueron llevadas a suspensión mediante tratamiento con tripsina, para posteriormente sembrarlas sobre cubreobjetos recubiertos con fibronectina (2µg/ml), permitiéndoles adherirse durante los períodos de tiempo indicados. Las muestras fueron luego preparadas para inmunofluorescencia y teñidas con Faloidina-Rodamina.

Análisis de Imágenes.

Desconvolución de imágenes obtenidas mediante microscopía confocal.

Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal fueron sometidas a desconvolución iterativa utilizando el software Hyugens Profesional, versión 3.7.0p3 (Scientific Volume Imaging, Hilversum, The Netherlands), utilizando funciones de dispersión de punto (PSF) teóricos estimados por el mismo software a partir de los parámetros de adquisición. La razón señal/ruido fue ajustada en cada imagen con el fin de obtener la restauración óptima de las imágenes y el número de ciclos en el proceso de desconvolución se limitó a menos de 40 iteraciones. Finalmente las imágenes fueron recortadas utilizando el software de manipulación de imágenes Adobe Photoshop (San Jose, CA).

Medición del porcentaje de células con marca mCherry periférica.

Para analizar la distribución de mCherry y mCherry-R5BD, las células fueron transfectadas durante 24 horas, resuspendidas y luego se les permitió adherirse y expandirse sobre cubreobjetos precubiertos con fibronectina (2 µg/ml) por diferentes

períodos de tiempo. La señal de mCherry fue analizada mediante Microscopía Confocal (Carl Zeiss LSM-Pascal 5). Las imágenes fueron elegidas al azar, y las células fueron definidas como “positivas o negativas para mCherry periférico” en base a la presencia/ausencia de tinción de mCherry demarcando la periferia celular. Luego, el porcentaje de “células positivas” fue calculado con respecto al número de células totales, el cual fue estimado mediante tinción nuclear (DAPI).

Co-localización y área de spreading. La co-localización fue evaluada en las imágenes desconvolucionadas, obtenidas mediante Microscopía Confocal (Carl Zeiss LSM-Pascal 5). El análisis fue realizado utilizando el software *Image J*, por medio de la herramienta “*Dynamic Profile*”. El spreading se midió por la tinción de actina (faloidina) y se adquirieron imágenes en un Microscopio Spinning Disk. El área de spreading se calculó ajustando el umbral (herramienta *threshold*) en el modo blanco y negro (B&W) hasta obtener el área celular completamente en negro sobre un fondo blanco, para luego cuantificar el número de píxeles y normalizarlo con respecto al número total de células (cuantificado mediante tinción nuclear, DAPI). El “spreading” de las células MDA-MB-231 a los 60 minutos fue utilizado como control interno para realizar la conversión de pixel a μm^2 sobre la base de la barra de aumento de la imagen (μm).

SDS-PAGE y Western Blot.

Para los ensayos de detección de proteínas en los extractos las células fueron lavadas 2 veces con PBS frío y homogeneizadas en solución compuesta por: HEPES 0.2 mM (pH 7.4), SDS 0.1%, inhibidor de fosfatasa (Na_3VO_4 1 mM) e inhibidores de proteasas

(benzamidina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, antipaina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, leupeptina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PMSF 1 mM). La concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo colorimétrico de ácido bicincoínico (BCA assay, Pierce). Extractos de proteína total (50 $\mu\text{g}/\text{carril}$) se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de agente denaturante (SDS-PAGE). Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en 0.1% Tween-TBS y posteriormente incubadas con anticuerpos. Los anticuerpos primarios fueron detectados con anticuerpos secundarios conjugados con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) utilizando el sistema de quimioluminiscencia EZ-ECL.

Inmunoprecipitación.

Las muestras fueron inmunoprecipitadas como se describe en (Torres et al, 2008). Los extractos celulares fueron preparados en una solución de Tris 20 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, NP-40 1% e inhibidores de proteasas. Luego de 5 minutos de incubación en hielo, las muestras se centrifugaron a 13,000xg por 1 min a 4°C y los sobrenadantes post-nucleares (500 μg de proteína total) fueron inmunoprecipitados con anticuerpos inmovilizados en perlas de proteína A/G durante 30 min. Para las inmunoprecipitaciones de Rab5, paxilina y la integrina $\beta 1$, se utilizaron anticuerpos policlonales. Los inmunoprecipitados fueron solubilizados en solución de Laemmli, hervidos, separados por SDS-PAGE y analizados mediante Western blot.

Ensayo de Precipitación por Afinidad de Rab5-GTP (Pull-Down).

Esta metodología permite enriquecer un extracto con la fracción activa de Rab5 al incubar un homogeneizado con una proteína de fusión constituida por la enzima Glutathion-S-Transferasa (GST) fusionada al motivo de unión a Rab5 activo subclonado a partir de Rabaptina5, un efector de Rab5 que posee el dominio denominado R5BD, capaz de unir específicamente a esta conformación.

Los ensayos de Pull-down fueron realizados como se ha reportado previamente (Torres et al, 2008), con algunas modificaciones. Brevemente, las células fueron lisadas en una solución isotónica conteniendo HEPES 25 mM (pH 7.4), NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, NP-40 1%, glicerol 10%, DTT 1 mM y mezcla de inhibidores de proteasas. Los extractos fueron incubados por 5 minutos en hielo y centrifugados a 10,000xg durante 1 min a 4°C. Los sobrenadantes post-nucleares fueron usados para ensayos de precipitación por afinidad utilizando 30 µg de perlas de Glutathión-Sepharosa precubiertos con GST-R5BD por condición. Las perlas fueron incubadas con los sobrenadantes por 15 min a 4°C en un agitador rotatorio. Posteriormente, las perlas fueron colectadas, lavadas con tampón conteniendo NP-40 al 0.01% y las muestras fueron solubilizadas en tampón de Laemmli de carga de proteínas, hervidas durante 5 minutos a 100°C y separadas mediante SDS-PAGE para análisis por Western blot.

Ensayo de Trans-Migración (Boyden-Chamber, Transwell™).

Los ensayos fueron realizados en cámaras Boyden (Transwell™ Costar, de 6.5 mm de diámetro y 8 μm de tamaño de poro) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, el fondo de los canastillos fue cubierto con fibronectina a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$. Las células (5×10^4) fueron resuspendidas en medio libre de suero y sembradas dentro del canastillo, permitiéndoles transmigrar hacia el fondo del inserto, donde se agregó medio suplementado con 10% de suero. Luego de 2 horas de incubación, los canastillos fueron removidos y lavados, para luego teñirlos con solución de cristal violeta 0.1% en 2% de metanol. Luego las células fueron contadas en un microscopio invertido.

Ensayo de Invasión (Matrigel Assay).

Los ensayos de invasión fueron realizados en Matrigel™ (BD Biosciences catalog no. 354480, San Diego, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los canastillos fueron pre-hidratados durante 2 horas en medio libre de suero. Las células (3×10^4) se resuspendieron en medio libre de suero y se sembraron en el interior del canastillo, permitiéndoles invadir el fondo del matrigel donde se depositó el medio suplementado con 10% de suero. Luego de 24 horas de incubación, los insertos fueron removidos, lavados y las células que migraron hasta el extremo inferior del canastillo fueron teñidas con una solución de 0.1% azul de toluidina y cuantificadas en un microscopio invertido.

Preparación de Fracciones Enriquecidas en Adhesiones Focales.

El fraccionamiento se realizó siguiendo un protocolo descrito previamente (Torres et al, 2008). Las células fueron sembradas sobre placas recubiertas con fibronectina (2 µg/ml) y luego se les permitió adherirse durante 45 minutos. Las células adheridas fueron homogeneizadas sobre la placa con solución de Tritón X-100 al 0.5% durante 30 minutos a 4°C. El extracto fue recolectado y centrifugado a 500xg durante 5 minutos, de manera de precipitar los núcleos y recuperar el sobrenadante. A esta fracción se le denominó "*fracción citosólica*". La fracción remanente, adherida a la placa, se extrajo con solución RIPA durante 5 minutos en hielo y posterior raspado con un rastrillo ("*cell scraper*"). Los extractos fueron centrifugados a 14,000xg durante 10 minutos y sus sobrenadantes fueron denominados "*fracción enriquecida en adhesiones focales*". El contenido de proteínas de ambas fracciones fue analizado mediante SDS-PAGE y Western blot.

Ensayo de Adhesión.

Las células se resuspendieron en medio libre de suero y luego fueron sembradas sobre placas de 24 pocillos pre-cubiertas con proteínas de matriz extracelular (Fibronectina 2 µg/ml ó matriz mixta de colágeno-albúmina 2 µg/ml) durante diferentes periodos de tiempo. Las células no adheridas fueron removidas mediante lavado con medio libre de suero y las células adheridas a la placa teñidas con cristal violeta al 0.1% en metanol al 2%. El colorante retenido en las células fue eluido con metanol, y su contenido fue determinado mediante absorbancia a 600 nm.

Análisis de Niveles Superficiales de Integrina β 1.

Las células se cultivaron durante 24 horas hasta alcanzar sub-confluencia en medio completo. Posteriormente, las células fueron resuspendidas y bloqueadas en PBS conteniendo suero fetal bovino al 0.5% durante 30 minutos a 4°C. La suspensión celular fue incubada con anticuerpo monoclonal (Millipore) dirigido contra el dominio extracelular de la integrina β 1 durante 60 min a 4°C, seguido de 45 minutos de incubación con anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con el fluoróforo Alexa-Fluor488. Luego, la suspensión fue resuspendida en PBS y analizada mediante citometría de flujo (FACSCanto; BD Biosciences, Mountain View, CA) utilizando el software FACSDiva.

Ensayo de spreading.

Para evaluar el dinamismo de adhesión de la suspensión celular se realizó un ensayo de *spreading* sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos con fibronectina (2 μ g/mL). Se evaluó el nivel de adhesión alcanzado a ciertos intervalos de tiempo cuantificando el área cubierta por las células durante los intervalos ensayados, después de teñir el citoesqueleto de actina con Faloidina-Rodamina.

Ensayo de Pull-Down Durante el Cierre de una Multiherida.

Con el fin de evaluar la actividad de Rab5, se realizó el ensayo de Pull-Down, desde placas confluentes sometidas a una multiherida y posterior tiempo de cierre. Luego se realizó un homogeneizado suave con solución isotónica conteniendo detergente no

iónico y Mg^{2+} para estabilizar la fracción de Rab5 en la conformación unida a GTP, para posteriormente incubar el lisado con las perlas de Agarosa-Glutation unidas a GST-R5BD previamente descritas (Torres, 2008), que unen y estabilizan específicamente a Rab5 en conformación unida a GTP, pudiendo precipitar selectivamente la fracción activa desde el sobrenadante.

Ensayo de Pull-Down durante el spreading.

Cultivos semi-confluentes de células MDA-MB-231 fueron llevados a suspensión mediante tratamiento con tripsina-EDTA que remueve las adhesiones, tanto célula-matriz mediados por integrinas, como contactos célula-célula mediados por cadherinas. Posteriormente, a esta suspensión celular se le permitió adherirse a placas pre-cubiertas con fibronectina, y al cabo de cortos períodos de tiempo (0-60 minutos) se procedió a detectar los niveles de Rab5(GTP) mediante el ensayo de pull-down con GST-R5BD.

Silenciamiento mediante shRNA.

La metodología consiste en expresar constitutivamente un RNA corto de doble hebra, diseñado para hibridar específicamente una región de la secuencia codificante de Rab5 endógeno, el que posteriormente utiliza el sistema de silenciamiento de RNA mensajero, interfiriendo con la expresión de la proteína. Esta metodología, involucra la utilización de un sistema de transducción lentiviral de tercera generación, el cual codifica un RNA corto que hibrida con el RNA codificante de Rab5, produciendo la respuesta de

interferencia y la degradación de los RNA mensajeros endógenos que codifican para Rab5, impidiendo de esta manera la traducción de la proteína.

Se generaron 2 sub-líneas, que expresaban establemente shRNAs contra Rab5, uno con la secuencia F10 y otro con la secuencia B5. Una tercera sub-línea fue generada con un shRNA control, el cual codifica un RNA corto con una secuencia al azar que no hibrida RNA mensajero.

Cada plasmidio posee un marco de lectura codificante de una resistencia a puromicina, por lo cual cada línea fue seleccionada en base a esta resistencia. La selección se realizó durante 2 semanas usando puromicina a concentración final de 2 $\mu\text{g/ml}$ de acuerdo a lo determinado en curvas de dosis respuesta.

Análisis estadístico.

Los datos fueron comparados mediante *t test* no-pareados utilizando el software *GraphPad Prism 5* (San Diego, CA). A menos que se indique lo contrario, al menos 3 experimentos independientes fueron analizados. Un valor $p < 0.05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS.

Diversos estudios han sugerido una participación de Rab5 en el proceso de migración celular (Torres and Stupack, 2011), sin embargo, no existen pruebas concluyentes que indiquen cual es el papel exacto de esta GTPasa pequeña en este contexto, de manera que este problema debe ser abordado, estudiando el tanto el requerimiento de la proteína como de la función de Rab5 en células inducidas a migrar.

RAB5 SE ACTIVA DURANTE EL CIERRE DE UNA MULTIHERIDA.

En primera instancia, y orientados por los antecedentes que indican que la activación de Rab5 es promovida por la unión de integrina $\beta 1$ a fibronectina, (Torres et al., 2010), nos propusimos evaluar los niveles de Rab5 activo en células inducidas a migrar direccionalmente. Para lograr esto, se realizó un ensayo de cierre de multiherida, el cual consiste en rasgar múltiples veces un monocapa de células creciendo en cultivo confluyente con un peine metálico y permitir el cierre de la herida por el avance de las células. Realizamos este ensayo utilizando cultivos confluentes de la línea celular MDA-MB-231, provenientes de adeno-carcinoma mamario metastásico, el cual se caracteriza por su alta motilidad. Al tiempo que el ensayo fue realizado (120 minutos) las células migraron, aunque no lo suficiente para cerrar la herida, avanzando una trayectoria aproximada de 5 veces el diámetro de una célula promedio.

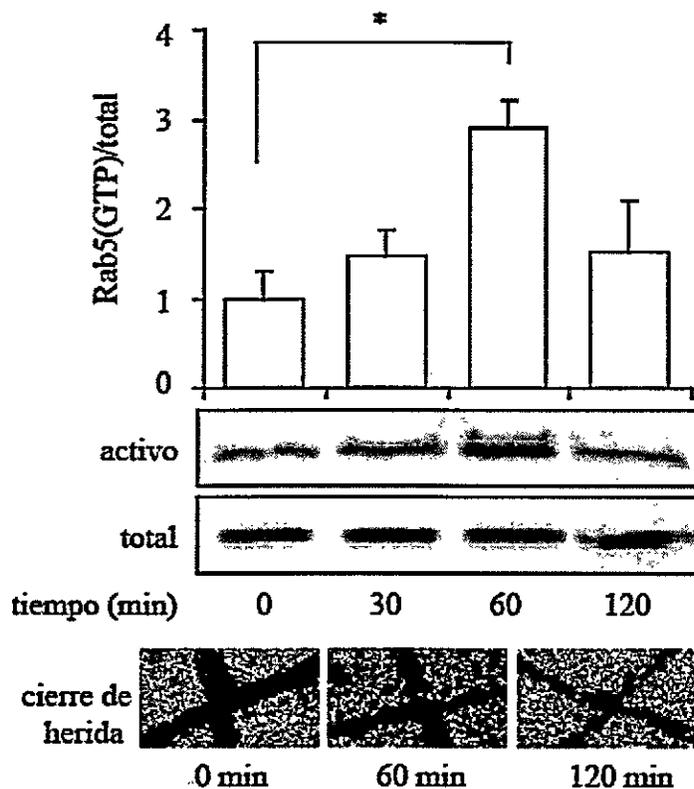


FIGURA 6: Activación de Rab5 durante el cierre de una multiherida. Las células MDA-MB-231 fueron crecidas hasta alcanzar confluencia y las monocapas resultantes fueron rasgadas múltiples veces con un peine de acero, para luego permitirles cerrar la herida. El gráfico muestra el aumento en los niveles de Rab5(GTP) durante etapas tempranas del cierre de la multiherida determinado mediante el ensayo de precipitación por afinidad GST-R5BD Pull-Down. Los paneles inferiores muestran un Western-blot representativo de los resultados obtenidos en el experimento, en donde el panel superior muestra los niveles de Rab5 del precipitado obtenido mediante el pull-down y el panel inferior muestra los niveles de Rab5 en el extracto de origen. Las imágenes inferiores corresponden a capturas representativas del cierre de herida a medida que progresa la migración. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes y las barras corresponden al error estándar del promedio. (* $p < 0,05$).

Una vez estandarizada ésta técnica de migración celular inducida, se abordó la interrogante acerca de la activación de Rab5 en procesos migratorios. Para ello estimamos los niveles de Rab5 unido a GTP (activo) en las células inducidas a migrar durante el proceso de cierre de una multiherida, para lo cual implementamos en nuestro modelo el ensayo de precipitación por afinidad (Pull-Down) de Rab5 activo con GST-R5BD.

Por medio de esta metodología se observó que los niveles de Rab5(GTP) se triplicaron respecto al nivel basal (0 minutos de cierre), obtenido inmediatamente después de realizar la herida y alcanzado un máximo de activación a los 60 minutos del cierre de la herida, decayendo y estabilizándose posteriormente a 120 minutos (Ver Figura 6).

RAB5 SE ACTIVA DURANTE EL *SPREADING*.

Para corroborar los hallazgos obtenidos en ensayos de multiherida, y descartar que la activación de Rab5 se deba a la liberación de contenido citosólico provenientes de células destruidas a causa de la multiherida, procedimos a evaluar la actividad de Rab5 en un modelo alternativo. Para ello, se analizó la activación de Rab5 durante la extensión de las células sobre matriz extracelular, durante el proceso de anclaje y expansión de superficie denominado *spreading*. Este experimento arrojó resultados similares a los obtenidos con el ensayo de multiherida, ya que se observó una activación sostenida de Rab5 durante el tiempo en que las células expandieron su superficie sobre la matriz, alcanzando un máximo de activación a los 30 minutos, correspondiente a 4 veces el nivel basal y una subsecuente disminución a los 60 minutos (Ver Figura 7).

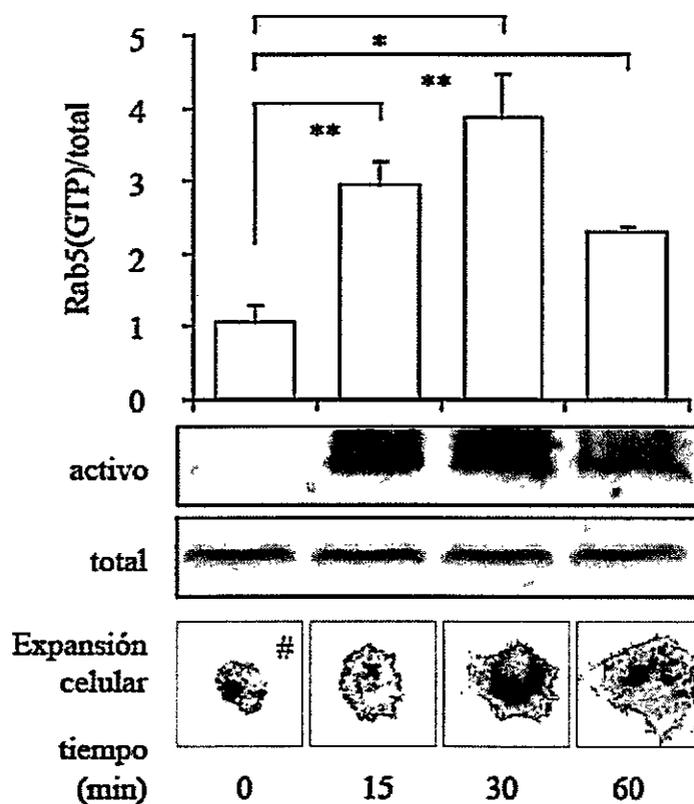


FIGURA 7: Activación de Rab5 durante el *spreading*. El gráfico muestra el aumento en los niveles de Rab5(GTP) durante etapas tempranas de la expansión del cuerpo celular sobre la matriz, determinado mediante el ensayo de precipitación por afinidad GST-R5BD Pull-Down. Los paneles inferiores muestran un western blot representativo de los resultados obtenidos en el experimento, en donde el panel superior muestra los niveles de Rab5 del precipitado obtenido mediante el pull-down y el panel inferior muestra los niveles de Rab5 en el extracto de origen. Las imágenes inferiores corresponden a capturas representativas del *spreading* a los tiempos analizados visualizado mediante tinción del citoesqueleto de actina con faloidina fluorescente. El tiempo 0, denotado con #, corresponde al *spreading* promedio observado a 5 minutos, tiempo mínimo requerido para el anclaje de estas células. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes y las barras corresponden al error estándar del promedio. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

VISUALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD LOCALIZADA DE RAB5 MEDIANTE UN BIOSENSOR.

Los datos mostrados indican que en general Rab5 se activa durante la migración celular. Posteriormente, se intentó averiguar si la localización de la forma activa se restringe a alguna ubicación sub-celular en especial, ya que se sabe que Rab5 puede estar localizado en micro-dominios de membrana, endosomas tempranos y lamelipodios. Para este fin, se procedió a evaluar la localización de Rab5(GTP) durante la migración, utilizando un biosensor compuesto por la proteína fluorescente mCherry fusionada al dominio R5BD de la proteína Rabaptina5, el efector de Rab5 previamente mencionado que interactúa con la proteína sólo cuando ésta se encuentra unida a GTP (Vitale et al., 1998). Este es el mismo dominio crítico fusionado a GST utilizado para Pull-Down en la detección de Rab5(GTP) durante el cierre de multiherida. De esta forma, se espera que este biosensor sólo interactúe con la fracción de Rab5 activa, localizándose preferentemente en zonas donde se esté produciendo la activación de Rab5.

En primer lugar, se controló la funcionalidad del biosensor para detectar Rab5(GTP). Para ello se realizaron co-transfecciones con las variedades del biosensor: mCherry-R5BD ó mCherry sólo, junto a las distintas mutantes de Rab5. Primero, la transfección con la mutante constitutivamente activa de Rab5 (Q79L) fusionada a GFP en la cual se ha reemplazado el aminoácido aspártico de la posición 79 (importante en la reacción de hidrólisis de GTP) por una leucina, y por lo tanto carente de actividad GTPasa. Esto provocó la formación de endosomas gigantes claramente observables al microscopio. Al co-expresar esta mutante con mCherry-R5BD, observamos co-localización de ambas

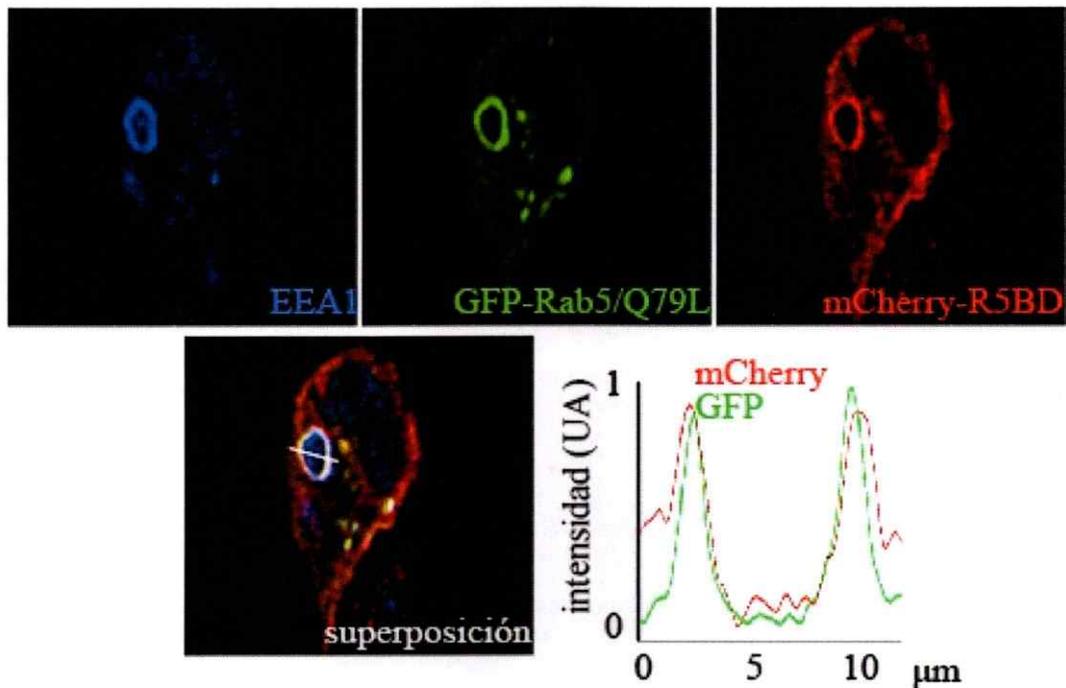


FIGURA 8: Control de especificidad del biosensor mCherry-R5BD. Las células MDA-MB-231 fueron co-transfectadas transitoriamente con el vector pEGFP-C1-Rab5/Q79L (actividad GTPasa deficiente, Rab5 constitutivamente unido a GTP), y el vector modificado pEGFP-C1-mCherry-R5BD. 24 horas luego de la transfección, las células fueron fijadas y teñidas con anticuerpo anti-EEA1 y luego con anticuerpo secundario fluorescente (azul). Las muestras se analizaron para la localización de la marca fluorescente de GFP (verde), mCherry (rojo) y EEA1 (azul) mediante microscopía confocal. Se muestran los canales de una imagen desconvolucionada, representativa de la población co-transfectada. El gráfico muestra un perfil densitométrico de la intensidad de las marcas verde y roja de GFP y mCherry, respectivamente, a lo largo de la línea blanca situada sobre el endosoma gigante mostrado en la superposición, que muestra una co-localización cuantitativa de mCherry-R5BD con Rab5 Q79L.

sondas en endosomas gigantes, los cuales además fueron positivos para el antígeno endosomal temprano 1 (EEA1, Ver Figura 8). Sin embargo, al co-expresar esta misma mutante con el vector codificante para mCherry sin el motivo de unión R5BD, no se observó co-localización entre ambas sondas. Por último, la co-expresión de una mutante de Rab5/S34N (la cual presenta alta afinidad por GDP, y por lo tanto es constitutivamente inactivo) junto al biosensor mCherry-R5BD tampoco se observó co-localización, demostrando la selectividad del biosensor hacia la forma activa de Rab5, (Ver Figura 9).

Una vez controlada la selectividad del biosensor, se procedió a evaluar su localización sub-celular en células inducidas a realizar *spreading*. Para ello, células MDA-MB-231 fueron transfectadas, ya sea con el biosensor mCherry-R5BD o con el vector vacío codificante para mCherry. Posteriormente, las células transfectadas se llevaron a suspensión para luego permitirles adherirse y expandirse sobre cubreobjetos recubiertos con fibronectina. Mediante microscopía confocal, se observó una re-localización significativa del biosensor hacia la membrana de las células que expresaron la proteína fluorescente mCherry fusionada a R5BD durante el *spreading*. Sin embargo, cuando se expresó solamente mCherry, la marca fluorescente apareció dispersa y de manera homogénea a través de todo el citoplasma, sin un patrón localizado (Ver Figura 10). Estas observaciones nos indican que Rab5 se activa en las protrusiones de membrana en células inducidas a migrar.

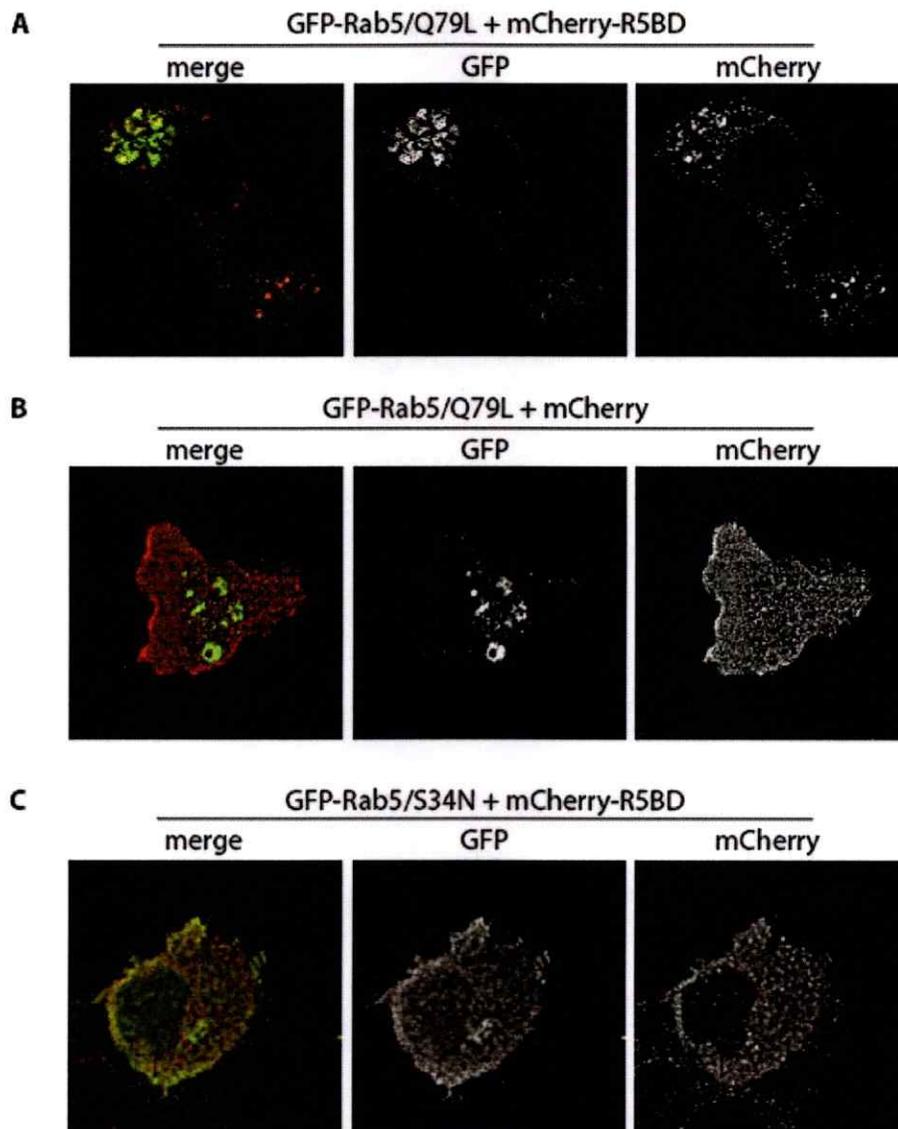


FIGURA 9: Control de inespecificidad del biosensor mCherry-R5BD. Las células MDA-MB-231 fueron co-transfectadas con el vector pEGFP-C1 codificando las variedades mutantes de Rab5: *wild-type* funcional, S34N (alta afinidad por GDP, dominante negativo) y Q79L (actividad GTPasa deficiente, Rab5 constitutivamente unido a GTP), y el vector modificado pEGFP-C1-mCherry-R5BD y su contraparte mCherry sin el motivo R5BD. 24 horas luego de la transfección, las células fueron fijadas y se analizaron para la localización de la marca fluorescente de GFP (verde) y mCherry (rojo) mediante microscopía confocal. Se muestran por separado los canales de imágenes desconvolucionadas, representativas de la población co-transfectada.

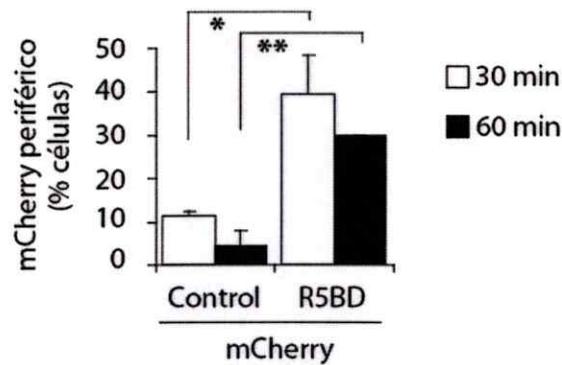
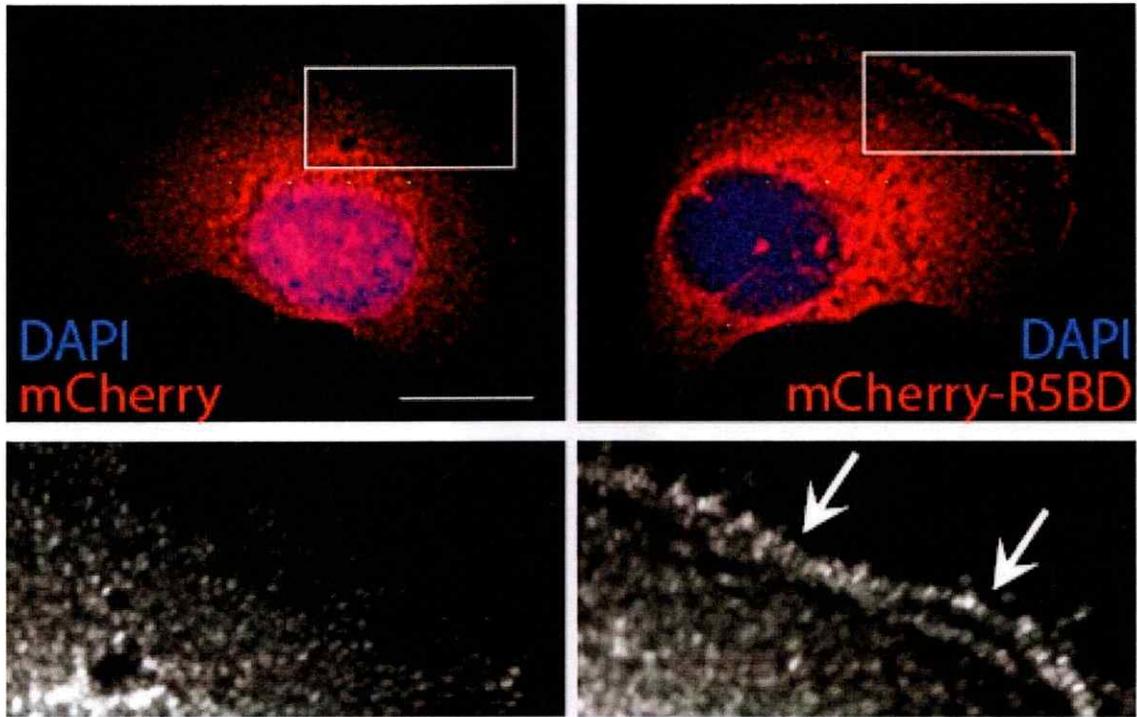


FIGURA 10: mCherry-R5BD se acumula en la periferia celular durante el *spreading*. Las células MDA-MB-231 fueron transfectadas transitoriamente con el vector modificado pEGFP-C1 expresando la proteína de fusión mCherry-R5BD y su contraparte control expresando únicamente mCherry. 24 horas luego de la transfección, las células fueron llevadas a suspensión y sembradas sobre cubreobjetos de vidrio pre-cubiertos con fibronectina, permitiendo la adhesión durante los tiempos indicados, para luego fijarlas. Las muestras se analizaron para la localización de la marca fluorescente mCherry (rojo) y DAPI (azul) mediante microscopía confocal. Se muestra una imagen desconvolucionada, representativa de la población transfectada. El gráfico muestra una cuantificación de la redistribución de mCherry durante el *spreading*, con una relocalización significativa de mCherry-R5BD en el borde de la célula (Ver Métodos).

RAB5 ES REQUERIDA PARA LA MIGRACIÓN CELULAR.

La correlación observada entre activación de Rab5 y migración celular sugiere un rol para esta proteína en la red de transducción de señales que lleva a cabo el proceso de migración. Para evaluar esta posibilidad, se determinó el requerimiento de Rab5 en la migración, para lo cual, se produjeron sub-líneas celulares donde se redujo la expresión de Rab5 mediante RNA de interferencia usando la metodología denominada “*short hairpin RNA*” (*shRNA*).

Rab5 fue silenciada en células MDA-MB-231 mediante transducción con un sistema lentiviral que expresa un shRNA específico contra Rab5 y selección con antibiótico, produciendo las sub-líneas MDA-MB-231/shRNA-Rab5(F10) y MDA-MB-231/shRNA-scramble como control (secuencia de nucleótidos al azar, “*scramble*”). Una vez obtenidas las sub-líneas estables, se procedió a evaluar el nivel de expresión de la proteína mediante Western-Blot.

De acuerdo a lo esperado, se observó una fuerte caída en el nivel de la proteína Rab5 en la línea celular que expresó constitutivamente el shRNA F10 dirigido contra Rab5, nivel remanente estimado en aproximadamente un 30% en comparación con aquella que expresó el shRNA control, la cual presentó un nivel de expresión similar a la línea parental sin transducción. Además, no se observaron diferencias significativas en la expresión de otras proteínas relacionadas con endosomas tempranos (EEA1) y endosomas tardíos (Rab7). Estos resultados validaron la metodología de shRNA en este modelo (Ver Figura 11).

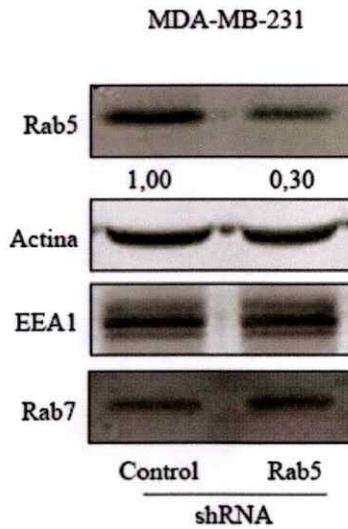


FIGURA 11: Silenciamiento parcial (*Knock-Down*) de Rab5. Las células MDA-MB-231 fueron transducidas establemente utilizando plasmidios codificantes para short hairpin RNA (shRNA) dirigido específicamente contra Rab5, además de una contraparte shRNA-scramble, utilizado como control. Se determinó el nivel de silenciamiento de Rab5 mediante western blot de extractos de proteína total. Los paneles muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes obtenidos mediante Western blot y los valores numéricos representan el promedio de la relación de intensidad entre las bandas Rab5 versus actina (para shRNA-Rab5: 0.30 ± 0.05).

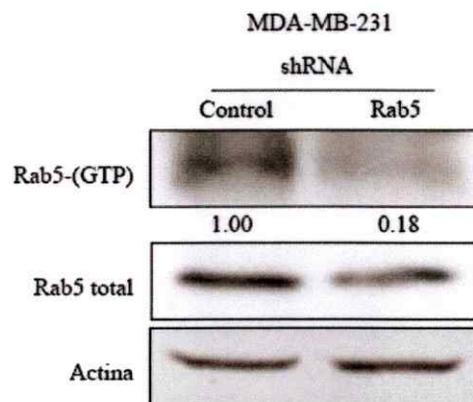


FIGURA 12: Nivel activo remanente de Rab5 en estado estacionario. Se midieron los niveles de la forma activa de Rab5 (Rab5(GTP) mediante el Pull-Down R5BD en las células MDA-MB-231 establemente expresando el shRNA-Rab5 comparados con las células shRNA-control. La figura es representativa de 3 experimentos independientes, y los valores numéricos corresponden al promedio de los niveles estimados mediante densitometría de imágenes obtenidas mediante western blot (para shRNA-Rab5: 0.18 ± 0.05).

Posteriormente se evaluó el efecto de la reducción del nivel total de Rab5 en la activación de los niveles residuales de Rab5, para lo cual se realizó el ensayo de pull-down GST-R5BD, en células tratadas con el shRNA-Rab5. Este experimento mostró que el tratamiento con shRNA contra Rab5 produjo una reducción de mayor magnitud en los niveles de la fracción activa de Rab5, en relación a su total. Este nivel residual de Rab5 activo apenas pudo ser detectado, en comparación con las células tratadas con el shRNA-control. La cuantificación indicó una reducción mayor al 80% de la forma activa, cuando el nivel total fue reducido en aproximadamente un 65%, lo que significa que la disminución de Rab5-GTP de las células en estado estacionario no fue estrictamente proporcional a la caída del nivel total (Ver Figura 12).

Estas observaciones indican que Rab5 fue silenciada tanto en su nivel total como en la forma activa. Para comparar la capacidad migratoria de las células, en función de la presencia de Rab5, se realizaron diferentes ensayos de migración: en primer lugar se realizó el ensayo de cierre de herida y posteriormente ensayos de transmigración utilizando cámaras de Boyden. Midiendo el porcentaje de cierre de herida luego de un período determinado puede estimarse la capacidad migratoria de las células sometidas a este estímulo. De esta forma, las células MDA-MB-231 shRNA-control fueron capaces de cerrar una herida al cabo de 6 horas, mientras que, las células tratadas con el shRNA-Rab5 no cerraron completamente la herida en este período de tiempo (Ver Figura 13).

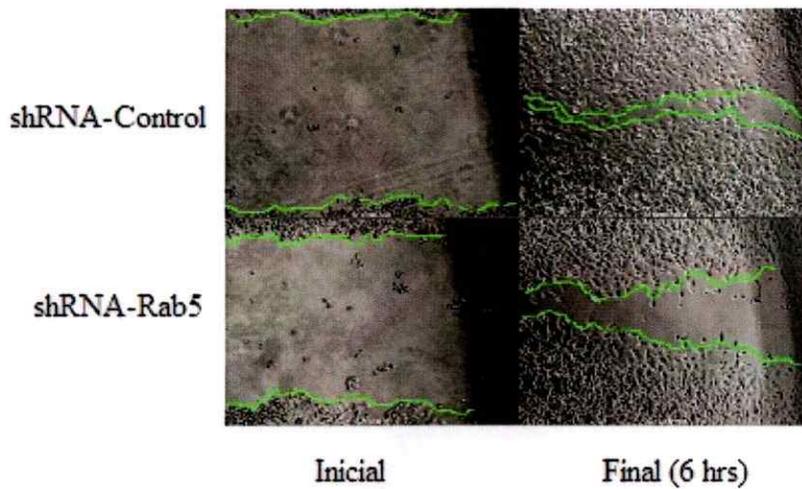


FIGURA 13. La reducción de Rab5 Retarda el Cierre de Herida. Mediante el ensayo de cierre de herida, se midió la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 establemente expresando el shRNA-Rab5 comparadas con las células shRNA-control. Las células fueron sembradas sobre placas de 6 pocillos y cultivadas hasta alcanzar confluencia. Con una punta de pipeta, se realizaron 2 heridas perpendiculares, y se incubó durante 6 horas para permitir el cierre de la herida. Las imágenes muestran capturas del mismo campo (visualizado mediante la línea negra en el borde derecho) en estado inicial y luego de 6 horas de incubación. La línea demarcada corresponde al borde de la herida a los tiempos capturados.

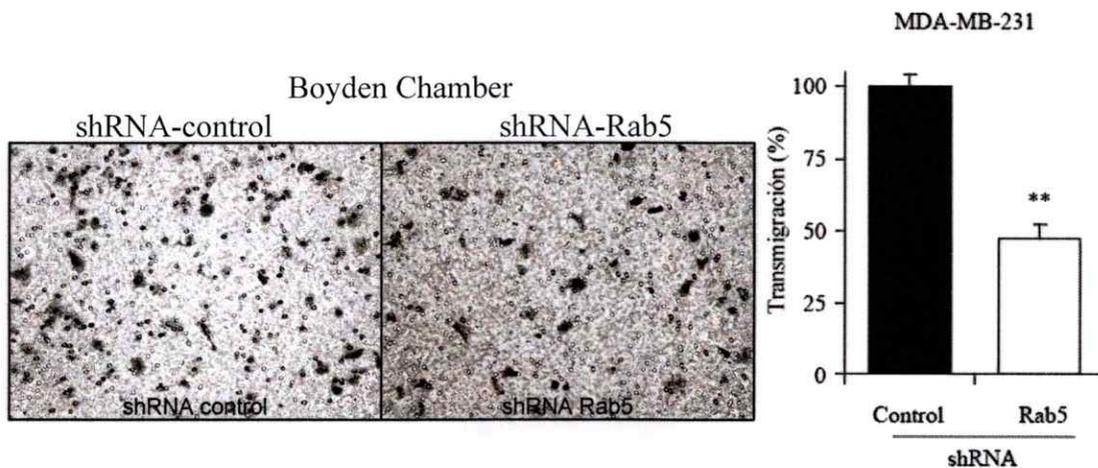


FIGURA 14. La trans migración celular es dependiente de Rab5. El panel muestra fotos representativas tomadas al fondo de las cámaras de trans migración teñidas con Cristal Violeta, al cabo de 2 horas de trans migración. El gráfico muestra los niveles de trans migración durante 2 horas, determinados en el ensayo de Cámara de Boyden (Transwell) utilizando insertos recubiertos con fibronectina. Las barras corresponden al error estándar del promedio de 3 experimentos independientes. Los datos presentan diferencias estadísticamente significativas (** $p < 0,01$).

Por este motivo, se evaluó la capacidad migratoria en ensayos de trans migración en cámara de Boyden. Mediante esta metodología, observamos que las células MDA-MB-231 presentan una alta capacidad migratoria, pudiendo cruzar ésta membrana porosa en un período menor a 120 minutos. También se pudo apreciar que el tratamiento con shRNA-control no tuvo mayor incidencia en la capacidad migratoria de esta línea celular. Sin embargo, las células transfectadas con el shRNA contra Rab5 mostraron una fuerte disminución en su capacidad migratoria, con una caída de un 50%. (Ver Figura 14).

Además del ensayo de trans migración, que mostró una relación estrecha entre Rab5 y la migración, se realizó un ensayo de *spreading* sobre fibronectina. Este ensayo mostró que las células expresando el shRNA-control tienen una dinámica de *spreading* similar a la observada en células parentales, pudiendo adherirse y extender protrusiones dentro de la primera media hora desde el primer contacto con la matriz, formando lamelipodios, y al cabo de 60 minutos presentar un notorio nivel de adhesión. Además, mediante tinción con faloidina fluorescente, se observó la aparición de fibras de estrés, indicando la maduración de las adhesiones y un alto nivel de tensión en el citoesqueleto, signo de adhesión estable. Sin embargo, la línea que expresa el shRNA-Rab5/F10, muestra un marcado retardo en la capacidad de extender su superficie celular sobre la matriz, y al cabo de 60 minutos no es capaz de formar lamelipodios, ni remodelar su estructura de la manera que se observa en la línea control, demostrando que Rab5 es requerido para el remodelamiento constante del frente de adhesión que involucra el proceso de *spreading* (Ver Figura 15).

MDA-MB-231

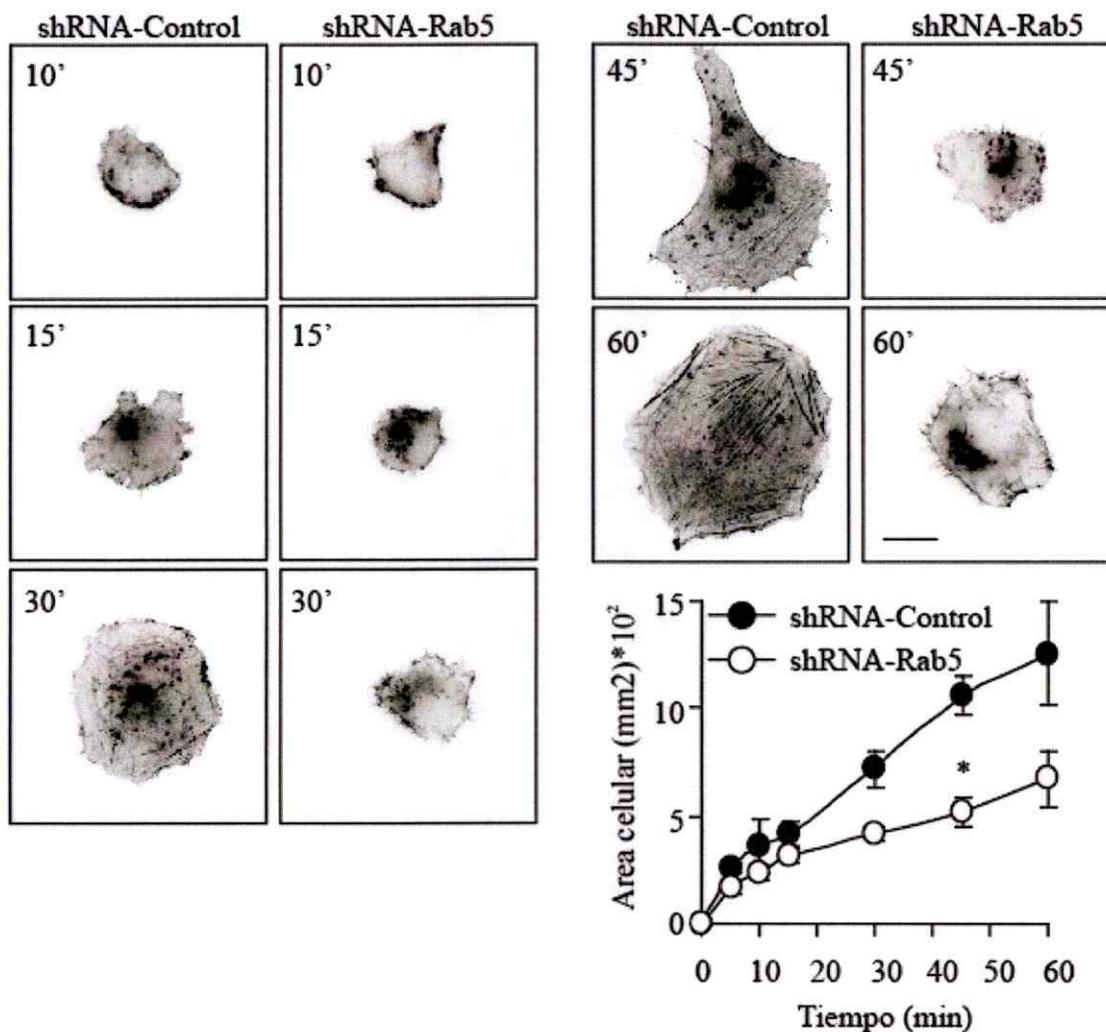


FIGURA 15. El *spreading* celular es dependiente de Rab5. Los paneles corresponden a imágenes representativas de células extendiendo su superficie sobre cubreobjetos recubiertos con fibronectina. Las células fueron fijadas luego de realizar *spreading* durante los tiempos indicados, teñidas con faloidinorodamina y analizadas mediante microscopía de fluorescencia. El gráfico muestra la cuantificación de la superficie celular expandida durante el *spreading*. Las curvas representan el promedio de 3 experimentos independientes y las barras corresponden al error estándar del promedio. Los datos arrojaron diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$).

Para descartar que el silenciamiento de Rab5 estuviera afectando la viabilidad celular procedimos a realizar el ensayo de medición indirecta de la actividad mitocondrial, MTS. Para ello, las células MDA-MB-231 shRNA-control y shRNA-Rab5 se incubaron en placas de 96 pocillos donde se sembraron 1000 o 5000 células por pocillo, según se indica, y se realizó el ensayo de MTS utilizando células proliferando durante 24, 48 y 72 horas desde la siembra, sin reemplazo del medio de cultivo durante estos períodos de tiempo. Los resultados no mostraron diferencias significativas en la viabilidad de las células expresando shRNA-Rab5 en esta cinética de sobrevivencia (Ver Figura 16).

LA INVASIÓN CELULAR ES DEPENDIENTE DE RAB5.

Se ha establecido una estrecha relación entre la capacidad migratoria y el potencial invasivo (Chan et al., 2009; Hood and Cheresch, 2002), ambas características propias de las células metastásicas y de interés para este estudio, por lo cual procedimos a evaluar la capacidad invasiva de la línea MDA-MB-231 mediante un ensayo de invasión *in vitro*, en matrigel.

El ensayo de invasión mostró que las células MDA-MB-231 son capaces de transmigrar hacia la cámara inferior, observándose un número considerable de células en la superficie inferior del matrigel. Además la expresión del shRNA-control no afecta el potencial invasivo de estas células, ya que se aprecia una invasión similar a la observada en células parentales. Sin embargo, la expresión del shRNA contra Rab5 produce una fuerte y significativa reducción en la invasión (Ver Figura 17).

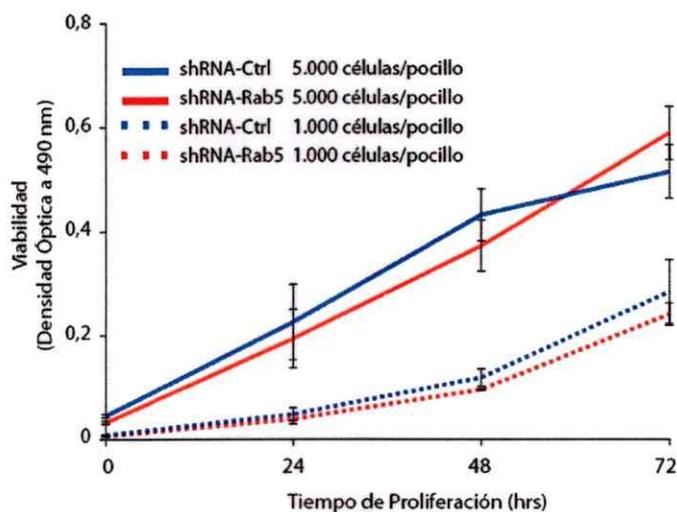


FIGURA 16. La reducción de Rab5 no modifica la viabilidad. El silenciamiento de Rab5 en células MDA-MB-231 no causa diferencias significativas en la viabilidad celular medida mediante el ensayo de MTS. El gráfico muestra la densidad óptica de los sobrenadantes de células expuestas al reactivo MTS, medida a intervalos de 24 horas, y determinada mediante espectrofotometría a 490 nm. Las barras corresponden al error estándar del promedio de 2 experimentos independientes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

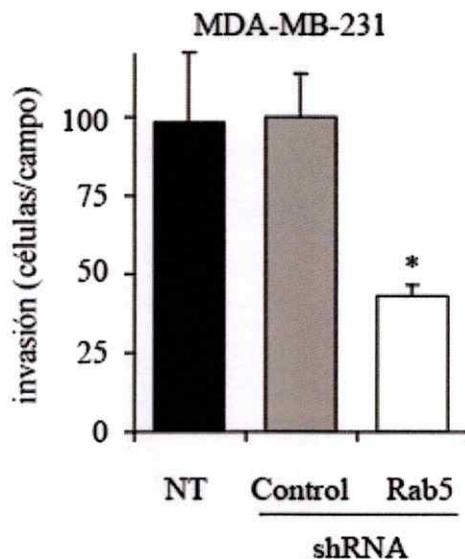


FIGURA 17. La invasividad celular es dependiente de Rab5 en células MDA-MB-231. El gráfico muestra los niveles de invasión, determinados en el ensayo de Matrigel (BD Biocoat) luego de 24 horas. (NT: No tratado). Las barras corresponden al error estándar del promedio de 3 experimentos independientes. Los datos arrojaron diferencias estadísticamente significativas (** $p < 0,01$).

MODELO CELULAR COMPLEMENTARIO: CARCINOMA PULMONAR.

Los hallazgos realizados en células de cáncer mamario, fueron validados en un modelo celular de cáncer pulmonar humano: células A549, las cuales tienen un carácter altamente metastásico (Jiang et al., 2001). En esta línea también se logró seleccionar con éxito las sub-líneas tratadas con shRNA control y shRNA-Rab5 versión F10, el mismo con el que se trabajó en MDA-MB-231. Además se logró obtener otra sub-línea que expresa el shRNA-Rab5 versión B5, el cual presenta mayor eficiencia de silenciamiento, de acuerdo al análisis mediante Western-blot (Ver Figura 18). Mientras que el shRNA control no provoca mayores cambios en el nivel total de Rab5, comparado con la línea parental (datos no mostrados), el shRNA-Rab5/F10 provoca un silenciamiento mayor al 70% con respecto al nivel observado en la línea shRNA-control. Más aún, el shRNA-Rab5/B5 provoca una caída del nivel total de Rab5 mayor al 90%. Cabe mencionar que no se observaron cambios en el nivel de la proteína relacionada con endosomas tempranos EEA1 al silenciar Rab5 con ambos shRNAs (Ver Figura 18).

Una vez generadas estas sub-líneas, se realizaron ensayos de Cámara Boyden, para evaluar la migración celular. Similarmente a lo observado en la línea celular MDA-MB-231, los shRNA-Rab5/B5 y F10 produjeron una fuerte caída en la trans-migración celular, en relación a la condición shRNA-control, cuya cuantificación reveló una reducción superior al 50% en la migración (Ver Figura 19).

También se analizó la invasividad de las células A549 expresando los shRNA-Rab5/B5 y F10, observándose que al igual que en MDA-MB-231, la reducción de Rab5 redujo la cantidad de células que invadieron el matrigel (Ver Figura 20).

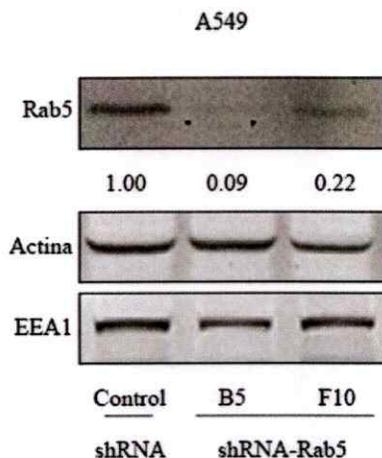


FIGURA 18. Silenciamiento parcial (*Knock-Down*) de Rab5 en células A549. Las células fueron transducidas establemente con lentivirus codificando short hairpin RNA (shRNA) dirigido específicamente contra Rab5 en 2 variedades, shRNA-Rab5 (B5) y shRNA-Rab5 (F10), además de una contraparte shRNA-scramble utilizado como control. Se determinó el nivel de silenciamiento de Rab5 mediante Western blot de extractos de proteína total. Los paneles muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes obtenidas mediante Western blot y los valores numéricos representan el promedio de la relación de intensidad entre las bandas Rab5 versus actina. (Para shRNA-Rab5/B5: 0.09 ± 0.05 y para shRNA-Rab5/F10: 0.22 ± 0.05)

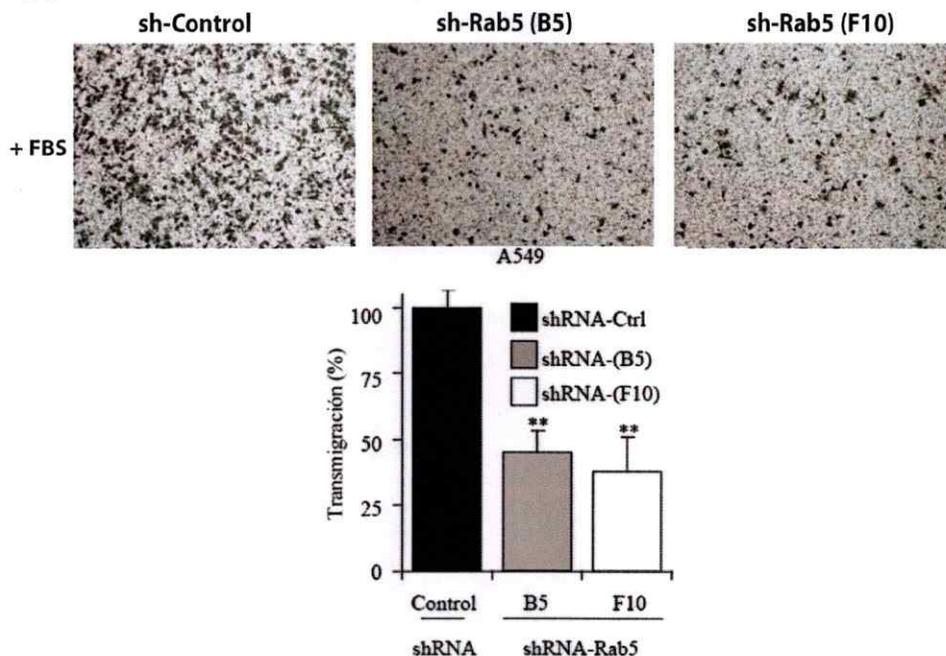


FIGURA 19. La trans migración celular es dependiente de Rab5 en células A549. Los paneles superiores muestran imágenes representativas de los campos analizados. El gráfico muestra los niveles de trans migración, determinados en el ensayo de Cámara de Boyden (Transwell, recubiertos con fibronectina) luego de 2 horas. Las barras corresponden al error estándar del promedio de 3 experimentos independientes. Los datos mostraron diferencias estadísticamente significativas (** $p < 0,01$).

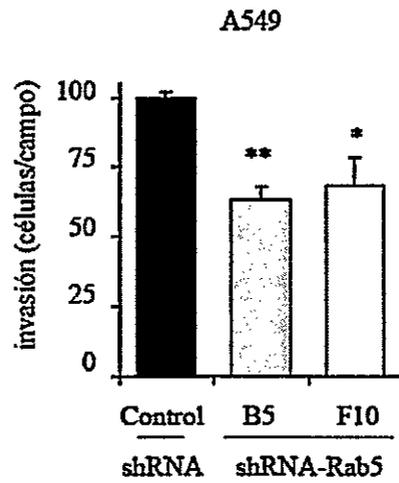


FIGURA 20. La invasividad celular es dependiente de Rab5 en células A549. El gráfico muestra los niveles de invasión, determinados en el ensayo de Matrigel (BD Biocoat) luego de 24 horas. Las barras corresponden al error estándar del promedio de 3 experimentos independientes. Se muestran diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

LA RE-EXPRESIÓN DE RAB5 FUNCIONAL RECUPERA LA MIGRACIÓN CELULAR.

Finalmente, se procedió a re-expresar Rab5 en las células donde se había silenciado y se analizó la recuperación en la capacidad migratoria. Para esto, se re-expresó transitoriamente la versión canina de Rab5 (resistente al shRNA) en la sub-línea A549 shRNA-Rab5 B5, tanto la versión funcional *wild-type* como el mutante inactivo S34N.

Mediante Western-blot se confirmó la re-expresión de Rab5 y el ensayo de trans-migración indicó que efectivamente las células que re-expresaron la versión funcional (*wild-type*) de Rab5 recuperaron la capacidad migratoria observada en las células expresando el shRNA-control, incluso superando el nivel basal. Sin embargo, el potencial migratorio no se recuperó en las células transfectadas con el vector vacío (pcDNA 3.1). Más aún, tampoco se recuperó la capacidad migratoria al re-expresar transitoriamente el mutante inactivo S34N (Ver Figura 21).

Para complementar estos hallazgos, se realizaron ensayos de recuperación, ésta vez transfectando transitoriamente Rab5 canina como proteína de fusión con GFP. Las tendencias se repitieron, ya que la versión GFP-Rab5 *wild-type* fue capaz de rescatar la capacidad migratoria, la cual no pudo reconstituirse al re-expresar la versión mutante inactiva GFP-Rab5 (S34N) (Ver figura 22).

En resumen, estos resultados indican que la actividad de Rab5 es requerida para la migración de células metastásicas.

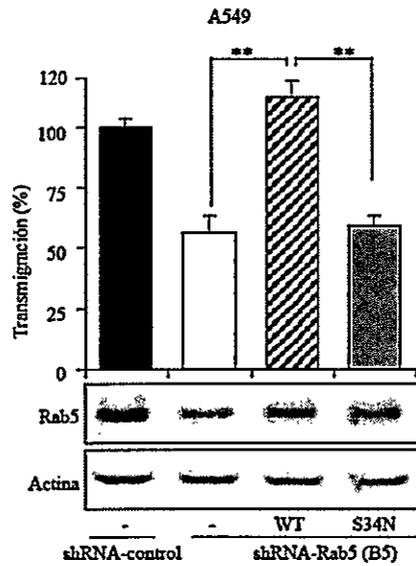


FIGURA 21. La trans migración celular se recupera al re-expresar Rab5 en células A549. Rab5 canina se re-expresó en las células A549 shRNA-Rab5 (B5), tanto la variedad *wild-type* funcional como la variedad disfuncional S34N. Los paneles inferiores muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes obtenidas mediante Western blot. El gráfico superior representa los niveles de trans migración, determinados en el ensayo de Cámara de Boyden (Transwell, recubiertos con fibronectina) luego de 2 horas. Las barras corresponden al error estándar del promedio de 3 experimentos independientes. Se muestran diferencias estadísticamente significativas, (** $p < 0,01$).

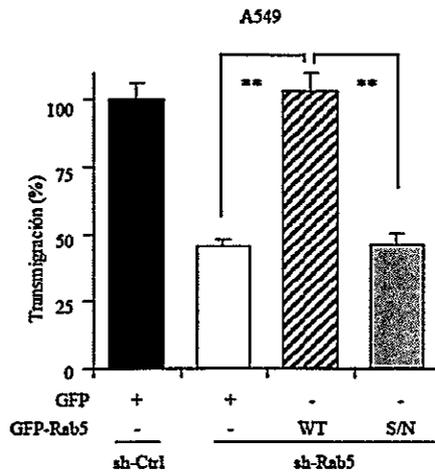


FIGURA 22. La trans migración se recupera al re-expresar GFP-Rab5 en células A549. GFP-Rab5 canina se re-expresó en las células A549 shRNA-Rab5 (B5), tanto la variedad *wild-type* funcional como la variedad disfuncional S34N. El gráfico representa los niveles de trans migración, determinados en el ensayo de Cámara de Boyden (Transwell, recubiertos con fibronectina) luego de 2 horas. Las barras corresponden al promedio y las llaves el error estándar del promedio de 3 experimentos independientes. Se muestran diferencias estadísticamente significativas, (** $p < 0,01$).

RAB5 SE ASOCIA CON COMPONENTES DE LAS ADHESIONES FOCALES DURANTE LA MIGRACIÓN CELULAR.

Existe evidencia que demuestra una co-localización de Rab5 con componentes estructurales de adhesiones célula-matriz, como la integrina $\beta 1$ (Pellinen and Ivaska, 2006; Torres et al., 2010). Ésto sugiere una relación funcional entre la maquinaria endocítica y los elementos estructurales de anclaje, dentro de los cuales tenemos los componentes de las adhesiones focales. Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue evaluar la asociación de Rab5 con componentes de las adhesiones focales durante el proceso de migración.

Para esto se realizó inmunoprecipitación de Rab5 en células de cáncer mamario humano MDA-MB-231 inducidas a migrar mediante el método de multiherida, buscando proteínas de adhesiones focales que co-inmunoprecipiten con Rab5.

Se logró detectar una leve presencia de la integrina $\beta 1$ en el inmunoprecipitado obtenido desde células en condiciones de estado estacionario (inmediatamente después de realizar la multiherida) y también se detectó la presencia de paxilina, y de FAK, componentes principales de las adhesiones focales. Más aún, observamos que el grado de asociación aumentó a medida que las células cerraron la multiherida, presentando un nivel máximo de co-inmunoprecipitación entre Rab5 y paxilina a los 30 minutos de cierre de multiherida, para luego decaer hasta un nivel por debajo del máximo observado (Ver Figura 23). Esto sugiere que existe un grado de asociación entre Rab5 y componentes de adhesiones focales durante la migración, que es leve y transitorio.

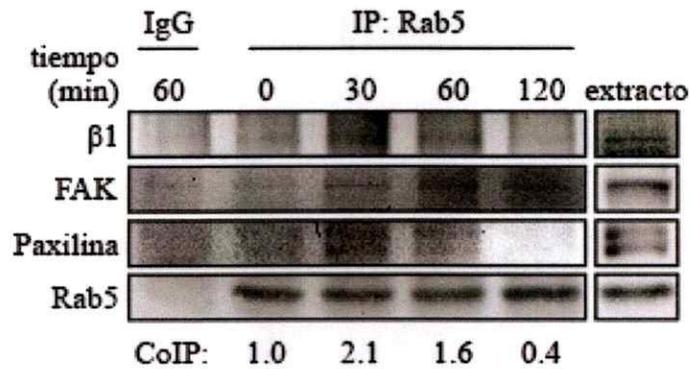


FIGURA 23. Inmunoprecipitación de Rab5 con componentes de adhesiones focales durante el cierre de multiherida. Las células MDA-MB-231 fueron cultivadas hasta alcanzar confluencia y las monocapas resultantes fueron rasgadas múltiples veces con un peine de acero, para luego permitirles cerrar la herida. Posteriormente se prepararon extractos celulares (lisados) desde donde Rab5 fue inmunoprecipitado con un anticuerpo policlonal y las muestras fueron analizadas mediante Western Blot. La integrina $\beta 1$, FAK, Paxilina y Rab5 fueron detectadas en los precipitados. Para comparación, los resultados obtenidos analizando 50 μg de extracto total son mostrados en los paneles de la derecha. Experimentos de inmunoprecipitación control fueron realizados con un anticuerpo IgG irrelevante a 60 min de cierre de una multiherida. Los niveles relativos de paxilina fueron cuantificados en los inmunoprecipitados mediante densitometría de las imágenes de Western Blots y normalizados a la intensidad de Rab5 inmunoprecipitado y paxilina total en el extracto celular (IP paxilina / IP Rab5 / paxilina total). Los datos numéricos bajo cada panel indican las veces de aumento en los niveles de paxilina (relativos al punto 0 min) medidos en los puntos: 30 min (2.1 ± 0.7), 60 min (1.6 ± 0.7) y 120 min (0.4 ± 1.0), calculados a partir de 3 experimentos independientes (promedio \pm error estándar del promedio).

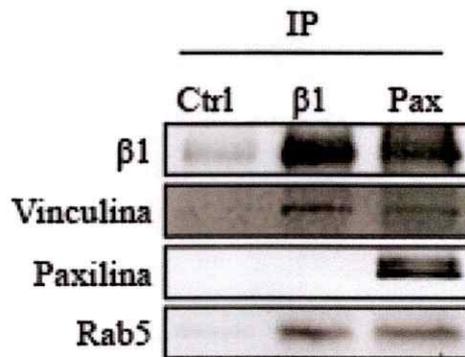


FIGURA 24. Inmunoprecipitación de componentes de adhesiones focales con Rab5 durante el cierre de una multiherida. Las células MDA-MB-231 fueron crecidas hasta alcanzar confluencia y las monocapas resultantes fueron rasgadas múltiples veces con un peine de acero, para luego permitirles cerrar la herida durante 30 min. Posteriormente se prepararon extractos celulares desde donde paxilina e integrina $\beta 1$ fueron inmunoprecipitadas con un anticuerpo policlonal y las muestras fueron analizadas mediante Western Blot. La integrina $\beta 1$, vinculina, paxilina y Rab5 fueron detectadas en los precipitados. Experimentos de inmunoprecipitación control fueron realizados con un anticuerpo IgG irrelevante. Las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes.

Para validar estos estudios se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación inversa, ésta vez inmunoprecipitando las proteínas paxilina e integrina $\beta 1$ y detectando la presencia de Rab5 en las co-inmunoprecipitaciones. Esto se realizó en células inducidas a migrar por 30 minutos. Los datos ratificaron nuestras observaciones anteriores, en donde encontramos a Rab5 en ambos inmunoprecipitados (Ver Figura 24).

Posteriormente, se procedió a realizar un análisis de co-localización mediante inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal. Para ésto, se visualizó Rab5 y componentes de adhesiones focales en células MDA-MB-231, tanto en estado estacionario, como después de una migración inducida por cierre de herida. En primer lugar, mediante anticuerpos contra paxilina se detectó a esta proteína tanto en la periferia, formando las adhesiones focales, como dispersa a través del citoplasma. Por otro lado, Rab5 presentó un patrón de distribución perinuclear, observándose estructuras que asemejan endosomas y vesículas endocíticas en tránsito (Figura 25). En ocasiones se observó una co-localización, aunque escasa, de ambas proteínas en el plano focal analizado, y esta co-localización se observó tanto en el estado estacionario como en las células inducidas a migrar, aunque en mayor proporción después del estímulo migratorio. En particular, se observó que la marca endosomal se tornó más periférica a 30 minutos de avance en el frente de la herida. Además se observó un aumento de la colocalización al estabilizar las adhesiones focales sincronizando células con nocodazol (Figura 26), lo cual sugiere que la asociación es transitoria, y solo puede ser detectada en estrechas ventanas de tiempo.

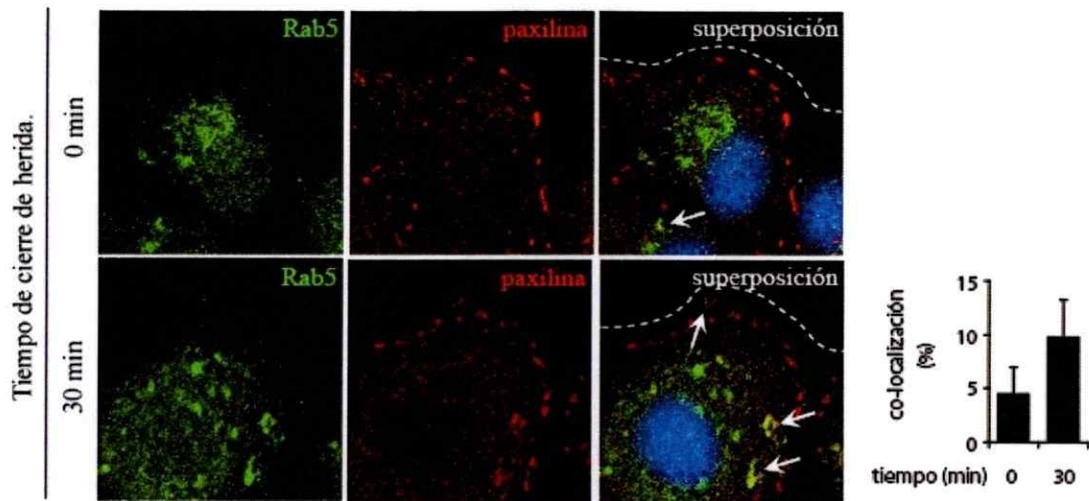


FIGURA 25. Rab5 co-localiza con paxilina durante el cierre de herida. Las células MDA-MB-231 fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio hasta alcanzar confluencia, y fueron rasgadas con una punta de micropipeta, produciendo una herida. Luego se les permitió cerrar la herida durante los tiempos indicados, para luego fijarlas sobre los cubreobjetos y teñirlas con los anticuerpos policlonal anti-Rab5 (en verde), monoclonal anti-paxilina (en rojo) y DAPI (azul) y analizarlas mediante microscopía confocal. Se muestran imágenes desconvolucionadas, representativas de la población en el borde de la herida, analizadas en 2 experimentos independientes y el gráfico muestra una cuantificación del porcentaje de colocalización en las imágenes obtenidas.

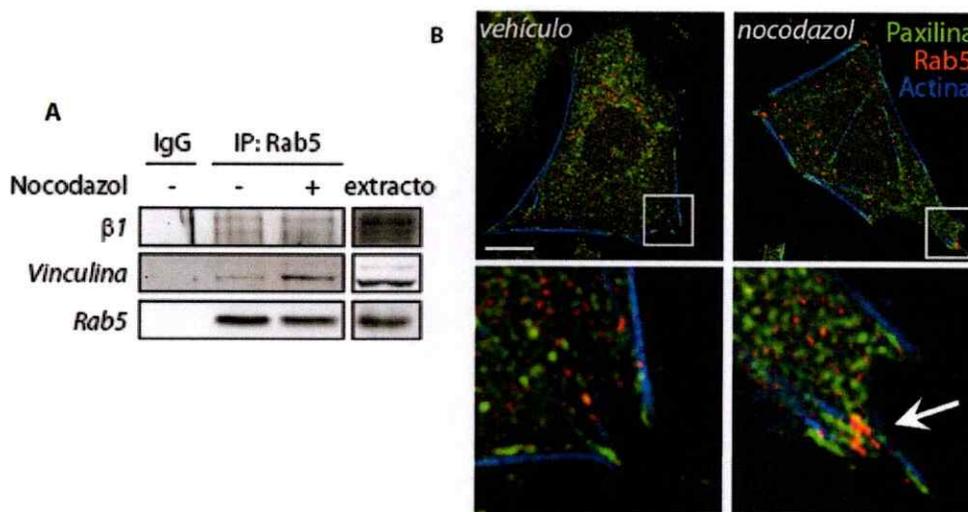


FIGURA 26. Rab5 se asocia con componentes de adhesiones focales al sincronizar las células con nocodazol. Las células MDA-MB-231 fueron incubadas con nocodazol, para luego A) inmunoprecipitar Rab5 y buscar componentes de adhesiones focales en los inmunoprecipitados ó B) fijarlas sobre cubreobjetos y teñirlas con los anticuerpos fluorescentes anti-Rab5 (en rojo), anti-paxilina (en verde) y faloidina (azul) y analizarlas mediante microscopía confocal. Se muestran imágenes desconvolucionadas, representativas de la población analizada.

Para evaluar la asociación de Rab5 activo con las adhesiones focales se procedió a analizar la co-localización de paxilina con el biosensor mCherry-R5BD durante el cierre de herida. El análisis mostró leve co-localización de las marcas fluorescentes en los planos focales analizados, mostrando una distribución del biosensor ubicada preferencialmente en endosomas perinucleares, pero también se observa en un menor grado en el frente de adhesión, asociado a las regiones ricas en adhesiones focales y demarcando la periferia de la célula (Figura 27) indicando que Rab5 activo se asocia con componentes de adhesiones focales tanto en compartimentos endosomales como en la periferia celular.

Para corroborar los hallazgos realizados en ensayos de inmunoprecipitación e inmunofluorescencia, se diseñó una tercera aproximación experimental, correspondiente al fraccionamiento subcelular para enriquecer adhesiones focales. De acuerdo a lo esperado, se observó abundancia de Rab5 en la fracción citoplasmática, controlada por la presencia de la chaperona citoplasmática HSP90; mientras tanto en la fracción enriquecida en adhesiones focales, controlada por la presencia cuantitativa de integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$, además de vinculina (como marcadores de adhesiones focales), se observó un porcentaje significativo de Rab5 (ver Figura 28), reafirmando la idea de una asociación entre esta GTPasa y las adhesiones focales.

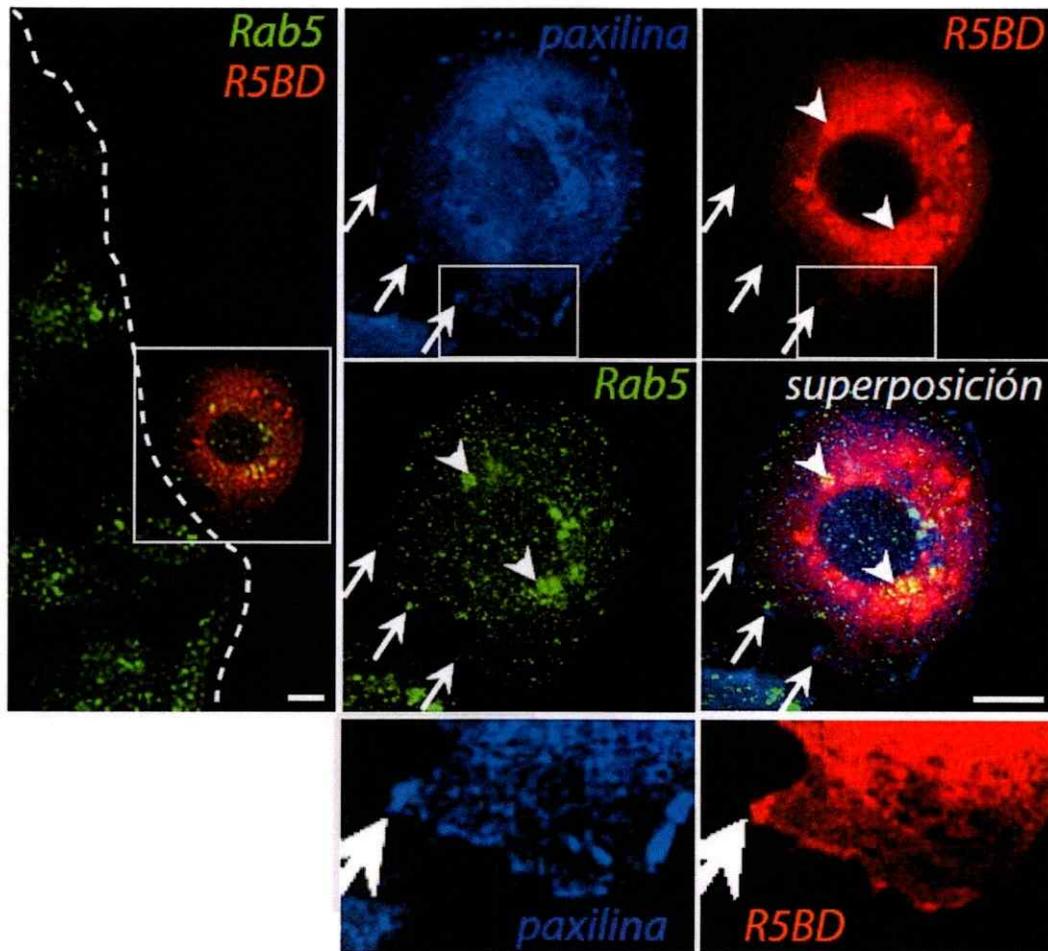


FIGURA 27. Rab5(GTP) co-localiza con paxilina durante el cierre de herida. Las células MDA-MB-231 fueron transfectadas con el biosensor mCherry-R5BD, cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio hasta alcanzar confluencia, y las monocapas fueron luego rasgadas con una punta de micropipeta, produciendo una herida. Luego se les permitió cerrar la herida durante 30 minutos, para luego fijarlas sobre los cubreobjetos y teñirlas con los anticuerpos fluorescentes anti-Rab5 (en verde) y anti-paxilina (en azul) y analizarlas mediante microscopía confocal. Se muestra una imagen desconvolucionada, representativa de la población en el borde de la herida, analizadas en 2 experimentos independientes.

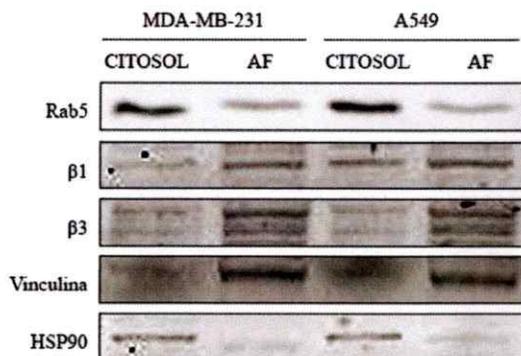


FIGURA 28. Rab5 está presente en adhesiones focales de células inducidas a adherirse. Las células MDA-MB-231 y A549 fueron llevadas a suspensión y sembradas sobre placas recubiertas con fibronectina, permitiéndoles adherirse durante 45 minutos, para luego extraer una fracción enriquecida en adhesiones focales como se indica en la sección materiales y métodos. Mediante Western blot se detectaron proteínas propias de las fracciones citosólica (indicada como CITOSOL) y fracción enriquecida en adhesiones focales (indicada como AF).

PARTICIPACIÓN DE RAB5 EN EL RECAMBIO DE ADHESIONES FOCALES.

Motivados por los hallazgos sobre la asociación de Rab5 con las adhesiones focales, se procedió a evaluar la participación de Rab5 en el desensamblaje y recambio de estos complejos de adhesión.

En primer lugar, se evaluó la presencia de integrinas superficiales en células que carecen de Rab5 por silenciamiento mediante shRNA. Para esto se procedió a resuspender células A549 tratadas con los shRNAs respectivos, para luego ser fijadas y teñidas con un anticuerpo fluorescente específico contra la integrina $\beta 1$. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. Según este análisis no se observaron diferencias significativas en el nivel superficial de integrina $\beta 1$, entre las células shRNA-Rab5 y las células shRNA-control (Ver Figura 29).

Ya que no se observaron cambios en los niveles de integrina superficial, se procedió a analizar la funcionalidad de estas integrinas, realizando un ensayo de adhesión a matrices artificiales. Para esto, células en suspensión fueron sembradas sobre placas pre-cubiertas con fibronectina o colágeno, permitiendo la adhesión en sucesión temporal a la matriz. Una vez fijadas y teñidas, las muestras fueron analizadas al microscopio y la adhesión cuantificada mediante tinción con cristal violeta. El ensayo tampoco mostró diferencias significativas en la cantidad de células adheridas al silenciar Rab5 (Ver Figura 30). De manera interesante, el análisis microscópico mostró que las células shRNA-Rab5 presentan una capacidad de expansión retrasada con respecto a la línea shRNA-control, aún cuando la cantidad de células adheridas en cada punto analizado no varió considerablemente (Ver Figura 31).

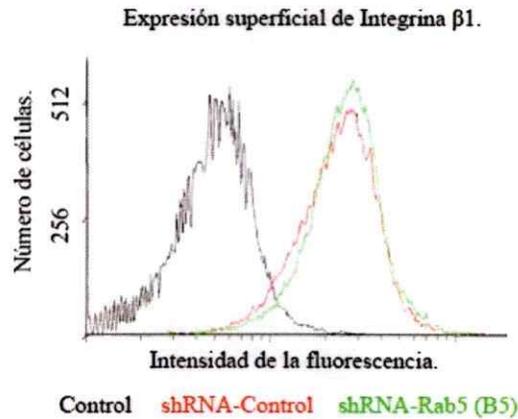


FIGURA 29. La expresión superficial de integrina $\beta 1$ no sufre cambios al reducir el nivel de Rab5. Las células A549 establemente expresando shRNA dirigido contra Rab5 y control fueron resuspendidas, fijadas, incubadas con un anticuerpo anti-integrina $\beta 1$ seguido de un anticuerpo secundario acoplado a FITC y analizadas mediante citometría de flujo. El gráfico representa los histogramas de intensidad de las células analizadas. El control representado por la línea negra corresponde a una población de células que no se incubaron con el anticuerpo primario anti-integrina $\beta 1$, y en su lugar sólo se incubaron con el anticuerpo fluorescente secundario anti-IgG acoplado a FITC. Las líneas coloreadas indican la intensidad de la fluorescencia de las células que se indican en la leyenda.

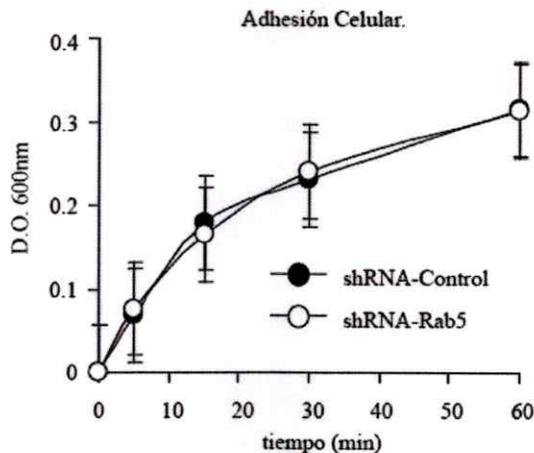


FIGURA 30. El ensayo de adhesión celular no muestra diferencias en el anclaje a la matriz en células con nivel reducido de Rab5. Las células MDA-MB-231 expresando shRNA contra Rab5 y control fueron llevadas a suspensión y sembradas en placas recubiertas con fibronectina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o colágeno 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (dato no mostrado). Luego de la incubación durante los tiempos indicados, se retiró la suspensión y las células adheridas fueron fijadas y teñidas con cristal violeta. Las curvas representan la densidad óptica (absorbancia a 600 nm) del colorante retenido en las células adherentes. Las curvas suavizadas delinean el promedio y el error estándar de 3 experimentos independientes.

Adhesión Celular.

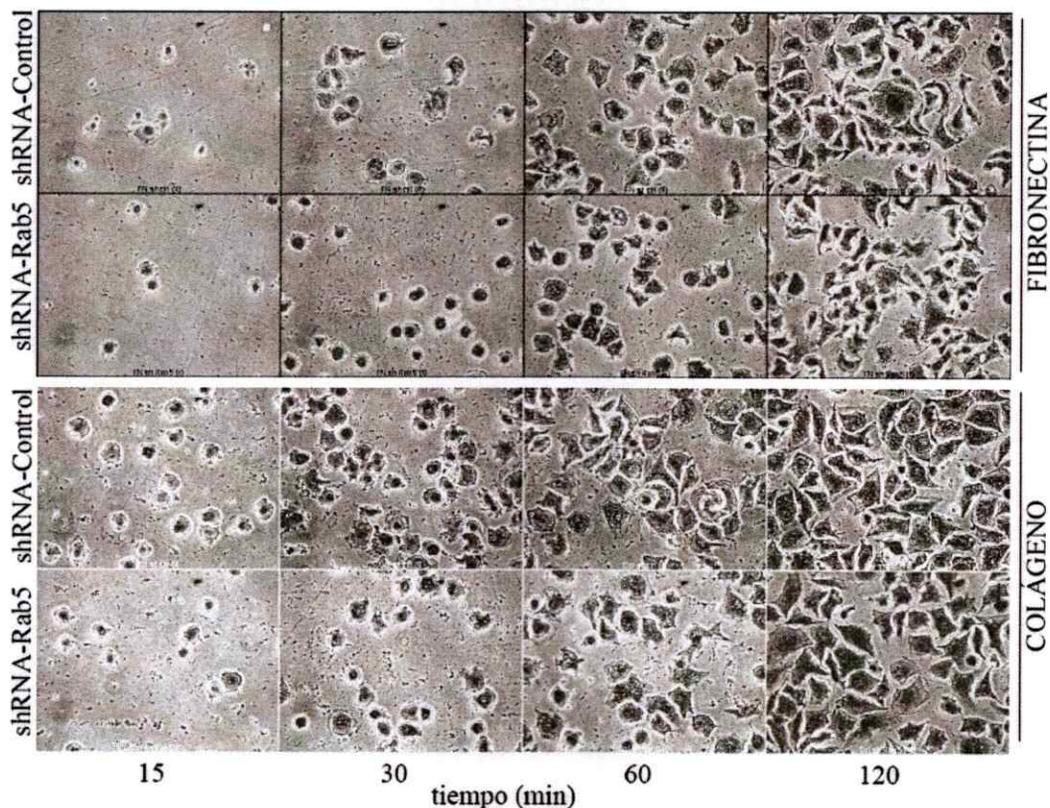


FIGURA 31: Análisis microscópico del ensayo de adhesión celular. La reducción del nivel endógeno de Rab5 produce retardos en el spreading que no se reflejan en el anclaje. Las células MDA-MB-231 que expresan shRNA contra Rab5 y shRNA-Control fueron llevadas a suspensión y sembradas en placas recubiertas con fibronectina y colágeno. Luego de la incubación durante los tiempos indicados, se retiró la suspensión y las células adheridas fueron fijadas y teñidas con cristal violeta. Los paneles muestran imágenes de la expansión de las células adherentes a los tiempos analizados y son representativas de 3 experimentos independientes.

RAB5 Y LA REGULACIÓN DEL RECAMBIO DE ADHESIONES FOCALES.

El fenómeno observado en los ensayos de *spreading* y de adhesión, junto con el patrón de expresión de integrinas, el cual no varía en estado estacionario, dirigió nuestra atención hacia la dinámica de recambio de adhesiones focales, de tal manera que se evaluó la capacidad de estas células para internalizar sus adhesiones focales. Para ello se determinó la velocidad de desensamblaje de adhesiones focales inducido por microtúbulos (Ezratty et al., 2005). Este ensayo se basa en la despolimerización masiva de los microtúbulos por acción del Nocodazol, lo cual lleva a la estabilización de adhesiones focales maduras. Por consiguiente, la remoción de este fármaco promueve la repolimerización de los microtúbulos y un concomitante desensamblaje de las adhesiones focales. De esta forma, en primer lugar se demostró que el Nocodazol depolimeriza cuantitativamente los microtúbulos en nuestro modelo de trabajo. Esto es, exponiendo células adheridas en estado estacionario al fármaco por 4 horas, seguido de una serie de lavados durante diferentes tiempos. Las muestras analizadas mediante inmunofluorescencia con anticuerpos anti alfa-tubulina indicaron que tanto la condición shRNA-control, como shRNA-Rab5 presentaron una disrupción parcial de la red de microtúbulos (Figura 32, tiempo 0'). Al someter las células a 15 minutos de lavado, se observó un crecimiento íntegro de los microtúbulos, con extensiones prolongadas a través de toda la célula, llegando a la periferia (Figura 32, tiempo 15'). A mayores tiempos de lavado se observó una reorganización de la red de microtúbulos alcanzando su estado basal y no se observaron diferencias en la velocidad de repolimerización al silenciar Rab5 (Ver Figura 32).

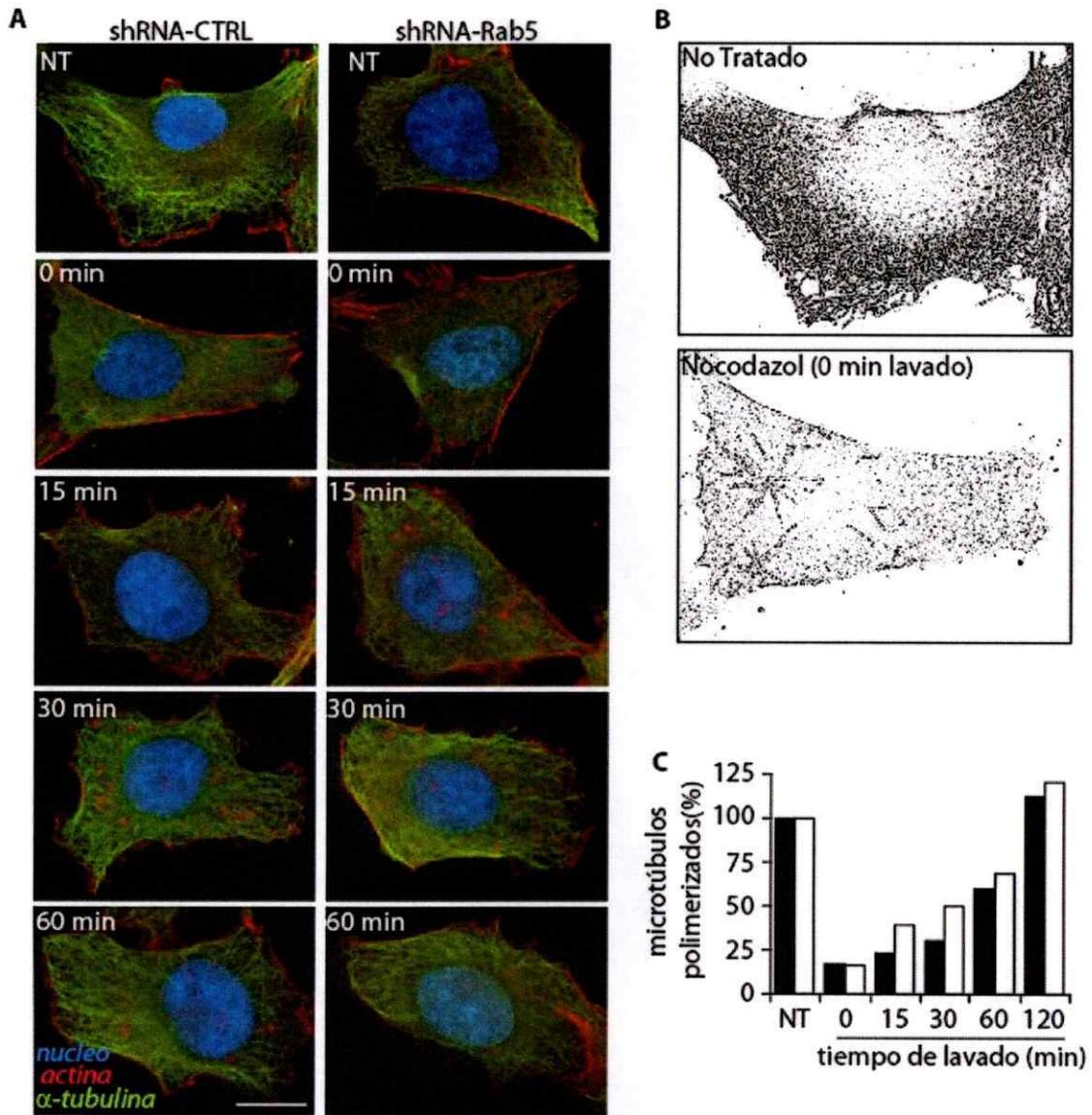


FIGURA 32. El Nocodazol induce la despolimerización de la red de microtúbulos. Las células fueron cultivadas en cubreobjetos de vidrio, privadas de factores de crecimiento durante 12 horas antes del experimento con medio suplementado con 1% de suero fetal bovino y tratadas con Nocodazol a una concentración de 10 μ M en medio libre de suero por 4 horas para producir la despolimerización de los microtúbulos. El Nocodazol fue retirado mediante lavado con medio libre de suero y las células fueron incubadas a 37°C por los períodos de tiempo indicados. Posteriormente, las células fueron fijadas y preparadas para inmunofluorescencia con anticuerpo anti α -tubulina seguido de anticuerpo secundario acoplado a FITC, y se tiñó el citoesqueleto de actina con faloidina-rodamina y el núcleo con DAPI, para su posterior análisis mediante microscopía de fluorescencia. A) Imágenes representativas de la red de microtúbulos. B) y C) Se realizó análisis de la integridad de los microtúbulos mediante cuantificación densitométrica de la intensidad integrada de píxeles, la cual se indica en el gráfico.

Una vez demostrado el efecto del Nocodazol en la línea celular MDA-MB-231, se realizó la cuantificación de la capacidad de recambio de adhesiones focales en estas células, reflejado en el desensamblaje de adhesiones focales mediado por microtúbulos. En células MDA-MB-231, las adhesiones focales fueron identificadas por tinción de vinculina, y fueron observadas como aglomeraciones o marcas puntiformes en la periferia celular (Figura 33, condición No Tratado (NT)). Tanto en la condición shRNA-control, como en shRNA-Rab5, la incubación con el nocodazol indujo fuertemente la formación y maduración de adhesiones focales, ya que en ambas sublíneas celulares se observó un alto número de puntos fluorescentes y de gran tamaño, fácilmente observables en comparación con la células que no fueron incubadas con el nocodazol (Figura 33, comparar células sincronizadas (tiempo 0 de lavado) versus No Tratado (NT)). En las células shRNA-control, la remoción del fármaco produjo un rápido desensamblaje de las adhesiones focales, observada tempranamente a los 15 minutos y continuando hasta los 30 minutos, para luego comenzar a reaparecer a los 60 minutos, recuperando un nivel similar a la condición sin tratamiento a los 120 minutos post-lavado. Sin embargo y de manera sorprendente, esta cinética se vio marcadamente retardada en la células shRNA-Rab5, donde a los 15 minutos desde el lavado, aún persistieron las adhesiones focales de manera intacta en la periferia celular. Incluso a los 30 minutos se mantuvo una fracción de adhesiones focales presentes en la periferia, donde recién a los 60 minutos desaparecieron, para recuperar parcialmente su ubicación periférica a los 120 minutos post-lavado (Ver Figura 33).

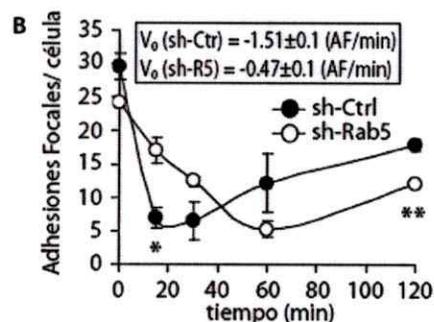
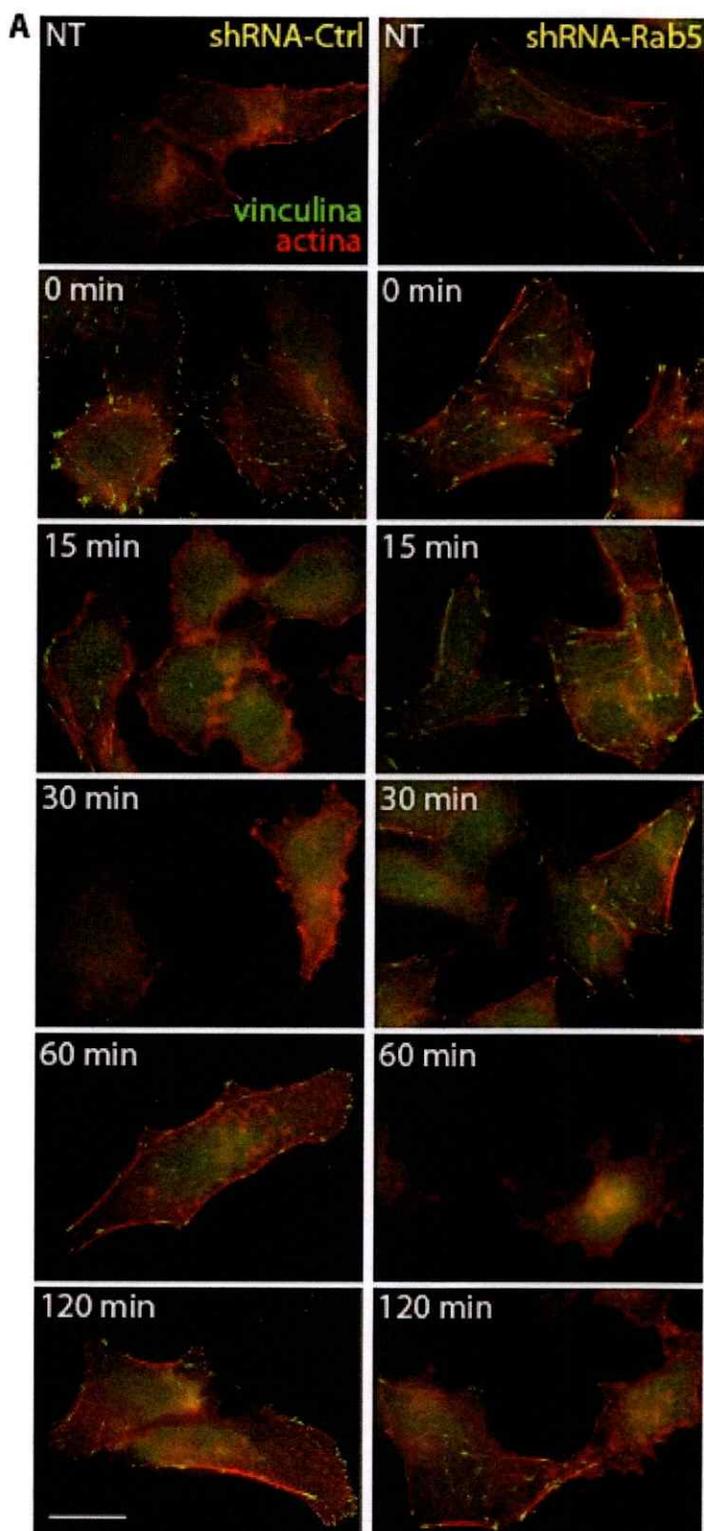


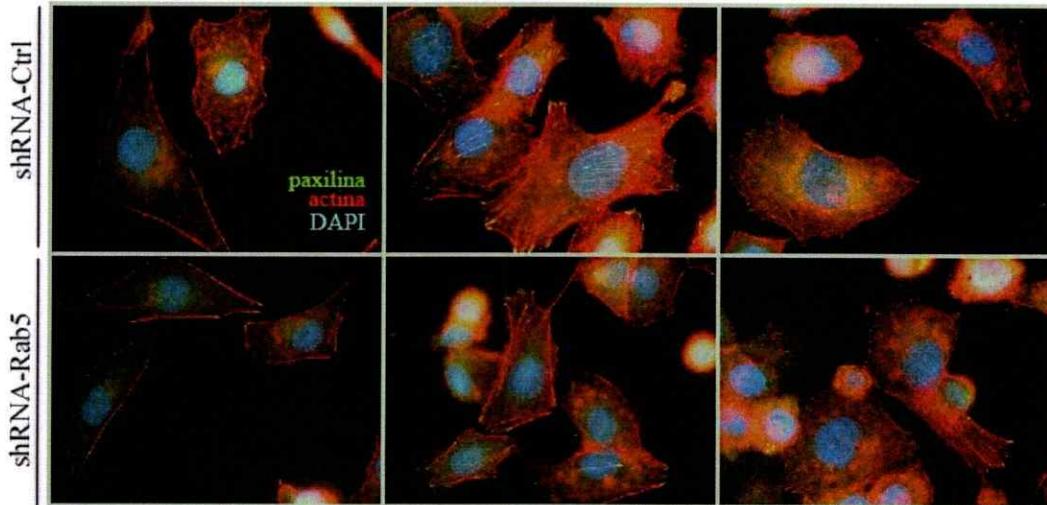
FIGURA 33. El silenciamiento de Rab5 retarda el desensamblaje de adhesiones focales inducido por Nocodazol en células MDA-MB-231. Las células fueron cultivadas en cubreobjetos de vidrio, privadas de factores de crecimiento durante 12 horas y tratadas con nocodazol 10 μ M en medio libre de suero por 4 horas. El nocodazol fue retirado mediante lavado con medio libre de suero y las células fueron incubadas a 37°C por los períodos de tiempo indicados permitiendo el crecimiento de los microtúbulos y el desensamblaje coordinado de las adhesiones focales. Posteriormente, las células fueron fijadas y preparadas para inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo anti-vinculina seguido de un anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 488, mientras que el citoesqueleto de actina se tiñó con faloidina-rodamina. La barra representa 10 μ m. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

B) Las curvas corresponden a la cuantificación de las adhesiones focales por célula en las imágenes obtenidas en el experimento de desensamblaje de adhesiones focales inducido por microtúbulos. El recuadro superior indica las velocidades iniciales de desensamblaje (diferencia promedio entre tiempo 0 y tiempo 15). Las curvas delinean el promedio y el error estándar de 3 experimentos independientes. Se muestran diferencias estadísticamente significativas entre las cinéticas a los puntos 15 y 120 desde la remoción del nocodazol (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

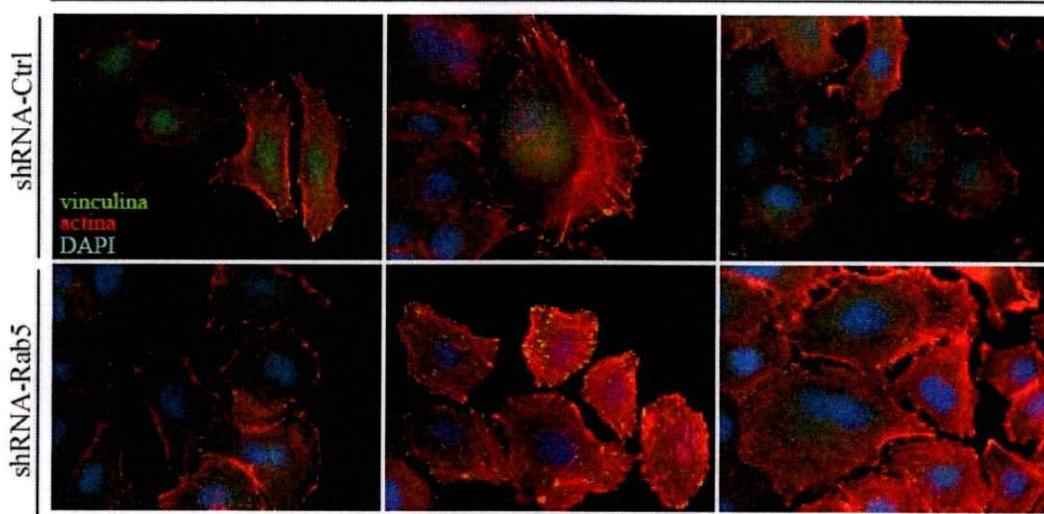
A partir de las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia se cuantificó el número de adhesiones focales por célula y se realizaron curvas de tendencia indicando la velocidad del desensamblaje de las adhesiones focales. La condición shRNA-control presentó un alto número de adhesiones focales al incubarse con el fármaco, mientras que a los 15 minutos de lavado éstas se han desensamblado en su mayoría, presentándose en este punto el mínimo observado. A los 30 minutos desde el lavado, persistió el bajo nivel de adhesiones focales, recuperándose posteriormente, hasta su nivel basal (60 minutos después del lavado). Por el contrario, el alto número de adhesiones focales en células shRNA-Rab5 tratadas con nocodazol, presentó un decaimiento lento, con un mínimo comparable a la condición control recién a los 60 minutos después del lavado (Ver Figura 33). Mediante una correlación lineal se estimó la velocidad inicial de desensamblaje, comparando el número promedio de adhesiones focales 15 minutos después del lavado en relación al nivel observado en las células donde no se realizó lavado. La velocidad de desensamblaje en la sub-línea shRNA-control fue de aproximadamente $-1,5$ adhesión focal*minuto⁻¹, mientras que en la condición shRNA-Rab5 fue de aproximadamente $-0,5$ adhesión focal*minuto⁻¹ (Ver Figura 33).

Estos datos fueron confirmados mediante tinción de paxilina, como marcador de adhesiones focales, repitiéndose esta tendencia e indicando que el fenómeno es independiente del marcador utilizado (Ver Figura 34). Por último, este ensayo fue también realizado en el modelo celular de carcinoma pulmonar A549, usando la construcción shRNA-Rab5/B5, observándose tendencias similares y demostrando la participación de Rab5 en la dinámica de recambio de adhesiones focales (Ver Figura 34).

MDA-MB-231



A549



No Tratado

Nocodazol 10 μ M

15 min lavado

FIGURA 34. El silenciamiento de Rab5 retarda el desensamblaje de adhesiones focales inducido por nocodazol, independientemente del reportero y la línea celular utilizada. Las células MDA-MB-231 y A549; shRNA-control y shRNA-Rab5 fueron cultivadas en cubreobjetos de vidrio, privadas de factores de crecimiento durante 12 horas antes del experimento con medio suplementado con 1% de suero fetal bovino y tratadas con nocodazol a concentración 10 μ M en medio libre de suero por 4 horas. El nocodazol fue retirado mediante lavado con medio libre de suero y las células fueron incubadas a 37°C durante 15 minutos, permitiendo el crecimiento de los microtúbulos y el desensamblaje coordinado de las adhesiones focales. Posteriormente, las células fueron fijadas y preparadas para inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo anti-paxilina en MDA-MB-231 y anti vinculina en A549 seguido de un anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 488, mientras que el citoesqueleto de actina se tiñó con faloidina-rodamina y el núcleo con DAPI. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes en MDA-MB-231 y 2 experimentos independientes en A549.

EL SILENCIAMIENTO DE RAB5 RETRASA LA DINÁMICA DE DESFOSFORILACIÓN DE FAK.

Para corroborar la participación de Rab5 en el recambio de adhesiones focales se utilizó como reportero bioquímico de la presencia/madurez de adhesiones focales el grado de autofosforilación de la Kinasa de Adhesión Focal (FAK) en la tirosina 397. Para esto, se utilizó el modelo experimental de desensamblaje de adhesiones focales inducido por microtubulos en células MDA-MB-231, esta vez analizando la fosforilación de FAK en extractos celulares mediante Western blot. La cuantificación de los datos presentó un comportamiento similar al observado mediante el conteo de adhesiones focales, ya que en las células shRNA-control se observó un alto nivel de la forma fosforilada de FAK como consecuencia del tratamiento con Nocodazol. Luego de 15 minutos de lavado esta fosforilación disminuyó rápidamente a un nivel mínimo, recuperándose rápidamente luego en tiempos posteriores y alcanzando niveles comparables con el basal de la condición sin droga (Ver Figura 35, comparar células sh-Ctrl sincronizadas (tiempo 0 de lavado) versus No Tratado (NT)). Sin embargo, la curva de desfosforilación de FAK se vió marcadamente retrasada en las células shRNA-Rab5, donde la desfosforilación de FAK Y397 después de 15 minutos de lavado fue mucho menos drástica que en el control, que presentó el nivel mínimo recién a los 30 minutos (Ver Figura 35, comparar células shRNA-Rab5 sincronizadas (tiempo 0 de lavado) versus No Tratado (NT)). Estas observaciones a nivel bioquímico apoyan la idea de que Rab5 es importante en el recambio de adhesiones focales.

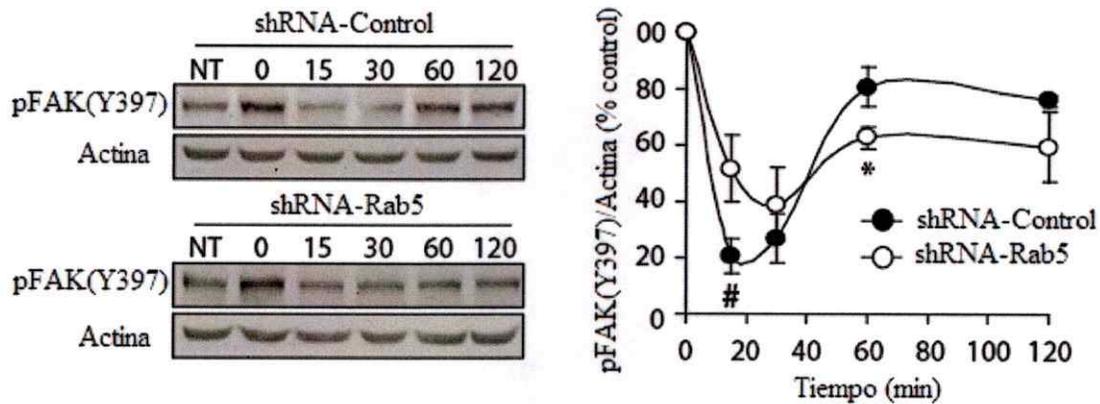


FIGURA 35. El silenciamiento de Rab5 retarda la dinámica de desfosforilación de la Kinasa de Adhesión Focal (FAK). Las células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos, privadas de factores de crecimiento durante 12 horas antes del experimento con medio suplementado con 1% de suero fetal bovino y tratadas con nocodazol a una concentración 10 μ M en medio libre de suero por 4 horas. El nocodazol fue retirado mediante lavado con medio libre de suero y las células fueron incubadas a 37°C por los períodos de tiempo indicados, permitiendo el crecimiento de los microtúbulos y promoviendo el desensamblaje coordinado de las adhesiones focales y la desfosforilación de FAK en la tirosina 397. Posteriormente, las células fueron homogeneizadas, los extractos fueron analizados mediante SDS-PAGE y las proteínas identificadas mediante Western blot. Los paneles mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. El gráfico de la derecha muestra una cuantificación densitométrica de los niveles de la forma fosforilada de FAK en Y397, normalizado con respecto a actina.

ESTUDIOS DE VIDEOMICROSCOPIA CONFIRMAN EL RETRASO DE LA DINAMICA DE DESENSAMBLAJE DE ADHESIONES FOCALES.

Para corroborar la participación de Rab5 en el recambio de adhesiones focales se utilizó la técnica de seguimiento mediante videomicroscopía de lapso de tiempo, analizando la dinámica de desensamblaje de adhesiones focales fluorescentes luego de un pulso de suero. Para esto, las células MDA-MB-231 se transfectaron con plasmidios codificando mCherry-Paxilina, lo cual nos permitió analizar la velocidad de desensamblaje de focos de adhesión en paralelo de las sub-líneas shRNA-Control y shRNA Rab5. El análisis mostró que en promedio las adhesiones en la sub-línea shRNA-control completaban un ciclo de aparición y desensamblaje en un período de 25 minutos, mientras que las adhesiones de la sub-línea shRNA-Rab5 eran desensambladas lentamente y persistían por períodos de más de una hora (Ver figura 36). Este resultado demuestra que Rab5 es fundamental para el apropiado desensamblaje de adhesiones focales, y manifiesta la existencia de una regulación por parte de esta GTPasa sobre la internalización de componentes de adhesiones focales. Posteriormente se analizó la localización de GFP-Rab5 durante el proceso de desensamblaje de adhesiones focales conteniendo mCherry-Paxilina y se observó que existe una fracción de endosomas periféricos que están en estrecha cercanía con las adhesiones focales (Figura 37A) y que durante el desensamblaje de éstas, algunos endosomas se aproximan a las regiones periféricas, co-localizando brevemente con las adhesiones focales, y este contacto es seguido del desensamblaje de éstas últimas (Ver figura 37B), lo cual sugiere que los endosomas pueden estar involucrados en la iniciación del desensamblaje de las adhesiones focales.

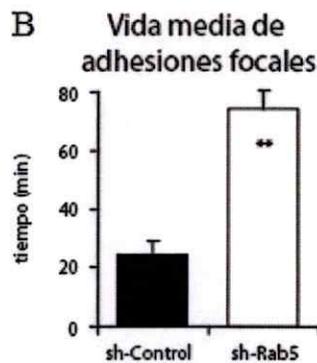
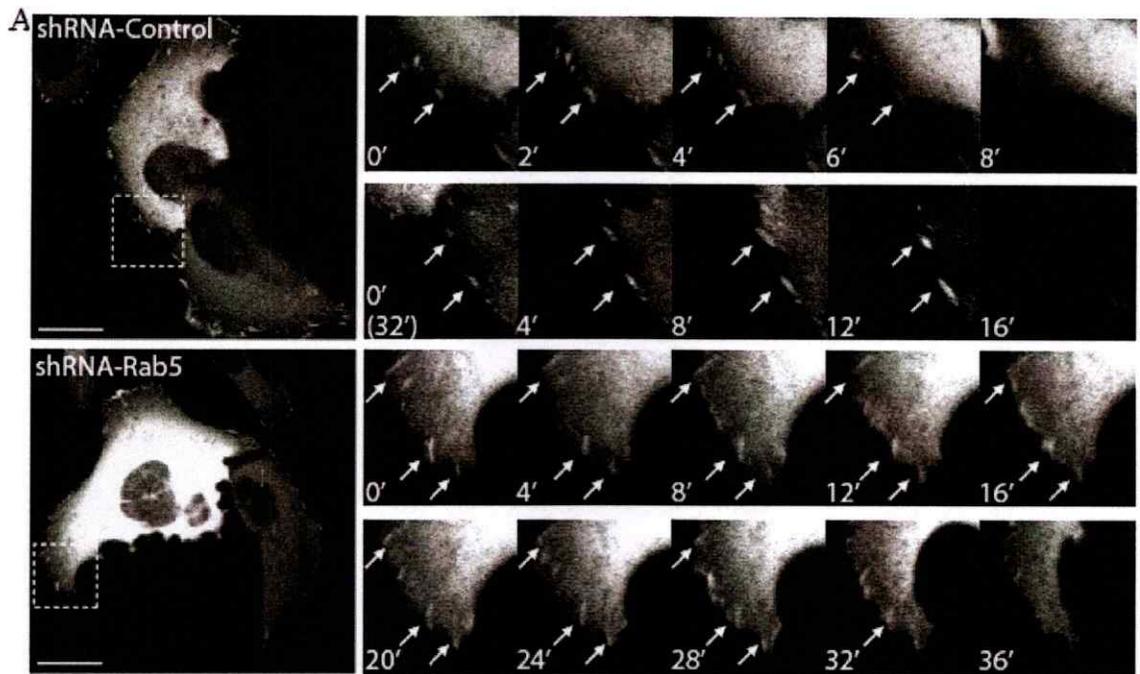


FIGURA 36. Análisis mediante Videomicroscopía demuestra que el silenciamiento de Rab5 retarda la dinámica de desensamblaje de adhesiones focales.

A) Las células MDA-MB-231 fueron cultivadas en placas con fondo de vidrio, transfectadas con mCherry-Paxilina durante 24 horas y sometidas a un pulso de suero para promover el desensamblaje de las adhesiones focales y mediante videomicroscopía se siguió el desensamblaje de los complejos durante 60 minutos. Los paneles mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. B) El gráfico muestra una cuantificación de la vida media de las adhesiones focales observadas en ambas condiciones durante las videomicroscopías.

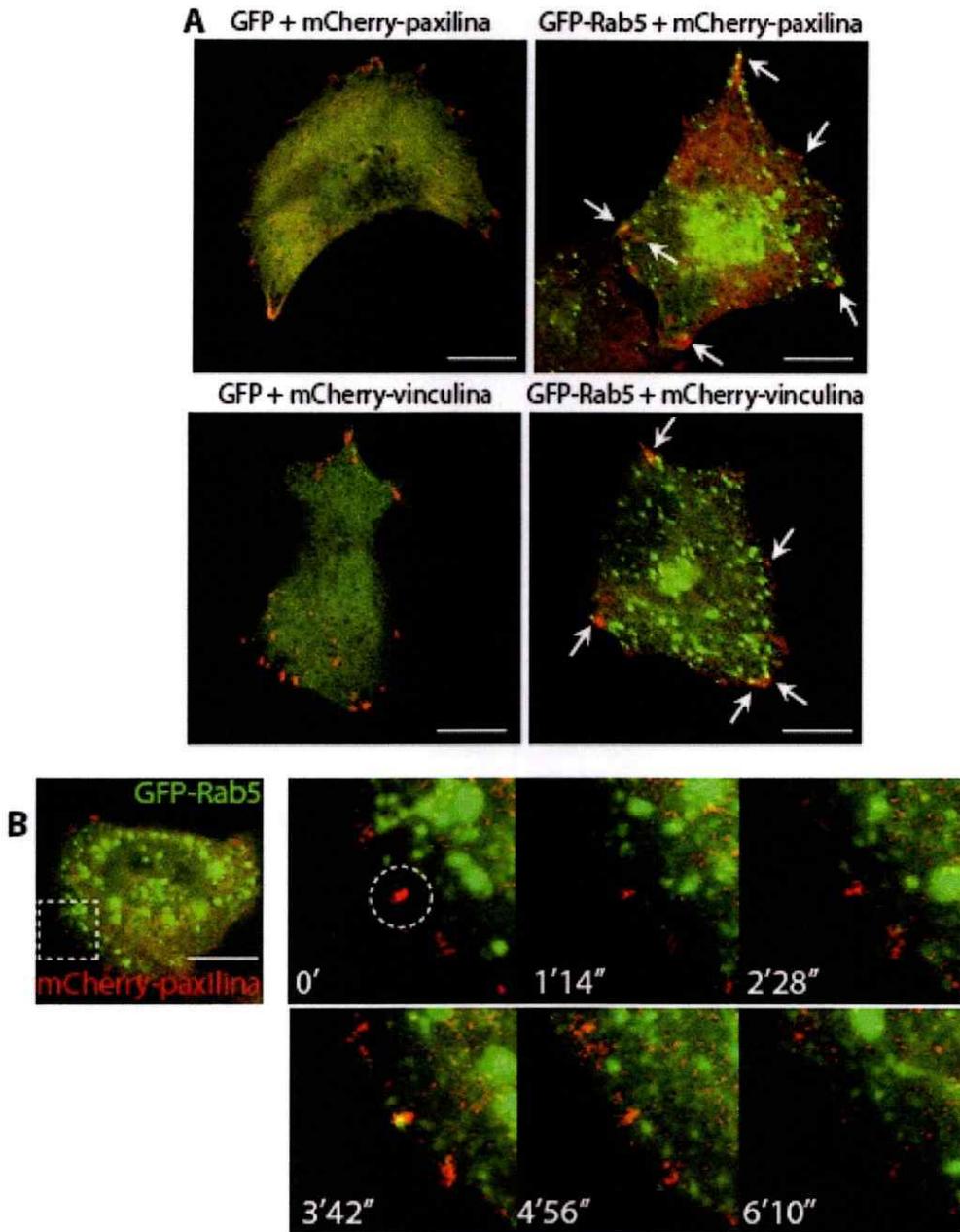


FIGURA 37. Análisis mediante Videomicroscopía demuestra que Rab5 se asocia transitoriamente con componentes de adhesiones focales y que esta interacción precede el desensamblaje de adhesiones focales.

A) Las células MDA-MB-231 fueron co-transfectadas con plasmidios que codificaban las proteínas indicadas y fijadas sobre cubreobjetos de vidrio. Posteriormente se analizó mediante microscopía confocal la localización subcelular de GFP-Rab5 y los componentes de adhesiones focales paxilina y vinculina. B) Las células MDA-MB-231 fueron co-transfectadas con GFP-Rab5 y mCherry Paxilina durante 24 horas sobre placas con fondo de vidrio, y luego analizadas mediante videomicroscopía, siguiendo el desensamblaje de los complejos de adhesión focal y la localización endosomal de GFP-Rab5.

LA ACTIVIDAD DE RAB5 ES REQUERIDA PARA EL RECAMBIO DE ADHESIONES FOCALES.

Utilizando el modelo de desensamblaje de adhesiones focales mediado por microtúbulos, se analizó el efecto de la re-expresión de Rab5 canina (como proteína de fusión con GFP) en células A549 tratadas con el shRNA-Rab5/B5. Se observó que las células que sólo re-expresaron GFP no fueron capaces de desensamblar cuantitativamente sus adhesiones focales después de 15 minutos de lavado del nocodazol, mientras que aquellas células con su Rab5 endógena silenciada, pero expresando GFP-Rab5 funcional, desensamblaron completamente sus adhesiones a los 15 minutos de lavado de la droga. Sin embargo, la expresión del mutante inactivable S34N no fue suficiente para promover el desensamblaje de las adhesiones focales, indicando el requerimiento de la actividad de Rab5 en la regulación del recambio de adhesiones focales (Ver Figura 38).

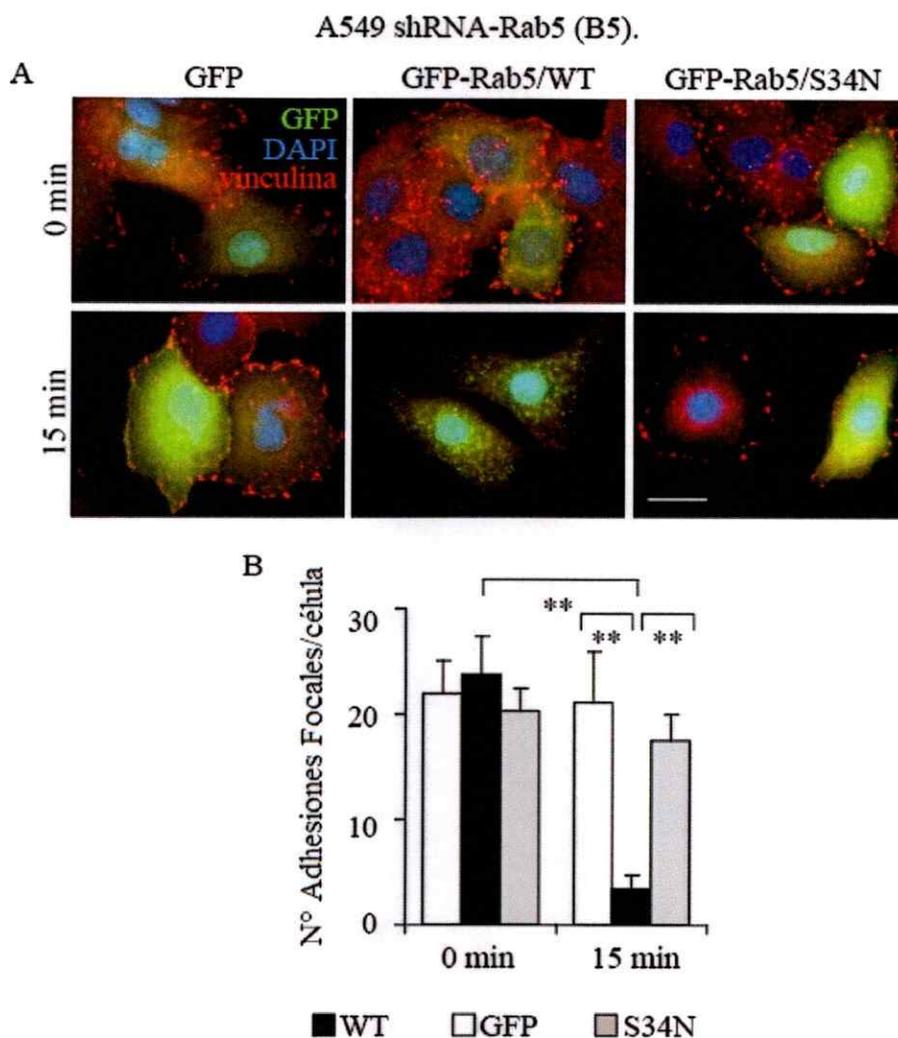


FIGURA 38. La reincorporación de Rab5 funcional recupera la capacidad de desensamblaje de adhesiones focales inducido por nocodazol. **A.** Las células A549/shRNA-Rab5 (B5) fueron transfectadas con el vector pEGFP-C1 codificando la proteína de fusión GFP-Rab5 resistente a shRNA en las variedades funcional (*wild type*, WT) y la variedad mutante dominante negativo S34N. Luego, las células fueron cultivadas en cubreobjetos de vidrio, privadas de factores de crecimiento durante 12 horas antes del experimento y tratadas con nocodazol a concentración de 10 μ M en medio libre de suero por 4 horas. El nocodazol fue retirado mediante lavado y las células fueron incubadas a 37°C durante 15 minutos, permitiendo el desensamblaje coordinado de las adhesiones focales. Posteriormente, las células fueron fijadas y preparadas para inmunofluorescencia y analizadas mediante microscopía confocal. La barra representa 10 μ m. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes. **B.** Cuantificación del recambio de adhesiones focales en las imágenes analizadas mediante microscopía confocal. La expresión de GFP no produce cambios en el desensamblaje de adhesiones focales mediado por microtúbulos, mientras que la expresión de GFP-Rab5 recupera completamente la capacidad de recambio de adhesiones focales. En tanto, la expresión de la mutante no funcional GFP-Rab5 (S34N) no es capaz de recuperar este fenotipo. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (** $p < 0,01$).

DISCUSIÓN

Este trabajo reúne una serie de experimentos que en su conjunto proveen evidencia molecular que confirma la dependencia de la migración celular tumoral del tráfico endocítico. Específicamente, se estudió el rol que cumple la GTPasa pequeña Rab5 en el recambio de adhesiones focales, proceso dinámico subyacente a la migración celular. Los antecedentes que existen en la literatura sugieren la participación directa de la maquinaria endocítica en este proceso; sin embargo, los mecanismos que regulan el proceso de recambio de adhesiones célula-matriz involucrado en la migración e invasión tumoral permanecen pobremente estudiados. En este aspecto, este trabajo vincula a Rab5 como interruptor molecular en la cinética de recambio de adhesiones focales.

Es aceptado que las integrinas se internalizan a través de la endocitosis mediada por clatrina (Pellinen, Arjonen et al. 2006), vía regulada por miembros de la familia de GTPasas Rab, y es posible que la interacción directa entre miembros de ésta familia y las subunidades α de las integrinas (Pellinen, Arjonen et al. 2006) sea responsable del recambio continuo y dinámico de éstos receptores de adhesión desde la membrana plasmática hacia compartimentos vesiculares intracelulares, y su reciclaje de vuelta a la membrana plasmática (Caswell and Norman 2006). Incluso se enfatiza la relevancia de un flujo circulante de integrinas más que un nivel constante en la perifería celular como coordinador de la migración celular, y se sugiere la importancia de la mantención de una fracción internalizada de integrinas, presente en compartimentos endosomales, que pueden ser recicladas para crear nuevas adhesiones en el frente de avance (Teckchandani, Toida et al. 2009).

En este contexto, recientemente Rab5 ha sido identificado como un regulador crítico de la migración celular en células de neuroblastoma (Torres, Mielgo et al. 2010), y nuevos reportes convergen en apuntar a esta proteína como un regulador crucial de la motilidad característica de células transformadas (Torres and Stupack 2011), (Liu, Chen et al. 2011). Sin embargo, el mecanismo por el cual Rab5 ejerce estos efectos permanece pobremente estudiado. Dado que Rab5 ha sido identificado como regulador de movimiento vesicular vía interacciones con microtúbulos, existen estudios acerca del requerimiento de Rab5 para la motilidad de endosomas y la distribución intracelular de endosomas tempranos (Nielsen, Severin et al. 1999). Esta función como coordinador de la destinación de la carga internalizada, alza la interrogante sobre un posible requerimiento de Rab5 para el recambio sincronizado y reposicionamiento de las adhesiones celulares implicadas en la migración celular tumoral. Pero a pesar de la evidencia mostrando asociación Rab5-Integrinas (Pellinen, Arjonen et al. 2006) y Rab5-Microtúbulos (Nielsen, Severin et al. 1999), aún no se han relacionado ambos fenómenos. La participación de Rab5 en el recambio de integrinas y el mantenimiento de una fracción móvil sujeta a reciclaje ha sido estudiada en un modelo *in-vivo*: la unión miotendinosa de la mosca, las cuales consisten en placas de adhesiones basadas en integrinas que sufren remodelamiento dinámico a través del desarrollo del organismo. Experimentos de FRAP mostraron que las fracciones móviles de integrinas y componentes de adhesiones focales son reguladas por Rab5 de manera dependiente de su actividad, enfatizando la importancia de una delicada regulación de la actividad de Rab5 para la mantención de un anclaje apropiado, y que el recambio modulado de

integrinas provee la flexibilidad que permite el remodelamiento tisular durante el desarrollo (Yuan, Fairchild et al. 2010).

Estos antecedentes establecen un vínculo entre el tráfico endocítico coordinado por Rab5 y la migración celular, y el presente trabajo intenta develar el mecanismo por el cual Rab5 promueve la migración, especialmente de células tumorales metastásicas. Los resultados más relevantes de este trabajo muestran que Rab5 se activa de manera generalizada durante la migración celular, aumentando en su forma activa, a medida que una monocapa de células rasgadas cierran una multiherida, y también a medida que las células se anclan y expanden su superficie sobre matriz extracelular. Sin embargo, a pesar de que la migración celular prosigue, este estímulo pierde sincronía y comienza a disminuir el nivel máximo de activación de Rab5. Esto sugiere que el estímulo promigratorio induce la activación de Rab5, la cual participa en el proceso de migración, pero su activación generalizada es transitoria y probablemente sólo es requerida en la etapa inicial del proceso de migración. Mediante la expresión ectópica de la proteína de fusión mCherry-R5BD, que se une específicamente a la forma de Rab5 unida a GTP, determinamos que una fracción importante de Rab5 activa se encuentra en la periferia celular a medida que procede la migración y el *spreading*. Esto sugiere que Rab5 participa en la endocitosis de integrinas, receptores de adhesión a la matriz extracelular presentes en la membrana plasmática. En este sentido, Rab5 podría asistir la internalización de las integrinas que forman las adhesiones en el extremo posterior con respecto al frente de migración (Jones et al. 2006). Así también, Rab5 permitiría una mayor plasticidad en la formación de adhesiones nacientes, promoviendo la endocitosis

de aquellas integrinas que fueron parte de un proceso de adhesión abortiva que no maduró, permaneciendo así en la periferia y quedando inhabilitadas para formar nuevas adhesiones (Caswell, et al. 2009). De esta forma, la endocitosis promovida por Rab5 aumentaría el reservorio disponible en tráfico que puede ser reciclado de vuelta a la membrana para formar adhesiones estables, de acuerdo a lo sugerido previamente (Arjonen, et al. 2012).

Para confirmar el requerimiento de Rab5 en la migración de las líneas celulares tumorales analizadas, se realizó el silenciamiento de Rab5 endógena mediante shRNA dirigido contra Rab5, el cual redujo en un 70% el nivel original endógeno de Rab5 total, mientras que la forma activa cayó a un nivel menor al 20% con respecto a la línea control en estado estacionario. El nivel residual de Rab5 en su forma activa fue apenas detectable y no coincidió con el 70% de reducción en su nivel total, lo cual sugiere que la cantidad de la forma activa puede estar regulada por un circuito de retroalimentación positiva (Del Conte-Zerial et al., 2008), en donde se requiere un nivel mínimo de la forma activa para el reclutamiento de las proteínas intercambiadores de nucleótidos de guanosina (GEF). Estas GEF activarían a su vez al reservorio de Rab5 inactivo del entorno local. Se ha descrito que Rab5 se autoregula por medio de circuitos de retroalimentación positiva, donde la forma activa es capaz de reclutar a su propio intercambiador de nucleótidos de guanosina, aumentando el recambio de nucleótidos en el entorno local. Esto resulta en una activación generalizada de Rab5 y la endocitosis rápida de componentes de membrana (Del Conte-Zerial et al., 2008). De esta manera, el nivel de Rab5 activo sería responsable de la disponibilidad local de los intercambiadores

de nucleótidos en un delicado equilibrio. Situando este mecanismo regulatorio en el contexto de la migración, un estímulo pro-migratorio podría promover el reclutamiento de GEFs (o alternativamente el secuestro de GAPs) aumentando así la activación de Rab5 de manera local, rápida y sincronizada en respuesta a un estímulo (Lanzetti, L. et al. 2004). En el caso de las células shRNA-Rab5, la disminución en el contenido de Rab5 endógena significaría una baja activación de esta misma, haciendo que el estímulo pro-migratorio fuese menos efectivo en la activación sincronizada y local de Rab5, al carecer de GEFs disponibles en su entorno local.

Se observó que las células depletadas de Rab5 endógena presentaban un 50% de reducción en la trans migración con respecto a un shRNA control, y un amplio retardo en la cinética de *spreading*, lo cual confirma nuestra hipótesis de endocitosis de complejos de adhesión mediante la activación periférica de Rab5. Además, este silenciamiento redujo la invasión de estas células en matrigel a un nivel menor al 50% comparado con las células que expresaban el shRNA-control, sugiriendo una participación de Rab5 en procesos de migración tridimensional y remodelamiento de la matriz extracelular. Estos procesos están involucrados en la invasión tumoral y en el establecimiento de un nicho secundario dentro del proceso secuencial de la cascada metastásica. Por otra parte, los ensayos de reincorporación de Rab5 en las células silenciadas mostraron que el retardo en la migración celular puede ser revertido al re-expresar Rab5 funcional, pero la re-expresión de la variedad inactivable S34N no produce la recuperación del fenotipo, observándose en esta última condición una migración similar a la condición en donde se había silenciado Rab5, confirmando la hipótesis de que la activación de esta GTPasa es

un evento fundamental en la migración de las células tumorales. Esta fuerte dependencia entre la activación de Rab5 y la migración celular sugiere que existe un acoplamiento entre la función de Rab5 y los procesos requeridos para la migración. Dada la función de Rab5, como coordinador maestro del tráfico endocítico (Zerial and McBride, 2001), se estudió el proceso de tráfico de componentes de adhesión célula-matriz, específicamente la dependencia entre la activación de Rab5 y el recambio de adhesiones focales.

Durante el proceso dinámico de posicionamiento y reciclaje de focos de adhesión se ha propuesto al tráfico endocítico como regulador crítico (Caswell and Norman, 2006) (Pellinen and Ivaska, 2006), identificándose diversos componentes de la endocitosis mediada por clatrina como elementos cruciales en este proceso (como por ejemplo Dab2, Dinamina y AP2 (Ezratty, et al. 2005), (Chao and Kunz, 2009)). Sin embargo aún se desconoce la regulación de este proceso y en este contexto este trabajo provee evidencia de que Rab5 funciona como un regulador dinámico del proceso. En experimentos de fraccionamiento de adhesiones focales y de inmunoprecipitación durante el cierre de multiherida, observamos que existe un grado de formación de complejo entre Rab5 y los componentes de adhesiones focales, como la integrina $\beta 1$ y paxilina, elementos esenciales de la adhesión focal, y además observamos que esta asociación aumenta a medida que las células realizan migración coordinada, perdiéndose esta asociación a medida que el estímulo pierde sincronía con el paso del tiempo. Aún así, la presencia de un complejo que contiene componentes estructurales de adhesiones focales y Rab5, nos lleva a pensar que el desensamblaje de las adhesiones focales es parcial, y las integrinas podrían ser internalizadas en endosomas manteniendo una

interacción con paxilina. Estos endosomas podrían ser luego destinados a rutas de reciclaje de vuelta a la membrana plasmática donde se formarían nuevas adhesiones, contribuyendo así al proceso global de migración. Además, los experimentos de tinción fluorescente de componentes de las adhesiones focales mostraron un ligero grado de co-localización de éstas con Rab5 en estado estacionario, y un aumento de esta co-localización luego de un estímulo pro-migratorio, tanto en sitios de adhesión como en vesículas internalizadas. Esto refuerza la idea de la internalización de los componentes de las adhesiones focales desensambladas parcialmente. En base a estos hallazgos, proponemos el modelo descrito en la Figura 39.

Finalmente, el análisis de la cinética de desensamblaje de adhesiones focales y el estado de fosforilación de FAK, entregó evidencia concluyente que sitúa a Rab5 como regulador clave del recambio de adhesiones focales y la consecuente migración celular. Esto porque el retardo en la migración celular observado en ausencia de Rab5 sólo fue recuperado al re-expresar una versión funcional, mientras que la reincorporación de Rab5 inactivable fue ineficaz en recuperar el fenotipo de desensamblaje rápido de adhesiones focales sincronizadas. De esta forma se concluye que, la activación de Rab5 juega un papel fundamental en la migración celular al promover el recambio de adhesiones focales.

A Célula migratoria polarizada.

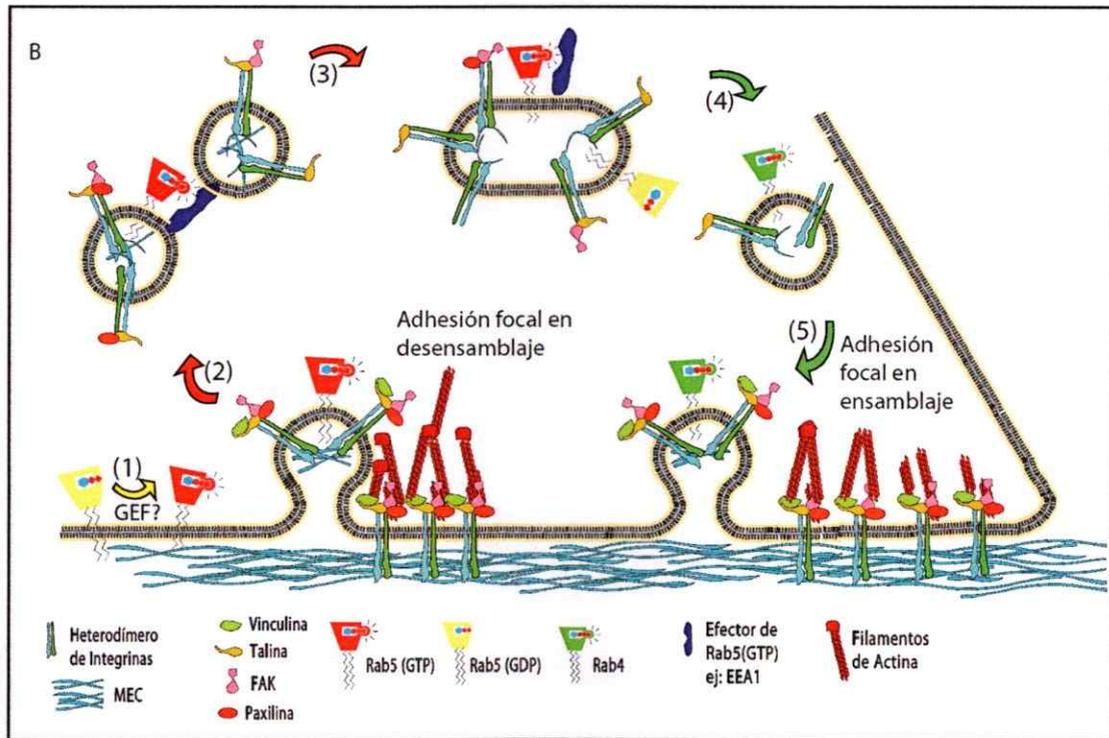
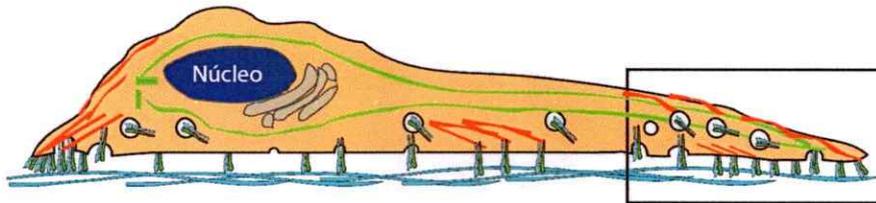


Figura 39. Modelo de desensamblaje de adhesiones focales promovido por Rab5(GTP).

La actividad de Rab5 en el frente de adhesión puede estar contribuyendo a la internalización dinámica de complejos de integrinas, generando una fracción de endosomas conteniendo integrinas disponibles para nuevos procesos de adhesión y migración. (A) Las células migratorias exhiben características morfológicas como polarización que involucra reposicionamiento del aparato de Golgi y centros organizadores de microtúbulos, además de la formación de protrusiones en el frente de migración (B), en donde las integrinas están en continuo transito y reciclaje. (1) La activación de Rab5 (intercambio de GDP por GTP) es promovida en la periferia celular luego de un estímulo migratorio, (2) produciendo el reclutamiento de efectores y la internalización de complejos Integrina-Matriz Extracelular en vesículas que se fusionan (3) formando endosomas tempranos, los cuales circulan a través de rutas endocíticas, conteniendo una fracción móvil de Integrinas, que pueden ser recicladas rápidamente de vuelta a la membrana plasmática (4), formando nuevas adhesiones en el frente delantero (5).

CONCLUSIONES

1. En células inducidas a migrar, o a reiniciar el programa de adhesión a la matriz extracelular, se produce una activación de Rab5 coordinada espacio-temporalmente, y concomitante con el remodelamiento de los complejos de adhesión célula-matriz, denominados adhesiones focales.
2. Rab5 es indispensable para la migración y el *spreading*, aunque no se requiere para el anclaje de las integrinas a la matriz extracelular.
3. Rab5 se asocia con componentes de adhesiones focales en células inducidas a migrar, tanto en la periferia celular como en vesículas internalizadas.
4. La actividad (carga de GTP) de Rab5 es indispensable en promover el recambio de adhesiones focales, lo cual involucra la participación de Rab5 como interruptor molecular en la coordinación de la migración celular, poniendo en evidencia un nuevo blanco farmacológico que puede ser usado en la generación de terapias de prevención de la metástasis.
5. En conjunto, estos resultados sugieren un importante rol regulatorio de Rab5 sobre la migración celular, enfatizando la estrecha relación entre la desregulación del tráfico intracelular y los mecanismos migratorios de las células tumorales, especialmente, células con alto potencial metastásico.

BIBLIOGRAFÍA

Aplin, A., Howe, A., Alahari, S., and Juliano, R. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacological reviews* 50, 197-263.

Arjonen, A., J. Alanko, et al. (2012). "Distinct recycling of active and inactive $\beta 1$ integrins." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 13(4): 610-625.

Berx, G., and van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1.

Bos, J., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865-877.

Bucci, C., Parton, R., Mather, I., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., and Zerial, M. (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70, 715-728.

Burrige, K. (2005). Foot in mouth: do focal adhesions disassemble by endocytosis? *Nature cell biology* 7, 545-547.

Burrige, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., and Turner, C. (1988). Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annual review of cell biology* 4, 487-525.

Caswell, P., and Norman, J. (2006). Integrin trafficking and the control of cell migration. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 7, 14-21.

Caswell, P., and Norman, J. (2008). Endocytic transport of integrins during cell migration and invasion. *Trends in cell biology* 18, 257-263.

- Caswell, P., S. Vadrevu, et al. (2009). "Integrins: masters and slaves of endocytic transport." *Nature reviews. Molecular cell biology* 10(12): 843-853.
- Cavallaro, U., and Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature reviews cancer* 4, 118-132.
- Critchley, D. (2000). Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Current opinion in cell biology* 12, 133-139.
- Cukierman, E., Pankov, R., and Yamada, K. (2002). Cell interactions with three-dimensional matrices. *Current opinion in cell biology* 14, 633-639.
- Chan, K., Cortesio, C., and Huttenlocher, A. (2009). FAK alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. *Journal of cell biology* 185, 357-370.
- Chao, W.-T., and Kunz, J. (2009). Focal adhesion disassembly requires clathrin-dependent endocytosis of integrins. *FEBS letters* 583, 1337-1343.
- Del Conte-Zerial, P., Bruschi, L., Rink, J., Collinet, C., Kalaidzidis, Y., Zerial, M., and Deutsch, A. (2008). Membrane identity and GTPase cascades regulated by toggle and cut-out switches. *Molecular systems biology* 4, 206.
- Ezratty, E., Partridge, M., and Gundersen, G. (2005). Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nature cell biology* 7, 581-590.
- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer* 127, 2893-2917.

Folkman, J. (1985). Tumor angiogenesis. *Advances in cancer research* 43, 175-203.

Gupta, G., and Massagué, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679-695.

Hanahan, D., and Weinberg, R. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hanahan, D., and Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Hood, J., and Cheresh, D. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature reviews cancer* 2, 91-100.

Hynes, R. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.

Jiang, Y., Cui, L., Yie, T., Rom, W., Cheng, H., and Tchou-Wong, K. (2001). Inhibition of anchorage-independent growth and lung metastasis of A549 lung carcinoma cells by IkappaBbeta. *Oncogene* 20, 2254-2263.

Jones, M., P. Caswell, et al. (2006). "Endocytic recycling pathways: emerging regulators of cell migration." *Current opinion in cell biology* 18(5): 549-557.

Lanzetti, L., A. Palamidessi, et al. (2004). "Rab5 is a signalling GTPase involved in actin remodelling by receptor tyrosine kinases." *Nature* 429(6989): 309-314.

Liotta, L., and Clair, T. (2000). Cancer. Checkpoint for invasion. *Nature* 405, 287-288.

Liotta, L., and Kohn, E. (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411, 375-379.

Maltese, W., Wilson, A., and Erdman, R. (1996). Prenylation-dependent interaction of Rab proteins with GDP dissociation inhibitors. *Biochemical society transactions* 24,

703-708.

McDonald, J. (1988). Extracellular matrix assembly. *Annual review of cell biology* 4, 183-207.

Muthuswamy, S., and Xue, B. (2012). Cell polarity as a regulator of cancer cell behavior plasticity. *Annual review of cell and developmental biology* 28, 599-625.

Nowell, P. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (New York, NY)* 194, 23-28.

Palamidessi, A., Frittoli, E., Garré, M., Faretta, M., Mione, M., Testa, I., Diaspro, A., Lanzetti, L., Scita, G., and Di Fiore, P. (2008). Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell* 134, 135-147.

Pellinen, T., and Ivaska, J. (2006). Integrin traffic. *Journal of cell science*.119 (Pt 18): 3723-3731.

Petit, V., and Thiery, J. (2000). Focal adhesions: structure and dynamics. *Biology of the cell* 92, 477-494.

Pfeffer, S., and Aivazian, D. (2004). Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nature reviews molecular cell biology* 5, 886-896.

Ridley, A., Schwartz, M., Burridge, K., Firtel, R., Ginsberg, M., Borisy, G., Parsons, J., and Horwitz, A. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science (New York, NY)* 302, 1704-1709.

Sivars, U., Aivazian, D., and Pfeffer, S. (2003). Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature* 425, 856-859.

Sporn, M. (1996). The war on cancer. *Lancet* 347, 1377-1381.

- Stenmark, H., Parton, R., Steele-Mortimer, O., Lütcke, A., Gruenberg, J., and Zerial, M. (1994). Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *The EMBO journal* *13*, 1287-1296.
- Talmadge, J., and Fidler, I. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research* *70*, 5649-5669.
- Tomar, A., and Schlaepfer, D. (2009). Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. *Current opinion in cell biology* *21*, 676-683.
- Torres, V., A. Mielgo, et al. (2008). "Caspase 8 promotes peripheral localization and activation of Rab5." *Journal of biological chemistry* *283*(52): 36280-36289.
- Torres, V., Mielgo, A., Barbero, S., Hsiao, R., Wilkins, J., and Stupack, D. (2010). Rab5 mediates caspase-8-promoted cell motility and metastasis. *Molecular biology of the cell* *21*, 369-376.
- Torres, V., and Stupack, D. (2011). Rab5 in the regulation of cell motility and invasion. *Current protein & peptide science* *12*, 43-51.
- Vitale, G., Rybin, V., Christoforidis, S., Thornqvist, P., McCaffrey, M., Stenmark, H., and Zerial, M. (1998). Distinct Rab-binding domains mediate the interaction of Rabaptin-5 with GTP-bound Rab4 and Rab5. *The EMBO journal* *17*, 1941-1951.
- Yamaguchi, H., Wyckoff, J., and Condeelis, J. (2005). Cell migration in tumors. *Current opinion in cell biology* *17*, 559-564.
- Yang, J., and Weinberg, R. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental cell* *14*, 818-829.
- Zallen, J. (2007). Planar polarity and tissue morphogenesis. *Cell* *129*, 1051-1063.

Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews Molecular cell biology* 2, 107-117.

Zerial, M., and Stenmark, H. (1993). Rab GTPases in vesicular transport. *Current opinion in cell biology* 5, 613-620.