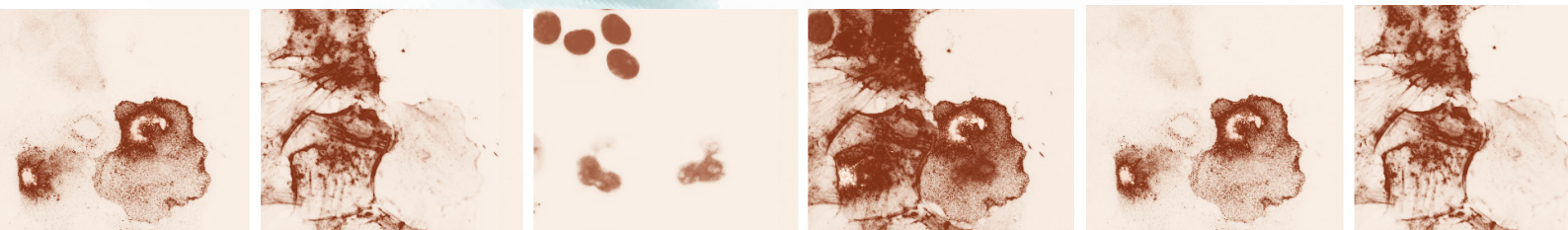




# Regulación de la morfología nuclear por las GTPasas Rho

Paula Colón Bolea  
Santander 2015



Universidad de Cantabria  
Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC)







**UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**  
**INSTITUTO DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA DE CANTABRIA**  
**(IBBTEC)**



# **Regulación de la morfología nuclear por las GTPasas Rho**

Tesis doctoral presentada por  
Paula Colón Bolea  
para optar al Grado de Doctor por la  
Universidad de Cantabria  
Mayo 2015



El Dr. PIERO CRESPO BARAJA, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC) asociado al Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria y Tutor de esta Tesis

CERTIFICA:

Que Paula Colón Bolea ha realizado bajo su dirección el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado:

## **Regulación de la morfología nuclear por las GTPasas Rho**

Que considera que dicho trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado al objeto de poder optar al grado de Doctor en Bioquímica.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expide el presente certificado en Santander, en Mayo de 2015.

Fdo. Piero Crespo



Esta Tesis ha sido realizada en el  
Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC)  
y el Departamento de Biología Molecular de la Facultad de  
Medicina de la Universidad de Cantabria (Santander)

La autora de esta Tesis ha disfrutado de una beca de Formación  
de Personal Investigador (FPI) y de un contrato por el CSIC  
durante la realización de la misma





# Agradecimientos

Es tanto el tiempo que lleva sacar una tesis adelante, que la lista de agradecimientos es larga, cada vez más, y el momento de pararte a pensar y echar la vista atrás para enumerar a todas las personas que de alguna manera han contribuido a esto es un momento lleno de alegría, pero también un tanto melancólico y difícil.

Por supuesto empezar dando las gracias a mi director de Tesis, al Dr. Piero Crespo por darme la oportunidad de empezar mi vida científica en su laboratorio y por enseñarme a llevar varios proyectos muy dispares a la vez. Según uno de sus lemas favoritos, "cortando cojones, se aprende a capar", y razón no te falta, Piero, gracias.

A continuación me gustaría agradecer a los laboratorios del doctor Xosé Bustelo, de la doctora Sanz-Moreno y de la doctora Sue Shackelton todos los vectores que han cedido para la realización de este trabajo.

Y ya me queda meterme de lleno a agradecer a la gente que me rodea en mi día a día. A todo el personal de la facultad y del IBBTEC. Al ala no científica, gracias, porque hacéis posible que mi laboratorio, siendo el caos que es, siga funcionando, a pesar de todo lo que gastamos, todas las facturas que llegan mal y toda la cantidad de basura que generamos. Y por supuesto a todo el personal científico. A todos los laboratorios (de la facultad y del IBBTEC), ya que a lo largo de la tesis ha surgido la necesidad de pedir ayuda o material en todos y en todos he recibido lo que necesitaba muy amablemente. Y no sólo a los laboratorios, también a los técnicos comunes, en especial a Mati, que vaya cómo nos has ayudado a Berta y a mí en el apasionante mundo de las HPLC y a Sandra, que en cuanto llegas al labo pones orden como nunca ha habido, jeje, y la verdad que tu trabajo no tiene precio.

Pero, claramente, los dos laboratorios, además del mío, en los que me he sentido como Pedro por su casa han sido el laboratorio de Bioquímica y el de Inmuno.

A los Bioquímicos, así en general, gracias, empezando por la Dra. Dolores Delgado y el Dr. Javier León, que aceptan nuestra presencia más que habitual en ese labo. A todos los nuevos que acabáis de llegar, fuerza. A los que ya no están, sobre todo a Manuel. Qué decirte, Manu, anda que no ha llovido desde tus sesiones con el logopeda (da qué pensar que me lo creyera, eh! jiji) y el desayuno en Santoña. Siempre has estado ahí para animarme, que anda que no ha hecho falta veces. A Rosa, la omnipresente en bioquímica, siempre dispuesta a ayudar y solucionar problemas. Cortiguera, tú ya estás a puntico de empezar a escribir, así que ánimo. Aunque nos has abandonado en el café y esa no te la perdono... Lu, (y automáticamente en mi cerebro sigue, gatiiiiiaiiiiiiin). Gracias por estar ahí, he recurrido a ti en momentos malos (y buenos, claro) y siempre has ayudado, a veces pecas de buena... Mañica, digo... Doctora Lafita, eres muy grande, la verdad, y siempre es un placer quedar y hablar contigo. Y aunque me da mucha pena que te vayas, ojalá encuentres mañana mismo un próximo destino

Mis vecinos, los inmunos. Qué alegría nos dimos cuando descubrimos que seguiríamos siendo vecinos en el IBBTEC. Qué pena que apenas lo piséis. Dado que hacemos tanto uso del laboratorio, gracias a los jefes, los Dres. Ramón y Jesús Merino. Y claro, Marquitos, te fuiste y vaya hueco has dejado. Me alegro mucho de haber coincidido contigo, gracias por ser como eres. Te echo de menos. Juanje y Pilar, (me han dicho que hay una tal Pilar en ese labo, aunque yo no sé quién es,...) dais mucha vida al labo y me gusta coincidir con vosotros, dentro y fuera del labo. Iván, no sabría si colocarte en el apartado inmuno o en el de mi labo, jaja, ieres ya uno más de los nuestros!

Y por supuesto, a mi laboratorio. Al actual, el que no se derrumba por momentos. Empiezo de mayor a menor. Berti, gracias, porque siempre estás dispuesta a echar un cable, nunca niegas ayuda y creo que nunca te he visto de mal humor. Además, parte de esta tesis es tan tuya como mía, así que muchas gracias. Lore, siempre has estado ahí, desde el minuto uno. Te deseo mucha, muchísima suerte en tu nuevo proyecto.. ;-) Y paciencia, que no te falta nunca, la verdad, pero espero que no se te agote estos días. Gracias, últimamente me he sentido apoyada por ti en momentos difíciles. Iñaky, ay ay, qué larga está siendo tu estancia. Qué alegría das al labo. A ver si vuelves ya, justo para la temporada de la Viga. Vincenzo, te ha abandonado Iñaky a tu suerte entre tanta mujer, estás aguantando como un campeón. A ver si hay suerte y encuentras algo para quedarte, mientras tanto, deja de robar a Marta, jaja. Rocío, ahora mismo me sale desearte que bajes el ritmo y calmes, porque te quedan muchos años por delante y no puedes seguir así, relaja. Y gracias por estar siempre atenta a ayudar en cualquier cosa. Marta, vaya fichaje.. Sigue con esas ganas y ese buen humor. Ayudas mucho al labo con eso. Y claro, todos los no doctores, suerte, mucha suerte en esta etapa. Y me queda agradecer a mi otro labo, al zulo, al que se caía literalmente a cachos. El labo en sí daba pena, pero qué buenos recuerdos guardo del zulo. Chipy, gracias por seguir dando guerra por ahí, jeje. Javi, eres una gran persona, además de tener ese gran sentido del humor. Echo de menos estar poyata con poyata contigo. Y quedar fuera del trabajo. Anica, hemos compartido mucho, dentro y fuera del labo, pero los viajes unen, y nos hemos cruzado el charco dos veces, con eso lo digo todo. Y Pinto, ya sabes que soy mucho de sacar conclusiones, que lo aprendí de ti, como tantas otras cosas. En cualquier caso, he concluido que las ranicas tienen ojos, que no son ciegas. Parece una conclusión muy evidente, pero no lo es tanto.

Me queda agradecer a la gente de Santander que no asocio al laboratorio. Rober, qué alegría me das cuando me dices que subes a Santander, cómo me divierto contigo, y cuando hace falta desahogar, también estás ahí. Irene, cómo molaba la época en que vivíamos puerta con puerta, creo que no lo aprovechamos lo suficiente. En cualquier caso, gracias, nos hicimos un huequito en esta ciudad las dos juntas, eso marca y une. Senda, cómo me alegro de que vinieras a hacer una estancia a Santander, y desde entonces todo lo que hemos compartido, no tengo esa facilidad de expresar las cosas como haces tú, a mí me faltan las palabras bonitas, pero bueno, a veces sobran las palabras. Val, mi gran amigo Val, tanto tú como yo somos un poco desastrosos en eso de mantenernos al día, pero ahí estás, siempre. Gracias.

Y a las que considero mi familia santanderina: Maigüi, Aramburu y Risoto. No sé qué haría sin vosotras. Simplemente por el hecho de saber que estáis ahí, yo me siento mejor. No soy yo muy dada a manifestar emociones, pero bueno, espero que sepáis que sois importantes.

Un breve agradecimiento a quien siempre está ahí. ¿Ana, que sería de mí sin ti? Paulana hasta el final. Sarah, siempre presente, tú y tus tesoritos me ayudáis mucho. A mi grupo fafinder, Mayte, Javi y Dani. Sobre todo a Mayte, que nunca fallas, siempre ahí desde el tercer vagón de cercanías.. eso y que parte de esta tesis es tuya, la más vistosa, la portada. En cualquier caso, este último año mis quedadas con vosotros tres me han dado mucha energía, a ver para cuándo la próxima. No se me ocurre mejor manera de celebrar la Tesis que yéndome de Fahrt. Sarah, siéntete incluida. Horrido! jaja..

Y ya, finalmente, a los más importantes, a mi familia. Papá y Mamá, sé que no habéis entendido demasiado bien que la tesis me haya llevado tanto, pero gracias por no preguntar y respetarme y respaldarme. Y a los demás, a todos, desde Juan hasta Ulises, que a ver si llega. Sois mi faro, mi Norte. Sé que tengo un apoyo incondicional en vosotros. Es un privilegio y una suerte increíble contar con vosotros. Os quiero.

¡¡¡GRACIAS!!!



## i. Abreviaturas y Acrónimos



<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AMT</b>	Transición ameboide-mesenquimal
<b>Arg (A)</b>	Arginina
<b>Arp2/3</b>	<i>Actin-related proteins</i>
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>Bleb</b>	Blebistatina
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>CAAX</b>	Secuencia de aminoácidos: Cisteína-Alifático-Alifático- Cualquiera
<b>CAM</b>	Membrana corioalantoidea
<b>cAMP</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>CDK</b>	<i>Cycline dependent kinase</i> o quinasa dependiente de ciclinas
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>CRIB</b>	<i>Cdc42/Rac-interactive binding region</i> (Región de unión a Rac y Cdc42)
<b>C-terminal</b>	Carboxilo-terminal
<b>Cys (C)</b>	Cisteína
<b>Cit D</b>	Citocalasina D
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol
<b>DMEM</b>	Medio esencial mínimo de Eagle, modificado por Dulbecco/Vogt
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>ECL</b>	Quimioluminiscencia ampliada
<b>EDTA</b>	N´N´N´N´-Etilen-diamino tetra- acetato disódico
<b>EGTA</b>	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
<b>EMT</b>	Transición epitelio mesénquima
<b>ERK</b>	<i>Extracellular regulated kinase</i>
<b>F-actina</b>	Filamentos de actina
<b>G418</b>	Geneticina
<b>G-actina</b>	Monómeros de actina
<b>GAP</b>	Proteínas activadoras de la actividad GTPasa
<b>GDP</b>	Nucleótido bifosfato de guanina
<b>GEF</b>	Factor de intercambio de nucleótidos



<b>GFP</b>	<i>Green fluorescent protein</i> (proteína verde fluorescente)
<b>Gln (Q)</b>	Glutamina
<b>Glu (E)</b>	Ácido Glutámico
<b>Gly (G)</b>	Glicina
<b>GRF</b>	<i>Guanine nucleotide releasing factor</i>
<b>GTP</b>	Nucleótido trifosfato de guanina
<b>GTPasa</b>	Proteína con capacidad intrínseca de catalizar la hidrólisis de GTP
<b>HA</b>	Hemaglutinina
<b>His (H)</b>	Histidina
<b>JNK</b>	Quinasa amino-terminal de c-Jun
<b>kb</b>	Kilobase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LB</b>	Medio de Luria-Bertani
<b>Leu (L)</b>	Leucina
<b>LINC</b>	<i>Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton</i> (unión entre el nucleoesqueleto y el citoesqueleto)
<b>M</b>	Molar
<b>mA</b>	mili-Amperios
<b>MAPK</b>	proteína quinasa activada por mitógenos
<b>MAT</b>	Transición mesenquimal-ameboide
<b>min</b>	Minutos
<b>MLC</b>	<i>Myosin light chain</i> (Cadena ligera de miosina)
<b>MNE</b>	Membrana nuclear externa
<b>MNI</b>	Membrana nuclear interna
<b>MTOC</b>	Centro de organización de microtúbulos
<b>N17</b>	Mutantes dominante inhibitorios
<b>Noc</b>	nocodazol
<b>N-terminal</b>	Amino-terminal
<b>NP-40</b>	<i>Nonidet-40</i>
<b>PAK1</b>	<i>p21 activated kinase</i>
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>pb</b>	Par de bases (de nucleótidos)
<b>PBS</b>	Solución salina tamponada de fosfato
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa

<b>Phe (F)</b>	Fenilalanina
<b>PI3K</b>	Fosfatidil-inositol 3 quinasa
<b>PKA</b>	Proteína quinasa dependiente de AMP cíclico
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>Pro (P)</b>	Prolina
<b>PVDF</b>	Polivinildenofluoruro
<b>QL</b>	Formas constitutivamente activas de las RhoGTPasas
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROCK</b>	Proteína quinasa asociada a Rho
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>Ser (S)</b>	Serina
<b>SF</b>	Suero fetal bovino
<b>SRE</b>	Elemento de respuesta a suero
<b>SRF</b>	Factor de respuesta a suero
<b>ST</b>	<i>Starved</i> (privación de suero)
<b>STAT3</b>	<i>Signal transducer and activator transcription 3</i>
<b>TAE</b>	<i>Tris-acetate-EDTA</i>
<b>TBS-T</b>	Salino tamponado con Tris-Tween
<b>Thr (T)</b>	Treonina
<b>Tm</b>	Temperatura <i>melting</i> o unión de oligonucleotidos
<b>Tyr (Y)</b>	Tirosina
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>Val</b>	Valina
<b>WASP</b>	Proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich
<b>WAVE</b>	<i>WASP-family verprolin-homologous protein</i>
<b>WB</b>	<i>Western blot</i>
<b>wt</b>	<i>Wild type</i> o forma salvaje de una proteína



## ii. Índice



I. Introducción.....	1
I.1 Superfamilia de GTPasas Ras.....	3
I.1.1 Definición.....	3
I.1.2 Estructura general.....	4
I.1.3 Ciclo de activación GDP-GTP.....	5
I.1.4 Familia Arf.....	7
I.1.5 Familia Rab.....	7
I.1.6 Familia Ras.....	8
I.1.7 Familia Ran.....	8
I.2 Familia de GTPasas Rho.....	10
I.2.1 Clasificación de las GTPasas Rho.....	10
I.2.2 Regulación de GTPasas Rho por RhoGDI.....	11
I.3 Funciones de las RhoGTPasas Rac1, RhoA Y Cdc42.....	14
I.3.1 Funciones bioquímicas de las GTPasas Rho.....	14
I.3.1.1 Regulación de actividades enzimáticas.....	14
I.3.1.2 Regulación de la expresión génica.....	15
I.3.1.3 Regulación del citoesqueleto: filamentos de actina.....	16
I.3.1.4 Regulación del citoesqueleto: microtúbulos.....	19
I.3.2 Funciones biológicas de las GTPasas Rho.....	22
I.3.2.1 Regulación del ciclo celular.....	22
I.3.2.2 Regulación de uniones adherentes.....	25
I.3.2.3 Regulación de la polaridad celular.....	26
I.3.2.4 Regulación de la migración celular.....	27
I.3.3 RhoGTPasas en cáncer.....	33
I.4 Conexión núcleo-citoplasma.....	34
I.4.1 Complejo LINC: Proteínas SUN y KASH.....	34
I.4.2 Las laminas.....	37
I.4.3 Emerina.....	38
I.4.4 Pleomorfismo nuclear y cáncer.....	40
II. Objetivos.....	43

III. Materiales y Métodos .....	47
III.1. Análisis y manipulación del ADN.....	49
III.1.1 Purificación de ADN plasmídico.....	49
III.1.2 Purificación de ADN genómico de tejido.....	50
III.1.3 Amplificación de fragmentos de ADN por PCR.....	50
III.1.4 Digestión con endonucleasas de digestión y purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa .....	51
III.1.5 Clonación de ADN en vectores plasmídicos.....	51
III.1.6 Plásmidos .....	52
III.2 Cultivos celulares.....	53
III.2.1 Métodos de transfección .....	53
III.2.2 Obtención de sublíneas estables.....	55
III.2.3 Ensayos de proliferación: Curvas de crecimiento.....	56
III.2.4 Líneas celulares.....	56
III.3 Análisis de proteínas .....	57
III.3.1 Detección de proteínas .....	57
III.3.2 Detección de apoptosis mediante marcaje con Anexina V.....	60
III.3.3 Ensayos de senescencia .....	61
III.3.4 Ensayos luciferasa .....	61
III.3.5 Ensayos de invasión en transwell.....	61
III.4 Modelos de embrión pollo.....	61
III.4.1 Ensayo de metástasis en embrión de pollo.....	61
III.4.2 PCR a tiempo real para la detección de células humanas .....	62
III.4.3 Ensayo de microtumores .....	62
III.5 Análisis informático .....	63
III.5.1 Análisis de los western blot.....	63
III.5.2 Análisis de las inmunofluorescencias .....	63
III.5.3 Gráficas y análisis estadísticos .....	63
III.5.4 Bibliografía.....	63

IV. Resultados .....	65
IV.1 Influencia de las RhoGTPasas sobre el núcleo .....	67
IV.1.1 Análisis en diferentes tipos celulares .....	67
IV.1.2 Análisis en células A375P .....	68
IV.2 Estudio sobre el mecanismo mediante el cual las RhoGTPasas alteran la morfología nuclear .....	73
IV.2.1 La alteración en la morfología nuclear no es debida a la regulación génica por parte de las GTPasas Rho .....	73
IV.2.2 Rac1QL altera la morfología nuclear a través del citoesqueleto de microtúbulos y de la contractilidad de actina miosina .....	77
IV.2.3 Las proteínas SUN y KASH son mediadoras de la regulación de la morfología nuclear por las GTPasas Rho .....	83
IV.2.4 El cambio morfológico del núcleo es un proceso dinámico.....	86
IV.3 Repercusión biológica del cambio morfológico nuclear .....	90
IV.3.1 Las Rho GTPasas no inducen apoptosis .....	90
IV.3.2 Las Rho GTPasas no inducen senescencia.....	91
IV.3.3 El cambio morfológico nuclear no se explica por fallos en el ciclo celular.....	92
IV.3.4 Las GTPasas Rho no afectan a la proliferación.....	95
IV.3.5 Rac1 induce invasión.....	95
IV.4 Análisis in vivo en modelo de embrión aviar.....	96
IV.4.1 Rac1QL promueve intravasación.....	96
IV.4.2 La ruptura del complejo LINC evita la intravasación.....	99
IV.4.3 La ruptura del complejo LINC evita la invasión.....	100
V. Discusión.....	103
V.1 Influencia de las RhoGTPasas sobre el núcleo.....	105
V.2 Mecanismo mediante el cual las GTPasas Rho alteran la morfología nuclear .....	107
V.3 Repercusión biológica del cambio morfológico nuclear .....	113
VI. Conclusiones .....	117
VII. Bibliografía.....	121





### iii. Índice de Figuras y Tablas



## **Introducción**

Figura I.1. Superfamilia de Ras.....	3
Figura I.2. Estructura de las GTPasas.....	4
Figura I.3. Esquema del ciclo de activación/desactivación de las proteínas G.....	6
Figura I.4. Transporte núcleo-citoplasma mediado por Ran.....	9
Figura I.5. Clasificación de las GTPasas Rho.....	10
Figura I.6. Funciones de la proteína RhoGDI.....	13
Figura I.7. Las RhoGTPasas regulan la expresión génica.....	15
Figura I.8. Regulación del citoesqueleto de actina.....	18
Figura I.9. Regulación del citoesqueleto de microtúbulos.....	21
Figura I.10. Papel de las RhoGTPasas en la citocinesis.....	24
Figura I.11. Movimiento mesenquimal frente a ameboide.....	31
Figura I.12. Esquema de la envoltura nuclear.....	38

## **Materiales y Métodos**

Tabla III.1. Plásmidos utilizados.....	51
Tabla III.2. Líneas celulares utilizadas en este trabajo.....	54
Tabla III.3. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas.....	58

## **Resultados**

Figura IV.1. Porcentaje de núcleos afectados en distintas líneas celulares.....	65
Figura IV.2. Clasificación de las morfologías nucleares.....	66
Figura IV.3. Distribución de los tipos nucleares con las RhoGTPasas constitutivamente activas.....	67
Figura IV.4. Distribución de los tipos nucleares con las RhoGTPasas dominantes inhibitorias.....	68
Figura IV.5. Distribución de los tipos de núcleos con el GEF oncoVav2.....	69
Figura IV.6. Efecto de la sobre-expresión de RhoGDI sobre la morfología nuclear.....	70
Figura IV.7. Distribución de núcleos en células IGR-1, células con Rac1P29S.....	71
Figura IV.8. Bloqueo de la regulación génica de las GTPasas Rho mediante la transfección de la proteína RanQL..	72
Figura IV.9.Efecto de las Rho GTPasas sobre la morfología nuclear en presencia de la GTPasa RanQL.	73
Figura IV.10. RacQLSAAX también es capaz de alterar la morfología nuclear.....	74
Figura IV.11. Efecto de la disrupción del citoesqueleto sobre el núcleo.....	76

Figura IV.12. Distribución con mutantes de RacQL para distintos efectores.....	78
Figura IV.13. Distribución de la morfología nuclear en células sobre-expresando PAK1 constitutivamente activo.....	79
Figura IV.14 Fosforilación de MLC por las GTPasas constitutivamente activas.....	79
Figura IV.15. Efecto de Pak sobre la contractilidad actina miosina y sobre los microtúbulos.....	81
Figura IV.16. Distribución de las morfologías nucleares con la ruptura del complejo LINC.....	82
Figura IV.17. Regulación de la expresión de las laminas y de algunos componentes de l complejo LINC por las pequeñas RhoGTPasas.....	84
Figura IV.18. Time-lapse de 3 horas de núcleos sobre-expresando GFP, Rac1QL y Rac1QL con KashDN.....	87
Figura IV.19 Apoptosis inducida por las GTPasas Rho constitutivamente activas.....	89
Figura IV.20. Senescencia inducida por las GTPasas constitutivamente activas.....	89
Figura IV.21. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.....	91
Figura IV.22. Marcaje de $\gamma$ -tubulina en núcleos arriñonados frente a células multinucleadas.....	91
Figura IV.23 Análisis de arresto en G2/M.....	92
Figura IV.24 Curvas de proliferación con Las RhoGTPasas activas.....	93
Figura IV.25 Invasión en transwell de 8 $\mu$ m con matrigel.....	94
Figura IV.26 Tumores en embriones de pollo con las diferentes GTPasas.....	95
Figura IV.27 Sólo las células con RacQL consiguen intravasasr.....	96
Figura IV.28 Las células que sobre-expresan Rac1QL y KASHDN inducen tumores de igual tamaño, pero no consiguen extravasar.....	97
Figura IV.29 Modelo <i>ex ovo</i> .....	98
Figura IV.30 La ruptura del complejo LINC evita la diseminación temprana del tumor inducida por Rac1QL.....	99
<b>Discusión</b>	
Figura V.1. Mecanismo de regulación de la morfología nuclear.....	109





# I. Introducción







## I.1 Superfamilia de GTPasas Ras

### I.1.1 Definición

La superfamilia de GTPasas Ras, también conocidas como proteínas G pequeñas o proteínas G monoméricas, recibe su nombre de las proteínas Ras, ya que fueron éstas las primeras en ser descubiertas. Todas las proteínas de la superfamilia tienen en común su pequeño tamaño (entre 20-29 kDa), su actividad GTPasa intrínseca, su capacidad de unir nucleótidos de guanina y el hecho de tener que estar unidas a membrana para poder realizar su función.

Las proteínas pertenecientes a esta superfamilia actúan como interruptores moleculares que al pasar de su forma inactiva (unida a GDP) a su forma activa (unida a GTP) inician una serie de respuestas biológicas muy variadas como puedan ser la división celular, la apoptosis o motilidad celular entre otras muchas. (Hoshino, Shimizu et al. 2004; Romano, Maccario et al. 2013)(Wu, Frey et al. 2009). Estos procesos son esenciales para la célula y por tanto se encuentran altamente regulados, a pesar de lo cual pueden llegar a desregularse y desencadenar graves patologías entre las que destaca el cáncer. (Barbacid 1987)

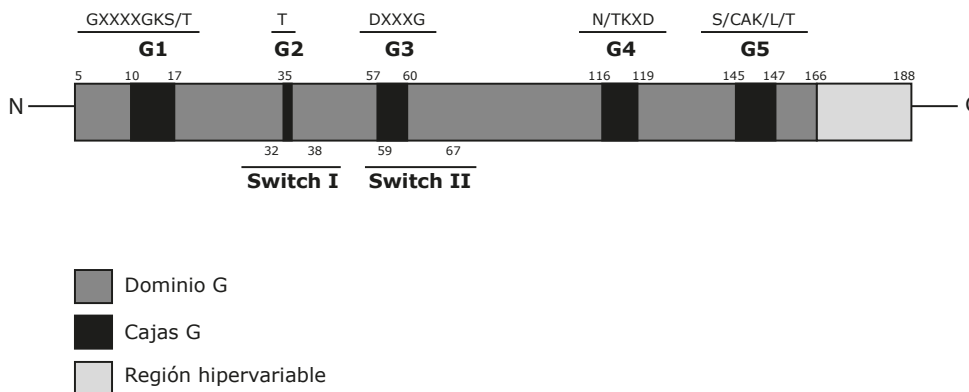
En humanos, la superfamilia Ras comprende más de 150 proteínas divididas en cinco ramas en función de su similitud tanto estructural como funcional. (Colicelli 2004). Son la familia de Arf, de Rab, de Ras, de Ran y de Rho. (Figura I.1).



**Figura I.1. Superfamilia de Ras.** Esquema de las cinco familias en las que se subdivide la superfamilia Ras y los procesos en los que participan.

## I.1.2 Estructura general

Existen unas secuencias consenso en el extremo N-terminal comunes a todas las proteínas de la superfamilia que son las responsables de la interacción específica con los nucleótidos de guanina así como de la actividad GTPasa. Son las denominadas cajas G. (Wennerberg, Rossman et al. 2005). Existen cinco cajas G llamadas G1, G2, G3, G4 y G5. (Figura I.2) Juntas forman el dominio G, de aproximadamente 20 kDa y cuya estructura conservada confiere una bioquímica similar a todas las proteínas pertenecientes a la superfamilia.



**Figura I.2. Estructura de las GTPasas.** Las distintas regiones y secuencias consenso de las cajas G presentes en las GTPasas de la superfamilia Ras. A, Ala; D, Asp; E, Glu; G, Gly; K, Lys; N, Asn; S, Ser; X, cualquier aminoácido.

La caja G1, también denominada bucle P, es una región de unión a nucleótidos de purina. La caja G2 sólo presenta una treonina conservada, pero es de gran importancia para establecer la unión del fosfato  $\gamma$  del GTP. La caja G3 está relacionada con la unión a un ión de  $Mg^{2+}$  asociado al nucleótido. Los residuos de la caja 4 producen puentes de hidrógenos con el anillo de guanina, de ahí su especificidad de unión a GTP sobre ATP. Los aminoácidos de la caja G5 están menos conservados y lo que hacen es crear asociaciones indirectas con el nucleótido de guanina. (Colicelli 2004)

Además de las cajas G existen otros dos dominios comunes a todas las GTPasas pequeñas, los denominados *switch I* y *switch II*, ambas regiones fundamentales para la correcta activación y función de la GTPasa. En función del nucleótido de guanina unido a la GTPasa presentan diferentes conformaciones estructurales, afectando a la unión de proteínas reguladoras y efectoras. (Ma and Karplus 1997)

En el extremo C-terminal de las proteínas de esta superfamilia se encuentra la región hipervariable (HVR), que es la que presenta mayor grado de variabilidad como su propio nombre indica. La mayoría de las proteínas de las familias de Ras y Rho terminan con la caja CAAX (la C equivale a una cisteína, la A a cualquier aminoácido alifático y la X a cualquier aminoácido). Es en este motivo donde se producen una serie de modificaciones post-traduccionales importantes para la correcta localización de la proteína ya sea a la membrana plasmática o a endomembranas.

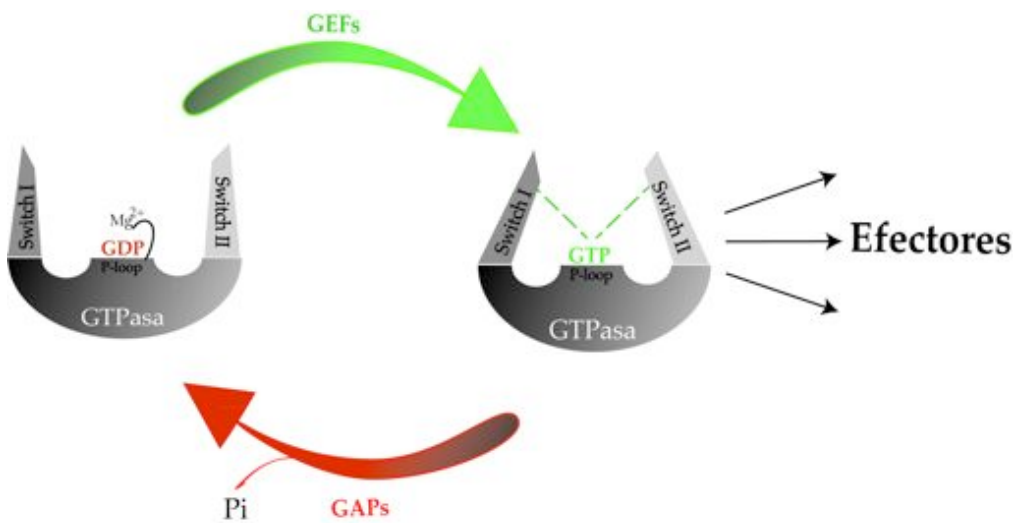
Este motivo CAAX es reconocido por una farnesiltransferasa y una geranilgeraniltransferasa que catalizan una adición covalente de un grupo farnesil o geranilgeranil isoprenoide respectivamente al residuo de cisteína de la caja CAAX. (Mitin, Roberts et al. 2012) Las proteínas de la familia Rab poseen un motivo similar que también es modificado por una geranilgeraniltransferasa para su correcta localización a membrana. Otros miembros de la superfamilia no sufren modificaciones lipídicas, pero también se asocian a membrana, como por ejemplo RIT, RhoBTB, Miro y Sar1. También existen ejemplos de proteínas pertenecientes a la superfamilia que no sufren modificaciones y no se hallan unidas a membrana como Ran y Rerg. (Wennerberg, Rossman et al. 2005)

### **1.1.3 Ciclo de activación GDP-GTP**

Como ya se ha mencionado anteriormente, las pequeñas GTPasas actúan como interruptores moleculares que al pasar de su forma inactiva a la activa inician una serie de respuestas biológicas fundamentales para el organismo. Se ha comentado también que todas ellas poseen actividad GTPasa intrínseca, sin embargo esta capacidad intrínseca es demasiado baja como para poder llevar a cabo un cambio rápido y eficiente entre las formas activas unidas a GTP y las inactivas unidas a GDP.

Así pues, el intercambio entre los estados inactivo y activo de las pequeñas GTPasas viene acelerado por las denominadas proteínas GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factor) que promueven el cambio de GDP por GTP y las GAPs (GTPase Activating Proteins) que acabarán con el estado activo provocando la hidrólisis del GTP. (Takai, Sasaki et al. 2001) (Figura I.3).

Para las distintas familias de pequeñas GTPasas existen GEFs específicos, así es que por ejemplo los GEFs para las proteínas Ras tienen un dominio Cdc25, los de la familia Arf tienen un dominio Sec7 o los de Rho tienen un dominio DH. (Vetter and Wittinghofer 2001). Los dominios catalíticos de las diferentes familias de GEFs son distintos y no están relacionados entre sí, pero en todos los casos el mecanismo de acción es similar. Lo que hacen es catalizar la disociación del nucleótido de la GTPasa al provocar un cambio conformacional en las regiones *switch I* y *switch II* y en el denominado bucle P. De este modo se libera el nucleótido GDP y es sustituido por uno de GTP, no porque la proteína G tenga mayor afinidad por él, sino porque hay una concentración 10 veces superior de GTP que de GDP en la célula. (Bos, Rehmann et al. 2007). Con la unión del GTP se produce un cambio conformacional en el dominio efector que favorece la interacción con el fosfato  $\gamma$  del GTP y que estabiliza de este modo la GTPasa. Es en este estado cuando las regiones *switch* forman una superficie de interacción con las moléculas efectoras. (Figura I.3)



**Figura I.3. Esquema del ciclo de activación/desactivación de las proteínas G.** Mediante la acción de las proteínas GEFs se sustituirá el nucleótido GDP por GTP y de este modo se activa la GTPasa que podrá actuar sobre distintos efectores. La desactivación la llevan a cabo las proteínas GAP.

En el caso de los GAPs sucede lo mismo que con los GEFs, no están conservados y existen distintos para las diferentes familias, pero el mecanismo de acción es similar. Las primeras informaciones en cuanto a cómo aceleraban la hidrólisis del GTP se obtuvieron estudiando el complejo Ras-RasGAP. En este caso RasGAP estabiliza la glutamina en la posición 61 de la proteína, lo que a su vez

coordina el ataque de la molécula de agua. Al mismo tiempo se sitúa una arginina en el sitio de unión a fosfato lo que estabiliza el estado transitorio al neutralizar la carga negativa procedente del fosfato  $\gamma$ . Un mecanismo de acción similar se ha visto también en la hidrólisis de GTP catalizada por los RhoGAP. En muchos tumores humanos se produce una mutación en la glutamina 61, de modo que no pueda llevarse a cabo la hidrólisis de GTP inducida por los GAP por lo que la GTPasa permanece siempre en su estado activo unida a GTP. (Bos, Rehmann et al. 2007).

#### **I.1.4 Familia Arf**

Esta familia incluye 26 proteínas. Se encuentran asociadas a membrana por toda la célula, incluyendo la membrana plasmática y las membranas de las vías endosomal-lisosomal y la secretora. Difiere del resto de familias de pequeñas GTPasas en que en el extremo amino terminal se encuentra una hélice anfipática crucial para la unión a membrana. Además las proteínas de esta familia sufren una miristoilación en el extremo amino terminal. Estas dos características aseguran una estrecha asociación a la membrana que las distingue del resto de proteínas de la superfamilia de Ras, cuyo anclaje a membrana se da por modificaciones post-traduccionales en el extremo carboxi-terminal. Así pues, los efectores de las proteínas Arf se encuentran muy próximos a la superficie de la membrana. En su estado activo, las proteínas Arf reclutan proteínas de revestimiento que por su especificidad por las distintas proteínas cargo permitirán un correcto transporte vesicular. En el Golgi, Arf1 activa la enzima fosfatidil inositol 4-quinasa necesaria para el funcionamiento del aparato de Golgi. Por último, las proteínas Arf también reclutan proteínas modificadoras de lípidos que alteran la composición lipídica de las membranas. (Donaldson and Jackson 2011)

#### **I.1.5 Familia Rab**

Existen hasta el momento más de 60 GTPasas caracterizadas pertenecientes a esta familia. Todas ellas se encuentran involucradas en la regulación de los distintos pasos del tráfico de membranas, desde la formación de vesículas en el compartimento dador, hasta la fusión de éstas con la membrana en el compartimento receptor. Además de su asociación a membranas, las proteínas

Rab interactúan directamente o a través de proteínas adaptadoras con motores moleculares de dineína y kinesina. De este modo, a través de los complejos motores, las proteínas Rab pueden controlar la dirección del movimiento a lo largo del citoesqueleto de microtúbulos. (Hutagalung and Novick 2011)

### I.1.6 Familia Ras

Las proteínas Ras fueron las primeras pequeñas GTPasas en ser descubiertas. Existen cuatro isoformas distintas: H-Ras, N-Ras, K-Ras4A y K-Ras 4B, dándose estas dos últimas por *splicing* alternativo a partir del mismo gen. Estas proteínas están involucradas en procesos clave para la célula como son la proliferación, la diferenciación y apoptosis entre muchas. La importancia de las proteínas Ras en la fisiología celular es tal, que en aproximadamente el 30% de cánceres humanos aparece una mutación activadora de alguna de las isoformas. Las diferencias funcionales entre las distintas proteínas de la familia dependen en gran medida de su distribución dentro de la célula. Esta diferencia en la localización se explica por las distintas modificaciones post-traduccionales que sufren las isoformas. (Arozarena, Calvo et al. 2011)

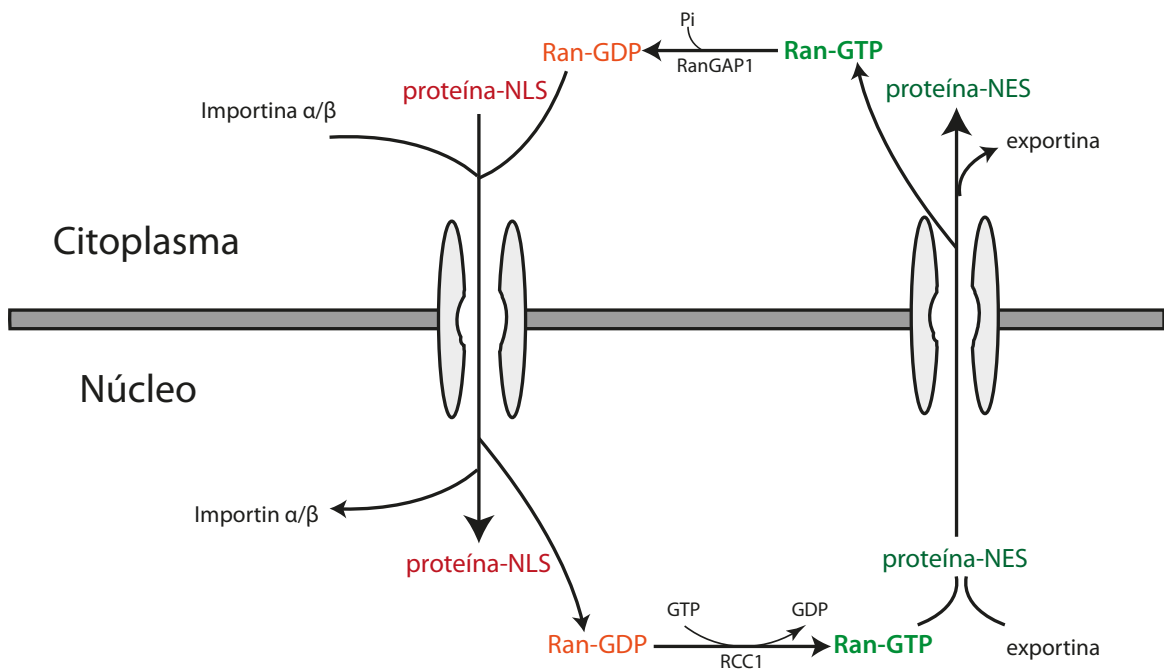
### I.1.7 Familia Ran

Una de las funciones principales de la proteína Ran es la de regular el transporte núcleo-citoplásmico de macromoléculas durante la interfase.

La GTPasa Ran se encuentra en continuo movimiento entre el citoplasma y el núcleo. La localización subcelular en la que aparece depende del nucleótido de guanina unido, así Ran-GTP se acumula en el núcleo y Ran-GDP en el citoplasma. Esto se debe a la compartimentalización de las proteínas reguladoras, presentándose las proteínas Ran-GAP en el citoplasma y las proteínas GEF como RCC1 en el núcleo.

Las importinas se unen a su cargo a bajas concentraciones de Ran-GTP (condición dada en el citoplasma) y atraviesan de este modo el complejo del poro nuclear. Una vez en el núcleo se une a la importina el Ran-GTP liberando el cargo.

Las exportinas, por el contrario se unen a su cargo a altas concentraciones de Ran-GTP (condición dada en el núcleo). El complejo RanGTP-exportina-cargo atraviesa el poro hacia el citoplasma, donde la proteína RanGAP1 hidrolizará el nucleótido de guanina generando así RanGDP, lo que rompe el complejo y libera el cargo. El RanGDP es devuelto al núcleo por el factor de transporte nuclear NTF2, donde la proteína GEF RCC1 facilitará el intercambio de nucleótido y producirá RanGTP de nuevo disponible para un siguiente ciclo. (Figura I.4) (Guttler and Gorlich 2011) (Clarke and Zhang 2001)



**Figura I.4. Transporte núcleo-citoplasma mediado por Ran.** En el citoplasma las proteínas con secuencia de localización nuclear atraviesan el poro nuclear junto a las importinas y Ran-GDP. Una vez en el núcleo el Ran-GTP causará la disociación y liberará el cargo. Las exportinas por el contrario se unen al Ran-GTP y a las proteínas con secuencia de exportación nuclear y de este modo cruzan el poro.

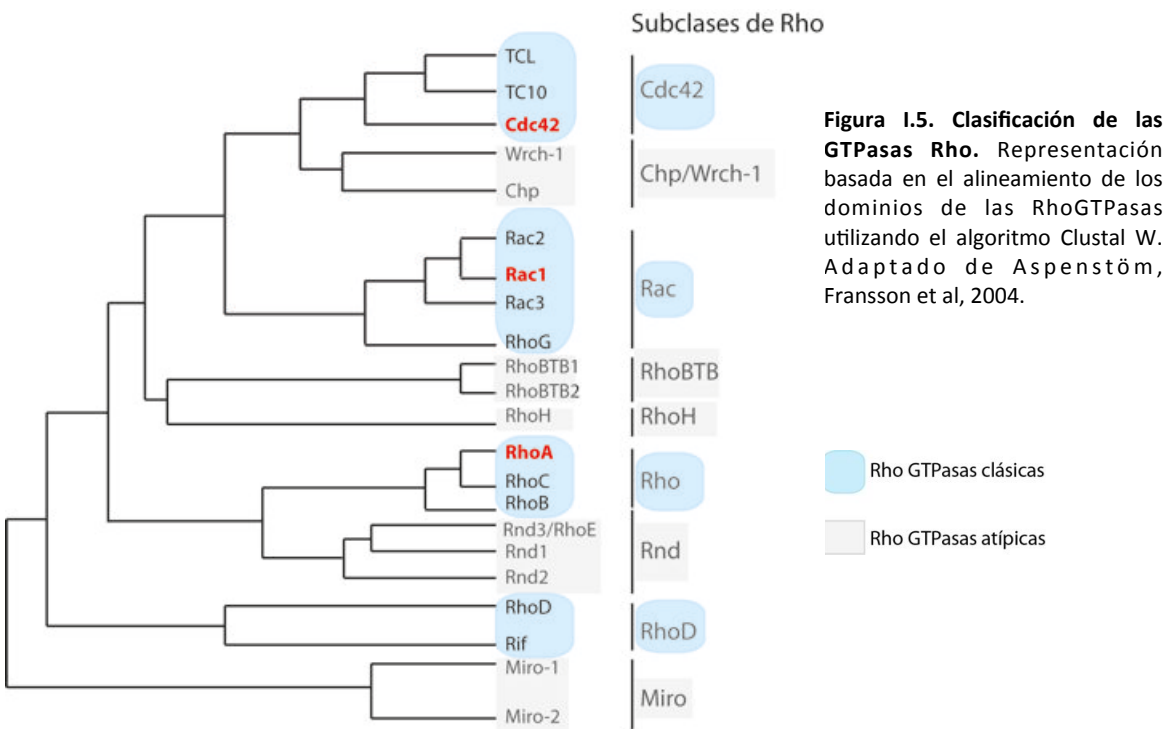
Durante la mitosis la GTPasa Ran también tiene un papel importante como reguladora del huso mitótico, siendo indispensable para la organización y función dinámica de los microtúbulos. En células que expresan los mutantes de Ran Q69L (mutante constitutivamente activo) o T24N (mutante dominante inhibitorio) se producen varios fallos como por ejemplo un alineamiento defectuoso de los cromosomas o husos mitóticos multipolares en lugar de los bipolares. (Clarke and Zhang 2008)



## I.2 Familia de GTPasas Rho

### I.2.1 Clasificación de las GTPasas Rho

Se han descrito hasta la fecha 22 genes en mamíferos que codifican para GTPasas Rho. Éstas pueden ser agrupadas en ocho subclases diferentes: Cdc42, Rac, RhoBTB, RhoH, Rho, Rnd, RhoD, Miro. (Figura I.5). Las subclases Rac, Rho, Cdc42 y RhoD pertenecen a las RhoGTPasas clásicas, mientras que las otras se incluyen entre las RhoGTPasas atípicas. (Aspenstrom, Fransson et al. 2004)



Las GTPasas Rho atípicas no son reguladas por GEFs y GAPs como las otras pequeñas GTPasas, sino que son reguladas por expresión génica, por degradación proteosomal o por fosforilación. (Aspenstrom, Ruusala et al. 2007)

Las denominadas clásicas ciclan entre un estado activo unido a GTP y uno inactivo unido a GDP gracias a la ayuda de GAPs y GEFs, pero además en el caso de esta familia de pequeñas GTPasas existe un tercer grupo de proteínas que participa en la regulación de su activación, las denominadas RhoGDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors.)

## I.2.2 Regulación de GTPasas Rho por RhoGDI

A pesar del amplio número de proteínas que componen la familia de proteínas Rho, sólo existen tres isoformas distintas de RhoGDI en mamíferos:

- RhoGDI1 (también denominada RhoGDI $\alpha$ ). Es la más abundante y mejor caracterizada de la familia. Se expresa de forma ubicua e interacciona con varios miembros de la familia de RhoGTPasas como RhoA, RhoC, Rac1, Rac2 y Cdc42. (Fukumoto, Kaibuchi et al. 1990)
- RhoGDI2 (también RhoGDI $\beta$ , Ly-GDI o D4-GDI). Se dan niveles de expresión altos en células hematopoyéticas, pero también se expresa en otros tipos celulares y está muy relacionada con el cáncer de vejiga y de colon entre otros. (Griner and Theodorescu 2012; Li, Wang et al. 2012)
- RhoGDI3 (también RhoGDI $\gamma$ ). Es la menos expresada de las tres, parece interaccionar principalmente con RhoB y RhoG. Contiene una extensión amino terminal que la localiza a Golgi, donde desempeña un importante papel en el transporte vesicular. (Brunet, Morin et al. 2002)

Las proteínas RhoGDI fueron inicialmente descritas como simples inhibidores de las GTPasas Rho, sin embargo con el tiempo se les están asignando funciones más complejas. (Figura I.6)

### ● RhoGDI como regulador negativo de GTPasas Rho

Cuando se descubrieron estas proteínas se vio que cuando se unían a las GTPasas Rho lo que hacían era inhibir la disociación del nucleótido de guanina unido a ésta. (Ueda, Kikuchi et al. 1990). El dominio N-terminal de las RhoGDI se une a los dominios *switch* I y *switch* II de la pequeña GTPasa restringiendo así la flexibilidad espacial necesaria para que se produzca el intercambio de nucleótido. Además también inhiben la actividad GTPasa intrínseca de las Rho. (Hart, Maru et al. 1992).

- RhoGDI como chaperonas

Una de las funciones principales de las proteínas RhoGDI es la de permitir a la célula tener una reserva de proteínas Rho en el citoplasma, de modo que pueda producirse una rápida respuesta a un estímulo dado. (Boulter, Garcia-Mata et al. 2010) Como se ha comentado anteriormente, las pequeñas GTPasas sufren una prenilación en la caja CAAX en su extremo carboxilo terminal para su correcta localización subcelular y señalización. (Cox and Der 1992). Las proteínas RhoGDI protegen este grupo altamente hidrofóbico de la exposición al agua presente en el citosol evitando así un plegamiento incorrecto de las proteínas Rho. Hay estudios en los que se ha observado que en ausencia de la proteína RhoGDI1 se produce una rápida degradación proteosómica de las proteínas Rho citosólicas. (Boulter, Garcia-Mata et al. 2010)

- RhoGDI como “extractor” de RhoGTPasas de la membrana

Las proteínas RhoGDI catalizan la disociación de las proteínas Rho de las membranas. (Leonard, Hart et al. 1992) Ha sido demostrado que, a pesar de que en solución RhoGDI tiene igual afinidad por Cdc42 activo e inactivo, en presencia de membranas la afinidad por Cdc42 unido a GDP es mucho mayor. De este modo, al extraer preferentemente las GTPasas inactivas, las proteínas RhoGDI ayudan a aumentar la cantidad de GTPasas activas en las membranas.

- RhoGDI como transportador entre membranas

Como se ha comentado las proteínas RhoGDI extraen las GTPasas Rho de las membranas (Hart, Maru et al. 1992) y de la misma forma, se plantea la posibilidad de que las transporten del citosol a la membrana correspondiente en respuesta a un estímulo dado. Sin embargo, existe una gran polémica en torno a esta función y se encuentran trabajos que apuntan a que sí existe un papel elemental de las RhoGDI en este proceso, mientras que en otros casos se demuestra lo contrario.

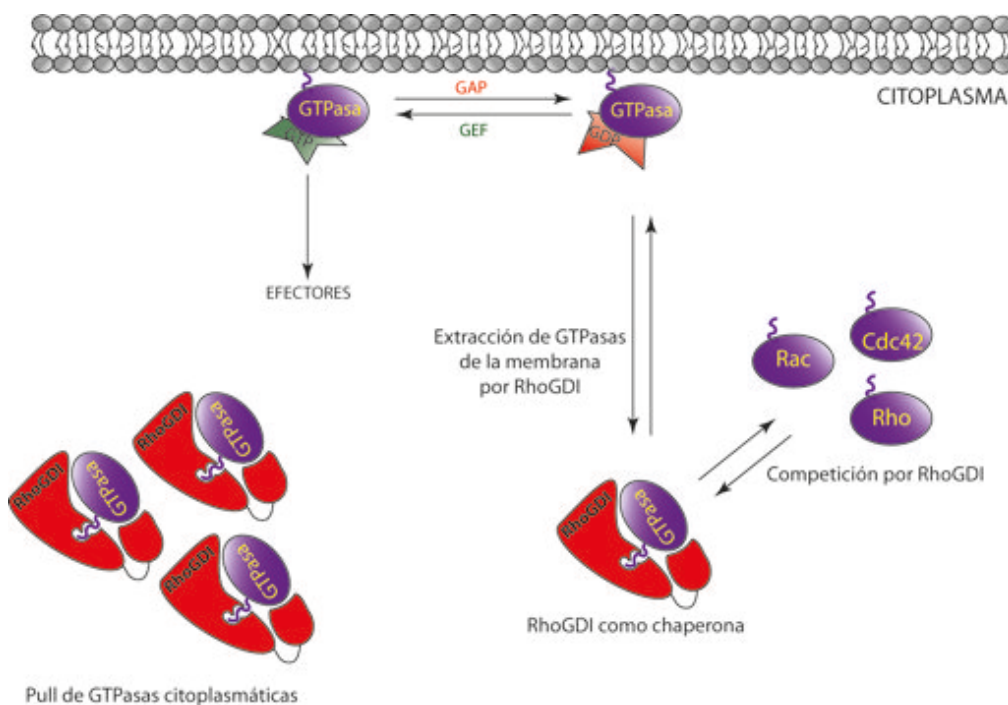
Existen publicaciones en las que los autores usan unos mutantes de Rac1, CDC42 (mutación Arg66Glu) y RhoA (Arg68Glu) incapaces de unirse a las proteínas RhoGDI a pesar de lo cual no muestran diferencias en señalización con respecto a los *wild type*. (Gandhi, Gibson et al. 2004; Gibson, Gandhi et al.

2004). Además células que no expresan RhoGDI responden de la misma forma que células que sí lo expresan cuando son transfectadas con los mutantes constitutivamente activos de Rac1, RhoA y Cdc42. Estos datos avalan que las proteínas RhoGDI no son necesarias para transportar las pequeñas Rho GTPasas a membranas, desde las cuales ejercen su función.

Por el contrario, se ha visto que un mutante de Cdc42 (Phe28Leu) que cicla rápidamente entre el estado GDP y GTP es capaz de inducir la transformación celular en NIH3T3. Cuando además se le inserta la mutación Arg66Glu evitando así su unión a RhoGDI pierde esta capacidad transformante. (Lin, Fuji et al. 2003) Este doble mutante se acumula en las membranas de la región perinuclear en vez de llegar hasta la membrana plasmática. También se ha visto que Rac1 Arg66Glu no se transloca correctamente a la membrana plasmática tras estimulación con el factor de crecimiento de hepatocitos HGF. (Chianale, Rainero et al. 2010)

Una posible explicación para estos, en apariencia contradictorios, resultados sería la existencia de dos mecanismos distintos a través de los cuales las RhoGTPasas llegan a las membranas. Uno de ellos requeriría la acción de las proteínas RhoGDI, mientras que el otro sería el tráfico vesicular. (Garcia-Mata, Boulter et al. 2011)

**Figura 1.6. Funciones de la proteína RhoGDI.** En esta figura se ve cómo las proteínas RhoGDI extraen GTPasas de la membrana. También protegen la prenilación de las RhoGTPasas evitando un plegamiento erróneo y su degradación. Se observa que existe una competencia de las distintas GTPasas en su unión por RhoGDI. Asimismo sirven para que la célula pueda almacenar GTPasas citoplasmáticas y poder responder rápidamente a un estímulo.



## **I.3 Funciones de las RhoGTPasas Rac1, RhoA Y Cdc42**

Dentro de la familia de las GTPasas Rho las proteínas más estudiadas son Rac1, RhoA y Cdc42. A través de una compleja red bioquímica controlan un abundante número de procesos biológicos muy importantes. De los múltiples efectores de estas proteínas caben destacar ROCK para RhoA y PAK para Rac1 y Cdc42. A través de estos efectores regulan muchas de las funciones bioquímicas en las que están involucradas las GTPasas Rho. (Kumar, Gururaj et al. 2006; Amano, Nakayama et al. 2010)

### **I.3.1 Funciones bioquímicas de las GTPasas Rho**

Estas pequeñas GTPasas llevan a cabo diferentes funciones bioquímicas:

- Regulación de actividades enzimáticas
- Regulación de expresión génica
- Regulación del citoesqueleto: filamentos de actina
- Regulación del citoesqueleto: microtúbulos

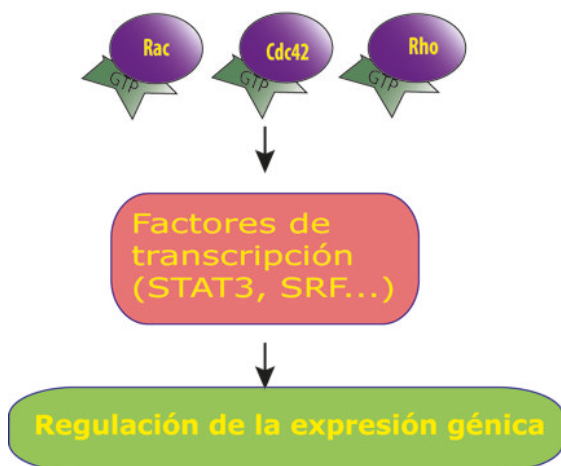
#### **I.3.1.1 Regulación de actividades enzimáticas**

Además de las proteínas relacionadas con el citoesqueleto, estas GTPasas regulan otras muchas actividades enzimáticas. Muchas de éstas son enzimas involucradas en el metabolismo celular, como por ejemplo la glutaminasa mitocondrial, cuya actividad se ve incrementada en respuesta a la activación de las Rho GTPasas. (Wilson, Erickson et al. 2013) Otro ejemplo es el de la proteína PI3K p110 $\beta$ , a diferencia de las proteínas Ras, que regulan la isoforma p110 $\alpha$ . (Fritsch, de Krijger et al. 2013)

Una de las primeras dianas de Rac1 en ser identificadas fue la proteína p67phox, componente esencial del complejo de la oxidasa NADPH presente en fagocitos. Desde entonces se ha visto que Rac1 promueve la producción de ROS en muchos tipos celulares, proponiendo como mediador de esta actividad a las oxidasas pertenecientes a la familia Nox. (Diekmann, Abo et al. 1994; Takeya and Sumimoto 2003)

### I.3.1.2 Regulación de la expresión génica

Las pequeñas Rho GTPasas son capaces de regular varias cascadas de señalización que conllevan finalmente una alteración en la expresión génica. Tanto Rac1 como CDC42 y RhoA son capaces de activar rutas de las MAPK.



**Figura I.7. Las RhoGTPasas regulan la expresión génica.** A través de múltiples factores de transcripción las RhoGTPasas son capaces de regular la expresión génica de varios genes relacionados con proliferación, migración o proteínas del citoesqueleto.

(Arozarena, Aaronson et al. 2000; Mulloy, Cancelas et al. 2010). También son capaces de activar Stat3, factor de transcripción que regula múltiples genes como *myc*, *Akt*, *cyclinD*. (Raptis, Arulanandam et al. 2011) o el factor de transcripción NFκB, aumentando así la migración, proliferación o supervivencia celular. (Figura I.7) (Karin 2006; Gastonguay, Berg et al. 2012)

Otro de los múltiples factores de transcripción que regulan es el factor SRF (Serum Response Factor). Este factor de transcripción está codificado por un único gen expresado abundantemente en muchos tipos celulares y regula la transcripción de varios genes, principalmente implicados en regulación del citoesqueleto. (Posern and Treisman 2006; Busche, Descot et al. 2008; Stritt, Stern et al. 2009) Actúa sobre la región SRE presente en muchos promotores y requiere la presencia de un co-activador, la proteína MAL (también denominada MRTF-A, MKL1 y BSAC). (Miralles, Posern et al. 2003) Esta proteína se encuentra en el citoplasma unida a moléculas de G-actina. Cuando, tras la activación de las RhoGTPasas se produce la polimerización de F-actina, MAL se libera de la G-actina y entra al núcleo, donde se une a SRF para regular la transcripción. Existe también una regulación de MAL en el núcleo dependiente de la G-actina nuclear, regulada por las forminas nucleares, que inducen la polimerización de actina con la consecuente activación de SRF. (Olson and Nordheim 2010; Baarlink, Wang et al. 2013)

### **I.3.1.3 Regulación del citoesqueleto: filamentos de actina**

Los filamentos de actina se encuentran en todas las células eucariotas y son imprescindibles para la mayoría de sus movimientos, especialmente los de la superficie celular. Los filamentos crecen mediante adición de monómeros de actina (G-actina) a cada uno de los extremos de F-actina, pero la velocidad de crecimiento es más rápida en el extremo *más* que en el extremo *menos*.

Las tres RhoGTPasas controlan el citoesqueleto de actina, aunque a través de mecanismos diferentes con consecuencias distintas. (Ridley, Schwartz et al. 2003) Lo hacen a través de la polimerización/despolimerización de actina por una parte y por la otra controlando la organización de los filamentos de actina.

Son varias las proteínas a través de las cuales regulan el citoesqueleto de actina, como las forminas, el factor ARP2/3 o la cofilina. (Figura I.8)

#### ● FORMINAS

Las forminas producen filamentos de actina sin ramificar que se encuentran principalmente en filopodios y en el anillo contráctil durante la citocinesis. Fueron descubiertas inicialmente como dianas de Rho1p en lavaduras (Kohno, Tanaka et al. 1996). Dentro de las forminas de vertebrados las mejor caracterizadas son las proteínas de mamíferos Dia1, 2 y 3 (también conocidas como Diap o Diaph). Éstas forman una de las siete subfamilias de forminas. (Chesarone, DuPage et al. 2010) La característica común que define estas proteínas es la presencia de un dominio FH2 (*formin homology 2*) y un dominio FH1 de unión a profilina adyacente al FH2. Estos dos dominios son los que cooperan para iniciar el ensamblaje de filamentos de actina. La mayor parte de las forminas contienen además en el extremo carboxilo-terminal un dominio de autorregulación inhibitoria (DAD) y en el extremo amino-terminal un dominio de unión a pequeñas GTPasas (GBD). En este extremo se encuentra otro dominio inhibitorio (DID). Los dominios DAD y DID interaccionan entre sí y de este modo mantienen a las forminas en estado inactivo en el citosol. (Nezami, Poy et al. 2010; Maiti, Michelot et al. 2012)

Cuando las pequeñas GTPasas se activan en respuesta a una señal como pueden ser factores de crecimiento o algún quimioatrayente, se unen directamente al dominio GBD de las forminas rompiendo la unión entre DAD y DID y exponiendo así los dominios FH2. (Otomo, Otomo et al. 2005; Rose, Weyand et al. 2005). Estos dominios FH2 estabilizan los dímeros de G-actina (Pring, Evangelista et al. 2003) dando comienzo a la nucleación, primer paso en la formación de F-actina. Las forminas permanecen entonces unidas al extremo creciente del filamento de actina a través de los dominios FH2 y así lo protegen de las proteínas de capping. (Estas proteínas se unen a la F-actina en su extremo *más* e impiden su elongación). (Moseley, Sagot et al. 2004; Schirenbeck, Bretschneider et al. 2005). Por otra parte el dominio FH1 es capaz de unirse al complejo profilina/actina y traspasar monómeros de ATP-G-actina al dominio FH2 para que los incorpore al extremo creciente de F-actina. (Faix and Grosse 2006)

Además de su activación por pequeñas GTPasas, se ha visto que las forminas también pueden iniciar la nucleación de actina en respuesta a tensión mecánica. (Higashida, Kiuchi et al. 2013)

Estudios recientes también han visto que las forminas no sólo inducen la polimerización de actina en el citoplasma, sino que además la polimerización de actina en el núcleo en respuesta a suero también depende de la activación de las forminas, en concreto de mDia1. (Baarlink, Wang et al. 2013)

#### ● FACTOR ARP2/3

La polimerización de actina se inicia con el ensamblaje de tres monómeros de actina. El complejo ARP2/3 consta de dos moléculas emparentadas con la actina, de modo que al unirse a una molécula de actina inicia la nucleación. A través de este complejo se generan ramificaciones de actina a partir de una cadena ya existente. (Kurusu and Takenawa 2009) Tanto Cdc42 como Rac1 son capaces de activarlo, no directamente, sino uniéndose a proteínas pertenecientes a la familia de WASP y WAVE respectivamente.

Cdc42 se une a la región CRIB (CDC42/Rac-interactive binding region) que se encuentra en el extremo N-terminal de las proteínas WASP. (Takenawa and Suetsugu 2007) La sobre-expresión de Cdc42 en células en cultivo dio como



resultado un aumento en los filamentos de actina en las localizaciones de WASP y N-WASP. Un experimento contrario, la sobre-expresión de un dominante negativo de Cdc42 redujo el número de filamentos originados desde WASP y N-WASP. Así es como se determinó que las proteínas WASP actúan por debajo de Cdc42 en la cascada de señalización. (Symons, Derry et al. 1996; Miki, Sasaki et al. 1998)

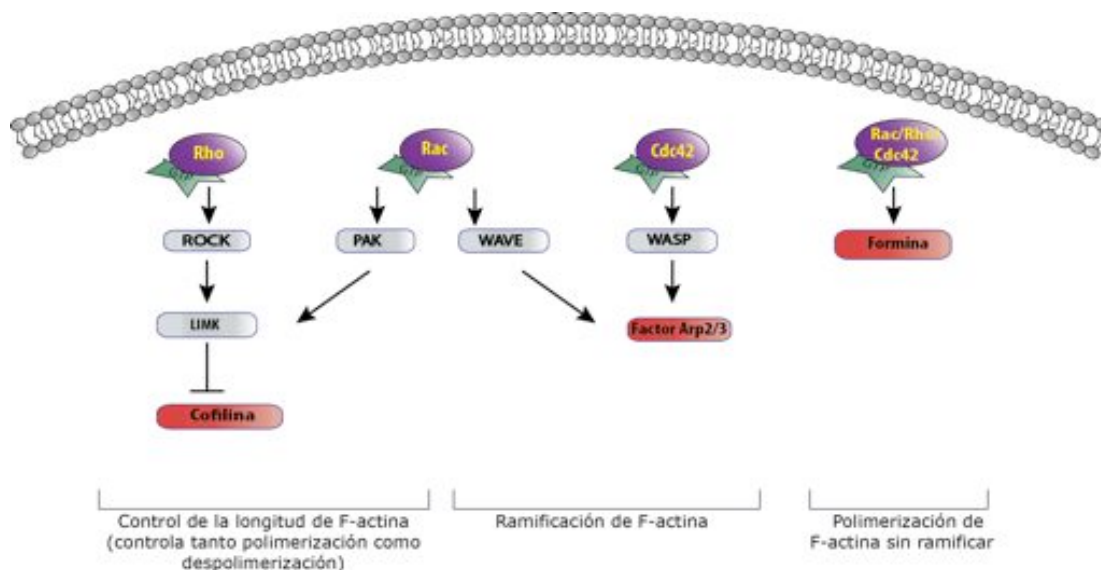
En el caso de Rac1 la activación de ARP2/3 se da a través de las proteínas de la familia WAVE. Sin embargo, a diferencia de Cdc42 que se une a WASP, Rac1 no se une directamente a las proteínas WAVE. Estas proteínas se encuentran formando un complejo de cinco proteínas distintas entre las cuales se encuentra la proteína de unión a Rac1 PIR121. Es pues a través de esta última que Rac1 acaba activando la proteína WAVE que a su vez acaba activando el complejo ARP2/3. (Ismail, Padrick et al. 2009)

#### ● COFILINA

La cofilina produce cortes en los filamentos de actina, (Ghosh, Song et al. 2004; Galkin, Orlova et al. 2011; Bravo-Cordero, Magalhaes et al. 2013) a través de los cuales regula tanto la polimerización como la despolimerización. Al seccionar los filamentos produce más extremos barbados que sirven como puntos de elongación. Sin embargo, hay estudios que han demostrado que la polimerización se produce a una concentración adecuada entre la cantidad de cofilina activa y la cantidad de ATP-G-actina que haya. (Kiuchi, Ohashi et al. 2007; Normoyle and Briehner 2012) Es por eso que de no darse la concentración para que se produzca la polimerización, al cortar los filamentos lo que hará será despolimerizar. Varios estudios han demostrado que la cofilina juega un papel muy importante durante la migración de las células gracias a esta capacidad de controlar la longitud de los filamentos de actina. Está activa en las protrusiones de las células y de hecho la inhibición de esta proteína tiene como consecuencia fallo en las protrusiones, en la polaridad celular y en la quimiotaxis. (DesMarais, Ghosh et al. 2005; Mouneimne, DesMarais et al. 2006; Tania, Prosk et al. 2011)

La actividad de la cofilina está regulada por varios mecanismos: unión de PIP<sub>2</sub>, interacción con otras proteínas, cambios en el pH o fosforilación. Cuando es fosforilada, la proteína se inactiva. Esta fosforilación es llevada a cabo principalmente por las LIM quinasas (LIMK) (Arber, Barbayannis et al. 1998) que

a su vez son activadas por PAK y por ROCK. (Edwards, Sanders et al. 1999; Maekawa, Ishizaki et al. 1999)



**Figura 1.8. Regulación por las GTPasas Rho del citoesqueleto de actina.** Rutas a través de las cuales se regula el citoesqueleto de actina por parte de las GTPasas Rho.

### **1.3.1.4 Regulación del citoesqueleto: microtúbulos**

Los microtúbulos tienen un papel organizador crucial en todas las células eucariotas. Crecen a partir del centrosoma hacia la periferia celular, generando un sistema de guías a lo largo de las cuales pueden desplazarse vesículas, orgánulos y otros componentes celulares. Una vez producida la nucleación en el centrosoma, se produce la elongación en el extremo *más* al añadirse nuevos dímeros de  $\alpha$  tubulina/ $\beta$  tubulina. Sin embargo, de no unirse este extremo a otra proteína o a otra estructura celular, rápidamente se invierte la situación y empezará a despolimerizarse. Este fenómeno es conocido como inestabilidad dinámica.

Al igual que sucede con el citoesqueleto de actina, las pequeñas Rho GTPasas regulan tanto la polimerización como la despolimerización de los microtúbulos. Y esta regulación la pueden llevar a cabo bien regulando proteínas que a su vez regulan la dinámica de los microtúbulos, o bien regulando proteínas que se unirán al extremo *más*.

- OP18/STATHMIN

Esta proteína es capaz de desestabilizar los microtúbulos de dos formas distintas. Por una parte secuestra dímeros de  $\alpha$  tubulina/ $\beta$  tubulina disminuyendo así la concentración de dímeros disponibles para la polimerización e inhibiéndola de este modo. Por otro lado juega un papel activo provocando lo que se denomina catástrofe de los microtúbulos en el extremo *más*, es decir, induce la despolimerización. (Cassimeris 2002) Op18/stathmin puede ser fosforilada en cuatro residuos diferentes. Cualquiera de estas fosforilaciones inactiva la proteína, lo cual disminuye la frecuencia de catástrofes con lo que se produce un crecimiento de los microtúbulos. (Andersen 2000) Es aquí donde entran en juego las GTPasas Rac1 y Cdc42, ya que en respuesta a distintos estímulos extracelulares activan PAK que a su vez fosforila el residuo Ser16 de Op18/stathmin y la inactiva. (Fig. 1.9) (Daub, Gevaert et al. 2001; Wittmann, Bokoch et al. 2004)

- EB1

Es una proteína que estabiliza los microtúbulos al unirse a su extremo *más*. Fue inicialmente descrita como proteína de unión a APC (adenomatous polyposis coli), un factor de supresión tumoral. (Su, Burrell et al. 1995) Se han descrito dos cascadas de señalización diferentes que regulan la unión de APC/EB1 a microtúbulos.

En primer lugar, en astrocitos en migración, CDC42 se activa por unión a sustrato mediada por integrina. CDC42 fosforila y activa Par6 que a su vez activa PKC $\zeta$  que fosforila GSK-3 $\beta$ . Al fosforilarse esta última, se produce su inactivación, que permitirá así la unión de APC/EB1 a los microtúbulos. (Fig. 1.9) (Mimori-Kiyosue, Shiina et al. 2000; Etienne-Manneville and Hall 2003)

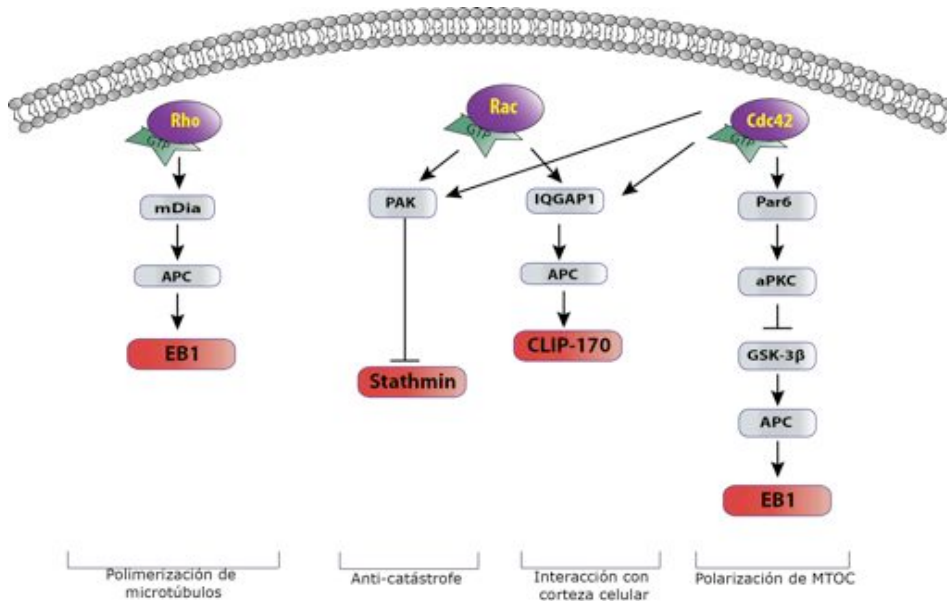
Por otro lado, en fibroblastos se ha encontrado que las forminas también juegan un papel importante en la polimerización de microtúbulos, función independiente de su efecto sobre la nucleación de actina. Lo hace a través de su unión a APC/EB1 en una cascada iniciada por RhoA. (Wen, Eng et al. 2004; Chesarone, DuPage et al. 2010) Dado que las forminas están muy implicadas en la regulación de la polimerización de actina, se cree pueden coordinar la

colaboración entre el citoesqueleto de actina y los microtúbulos. (Ishizaki, Morishima et al. 2001; Akhshi, Wernike et al. 2013)

Se ha descrito la proteína EB1 también como un posible mediador entre el citoesqueleto de microtúbulos y el de actina. En células de melanoma, por ejemplo, se ha visto que la ausencia de EB1 disminuye la cantidad de lamelipodios y produce una distribución alterada de filopodios, lo que contribuye a una menor migración. (Schober, Cain et al. 2009; Schober, Kwon et al. 2012)

#### ● CLIP-170

A través de la unión de los microtúbulos a proteínas de la corteza celular, éstos ayudan a definir la forma y la polaridad de la célula. La proteína CLIP-170 actúa como intermediaria entre los microtúbulos y el citoesqueleto de actina presente en la corteza. Se une al extremo *más* por una parte y por la otra es capaz de interactuar con IQGAP1, proteína de unión a actina y efector de Rac1 y CDC42. (Figura 1.9) (Fukata, Watanabe et al. 2002) También existe una interacción entre IQGAP1 y APC, ambas localizadas en el extremo director de la célula. Este complejo es necesario para mantener a CLIP-170 también en este extremo director de la célula. De este modo, Rac1 y CDC42 parecen marcar zonas concretas dentro de la corteza celular para reclutar extremos *más* de los microtúbulos. (White, Erdemir et al. 2012)



**Figura I.9. Regulación del citoesqueleto de microtúbulos.** Ilustración esquemática de las rutas a través de las cuales las Rho GTPasas regulan el citoesqueleto de microtúbulos

### I.3.2 Funciones biológicas de las GTPasas Rho

Entre las funciones biológicas que regulan las pequeñas Rho GTPasas están:

- Regulación del ciclo celular
- Regulación de uniones adherentes
- Regulación de la polaridad celular
- Regulación de la migración celular

#### I.3.2.1 Regulación del ciclo celular

El ciclo celular en eucariotas está dividido en cuatro fases diferentes. La fase M que comprende la mitosis y la citocinesis, la fase S, durante la cual la célula replica su DNA nuclear, la fase G<sub>1</sub>, que comprende el intervalo de tiempo entre la conclusión de la fase M y el comienzo de la S y la fase G<sub>2</sub>, intervalo de tiempo entre el final de la fase S y el inicio de la M. El papel de las pequeñas RhoGTPasas durante el ciclo celular depende de la fase en la que se encuentre la célula

##### ● FASE G<sub>1</sub>

La progresión a lo largo de esta fase está regulada por las quinasas dependientes de ciclinas Cdk4/Cdk6 y Cdk2, que se activan tras la unión a ciclina D y ciclina E respectivamente. A su vez estas Cdks son inhibidas por miembros de la familia de proteínas INK4A y Cip/Kip. Aunque de manera distinta dependiendo del tipo celular, se ha visto que las pequeñas Rho GTPasas regulan positivamente la expresión de la ciclina D1 y la degradación de las proteínas inhibitoras de Cdk2 p21<sup>cip1</sup> y p27<sup>kip1</sup>. De este modo favorecen el paso a la siguiente fase del ciclo celular. (Coleman, Marshall et al. 2004; Welsh 2004; Coleman, Densham et al. 2006)

Durante esta fase también tiene lugar la duplicación del centrosoma, necesaria para la correcta formación del huso mitótico y posterior segregación de los cromosomas. Este proceso es regulado por ROCK II, efector de RhoA (Kanai, Crowe et al. 2010)

## ● MITOSIS

El alineamiento de los cromosomas durante la profase y metafase es llevado a cabo principalmente por microtúbulos que parten de los dos centrosomas. Así, durante la mitosis temprana un papel fundamental que juegan las pequeñas RhoGTPasas es el de favorecer el correcto alineamiento de los cromosomas durante la formación del huso mitótico. Para un alineamiento adecuado se ha visto que se necesita una correcta separación de los centrosomas. En este punto se ha identificado a Rac1 activado por el GEF Tiam1 como regulador, actuando como antagonista de la kinesina 5 (Eg5) y equilibrando así las fuerzas durante la formación del huso mitótico (Woodcock, Rushton et al. 2010) Para el posicionamiento de los centrosomas también es necesaria la activación de ROCK por parte de RhoA.(Chevrier, Piel et al. 2002)

Además en el cinetocoro se encuentran múltiples efectores de pequeñas RhoGTPasas que favorecen la unión de los microtúbulos a los cromosomas. Un ejemplo es mDia3, efector de Cdc42. Se ha visto que en el caso de que no haya ni mDia3 ni Cdc42 se produce un arresto mitótico en el que muchas cromosomas no están bien unidos a los microtúbulos. (Yasuda, Oceguera-Yanez et al. 2004)

## ● CITOCINESIS

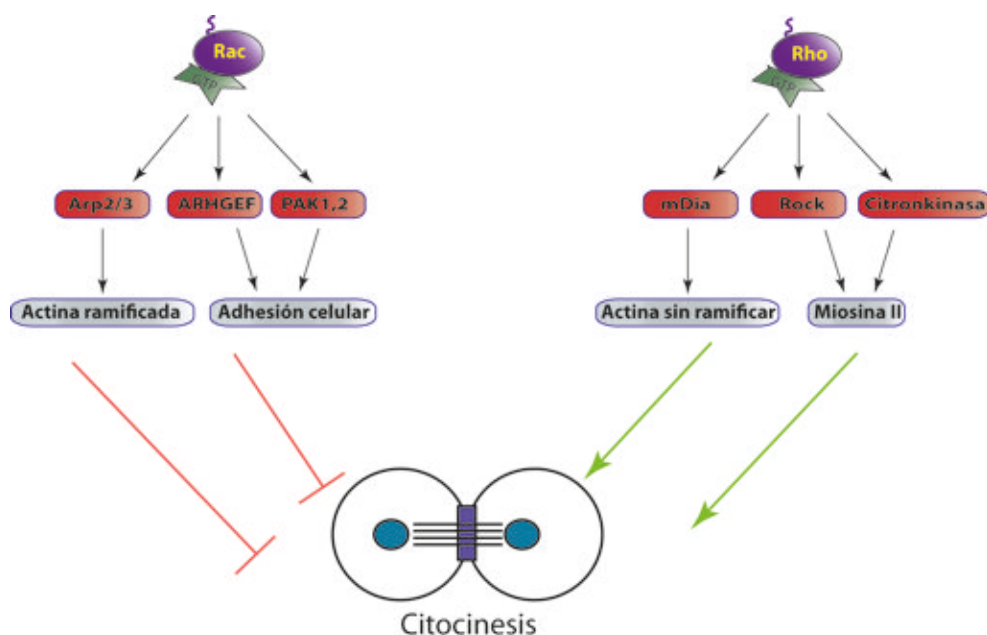
Durante la citocinesis las pequeñas RhoGTPasas juegan un papel muy distinto. (Figura I.10)

RhoA es un regulador positivo durante este proceso de separación del citoplasma en dos. La localización espacio-temporal de RhoA activo sugiere que determina el plano de división, ya que se acumula a lo largo de éste justo antes de comenzar la separación. Esta presencia de RhoA activo en el plano de división viene determinada por los microtúbulos, ya que asociados a éstos se encuentran GEFs y GAPs. (Bement, Benink et al. 2005; Murthy and Wadsworth 2008) Un ejemplo de GEF que activa RhoA en el huso central es Ect2, sin el cual se ha comprobado que no se da la citocinesis. (Morita, Hirono et al. 2005) Un ejemplo de GAP es el de p190RhoGAP y se ha visto que su degradación es necesaria para que se produzca una correcta citocinesis. (Manchinelly, Miller et al. 2010) Una

vez activado, RhoA actúa sobre diversos efectores. Actúa sobre mDia para iniciar la formación de filamentos de actina del anillo contráctil (Watanabe, Okawa et al. 2010), y sobre ROCK y la Citron quinasa para iniciar la actividad motora de miosina-II. (Goto, Kosako et al. 2000; Bassi, Verbrugghe et al. 2011) La miosina-II activa se une a la actina polimerizada por mDia y estimula la constricción del anillo. ROCK también activa LIMK que a su vez fosforila e inhibe la cofilina para evitar la despolimerización de actina. (Amano, Kaji et al. 2002)

A diferencia de RhoA, Rac1 es un regulador negativo de la constricción del anillo contráctil durante la citocinesis. De hecho, la sobreexpresión de Rac1 constitutivamente activo induce la multinucleación en muchas líneas celulares como HeLa, Rat1A, NIH3T3. (Yoshizaki, Ohba et al. 2004) Al igual que ocurre con RhoA, la actividad de Rac1 se regula desde el huso central, en este caso por el GAP MgcRacGAP. Así en células HeLa que expresan una versión inactiva de MgcRacGAP y por tanto no realizan bien la citocinesis, la inhibición de Rac1 consigue contrarrestar el fallo. (Bastos, Penate et al. 2012) Así pues la inactivación de Rac1 es necesaria para una correcta citocinesis en determinados tipos celulares. Una razón para esta inactivación puede ser la de mantener los niveles de Pak activo bajos, ya que se ha visto que la expresión de Pak1 en HeLa conlleva una inhibición por fosforilación de MLCK, lo que impide la constricción del anillo mediada por miosina-II. (Yoshizaki, Ohba et al. 2004) Otra posible razón es la de inhibir la adhesión celular al plano de división. En HeLa la expresión de Rac1 constitutivamente activo o de MgcRacGAP deficiente resultaba en una mayor adhesión celular dificultando la constricción. (Bastos, Penate et al. 2012; Davies and Canman 2012)

En el caso de Cdc42 lo que se ha observado es que es necesaria su actividad para la citocinesis asimétrica y producir cuerpos polares pequeños durante la meiosis. (Liu 2012; Maddox, Azoury et al. 2012) Además se ha visto que la sobre-expresión de Cdc42 constitutivamente activo impide la división dando lugar a células gigantes multinucleadas. (Dutartre, Davoust et al. 1996)



**Figura I.10. Papel de las RhoGTPasas en la citocinesis.** Esquema representando el papel más destacado de las RhoGTPasas en la citocinesis. Aunque dependiendo del tipo celular, en general, parece que Rac evita la citocinesis, mientras que Rho la induce.

### I.3.2.2 Regulación de uniones adherentes

Las uniones adherentes entre células están formadas por interacciones homofílicas entre cadherinas por su parte extracelular. En su dominio citoplasmático, las cadherinas establecen uniones con el citoesqueleto de actina a través de la  $\beta$ -catenina, que se une a  $\alpha$ -catenina y ésta a actina. (Menke and Giehl 2012)

La interacción homofílica entre E-cadherinas es el primer paso para establecer una unión adherente y ésta puede ser facilitada por la formación de lamelipodios inducida por Rac1. A través de estos lamelipodios entran en contacto células adyacentes y surgirá la unión. (Ehrlich, Hansen et al. 2002)

Una vez establecida la interacción homofílica se produce un incremento de Rac1 activo en las uniones que rápidamente vuelve a decaer. (Nakagawa, Fukata et al. 2001; Kitt and Nelson 2011) Este incremento indica que hay GEFs para Rac1 que responden a la adhesión de cadherina. Se han identificado varios, por ejemplo Trio, Tiam1 y Vav2 (Malliri, van Es et al. 2004; Fukuyama, Ogita et al. 2006; Charrasse, Comunale et al. 2007) La actividad de Rac1 en las adhesiones conlleva una reorganización del citoesqueleto de actina cuya principal función es



la estabilización de las uniones. La caída en la actividad la lleva a cabo el GAP MgcRacGAP. (Ratheesh, Gomez et al. 2012)

Al tiempo que se activa Rac1, el GAP p190RhoGAP se encarga de inactivar la GTPasa RhoA. (Noren, Arthur et al. 2003) Sin embargo, para su maduración, las uniones requieren un aumento en la actividad de actomiosina que permita tener capacidad contráctil para la expansión de los contactos. Es por ello que al poco de establecerse la unión, la actividad de Rac1 disminuye a la vez que se produce un aumento en la de RhoA regulado por p114RhoGEF. (Terry, Zihni et al. 2011)

Sin embargo, el papel de las pequeñas RhoGTPasas en las uniones adherentes depende mucho del tipo celular y del contexto. Existen múltiples rutas reguladas por las pequeñas RhoGTPasas que afectan a las uniones adherentes, bien estabilizándolas o rompiéndolas. Esta respuesta varía mucho en función del tipo celular, de los niveles de activación o incluso del sustrato. Por ejemplo, Rac activo promueve la formación de uniones adherentes en células MDCKII mientras que en células de carcinoma pancreático disminuye su número. (Malliri, van Es et al. 2004; Hage, Meinel et al. 2009)

### **I.3.2.3 Regulación de la polaridad celular**

La polaridad, la capacidad de una célula de definir un eje geométrico, es importante para un gran número de funciones biológicas, como la división asimétrica, la migración direccional o el establecimiento de la polaridad apico-basolateral de las células epiteliales. (St Johnston and Ahringer 2010)

Existen tres complejos de proteínas involucrados en el establecimiento de la polaridad celular en epitelios: PAR6/aPKC/PAR3 y Crumbs3/PALS1/PATJ localizados en la zona apical junto a las uniones estancas y Dlg/Lgl/Scribble situado en la zona basolateral. La unión de Cdc42 y Rac1 a PAR6 promueve la capacidad de éste de activar aPKC. (Iden and Collard 2008)

Las RhoGTPasas también están involucradas en la pérdida de uniones estancas durante la transición epitelio mesénquima (EMT). El factor de

crecimiento TGF $\beta$ , un potente inductor de este proceso, promueve la fosforilación de PAR6 por el receptor de TGF $\beta$ . Una vez fosforilado, PAR6 se asocia a SMURF1 y de este modo se induce la degradación proteosomal de RhoA con la consecuente pérdida de las uniones estancas. (Ozdamar, Bose et al. 2005) Las células tumorales invasivas sufren un proceso similar al EMT y de hecho, la desregulación de la polaridad contribuye a la progresión del cáncer. (Wodarz and Nathke 2007)

Durante la migración celular se establece una polaridad antero-posterior importante para un movimiento dirigido. Además de la formación de protrusiones en el extremo director, se produce una reorientación del MTOC de modo que el crecimiento de los microtúbulos sea hacia el frente, favoreciendo así el transporte vesicular hacia esa zona. (Woodham and Machesky 2014) Durante el establecimiento de esta polaridad antero-posterior las pequeñas RhoGTPasas juegan un papel activo.

#### **I.3.2.4 Regulación de la migración celular**

La migración celular en organismos multicelulares es crucial y juega un papel importante no sólo durante la morfogénesis en el desarrollo sino también en la respuesta inmune, en la cicatrización, en la renovación de los tejidos o durante la metástasis. Las células pueden migrar solas o en conjunto, lo que se denomina migración colectiva. En el caso de que migren solas, existen dos tipos de movimiento que se da en función del contexto, el mesenquimal y el ameboide.

##### ● Migración mesenquimal

Este tipo de migración se caracteriza por la morfología elongada de las células, la polaridad antero-posterior muy bien establecida, la degradación de la matriz extracelular por proteólisis y por una velocidad relativamente lenta de aproximadamente 0.1-1  $\mu\text{m}/\text{min}$ . (Friedl and Wolf 2003) Consta de 5 pasos:

1. Extensión de lamelipodio en el frente de migración
2. Adhesión al sustrato mediante la formación de complejos de adhesión focal
3. Secreción de proteasas para degradar la matriz extracelular

4. Translocación celular por contracción de complejos de actomiosina
5. Despegue del extremo posterior de la célula.

Los lamelipodios son protrusiones de la membrana principalmente constituidos de filamentos de actina tanto ramificados como sin ramificar. La RhoGTPasa encargada de su formación es Rac1. Tras la exposición de la célula a ciertos estímulos como factores de crecimiento, citoquinas o componentes de la matriz extracelular se produce un aumento de fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP<sub>3</sub>), producto de la PI3K, en el extremo director que conduce a la activación de GEFs específicos para Rac1. (Ridley, Schwartz et al. 2003) Además de esta activación vía PI3K, Rac1 también se activa en el extremo director gracias a que los microtúbulos son capaces de transportar y/o activar RacGEFS en el frente de la célula. Por ejemplo, un crecimiento neto de microtúbulos hacia el extremo director activa el GEF Asef. (Kawasaki, Senda et al. 2000)

Una vez activada la proteína Rac1 comienza la polimerización de actina a través del factor de nucleación Arp2/3. Además Rac1 también induce cambios en el citoesqueleto al fosforilar la cadena ligera de miosina (MLC) a través de su efector PAK. (Brzeska, Szczepanowska et al. 2004)

Una vez formada la protrusión, ésta se une a la matriz extracelular (ECM), por lo que se producen interacciones entre las integrinas de la membrana con ligandos de la matriz. (Ridley, Schwartz et al. 2003) Como consecuencia de estas interacciones se reclutan aún más integrinas a la zona de adhesión que serán recicladas y transportadas a través de los microtúbulos desde otras regiones celulares. (Gu, Noss et al. 2011) La unión de ligandos al dominio extracelular de las integrinas, produce un cambio conformacional en su dominio citoplasmático que permite la interacción con la quinasa de adhesión focal (FAK), con  $\alpha$ -actinina y con talina. Todas estas proteínas son capaces de unirse a través de proteínas adaptadoras a proteínas de unión a actina (como vinculina, paxilina o más  $\alpha$ -actinina). (Friedl and Wolf 2003) De este modo se produce una conexión entre el punto de unión a ECM con el citoesqueleto de actina. Además de estas proteínas, a través de las integrinas también se reclutan pequeñas RhoGTPasas y PI3K que regulan el complejo focal, que o bien madura a adhesión focal o se desintegra rápidamente.

Para la degradación de la matriz se requiere la llegada a través de los microtúbulos de vesículas que contengan metaloproteinasas, sobre todo la metaloproteinasa de tipo membrana 1 (MT1-MMP). (Poincloux, Lizarraga et al. 2009; Frittoli, Palamidessi et al. 2011) Ésta se encarga de la fragmentación del colágeno y de otras moléculas de la matriz, de modo que sean accesibles posteriormente para su degradación por gelatinasas (MMP2 y MMP9) o serín-proteasas. (Friedl and Wolf 2003) Rac1 juega un papel importante durante esta fase de secreción de proteasas, ya que su activación induce la expresión de MMPs en varios tipos celulares. (Parri and Chiarugi 2010)

A continuación tiene lugar la translocación celular llevada a cabo gracias a la fuerza contráctil de la actomiosina. La contracción, debida a la miosina II, está principalmente inducida por la GTPasa RhoA. A través de su efector ROCK, RhoA controla la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC) de dos maneras distintas: inhibiendo fosfatasas que actúan sobre ella y activando la quinasa de MLC (MLCK). (Amano, Nakayama et al. 2010) La fosforilación de MLC activa la miosina y de este modo aumenta la contractilidad y tensión en las zonas de adhesión.

Finalmente se despega el extremo posterior de la célula, para lo cual tienen que desensamblarse las adhesiones formadas anteriormente. Juegan aquí un papel muy importante los microtúbulos, y de hecho se ha visto que el tratamiento de las células con nocodazol impide su desintegración y provoca grandes adhesiones focales. Cada interacción entre los microtúbulos y la adhesión focal está asociada a una pausa en el crecimiento de los microtúbulos seguida de una rápida despolimerización que provoca la disminución en tamaño de la adhesión focal. El mecanismo exacto de cómo tiene lugar este desensamblaje no se conoce del todo, pero se cree que FAK, a través de su efector paxilina puede estar involucrada en este paso. (Etienne-Manneville 2013) Además del papel de los microtúbulos, la proteasa calpaína, que puede degradar numerosas proteínas presentes en las adhesiones focales, como por ejemplo talina, es requerida en muchos tipos celulares para la ruptura de las adhesiones. (Huttenlocher and Horwitz 2011)

### ● Migración ameboide

Este tipo de migración se caracteriza por ciclos de expansión y contracción del cuerpo celular. Las células tumorales con migración ameboide adoptan una morfología redondeada en sustratos 3D. Es a través de la cascada de señalización de Rho/ROCK que se produce un aumento en la contractilidad de la célula que finalmente permite que ésta sea capaz de colarse entre los huecos de la matriz extracelular. Al contrario de lo que sucede en la migración mesenquimal, en este tipo de migración no es necesaria la degradación de la matriz por metaloproteinasas. (Wyckoff, Pinner et al. 2006) Si bien es cierto que recientemente se ha visto que las células con este tipo de movimiento sí que secretan metaloproteinasas para invadir a través de colágeno I. (Orgaz, Pandya et al. 2014) Otra característica de este tipo de migración es que la célula apenas se adhiere al sustrato, por lo que la velocidad de la célula es mayor llegando a alcanzar incluso las 25 $\mu$ M/min, como en el caso de los linfocitos en colágeno. La protrusión típica que aparece en este tipo de movimiento es una protrusión similar a una burbuja que en inglés se denomina "*bleb*" generada por presión desde el citoplasma. Su formación consta de tres pasos: iniciación, expansión y retracción. (Charras and Paluch 2008) Se inicia cuando al contraerse la actina de la corteza celular no se rompe la adhesión entre la corteza y la membrana plasmática. Esta contracción es causada por la activación de miosina a cargo de los efectores de RhoA: ROCK y MLCK. Para que la célula migre, esta burbuja tiene que formarse en el extremo director. La presión generada por la contracción de actomiosina hace que entre citosol en la burbuja y de este modo la protrusión se expande. Durante la retracción se regenera la corteza de actomiosina y la burbuja se retrae. (Paluch and Raz 2013)

### ● Plasticidad entre migración mesenquimal y ameboide

En la figura I.11 se muestra una comparación entre los movimientos mesenquimal-elongado y ameboide-redondeado. Existen células con preferencia hacia uno u otro tipo, sin embargo los mecanismos de invasión mesenquimal y ameboide son intercambiables, así suprimiendo o potenciando las rutas de señalización que determinan el tipo de migración se consigue un cambio de uno a otro. Estos procesos se conocen como transición mesenquimal-ameboide (MAT), o ameboide-mesenquimal (AMT). Estas transiciones requieren cambios rápidos

en la célula y se dan como respuesta a cambios específicos en el ambiente. (Taddei, Giannoni et al. 2013)

Como se ha mencionado previamente, la migración ameboide recae principalmente sobre la contractilidad de actomiosina regulada por la ruta de señalización de Rho/ROCK. El silenciamiento de esta cascada fue el primer mecanismo que se describió como inductor de la transición ameboide-mesenquimal en las células de melanoma A375m2. (Sahai and Marshall 2003) En este mismo tipo celular, se vio que la unión de PDK1 a ROCK promovía la contractilidad de actomiosina. La pérdida de PDK1 resulta en un fenotipo elongado mesenquimal. (Pinner and Sahai 2008)

La cascada de Rho/ROCK no sólo es que induzca la migración ameboide al aumentar la contractilidad, sino que además impide la formación de lamelipodios mediada por Rac1. Esto lo consigue al activar ARHGAP22, un GAP de Rac1. Y de hecho, el silenciamiento de este GAP induce el fenotipo mesenquimal en células de melanoma. (Sanz-Moreno, Gadea et al. 2008) En este mismo estudio, Sanz-Moreno *et al* consiguieron inducir un fenotipo ameboide en A375P al inactivar Rac1 directamente o al inactivar su GEF DOCK3, o NEDD9, una proteína adaptadora que forma parte del complejo que se forma con DOCK3. (Sanz-Moreno, Gadea et al. 2008)

La inhibición de la contractilidad en el extremo director es necesaria para una correcta formación de las protrusiones durante la migración mesenquimal. La ausencia de RhoA en este extremo corre a cargo de la E3-ubiquitín ligasa Smurf1, ya que promueve su degradación proteolítica. Se ha visto que la inhibición de Smurf1 en células de carcinoma de colon es suficiente para inducir una transición mesenquimal-ameboide. (Sahai, Garcia-Medina et al. 2007)

Existen muchos más ejemplos de cómo se pueden inducir transiciones entre los dos modos de migración. (Sanz-Moreno and Marshall 2010) Lo importante es que las células son capaces de intercambiarlos y adaptarse al ambiente. Esto dificulta los tratamientos antitumorales, ya que no basta con bloquear un único tipo de invasión.



	Elongado-Mesenquimal	Redondeado-Ameboide
Velocidad	Lenta < 1µm	Rápida, ~10 µm
Polaridad	Múltiple, varios lamelipodios	Bien establecida
Adhesión	Fuerte; complejos de adhesión a la matriz extracelular vía integrinas	Débil
Organización citoesqueleto de actina	F-actina en el extremo director, fibras de estrés atravesando la célula	Estructuras contráctiles
Contractilidad actina miosina	Baja	Alta
GTPasas	RhoA bajo, Rac1 alto, Cdc42	RhoA alto, Rac1 bajo, Cdc42
Protrusiones celulares	Filpodios y Lamelipodios	<i>Blebs</i>

**Figura I.11. Movimiento mesenquimal frente a ameboide.** Comparación de los dos tipos de movimientos y sus características más importantes

### ● Migración colectiva

La migración colectiva es una migración coordinada de un grupo de células durante la cual las células se ven influenciadas por interacciones con sus vecinas. Se ha observado este tipo de migración entre otros procesos durante el desarrollo o durante la invasión de células cancerígenas. La comunicación entre las células se mantiene principalmente a través de las uniones adherentes. Se da tanto en células epiteliales como en células mesenquimales, ya que en muchos casos éstas siguen manteniendo cadherina en sus membranas. El conjunto de células se comporta como una única célula, en la que las células que se encuentran en el frente, las denominadas células líderes, son las que generan adhesiones vía integrinas y van abriendo paso al deshacer la matriz secretando metaloproteasas. Estas células líderes intercambian con el resto de células información, ya sea por interacción directa, o de forma paracrina con la secreción de factores solubles. Quedan aún muchas preguntas por responder en relación a este tipo de migración, como por ejemplo, qué señales inducen la formación de las células líderes. (Friedl and Gilmour 2009; Theveneau and Mayor 2013; Cai, Chen et al. 2014; Etienne-Manneville 2014)

### 1.3.3 RhoGTPasas en cáncer

Teniendo en cuenta la cantidad de procesos importantes en los que participan las pequeñas RhoGTPasas, como la proliferación, la migración, apoptosis o la supervivencia celular, no es de extrañar que jueguen un papel crucial en cáncer. De hecho, la expresión y/o actividad de las proteínas reguladoras de GTPasas, así como de las GTPasas mismas o de sus efectores se ha visto alterada en cáncer.

Diversos trabajos han publicado que la expresión de RhoA y RhoC está frecuentemente aumentada en tumores mientras que la de RhoB se encuentra disminuida. RhoA está implicada en la proliferación y supervivencia celular estimulando la transformación, y durante la progresión tumoral afecta a las uniones epiteliales. En cambio RhoC parece tener un papel más tardío, durante la invasión y metástasis, tal como se ha descrito en el cáncer de mama o durante la transición epitelio-mesénquima en cáncer de colon. (Parri and Chiarugi 2010)

Rac1 también aparece sobre-expresado en varios tipos de cáncer. Además, Rac1 es de las pocas RhoGTPasas que aparecen mutadas en algunos tumores. Se encuentra una mutación activadora de Rac1 (P29S) en mama y melanoma (Krauthammer, Kong et al. 2012; Davis, Ha et al. 2013) Es la tercera mutación activadora más frecuente en melanoma detrás de BRaf y NRas. Esta mutación confiere un cambio conformacional que induce una mayor unión a los efectores y promueve mayor proliferación y migración en melanocitos. (Bertolotto 2013) Además de la mutación directa de Rac1, existen varias mutaciones en melanoma que afectan a GEFs específicos de Rac1 como por ejemplo Tiam1, P-Rex1,2 y Ect2. (Lindsay, Lawn et al. 2011) De hecho, teniendo estos datos en cuenta, se han hecho estudios que demuestran que la inhibición de Rac1 mediante el uso de fármacos impedía el crecimiento del tumor y su propagación a otros órganos en modelos de ratón con NRas mutado. (Li, Ma et al. 2011; Li, Ma et al. 2012)

En el caso de Cdc42 también se ha encontrado una mutación activadora en melanomas, Cdc42G12V. (Hodis, Watson et al. 2012) Además CDC42 también aparece sobre-expresada en varios tipos de cáncer, como cáncer de mama o de testículos. (Alan and Lundquist 2013)



## I.4 Conexión núcleo-citoplasma

La envoltura nuclear comprende dos endomembranas concéntricas, la membrana nuclear externa (MNE) y la interna (MNI), relacionadas con el citoplasma y el nucleoplasma respectivamente. El nexo que une estas membranas desde el nucleoesqueleto hasta el citoesqueleto está formado por las proteínas SUN y KASH y se denomina complejo LINC. (Starr and Fridolfsson 2010)

La conexión entre el núcleo y el citoplasma es crítica para un correcto posicionamiento del núcleo dentro de la célula. Este posicionamiento es fundamental para procesos como la migración nuclear, la adhesión de los centrosomas al núcleo o la transmisión de fuerza entre el núcleo y el citoesqueleto. (Starr, Hermann et al. 2001; Zhang, Lei et al. 2009; Lombardi, Jaalouk et al. 2011) La importancia de esta conexión se ve reflejada en el hecho de que mutaciones en las proteínas que participan en esta unión contribuyen a enfermedades como la distrofia muscular de Emery-Dreifuss, ataxia, progeria y cáncer. (Chen, Chi et al. 2012; Luxton and Starr 2014)

### **I.4.1 Complejo LINC: Proteínas SUN y KASH**

Como se ha mencionado, son las proteínas SUN y KASH las que establecen el puente entre el citoesqueleto y el núcleo.

#### ● Proteínas SUN

Las proteínas SUN (de Sad1 y UNC-84) se encuentran principalmente en la MNI. (Figura I.12) Su conservado dominio carboxilo-terminal (el dominio SUN) se encuentra localizado en el espacio perinuclear (el espacio entre la MNI y la MNE), mientras que el variable dominio amino-terminal se encuentra en la región nucleoplásmica. En mamíferos existen 5 isoformas diferentes, SUN1-5, cuya expresión depende del tipo celular. (Sosa, Kutay et al. 2013) En el nucleoplasma, estas proteínas interactúan con la lámina nuclear subyacente a la MNI. Esta lámina está constituida por una red de filamentos intermedios denominados laminas, incluyendo los tipos A, C (dos isoformas diferentes a partir de *splicing* alternativo del mismo gen) B1 y B2. El dominio N-terminal de las proteínas SUN1 y SUN2 se une a la lamina A. (Haque, Lloyd et al. 2006) Además de unir la lámina

nuclear a la envoltura nuclear, las proteínas SUN también se anclan directamente a la cromatina y regulan de esta manera la expresión génica. (Starr and Fridolfsson 2010; Dahl and Kalinowski 2011)

#### ● KASH

Las proteínas KASH (Klarsicht, ANC-1, Syne homology) se localizan en la MNE. La hélice transmembrana junto con los 8-30 residuos que forman la cola de la proteína localizada en el espacio perinuclear están muy conservadas y forman el denominado dominio KASH. (Sosa, Kutay et al. 2013) En humanos las proteínas KASH, llamadas nesprinas, están codificadas por 5 genes diferentes, algunos de los cuales pueden dar lugar a múltiples isoformas por *splicing* alternativo. Las nesprinas-1 y 2 contienen un dominio N-terminal citoplasmático que se une a la actina del citoesqueleto, Nesprina-3 se une a filamentos intermedios y Nesprina-4 se une a los microtúbulos a través de la kinesina. (Figura I.12) Además, recientemente se ha visto que las nesprinas-1 y 2 son capaces de unirse al extremo N-terminal de otras proteínas KASH. (Lu, Schneider et al. 2012) También se sabe que las nesprinas-1 y -2 interactúan con los motores de microtúbulos dineína y kinesina, pero no está claro que esta conexión sea directa. (Gundersen and Worman 2013)

#### ● El complejo LINC

Este complejo lo componen las proteínas SUN y KASH. Su función principal es la de mantener una unión entre el citoesqueleto y el nucleoesqueleto, y dado que la fuerza que se transmite entre estas dos estructuras es alta, la interacción entre SUN y KASH tiene que ser fuerte y estable. En la región perinuclear las proteínas SUN forman un homotrímero que sirve de plataforma para la unión de tres péptidos de KASH. (Rothballer, Schwartz et al. 2013)

Las proteínas KASH, gracias a la unión que establecen con las proteínas SUN son capaces de mover el núcleo. Esto lo consiguen mediante dos mecanismos diferentes. Por una parte por la unión de Nesprina-4 a proteínas motoras como dineína o kinesina, que proporcionan la fuerza para que los núcleos se muevan a lo largo de los microtúbulos. (Fridolfsson and Starr 2010) El segundo mecanismo mediante el cual consiguen mover el núcleo es a través de la unión de nesprina-1 y 2 a los filamentos de actina. (Luxton, Gomes et al.

2010) En ratones dobles knockout para SUN1 y SUN2 y nesprinas-1 y -2 la neurogénesis y la migración neuronal se ven alteradas precisamente por un fallo en el movimiento nuclear. (Zhang, Lei et al. 2009)

La elasticidad del núcleo viene en parte determinada por las proteínas del complejo LINC. (Hale, Shrestha et al. 2008) De hecho, la depleción de alguno de los dos componentes del complejo acarrea defectos en la estructura nuclear y una consecuente disminución de la rigidez tanto del núcleo como del citoplasma. (Lammerding, Schulze et al. 2004) Las moléculas del complejo LINC juegan un papel importante en la migración colectiva en 2D, si bien es cierto que se sabe poco sobre su implicación en 3D. (Wirtz, Konstantopoulos et al. 2011) Se han encontrado mutaciones en cáncer de mama en nesprinas y laminas A/C que podrían afectar a la conexión núcleo-citoplasma y alterar la motilidad y la capacidad invasiva de estas células. (Wood, Parsons et al. 2007)

El complejo LINC también sirve para la mecanotransducción (la conversión de un estímulo mecánico extracelular en señales bioquímicas) a través de la envoltura nuclear. (Isermann and Lammerding 2013) Es decir, una estimulación mecánica de la célula produce cambios morfológicos en el núcleo que como consecuencia produce cambios en la organización de la cromatina favoreciendo la unión al DNA de determinadas enzimas y factores de transcripción, modulando así la expresión génica. Además la sobre-expresión de un dominante negativo de SUN tiene como consecuencia la acumulación de NFkB en el núcleo. (Brosig, Ferralli et al. 2010) Es decir, un complejo LINC intacto parece regular no sólo la transcripción a través de la reorganización de la cromatina, sino que además regula la presencia de factores de transcripción en el núcleo.

La estabilidad mecánica de las células y la capacidad de responder adecuadamente a la tensión a la que se ven sometidas se ve deteriorada al romper el complejo LINC y ello conlleva fallos en la motilidad de la célula y la mecanotransducción. Esta desregulación en la mecanotransducción se está viendo que tiene consecuencias importantes que pueden promover la tumorigénesis y metástasis. Dado que la conexión núcleo-citoplasma es clave en este tipo de señalización se puede deducir que la envoltura nuclear en su conjunto puede jugar un papel clave en el desarrollo del cáncer. (Jaalouk and Lammerding 2009; Wang, Tytell et al. 2009; Lombardi, Jaalouk et al. 2011)

### I.4.2 Las laminas

No forman parte directa del puente que une el núcleo con el citoesqueleto, pero dado que SUN1 y 2 se unen a las laminas juegan un papel muy importante en el proceso de conectar las señales citoplasmáticas con las nucleares.

Las laminas son filamentos intermedios de tipo V y componentes fundamentales del nucleoesqueleto. En humanos hay tres genes que codifican para laminas, el gen *LMNA* que por *splicing* alternativo genera las laminas A y C, y los genes *LMNB1* y *LMNB2* que codifican para las laminas B1 y B2 respectivamente. (Gruenbaum, Margalit et al. 2005) La lamina B3 específica de testículos se da por *splicing* alternativo de *LMNB2*. (Furukawa and Hotta 1993) Cuando fueron descubiertas hace 35 años se creyó que eran meras proteínas estructurales, pero hoy en día se sabe que además de eso son mucho más. Son capaces de regular la organización de la cromatina y otros aspectos del metabolismo nuclear incluyendo la transcripción y la replicación, por ejemplo la lamina B1 es esencial para la síntesis de RNA y actividad de la RNA polimerasa I y II. (Tang, Maya-Mendoza et al. 2008) Además, las laminas están en contacto con proteínas de la envoltura nuclear, como SUN1 y SUN2 (Haque, Mazzeo et al. 2010) de modo que forman parte de la maquinaria que contacta el citoesqueleto con el núcleo pudiendo influir sobre el comportamiento celular. Por lo general las laminas A/C contribuyen más a las funciones mecánicas del núcleo, así, una disminución en su expresión está asociada con menor rigidez nuclear y por tanto también citoplásmica. Es necesario un equilibrio, ya que menor rigidez nuclear puede implicar mayor migración en algunos casos (Harada, Swift et al. 2014), pero si es demasiado baja puede limitar la supervivencia. De hecho existen muchas enfermedades asociadas a mutaciones en el gen *LMNA* y una ausencia de lamina A/C induce defectos en la mecánica celular en la polarización y en la migración. (Lee, Hale et al. 2007; Worman and Bonne 2007) La expresión de la lamina A se ve alterada en varios tipos de cáncer. De hecho, la pérdida de lamina A es bastante habitual en ciertos tumores y se utiliza como biomarcador e indicador de mala prognosis. (Prokocimer, Margalit et al. 2006; Foster, Przyborski et al. 2010) No se explica bien la razón por la cual se produce esta pérdida en ciertos tumores, sobre todo porque no es algo común a todos los tipos de cáncer, más bien todo lo contrario, en carcinoma colorrectal es la sobre-expresión de lamina A la que correlaciona con un mayor potencial metastático jugando un

papel importante en el potencial tumorigénico de estas células. (Willis, Cox et al. 2008)

En el caso de las laminas B, bloquear su expresión en células HeLa conlleva una parada proliferativa y apoptosis. (Burke and Stewart 2013) De acuerdo a estos experimentos, en fibroblastos humanos se asocia una disminución en la expresión de la proteína lamina B1 con mayor senescencia. (Shimi, Butin-Israeli et al. 2011) Aunque la senescencia también está ligada a la lamina A. Daños producidos en la lamina A causados por la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) también provocan senescencia. (Pekovic, Gibbs-Seymour et al. 2011) Dado que muchas cascadas de señalización convergen en las laminas, no es de extrañar que daños en las laminas activen señales que induzcan senescencia o muerte celular. (Simon and Wilson 2011)

En conclusión, existe una estrecha relación entre el comportamiento celular, las laminas y el citoesqueleto.

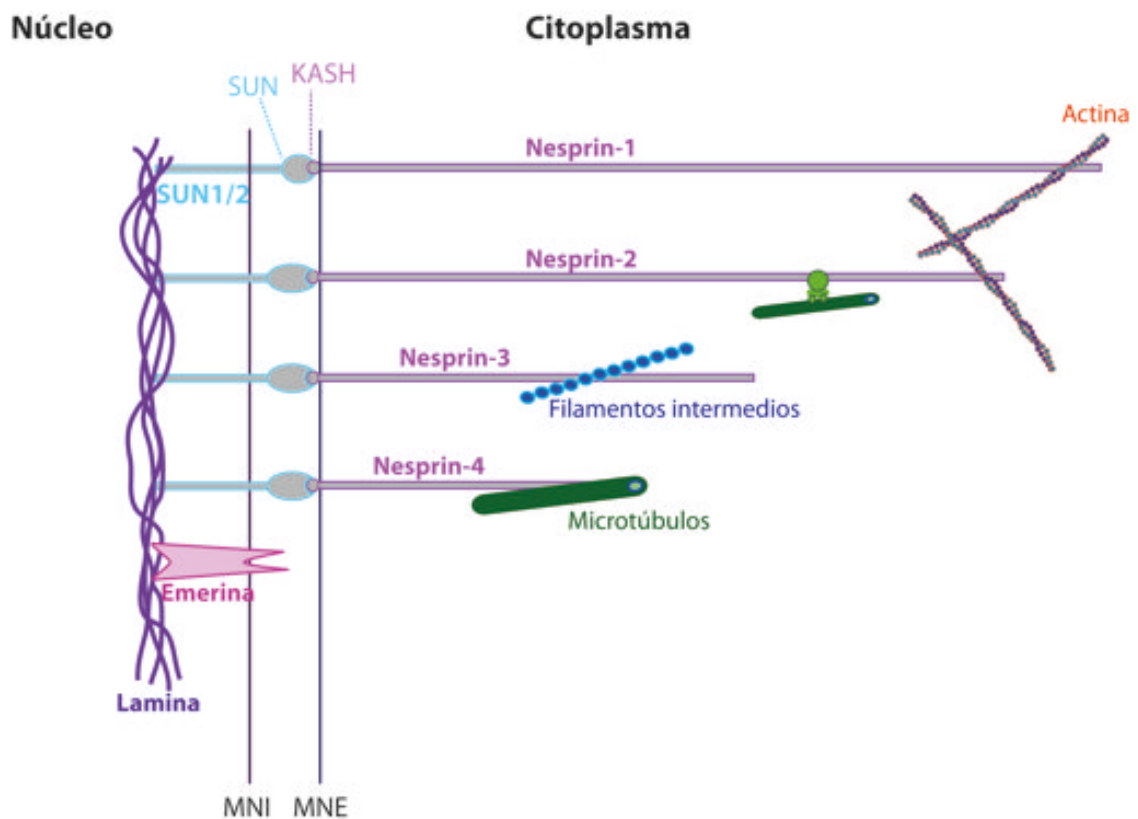
### **I.4.3 Emerina**

La proteína emerina es una proteína localizada principalmente en la membrana nuclear interna y se une directamente a la lamina subyacente (Figura I.12). Además, también es capaz de unirse al dominio nucleoplásmico de las proteínas SUN y a nesprinas (Mislow, Holaska et al. 2002; Haque, Mazzeo et al. 2010) Así pues existe un contacto directo entre el complejo LINC y emerina, pudiendo ésta de este modo contribuir a la transmisión mecánica entre citoplasma y núcleo entre otras cosas. De hecho, se sabe que la emerina es necesaria para la acumulación nuclear del factor de transcripción MKL1. Este factor de transcripción es traslocado al núcleo en respuesta a una señal mecánica, donde finalmente activa la transcripción de genes relacionados con proteínas del citoesqueleto. En MEFS emerina  $-/-$  apenas hay MKL1 tras un estímulo mecánico. (Ho, Jaalouk et al. 2013)

Mutaciones en el gen de la emerina conllevan enfermedades como la distrofia muscular de Emery-Dreifuss, causada también por mutaciones en la lamina A. En MEFs sin emerina se ha observado que el porcentaje de células con morfología defectuosa de los núcleos es más alto que en los que sí que tienen

emerina. (Lammerding, Hsiao et al. 2005) Estas células además son más propensas a entrar en apoptosis cuando se ven sometidas a una fuerza mecánica continua, posiblemente debido a su imposibilidad de activar ciertos genes en respuesta a estrés mecánico, como por ejemplo el gen *IEX-1*. La expresión de este gen evitaría que las células entraran en apoptosis. Se produce una reducción en la elasticidad de la envoltura nuclear que probablemente también contribuya a la fragilidad nuclear en pacientes con la enfermedad de Emery-Dreifuss.

En resumen, hay varios estudios que sugieren que la proteína emerina contribuye a la arquitectura nuclear y es importante para mantener la integridad estructural y la función de la envoltura nuclear. (Berk, Tiffet et al. 2013)



**Figura 1.12. Esquema de la envoltura nuclear.** Esquema que muestra los componentes principales involucrados en la conexión nucleoesqueleto-citoesqueleto. Las nesprinas en su dominio citoplasmático se unen al citoesqueleto, mientras que las proteínas SUN y emerina se unen a las laminas. En el espacio entre la membrana nuclear externa e interna es donde entran en contacto los dominios SUN y KASH.

#### **1.4.4 Pleomorfismo nuclear y cáncer**

Las células cancerosas se caracterizan en muchas ocasiones por la presencia de núcleos con morfología aberrante, similares a aquellos núcleos deficientes en laminas. (Dey 2009) De hecho, cambios en la expresión de las laminas han sido correlacionados con un mayor potencial tumorigénico. (Chow, Factor et al. 2012). Por ejemplo, una disminución en la expresión de las laminas A/C se asocia a linfomas, leucemias, cáncer de colon o cáncer de mama entre otros. (Belt, Fijneman et al. 2011; Capo-chichi, Cai et al. 2011) Uno de los procesos más importantes en el desarrollo del cáncer es la metástasis, para la cual la célula tiene que migrar escapando del tumor primario, intravasarse al torrente sanguíneo, transportarse a otros lugares, salir del torrente sanguíneo (extravasarse) y colonizar un órgano nuevo. Como se ha comentado previamente, cambios en la expresión de algunos elementos clave de la envoltura nuclear aumentan la plasticidad de dicho orgánulo. Esto finalmente puede favorecer la migración celular al facilitar el paso a través de lugares más estrechos. (Friedl, Wolf et al. 2011)

Sin embargo, no sólo el cambio en la expresión de las laminas se asocia al cáncer. Así por ejemplo, la nesprina-1 se asocia a cáncer de ovario y cáncer colorrectal y la nesprina-2 a cáncer de mama. (Luxton and Starr 2014)

El pleomorfismo nuclear también puede deberse a defectos en la segregación de cromosomas durante la mitosis, dando lugar, por ejemplo a núcleos lobulados. (Chow, Factor et al. 2012) La alteración en la expresión de los componentes de la envoltura nuclear puede inducir estos fallos en mitosis que contribuyen a la inestabilidad genómica presente en muchos tumores.

Por tanto, la expresión de las proteínas de la envoltura nuclear se ve alterada en numerosos tipos de cáncer y, de hecho, el pleomorfismo nuclear es usado por los patólogos en el diagnóstico de esta enfermedad (de Las Heras, Batrakou et al. 2013)

A pesar de todo, poco se sabe del mecanismo a través del cual se producen estas alteraciones en la morfología nuclear. Durante la introducción de esta tesis se ha descrito cómo existe una estrecha relación entre el

nucleoesqueleto y el citoesqueleto a través del complejo LINC y cómo los componentes de la envoltura nuclear contribuyen a la plasticidad del núcleo. Por otro lado, se sabe que las pequeñas RhoGTPasas son unas proteínas clave en la regulación del citoesqueleto, tanto de actina como de tubulina y que controlan funciones biológicas importantes como la migración y la división celular. Es por ello que nos propusimos estudiar si las RhoGTPasas, a través del citoesqueleto y el complejo LINC, tenían capacidad de regular la morfología nuclear.





## II. Objetivos

O

En concreto los objetivos de esta tesis han sido:

1. Determinar si las pequeñas RhoGTPasas influyen sobre la morfología nuclear.
2. Determinar el mecanismo a través del cuál las pequeñas GTPasas Rho regulan el cambio morfológico nuclear
3. Determinar la repercusión biológica de dicha alteración.



## III. Materiales y Métodos

---



## III.1. Análisis y manipulación del ADN

### III.1.1 Purificación de ADN plasmídico

La purificación de ADN plasmídico se llevó a cabo a partir de cultivos bacterianos derivados de cepas transformadas de *Escherichia coli* DH5a. Los cultivos bacterianos se crecieron en un volumen total de 400 ml de medio de cultivo *Luria Broth* (LB) durante 12 horas, a una temperatura de 37 °C en presencia del antibiótico de selección adecuado a la resistencia proporcionada por el plásmido (generalmente ampicilina o kanamicina) a una concentración de 50 µg/ml.

Tras ese periodo, los cultivos bacterianos se centrifugaron durante 10 minutos a 6.000 rpm. El sedimento celular se resuspendió en 10 ml de un tampón de resuspensión (50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA, 10 µg/ml RNasa A), y se lisó con 10 ml de un tampón de lisis (200 mM NaOH y 1% SDS), mezclándolo por inversión e incubándolo durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 10 ml de una solución de neutralización que contiene 3 M de acetato potásico a un pH 5.5, y se incubó durante 5 minutos en hielo. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se centrifugó en una centrifuga refrigerada (4°C) durante 20 minutos a 10.000 rpm, o bien se pasó por una jeringa con filtro. Finalmente, el sobrenadante se pasó por columnas de intercambio de *Qiagen*, siguiendo las instrucciones del fabricante (*QIAfilter Plasmid Maxi Kit*). Al eluido obtenido se le añadió 15 ml de isopropanol frío, dejando precipitar el ADN durante cinco minutos a temperatura ambiente. Para obtener el ADN precipitado, se centrifugó la mezcla durante 30 minutos a 10.000 rpm y a 4°C. A continuación se realizó un lavado del precipitado utilizando etanol al 70%, se secó y se resuspendió en un volumen de 300 µl de agua destilada estéril. El ADN purificado se guardó a una temperatura de -20°C para su posterior uso tanto en transfecciones celulares como en clonajes.

También se realizaron purificaciones a pequeña escala de ADN plasmídico, partiendo de 5 ml de cultivo bacteriano y siguiendo las instrucciones recomendadas por *Macherey-Nagel*, fabricante del kit de extracción de ADN plasmídico *NucleoSpin Plasmid*. Este kit también consiste en un primer paso de resuspensión del sedimento del cultivo, procedido de una lisis durante un minuto



y una neutralización. A continuación, la mezcla neutralizada se pasó por una columna de intercambio, sobre la cual se realizaron una serie de lavados. Por último, el ADN plasmídico se resuspendió en un volumen final de 40  $\mu$ l, almacenándose a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para su posterior uso para clonajes.

### III.1.2 Purificación de ADN genómico de tejido

Para la extracción de DNA genómico de tejido de embrión de pollo se usó el Gentra Puregen Tissue kit de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se lisa el tejido con el buffer de lisis en un politrón y se deja luego toda la noche a  $55^{\circ}\text{C}$  para completar la lisis. Se añade RNasaA y la solución de precipitación de proteínas. Se da con el vortex y se centrifuga 3 minutos a 13000 g. El sobrenadante se añade luego a un tubo con isopropanol y se mezcla bien para conseguir que precipite el ADN. Se centrifuga 1 minuto a 13000 g y se tira con cuidado el sobrenadante. Para lavar el ADN se añade etanol al 70% y se centrifuga 1 minuto a 13000 g. Se quita el etanol y se deja secar 10 minutos al aire. Posteriormente se añade la solución de hidratación y se deja agitando toda la noche para que se disuelva el ADN

### III.1.3 Amplificación de fragmentos de ADN por PCR

Para la amplificación de fragmentos de ADN, siempre se buscó alta fidelidad en la polimerización usando polimerasas oportunas (Roche).

Las condiciones usadas para llevar a cabo la PCR (Polymerase Chain Reaction) variaron en función de los oligonucleótidos empleados y del ADN molde en cuestión. Normalmente, la técnica comienza con un primer paso de  $95^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos para desnaturalizar la doble hebra de ADN, seguido de 30-35 ciclos de [ 1 minuto a  $95^{\circ}\text{C}$ , 1 minuto a  $54-58^{\circ}\text{C}$  para la óptima hibridación de los oligonucleótidos, 1 minuto a  $72^{\circ}\text{C}$  para elongar la hebra naciente ] y por último  $72^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, con el que se completa la elongación de los fragmentos. Las reacciones se hicieron en un volumen de 50  $\mu$ l y las concentraciones de los reactivos se eligieron según la recomendación de cada fabricante. Para calcular la temperatura de hibridación se escogió la  $T_m$  más baja de los dos cebadores y se restaron  $5^{\circ}\text{C}$  a esta temperatura. Una vez terminada la amplificación se mantienen indefinidamente las muestras a  $4^{\circ}\text{C}$ . Según el

tamaño de PCR obtenido se corre la muestra en geles de agarosa variando el porcentaje en función del tamaño de inserto.

### III.1.4 Digestión con endonucleasas de digestión y purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Para la realización de clonajes y subclonajes, uno de los abordajes más empleados ha sido mediante digestiones realizadas con endonucleasas de restricción. Las digestiones de los plásmidos se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones de la casa comercial correspondiente (Fermentas o Invitrogen) en función de la enzima utilizada.

Tanto los fragmentos originados en las digestiones, como aquellos originados tras realizar una PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa (Pronadisa) en un tampón TAE (0.09 M Tris-acetato, 2 mM EDTA), utilizando *SYBR Safe* (Invitrogen) como agente intercalante de tinción de ADN. Se añadió a las muestras un tampón de carga (0.005% (w/v) de azul de bromofenol y 30% de glicerol), y se sometieron a un campo eléctrico de 70-80V en un gel de agarosa de concentración variable en función del tamaño del inserto que queramos analizar. Como marcadores de peso molecular se usó *1Kb DNA ladder* y *100 pb DNA ladder* de Invitrogen.

La banda correspondiente al fragmento de ADN que se desea purificar se recortó del gel de agarosa. Posteriormente, se extrajo el ADN de la agarosa mediante *kits* especiales de purificación de ADN en gel, como es el caso de *JETquick* o *GeneClean*. Ambos se basan en la fusión de la banda de gel que contiene el ADN de interés, a continuación se deben pasar por una columna de intercambio o incubarse con una resina de intercambio, respectivamente. Por último, se realizaron lavados de las muestras y se eluyeron en un volumen de 20  $\mu$ l.

### III.1.5 Clonación de ADN en vectores plasmídicos

Los fragmentos digeridos o amplificados por PCR y posteriormente digeridos, se incubaron junto a los vectores plasmídicos digeridos con las mismas enzimas de restricción, bajo una reacción catalizada por la enzima T4 ligasa (Promega) en un tampón de ligación (300 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10

mM ATP, 100 mM DTT). Las reacciones se hicieron utilizando 20 unidades enzimáticas en un volumen de 20  $\mu$ l e incubándolas mínimo 3 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente, las ligaciones se utilizaron para transformar la cepa bacteriana DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (Invitrogen). Para ello, se añadió 2  $\mu$ l de la mezcla de ligación a una alícuota de bacterias competentes. Se mantuvieron durante 30 minutos en hielo, a continuación se les sometió a un choque térmico de 1 minuto a 42 °C, y por último 5 minutos de hielo. Tras el choque térmico, durante una hora se mantienen las células en un medio de cultivo permisivo SOC (Invitrogen), carente de antibióticos, con el fin de dar tiempo a las células a que expresen resistencia al antibiótico codificado por el plásmido incorporado. Por último, la mezcla se siembra en una placa de LB-Agar con 1.5% de agar y 50  $\mu$ g/ml de ampicilina o kanamicina en función del antibiótico de selección necesario. Se obtuvieron, a las 24 horas, colonias de bacterias con expresión del plásmido clonado. Estas colonias de bacterias pueden ser trasladadas a un medio de cultivo líquido para la posterior purificación de ADN plasmídico.

### III.1.6 Plásmidos

A continuación se detallan los plásmidos utilizados para la realización de esta tesis.

Plásmido	Descripción
pEGFP	Se usó para igualar las concentraciones de ADN de cada transfección realizada; Se usó como control.
pEGFP Rac1Q61L	Expresa la proteína Rac1 constitutivamente activa; Fusionada a GFP; Cedido por X.Bustelo
pmCherryRac1 V12	Expresa la proteína Rac1 constitutivamente activa; Fusionada a proteína cherry; Cedido por X.Bustelo
pCEFLHA Rac1Q61L	Expresa la proteína Rac1 constitutivamente activa; Contiene el epítipo HA
pCEFLHA Rac1N17	Expresa la proteína Rac1 dominante negativa; Contiene el epítipo HA
pEGFPRac1N17	Expresa la proteína Rac1 dominante negativa; Fusionada a GFP
pEGFP RhoAQ63L	Expresa la proteína RhoA constitutivamente activa; Fusionada a GFP; Cedido por X.Bustelo
pCEFLHA RhoAQL	Expresa la proteína RhoA constitutivamente activa; Contiene el epítipo HA

pCEFLHA RhoAN17	Expresa la proteína RhoA dominante negativa; Contiene el epítipo HA
pEGFP Cdc42Q61L	Expresa la proteína Cdc42 constitutivamente activa; Fusionada a GFP; Cedido por X.Bustelo
pCEFLHA Cdc42Q61L	Expresa la proteína Cdc42 constitutivamente activa; Contiene el epítipo HA
pCEFLHA Cdc42N17	Expresa la proteína Cdc42 dominante negativa; Contiene el epítipo HA
pEGFPRac1QL,F37A	Expresa la proteína Rac1 constitutivamente activa con la mutación F37A; Fusionada a proteína GFP; Cedido por X.Bustelo
pEGFPRac1QL,Y40C	Expresa la proteína Rac1 constitutivamente activa con la mutación Y40C; Fusionada a proteína GFP; Cedido por X.Bustelo
pCDNA3HA Rac1SAAX	Expresa la proteína Rac1 constitutivamente activa, pero no se une a membranas ni a RhoGDI; Contiene el epítipo HA; Cedido por X.Bustelo
pCEFLFlag RhoGDI	Expresa la proteína RhoGDI en su forma silvestre; Contiene el epítipo Flag
pCEFLHA RanQ69L	Expresa la proteína Ran constitutivamente activa; Contiene el epítipo HA
pEGFP Kash2 Domain	Rompe la interacción entre SUN y KASH; Fusionada a la proteína GFP; Cedido por I.Lammerding
pCDHEF1-SUNDN	Expresa el dominio luminal de la proteína SUN1; Rompe la interacción entre SUN y KASH; Fusionada a la proteína GFP; cedido por
pEGFP Oncovav2	Expresa la proteína Vav2 constitutivamente activa; Fusionada a GFP; Cedido por X.Bustelo
pCEFLFlag Stathmin	Expresa la proteína estatmina en su forma silvestre; Contiene el epítipo Flag
pSRE luc	Vector para ensayo luciferasa. La luciferasa se encuentra bajo el promotor SRE; Cedido por X. Bustelo

Tabla III.1. Plásmidos utilizados.

## III.2 Cultivos celulares

### III.2.1 Métodos de transfección

#### ● Precipitación con fosfato de calcio

Las células fueron plaqueadas el día previo a la transfección con una densidad de  $3 \times 10^6$  células en cada placa de 60 mm. Al día siguiente, para cada placa se prepararon dos mezclas de transfección consistentes en:

solución 1: Hepes 50 mM/NaCl 280 mM; pH 7.1 (490 $\mu$ l) y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 70 mM; pH 7.1 (11.2 $\mu$ l)

solución 2: CaCl<sub>2</sub> 0.25 M (502,5 $\mu$ l) y la cantidad apropiada de cada ADN (1 $\mu$ g de cada plásmido)

El contenido de la solución 2 se mezcló, gota a gota, con el contenido de la solución 1, al tiempo que se burbujea suavemente. A continuación, se dejó reposar durante media hora, tras lo cual se agregó el precipitado a las placas. La cantidad total de ADN fue igualada en todas las muestras con el vector vacío. Al día siguiente las células fueron lavadas con PBS 1X y se les puso medio DMEM suplementado con un 10% de suero. Se dejó un tiempo oportuno para el crecimiento de las células y la expresión de la proteína exógena (1 ó 2 días).

#### • Transfección con el reactivo Fugene

Este método de transfección aporta la ventaja de que las células pueden ser pasadas en el mismo momento de la transfección, sin necesidad de plaquear las células el día antes. En contra, su eficiencia es muy baja por lo que puede ser buen método para la generación de sublíneas estables. Además también se puede usar para las células que vayan a ser procesadas para inmunofluorescencia, ya que es el método que menos señal de fondo genera.

En primer lugar se realizó una mezcla con 3  $\mu$ l del reactivo FuGene y 97  $\mu$ l de medio de cultivo DMEM. Se agitó la mezcla y se dejó reposar durante 5 minutos. Posteriormente se añadió la cantidad de ADN necesario, agitando de nuevo y dejándolo 20 minutos más de reposo. A continuación, la mezcla generada se añadió a las células encima de su medio de cultivo completo. Las células permanecieron con la mezcla el tiempo necesario para la expresión de la proteína, normalmente 1 ó 2 días.

#### • Transfección con el reactivo lipofectamina 2000

En el laboratorio utilizamos dos métodos diferentes de transfección con lipofectamina 2000. En el primero se preparan dos tubos con igual volumen de medio Optimem y se añade por una parte el ADN y por otra el reactivo, tres microlitros/microgramo de ADN. Tras cinco minutos se juntan los dos tubos y se dejan 25 minutos. Pasado este tiempo se añade a las células, habiendo lavado éstas previamente con PBS, y se deja durante 5 horas con la mezcla y medio

DMEM sin suplementar. Transcurridas estas horas, se lava la placa y se añade medio nuevo.

El siguiente método es más efectivo para algunos tipos celulares, como por ejemplo las A375p. En este caso, se preparan igualmente dos tubos, con 250 microlitros de Optimem cada uno por pocillo de T6. A uno de los tubos se le añade el ADN, al otro 7,5 microlitros de lipofectamina 2000. Se da un pequeño vortex y se espera cinco minutos antes de juntar el medio de los dos tubos y volver a dar vortex. Llegado a este punto se espera 25 minutos antes de echarlo a las células, previamente lavadas con PBS. Se deja a las células con esos 500 microlitros durante 30-45 minutos, período tras el cual se completa las células con dos mililitros de DMEM con una concentración de suero de 10%.

Se dejaron las células 24-48 horas con el fin de que expresaran la proteína exógena.

Posteriormente a cada tipo de técnica de transfección empleada y una vez sometidas a las condiciones deseadas en cada experimento, las células se recogieron en hielo, o a temperatura ambiente, con el tampón de lisis adecuado para cada experimento en concreto. O bien fueron fijadas en paraformaldehído al 4% o en metanol a -20 grados centígrados.

### III.2.2 Obtención de sublíneas estables

A partir de las células parentales se transfectaron diferentes vectores, en función de la sublínea que se pretendía generar, siguiendo distintos métodos de transfección, generalmente Lipofectamina o FuGene. Todos los vectores usados llevan un gen de resistencia a algún antibiótico que permite seleccionar las células transfectadas con la concentración óptima de dicho antibiótico. El antibiótico utilizado para la realización de dicha tesis ha sido la geneticina (0.75 µg/µl).

Tras, aproximadamente, 10 ó 15 días en presencia del antibiótico se obtuvieron colonias puntuales, que permitieron ser aisladas para continuar su crecimiento por separado utilizando para ello discos de tripsina. En otros casos, los clones de colonias transfectadas se mezclaron obteniendo un *pool* de sublíneas, resultantes de la misma transfección. La expresión ectópica de cada

línea fue comprobada mediante la técnica de *western blot*, utilizando para su detección un anticuerpo frente a la proteína sobreexpresada, o bien un anticuerpo para un epítipo en el caso de que la proteína lo portara

### III.2.3 Ensayos de proliferación: Curvas de crecimiento

Como primer paso, las células de cada tipo celular con las que se iba a realizar el ensayo fueron tripsinizadas y recogidas para ser contadas mediante la cámara de Neubauer o el empleo del Nucleocounter (técnica basada en la tinción con yoduro de propidio del DNA de los núcleos). Posteriormente, tras realizar las diluciones oportunas, las células fueron sembradas en igual número inicial, utilizando para cada punto un mínimo de dos réplicas.

A cada tiempo estimado en el experimento (normalmente 24 horas) las células eran recogidas en tripsina, a la que se añadía medio con suero con el fin de inactivarla, realizando el contaje en cada punto con cualquiera de los dos métodos descritos previamente, repitiendo este procedimiento hasta el tiempo máximo requerido.

### III.2.4 Líneas celulares

Línea celular	Origen	Origen de Propagación
<b>HEK 293T</b>	Células embrionarias de riñón humano Antígeno T positivas	DMEM 10% SF
<b>HeLa</b>	Células epiteliales de endometrio humanas	DMEM 10% SF
<b>C2C12</b>	Mioblastos de ratón	DMEM 10% SF
<b>SK-MEL 2</b>	células humanas derivadas de metástasis en piel	DMEM 10% SF
<b>SKMEL 28</b>	células humanas derivadas de melanoma	DMEM 10% SF
<b>CHL</b>	células epiteliales de melanoma humano	DMEM 10% SF
<b>A375P</b>	células epiteliales de melanoma humano	DMEM 10% SF

Tabla III.2. Resumen de las líneas celulares utilizadas en este trabajo. Se detallan las diferentes líneas celulares utilizadas en la realización de esta tesis.

#### ● Tratamientos

En algunos experimentos hubo que tratar las células con los siguientes compuestos. Blebbistatin 5  $\mu\text{M}$ , citocalasina D 1  $\mu\text{M}$  y nocodazol 0,5  $\mu\text{M}$ .

## III.3 Análisis de proteínas

### III.3.1 Detección de proteínas

#### ● Western Blot

Para la obtención de los extractos totales de proteína proveniente de cultivos celulares, se eliminó el medio de cultivo de las placas y se lisaron con el volumen adecuado de un tampón de lisis apropiado. En nuestro caso se usó un tampón de lisis constituido por: 20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM EGTA, 40 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 1% detergente no iónico NP40, 2.5 mM  $MgCl_2$ , 1mM ortovanadato, 1mM DTT y extemporáneamente 10 $\mu$ g/ml aprotinina y 10 $\mu$ g/ml leupeptina. Las células se recogieron y se centrifugaron a 13.000 rpm, durante 7 minutos y a 4 °C, para su clarificación. Se separaron los extractos de proteínas del resto de componentes de las células y se procedió a la cuantificación de la concentración proteica de cada lisado. Para la determinación de la cantidad de proteína se usó el método de Bradford (Bradford, 1975) y se realizó la medida a una longitud de onda de 620 nm en un aparato de ELISA.

Se tomaron aproximadamente 50  $\mu$ g de proteína, a los que se añadió tampón Laemli 5X (100 mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 20 mM DTT y 0.005% azul de bromofenol). Tras hervir las muestras durante cinco minutos, se sometieron a electroforesis en un gel vertical de poliacrilamida (29:1)-SDS (dodecil sulfato sódico) de un porcentaje adecuado al tamaño de la proteína a analizar. Se usó un porcentaje del 12% de acrilamida para las proteínas menores de 45 kDa, del 10% para detectar proteínas entre 45 y 100 kDa, y del 8% para proteínas de gran peso molecular. La electroforesis vertical se llevó a cabo en un tampón con 25 mM Trizma base, 192 mM glicina y 0.1% SDS. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa fijando el amperaje en 400 mA durante el tiempo apropiado en función del tamaño de la proteína, en un tampón de Trizma base 25 mM y 192 mM Glicina, o bien en membranas de PVDF a un voltaje constante de 100 V durante una hora en un tampón Trizma base 25 mM, 192 mM glicina y 10% metanol.

Finalizada la transferencia, las membranas se incubaron durante una hora, a temperatura ambiente y con agitación, en una solución de TBS-T (Tris Buffered Saline-Tween; 20 mM Tris pH 7.5, 137 mM NaCl y 0.05% de Tween 20) con un



4% de BSA, para bloquear los sitios inespecíficos. Tras ello, los filtros fueron incubados con el anticuerpo primario (0.2-0.4  $\mu\text{g/ml}$  o las concentraciones indicadas por la casa comercial, en cada caso concreto) diluido en BSA al 4% en TBS-T durante una hora como mínimo. Se realizaron dos lavados con TBS-T durante un total de quince minutos, tras los cuales se incubaron los filtros con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, diluido 1:5.000 o 1:10.000 en leche al 0.4% en TBS-T durante una hora a temperatura ambiente. Se realizaron de nuevo dos lavados con TBS-T y se procedió a la detección de la proteína por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL. Se realizó una autorradiografía de los filtros con películas Kónica que nos permitió detectar una banda allí donde el anticuerpo primario había reconocido de forma específica la proteína de interés.

#### ● Inmunofluorescencia

Las células se crecieron hasta subconfluencia sobre cubreobjetos de vidrio de 10 mm de diámetro estériles. En el momento de hacer la inmunofluorescencia, las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron con una solución al 4% de paraformaldehído en PBS 1X, durante 10 minutos a temperatura ambiente, excepto en el caso en que nos interesaba ver la gamma tubulina en el cual fijamos durante 5 minutos en metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Tras la fijación de las células, se realizaron dos lavados con PBS 1X, cinco minutos cada lavado. En el caso en el que las células tuvieran que ser permeabilizadas, se incubaron durante 5 minutos con una dilución 0.5% de Tritón X-100 en PBS, seguido por tres lavados de PBS 1X de cinco minutos cada uno. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario necesario a una concentración 1/100 o 1/150, durante una hora en una cámara húmeda. Tras tres lavados con PBS, de cinco minutos cada uno, se añadió el anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo: FITC (Conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína) o bien Texas Red, incubándolo durante 45-50 minutos en una cámara húmeda y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se realizaron dos nuevos lavados, de cinco minutos cada uno, con PBS 1X.

En el caso de los ensayos de doble marcaje por inmunofluorescencia, el anticuerpo primario de cada una de las proteínas debe ser de diferente especie para poder detectar cada uno de ellos con un fluoróforo diferente.

Por último, se añadió sobre un portaobjetos una gota de medio de montaje Prolong con DAPI y posteriormente se colocó encima el cubre con las células. Las células se examinaron mediante microscopía de fluorescencia (fotomicroscopio Axiophot, Carl Zeiss). Las imágenes se digitalizaron y procesaron utilizando el programa Fiji.

Anticuerpo	Especificidad	Dilución western Blot	Dilución inmunofluorescencia	Casa comercial
anti-HA	monoclonal de ratón	1:1000	1:150	Santa Cruz; sc-7392
anti-HA	policlonal de conejo	1:1000	1:100	Santa Cruz; sc-805
anti-Flag	monoclonal de ratón	1:1000	1:150	Sigma; F1804
anti-GFP	policlonal de conejo	1:1000		Cell Signaling; 2956S
anti-Rac1	policlonal de conejo	1:1000		Santa Cruz; sc-217
anti-RhoA	monoclonal de ratón	1:1000		Santa Cruz; sc-418
anti-Cdc42	policlonal de conejo	1:1000		Santa Cruz; sc-87
anti-RhoGDI	Policlonal de conejo	1:1000	1:100	Santa Cruz; sc-360
anti-lamina A/C	policlonal de conejo	1:1000	1:100	Santa Cruz; sc-20680
anti-lamina A/C	monoclonal de ratón	1:2000	1:150	Sigma; SAB4200236
anti-lamina B1	monoclonal de ratón	1:1000		Santa Cruz; sc-56145
anti-lamina B2	policlonal de conejo	1:1000		Santa Cruz; sc-134477
anti-SUN1	policlonal de conejo	1:1000	1:150	cedido por Sue Shackelton
anti-SUN2	policlonal de conejo	1:1000	1:150	cedido por Sue Shackelton
anti-Emerin		1:1000		
anti-MLC	policlonal de conejo	1:1000		Santa Cruz; sc-15370
anti-pMLC	policlonal de conejo	1:1000		Cell Signaling; 3964S

anti- $\gamma$ tubulina	monoclonal de ratón	1:2000	1:200	Sigma; T6557
anti- $\alpha$ tubulina	monoclonal de ratón	1:2000	1:200	Sigma; T5168
anti-caspasa 3	monoclonal de ratón	1:1000		BD-Bioscience; 610323
anti-cleaved caspasa 3	policlonal de conejo	1:1000		Cell Signaling; 9464S
anti- mouse-HRP (IgG de ratón)	Cabra	1:5000		Biorad; 170-5047
anti- Rabbit-HRP (IgG de conejo)	Cabra	1:5000		Biorad; 170-5046

**Tabla III.3. Resumen de los anticuerpos utilizados para la detección de proteínas.** Se detallan los diferentes anticuerpos utilizados tanto primarios como secundarios, detallando la casa comercial, la referencia del productos así como la concentración a la cual se han utilizado.

### III.3.2 Detección de apoptosis mediante marcaje con Anexina V

La Anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos con gran afinidad por PS, un componente de la membrana que normalmente está localizado en la cara interna de la membrana celular. Ya al inicio de la apoptosis se transloca a la cara externa de la membrana donde la anexina podrá unirse a ellas.

Para este análisis utilizamos el Guava Nexin Reagent de Millipore, apropiado para citómetros Guava. 48 horas después de la transfección, se recogen las células (tanto las adheridas como las muertas) y se centrifugan, incluidos los controles positivos y negativos, a 1200 rpm durante 5 minutos. Las células se resuspenden a una concentración de entre  $2 \times 10^5$  o  $2 \times 10^6$  células/ml en PBS con 1% de BSA. Se toma 100  $\mu$ l de la suspensión de células y se añade 100 microlitros del reactivo Guava previamente atemperado. Se deja incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Pasado este tiempo se lleva a analizar al citómetro. Las células que aparezcan en el cuadrante inferior derecho son células en apoptosis temprana, las células en el cuadrante superior derecho son células muertas o en apoptosis tardía.

### III.3.3 Ensayos de senescencia

Para los ensayos de senescencia se usó el kit de *Cell Signaling Senescence  $\beta$ -Galactosidase staining kit*. (#9860) Este kit se basa en detectar la actividad  $\beta$ -galactosidasa a pH6 característica de las células senescentes.

Se transfectan las células A375P con el plásmido correspondiente y se deja 72 horas antes de fijar las células, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se añade la solución de tinción de galactosidasa y se deja durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se miran las células al microscopio para ver si se han teñido de azul, señal de que estaban senescentes.

### III.3.4 Ensayos luciferasa

Se transfectaron células A375P con los plásmidos indicados, incluyendo pRL Null Renilla y pSRE luc. Pasadas 24 horas se les cambia el medio por medio sin factores de crecimiento y se incuban durante 16 horas. Se estimulan con EGF (100 ng/ml, 2 horas) y se lisan con 200  $\mu$ l de passive lysis buffer (Promega). La medición se realizó utilizando los reactivos del kit de Promega Dual-Luciferase Reporter assay (#E1910, E1960 y E1980) en un luminómetro Monolight 3010.

### III.3.5 Ensayos de invasión en transwell

Para estos ensayos se utilizaron los transwell de Corning de 8.0  $\mu$ m Polycarbonate Membrane. Tras añadir 50  $\mu$ l de matrigel de BD diluido 1:50 en medio sin suero y dejar secar se añadieron 15000 células verdes al pocillo. Tras 16 horas se retiran con un bastoncillo las células que no han sido capaces de atravesar la membrana y se cuentan las células verdes que han sido capaces de migrar.

## III.4 Modelos de embrión pollo

### III.4.1 Ensayo de metástasis en embrión de pollo

Los huevos fertilizados fueron incubados en un incubador rotatorio a 38°C con el 60% de humedad durante 10 días. En este punto se hace caer la CAM al perforar la cáscara de huevo en el saco de aire y un segundo agujero cerca de la vena alantoica que penetra la membrana de la cáscara de huevo pero no la CAM.

La CAM cae al aplicar vacío en el agujero sobre el saco de aire. Una vez caída, con una dremel se hace una ventana en la cáscara para exponer la CAM subyacente. Se añaden  $10^6$  células A375p resuspendidas en 25µl de medio DMEM sin suero. Se cierra la ventana y se devuelven los huevos al incubador, pero esta vez sin rotación. Pasados 7 días se toman la CAM, el tumor y el hígado para analizarlos mediante PCR cuantitativa.

### III.4.2 PCR a tiempo real para la detección de células humanas

Las células humanas dentro del tejido de pollo fueron detectadas mediante PCR a tiempo real amplificando las secuencias Alu humanas. Se usaron 30 ng de DNA genómico como molde en una reacción de 25 µl con los siguientes primers:

Alu sense (ACGCCTGTAATCCCAGCACTT)

Alu antisense (TCGCCCAGGCTGGGTGCA)

Las condiciones de la PCR fueron 95°C durante 4 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 63°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos. El número de células humanas amplificadas fue determinado gracias a una curva estándar generada mediante diluciones seriadas de células tumorales. Este proceso viene bien detallado en el artículo de Zijlstra et al. (Zijlstra, Mellor et al. 2002)

### III.4.3 Ensayo de microtumores

Los huevos fertilizados fueron incubados durante tres días en un incubador rotatorio a 38°C con el 60% de humedad. En este punto se cascan los huevos y se dejan crecer los embriones *ex ovo* hasta día 10. Se resuspenden las células A375P a una concentración de  $1 \times 10^6$  /ml y se añaden por embrión cinco o seis futuros microtumores (20 µl de células). Se devuelven los embriones al incubador, esta vez sin rotación. Se dejan ahí creciendo durante 3 días más hasta que llega el momento de su análisis al microscopio. La cuantificación de las células que escapan el tumor, así como la distancia a la que se alejan fue calculada gracias al software ImageJ.

## **III.5 Análisis informático**

### **III.5.1 Análisis de los western blot**

Las bandas obtenidas en las películas fueron escaneadas y se cuantificó la intensidad de éstas con el software image j.

### **III.5.2 Análisis de las inmunofluorescencias**

Las imágenes obtenidas en el microscopio fueron posteriormente montadas con el software image j.

### **III.5.3 Gráficas y análisis estadísticos**

Las gráficas y diseños de esta tesis se han realizado mediante el uso del software *GraphPad Prism 6*, *PowerPoint2011* y *Adobe Illustrator CS5*.

Para el análisis del nivel de confianza o significancia de los distintos experimentos se empleó el software *GraphPad Prism 6*. En todos los casos se analizaron mediante el t de student de dos colas. Las diferencias se consideraban estadísticamente significativas cuando: \* $p < 0,05$ ; \*\* $< 0,01$ ; \*\*\* $< 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ;

### **III.5.4 Bibliografía**

La bibliografía presente en este trabajo se realizó usando el software *EndNote X7*.



## IV. Resultados





R

## IV.1 Influencia de las RhoGTPasas sobre el núcleo

Como ya se ha mencionado previamente, las pequeñas RhoGTPasas son grandes reguladoras del citoesqueleto. Éste a su vez está conectado al nucleoesqueleto a través del complejo LINC. De modo que la hipótesis de partida fue que a través del citoesqueleto, estas proteínas podían estar transmitiendo señales al núcleo y afectar a su posicionamiento o a su morfología.

### IV.1.1 Análisis en diferentes tipos celulares

El primer abordaje consistió en observar en diferentes líneas celulares si la sobre-expresión de las pequeñas RhoGTPasas constitutivamente activas producía algún efecto sobre el núcleo. Las construcciones portan la mutación Q61L que impide la acción de las proteínas reguladoras GAP, de modo que permanecen siempre unidas a GTP. Dado que al microscopio de fluorescencia se pudieron apreciar aberraciones en los núcleos, se procedió a determinar el porcentaje de núcleos afectados en función de la proteína sobre-expresada. (Figura IV.1) En todas las líneas celulares analizadas la proporción de núcleos afectados era mayor en caso de que las proteínas sobre-expresadas fueran Rac1 o Cdc42.

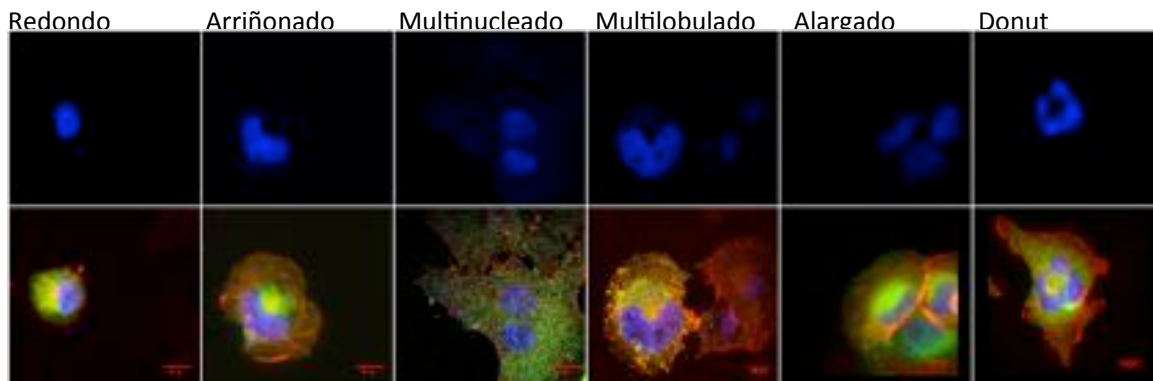
**PORCENTAJE DE NÚCLEOS AFECTADOS**

	GFP	RacQL	RhoQL	Cdc42QL
C2C12	21%	70%	38%	65%
SKMEL28	21%	63%	50%	68%
SKMEL2	11%	67%	15%	72%
A375P	20%	62%	42%	60%

**Figura IV.1. Porcentaje de núcleos afectados en distintas líneas celulares.** Tabla que muestra el porcentaje de núcleos afectados en función de la RhoGTPasa sobre-expresada. Se puede apreciar que en todas las líneas celulares aumenta la cantidad de núcleos aberrantes al expresar las proteínas constitutivamente activas siendo este incremento más acentuado con Rac1 y Cdc42.

Con el fin de alcanzar un estudio más exhaustivo se procedió a establecer una clasificación de los núcleos en función de la morfología que presentaban en respuesta a la sobre-expresión de las proteínas Rho. Se detectaron seis tipos de núcleos en las preparaciones: "normal" redondeado, arriñonado, multinucleado, multilobulado, alargado y donut. (Figura IV.2)

R

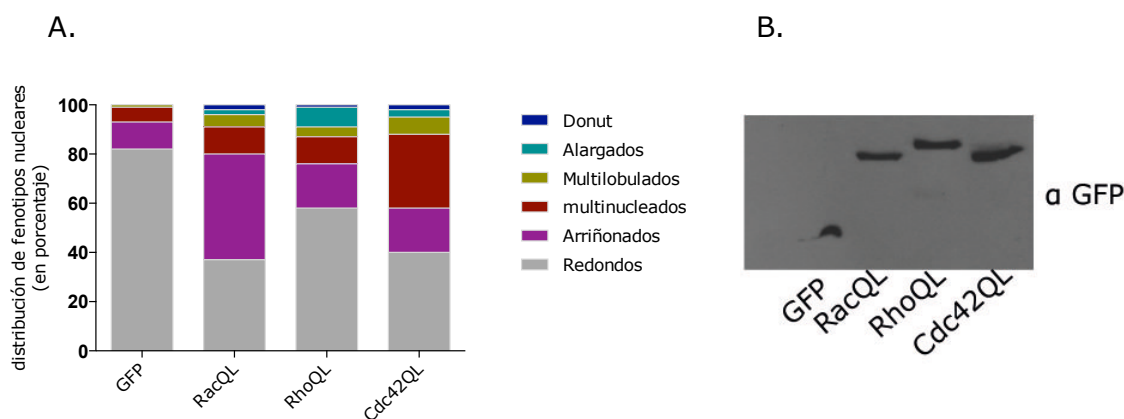


**Figura IV.2. Clasificación de las morfologías nucleares.** Figura que muestra los diferentes tipos nucleares con las pequeñas RhoGTPasas. En azul se muestra el núcleo, en verde la GTPasa y en rojo el citoesqueleto de actina.

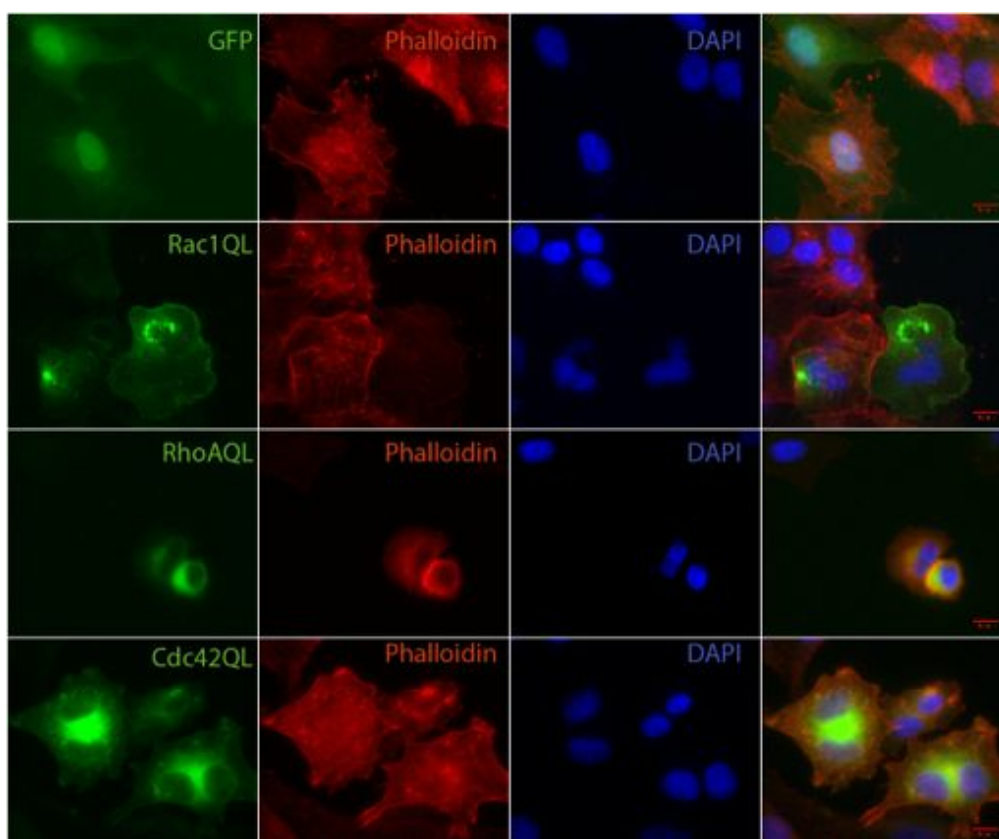
R

### IV.1.2 Análisis en células A375P

Una vez hecha esta clasificación se procedió a observar cómo se distribuían los tipos de núcleos según la GTPasa sobre-expresada. A partir de este momento se centraron los análisis en las células de melanoma A375P. Como se muestra en la figura IV.3, en el caso de las células transfectadas con Rac1QL lo que se producía era sobre todo un incremento en la cantidad de núcleos arriñonados con respecto a las células control, transfectadas únicamente con la proteína GFP (Green Fluorescent Protein). Sin embargo, en el caso de Cdc42QL lo que se produjo fue un incremento en la cantidad de células multinucleadas. Así, a pesar de que con ambas GTPasas el porcentaje de núcleos aberrantes era similar, las morfologías nucleares eran diferentes. Además, en las células que expresaban exógenamente alguna de las pequeñas RhoGTPasas aparecieron fenotipos nucleares que no se daban en el caso de las células control, como la morfología alargada y el donut.



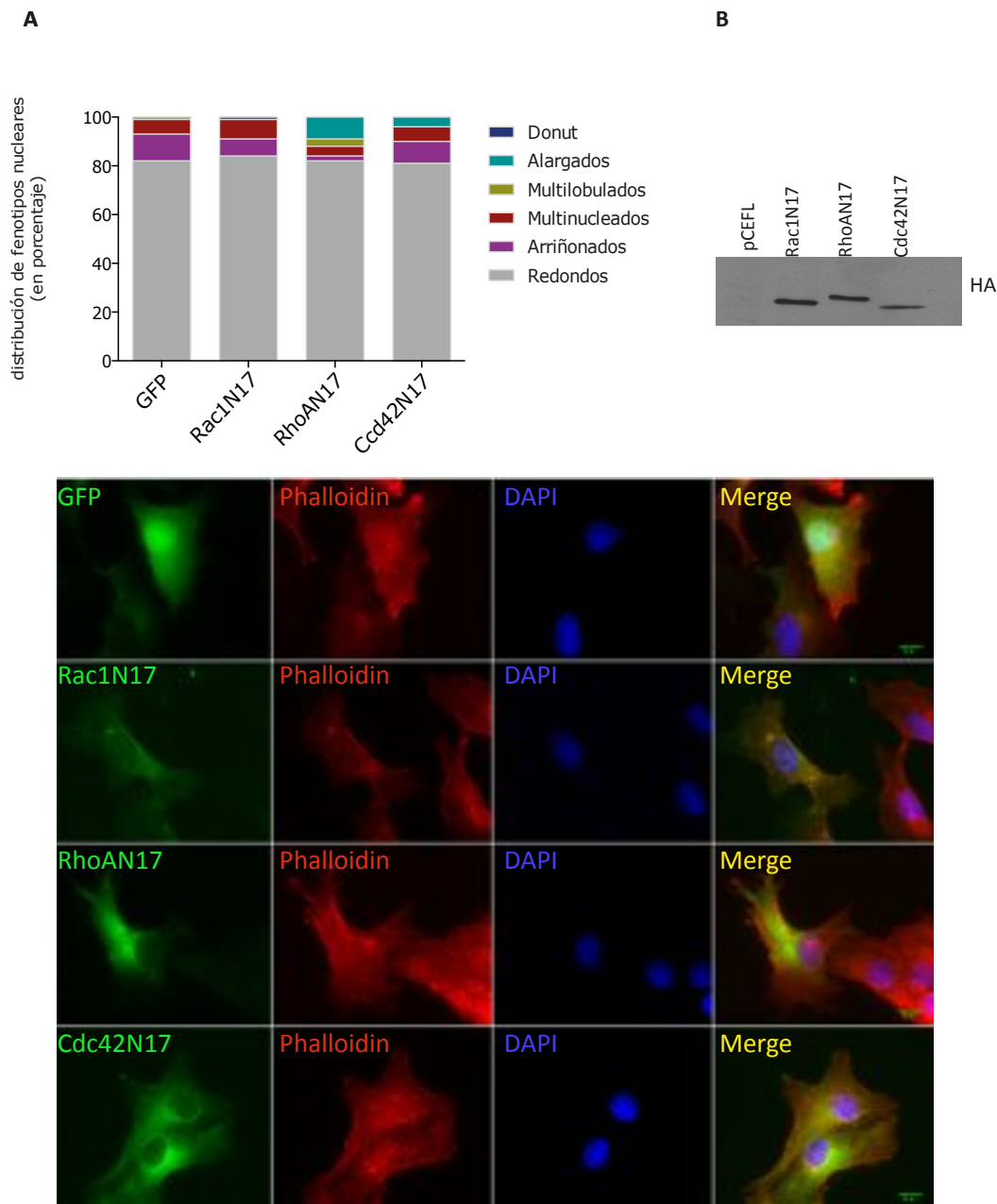
C.



**Figura IV.3. Distribución de los tipos nucleares con las RhoGTPasas constitutivamente activas.** En la gráfica A se puede apreciar cómo varían los tipos nucleares en función de la pequeña GTPasa dominante. A pesar de que tanto con Rac1QL como con RhoAQL y Cdc42QL disminuye el porcentaje de núcleos redondos, la distribución es diferente. Así, con Rac1QL aumentan mucho los denominados núcleos arriñonados y con Cdc42QL aumentan las células multinucleadas. B. Western Blot de los niveles de expresión de las diferentes construcciones. C. Inmunofluorescencias mostrando la morfología nuclear resultante.

Como control, para asegurar que el cambio morfológico de los núcleos fuera debido a la acción de las pequeñas RhoGTPasas, se procedió a hacer el mismo experimento, pero esta vez utilizando mutantes dominantes inhibitorios que llevan la mutación S17N, de modo que las GTPasas están inactivas, unidas a GDP. Con estas construcciones no se produjo ninguna alteración significativa en los núcleos (Figura IV.4) De este modo, se concluyó que el pleomorfismo nuclear se debía a la actividad de las pequeñas RhoGTPasas a través de alguno de sus efectores.

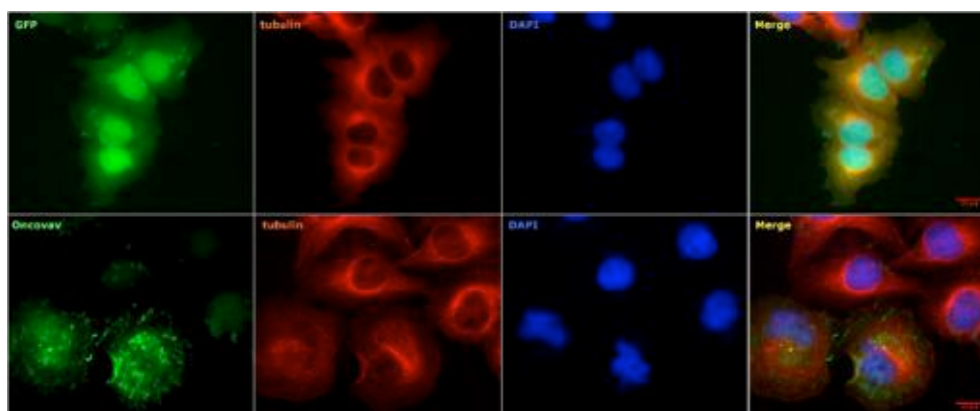
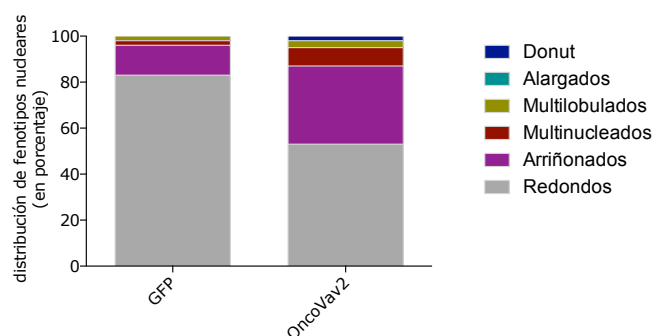
R



**Figura IV.4. Distribución de los tipos nucleares con las RhoGTPasas dominantes inhibitorias.** A pesar de la sobre-expresión de las GTPasas, al ser éstas dominantes inhibitorias, no ejercen ninguna influencia sobre la morfología nuclear, el porcentaje de núcleos redondos es en todos casos prácticamente igual al control (GFP).

También se decidió determinar si la activación de las GTPasas endógenas inducía el mismo efecto sobre la morfología nuclear que la sobre-expresión de las versiones constitutivamente activas. Para ello se utilizó la sobre-expresión del GEF oncoVav2. Vav2 es un GEF que facilita el intercambio de nucleótidos de GDP a GTP tanto en Rac1 como en RhoA y Cdc42. (Abe, Rossman et al. 2000) OncoVav2 es la forma oncogénica de Vav2, cuya actividad de intercambio de nucleótidos es superior a la de Vav2 *wild type*. (Liu and Burrige 2000) Con la sobre-expresión de este GEF aumentó considerablemente el número de núcleos

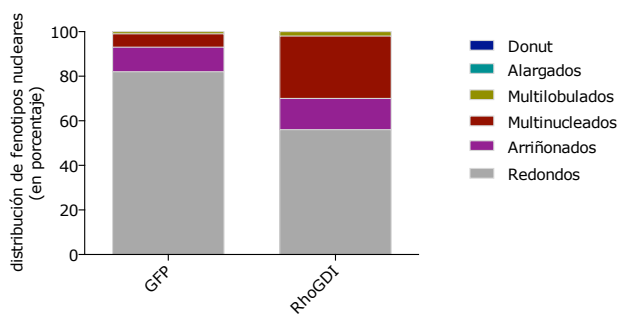
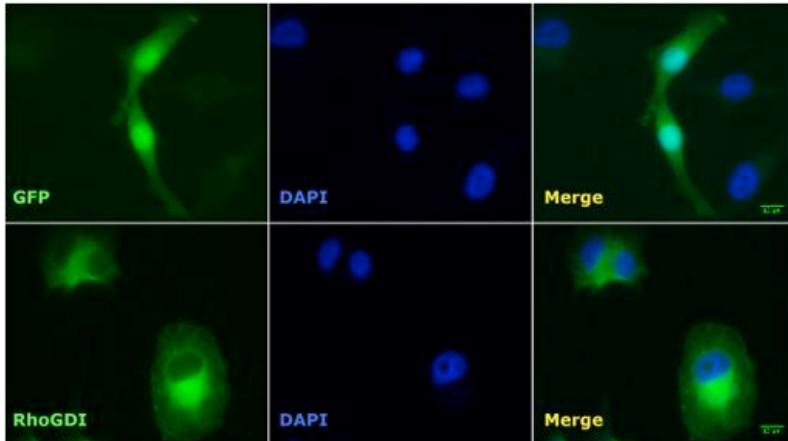
con morfología arriñonada (Figura IV.5), reproduciendo el efecto obtenido con la sobre-expresión de la GTPasa Rac1Q61L. (Figura IV.3) A pesar de tener una influencia similar sobre los núcleos, el efecto de oncoVav2 no fue tan pronunciado como la sobre-expresión de la GTPasa, lo cual pudo deberse a que con la sobre-expresión de oncoVav2 se produjo un incremento en la activación de la proteína Rac1 endógena, mientras que con la transfección de Rac1QL no sólo se indujo el correspondiente efecto, sino que además se incrementó la cantidad de Rac1 en las células.



**Figura IV.5. Distribución de los tipos de núcleos con el GEF oncoVav2.** La distribución con la activación de las RhoGTPasas endógenas mediante la sobre-expresión del GEF oncoVAV2, la morfología del núcleo también se ve afectada, asemejándose a la distribución observada con Rac1QL. Inmunofluorescencia mostrando dos núcleos afectados.

De igual forma que al sobre-expresar la proteína oncoVav2 se aumentó la actividad de las proteínas endógenas, se planteó analizar el efecto de la inhibición de las GTPasas endógenas mediante la sobre-expresión de la proteína RhoGDI, la cual se une a las GTPasas evitando así su interacción con sus efectores. Se hipotetizó que quizás de esta manera disminuía el número de núcleos afectados en las células A375P transfectadas con GFP únicamente. Sin embargo, no disminuyó el número de núcleos arriñonados con respecto a las células control, aunque sí aumentó mucho el número de células binucleadas.

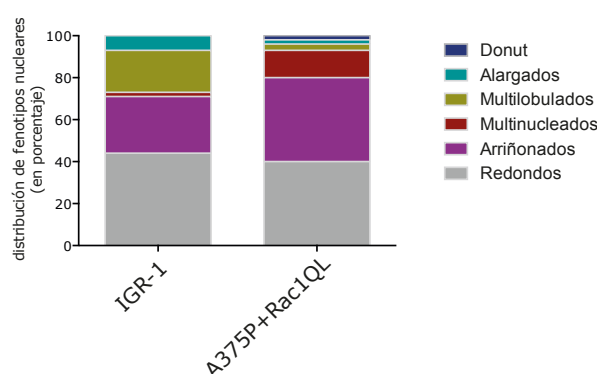
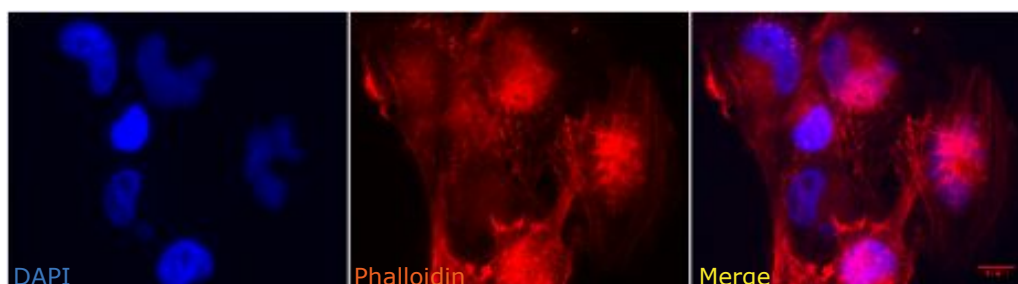
(Figura IV.6) Ya se ha comentado en la introducción que las GTPasas Rho juegan un papel importante durante la citocinesis. Es por ello que su inhibición mediante la acción de la proteína reguladora RhoGDI tenga como consecuencia fallos en citocinesis y por ende aumente el número de células multinucleadas.



**Figura IV.6. Efecto de la sobre-expresión de RhoGDI sobre la morfología nuclear.** Al sobre-expresar la proteína reguladora de RhoGTPasas, se induce un aumento en la cantidad de células binucleadas.

Finalmente, como se ha comentado en la introducción, existe una mutación en Rac1 en melanomas, la mutación P29S, que provoca la actividad constitutiva de la GTPasa y promueve la proliferación y la migración de melanocitos. (Davis, Ha et al. 2013) Puesto que tienen Rac1 activo de manera incontrolada, se planteó estudiar si la proporción de núcleos aberrantes en estas células era alta y comparar el resultado con el efecto de Rac1QL sobre los núcleos en A375P. Se cuantificaron los núcleos aberrantes en las células IGR-1, que portan la mutación Rac1P29S y se comprobó que efectivamente un alto número de núcleos en estas células poseía una morfología alterada. (Figura IV.7) De manera que se corroboró en un modelo fisiológico de hiperactividad de Rac1 el cambio morfológico en los núcleos. La proporción de núcleos deformados en células IGR-1 y A375P que sobre-expresan Rac1QL era muy similar, aunque en el

caso de las células IGR-1 el número de núcleos multilobulados era mayor que en las A375P-Rac1QL.



**Figura IV.7. Distribución de núcleos en células IGR-1, células con Rac1P29S.** En estas células que poseen una mutación en Rac1, la proporción de núcleos con morfologías alteradas es tan alta como en aquellas células que sobre-expresan la mutación de Rac1QL.

## IV.2 Estudio sobre el mecanismo mediante el cual las RhoGTPasas alteran la morfología nuclear

Una vez establecida la relación entre la actividad de las RhoGTPasas y el cambio morfológico en los núcleos, se pretendió dilucidar el mecanismo de acción mediante el cual las GTPasas, en particular Rac1, ejercían estos cambios en los núcleos.

### **IV.2.1 La alteración en la morfología nuclear no es debida a la regulación génica por parte de las GTPasas Rho**

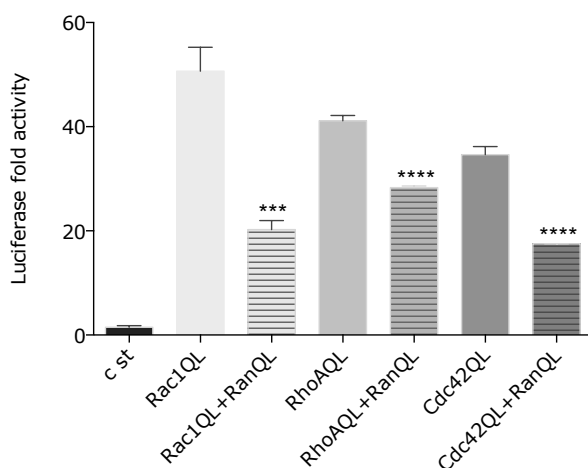
La primera incógnita que se intentó aclarar, era si el efecto de las GTPasas sobre los núcleos se estaba ejerciendo desde el citoplasma o desde el núcleo en respuesta a regulación génica. Para ello se bloqueó la entrada de proteínas al núcleo mediante el uso de otra pequeña GTPasa, la GTPasa Ran. Como se ha mencionado en la introducción de esta tesis, Ran está implicada en el transporte

R



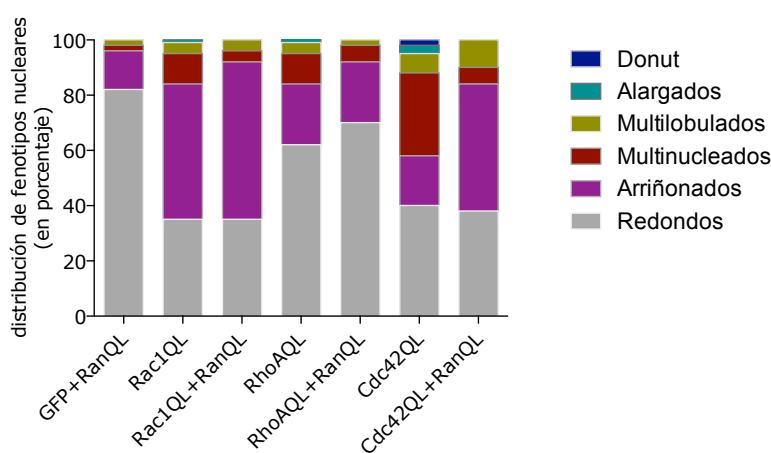
núcleo-citoplasma. En caso de que porte una mutación activadora que mantenga la proteína unida a GTP (como por ejemplo la mutación Q69L), la importación de proteínas al núcleo se ve suspendida. (Steggerda and Paschal 2002)

Se ha descrito en la introducción de esta tesis cómo las pequeñas RhoGTPasas Rac1, RhoA y Cdc42 son capaces de regular la expresión de genes que se encuentran bajo promotores que contienen la región SRE (serum response element). Para la correcta regulación de estos genes se requiere la unión del co-activador MAL al factor de transcripción SRF. MAL se encuentra en el citoplasma y se transporta al núcleo tras la activación de las GTPasas Rho. Una vez en el núcleo se une a SRF y comienza la transcripción de los genes que se encuentran bajo el promotor SRE. De manera que bloqueando la entrada de MAL al núcleo mediante la sobre-expresión de RanQL se impediría la expresión de los genes dependientes de la activación de las RhoGTPasas. Para asegurar que con RanQL se evitaba la expresión de los genes regulados por las GTPasas, se co-transfectaron células A375P con la RhoGTPasa correspondiente, la proteína RanQL y además un gen luciferasa bajo el promotor SRE. De este modo al hacer un ensayo luciferasa, en los casos en los que se estuvieran co-expresando la RhoGTPasa constitutivamente activa y la proteína RanQL se debería observar una disminución en la actividad luciferasa con respecto a los casos en los que no se transfectaba RanQL. Y efectivamente, al hacer esta comprobación, se detectó una menor actividad luciferasa en aquellas células que además de la RhoGTPasa expresaban Ran constitutivamente activo. (Figura IV.8) Como control negativo para este experimento se tomaron unas células que habían sido privadas de suero durante 16 horas.

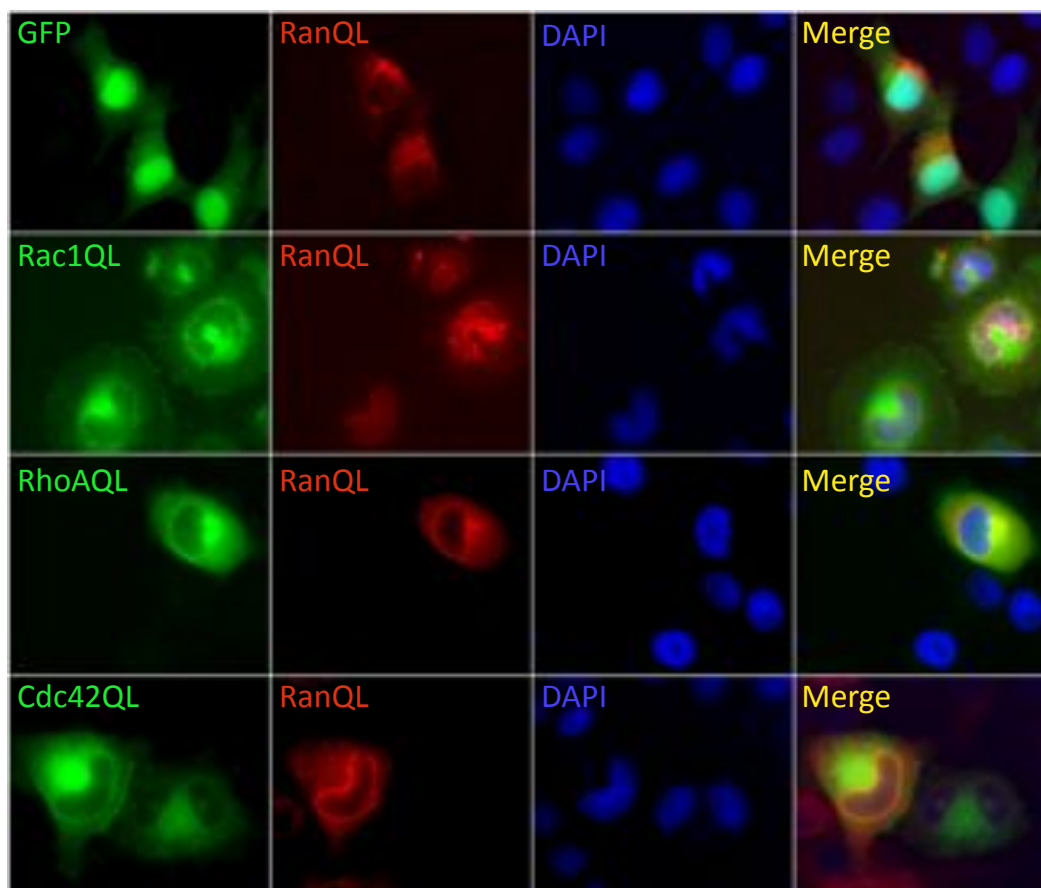


**Figura IV.8. Bloqueo de la regulación génica de las GTPasas Rho mediante la transfección de la proteína RanQL.** Este ensayo luciferasa muestra cómo al co-transfectar las RhoGTPasas con la pequeña GTPasa Ran activa, se ve mermada la capacidad de Rac, Rho y Cdc42 de regular la expresión de los genes que se encuentran bajo un promotor dependiente de las GTPasas Rho. En presencia de la GTPasa RanQL la actividad luciferasa disminuye significativamente con respecto a las condiciones en las que esta proteína estaba ausente.

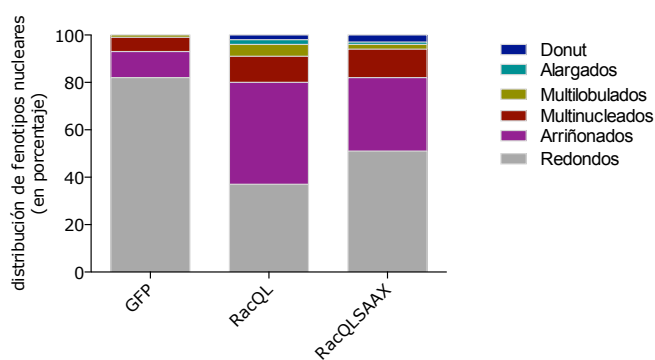
A continuación se analizó la capacidad de las GTPasas Rho de inducir cambios morfológicos en los núcleos en células A375P en presencia de RanQL, es decir, impidiendo la entrada de las GTPasas al núcleo y su implicación en la regulación génica. Se observó que la distribución de las diferentes morfologías nucleares era similar a la descrita en ausencia de RanQL, con la excepción de Cdc42QL, en cuyo caso se vio potenciada su capacidad para inducir núcleos arriñonados, mientras que disminuyó el número de células multinucleadas. (Figura IV.9) Por tanto, este resultado permitió concluir que la capacidad de las GTPasas Rho de inducir alteraciones en la morfología nuclear es independiente de su entrada al núcleo y de su papel en la regulación génica.



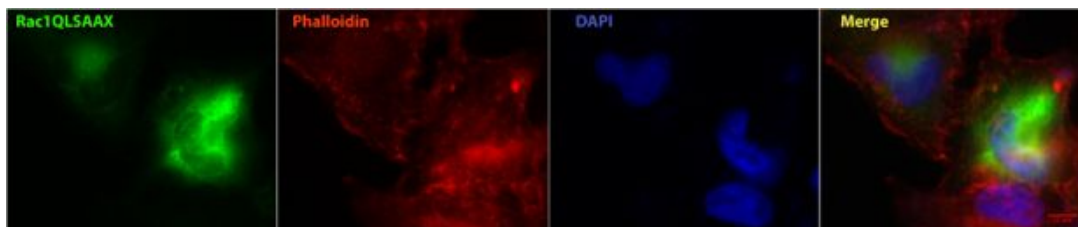
**Figura IV.9. Efecto de las Rho GTPasas sobre la morfología nuclear en presencia de la GTPasa RanQL.** A pesar de tener bloqueada la entrada de proteínas al núcleo, el patrón observado al co-transfectar las células con la Rho GTPasa correspondiente y la proteína Ran constitutivamente activa era muy similar a detectado sin RanQL. Con la excepción de Cdc42, en cuyo caso se vio disminuida la cantidad de células poliploides.



A raíz del experimento realizado bloqueando la entrada de las GTPasas al núcleo se pensó que el efecto observado era fruto de la acción de las GTPasas desde el citoplasma. Nos preguntamos si era necesario el anclaje de las GTPasas Rho a membranas o bien podían causar un cambio morfológico desde el citosol. Se decidió por tanto abordar el experimento de la señalización de las GTPasas desde el citosol utilizando un mutante de Rac1 que además de la mutación Q61L porta una mutación en la cisteína 189 pasando ésta a ser serina. En la introducción de esta tesis se ha mencionado que las Rho GTPasas contienen en su extremo C-terminal un motivo denominado caja CAAX. Esta cisteína (189 en el caso de Rac1) es prenilada para facilitar la unión a membranas. Esta modificación es necesaria también para la unión a RhoGDI. (Michaelson, Silletti et al. 2001) Por tanto, el mutante Rac1QLSAAX no se ancla a membranas y además tampoco se une a las proteínas RhoGDI. Al no interaccionar con RhoGDI sí es capaz de unirse a los efectores. (Del Pozo, Kiosses et al. 2002) A pesar de que hay artículos donde se describe que el mutante Rac1QLSAAX se localiza principalmente en el núcleo, en nuestras manos aparecía fundamentalmente en el citoplasma. (Figura IV.9) (Navarro-Lerida, Sanchez-Perales et al. 2012) Al cuantificar los núcleos afectados se apreció que el mutante citoplasmático no llegaba a tener tanto efecto como el Rac1QL salvaje, pero aun así, sí que produce



un cambio en los núcleos. La diferencia se debe probablemente a que la capacidad de unión a los efectores esté mermada. Por tanto, concluimos que no hace falta que Rac1 esté anclada a membranas para cambiar la morfología nuclear.



**Figura IV.10. RacQLSAAX también es capaz de alterar la morfología nuclear.** Distribución de los diferentes fenotipos nucleares con el mutante Rac1QLSAAX. Observamos que aunque en menor medida que el mutante Rac1QL a secas, el doble mutante también produce pleomorfismo nuclear. Inmunofluorescencia que muestra núcleos alterados con el mutante Rac1QLSAAX. Nótese la presencia principalmente citosólica de la proteína.

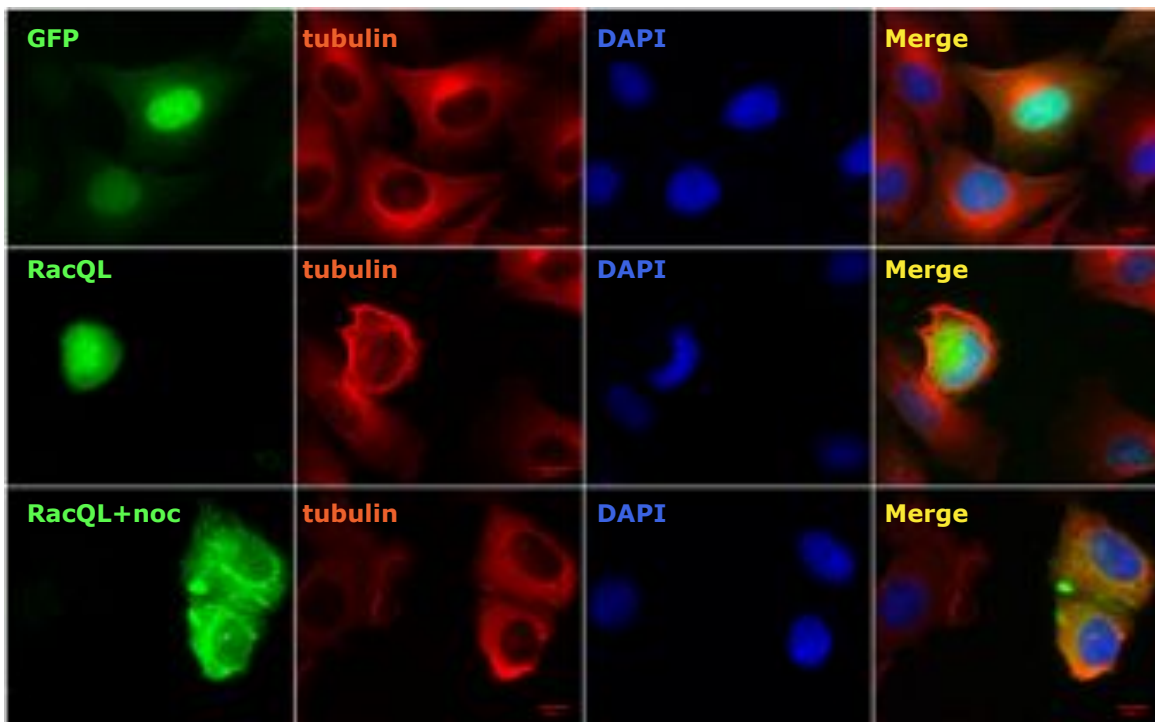
#### IV.2.2 Rac1QL altera la morfología nuclear a través del citoesqueleto de microtúbulos y de la contractilidad de actina miosina

Las RhoGTPasas son grandes reguladoras del citoesqueleto, tanto de actina como de tubulina, a través de sus múltiples efectores. (Bishop and Hall 2000) Por ello se propuso estudiar cuál de los dos podía estar involucrado en el cambio morfológico del núcleo, si es que alguno de los dos participaba. Para ello se utilizaron diferentes compuestos que atacan al citoesqueleto. Uno de los fármacos elegidos para alterar el citoesqueleto de actina fue la citocalasina D, compuesto de origen fúngico que se une a los filamentos de actina e impide así su elongación. (Goddette and Frieden 1986) Otro tratamiento utilizado para la alteración del citoesqueleto de actina fue la blebistatina. Con este fármaco lo que se consigue es inhibir la miosina no muscular II. (Kovacs, Toth et al. 2004) La miosina II es un motor molecular involucrado en la contracción actina miosina que regula procesos como la migración o la división celular. Para alterar el citoesqueleto de tubulina se añadió nocodazol, un agente antimitótico que se une a la  $\beta$ -tubulina interfiriendo con la polimerización de los microtúbulos. (Jordan, Thrower et al. 1992)

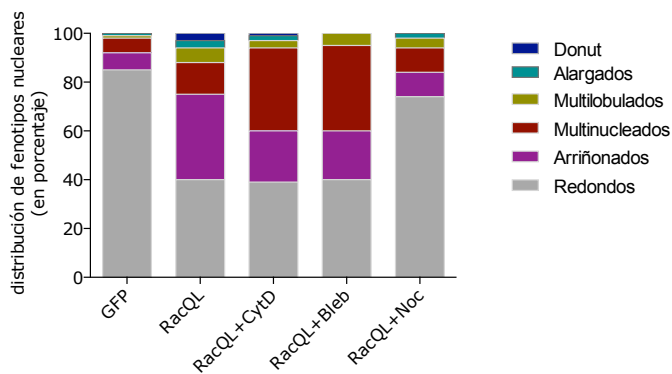
Se transfectaron las células A375P con el mutante Rac1QL y a los dos días se trataron durante tres horas con los compuestos mencionados para ver si con alguno de los tres tratamientos se conseguía revertir el efecto producido por la RhoGTPasa Rac1 constitutivamente activa. Tanto con citocalasina D (CytD) como con blebistatina (Bleb), lo que se produjo fue un aumento en la cantidad de células binucleadas, lo que no resulta sorprendente, dado que con este tratamiento lo que se produce es un fallo en la citocinesis. También observamos una disminución en el porcentaje de núcleos arriñonados, sin embargo este efecto fue más pronunciado cuando tratamos con nocodazol (Noc). En este caso la distribución de las diferentes morfologías nucleares era muy similar a la de las células control. (Figura IV.11) De esta forma, se concluyó que el efecto de la pequeña RhoGTPasa Rac1 sobre los núcleos estaba relacionado con su función como reguladora de microtúbulos.

R

A.



B.

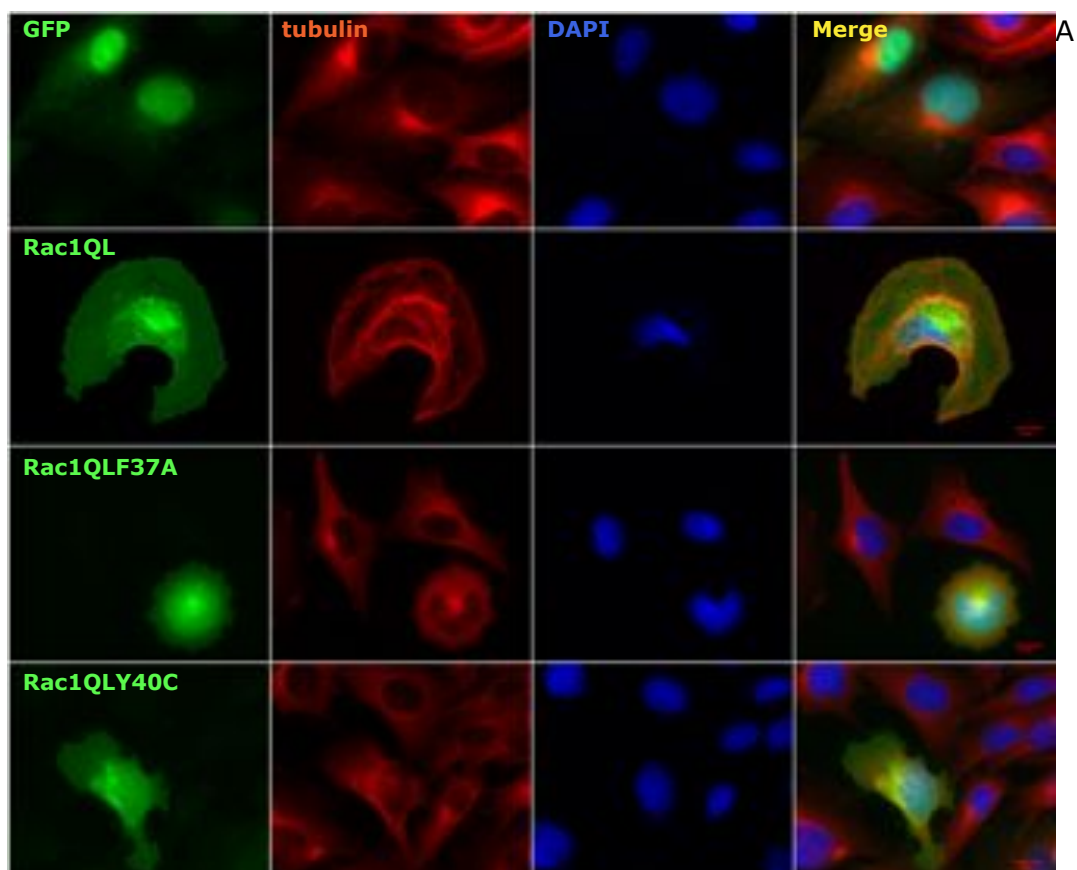


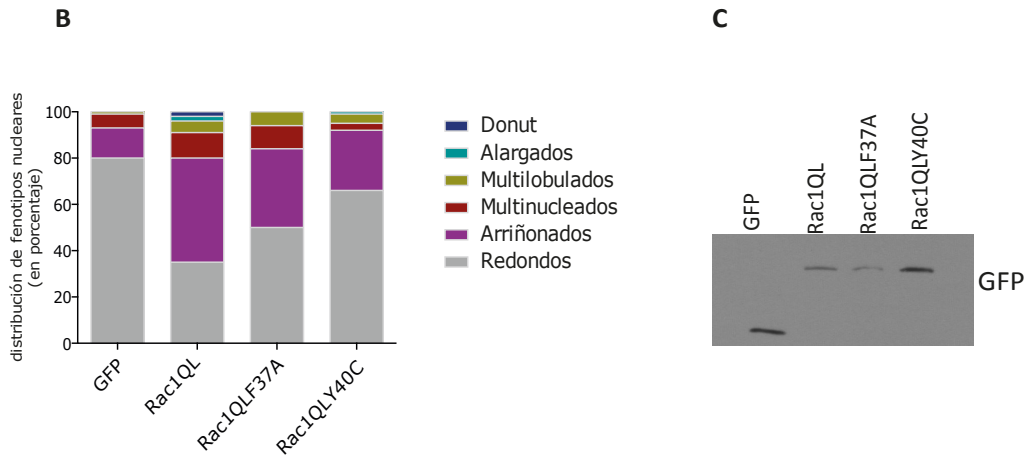
**Figura IV.11. Efecto de la disrupción del citoesqueleto sobre el núcleo.** A. Imágenes que muestran cómo el nocodazol consigue revertir el efecto de la RhoGTPasa RacQL. B. Gráfico mostrando la distribución de los fenotipos nucleares con los distintos tratamientos.

Además de esta aproximación mediante el uso de fármacos, decidimos utilizar dos mutantes de Rac1QL deficientes en la unión a distintos efectores, el mutante Rac1QLF37A y el mutante Rac1QLY40C. De esta forma podemos discriminar entre rutas de señalización activadas por Rac1QL. El mutante F37A es capaz de unirse a proteínas efectoras como Pak1 o JNK, sin embargo no induce cambios en el citoesqueleto de actina. En el mutante Y40C la cisteína 40 es sustituida por una tirosina en el dominio efector de Rac1, de modo que se impide su unión a Pak1 o JNK, pero sigue induciendo “*membrane ruffling*”, es decir, es capaz de modificar el citoesqueleto de actina (Joneson, McDonough et al. 1996; Lamarche, Tapon et al. 1996) Se procedió a la transfección de estos mutantes y a la comparación con el Rac1QL a ver si con alguno de los dos se impedía la

formación de núcleos aberrantes. Con ambos mutantes se produce una disminución en el número de núcleos aberrantes, si bien este efecto es más pronunciado con el mutante Y40C que no es capaz de unirse a Pak1. (Figura IV. 12) Este resultado pareció coherente con el obtenido en el experimento anterior en el que se revertía el efecto de Rac1QL al tratar las células con nocodazol. Como se ha explicado en la introducción, la activación de PAK1 induce la fosforilación de la proteína estatmina evitando así que ésta despolimerice los microtúbulos. Por lo tanto, con el mutante deficiente en la unión a PAK, esta inhibición no se produce, por lo que la estatmina continuará ejerciendo su papel promoviendo el desensamblaje de los microtúbulos. Con este resultado y con el anterior, con el nocodazol como agente despolimerizante, se dedujo que Rac1 inducía su efecto principalmente a través de su capacidad de regular la polimerización de microtúbulos. No obstante, parecía existir otro mecanismo adicional por el que se inducía el cambio morfológico en los núcleos, ya que con el otro mutante había también cierto grado de reversión.

A.

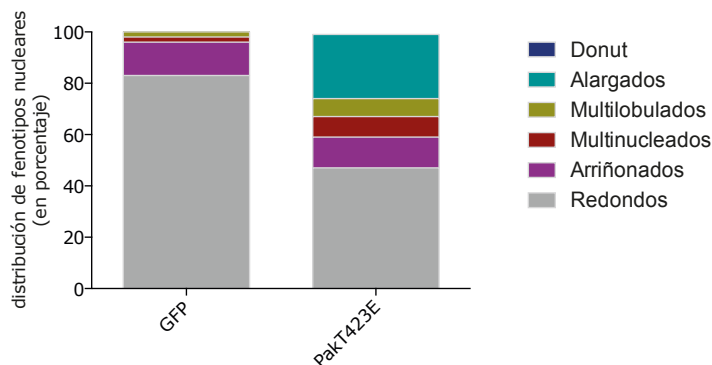
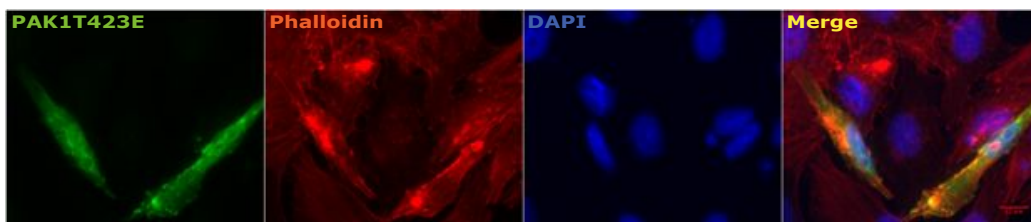




**Figura IV.12. Distribución con mutantes de Rac1QL para distintos efectores.** A. Inmunofluorescencia mostrando núcleos de células con los mutantes de Rac1QL para diferentes efectores B. Con el mutante incapaz de unirse a PAK1, el Y40C, se puede observar que el número de núcleos redondos pasa del 35% en el caso de Rac1QL al 66%. C. WB de expresión de las diferentes construcciones.

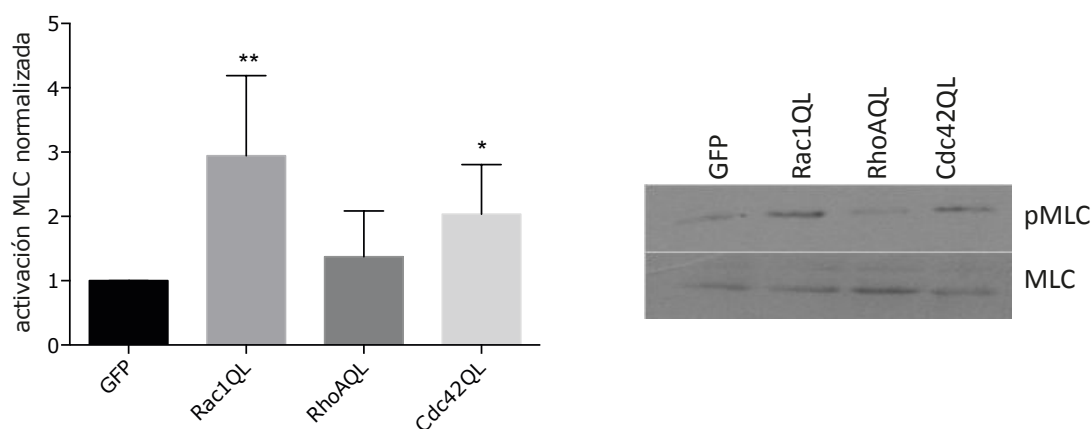
R

Así pues, a la luz de estos resultados, se analizó la influencia de la sobre-expresión de una construcción de PAK constitutivamente activa sobre es aspecto de los núcleos. En un principio se esperó ver un aumento de núcleos aberrantes y, efectivamente, al cuantificar el porcentaje de núcleos afectados se detectó una desviación con respecto al control. Sin embargo, no se produjo un aumento en la proporción de núcleos arriñonados, como en el caso de Rac1QL, sino que que la morfología más destacada fue la de los núcleos alargados. (Figura IV.13) Este dato llevó a concluir que probablemente PAK está jugando un papel en la regulación de la morfología nuclear, pero Rac1QL debe de estar provocando estos cambios a través de otros efectores adicionales.



**Figura IV.13. Distribución de la morfología nuclear en células sobre-expresando PAK1 constitutivamente activo.** Figura que muestra cómo la sobre-expresión de PAK1 constitutivamente activo no induce los cambios morfológicos que vemos con Rac1QL, es decir, núcleos predominantemente arriñonados, sino que lo que provoca es un aumento en el número de núcleos alargados.

Llegados a este punto se pensó que quizá existía una colaboración entre el citoesqueleto de microtúbulos y la contractilidad de actina/miosina para inducir este cambio en la morfología nuclear. Dado que con el tratamiento con la blebistatina también se reducía en parte el porcentaje de núcleos arriñonados se quiso comprobar si quizá era la combinación entre contractilidad actina/miosina y los microtúbulos la que proporcionaba la fuerza suficiente para inducir los cambios al núcleo. Lo primero que se analizó fue si con la sobre-expresión de las pequeñas RhoGTPasas aumentaba la contractilidad. La actividad de la miosina II está regulada por la fosforilación en la Serina 19 de la cadena ligera de miosina (MLC) por ello la fosforilación en este residuo es un indicador de contractilidad. Se transfectaron las células con los mutantes constitutivamente activos y a las 48 horas se lisaron y se hizo un *western blot* para ver si aumentaba la fosforilación de MLC. En la figura IV.14 se puede ver que efectivamente se produce un aumento en la fosforilación de MLC con Rac1QL y Cdc42QL.



**Figura IV.14 Fosforilación de MLC por las GTPasas constitutivamente activas.** Aumento en la fosforilación de MLC por parte de las RhoGTPasas constitutivamente activa. Este aumento es significativo en el caso de Rac1QL y de Cdc42QL. Análisis de un total de 5 *western blots*, haciendo un t de student de dos colas.

Nos sorprendió mucho no ver aumento en contractilidad con RhoAQL dado que esta proteína a través de ROCK induce contractilidad. En todo caso, sí se produjo un incremento en contractilidad con las otras dos RhoGTPasas y eso condujo al siguiente punto. De ser una combinación entre contractilidad y cambios en la dinámica de los microtúbulos lo que potencia el cambio morfológico en el núcleo, PAK debería estar promoviendo sólo uno (o ninguno) de estos dos procesos. Por ello se planteó determinar si PAK1 inducía contractilidad y analizar si al tratar con nocodazol las células con el mutante de PAK1



constitutivamente activo se revertía su capacidad de inducir una morfología alargada.

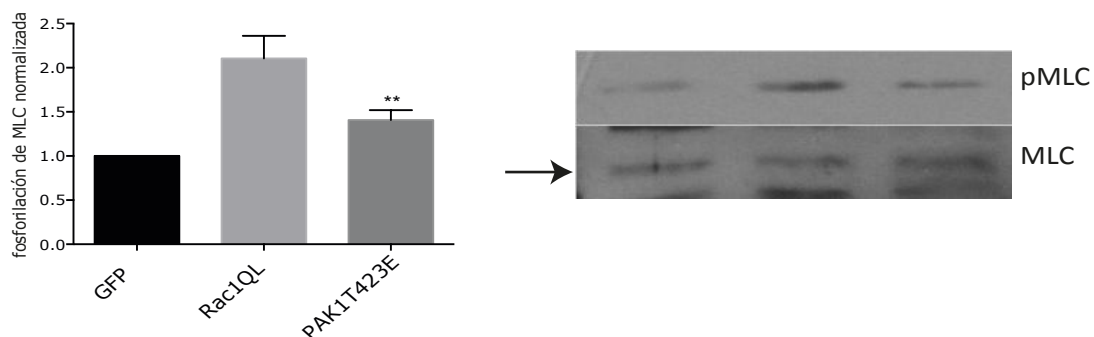
En el primer caso observamos que la diferencia en la fosforilación de MLC en las células que sobre-expresan PAK1 constitutivamente activa era menor y estadísticamente significativa con respecto a las células que sobre-expresaban Rac1QL. (Figura IV.15A) No se produjo tanta contractilidad actina miosina como con Rac1QL. Sí que aumentó con respecto al control, y de hecho, está descrito que PAK induce contractilidad, pero en nuestro sistema tiene que haber algún otro mecanismo a través del cual Rac1QL esté induciendo contractilidad. (Goeckeler, Masaracchia et al. 2000; Brzeska, Szczepanowska et al. 2004)

R

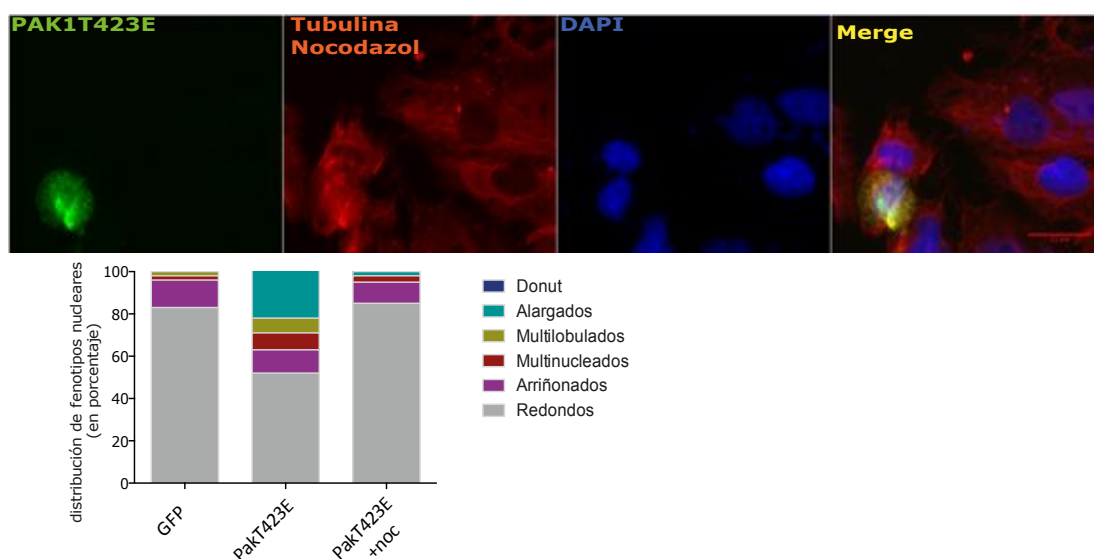
En el segundo experimento, se transfectaron las células A375P con Pak1 constitutivamente activo y a las 48 horas se trataron con nocodazol durante 3 horas. Posteriormente se procedió a ver si disminuía el porcentaje de núcleos alargados. En la figura IV.15B se muestra que efectivamente, el tratamiento con nocodazol revierte el efecto producido por PAK sobre los núcleos.

Gracias a estos experimentos podemos deducir que Rac1QL a través de Pak está regulando los microtúbulos y ello conlleva un cambio morfológico en los núcleos, pero para una deformación nuclear mayor, es necesario un aumento en contractilidad actina miosina que no se produce por Pak, sino por algún otro efector que desconocemos.

A



B



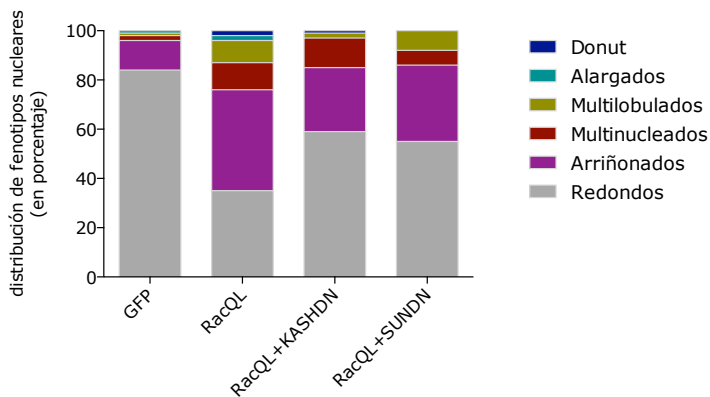
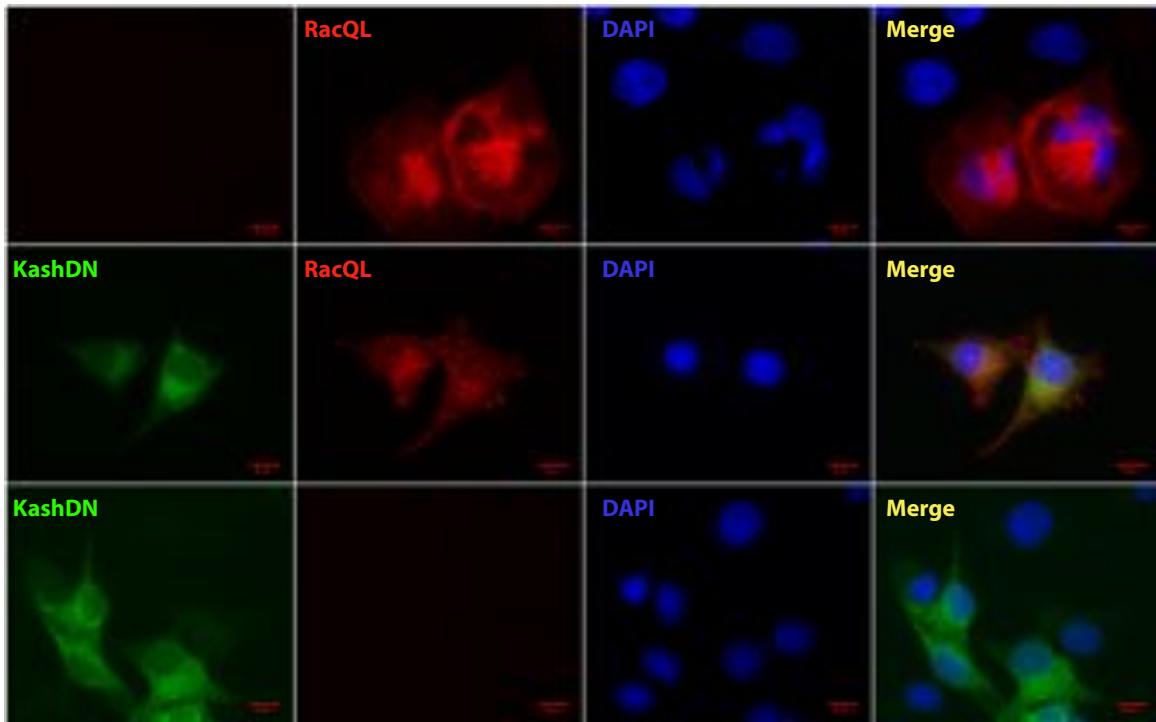
**Figura IV.15. Efecto de Pak sobre la contractilidad actina miosina y sobre los microtúbulos.** A. PakT423E no induce tanta fosforilación en MLC como Rac1QL, por lo que Rac1QL induce la fosforilación a través de otro efector. B. El tratamiento con nocodazol impide que Pak constitutivamente activo induzca cambios en la morfología nuclear.

### IV.2.3 Las proteínas SUN y KASH son mediadoras de la regulación de la morfología nuclear por las GTPasas Rho

Como ya se ha comentado anteriormente, la idea inicial era que las proteínas SUN y KASH sirvieran de conexión entre el citoesqueleto y el núcleo transmitiendo los efectos de la acción de las proteínas Rho al núcleo. De ser correcta esta hipótesis, romper esta conexión debería evitar el cambio morfológico en los núcleos. Esta cuestión se abordó mediante la ruptura de las uniones LINC al citoesqueleto. Para esta ruptura se sobre-expresaron dos construcciones dominantes negativas de SUN y KASH. (SUNDN y KASHDN) Estas construcciones son conocidas por interferir en la interacción de componentes endógenos del complejo LINC, causando la disminución de nesprinas en la membrana nuclear externa. (Crisp, Liu et al. 2006; Stewart-Hutchinson, Hale et al. 2008) Efectivamente, la sobre-expresión de estas construcciones disminuyó el porcentaje de núcleos anómalos al co-transfectarlo con Rac1QL comparándolo con el número de núcleos aberrantes obtenido con la sobre-expresión de Rac1QL solo. (Figura IV.16) Algo que captó nuestra atención fue el cambio de distribución de Rac1QL cuando se sobre-expresaba la proteína KashDN. En lugar de una distribución, en apariencia, predominantemente perinuclear, la GTPasa en presencia de KashDN adquiría una distribución menos definida, de aspecto

R

vesicular distribuida por toda la célula. Si bien es cierto que no en todas las células que expresan estas dos proteínas vemos esta distribución de Rac1QL sí que se da en un alto número de células. En cualquier caso, la ruptura del complejo LINC impide en gran medida el cambio morfológico nuclear inducido por las pequeñas Rho GTPasas.



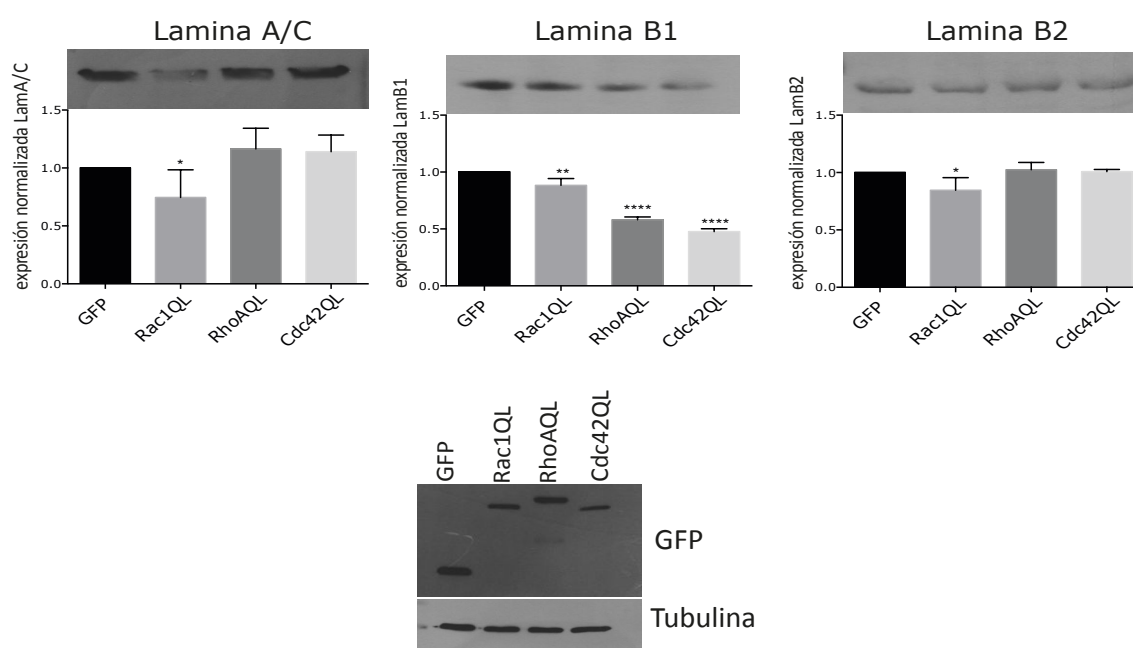
**Figura IV.16. Distribución de las morfologías nucleares con la ruptura del complejo LINC.** Al sobre-expresar dominantes negativos que rompen el complejo LINC se inhibe el pleomorfismo nuclear generado por RacQL

Una vez obtenido este resultado se pretendió determinar si la sobre-expresión de las GTPasas Rho estaba influyendo en la expresión de las laminas (Figura IV.17A) y en la de algunos componentes del complejo LINC. (Figura IV. 17B)

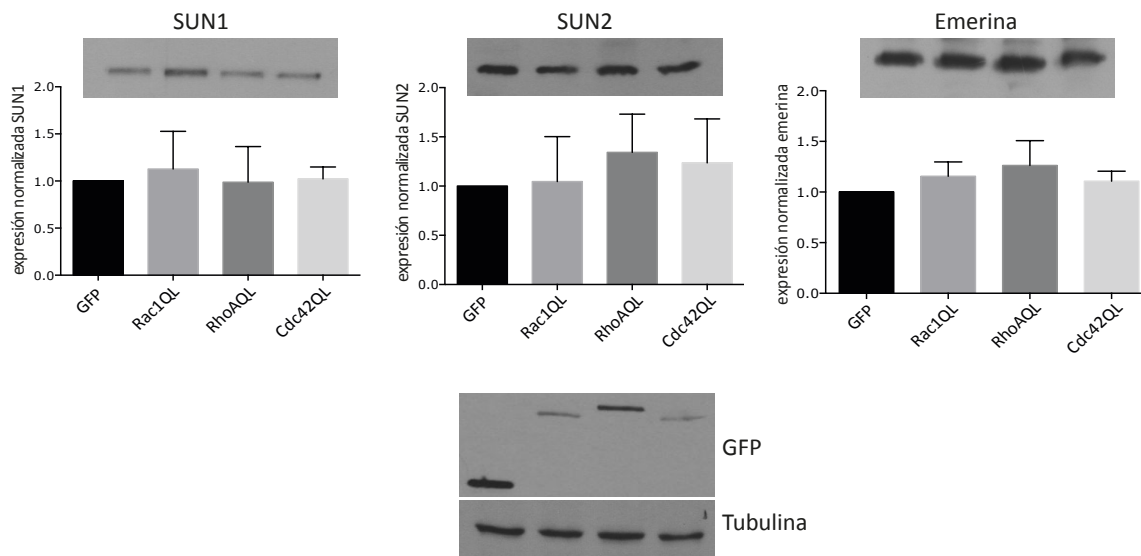
Al cuantificar la expresión de las laminas en A375P sobre-expresando las GTPasas constitutivamente activas se observó que en el caso de la lamina A/C su expresión se vio disminuida cuando las células sobre-expresaban Rac1QL. En el caso de la lamina B1 se vio mermada con todas las pequeñas GTPasas constitutivamente activas, si bien es sobre todo llamativa la bajada en expresión si las células sobre-expresaban RhoAQL o Cdc42QL. Con la lamina B2 sucedió lo mismo que con la lamina A/C, la proteína Rac1QL causó una bajada en la cantidad de lamina B2 presente en las células. Por tanto Rac1QL fue capaz de influir en la expresión de todas las laminas. Si bien es cierto que en todos los casos la diferencia con respecto al control fue estadísticamente significativa, la disminución en la expresión de las laminas no fue muy drástica. Aún así, puede que esta pequeña alteración sea suficiente para provocar un cambio en la rigidez del núcleo que facilite su posterior deformación. Ya se ha comentado en la introducción de esta tesis que estos filamentos intermedios son importantes a la hora de mantener la arquitectura nuclear.

Dado el gran tamaño de las proteínas nesprinas no fuimos capaces de ver su expresión. Con respecto a la expresión de SUN1/2 y de emerina, a diferencia de la situación que nos encontramos con las laminas, las pequeñas RhoGTPasas no parecen modular la expresión de ninguna de estas proteínas. (Figura IV.13B)

A.



B.



**Figura IV.17. Regulación de la expresión de las laminas y de algunos componentes del complejo LINC por las pequeñas RhoGTPasas.** En la figura A se muestra cómo las pequeñas RhoGTPasas son capaces de modular la expresión de las laminas, en el caso de las laminas A/C Rac1QL disminuye su expresión, en el caso de la lamina B1 todas disminuyen su expresión, sobre todo RhoAQL y Cdc42QL. La lamina B2 disminuye ligeramente en el caso de que la proteína sobre-expresada sea Rac1QL. B. La expresión de componentes de l complejo LINC no se ve afectada por ninguna RhoGTPasa. En todos los casos se analizaron 4 *western blots* diferentes y se analizó la estadística con un test de student de dos colas.

#### IV.2.4 El cambio morfológico del núcleo es un proceso dinámico

De los experimentos realizados hasta este punto se podía concluir que las pequeñas RhoGTPasas y en especial Rac1 eran capaces de inducir cambios morfológicos en el núcleo. Quedaba por dilucidar si este efecto era permanente, o si por el contrario el núcleo sufría continuas remodelaciones, es decir, si se trataba de un proceso dinámico. Para aclararlo se utilizó la construcción de Rac1 constitutivamente activa fusionada a la proteína GFP, de modo que se pudiera monitorizar la dinámica del núcleo de las células transfectadas. Para ello el núcleo se tiñó con Hoechst, con el fin de hacer el seguimiento de su morfología a lo largo del tiempo. Se tomaron fotos de los núcleos cada 10 minutos durante un intervalo de tres horas para analizar cambios en la morfología nuclear.

Habíamos descrito también que con la sobre-expresión de las proteínas dominante negativas de SUN y KASH se reducía la proporción de núcleos con morfología alterada.

Para este análisis se grabó el movimiento nuclear de las células A375P en tres condiciones diferentes:

- Células control sobre-expresando GFP
- Células sobre-expresando la proteína de fusión GFP-Rac1QL
- Células sobre-expresando las proteínas mCherry-Rac1QL y GFP-KashDN

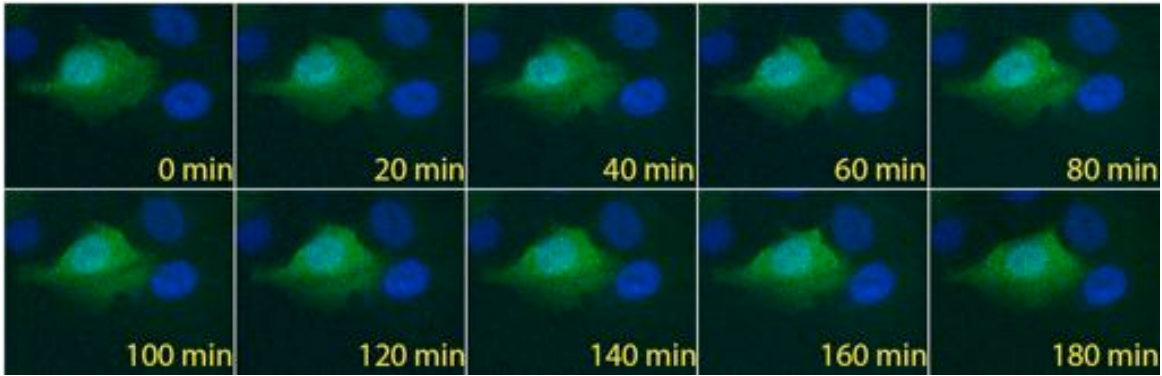
Aquellas células que sobre-expresaban Rac1QL mostraron un cambio morfológico nuclear más dinámico que aquellas que sobre-expresaban la proteína GFP, donde no se produjo cambio apreciable. Por el contrario, en las células que sobre-expresaban tanto Rac1QL como KashDN los núcleos parecían estar más estáticos. Si bien es cierto que algunas de las células que sobre-expresaban ambas proteínas poseían núcleos arriñonados, éstos no variaron a lo largo de las tres horas de monitorización. En la figura IV.18A se muestra en las fotos del vídeo con Rac1QL y KashDN cómo uno de los núcleos, arriñonado, en la esquina inferior de la foto, permanece arriñonado durante las tres horas.

Se pretendió cuantificar el cambio que se producía en los núcleos a lo largo del tiempo para poder compararlos. Se decidió analizar 10 núcleos al azar de cada condición y medir la redondez, el perímetro y el área del núcleo mediante el uso del programa ImageJ. Para hacer la comparativa más visual, en las gráficas se representaron las medidas normalizadas con respecto al primer fotograma, de modo que el primer fotograma tiene siempre el valor "1". Se estudió la variación a lo largo del tiempo. Efectivamente, tanto la redondez como el área como el perímetro en las células GFP se mantuvo estable, mientras que en las Rac1QL se produjeron alteraciones importantes. En el caso de las células que expresaban tanto Rac1QL como KashDN el núcleo sufrió cambios, pero no fueron tan acentuados como con Rac1QL solo. Además, cabe destacar que el perímetro nuclear de las células que sobre-expresaban Rac1QL no sufrió tantos cambios a lo largo del tiempo como la redondez o el área. De las tres características nucleares medidas la que mayor diferencia mostró con respecto al control y con respecto a las que también sobre-expresaban KashDN fue la redondez. (Figura IV.18B)

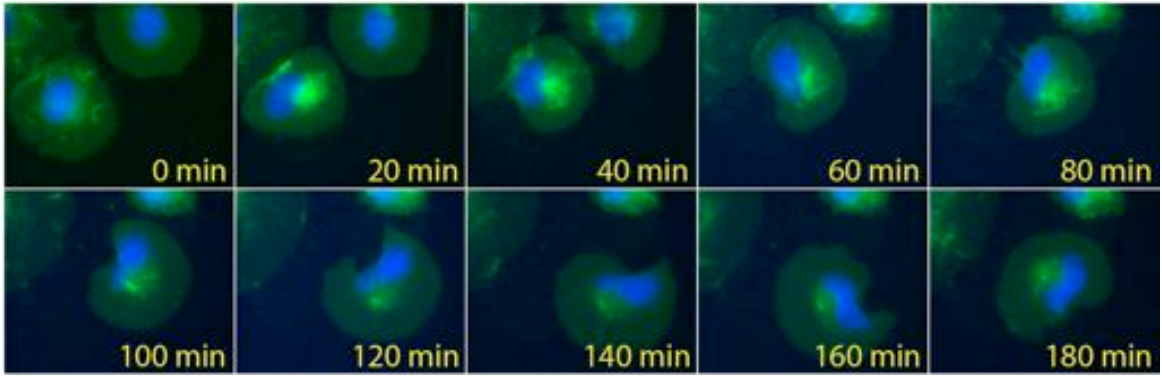
R

A.

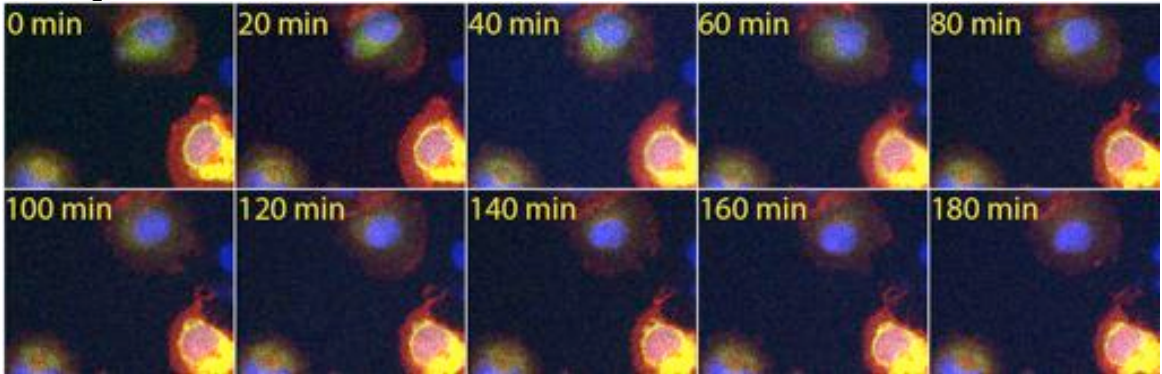
**GFP**



**Rac1QL**



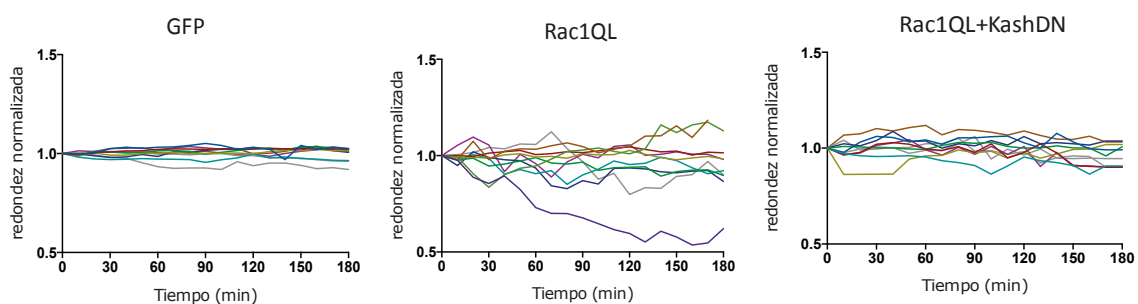
**Rac1QL+KashDN**



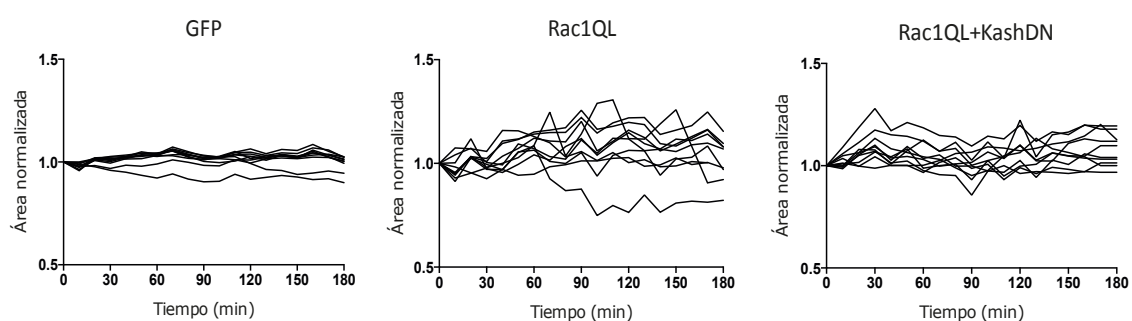
R

B.

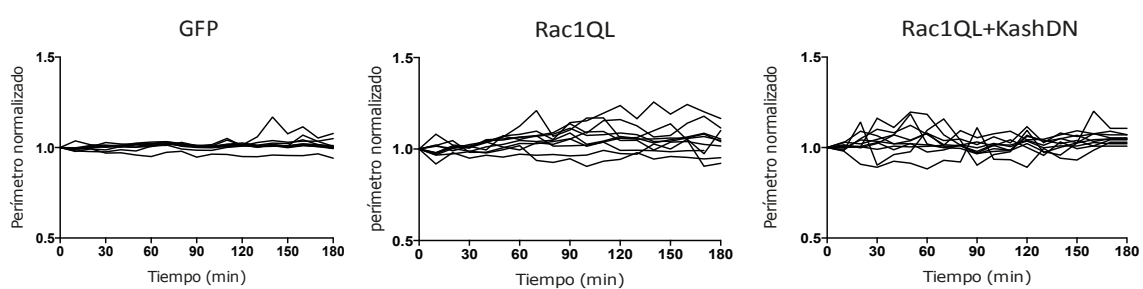
## Redondez



## Área



## Perímetro



**Figura IV.18. Time-lapse de 3 horas de núcleos sobre-expresando GFP, Rac1QL y Rac1QL con KashDN.** En la figura A se muestran fotos del *time-lapse* en las que se puede apreciar cómo la célula que sobre-expresa Rac1QL tiene un núcleo que va variando de forma a lo largo del tiempo, mientras que ni las células que expresan GFP ni las que co-expresan Rac1QL y KashDN tienen unos núcleos tan dinámicos. B. Análisis de diez núcleos al azar de cada una de las condiciones en las que estudiamos la variación en redondez, área y perímetro en un intervalo de tiempo de 3 horas. La redondez del núcleo es la que más varía cuando la célula sobre-expresa Rac1QL frente a las células control (GFP) o las células que co-expresan Rac1QL y KashDN.

R

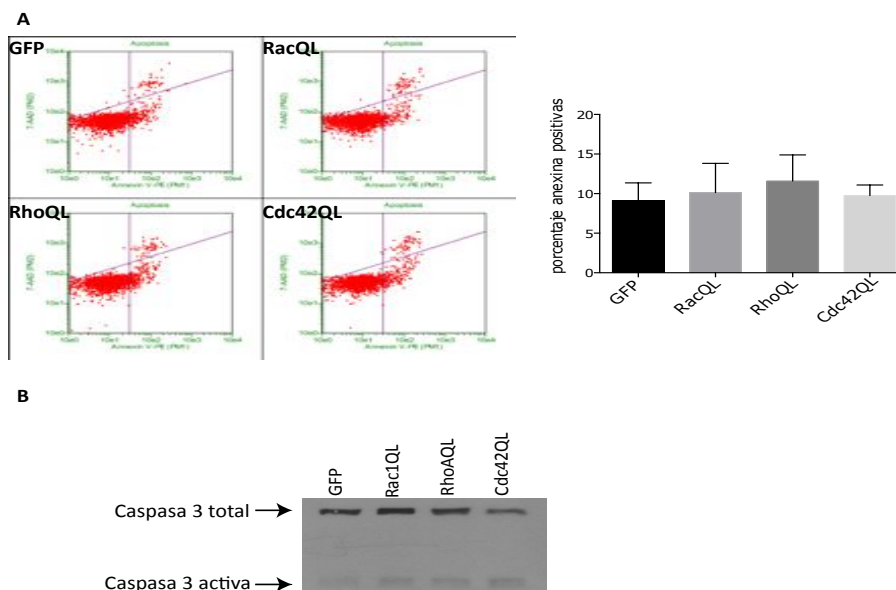


## IV.3 Repercusión biológica del cambio morfológico nuclear

Otro de los objetivos marcados era comprender qué proceso estaban regulando las GTPasas al provocar este cambio morfológico de los núcleos.

### IV.3.1 Las Rho GTPasas no inducen apoptosis

Las RhoGTPasas regulan múltiples procesos biológicos, entre los que se encuentra la apoptosis. La inducción de apoptosis está estrechamente ligada con la capacidad de las pequeñas RhoGTPasas de activar proteínas como las JNK o la de regular proteínas de producción de ROS, como las de la familia NOX. (Embade, Valeron et al. 2000; Munoz-Alonso, Gonzalez-Santiago et al. 2008; Selimovic, Badura et al. 2013) Dado que durante la apoptosis se generan cambios en el núcleo como la condensación de cromatina o la fragmentación nuclear (Ziegler and Groscurth 2004), se especuló que quizá los núcleos aberrantes eran pasos previos a la fragmentación o condensación. Por ello, se transfectaron las células con las construcciones de las RhoGTPasas activas y a las 48 horas se analizaron las células (tanto las muertas flotantes como las adheridas a la placa) para ver si habían entrado o estaban entrando en apoptosis. Por una parte se midió la cantidad de células anexina-V positivas, por otra la fragmentación de la caspasa 3, ambos métodos indicadores de apoptosis. Se produjo un ligero incremento de la apoptosis con respecto al control cuando se calculó la presencia de células anexina-V positivas, pero tras un análisis estadístico t de student en todos los casos salió no significativo. (Figura IV.19)

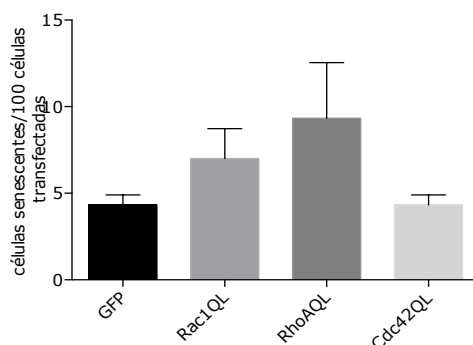
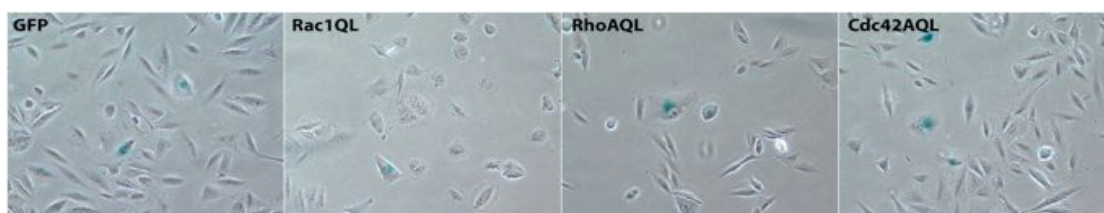


**Figura IV.19 Apoptosis inducida por las GTPasas Rho constitutivamente activas.** En la figura A se muestra la apoptosis medida por células anexina positivas. En la B miramos la apoptosis por la fragmentación de la caspasa 3. Con ninguno de los dos métodos se observa aumento significativo de muerte celular. Análisis en tres experimentos independientes con t de student de dos colas.

### IV.3.2 Las Rho GTPasas no inducen senescencia

Otra de las funciones que regulan las GTPasas a través de sus diferentes efectores es la senescencia. (Debidda, Williams et al. 2006; Caino, Meshki et al. 2009; Gorgoulis and Halazonetis 2010) Igual que sucede con la apoptosis, el aspecto morfológico de los núcleos senescentes se ve alterado, así por ejemplo, en muchas ocasiones las células presentan poliploidía, la expresión de las laminas se ve alterada y pueden presentarse núcleos lobulados (Mehta, Figgitt et al. 2007; Ohshima 2008; Barascu, Le Chalony et al. 2012) De hecho, la pérdida de lamina B1 es un biomarcador de senescencia (Freund, Laberge et al. 2012) y como se ha visto en la figura IV.17 con las tres GTPasas constitutivamente activas disminuía su expresión, sobre todo con RhoA y Cdc42.

Las células senescentes expresan una  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia, de modo que para detectarlas se añade  $\beta$ -gal a las células fijadas, previamente transfectadas con nuestras construcciones, y se analiza al microscopio la existencia de tinción azul, indicador de que la célula está senescente. Al hacerlo pudimos observar que no se produjo aumento significativo en senescencia con respecto al control, si bien sí hubo tendencia a aumentar con Rac1QL y RhoAQL. (Figura IV.20) A pesar de este aumento, al no ser significativo pudimos descartar que el efecto producido sobre el núcleo estuviera asociado a senescencia.

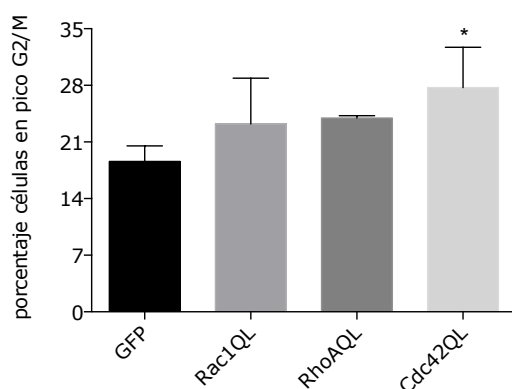


**Figura IV.20. Senescencia inducida por las GTPasas constitutivamente activas.** La sobre-expresión de la GTPasa Rho constitutivamente activa induce un aumento de senescencia, medida por actividad  $\beta$ -galactosidasa, sin embargo no son cambios estadísticamente significativos.

### IV.3.3 El cambio morfológico nuclear no se explica por fallos en el ciclo celular

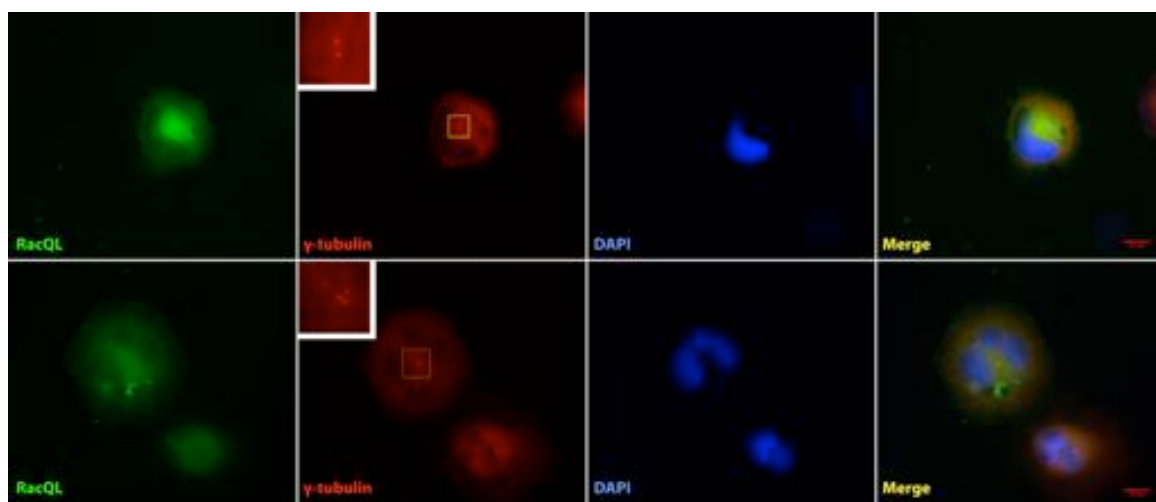
Dado que, como se puede observar en la figura IV.3, la sobre-expresión de las pequeñas GTPasas en A375P contribuyó al aumento del número de células multinucleadas, era importante estudiar si las alteraciones en la morfología nuclear eran consecuencia de fallos en mitosis. En algunos estudios se ha visto que las células pueden salir de mitosis sin la segregación de cromosomas o citocinesis, dando lugar a núcleos poliploides ya sean de apariencia normal o aberrantes. Por esta razón se planteó la posibilidad de que las células con núcleos aberrantes fueran resultado de una mitosis incompleta. (Ohshima 2008) Es decir, independientemente de la presencia de uno o varios núcleos, la carga de DNA y de proteínas podría ser doble. Por ello, se transfectaron las células con las Rho GTPasas constitutivamente activas fusionadas a GFP y se hizo un análisis del ciclo celular mediante citometría en la que se midió la cantidad de DNA mediante tinción con yoduro de propidio de las células verdes. La intensidad de fluorescencia obtenida con el yoduro de propidio por tanto, correlaciona con la cantidad de DNA. Se obtienen al hacer esto tres picos, el primero equivale a células en G1, el segundo equivale a células en interfase S y el último es el de células en G2-mitosis. Este último pico implica que esas células tienen doble carga de DNA.

El análisis de las células transfectadas reveló que efectivamente se producía un ligero incremento en el número de células en el tercer pico con respecto a las células control, siendo esta diferencia más acentuada en aquellas células que habían sido transfectadas con Cdc42QL, de hecho fue el único punto en que la diferencia salía significativa. (Figura IV.21) Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la figura IV.3. Ahí veíamos que la cantidad de células binucleadas era mayor en caso de haber sido transfectadas con Cdc42QL. Por tanto, la información obtenida con este experimento indicaba que el porcentaje de núcleos aberrantes presente en células transfectadas con Rac1QL no parecía ser consecuencia de fallos en mitosis.



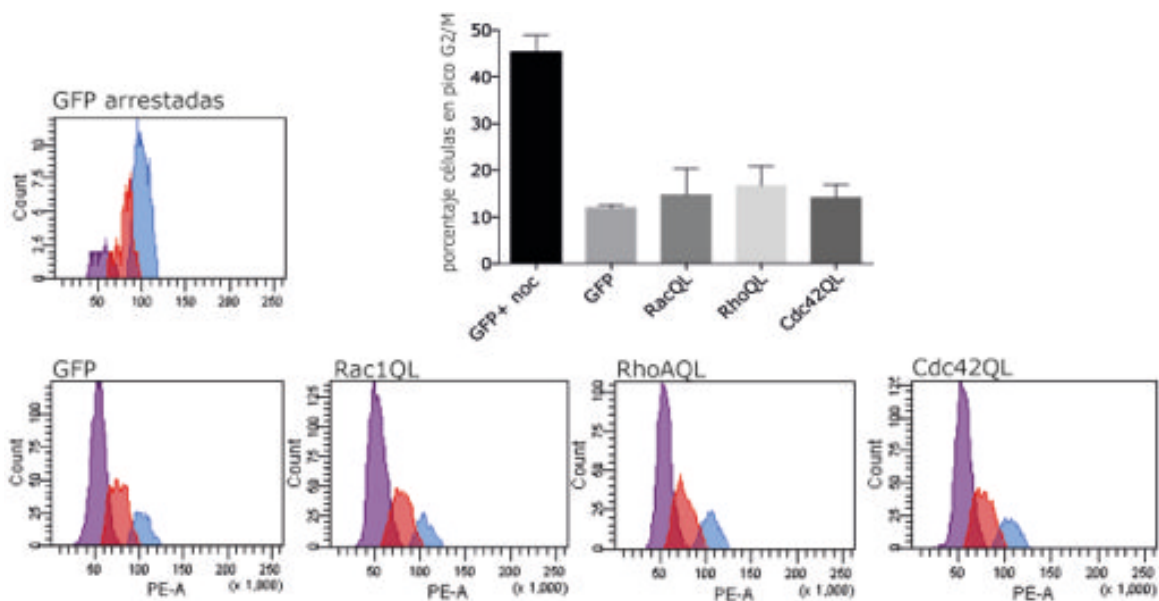
**Figura IV.21. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.** Resultado de la citometría para el análisis del ciclo celular con las diferentes RhoGTPasas, mostrando el porcentaje de células que se encuentran en el pico de G2. Haciendo un análisis estadístico con t de student vemos que la única diferencia significativa con respecto al control se obtiene con Cdc42QL.

A pesar del resultado anterior se continuó estudiando la hipótesis de que posibles fallos en mitosis fueran la causa de la morfología alterada de los núcleos. Una célula con un ciclo sin alteraciones, tiene uno o dos centrosomas dependiendo de la fase del ciclo en la que se encuentre. Por el contrario, una célula que haya sufrido una citocinesis incorrecta, poseerá más centrosomas. Por ello se quiso determinar el número de centrosomas de aquellas células con núcleos anómalos. Como marcaje de centrosomas se utilizó la  $\gamma$ -tubulina. Como se puede observar en la figura IV.22 en el caso de las células con núcleos arriñonados, se cuantificó o bien uno o dos centrosomas, pero nunca más de dos. Sin embargo, en las células con más de un núcleo el número de centrosomas estaba por encima de dos. Este resultado apuntaba a que la apariencia aberrante de los núcleos no era consecuencia de una citocinesis incompleta.



**Figura IV.22. Marcaje de  $\gamma$ -tubulina en núcleos arriñonados frente a células multinucleadas.** la figura muestra que las células con más de un núcleo tiene el doble de centrosomas que la arriñonada, dando a entender que las células arriñonadas no han sufrido un fallo en citocinesis.

Finalmente se analizó un posible arresto de las células A375P en G2/M causado por las RhoGTPasas. Para ello, se estudió la capacidad de las células de salir de esta fase del ciclo. Con este motivo se forzó a las células previamente transfectadas con la GTPasa correspondiente a arrestarse en G2/M mediante el tratamiento durante 16 horas con nocodazol. En caso de que las GTPasas impidieran el paso a la siguiente fase del ciclo, tras la retirada de nocodazol del medio, las células continuarían arrestadas en G2/M. El análisis de la citometría de flujo mostró que independientemente de la GTPasa con la que estuvieran transfectadas las células, éstas eran capaces de continuar con el ciclo celular al retirar el nocodazol del medio. (Figura IV.23) Como control de que el nocodazol estaba induciendo una parada del ciclo en G2 se utilizaron unas células transfectadas con GFP a las que no se les retiró el tratamiento del medio. Este análisis permitió concluir que las RhoGTPasas no estaban causando un arresto en G2 y que por tanto los núcleos aberrantes no eran consecuencia de una parada en G2/M.

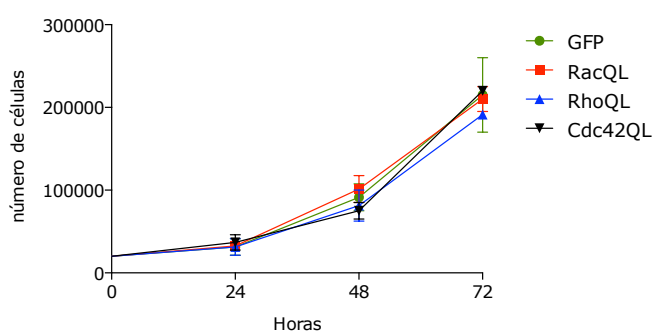


**Figura IV.23 Análisis de arresto en G2/M.** Las células fueron arrestadas mediante el tratamiento con nocodazol en fase G2/M. Posteriormente se permitió que continuaran el ciclo al quitarles el nocodazol del medio. En caso de que la GTPasa que estuvieran sobre-expresando hubiera provocado parada del ciclo en G2, las células no serían capaces de continuar con la mitosis. Sin embargo, en este experimento no vemos diferencias significativas con respecto al control.

Teniendo todos estos experimentos en cuenta, pareció razonable concluir que el efecto de las RhoGTPasas sobre la morfología nuclear no estaba relacionado con un fallo en el ciclo celular.

### IV.3.4 Las GTPasas Rho no afectan a la proliferación

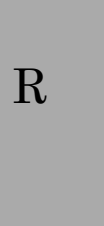
Otro efecto biológico a estudiar fue el de la proliferación celular. Nos interesaba saber si las RhoGTPasas estaban influyendo sobre la proliferación, ya que hay múltiples estudios que observan que las pequeñas GTPasas actúan sobre la proliferación en diferentes tipos celulares y en varios tipos de cáncer. (Morin, Flors et al. 2009; Gastonguay, Berg et al. 2012; Melendez, Liu et al. 2013; Hofbauer, Krenn et al. 2014) Para este caso, se transfectaron las células A375P con una de las tres GTPasas constitutivamente activas y con GFP y se seleccionaron con genética para conseguir células que expresaran de forma estable las GTPasas. Posteriormente se plaquearon inicialmente 20000 células y se contaron durante 3 días cada 24 horas. En la figura IV.24 se muestran las curvas de proliferación en las que se puede apreciar que ninguna de las GTPasas transfectadas confirió una ventaja proliferativa a las células.



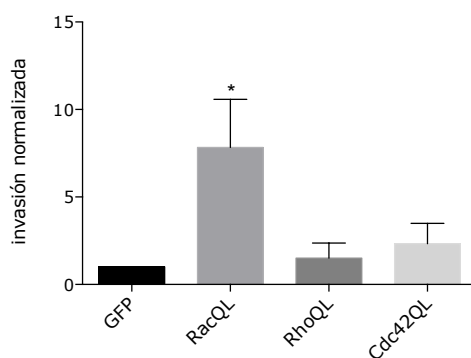
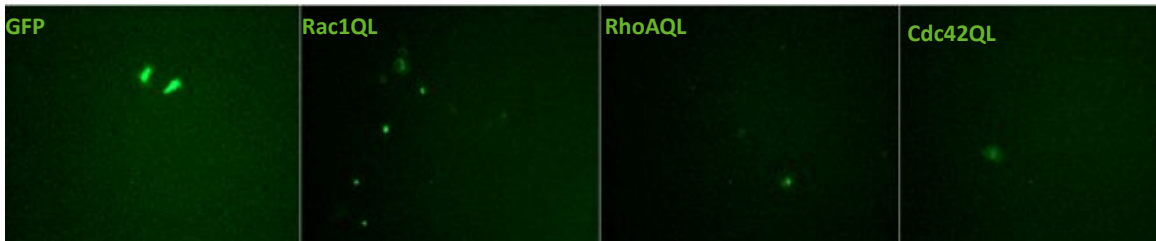
**Figura IV.24 Curvas de proliferación con Las RhoGTPasas activas.** Curvas de proliferación en células estables. Se cuenta el número de células cada 24 horas durante tres días. No se aprecia ningún cambio significativo en la capacidad proliferativa de estas células.

### IV.3.5 Rac1 induce invasión

Las pequeñas RhoGTPasas están estrechamente ligadas a la migración celular y a la capacidad invasiva de las células. Por tanto una hipótesis que se barajó fue que la deformación nuclear inducida por las RhoGTPasas, en especial por Rac1, aportara ventajas invasivas permitiendo el paso de las células a través de espacios más pequeños. El núcleo es el orgánulo más grande y rígido dentro de una célula y por tanto es el que determina el diámetro que ésta podrá atravesar. (Wolf, Te Lindert et al. 2013). Se pretendió analizar si las células que sufrían mayor deformación nuclear tenían mayor capacidad invasiva. Para ello, se utilizaron unos *transwell* con poros de diámetro de 8  $\mu\text{m}$  con una capa de matrigel para estudiar la invasión de las células transfectadas con las GTPasas Rho constitutivamente activas. Tras 16 horas se cuantificó el número de células



verdes (es decir, aquellas que sobre-expresaban la GTPasa correspondiente) que habían sido capaces de atravesar la membrana. Aquellas células que sobre-expresaban Rac1QL atravesaron en mayor número la membrana y aumentan significativamente con respecto al control. (Figura IV.25)



**Figura IV.25** Invasión en *transwell* de 8  $\mu$ m con matrigel. Tras 16 horas dejando que invadan, se cuantifican las células verdes que han sido capaces de traspasar el pocillo. Las células que más capacidad tienen de atravesar esta matriz son las células que sobre-expresan la proteína Rac1QL. Análisis de un total de 4 experimentos con t de student de dos colas.

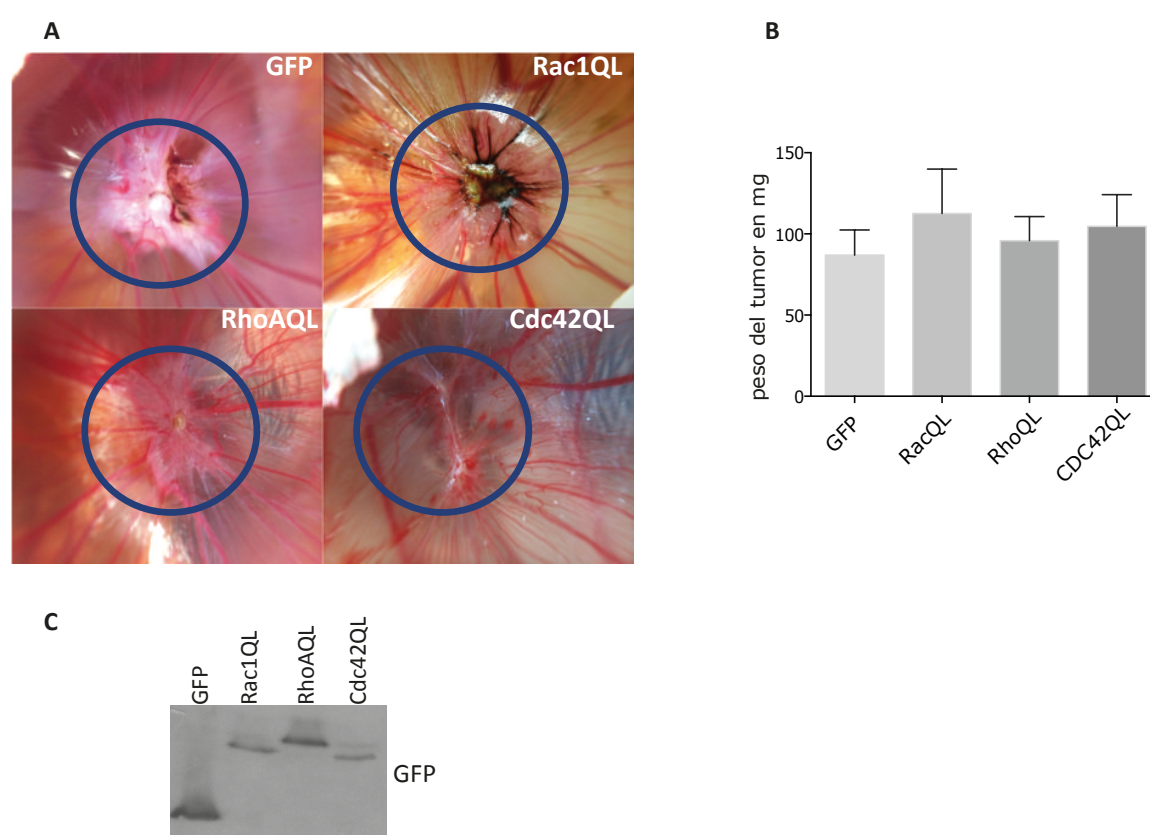
A raíz de estos resultados se concluyó que Rac1QL estaba favoreciendo la invasión de las células en ensayos en *transwell*. Por esta razón se planteó profundizar en estos resultados en modelos de invasión *in vivo*.

## IV.4 Análisis *in vivo* en modelo de embrión aviar

### IV.4.1 Rac1QL promueve intravasación

A tenor de todos los resultados descritos hasta este punto, se había llegado a la conclusión de que Rac1QL estaba induciendo un cambio morfológico en los núcleos regulando el citoesqueleto (tanto los microtúbulos como la contractilidad actina miosina) y a través de las proteínas SUN y nesprinas. Tras el estudio en el que se trató de asociar la morfología nuclear aberrante a un determinado papel biológico, se observó que Rac1QL aumentaba la invasión de las células A375P en ensayos en *transwell*. Por todo esto, se decidió hacer un estudio *in vivo* en un modelo de embrión aviar. Para ello se inocularon células A375P sobre-expresando la RhoGTPasa correspondiente sobre la membrana

corioalantoidea (CAM) y se dejaron crecer hasta desarrollar un tumor durante siete días. Esta membrana se encuentra debajo de la cáscara del huevo, está muy vascularizada y permite el desarrollo del tumor. Transcurrido este tiempo se tomaron los tumores y se pesaron con el fin de determinar si existían diferencias en tamaño en función de la RhoGTPasa sobre-expresada. (Figura IV.26) No se detectó ningún cambio estadísticamente significativo en este aspecto, dato que no es sorprendente, ya que en el análisis previo en curvas de proliferación con las células se había observado una proliferación muy similar de las células independientemente de la RhoGTPasa sobre-expresada.

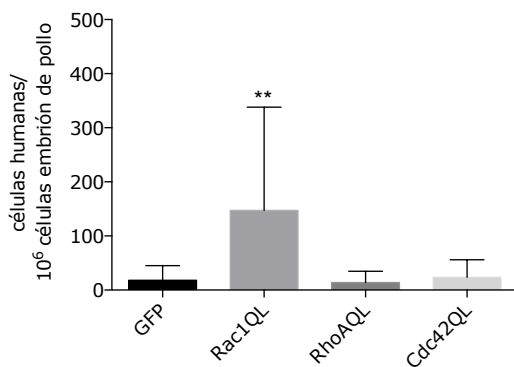


**Figura IV.26 Tumores en embriones de pollo con las diferentes GTPasas.** Tanto la dimensión (A) como el peso (B) del tumor que obtenemos con las diferentes GTPasas es muy similar y no da resultados estadísticamente significativos. C. Western blot anti-GFP mostrando la expresión de las GTPasas en los tumores.

El interés en este experimento radicaba en el análisis de una posible metástasis incrementada por la sobre-expresión de las RhoGTPasas. Uno de los pasos clave dentro de la metástasis es la entrada de las células tumorales al torrente sanguíneo, proceso denominado intravasación. Para estudiar la intravasación en este modelo, se toma la parte de la CAM más alejada al tumor primario. Este tejido se analiza mediante PCR cuantitativa frente a secuencias



*Alu*. Éstas son secuencias repetitivas que se dan muy abundantemente en el genoma humano y que son características de humano y otros primates, (Mighell, Markham et al. 1997) por lo que sólo se obtiene amplificación de estas secuencias en caso de que haya células humanas en la CAM. A mayor amplificación mayor número de células presentes en la CAM, indicador de mayor intravasación. Mediante una recta patrón con un número de células conocido se puede cuantificar cuántas células humanas hay en función de la amplificación resultante de la PCR cuantitativa.



**Figura IV.27 Sólo las células con RacQL consiguen intravasarse.** Las células con Rac1QL son capaces de intravasarse y aparecen en la CAM en la zona más alejada del tumor primario. El número de huevos utilizado por cada condición: 20 huevos para GFP, 17 con Rac1QL, 16 para RhoAQL y 16 para Cdc42QL. Análisis t de student de dos colas.

Como se observa en la gráfica (Figura IV.27) con la única GTPasa con la que aumentó la cantidad de células capaces de intravasarse fue con Rac1QL. A pesar de la gran variabilidad obtenida en los experimentos con Rac1QL la diferencia con respecto al control es estadísticamente significativa.

La metástasis es un proceso de varios pasos en que tras la intravasación las células tienen que sobrevivir en el torrente sanguíneo y finalmente salir de éste en un proceso denominado extravasación. Una vez fuera del torrente podrán proliferar y generar un tumor secundario en otro órgano. Por ello, con el fin de determinar si las RhoGTPasas conferían ventajas a las células para colonizar otros órganos, se analizaron los hígados de los embriones de pollo en busca de secuencias *Alu*. En este caso en ninguna de las condiciones se obtuvo amplificación de estas secuencias, lo que implica que las células A375P no llegaron hasta el hígado en ningún caso.

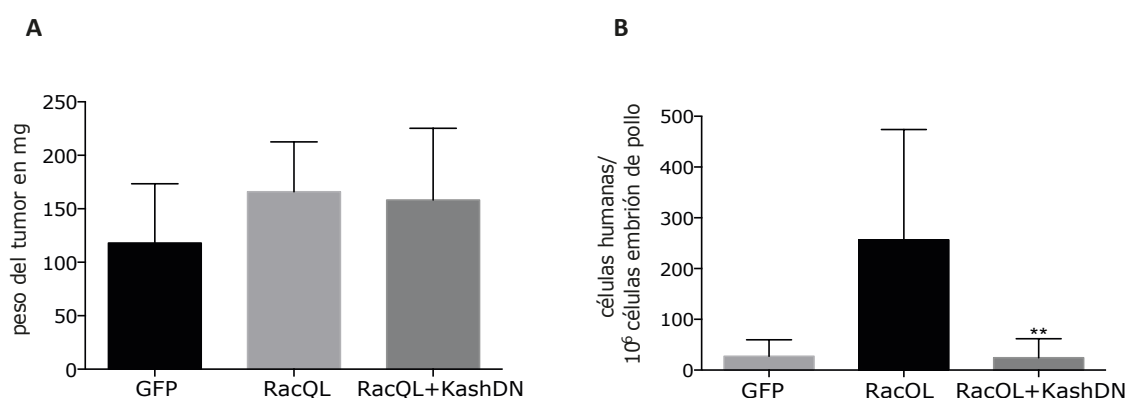
De estos resultados se pudo deducir que la GTPasa Rac1QL estaba facilitando la entrada al torrente sanguíneo de las células, pero que no confería ninguna ventaja a la hora de continuar con el proceso metastásico.

#### IV.4.2 La ruptura del complejo LINC evita la intravasación

Resultados previos en las células A375P habían mostrado que la ruptura del complejo LINC mediante la sobre-expresión de la construcción dominante negativa de KASH impedía que Rac1QL modificara la morfología nuclear. Teniendo estos datos en cuenta se planteó estudiar si la sobre-expresión de KASHDN en las células que también tuvieran Rac1QL lograba evitar la intravasación de éstas en el modelo de embrión aviar.

Tras la formación del tumor, se procedió a analizar su tamaño y peso y se determinó que no existían diferencias en este aspecto. (Figura IV.28A). Este dato es importante, ya que de encontrar diferencias en el número de células intravasadas no se podría achacar a una mayor capacidad proliferativa, sino únicamente a su capacidad de entrar en el torrente sanguíneo.

El análisis de la PCR cuantitativa mostró que aquellas células que sobre-expresan tanto Rac1QL como KASHDN eran incapaces de intravasarse al compararse con las que tan sólo sobre-expresan Rac1QL. (Figura IV.28B). Este resultado demuestra que la conexión del citoesqueleto con el nucleoesqueleto a través del complejo LINC es la que otorga a las células que sobre-expresan Rac1QL la ventaja de intravasarse y que la disrupción de dicho complejo evita la entrada de las células al torrente sanguíneo, a pesar de la presencia de la GTPasa.

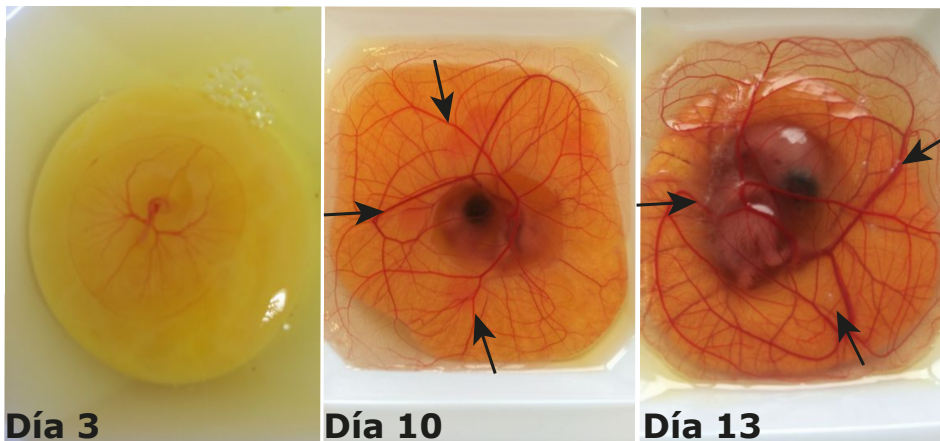


**Figura IV.28 Las células que sobre-expresan Rac1QL y KASHDN inducen tumores de igual tamaño, pero no consiguen intravasarse.** Las células que sobre-expresan además de la proteína Rac1QL la proteína KashDN provocan un tumor de igual tamaño que las que sólo expresan la proteína Rac1QL. (A). Sin embargo, al co-expresar las dos proteínas la intravasación a la CAM es mucho menor. En este caso el número de huevos utilizados fueron 10 para GFP, 9 para Rac1QL y 12 para Rac1QL + KASHDN. El análisis estadístico fue el t de student de dos colas. El análisis t de student de dos colas se hizo comparando la condición Rac1QL con Rac1QL +KashDN.

Los hígados de estos embriones de pollo también se analizaron en busca de células humanas y en este caso, igual que en el anterior, las células no llegaron a colonizar este órgano.

#### IV.4.3 La ruptura del complejo LINC evita la invasión

El resultado anterior indicaba que el complejo LINC era crucial para la ventaja que otorgaba Rac1QL a las células. Se pretendió corroborar este resultado mediante un segundo abordaje en un modelo en embrión de pollo, pero diferente al anterior. En este caso se deja crecer el embrión *ex ovo*. Para ello, a día tres de desarrollo se extrae el embrión del huevo y se deja crecer en una navecilla de pesaje hasta el día 10. En ese momento se inoculan las células A375P directamente sobre el mesodermo de la CAM cerca de los vasos sanguíneos y se dejan aumentar los microtumores durante tres días más. Posteriormente se toman estos microtumores y se analizan al microscopio. (Figura IV.29)

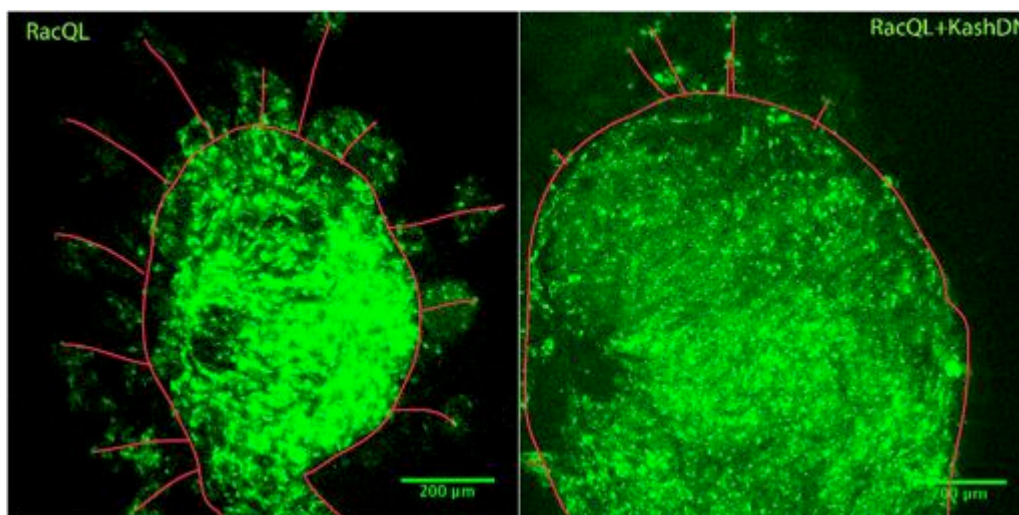


**Figura IV.29 Modelo *ex ovo*.** Fotos que muestran el modelo *ex ovo* a día 3, según se casca el huevo, a día 10, recién puestas las células, las flechas indican algunos de los futuros microtumores, a día 13, las flechas indican algunos de los microtumores. En ese punto se corta el microtumor para observarlo al microscopio.

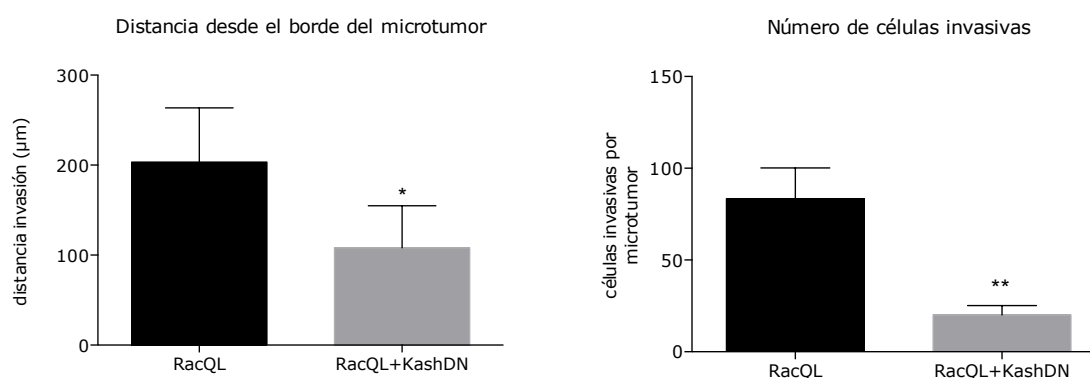
En este modelo las células inician a los dos días la evasión del microtumor mesodermal y comienzan la invasión intersticial que se puede visualizar en un microscopio de epifluorescencia, ya que las células llevan las construcciones fusionadas a GFP, de modo que puede cuantificarse la migración. (Casar, Rimann et al. 2014)(Figura IV.30A) Por un lado se puede cuantificar la distancia máxima que recorren las células desde el borde del microtumor y por otro además se

puede cuantificar el número de células que escapan del microtumor. (Figura IV. 30B) En ambos casos disminuyó el número considerablemente cuando las células expresan además de Rac1QL la construcción dominante negativa de KASH. Estos datos corroboran los datos anteriores.

A.



B.



**Figura IV.30 La ruptura del complejo LINC evita la diseminación temprana del tumor inducida por Rac1QL.** A. Células escapando e invadiendo en el modelo de microtumor intramesodermal. En el caso de microtumor con Rac1QL las células verdes son aquellas que sobre-expresan la pequeña GTPasa. En el caso del microtumor con Rac1QL y KashDN la construcción fusionada a GFP es KashDN. Esta construcción se expresa en menores cantidades que la GTPasa, y hemos podido comprobar por inmunofluorescencia que en el 90% de los casos si expresa la proteína Kash, también sobre-expresa la pequeña GTPasa. B. Gráficas que muestran cómo disminuye la distancia recorrida cuando las células sobre-expresan el KashDN además de Rac1QL y el número de células que escapan del microtumor. El análisis que se hizo es un t de student de dos colas.



## V. Discusión



D

## V.1 Influencia de las RhoGTPasas sobre el núcleo

Dentro de los modelos celulares usados para el estudio de algunas laminopatías como HGPS o la distrofia muscular de Emery-Dreifuss están las células C2C12, células de mioblasto de ratón. En estas células cuando se sobre-expresan mutantes de lamina se ha observado que se producen anomalías estructurales en la membrana nuclear. (Favreau, Dubosclard et al. 2003) Es por ello que seleccionamos este modelo para el primer abordaje que realizamos. Queríamos ver si al sobre-expresar las pequeñas RhoGTPasas constitutivamente activas conseguíamos núcleos aberrantes. Además quisimos hacer el estudio en células tumorales, ya que se han observado cambios en la morfología nuclear en varios tipos de cáncer. Las invaginaciones de la envoltura nuclear son frecuentes en varios tipos de cáncer, la aparición de lóbulos se asocia principalmente a adenocarcinomas. También se pueden producir surcos a lo largo del núcleo que se asocian a varios tipos de tumores. (de Las Heras, Batrakou et al. 2013) Y ya que la activación de las pequeñas RhoGTPasas (normalmente por expresión alterada de GEFs) es frecuente en melanoma, se utilizaron líneas de melanoma. (Cook, Rossman et al. 2014)

Al hacer el análisis morfológico de los núcleos obtenidos con las diferentes GTPasas observamos que en todos los casos la proporción de núcleos aberrantes es mayor con la sobre-expresión de alguna de las tres RhoGTPasas. Este primer resultado apoya la teoría de que efectivamente existe una relación entre las GTPasas y la estructura nuclear. Si bien en todos los casos se produce un aumento en el porcentaje de núcleos con morfología alterada, la diferencia con respecto al control es más acentuada cuando las GTPasas sobre-expresadas son Rac1 o Cdc42. Sin embargo, en este primer análisis no tuvimos en cuenta la morfología nuclear obtenida y pensamos que al no hacerlo se perdía información relevante, ya que cada GTPasa podría estar favoreciendo una morfología determinada. Con este fin se establecieron las morfologías nucleares más frecuentes y, esta vez centrándonos en una única línea celular, se cuantificó la distribución con las diferentes RhoGTPasas.

Tras la cuantificación se determinó que en las A375P, la línea celular por la que nos decantamos, el porcentaje de núcleos redondos en células transfectadas con Rac1 y con Cdc42 es prácticamente igual. La diferencia estriba en que en el



caso de Rac1 la mayor parte de los núcleos aberrantes que encontramos son núcleos con una morfología arriñonada y en el caso de Cdc42 la alta proporción de núcleos afectados se debe a que las células son binucleadas. De hecho, existen varios estudios que describen la importancia de Cdc42 a la hora de la correcta segregación de los cromosomas y cómo la sobre-expresión de su forma constitutivamente activa o la de algún GEF de Cdc42 conlleva la multinucleación de las células. (Lin, Fuji et al. 2003; Yasuda, Ocegüera-Yanez et al. 2004; Yasuda, Taniguchi et al. 2006) A la luz de este resultado parece lógico pensar que las dos GTPasas están ejerciendo influencia sobre el núcleo a través de mecanismos diferentes. Con RhoA constitutivamente activo se produce igualmente un incremento en núcleos aberrantes, a pesar de no ser tan llamativo como con las otras dos proteínas y en este caso no hay ninguna morfología predominante.

Con el propósito de corroborar que el cambio morfológico observado en los núcleos era debido a la actividad de las RhoGTPasas se llevaron a cabo varios experimentos que consistieron en sobre-expresar las pequeñas RhoGTPasas dominante negativas y en sobre-expresar un GEF que lo que causara fuera la activación de las RhoGTPasas endógenas.

En el primer caso, al sobre-expresar la versión dominante negativa de las pequeñas RhoGTPasas no vemos ningún efecto sobre los núcleos, confirmando la hipótesis de que es la actividad de las GTPasas constitutivamente activas la que induce el cambio morfológico.

Con la sobre-expresión de oncovav2, un GEF capaz de activar las tres pequeñas GTPasas (Liu and Burridge 2000), aumenta la cantidad de núcleos aberrantes, principalmente el número de arriñonados. Se asemeja a la distribución obtenida con Rac1QL sin llegar a ser tan elevado el número de núcleos deformados. Este menor porcentaje en núcleos aberrantes se deba probablemente a que al activar la GTPasa endógena, la cantidad de moléculas de Rac1 activas sea menor que en el caso de sobre-expresar la proteína constitutivamente activa directamente. Además, Vav2 no sólo está activando Rac1, sino que también activa RhoA y Cdc42. Sin embargo, aún mostrando menor efecto, con este experimento deducimos que incluso activando las GTPasas endógenas conseguimos un cambio morfológico de los núcleos.

El inconveniente obvio de todos los experimentos anteriores, es que el resultado obtenido es a base de la sobre-expresión de alguna proteína, ya sean las GTPasas propiamente dichas o un GEF que produce su activación. Por ello, el resultado en la línea celular IGR-1 que porta la mutación Rac1P29S es muy valioso. Se demuestra en un modelo fisiológico que la hiperactividad de Rac1 correlaciona con un aumento en el número de núcleos deformados. De hecho, la proporción de estos núcleos es similar a la obtenida en los modelos de sobre-expresión de Rac1QL. Esta línea celular es por tanto una gran herramienta y habría que seguir estudiando en ella cómo revertir la deformación nuclear o la conexión entre el núcleo y citoplasma a través del complejo LINC.

La conclusión que se puede extraer de esta parte del trabajo es que existe una relación entre la actividad de las RhoGTPasas y la morfología nuclear. Dentro de las tres GTPasas estudiadas es Rac1QL la que tiene mayor influencia sobre el aspecto de los núcleos.

## V.2 Mecanismo mediante el cual las GTPasas Rho alteran la morfología nuclear

La hipótesis de partida consistía en que las pequeñas RhoGTPasas, a través de su papel como reguladoras del citoesqueleto y conectando con las proteínas del complejo LINC podían estar modulando la forma nuclear. Por esta razón se nos ocurrió que podíamos probar a bloquear el transporte núcleo-citoplasma a través de los poros nucleares y observar si incluso así se producía un efecto. De esta manera pretendíamos corroborar que existe una relación entre el citoesqueleto y el nucleoesqueleto independiente de los poros nucleares e inducida por las pequeñas RhoGTPasas que causa el cambio morfológico en los núcleos. Para bloquear el transporte entre esos dos compartimentos celulares se utilizó la pequeña GTPasa Ran con la mutación que la mantiene siempre en su estado activo. Al comparar los resultados obtenidos transfectando únicamente las RhoGTPasas con los obtenidos con la co-transflectación de las RhoGTPasas y RanQL, se observa que el núcleo sigue sufriendo una deformación, pero hay muchas menos células binucleadas. Además esta disminución en células binucleadas se correlaciona con un incremento en el número de células con núcleos arriñonados. Este resultado se hace evidente sobre todo en el caso de Cdc42, ya que con esta GTPasa en ausencia de RanQL el efecto más llamativo es

el alto número de células poliploides. Este resultado puede explicarse si se tiene en cuenta que la pequeña GTPasa Ran además de estar involucrada en el transporte núcleo-citoplasmas a través de los poros, también juega un papel muy importante durante la mitosis y durante el ensamblaje de la envoltura nuclear tras la mitosis. (Askjaer, Galy et al. 2002; Li and Zheng 2004; Kalab and Heald 2008; Zhang, Arnaoutov et al. 2014)

Aún así lo importante de este resultado es que en presencia de RanQL, es decir, impidiendo el transporte a través de poro nuclear y la regulación génica inducida por las GTPasas Rho, continúa observándose un efecto sobre el aspecto de los núcleos. Por tanto, existe una conexión entre estos dos compartimentos celulares independiente del poro que parece estar regulando la morfología nuclear.

Este resultado resulta confirmado con la sobre-expresión del mutante de Rac1 que además de la mutación que hace que se encuentre constitutivamente activo, lleva la mutación que lo deja en el citosol. Incluso con este mutante se producen cambios en la morfología de los núcleos, si bien no tan pronunciados como con Rac1QL con la caja CAAX intacta, debido probablemente a que este último se une más eficientemente a los efectores. Es por ello que deducimos que el efecto de RacQL sobre los núcleos viene determinado desde el citoplasma. Sin embargo, a este respecto se ha publicado recientemente un artículo en el que aseguran precisamente lo contrario. (Navarro-Lerida, Pellinen et al. 2015) En ese artículo los autores describen cómo Rac1 desde el núcleo induce cambios en su morfología a través de la actina nuclear. Ven también que la acumulación de Rac1 en el núcleo permite un aumento de contractilidad en el citoplasma asociado a la actividad de RhoA. Nosotros, a lo largo de la tesis, en muy pocas ocasiones vemos Rac1QL en el núcleo, de hecho, el mutante con la caja CAAX mutada también lo vemos en citosol predominantemente. Es por ello que a raíz de la aparición de este artículo nos planteamos que deberíamos ver el efecto sobre los núcleos de un mutante de Rac1 que se sepa a ciencia cierta que apenas entra en el núcleo. En este mismo artículo los autores describen cómo los últimos 50 aminoácidos de la parte C-terminal de Rac son claves para su localización celular. Por ello, las quimeras de Rac1 con el C-terminal de Rac2 o Rac3 (citoplasmáticos principalmente) son incapaces de traslocarse al núcleo, de modo que habría que analizar el efecto de estas quimeras sobre el núcleo en nuestro modelo celular.

Con el tratamiento de los diferentes inhibidores del citoesqueleto, tanto de actina como de tubulina, y con la sobre-expresión de los mutantes deficientes en la unión a determinados efectores se ha podido determinar que el citoesqueleto de tubulina parece ser imprescindible en el cambio que induce Rac1QL en el núcleo. Existen otros trabajos en los que se asocia la deformación nuclear a los microtúbulos. En un estudio en núcleos de embriones de *Drosophila melanogaster* concluyen que los microtúbulos ejercen una fuerza sobre el núcleo capaz de cambiar su aspecto. Además este proceso de cambio en los núcleos a través de los microtúbulos es dependiente de la dineína. Los autores proponen en su trabajo que la polimerización de los microtúbulos es necesaria para la deformación nuclear, pero que es gracias a la organización de éstos en haces por la dineína que son capaces de generar los núcleos lobulados. (Hampoelz, Azou-Gros et al. 2011) Otro ejemplo más de cómo los microtúbulos ejercen la fuerza necesaria para cambiar el aspecto nuclear es el caso de los neutrófilos. Durante la granulopoyesis (proceso de diferenciación para dar neutrófilos maduros), los promielocitos adoptan núcleos multilobulados. Este cambio nuclear se asocia a una menor expresión de la lamina A y otros componentes de la envoltura nuclear que finalmente conllevan una menor rigidez nuclear, de modo que éstos sean más maleables por los microtúbulos, si bien el proceso molecular por el que esto sucede no se conoce aún. (Zwerger, Ho et al. 2011) En otro estudio, con células MDCK, los autores investigan la capacidad de deformación de los núcleos de estas células observando que no cambia por igual el eje mayor del núcleo que el menor. Finalmente concluyen que son los microtúbulos los responsables de mantener la estructura nuclear. (Tremblay, Andrzejewski et al. 2013) Lo cierto es que nosotros al impedir la dinámica de los microtúbulos cuando sobre-expresamos las RhoGTPasas constitutivamente activas advertimos que se revierte el efecto sobre los núcleos prácticamente en su totalidad.

No obstante, también el citoesqueleto de actina debe de desempeñar un papel en este proceso. Con el tratamiento de citocalasina D y con la blebistatina se induce una disminución en el número de núcleos deformados con respecto a las células con Rac1QL sin tratar. Es cierto que no reduce el efecto tanto como el nocodazol, pero aun así el número de núcleos arriñonados es menor. Lo mismo sucede con la sobre-expresión de los mutantes. El mutante Rac1QLY40C produce menos efectos sobre el aspecto de los núcleos que el que porta la mutación que

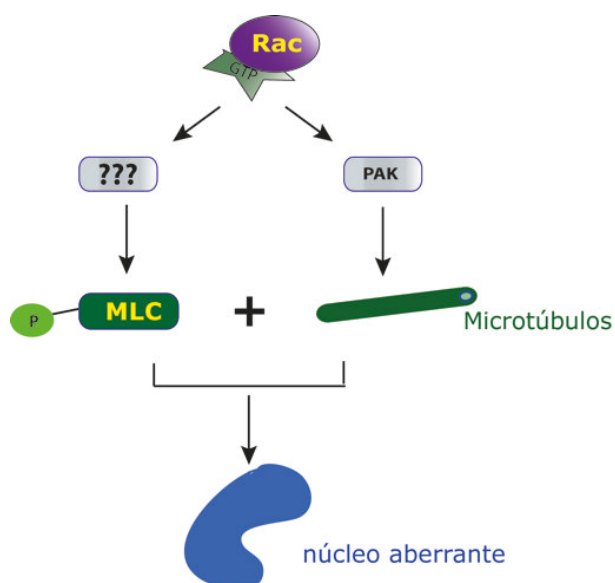
impide a Rac1QL regular el citoesqueleto de actina. Pero ambos mutantes son menos efectivos que el Rac1QL a la hora de inducir cambios en la estructura nuclear. Existen numerosos trabajos que asocian la contractilidad y la actina con la dinámica del núcleo. En un trabajo hecho en fibroblastos de ratón Khatau *et al* observan que los núcleos cambian en función del aspecto de la célula, así, por ejemplo, una célula alargada tiene un núcleo alargado. Este cambio se produce gracias a una capa de actina que rodea al núcleo y que está conectada con éste a través del complejo LINC. Mediante la utilización de unos fármacos para inducir la despolimerización de actina o impedir la contractilidad, esta capacidad del núcleo de adaptar su forma a la de la célula se ve mermada. (Khatau, Hale et al. 2009) En un estudio similar, en el que al igual que en el anterior también se analiza la capacidad del núcleo de adquirir una morfología alargada, los autores atribuyen la elongación del núcleo a un aumento en contractilidad, en este caso mediada por la pequeña GTPasa RhoA. (Versaevel, Grevesse et al. 2012)

D

Todos los artículos que relacionan el citoesqueleto de actina con la mecánica del núcleo y su cambio morfológico convergen en que la contractilidad actina-miosina es clave. Por eso se analizó la fosforilación de MLC en nuestro modelo. RhoA está descrito como el principal mediador de la contractilidad (Sadok and Marshall 2014), pero la implicación de Rac1 y Cdc42 en la contractilidad es compleja, ya que a veces actúan como reguladores negativos y otras como reguladores positivos. (Brzeska, Szczepanowska et al. 2004; Jean, Majumdar et al. 2013)(Gad, Ronnlund et al. 2012) En este caso, en las células A375P en plástico, la sobre-expresión de Rac1QL conlleva un aumento en la fosforilación de la cadena ligera de la miosina. Este aumento en contractilidad con Rac1QL parece ir en concordancia con lo descrito, es decir, a mayor contractilidad, mayor cambio en la morfología nuclear.

Por otro lado al sobre-expresar PAK constitutivamente activo lo que obtenemos es un aumento en el número de núcleos alargados, pero no conseguimos simular totalmente el efecto que produce Rac1QL, a pesar de que con el mutante de Rac1 que no activa PAK apenas vemos núcleos arriñonados. Es decir, PAK es necesario en la regulación de la morfología nuclear, pero no sería el único efector implicado. El hecho de que la sobre-expresión de PAK en células que se tratan con nocodazol no induzca estos núcleos alargados, nos lleva a pensar que PAK ejerce este efecto a través de los microtúbulos y por ende que

Rac1 regula los microtúbulos a través de PAK para inducir cambios morfológicos. Pero la sobre-expresión de PAK no aumenta la contractilidad en estas células. De modo que Rac1QL ejerce la fosforilación de MLC a través de algún otro efector que desconocemos. Y el hecho de que sin aumento en contractilidad PAK no sea capaz de inducir núcleos arriñonados o multilobulados nos lleva a deducir que es la combinación de ambas fuerzas la que provoca los núcleos aberrantes. Si bien los microtúbulos parecen ser imprescindibles en ese proceso, ya que el tratamiento con nocodazol evita prácticamente cualquier distorsión de estos núcleos, ellos por sí solos no consiguen moldear los núcleos en su totalidad. Se abre aquí la incógnita del posible efector de Rac1 que provoca el aumento en contractilidad y sería interesante seguir trabajando en buscar posibles implicados. JAK1, activado por RhoA, señala en favor de la fosforilación de MLC. (Sanz-Moreno, Gaggioli et al. 2011) Rac1 y Cdc42 también son capaces de señalar a través de JAK1 (Raptis, Arulanandam et al. 2011), por lo que éste podría ser un posible candidato.



**Figura V.1. Mecanismo de regulación de la morfología nuclear.** La cooperación entre los microtúbulos, regulados por Rac1 a través de PAK y la contractilidad actina-miosina, a través de un efector desconocido, es la responsable del cambio morfológico de los núcleos.

En varios estudios se ha visto que impedir la conexión núcleo-citoplasma a través del complejo LINC tiene un efecto negativo sobre la dinámica nuclear. En el artículo ya mencionado de Khatau *et al*, los autores impiden el cambio en la morfología del núcleo al desplazar de la envoltura la nesprina-2. (Khatau, Hale et al. 2009) En otro estudio en el que no se centran en el cambio morfológico del núcleo, pero sí en el movimiento del núcleo dentro de la célula, el silenciamiento de la nesprina-3 mediante siRNA frena este fenómeno. (Petrie, Koo et al. 2014) Un tercer ejemplo sería el trabajo de Lombardi *et al* en el cual demuestran que el

D

complejo LINC es crítico para la transmisión de fuerza entre el citoplasma y el núcleo y que romper la interacción entre estos dos compartimentos conlleva fallos en la posición del núcleo y en su capacidad de deformación que puede provocar una menor migración. (Lombardi, Jaalouk et al. 2011) Por tanto, el hecho de que en nuestros experimentos con la sobre-expresión de las proteínas que provocan la disociación del complejo LINC veamos menor número de núcleos aberrantes no es de extrañar. Aunque el hecho de asociar la ruptura del complejo LINC con las RhoGTPasas sí que es algo llamativo y novedoso. También llamó nuestra atención que en muchos casos la localización de Rac1QL parece verse alterada cuando sobre-expresamos la proteína KashDN y de hecho en este aspecto deberíamos seguir trabajando. A lo largo de la realización de esta tesis hemos podido observar que Rac1QL parece acumularse siempre cerca del núcleo. Por tanto, tendríamos que estudiar por una parte dónde se produce esta aglomeración, dado que no hemos hecho ningún estudio al respecto y a partir de ahí estudiar qué sucede con ese acúmulo de Rac1QL cuando sobre-expresamos la proteína KashDN. Si observamos las fotos del *time-lapse*, podemos apreciar cómo el tamaño y la posición de ese *pool* de Rac1QL va cambiando con el tiempo a la vez que varía también la morfología del núcleo. A pesar de la importancia que tiene el complejo LINC a la hora de moldear el núcleo, los componentes de este complejo no sufren cambios significativos en su expresión cuando transfectamos Rac1QL.

Sin embargo sí observamos que se reduce la expresión de las laminas cuando transfectamos las RhoGTPasas constitutivamente activas. Rac1QL provoca una disminución en todas las laminas. A pesar de que la bajada que produce no es muy drástica, es algo que observamos repetidamente en los diferentes experimentos que hemos realizado. Es posible que esta pequeña alteración en la expresión de las laminas sea suficiente para disminuir la rigidez del núcleo y así poder moldearlo. Existen varios estudios que asocian la deformación del núcleo a las laminas. (Dahl, Ribeiro et al. 2008; Dittmer and Misteli 2011) Como se ha comentado en la introducción es necesario mantener cierta rigidez nuclear, ya que la pérdida total de rigidez puede limitar la supervivencia de las células. De modo que un pequeño cambio en la expresión de las laminas puede ser suficiente para permitir al citoesqueleto cambiar la morfología de los núcleos, pero seguir manteniendo una integridad nuclear suficiente para resistir las tensiones a las que se vea sometida la célula.

### V.3 Repercusión biológica del cambio morfológico nuclear

Analizamos varias posibles implicaciones de esta deformación nuclear en procesos biológicos y vimos que con la sobre-expresión de Rac1QL obteníamos una mayor migración celular, tanto en los ensayos en *transwell* como en el modelo de embrión de pollo. Dado que en otros trabajos realizados se obtiene mayor migración celular e invasión cuando las células tienen activada la ruta de Rho-ROCK y con ello mayor contractilidad, en un principio este resultado puede resultar desconcertante. Sobre todo teniendo en cuenta que en el caso del trabajo de Sanz-Moreno *et al* utilizan el mismo modelo celular. (Sanz-Moreno, Gadea et al. 2008) Sin embargo, pensamos que nuestro modelo es algo diferente y por ello obtenemos distintos resultados. En caso de inhibir la actividad de Rac1 mediante el inhibidor NSC23766 en las células A375P Lorentzen *et al* ven una reducción en el número de células capaces de invadir en matrices de colágeno tipo I dando a entender que esta línea celular depende de Rac1 para la migración e invasión. (Lorentzen, Bamber et al. 2011) En nuestro trabajo miramos la capacidad de invadir en matrigel al sobre-expresar la proteína constitutivamente activa y, en concordancia con el trabajo citado, vemos un aumento en el número de células que migran, demostrando la importancia de Rac1 en esta línea celular para la invasión. Este resultado lo validamos también gracias al modelo de embrión de pollo, en el cual, en caso de que las células se encuentren sobre-expresando la proteína Rac1QL son capaces de diseminarse del tumor inicial y entrar en el torrente sanguíneo del embrión de pollo. A pesar de lograr intravasarse, las células posteriormente no consiguen colonizar el hígado, por lo que es probable que Rac1 confiera ventajas en los primeros pasos de metástasis, pero que su sobre-expresión no favorezca la extravasación. En su trabajo, Sanz-Moreno *et al* utilizan un modelo de ratón en el que inyectan las células directamente en el torrente sanguíneo del animal y observan mayor colonización de otros órganos cuando las células tienen una elevada actividad de RhoA. Por tanto, sería posible que Rac1 estuviera favoreciendo la intravasación, mientras que la actividad de RhoA permitiera la salida del torrente sanguíneo y la colonización consecuente. Para dicha entrada al torrente sanguíneo favorecida por la sobre-expresión de Rac1QL es necesaria una relación entre el citoesqueleto y nucleoesqueleto, ya que la disrupción del complejo LINC evita la

D



diseminación de las células del tumor primario, tal como puede observarse en el modelo *ex ovo*.

Así pues, la proteína Rac1 mediante su papel como regulador del citoesqueleto induce una serie de cambios en la morfología nuclear a través del complejo LINC que otorga a las células una mayor capacidad invasiva. La mutación en Rac1 P29S es de las pocas mutaciones activadoras de RhoGTPasas asociada a cáncer. Además, muchos tumores humanos se caracterizan por la sobre-expresión o la hiperactivación de Rac1. (Karlsson, Pedersen et al. 2009) Es por ello que seguir indagando en el mecanismo de acción por el cual Rac1 induce estos cambios en los núcleos y comprenderlo mejor sería muy importante para en el futuro poder evitar que este proceso tenga lugar.

D



## VI. Conclusiones





1. Las pequeñas RhoGTPasas constitutivamente activas, en especial Rac1, son capaces de inducir cambios morfológicos en los núcleos. No sólo en modelos de células en los que sobre-expresamos la proteína, sino también en modelos fisiológicos en que la mutación en Rac1 aparece de forma natural.
2. Hace falta una colaboración entre los microtúbulos, a través de PAK, y la contractilidad actina miosina para generar los núcleos aberrantes.
3. La ruptura del complejo LINC evita la deformación de los núcleos por parte de Rac1QL.
4. Rac1QL favorece la invasión y la intravasación en las células A375P siempre y cuando el complejo LINC esté intacto.



## VII. Bibliografía





B

- Abe, K., K. L. Rossman, et al.** (2000). "Vav2 is an activator of Cdc42, Rac1, and RhoA." *J Biol Chem* **275**(14): 10141-10149
- Akhshi, T. K., D. Wernike, et al.** (2013). "Microtubules and actin work together to polarize cells for division and migration." *Cytoskeleton (Hoboken)*
- Alan, J. K. and E. A. Lundquist** (2013). "Mutationally activated Rho GTPases in cancer." *Small GTPases* **4**(3): 159-163
- Amano, M., M. Nakayama, et al.** (2010). "Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity." *Cytoskeleton (Hoboken)* **67**(9): 545-554
- Amano, T., N. Kaji, et al.** (2002). "Mitosis-specific activation of LIM motif-containing protein kinase and roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation in mitosis." *J Biol Chem* **277**(24): 22093-22102
- Andersen, S. S.** (2000). "Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and Stathmin/Op18." *Trends Cell Biol* **10**(7): 261-267
- Arber, S., F. A. Barbayannis, et al.** (1998). "Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase." *Nature* **393**(6687): 805-809
- Arozarena, I., D. S. Aaronson, et al.** (2000). "The Rho family GTPase Cdc42 regulates the activation of Ras/MAP kinase by the exchange factor Ras-GRF." *J Biol Chem* **275**(34): 26441-26448
- Arozarena, I., F. Calvo, et al.** (2011). "Ras, an actor on many stages: posttranslational modifications, localization, and site-specified events." *Genes Cancer* **2**(3): 182-194
- Askjaer, P., V. Galy, et al.** (2002). "Ran GTPase cycle and importins alpha and beta are essential for spindle formation and nuclear envelope assembly in living *Caenorhabditis elegans* embryos." *Mol Biol Cell* **13**(12): 4355-4370
- Aspenstrom, P., A. Fransson, et al.** (2004). "Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system." *Biochem J* **377**(Pt 2): 327-337
- Aspenstrom, P., A. Ruusala, et al.** (2007). "Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases." *Exp Cell Res* **313**(17): 3673-3679
- Baarlink, C., H. Wang, et al.** (2013). "Nuclear actin network assembly by formins regulates the SRF coactivator MAL." *Science* **340**(6134): 864-867
- Barascu, A., C. Le Chalony, et al.** (2012). "Oxydative stress alters nuclear shape through lamins dysregulation: a route to senescence." *Nucleus* **3**(5): 411-417
- Barbacid, M.** (1987). "ras genes." *Annu Rev Biochem* **56**: 779-827
- Bassi, Z. I., K. J. Verbrughe, et al.** (2011). "Sticky/Citron kinase maintains proper RhoA localization at the cleavage site during cytokinesis." *J Cell Biol* **195**(4): 595-603

- Bastos, R. N., X. Penate, et al.** (2012). "CYK4 inhibits Rac1-dependent PAK1 and ARHGEF7 effector pathways during cytokinesis." *J Cell Biol* **198**(5): 865-880
- Belt, E. J., R. J. Fijneman, et al.** (2011). "Loss of lamin A/C expression in stage II and III colon cancer is associated with disease recurrence." *Eur J Cancer* **47**(12): 1837-1845
- Bement, W. M., H. A. Benink, et al.** (2005). "A microtubule-dependent zone of active RhoA during cleavage plane specification." *J Cell Biol* **170**(1): 91-101
- Berk, J. M., K. E. Tifft, et al.** (2013). "The nuclear envelope LEM-domain protein emerin." *Nucleus* **4**(4): 298-314
- Bertolotto, C.** (2013). "Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options." *Scientifica (Cairo)* **2013**: 635203
- Bishop, A. L. and A. Hall** (2000). "Rho GTPases and their effector proteins." *Biochem J* **348 Pt 2**: 241-255
- Bos, J. L., H. Rehmann, et al.** (2007). "GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins." *Cell* **129**(5): 865-877
- Boulter, E., R. Garcia-Mata, et al.** (2010). "Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1." *Nat Cell Biol* **12**(5): 477-483
- Bravo-Cordero, J. J., M. A. Magalhaes, et al.** (2013). "Functions of cofilin in cell locomotion and invasion." *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(7): 405-415
- Brosig, M., J. Ferralli, et al.** (2010). "Interfering with the connection between the nucleus and the cytoskeleton affects nuclear rotation, mechanotransduction and myogenesis." *Int J Biochem Cell Biol* **42**(10): 1717-1728
- Brunet, N., A. Morin, et al.** (2002). "RhoGDI-3 regulates RhoG and targets this protein to the Golgi complex through its unique N-terminal domain." *Traffic* **3**(5): 342-357
- Brzeska, H., J. Szczepanowska, et al.** (2004). "Rac-induced increase of phosphorylation of myosin regulatory light chain in HeLa cells." *Cell Motil Cytoskeleton* **58**(3): 186-199
- Burke, B. and C. L. Stewart** (2013). "The nuclear lamins: flexibility in function." *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(1): 13-24
- Busche, S., A. Descot, et al.** (2008). "Epithelial cell-cell contacts regulate SRF-mediated transcription via Rac-actin-MAL signalling." *J Cell Sci* **121**(Pt 7): 1025-1035
- Cai, D., S. C. Chen, et al.** (2014). "Mechanical feedback through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration." *Cell* **157**(5): 1146-1159

- Caino, M. C., J. Meshki, et al.** (2009). "Hallmarks for senescence in carcinogenesis: novel signaling players." *Apoptosis* **14**(4): 392-408
- Capo-chichi, C. D., K. Q. Cai, et al.** (2011). "Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity in breast cancer." *Chin J Cancer* **30**(6): 415-425
- Casar, B., I. Rimann, et al.** (2014). "In vivo cleaved CDCP1 promotes early tumor dissemination via complexing with activated beta1 integrin and induction of FAK/PI3K/Akt motility signaling." *Oncogene* **33**(2): 255-268
- Cassimeris, L.** (2002). "The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers." *Curr Opin Cell Biol* **14**(1): 18-24
- Charras, G. and E. Paluch** (2008). "Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(9): 730-736
- Charrasse, S., F. Comunale, et al.** (2007). "M-cadherin activates Rac1 GTPase through the Rho-GEF trio during myoblast fusion." *Mol Biol Cell* **18**(5): 1734-1743
- Chen, C. Y., Y. H. Chi, et al.** (2012). "Accumulation of the inner nuclear envelope protein Sun1 is pathogenic in progeric and dystrophic laminopathies." *Cell* **149**(3): 565-577
- Chesarone, M. A., A. G. DuPage, et al.** (2010). "Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(1): 62-74
- Chevrier, V., M. Piel, et al.** (2002). "The Rho-associated protein kinase p160ROCK is required for centrosome positioning." *J Cell Biol* **157**(5): 807-817
- Chianale, F., E. Rainero, et al.** (2010). "Diacylglycerol kinase alpha mediates HGF-induced Rac activation and membrane ruffling by regulating atypical PKC and RhoGDI." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(9): 4182-4187
- Chow, K. H., R. E. Factor, et al.** (2012). "The nuclear envelope environment and its cancer connections." *Nat Rev Cancer* **12**(3): 196-209
- Clarke, P. R. and C. Zhang** (2001). "Ran GTPase: a master regulator of nuclear structure and function during the eukaryotic cell division cycle?" *Trends Cell Biol* **11**(9): 366-371
- Clarke, P. R. and C. Zhang** (2008). "Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(6): 464-477
- Coleman, M. L., R. M. Densham, et al.** (2006). "Stability of p21Waf1/Cip1 CDK inhibitor protein is responsive to RhoA-mediated regulation of the actin cytoskeleton." *Oncogene* **25**(19): 2708-2716
- Coleman, M. L., C. J. Marshall, et al.** (2004). "RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(5): 355-366

- Colicelli, J.** (2004). "Human RAS superfamily proteins and related GTPases." *Sci STKE* **2004**(250): RE13
- Cook, D. R., K. L. Rossman, et al.** (2014). "Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease." *Oncogene* **33**(31): 4021-4035
- Cox, A. D. and C. J. Der** (1992). "Protein prenylation: more than just glue?" *Curr Opin Cell Biol* **4**(6): 1008-1016
- Crisp, M., Q. Liu, et al.** (2006). "Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex." *J Cell Biol* **172**(1): 41-53
- Dahl, K. N. and A. Kalinowski** (2011). "Nucleoskeleton mechanics at a glance." *J Cell Sci* **124**(Pt 5): 675-678
- Dahl, K. N., A. J. Ribeiro, et al.** (2008). "Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction." *Circ Res* **102**(11): 1307-1318
- Daub, H., K. Gevaert, et al.** (2001). "Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16." *J Biol Chem* **276**(3): 1677-1680
- Davies, T. and J. C. Canman** (2012). "Stuck in the middle: Rac, adhesion, and cytokinesis." *J Cell Biol* **198**(5): 769-771
- Davis, M. J., B. H. Ha, et al.** (2013). "RAC1P29S is a spontaneously activating cancer-associated GTPase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(3): 912-917
- de Las Heras, J. I., D. G. Batrakou, et al.** (2013). "Cancer biology and the nuclear envelope: a convoluted relationship." *Semin Cancer Biol* **23**(2): 125-137
- Debidda, M., D. A. Williams, et al.** (2006). "Rac1 GTPase regulates cell genomic stability and senescence." *J Biol Chem* **281**(50): 38519-38528
- Del Pozo, M. A., W. B. Kiosses, et al.** (2002). "Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI." *Nat Cell Biol* **4**(3): 232-239
- DesMarais, V., M. Ghosh, et al.** (2005). "Cofilin takes the lead." *J Cell Sci* **118**(Pt 1): 19-26
- Dey, P.** (2009). "Nuclear margin irregularity and cancer: a review." *Anal Quant Cytol Histol* **31**(5): 345-352
- Diekmann, D., A. Abo, et al.** (1994). "Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity." *Science* **265**(5171): 531-533
- Dittmer, T. A. and T. Misteli** (2011). "The lamin protein family." *Genome Biol* **12**(5): 222

- Donaldson, J. G. and C. L. Jackson** (2011). "ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(6): 362-375
- Dutartre, H., J. Davoust, et al.** (1996). "Cytokinesis arrest and redistribution of actin-cytoskeleton regulatory components in cells expressing the Rho GTPase CDC42Hs." *J Cell Sci* **109 ( Pt 2)**: 367-377
- Edwards, D. C., L. C. Sanders, et al.** (1999). "Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics." *Nat Cell Biol* **1**(5): 253-259
- Ehrlich, J. S., M. D. Hansen, et al.** (2002). "Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion." *Dev Cell* **3**(2): 259-270
- Embade, N., P. F. Valeron, et al.** (2000). "Apoptosis induced by Rac GTPase correlates with induction of FasL and ceramides production." *Mol Biol Cell* **11**(12): 4347-4358
- Etienne-Manneville, S.** (2013). "Microtubules in cell migration." *Annu Rev Cell Dev Biol* **29**: 471-499
- Etienne-Manneville, S.** (2014). "Neighborly relations during collective migration." *Curr Opin Cell Biol* **30C**: 51-59
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall** (2003). "Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity." *Nature* **421**(6924): 753-756
- Faix, J. and R. Grosse** (2006). "Staying in shape with formins." *Dev Cell* **10**(6): 693-706
- Favreau, C., E. Dubosclard, et al.** (2003). "Expression of lamin A mutated in the carboxyl-terminal tail generates an aberrant nuclear phenotype similar to that observed in cells from patients with Dunnigan-type partial lipodystrophy and Emery-Dreifuss muscular dystrophy." *Exp Cell Res* **282**(1): 14-23
- Foster, C. R., S. A. Przyborski, et al.** (2010). "Lamins as cancer biomarkers." *Biochem Soc Trans* **38**(Pt 1): 297-300
- Freund, A., R. M. Laberge, et al.** (2012). "Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker." *Mol Biol Cell* **23**(11): 2066-2075
- Fridolfsson, H. N. and D. A. Starr** (2010). "Kinesin-1 and dynein at the nuclear envelope mediate the bidirectional migrations of nuclei." *J Cell Biol* **191**(1): 115-128
- Friedl, P. and D. Gilmour** (2009). "Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(7): 445-457
- Friedl, P. and K. Wolf** (2003). "Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms." *Nat Rev Cancer* **3**(5): 362-374

- Friedl, P., K. Wolf, et al.** (2011). "Nuclear mechanics during cell migration." *Curr Opin Cell Biol* **23**(1): 55-64
- Fritsch, R., I. de Krijger, et al.** (2013). "RAS and RHO families of GTPases directly regulate distinct phosphoinositide 3-kinase isoforms." *Cell* **153**(5): 1050-1063
- Frittoli, E., A. Palamidessi, et al.** (2011). "Secretory and endo/exocytic trafficking in invadopodia formation: the MT1-MMP paradigm." *Eur J Cell Biol* **90**(2-3): 108-114
- Fukata, M., T. Watanabe, et al.** (2002). "Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170." *Cell* **109**(7): 873-885
- Fukumoto, Y., K. Kaibuchi, et al.** (1990). "Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins." *Oncogene* **5**(9): 1321-1328
- Fukuyama, T., H. Ogita, et al.** (2006). "Activation of Rac by cadherin through the c-Src-Rap1-phosphatidylinositol 3-kinase-Vav2 pathway." *Oncogene* **25**(1): 8-19
- Furukawa, K. and Y. Hotta** (1993). "cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells." *EMBO J* **12**(1): 97-106
- Gad, A. K., D. Ronnlund, et al.** (2012). "Rho GTPases link cellular contractile force to the density and distribution of nanoscale adhesions." *FASEB J* **26**(6): 2374-2382
- Galkin, V. E., A. Orlova, et al.** (2011). "Remodeling of actin filaments by ADF/cofilin proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(51): 20568-20572
- Gandhi, P. N., R. M. Gibson, et al.** (2004). "An activating mutant of Rac1 that fails to interact with Rho GDP-dissociation inhibitor stimulates membrane ruffling in mammalian cells." *Biochem J* **378**(Pt 2): 409-419
- Garcia-Mata, R., E. Boulter, et al.** (2011). "The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs." *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(8): 493-504
- Gastonguay, A., T. Berg, et al.** (2012). "The role of Rac1 in the regulation of NF-kappaB activity, cell proliferation, and cell migration in non-small cell lung carcinoma." *Cancer Biol Ther* **13**(8): 647-656
- Ghosh, M., X. Song, et al.** (2004). "Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility." *Science* **304**(5671): 743-746
- Gibson, R. M., P. N. Gandhi, et al.** (2004). "An activating mutant of Cdc42 that fails to interact with Rho GDP-dissociation inhibitor localizes to the plasma membrane and mediates actin reorganization." *Exp Cell Res* **301**(2): 211-222
- Goddette, D. W. and C. Frieden** (1986). "Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D." *J Biol Chem* **261**(34): 15974-15980

- Goeckeler, Z. M., R. A. Masaracchia, et al.** (2000). "Phosphorylation of myosin light chain kinase by p21-activated kinase PAK2." *J Biol Chem* **275**(24): 18366-18374
- Gorgoulis, V. G. and T. D. Halazonetis** (2010). "Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response." *Curr Opin Cell Biol* **22**(6): 816-827
- Goto, H., H. Kosako, et al.** (2000). "Regulation of intermediate filament organization during cytokinesis: possible roles of Rho-associated kinase." *Microsc Res Tech* **49**(2): 173-182
- Griner, E. M. and D. Theodorescu** (2012). "The faces and friends of RhoGDI2." *Cancer Metastasis Rev* **31**(3-4): 519-528
- Gruenbaum, Y., A. Margalit, et al.** (2005). "The nuclear lamina comes of age." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(1): 21-31
- Gu, Z., E. H. Noss, et al.** (2011). "Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration." *J Cell Biol* **193**(1): 61-70
- Gundersen, G. G. and H. J. Worman** (2013). "Nuclear positioning." *Cell* **152**(6): 1376-1389
- Guttler, T. and D. Gorlich** (2011). "Ran-dependent nuclear export mediators: a structural perspective." *EMBO J* **30**(17): 3457-3474
- Hage, B., K. Meinel, et al.** (2009). "Rac1 activation inhibits E-cadherin-mediated adherens junctions via binding to IQGAP1 in pancreatic carcinoma cells." *Cell Commun Signal* **7**: 23
- Hale, C. M., A. L. Shrestha, et al.** (2008). "Dysfunctional connections between the nucleus and the actin and microtubule networks in laminopathic models." *Biophys J* **95**(11): 5462-5475
- Hampoelz, B., Y. Azou-Gros, et al.** (2011). "Microtubule-induced nuclear envelope fluctuations control chromatin dynamics in *Drosophila* embryos." *Development* **138**(16): 3377-3386
- Haque, F., D. J. Lloyd, et al.** (2006). "SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton." *Mol Cell Biol* **26**(10): 3738-3751
- Haque, F., D. Mazzeo, et al.** (2010). "Mammalian SUN protein interaction networks at the inner nuclear membrane and their role in laminopathy disease processes." *J Biol Chem* **285**(5): 3487-3498
- Harada, T., J. Swift, et al.** (2014). "Nuclear lamin stiffness is a barrier to 3D migration, but softness can limit survival." *J Cell Biol* **204**(5): 669-682



- Hart, M. J., Y. Maru, et al.** (1992). "A GDP dissociation inhibitor that serves as a GTPase inhibitor for the Ras-like protein CDC42Hs." *Science* **258**(5083): 812-815
- Higashida, C., T. Kiuchi, et al.** (2013). "F- and G-actin homeostasis regulates mechanosensitive actin nucleation by formins." *Nat Cell Biol* **15**(4): 395-405
- Ho, C. Y., D. E. Jaalouk, et al.** (2013). "Lamin A/C and emerin regulate MKL1-SRF activity by modulating actin dynamics." *Nature* **497**(7450): 507-511
- Hodis, E., I. R. Watson, et al.** (2012). "A landscape of driver mutations in melanoma." *Cell* **150**(2): 251-263
- Hofbauer, S. W., P. W. Krenn, et al.** (2014). "Tiam1/Rac1 signals contribute to the proliferation and chemoresistance, but not motility, of chronic lymphocytic leukemia cells." *Blood* **123**(14): 2181-2188
- Hoshino, T., K. Shimizu, et al.** (2004). "A novel role of nectins in inhibition of the E-cadherin-induced activation of Rac and formation of cell-cell adherens junctions." *Mol Biol Cell* **15**(3): 1077-1088
- Hutagalung, A. H. and P. J. Novick** (2011). "Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology." *Physiol Rev* **91**(1): 119-149
- Huttenlocher, A. and A. R. Horwitz** (2011). "Integrins in cell migration." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(9): a005074
- Iden, S. and J. G. Collard** (2008). "Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(11): 846-859
- Isermann, P. and J. Lammerding** (2013). "Nuclear mechanics and mechanotransduction in health and disease." *Curr Biol* **23**(24): R1113-1121
- Ishizaki, T., Y. Morishima, et al.** (2001). "Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1." *Nat Cell Biol* **3**(1): 8-14
- Ismail, A. M., S. B. Padrick, et al.** (2009). "The WAVE regulatory complex is inhibited." *Nat Struct Mol Biol* **16**(5): 561-563
- Jaalouk, D. E. and J. Lammerding** (2009). "Mechanotransduction gone awry." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(1): 63-73
- Jean, L., D. Majumdar, et al.** (2013). "Activation of Rac by Asef2 promotes myosin II-dependent contractility to inhibit cell migration on type I collagen." *J Cell Sci* **126**(Pt 24): 5585-5597
- Joneson, T., M. McDonough, et al.** (1996). "RAC regulation of actin polymerization and proliferation by a pathway distinct from Jun kinase." *Science* **274**(5291): 1374-1376

- Jordan, M. A., D. Thrower, et al.** (1992). "Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis." *J Cell Sci* **102 ( Pt 3)**: 401-416
- Kalab, P. and R. Heald** (2008). "The RanGTP gradient - a GPS for the mitotic spindle." *J Cell Sci* **121**(Pt 10): 1577-1586
- Kanai, M., M. S. Crowe, et al.** (2010). "RhoA and RhoC are both required for the ROCK II-dependent promotion of centrosome duplication." *Oncogene* **29**(45): 6040-6050
- Karin, M.** (2006). "Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression." *Nature* **441**(7092): 431-436
- Karlsson, R., E. D. Pedersen, et al.** (2009). "Rho GTPase function in tumorigenesis." *Biochim Biophys Acta* **1796**(2): 91-98
- Kawasaki, Y., T. Senda, et al.** (2000). "Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling." *Science* **289**(5482): 1194-1197
- Khatau, S. B., C. M. Hale, et al.** (2009). "A perinuclear actin cap regulates nuclear shape." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(45): 19017-19022
- Kitt, K. N. and W. J. Nelson** (2011). "Rapid suppression of activated Rac1 by cadherins and nectins during de novo cell-cell adhesion." *PLoS One* **6**(3): e17841
- Kiuchi, T., K. Ohashi, et al.** (2007). "Cofilin promotes stimulus-induced lamellipodium formation by generating an abundant supply of actin monomers." *J Cell Biol* **177**(3): 465-476
- Kohno, H., K. Tanaka, et al.** (1996). "Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*." *EMBO J* **15**(22): 6060-6068
- Kovacs, M., J. Toth, et al.** (2004). "Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II." *J Biol Chem* **279**(34): 35557-35563
- Krauthammer, M., Y. Kong, et al.** (2012). "Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma." *Nat Genet* **44**(9): 1006-1014
- Kumar, R., A. E. Gururaj, et al.** (2006). "p21-activated kinases in cancer." *Nat Rev Cancer* **6**(6): 459-471
- Kurusu, S. and T. Takenawa** (2009). "The WASP and WAVE family proteins." *Genome Biol* **10**(6): 226
- Lamarque, N., N. Tapon, et al.** (1996). "Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade." *Cell* **87**(3): 519-529

- Lammerding, J., J. Hsiao, et al.** (2005). "Abnormal nuclear shape and impaired mechanotransduction in emerin-deficient cells." *J Cell Biol* **170**(5): 781-791
- Lammerding, J., P. C. Schulze, et al.** (2004). "Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction." *J Clin Invest* **113**(3): 370-378
- Lee, J. S., C. M. Hale, et al.** (2007). "Nuclear lamin A/C deficiency induces defects in cell mechanics, polarization, and migration." *Biophys J* **93**(7): 2542-2552
- Leonard, D., M. J. Hart, et al.** (1992). "The identification and characterization of a GDP-dissociation inhibitor (GDI) for the CDC42Hs protein." *J Biol Chem* **267**(32): 22860-22868
- Li, A., Y. Ma, et al.** (2012). "Activated mutant NRas(Q61K) drives aberrant melanocyte signaling, survival, and invasiveness via a Rac1-dependent mechanism." *J Invest Dermatol* **132**(11): 2610-2621
- Li, A., Y. Ma, et al.** (2011). "Rac1 drives melanoblast organization during mouse development by orchestrating pseudopod-driven motility and cell-cycle progression." *Dev Cell* **21**(4): 722-734
- Li, H. Y. and Y. Zheng** (2004). "Phosphorylation of RCC1 in mitosis is essential for producing a high RanGTP concentration on chromosomes and for spindle assembly in mammalian cells." *Genes Dev* **18**(5): 512-527
- Li, X., J. Wang, et al.** (2012). "Overexpression of RhoGDI2 correlates with tumor progression and poor prognosis in colorectal carcinoma." *Ann Surg Oncol* **19**(1): 145-153
- Lin, Q., R. N. Fuji, et al.** (2003). "RhoGDI is required for Cdc42-mediated cellular transformation." *Curr Biol* **13**(17): 1469-1479
- Lindsay, C. R., S. Lawn, et al.** (2011). "P-Rex1 is required for efficient melanoblast migration and melanoma metastasis." *Nat Commun* **2**: 555
- Liu, B. P. and K. Burridge** (2000). "Vav2 activates Rac1, Cdc42, and RhoA downstream from growth factor receptors but not beta1 integrins." *Mol Cell Biol* **20**(19): 7160-7169
- Liu, X. J.** (2012). "Polar body emission." *Cytoskeleton (Hoboken)* **69**(10): 670-685
- Lombardi, M. L., D. E. Jaalouk, et al.** (2011). "The interaction between nesprins and sun proteins at the nuclear envelope is critical for force transmission between the nucleus and cytoskeleton." *J Biol Chem* **286**(30): 26743-26753
- Lorentzen, A., J. Bamber, et al.** (2011). "An ezrin-rich, rigid uropod-like structure directs movement of amoeboid blebbing cells." *J Cell Sci* **124**(Pt 8): 1256-1267
- Lu, W., M. Schneider, et al.** (2012). "Nesprin interchain associations control nuclear size." *Cell Mol Life Sci* **69**(20): 3493-3509

- Luxton, G. W., E. R. Gomes, et al.** (2010). "Linear arrays of nuclear envelope proteins harness retrograde actin flow for nuclear movement." *Science* **329**(5994): 956-959
- Luxton, G. W. and D. A. Starr** (2014). "KASHing up with the nucleus: novel functional roles of KASH proteins at the cytoplasmic surface of the nucleus." *Curr Opin Cell Biol* **28**: 69-75
- Ma, J. and M. Karplus** (1997). "Molecular switch in signal transduction: reaction paths of the conformational changes in ras p21." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(22): 11905-11910
- Maddox, A. S., J. Azoury, et al.** (2012). "Polar body cytokinesis." *Cytoskeleton (Hoboken)* **69**(11): 855-868
- Maekawa, M., T. Ishizaki, et al.** (1999). "Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase." *Science* **285**(5429): 895-898
- Maiti, S., A. Michelot, et al.** (2012). "Structure and activity of full-length formin mDia1." *Cytoskeleton (Hoboken)* **69**(6): 393-405
- Malliri, A., S. van Es, et al.** (2004). "The Rac exchange factor Tiam1 is required for the establishment and maintenance of cadherin-based adhesions." *J Biol Chem* **279**(29): 30092-30098
- Manchinelly, S. A., J. A. Miller, et al.** (2010). "Mitotic down-regulation of p190RhoGAP is required for the successful completion of cytokinesis." *J Biol Chem* **285**(35): 26923-26932
- Mehta, I. S., M. Figgitt, et al.** (2007). "Alterations to nuclear architecture and genome behavior in senescent cells." *Ann N Y Acad Sci* **1100**: 250-263
- Melendez, J., M. Liu, et al.** (2013). "Cdc42 coordinates proliferation, polarity, migration, and differentiation of small intestinal epithelial cells in mice." *Gastroenterology* **145**(4): 808-819
- Menke, A. and K. Giehl** (2012). "Regulation of adherens junctions by Rho GTPases and p120-catenin." *Arch Biochem Biophys* **524**(1): 48-55
- Michaelson, D., J. Silletti, et al.** (2001). "Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding." *J Cell Biol* **152**(1): 111-126
- Mighell, A. J., A. F. Markham, et al.** (1997). "Alu sequences." *FEBS Lett* **417**(1): 1-5
- Miki, H., T. Sasaki, et al.** (1998). "Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP." *Nature* **391**(6662): 93-96

- Mimori-Kiyosue, Y., N. Shiina, et al.** (2000). "Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells." *J Cell Biol* **148**(3): 505-518
- Miralles, F., G. Posern, et al.** (2003). "Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL." *Cell* **113**(3): 329-342
- Mislow, J. M., J. M. Holaska, et al.** (2002). "Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro." *FEBS Lett* **525**(1-3): 135-140
- Mitin, N., P. J. Roberts, et al.** (2012). "Posttranslational lipid modification of Rho family small GTPases." *Methods Mol Biol* **827**: 87-95
- Morin, P., C. Flors, et al.** (2009). "Constitutively active RhoA inhibits proliferation by retarding G(1) to S phase cell cycle progression and impairing cytokinesis." *Eur J Cell Biol* **88**(9): 495-507
- Morita, K., K. Hirono, et al.** (2005). "The *Caenorhabditis elegans* ect-2 RhoGEF gene regulates cytokinesis and migration of epidermal P cells." *EMBO Rep* **6**(12): 1163-1168
- Moseley, J. B., I. Sagot, et al.** (2004). "A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin." *Mol Biol Cell* **15**(2): 896-907
- Mouneimne, G., V. DesMarais, et al.** (2006). "Spatial and temporal control of cofilin activity is required for directional sensing during chemotaxis." *Curr Biol* **16**(22): 2193-2205
- Mulloy, J. C., J. A. Cancelas, et al.** (2010). "Rho GTPases in hematopoiesis and hemopathies." *Blood* **115**(5): 936-947
- Munoz-Alonso, M. J., L. Gonzalez-Santiago, et al.** (2008). "Plitidepsin has a dual effect inhibiting cell cycle and inducing apoptosis via Rac1/c-Jun NH2-terminal kinase activation in human melanoma cells." *J Pharmacol Exp Ther* **324**(3): 1093-1101
- Murthy, K. and P. Wadsworth** (2008). "Dual role for microtubules in regulating cortical contractility during cytokinesis." *J Cell Sci* **121**(Pt 14): 2350-2359
- Nakagawa, M., M. Fukata, et al.** (2001). "Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites." *J Cell Sci* **114**(Pt 10): 1829-1838
- Navarro-Lerida, I., T. Pellinen, et al.** (2015). "Rac1 nucleocytoplasmic shuttling drives nuclear shape changes and tumor invasion." *Dev Cell* **32**(3): 318-334
- Navarro-Lerida, I., S. Sanchez-Perales, et al.** (2012). "A palmitoylation switch mechanism regulates Rac1 function and membrane organization." *EMBO J* **31**(3): 534-551

- Nezami, A., F. Poy, et al.** (2010). "Crystal structure of a complex between amino and carboxy terminal fragments of mDia1: insights into autoinhibition of diaphanous-related formins." *PLoS One* **5**(9)
- Noren, N. K., W. T. Arthur, et al.** (2003). "Cadherin engagement inhibits RhoA via p190RhoGAP." *J Biol Chem* **278**(16): 13615-13618
- Normoyle, K. P. and W. M. Brieher** (2012). "Cyclase-associated protein (CAP) acts directly on F-actin to accelerate cofilin-mediated actin severing across the range of physiological pH." *J Biol Chem* **287**(42): 35722-35732
- Ohshima, S.** (2008). "Abnormal mitosis in hypertetraploid cells causes aberrant nuclear morphology in association with H2O2-induced premature senescence." *Cytometry A* **73**(9): 808-815
- Olson, E. N. and A. Nordheim** (2010). "Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(5): 353-365
- Orgaz, J. L., P. Pandya, et al.** (2014). "Diverse matrix metalloproteinase functions regulate cancer amoeboid migration." *Nat Commun* **5**: 4255
- Otomo, T., C. Otomo, et al.** (2005). "Structural basis of Rho GTPase-mediated activation of the formin mDia1." *Mol Cell* **18**(3): 273-281
- Ozdamar, B., R. Bose, et al.** (2005). "Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity." *Science* **307**(5715): 1603-1609
- Paluch, E. K. and E. Raz** (2013). "The role and regulation of blebs in cell migration." *Curr Opin Cell Biol* **25**(5): 582-590
- Parri, M. and P. Chiarugi** (2010). "Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control." *Cell Commun Signal* **8**: 23
- Pekovic, V., I. Gibbs-Seymour, et al.** (2011). "Conserved cysteine residues in the mammalian lamin A tail are essential for cellular responses to ROS generation." *Aging Cell* **10**(6): 1067-1079
- Petrie, R. J., H. Koo, et al.** (2014). "Generation of compartmentalized pressure by a nuclear piston governs cell motility in a 3D matrix." *Science* **345**(6200): 1062-1065
- Pinner, S. and E. Sahai** (2008). "PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE." *Nat Cell Biol* **10**(2): 127-137
- Poincloux, R., F. Lizarraga, et al.** (2009). "Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia." *J Cell Sci* **122**(Pt 17): 3015-3024
- Posern, G. and R. Treisman** (2006). "Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction." *Trends Cell Biol* **16**(11): 588-596

- Pring, M., M. Evangelista, et al.** (2003). "Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments." *Biochemistry* **42**(2): 486-496
- Prokocimer, M., A. Margalit, et al.** (2006). "The nuclear lamina and its proposed roles in tumorigenesis: projection on the hematologic malignancies and future targeted therapy." *J Struct Biol* **155**(2): 351-360
- Raptis, L., R. Arulanandam, et al.** (2011). "The R(h)oads to Stat3: Stat3 activation by the Rho GTPases." *Exp Cell Res* **317**(13): 1787-1795
- Ratheesh, A., G. A. Gomez, et al.** (2012). "Centralspindlin and alpha-catenin regulate Rho signalling at the epithelial zonula adherens." *Nat Cell Biol* **14**(8): 818-828
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, et al.** (2003). "Cell migration: integrating signals from front to back." *Science* **302**(5651): 1704-1709
- Romano, D., H. Maccario, et al.** (2013). "The differential effects of wildtype and mutated K-Ras on MST2 signalling are determined by K-Ras activation kinetics." *Mol Cell Biol*
- Rose, R., M. Weyand, et al.** (2005). "Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia." *Nature* **435**(7041): 513-518
- Rothballer, A., T. U. Schwartz, et al.** (2013). "LINCing complex functions at the nuclear envelope: what the molecular architecture of the LINC complex can reveal about its function." *Nucleus* **4**(1): 29-36
- Sadok, A. and C. J. Marshall** (2014). "Rho GTPases: masters of cell migration." *Small GTPases* **5**: e29710
- Sahai, E., R. Garcia-Medina, et al.** (2007). "Smurf1 regulates tumor cell plasticity and motility through degradation of RhoA leading to localized inhibition of contractility." *J Cell Biol* **176**(1): 35-42
- Sahai, E. and C. J. Marshall** (2003). "Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis." *Nat Cell Biol* **5**(8): 711-719
- Sanz-Moreno, V., G. Gadea, et al.** (2008). "Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement." *Cell* **135**(3): 510-523
- Sanz-Moreno, V., C. Gaggioli, et al.** (2011). "ROCK and JAK1 signaling cooperate to control actomyosin contractility in tumor cells and stroma." *Cancer Cell* **20**(2): 229-245
- Sanz-Moreno, V. and C. J. Marshall** (2010). "The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration." *Curr Opin Cell Biol* **22**(5): 690-696

- Schirenbeck, A., T. Bretschneider, et al.** (2005). "The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia." *Nat Cell Biol* **7**(6): 619-625
- Schober, J. M., J. M. Cain, et al.** (2009). "Migration and actin protrusion in melanoma cells are regulated by EB1 protein." *Cancer Lett* **284**(1): 30-36
- Schober, J. M., G. Kwon, et al.** (2012). "The microtubule-associated protein EB1 maintains cell polarity through activation of protein kinase C." *Biochem Biophys Res Commun* **417**(1): 67-72
- Selimovic, D., H. E. Badura, et al.** (2013). "Vinblastine-induced apoptosis of melanoma cells is mediated by Ras homologous A protein (Rho A) via mitochondrial and non-mitochondrial-dependent mechanisms." *Apoptosis* **18**(8): 980-997
- Shimi, T., V. Butin-Israeli, et al.** (2011). "The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence." *Genes Dev* **25**(24): 2579-2593
- Simon, D. N. and K. L. Wilson** (2011). "The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic 'network of networks'." *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(11): 695-708
- Sosa, B. A., U. Kutay, et al.** (2013). "Structural insights into LINC complexes." *Curr Opin Struct Biol* **23**(2): 285-291
- St Johnston, D. and J. Ahringer** (2010). "Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity." *Cell* **141**(5): 757-774
- Starr, D. A. and H. N. Fridolfsson** (2010). "Interactions between nuclei and the cytoskeleton are mediated by SUN-KASH nuclear-envelope bridges." *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**: 421-444
- Starr, D. A., G. J. Hermann, et al.** (2001). "unc-83 encodes a novel component of the nuclear envelope and is essential for proper nuclear migration." *Development* **128**(24): 5039-5050
- Steggerda, S. M. and B. M. Paschal** (2002). "Regulation of nuclear import and export by the GTPase Ran." *Int Rev Cytol* **217**: 41-91
- Stewart-Hutchinson, P. J., C. M. Hale, et al.** (2008). "Structural requirements for the assembly of LINC complexes and their function in cellular mechanical stiffness." *Exp Cell Res* **314**(8): 1892-1905
- Stritt, C., S. Stern, et al.** (2009). "Paracrine control of oligodendrocyte differentiation by SRF-directed neuronal gene expression." *Nat Neurosci* **12**(4): 418-427
- Su, L. K., M. Burrell, et al.** (1995). "APC binds to the novel protein EB1." *Cancer Res* **55**(14): 2972-2977



- Symons, M., J. M. Derry, et al.** (1996). "Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization." *Cell* **84**(5): 723-734
- Taddei, M. L., E. Giannoni, et al.** (2013). "Microenvironment and tumor cell plasticity: an easy way out." *Cancer Lett* **341**(1): 80-96
- Takai, Y., T. Sasaki, et al.** (2001). "Small GTP-binding proteins." *Physiol Rev* **81**(1): 153-208
- Takenawa, T. and S. Suetsugu** (2007). "The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(1): 37-48
- Takeya, R. and H. Sumimoto** (2003). "Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases." *Mol Cells* **16**(3): 271-277
- Tang, C. W., A. Maya-Mendoza, et al.** (2008). "The integrity of a lamin-B1-dependent nucleoskeleton is a fundamental determinant of RNA synthesis in human cells." *J Cell Sci* **121**(Pt 7): 1014-1024
- Tania, N., E. Prosk, et al.** (2011). "A temporal model of cofilin regulation and the early peak of actin barbed ends in invasive tumor cells." *Biophys J* **100**(8): 1883-1892
- Terry, S. J., C. Zihni, et al.** (2011). "Spatially restricted activation of RhoA signalling at epithelial junctions by p114RhoGEF drives junction formation and morphogenesis." *Nat Cell Biol* **13**(2): 159-166
- Theveneau, E. and R. Mayor** (2013). "Collective cell migration of epithelial and mesenchymal cells." *Cell Mol Life Sci* **70**(19): 3481-3492
- Tremblay, D., L. Andrzejewski, et al.** (2013). "Actin and microtubules play distinct roles in governing the anisotropic deformation of cell nuclei in response to substrate strain." *Cytoskeleton (Hoboken)* **70**(12): 837-848
- Ueda, T., A. Kikuchi, et al.** (1990). "Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel regulatory protein inhibiting the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein." *J Biol Chem* **265**(16): 9373-9380
- Versaevel, M., T. Grevesse, et al.** (2012). "Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells." *Nat Commun* **3**: 671
- Vetter, I. R. and A. Wittinghofer** (2001). "The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions." *Science* **294**(5545): 1299-1304
- Wang, N., J. D. Tytell, et al.** (2009). "Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(1): 75-82

- Watanabe, S., K. Okawa, et al.** (2010). "Rho and anillin-dependent control of mDia2 localization and function in cytokinesis." *Mol Biol Cell* **21**(18): 3193-3204
- Welsh, C. F.** (2004). "Rho GTPases as key transducers of proliferative signals in g1 cell cycle regulation." *Breast Cancer Res Treat* **84**(1): 33-42
- Wen, Y., C. H. Eng, et al.** (2004). "EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration." *Nat Cell Biol* **6**(9): 820-830
- Wennerberg, K., K. L. Rossman, et al.** (2005). "The Ras superfamily at a glance." *J Cell Sci* **118**(Pt 5): 843-846
- White, C. D., H. H. Erdemir, et al.** (2012). "IQGAP1 and its binding proteins control diverse biological functions." *Cell Signal* **24**(4): 826-834
- Willis, N. D., T. R. Cox, et al.** (2008). "Lamin A/C is a risk biomarker in colorectal cancer." *PLoS One* **3**(8): e2988
- Wilson, K. F., J. W. Erickson, et al.** (2013). "Rho GTPases and their roles in cancer metabolism." *Trends Mol Med* **19**(2): 74-82
- Wirtz, D., K. Konstantopoulos, et al.** (2011). "The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis." *Nat Rev Cancer* **11**(7): 512-522
- Wittmann, T., G. M. Bokoch, et al.** (2004). "Regulation of microtubule destabilizing activity of Op18/stathmin downstream of Rac1." *J Biol Chem* **279**(7): 6196-6203
- Wodarz, A. and I. Nathke** (2007). "Cell polarity in development and cancer." *Nat Cell Biol* **9**(9): 1016-1024
- Wolf, K., M. Te Lindert, et al.** (2013). "Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force." *J Cell Biol* **201**(7): 1069-1084
- Wood, L. D., D. W. Parsons, et al.** (2007). "The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers." *Science* **318**(5853): 1108-1113
- Woodcock, S. A., H. J. Rushton, et al.** (2010). "Tiam1-Rac signaling counteracts Eg5 during bipolar spindle assembly to facilitate chromosome congression." *Curr Biol* **20**(7): 669-675
- Woodham, E. F. and L. M. Machesky** (2014). "Polarised cell migration: intrinsic and extrinsic drivers." *Curr Opin Cell Biol* **30C**: 25-32
- Worman, H. J. and G. Bonne** (2007). "'Laminopathies': a wide spectrum of human diseases." *Exp Cell Res* **313**(10): 2121-2133
- Wu, Y. I., D. Frey, et al.** (2009). "A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells." *Nature* **461**(7260): 104-108

- Wyckoff, J. B., S. E. Pinner, et al.** (2006). "ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo." *Curr Biol* **16**(15): 1515-1523
- Yasuda, S., F. Ocegüera-Yanez, et al.** (2004). "Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores." *Nature* **428**(6984): 767-771
- Yasuda, S., H. Taniguchi, et al.** (2006). "An essential role of Cdc42-like GTPases in mitosis of HeLa cells." *FEBS Lett* **580**(14): 3375-3380
- Yoshizaki, H., Y. Ohba, et al.** (2004). "Cell type-specific regulation of RhoA activity during cytokinesis." *J Biol Chem* **279**(43): 44756-44762
- Zhang, M. S., A. Arnaoutov, et al.** (2014). "RanBP1 Governs Spindle Assembly by Defining Mitotic Ran-GTP Production." *Dev Cell* **31**(4): 393-404
- Zhang, X., K. Lei, et al.** (2009). "SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 complexes connect centrosome to the nucleus during neurogenesis and neuronal migration in mice." *Neuron* **64**(2): 173-187
- Ziegler, U. and P. Groscurth** (2004). "Morphological features of cell death." *News Physiol Sci* **19**: 124-128
- Zijlstra, A., R. Mellor, et al.** (2002). "A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction." *Cancer Res* **62**(23): 7083-7092
- Zwenger, M., C. Y. Ho, et al.** (2011). "Nuclear mechanics in disease." *Annu Rev Biomed Eng* **13**: 397-428

