

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## ***INTERACCIÓN CON LIGANDOS CELULARES DE LOS DOMINIOS SH3 DEL ADAPTADOR CIN85 EN LA REGULACIÓN DEL EGFR***

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A:

Moisés Castellá Giner

TUTOR/A:

Prof. D. Rafael Sirera Pérez

COTUTOR/A:

D. Jerónimo Bravo Sicilia

Curso Académico 2015-2016

VALÈNCIA, septiembre de 2016



## Resumen

### Interaction with cellular partners of the SH3 domains from the adaptor CIN85 in the regulation of EGFR

The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is a Receptor Tyrosine Kinase (RTK) whose ligand is the Epidermal Growth Factor (EGF). EGFR is responsible for a wide variety of important biological processes, such as cell proliferation, differentiation, survival, migration, adhesion or apoptosis. Constitutive activation of RTKs has negative consequences in the organism and overexpression of EGFR is frequently found in different types of cancer. Therefore, downregulation of EGFR is a critical step in modulating receptor activity and takes place by endocytosis, receptor ubiquitination, and subsequent lysosomal degradation. In this process, c-Cbl and Cbl-b proteins play a crucial role by acting as ubiquitin ligases as well as endocytic adaptor molecules. Cbl monoubiquitinates activated EGFR and sorts the receptor-containing vesicle to a degradation route that leads to the termination of the RTK signal. The recruitment of the adaptor CIN85 by Cbl is crucial for the initiation of the early steps of multistep process of EGFR downregulation. The domain structure of CIN85 shows three SH3 domains at the N-terminus which recognize an atypical proline-arginine motif present in the C-terminal region of c-Cbl and Cbl-b to form a complex with these proteins. SH3A and SH3C domains of CIN85 were purified by both affinity chromatography and size exclusion chromatography. It yielded enough amount to characterize and study the interaction of both domains with two peptides of the protein MUC1. *Isothermal titration calorimetry* (ITC) and *BLItz* experiments determined that neither SH3A nor SH3C interact with MUC1 in the conditions in which the research was done.

**Key words:** CIN85, Cbl, Ubiquitination, Cancer, SH3 domains, MUC1

El receptor del Factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un receptor del tipo tirosina quinasa (RTK) cuyo ligando es el Factor de crecimiento epidérmico (EGF). El EGFR es responsable de una amplia variedad de procesos biológicos importantes como la proliferación celular, la diferenciación, la supervivencia, la migración, la adhesión o la apoptosis. La activación constitutiva de los RTKs tiene consecuencias negativas en el organismo y la sobreexpresión del EGFR se puede encontrar frecuentemente en diferentes tipos de cáncer. Por lo tanto, la regulación a la baja del EGFR es un paso crítico en la modulación de la actividad del receptor y tiene lugar por endocitosis, ubiquitinización del receptor y por la subsiguiente degradación lisosomal. En este proceso, las proteínas c-Cbl y Cbl-b desempeñan un rol crucial actuando como ligasas de ubiquitina y como adaptadores endocíticos. Cbl monoubiquitina a EGFR activado y orienta al receptor, dentro de la vesícula, hacia la ruta de degradación y provoca la terminación de la señal del RTK. El reclutamiento del adaptador CIN85 por Cbl es crucial para la iniciación de los primeros pasos del proceso de regulación a la baja de EGFR. CIN85 presenta tres dominios SH3 en el extremo N-terminal que reconocen un motivo atípico de prolina-arginina presente en la región C-terminal de c-Cbl y Cbl-b para formar un complejo con estas. Los dominios SH3A y SH3C de CIN85 fueron purificados mediante cromatografía de afinidad y cromatografía de exclusión por tamaño. Se produjo suficiente cantidad para caracterizar y estudiar la interacción de ambos dominios con dos péptidos de la proteína MUC1. Experimentos mediante calorimetría isoterma de titulación (ITC) y a través del sistema *BLItz* determinaron que ni el dominio SH3A ni el SH3C interactúan con MUC1 en las condiciones en las que se realizó la investigación.

**Palabras clave:** CIN85, Cbl, Ubiquitinización, Cáncer, dominios SH3, MUC1

Autor/a: Moisés Castellá Giner Valencia, septiembre 2016

Tutor académico: Prof. D. Rafael Sirera Pérez

Cotutor/a: D. Jerónimo Bravo Sicilia

## **Agradecimientos**

En primer lugar me gustaría agradecer a mis compañeros y amigos de la última fila por estos cuatro años que ya se terminan. Hemos compartido muchos momentos tanto dentro como fuera de la universidad. Momentos buenos y otros no tan buenos. Viajes, cenas, tardes de preparación de trabajos y exposiciones y muchas más cosas. Pero lo que más valoro es que habéis hecho que estos cuatro años hayan valido mucho la pena.

En segundo lugar, quiero agradecer a Jero la oportunidad que me ha brindado de realizar este trabajo en su laboratorio, por su amabilidad a la hora de explicarme las técnicas y protocolos y por su paciencia conmigo cuando las cosas no salían del todo bien. También agradecer la ayuda que me han prestado Sara, Nada y Lucía en el laboratorio. Siempre que tenía alguna duda, ellas me la resolvían.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mis padres y a mi hermana el apoyo incondicional que me dan siempre. Durante estos cuatro años y sobretodo, en los momentos más difíciles, ellos siempre han estado ahí para animarme y darme el empujón que necesitaba para continuar hacia adelante. Gràcies per haver-me ajudat a aconseguir complir este somni.

# Índice

## 1. Índice temático

1. Introducción.....	1
1.1. Ruta de señalización mediada por el <i>EGFR</i> .....	1
1.1.1. ¿Qué es el <i>EGFR</i> ?.....	1
1.1.2. Estructura del <i>EGFR</i> .....	1
1.1.3. Función del <i>EGFR</i> .....	2
1.1.4. Regulación del <i>EGFR</i> .....	2
1.2. La proteína <i>Cbl</i> .....	2
1.2.1. ¿Qué es <i>Cbl</i> ?.....	3
1.2.2. Estructura de <i>Cbl</i> .....	3
1.2.3. Función de <i>Cbl</i> .....	3
1.3. El adaptador <i>CIN85</i> .....	5
1.3.1. ¿Qué es <i>CIN85</i> ?.....	5
1.3.2. Estructura y función de <i>CIN85</i> .....	5
1.4. La proteína <i>MUC1</i> .....	6
1.4.1. ¿Qué es <i>MUC1</i> ?.....	7
1.4.2. Estructura de <i>MUC1</i> .....	7
2. Objetivos.....	8
3. Material y métodos.....	9
3.1. Dominio <i>SH3A</i> de <i>CIN85</i> .....	9
3.1.1. Construcción <i>UTS-115</i> .....	9
3.1.1.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> y <i>Mini-prep</i> .....	10
3.1.1.2. Sobreexpresión mediante inducción por <i>IPTG</i> .....	11
3.1.1.3. Sobreexpresión mediante autoinducción.....	11
3.1.1.4. Purificación mediante cromatografía de interacción hidrofóbica.....	12
3.1.2. Construcción <i>UTS-80</i> .....	13
3.1.2.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> y <i>Mini-prep</i> .....	13
3.1.2.2. Sobreexpresión mediante autoinducción.....	14
3.1.2.3. Purificación de <i>UTS-80</i> .....	14
3.2. Dominio <i>SH3C</i> de <i>CIN85</i> .....	16
3.2.1. Construcción <i>UTS-86</i> .....	16
3.2.1.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> y <i>Mini-prep</i> .....	17
3.2.1.2. Sobreexpresión mediante autoinducción.....	17
3.2.1.3. Purificación de <i>UTS-86</i> .....	17
3.3. Proteína <i>MUC1</i> .....	17
3.3.1. Péptido <i>VNTR</i> .....	18
3.3.2. Péptido <i>Imperfect Repeat (IR)</i> .....	18
3.4. Estudio de la interacción entre <i>CIN85</i> y <i>MUC1</i> utilizando <i>Bio-layer Interferometry (BLI)</i> .....	19
3.5. Estudio de la interacción entre <i>CIN85</i> y <i>MUC1</i> empleando <i>Isothermal Titration Calorimetry (ITC)</i> .....	20
4. Resultados y discusión.....	21
4.1. Purificación de la construcción <i>UTS-115</i> .....	21
4.2. Purificación de la construcción <i>UTS-80</i> .....	25
4.3. Purificación de la construcción <i>UTS-86</i> .....	28
4.4. Caracterización de la unión de <i>CIN85</i> con <i>MUC1</i> .....	32
4.4.1. Mediante <i>BLI</i> .....	32
4.4.2. Mediante <i>ITC</i> .....	33
4.5. Discusión.....	37
5. Conclusiones.....	39
6. Referencias bibliográficas.....	39

## 2. Índice de figuras

### INTRODUCCIÓN

Figura 1. Conformación del <i>EGFR</i> y su activación por la unión de su ligando.....	1
Figura 2. Dominios de la proteína <i>c-Cbl</i> y <i>Cbl-b</i> .....	3
Figura 3. Rol de <i>CIN85</i> y de <i>Cbl</i> en la regulación del <i>EGFR</i> .....	4
Figura 4. Representación esquemática de la interacción de diferentes proteínas con los diferentes dominios de <i>Cbl</i> .....	5
Figura 5. Estructura del complejo trimérico entre el péptido de <i>Cbl</i> y dos dominios <i>SH3</i> de <i>CIN85</i> .....	6
Figura 6. Representación de la estructura y los dominios de la proteína <i>Mucin 1</i> .....	8

### MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 7. Traducción de la secuencia de la construcción <i>UTS-115</i> .....	9
Figura 8. Traducción de la secuencia de la construcción <i>UTS-80</i> .....	13
Figura 9. Traducción de la secuencia de la construcción <i>UTS-86</i> .....	16
Figura 10. Secuencia de la proteína <i>MUC1</i> en humanos.....	17
Figura 11. Localización de la región <i>VNTR</i> en la secuencia de <i>MUC1</i> .....	18
Figura 12. Secuencia del péptido <i>VNTR</i> .....	18
Figura 13. Secuencia del péptido <i>Imperfect Repeat</i> y región donde se encuentra en la proteína <i>MUC1</i> .....	19
Figura 14. Configuración empleada para llevar a cabo el ensayo de afinidad entre la proteína <i>UTS-80</i> y los péptidos <i>VNTR</i> e <i>IR</i> .....	20

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 15. Cromatograma de la purificación de la construcción <i>UTS-115</i> mediante el uso del <i>Äkta Purifier</i> .....	22
Figura 16. Gel de poliacrilamida al 15% de las fracciones obtenidas en la purificación de <i>UTS-115</i> utilizando la columna <i>HiTrap Phenyl FF (high sub)</i> .....	22
Figura 17. Cromatograma de la purificación de la construcción <i>UTS-115</i> mediante el uso del <i>Äkta Purifier</i> .....	23
Figura 18. Gel de poliacrilamida al 15% de las fracciones obtenidas en la purificación de <i>UTS-115</i> utilizando la columna <i>HiTrap Phenyl FF (high sub)</i> tras aplicar un <i>hold</i> .....	24
Figura 19. Cromatograma de la purificación de la construcción <i>UTS-80</i> mediante el uso del <i>Äkta Purifier</i> .....	25
Figura 20. Gel de poliacrilamida al 15% de las fracciones obtenidas en la purificación de <i>UTS-80</i> utilizando la columna de níquel.....	26
Figura 21. Gel de poliacrilamida al 15% de la purificación de <i>UTS-80</i> en la columna de <i>GST</i> .....	26
Figura 22. Cromatograma de la purificación de la construcción <i>UTS-80</i> mediante el uso del <i>Äkta Prime</i> .....	27

Figura 23. Gel de poliacrilamida al 15% de las fracciones de la <i>gel filtration</i> utilizando el <i>Ákta Prime</i> .....	28
Figura 24. Cromatograma de la purificación de la construcción <i>UTS-86</i> mediante el uso del <i>Ákta Purifier</i> .....	29
Figura 25. Gel de poliacrilamida al 15% de las fracciones obtenidas en la purificación de <i>UTS-86</i> utilizando la columna de níquel.....	29
Figura 26. Gel de poliacrilamida al 15% de la purificación de <i>UTS-86</i> en la columna de <i>GST</i> .....	30
Figura 27. Cromatograma de la purificación de la construcción <i>UTS-86</i> mediante el uso del <i>Ákta Prime</i> .....	31
Figura 28. Gel de poliacrilamida al 15% de las fracciones de la <i>gel filtration</i> utilizando el <i>Ákta Prime</i> para la purificación de la construcción <i>UTS-86</i> .....	31
Figura 29. Curvas obtenidas en el ensayo para determinar la interacción entre las construcciones <i>UTS-80</i> y el péptido <i>VNTR</i> .....	32
Figura 30. Curvas obtenidas en el ensayo para determinar la interacción entre la construcción <i>UTS-80</i> y el péptido <i>IR</i> .....	33
Figura 31. <i>ITC</i> para la construcción <i>UTS-80</i> y el péptido <i>VNTR</i> .....	34
Figura 32. <i>ITC</i> del ensayo de interacción entre el glutatión y la pepsina.....	34
Figura 33. <i>ITC</i> para la construcción <i>UTS-80</i> y el péptido <i>IR</i> .....	35
Figura 34. <i>ITC</i> para la construcción <i>UTS-86</i> y el péptido <i>VNTR</i> .....	35
Figura 35. <i>ITC</i> para la construcción <i>UTS-86</i> y el péptido <i>IR</i> .....	36
Figura 36. Estequiometría de interacción entre los dominios <i>SH3A</i> y <i>SH3C</i> con los péptidos <i>VNTR</i> e <i>IR</i> .....	37

## Abreviaturas

*BLI* (*Bio-layer Interferometry*)

*Cbl* (*Casitas B-lineage lymphoma*)

*CIN85* (*Cbl-interacting protein of 85K*)

*EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

*IPTG* (*Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido*)

*ITC* (*Isothermal titration calorimetry*)

LB (*Luria Broth médium*)

*MUC1* (*Mucin 1*)

*SH3* (*Src homology 3*)

*VNTR* (*Variable number tandem repeat*)

# 1. Introducción

## 1.1 Ruta de señalización mediada por el *EGFR*

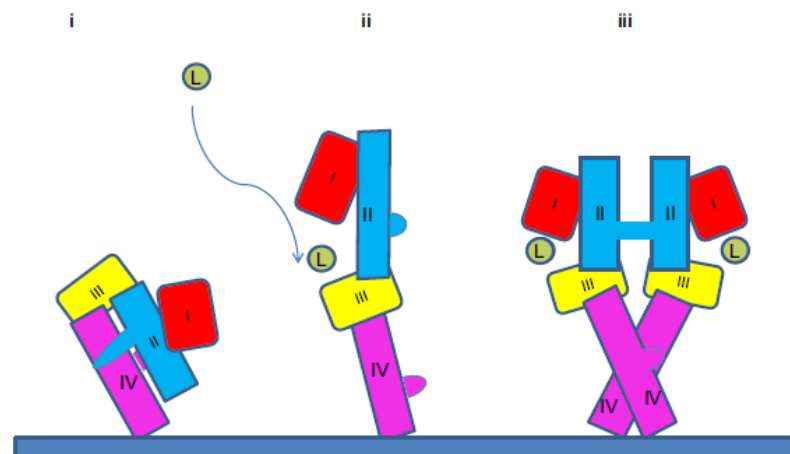
### 1.1.1. ¿Qué es el *EGFR*?

El *EGFR* (*Epidermal growth factor receptor*) es una glicoproteína transmembrana de la familia *ErbB* y fue el primer receptor del tipo tirosina quinasa (*RTK*) descubierto. Siguiendo este descubrimiento, se identificaron tres receptores de la misma familia: *ErbB2*, *ErbB3* y *ErbB4*. En mamíferos, la activación canónica del *EGFR* se produce tras la unión de uno de los siete péptidos siguientes que actúan como factores de crecimiento: el *EGF* (*Epidermal growth factor*), el *TGF $\alpha$*  (*Transforming growth factor alpha*), *HBEGF* (*Heparin-binding EGF-like growth factor*), *AREG* (*Amphiregulin*), *BTC* (*Betacellulin*), *EREG* (*Epiregulin*) y *EPGN* (*Epigen*) (Schneider y Wolf, 2009).

### 1.1.2. Estructura del *EGFR*

Como todos los *RTKs*, la familia del *EGFR* se compone de un dominio extracelular que permite la unión con el ligando, seguido por un único dominio transmembrana y un dominio citoplasmático que presenta un núcleo proteico de tirosina quinasa. El dominio extracelular de los miembros de la familia del *EGFR* está formado, a su vez, por cuatro subdominios llamados: dominio I (DI), II (DII), III (DIII) y IV (DIV) o L1, S1, L2 y S2, respectivamente (Schlessinger, 2002).

La unión del ligando a este receptor ocurre entre DI y DIII permitiendo la formación de un dímero que estabiliza la conformación extendida, dejando expuesto el brazo dimerizado de DII y otros residuos más. La figura 1 es una representación del cambio conformacional que sufre el *EGFR* tras la unión del ligando.



**Figura 1. Conformación del *EGFR* y su activación por la unión del ligando.** i) El *EGFR* se encuentra en su formación inhibida o en forma de tetrada en la cual el DII se encuentra unido al DIV impidiendo la unión del ligando. ii) El ligando (L=*EGF*) se une a los dominios I y III y esto provoca un cambio conformacional. Esta nueva conformación extendida es estable. iii) La exposición del brazo dimerizado en el dominio II provoca la formación de un core con otro receptor de la membrana (Yewale *et al.*, 2013).

### 1.1.3. Función del *EGFR*

*EGFR* desempeña un rol vital en la regulación de la proliferación, supervivencia y diferenciación celular. Debido a esto, el mecanismo de señalización de este receptor se ha estudiado ampliamente. Después de la unión del ligando y del cambio a una conformación extendida, el receptor es capaz de dimerizar con otro. La dimerización facilita que el dominio citoplasmático del monómero que actúa como regulador establezca el dominio tirosina quinasa del monómero que actúa como unidad catalítica en la conformación activa y presenta los residuos de tirosina del monómero regulador al sitio catalítico del monómero catalítico. Por otro lado, cada tipo de ligando produce la fosforilación de diferentes grupos de residuos de tirosina del *EGFR*. Aproximadamente se fosforilan 10 tirosinas del receptor después de la dimerización. Estos residuos actúan como sitios de unión para una serie de proteínas citosólicas que tienen dominios *Src homology 2 (SH2)* o motivos *phospho-tyrosine binding (PTB)*. La unión de un ligando al *EGFR* resulta, en definitiva, en la activación de diferentes rutas de señalización como *RAS*, *MAPK (Mitogen-activated protein kinase)*, *Src*, *STAT 3/5 (Signal transducer and activator of transcription 3/5)*, *PLC $\gamma$  (Phospholipase C  $\gamma$ )*, *PKC (Protein kinase C)* y *PI3-kinase*. Así, la autofosforilación y la transfosforilación de los receptores a través de sus dominios tirosina quinasa desencadena un reclutamiento de efectores *aguas abajo* y la estimulación de señales de proliferación y de supervivencia celular (Yewale *et al.*, 2013).

Una expresión anormal y una desregulación en el transporte intracelular de los miembros de la familia de receptores *EGFR* tienen unas consecuencias importantes y bien reconocidas en la oncogénesis. Por ejemplo, este receptor actúa como un potente indicador pronóstico en el cáncer de *head and neck*, de ovario, cervical, de vejiga y de esófago (Nicholson *et al.*, 2001).

Han sido identificadas mutaciones en el *EGFR* en diferentes tipos de cáncer y este receptor es la diana de una clase de terapias contra el cáncer en expansión. Defectos en el transporte que dan como resultado una localización incorrecta y una pobre regulación *aguas abajo* del *EGFR* están asociados con un aumento de la señalización que puede conducir al desarrollo de cáncer (Tomas *et al.*, 2014).

### 1.1.4. Regulación del *EGFR*

La regulación *aguas abajo* de *RTKs* es un paso crítico en la modulación de su actividad y está mediada por los procesos de endocitosis, ubiquitinación del receptor y la subsiguiente degradación en los lisosomas. Para que este proceso tenga éxito se debe producir la formación de grandes complejos proteicos capaces de eliminar los receptores activados de la membrana plasmática a través de la vía dependiente o independiente de clatrina (Moncalián *et al.*, 2006).

En la endocitosis del *EGFR* mediante la vía dependiente de clatrina actúa una proteína adaptadora denominada *Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2)*. Esta proteína se une al *EGFR* activado a través de sus dominios *SH2*. Esta interacción puede desencadenar efectos opuestos: regulación *aguas abajo* por medio de la internalización y la ubiquitinación que conlleva la degradación posterior pero también produce una activación de las cascadas de señalización a través de la interacción de los dominios *SH3 (Src homology 3)* de *Grb2* con el factor de intercambio de guanina de *Ras*. *Grb2* recluta a la ligasa de ubiquitinas *Cbl* desencadenando la ubiquitinación monomérica o polimérica de los residuos de lisina en el dominio quinasa de *EGFR* (Tomas *et al.*, 2014).



## 1.2. La proteína *Cbl*

### 1.2.1. ¿Qué es *Cbl*?

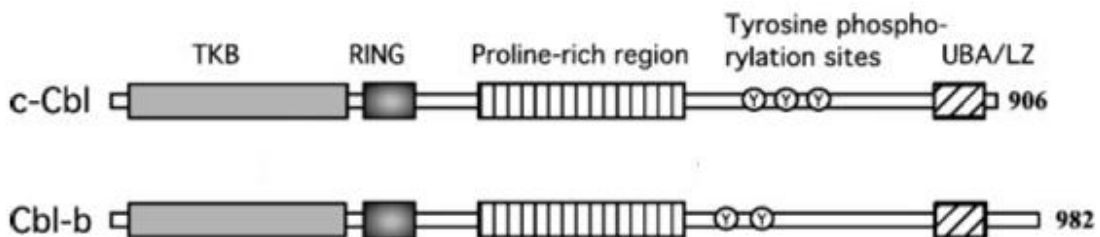
*Cbl* (*Casitas B-lineage Lymphoma*) fue aislada por primera vez como el producto del oncogen (*viral Cbl* o *v-Cbl*) obtenido tras la infección de un ratón con el retrovirus ecotrópico *Cas-Br-M* (Langdon *et al.*, 1989). Posteriormente, se identificaron el resto de proteínas de la familia de *Cbl*: *Cbl* o *c-Cbl*, *Cbl-b* y *Cbl-c*, *Cbl-3* o *Cbl-SL*. Todas ellas comparten secuencias muy conservadas en sus extremos terminales y están presentes en todos los mamíferos. Su función es actuar como ligasa de ubiquitina E3 durante la señalización celular (Thien and Langdon, 2001).

Además, actúan como proteínas adaptadoras multivalentes, capaces de interactuar con un gran número de proteínas y, por lo tanto, tener transcendencia en ciertos procesos biológicos.

### 1.2.2. Estructura de *Cbl*

*Cbl* es una proteína citoplasmática de 120 kDa que se expresa de forma ubicua y se encuentra en una cantidad elevada en el timo y los testículos. *Cbl-b* y *c-Cbl* también están presentes en las células de mamíferos. *Cbl-b*, que es la más similar a *Cbl*, se puede encontrar en numerosos tipos celulares y su expresión es elevada en las células T maduras. Por el contrario, *Cbl-c*, un homólogo de *Cbl* de menor tamaño, está presente en gran cantidad en los órganos derivados del endodermo, mientras que en los tejidos hematopoyéticos lo hace en menor cantidad (Dikic *et al.*, 2003).

Un estudio de la estructura de varias proteínas de la familia de *Cbl* revela que todas poseen una región conservada en el extremo N-terminal y dos dominios importantes como muestra la figura 2: el dominio de unión a tirosina quinasa (*TKB*) y una *mano EF* de unión a calcio. También presentan un dominio modificado *SH2* (Swaminathan y Tsygankov, 2006).



**Figura 2. Dominios de las proteínas *c-Cbl* y *Cbl-b*.** La región N-terminal contiene el dominio *TKB* y un dedo de zinc *RING*. En el extremo C-terminal existe una región rica en prolina, el dominio asociado a la ubiquitina (*UBA*) y la cremallera de leucina (*LZ*). Figura modificada de Swaminathan y Tsygankov (2006).

### 1.2.3. Función de *Cbl*

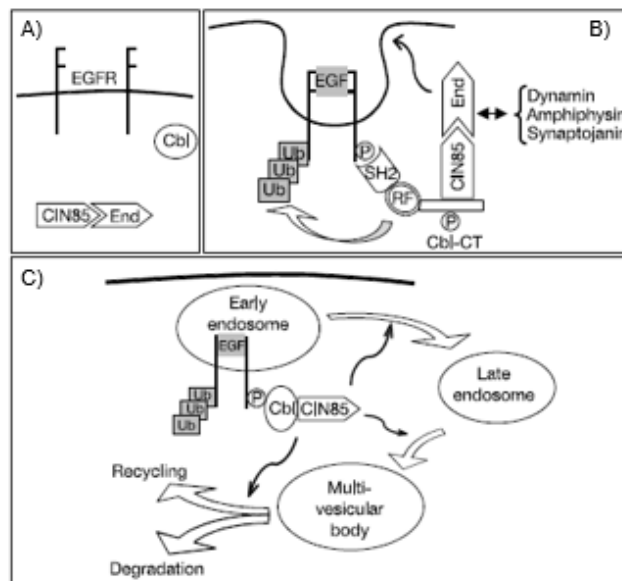
En la actualidad, se conoce que las proteínas de la familia de *Cbl* ejercen dos funciones diferentes en la regulación tanto positiva como negativa de la señalización mediante los *PTKs*.

Al principio, se sabía que *Cbl* mediaba en la ubiquitinación de los receptores activos y por lo tanto era esencial para la degradación y cese de la transducción de la señal. Sin embargo, se desconocía que esta familia de proteínas también regula la endocitosis del *EGFR* mediante la formación de complejos proteicos alrededor del receptor activado.

La figura 3 muestra el rol de *CIN85* y *Cbl* cuando se produce la activación del receptor de *EGF*. *Cbl* recluta a *CIN85* (*Cbl-interacting protein of 85K*) y endofilinas para formar un complejo con los *EGFR* activados, controlando así la internalización del receptor. *CIN85* está asociada de forma constitutiva con las endofilinas (Fig. 3 A) mientras que cuando ocurre la unión de *EGF*, se produce un aumento de la unión de *CIN85* con la región distal del extremo C-terminal de *Cbl*. Este aumento de la unión entre *CIN85* y *Cbl* se debe a la fosforilación de la tirosina en *Cbl* que provoca la translocación de *CIN85/endofilina* hacia las proximidades del receptor activado donde las endofilinas junto con otras proteínas (*dynamamin*, *amphiphysin* y *synaptojanin*) regulan la endocitosis mediada por clatrina (Fig. 3 B).

*Cbl* está asociado con *EGFR* a lo largo del proceso de endocitosis y está implicado en ordenar aquellos receptores que serán degradados en los lisosomas. Mientras que *CIN85* puede controlar el transporte de *EGFR* gracias a su capacidad de unión con otras múltiples proteínas adaptadoras (Fig. 3 C).

La inhibición de estas interacciones es suficiente para bloquear la internalización del *EGFR*, retrasar su degradación y potenciar la transcripción génica inducida por el *EGF*, sin interferir en la ubiquitinación del receptor mediada por *Cbl*.



**Figura 3. Rol de *CIN85* y de *Cbl* en la regulación del *EGFR*.** A) *CIN85* se encuentra asociada constitutivamente con las endofilinas. B) *Cbl* se une al receptor activado para ubiquitarlo y recluta a *CIN85* y las endofilinas que regulan la endocitosis mediada por clatrina. C) *Cbl* permanece asociado con *EGFR* a lo largo del proceso de endocitosis y está implicado en ordenar aquellos receptores que serán degradados en los lisosomas. Figura modificada de Soubeyran *et al.* (2002).

La estructura de *Cbl* y de sus compañeros permite su interacción con un gran número de proteínas a parte de la ya mencionada con *CIN85*. La región rica en prolina permite la asociación con proteínas que poseen dominios *SH3* como quinasas de la familia *Src*, *Grb2* y otras; los residuos de tirosina fosforilados del extremo *C-terminal* facilitan la unión con proteínas que poseen dominios *SH2* y que forman parte de la red

de señalización como: *Vav2* (*Vav-family of guanine nucleotide exchange factors for Rho-family GTPases*), la subunidad *p85* de *PI 3-kinase* y proteínas adaptadoras de la familia de *Crk*; el dominio *LZ* y el *UBA* facilitan la dimerización bajo ciertas condiciones experimentales y el dominio *TKB* es el responsable de la unión de *Cbl* con proteínas que presentaban motivos con tirosinas fosforiladas como por ejemplo *cKit*, *ZAP70* u otro receptor *EGFR*. La figura 4 muestra un esquema que representa la unión de diferentes proteínas con los diferentes dominios de *Cbl* (Mohapatra *et al.*, 2013)

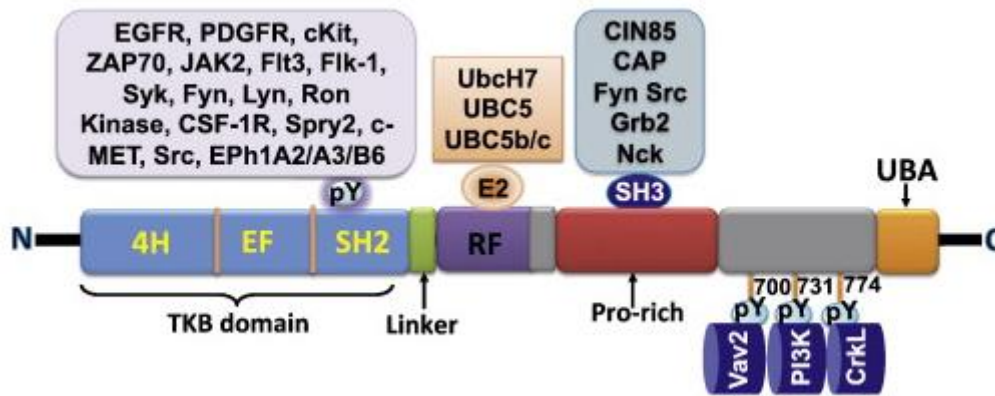


Figura 4. Representación esquemática de la interacción de diferentes proteínas con los diferentes dominios de *Cbl*. (Mohapatra *et al.*, 2013)

### 1.3. El adaptador *CIN85*

#### 1.3.1. ¿Qué es *CIN85*?

*CIN85* (*Cbl interacting protein of 85 kDa*) pertenece a una familia de proteínas adaptadoras endocíticas que tienen la capacidad de acoplar múltiples efectores y de regular el transporte de carga con el citoesqueleto. Fue identificada por primera vez por Take *et al.* (2000) durante el desarrollo de una investigación para determinar las proteínas con las que interactuaba *Cbl*. Esta proteína también es conocida como *Ruk* (*Regulator of ubiquitous kinase*) (Gout *et al.*, 2000) y como *SETA* (*SH3 domain-containing gene expressed in tumorigenic astrocytes*) (Bögler *et al.*, 2000).

*CIN85* contiene un dominio *coiled-coil* (CC) en el extremo C-terminal, una región de 160 aminoácidos que no presenta una estructura determinada, una región rica en prolina (PR) y tres dominios *SH3* en el extremo N-terminal. Estos tres dominios son los encargados de la formación de estos grandes complejos de proteínas. La región rica en prolina contiene múltiples secuencias *PXXP* que hacen posible el reconocimiento por los dominios *SH3* de otras proteínas.

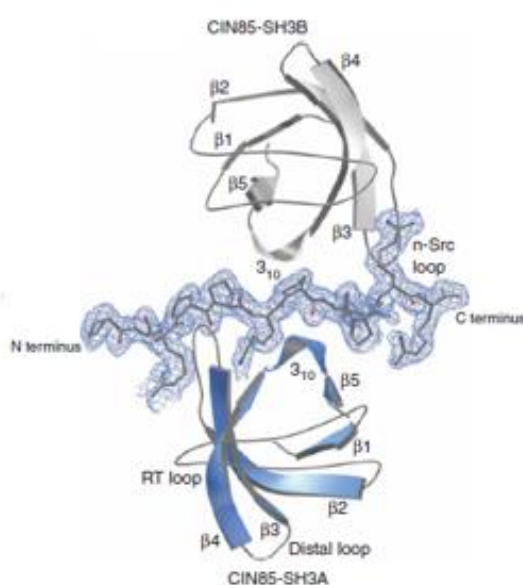
#### 1.3.2. Estructura y función de *CIN85*

Los dominios *SH3* se unen a regiones ricas en prolina y son esenciales en el ensamblaje y la regulación de muchos procesos de señalización intracelular. En general, están constituidos por cerca de 60 aminoácidos con una estructura de barril  $\beta$  formada por cinco láminas  $\beta$ . Estos ordenamientos forman una hendidura ácida y dos hidrofóbicas entre dos láminas  $\beta$  que están involucradas en el reconocimiento y unión a los motivos ricos en prolina. La mayoría de dominios *SH3* se caracterizan por reconocer

y unirse a secuencia ricas en prolina con el motivo  $\varphi P X \varphi P$  ( $P X X P K$ ) donde  $\varphi$  es, normalmente, un residuo hidrofóbico y  $X$  cualquier aminoácido.

Sin embargo, los dominios *SH3* de *CIN85* sólo pueden reconocer un motivo atípico de prolina y arginina ( $P X X X P R$ ) presente en la región C-terminal de *Cbl* y de *Cbl-b*. También se ha comprobado que otras proteínas que presentan este motivo también se unen a *CIN85* (Moncalián *et al.*, 2006).

Otro aspecto importante de la interacción entre *CIN85* y *Cbl* es el hecho que cualquiera de los tres dominios *SH3* es capaz de reconocer este motivo atípico de *Cbl*. Además, se ha descubierto una nueva forma de interactuar de *Cbl* que se basa en la formación de un complejo heterotrimérico. Se testó la formación de este complejo utilizando un único péptido de *Cbl* que contenía este motivo atípico y resultó que tanto en solución como *in vivo* se unían dos dominios *SH3* de *CIN85* a este péptido (Jozic *et al.*, 2005). En la figura 5 se puede ver la estructura que se obtuvo en la formación de este complejo heterotrimérico.



**Figura 5. Estructura del complejo trimérico entre el péptido de *Cbl* y dos dominios *SH3* de *CIN85*.** Se puede observar la estructura y localización de las 5 láminas  $\beta$  características de los dominios *SH3*. También, se aprecia como interaccionan ambos dominios (*SH3A* y *SH3B*) con el péptido de *Cbl* (Jozic *et al.*, 2005).

Previamente, se pensaba que la acción de *CIN85* en el complejo *EGFR/Cbl/CIN85* estaba implicada principalmente en las primeras etapas de la internalización endocítica. Sin embargo, Schroeder *et al.* (2012) demostraron que *CIN85* es prescindible para la internalización del receptor mediante un ensayo en el que bloquearon la fosforilación de los residuos de tirosina de *CIN85* y observaron que la endocitosis del receptor no se veía afectada. También realizaron un *knockdown* de *CIN85* empleando RNA de interferencia y el resultado fue el mismo. En cambio, determinaron que sí que es fundamental la acción de *CIN85* en los pasos finales de la endocitosis para un ordenamiento y degradación eficiente del receptor de *EGF*.

Estos hallazgos han impulsado la búsqueda de proteínas que puedan interactuar con *CIN85* a través de sus dominios *SH3* como los estudios realizados por Watanabe *et al.* (2000) y Schmidt *et al.* (2003). Además entre estos estudios, se encuentra uno que revela que puede existir interacción entre *CIN85* y la proteína *MUC1*.

## 1.4. La proteína *MUC1*

### 1.4.1. ¿Qué es *MUC1*?

*Mucin 1* (*MUC1*; también conocida como *episialin*, *PEM*, *H23Ag*, *EMA*, *CA15-3* y *MCA*) es una proteína transmembrana de un solo paso de tipo I con un dominio extracelular altamente glicosilado. Esta proteína se expresa normalmente en las células epiteliales luminales y glandulares de la glándula mamaria, del esófago, del estómago, del duodeno, del páncreas, del útero, de la próstata, de los pulmones y en menor medida en las células hematopoyéticas. En tejidos sanos, *MUC1* confiere protección a los epitelios subyacentes. Las cadenas de azúcares cargadas negativamente de *MUC1* crean una barrera física que limita la accesibilidad y previene la colonización por parte de patógenos. Además, estas cadenas oligomerizan y forman una especie de gel que lubrica y protege al epitelio subyacente de procesos como la desecación, cambios en el pH y microbios.

En ocasiones, se produce una glicosilación aberrante en *MUC1*. Estas glicoproteínas aberrantes están sobreexpresadas en las células tumorales de la mayoría de cánceres epiteliales en seres humanos.

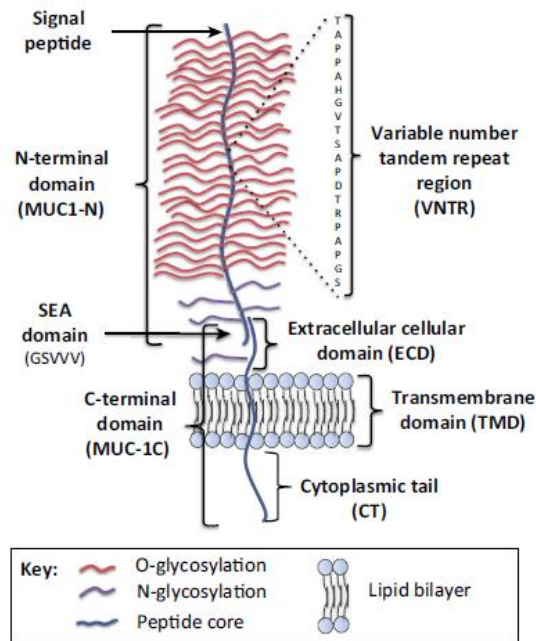
*MUC1* interviene en la producción de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento de tejido conectivo (*CTGF*), el factor A de crecimiento derivado de plaquetas (*PDGF-A*) y *PDGF-B* que promueve la activación de las rutas de *MAPK* y *PI3K/Akt*. De esta forma, potencia la proliferación y la supervivencia de las células tumorales.

Por otro lado, la cola citoplasmática de *MUC1* (*MUC1-CT*), liberada tras la escisión proteolítica de *Mucin 1*, se transloca al núcleo en asociación con la  $\beta$ -catenina, reprime la expresión de la *E-cadherina* y aumenta la expresión de los inductores de la transición epitelio-mesénquima (*EMT*) como *Snail*, *Slug*, *Vimentin* y *Twist*. Como consecuencia, las uniones adherentes se desestabilizan y se producen reordenamientos profundos del citoesqueleto. Esto reduce los contactos entre las células cancerosas y facilita la invasión de la membrana basal.

También se ha descrito que *MUC1* ayuda a las células tumorales a evadir la muerte celular previniendo la activación de las vías de apoptosis intrínsecas. Un ejemplo es el caso de las células en hipoxia. En estas células, niveles elevados de las especies reactivas del oxígeno (*ROS*) pueden activar la ruta de la apoptosis. Sin embargo, la sobreexpresión de *MUC1* reduce los niveles de *ROS* mediante el aumento de la expresión de la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa (Nath y Mukherjee, 2014).

### 1.4.2. Estructura de *MUC1*

En cuanto a su estructura, *MUC1* presenta un gran dominio extracelular que contiene una región de número variable de repeticiones en tándem (*VNTR*) compuesta por de 20 a 200 repeticiones en tándem (*TR*) de 20 aminoácidos. Esta región es rica en prolinas, y en serinas y treoninas o-glicosiladas. El dominio extracelular no está unido covalentemente a la subunidad pequeña consistente en un módulo de corte autocatalítico *SEA*, al dominio transmembrana (*TM*) y a la cola citoplasmática (Casicio, et al., 2013). En la figura 6 se puede apreciar la estructura y los dominios de *MUC1*.



**Figura 6. Representación de la estructura y los dominios de la proteína *Mucin 1*.** Está formada por un dominio N-terminal que contiene una región *VNTR*, un dominio *SEA*, un dominio extracelular (*ECD*), un dominio transmembrana y una cola citoplasmática (Nath y Mukherjee, 2014).

En un estudio para discernir qué proteínas pueden interactuar con *MUC1* y de esta forma conocer más en profundidad cuáles son las funciones que desempeña *Mucin 1* en las células tumorales, los ensayos de inmunoprecipitación realizados dieron como resultado que *CIN85* coprecipitaba junto con *MUC1*, por lo que los autores de dicho experimento postularon la hipótesis de que puede existir interacción entre ambas proteínas. Además, estudiaron mediante el uso de algunas proteínas quiméricas con que dominios de *MUC1* podría producirse dicha interacción con *CIN85*. La conclusión fue que la interacción podía darse en dos dominios diferentes: en la región *VNTR* y en la cola citoplasmática de *MUC1* (Cascio *et al.*, 2013).

Tras estos resultados, se realizó otro estudio para comprobar si al complejo *MUC1/CIN85* también estaba asociado la proteína *Cbl*. Se realizó otro ensayo de inmunoprecipitación y observaron que las tres proteínas coprecipitaban a partir del lisado obtenido de dos líneas celulares cancerosas de ratón (Cascio y Finn, 2015).

## 2. Objetivos

La finalidad de este trabajo será la de determinar experimentalmente si alguno de los dominios *SH3* de la proteína *CIN85* interactúa con la proteína *MUC1*. Para ello:

- Se procederá a la sobreexpresión de los dominios *SH3* de *CIN85* en organismos procariontes y a su purificación.
- Se comprobará a qué región de *MUC1* se une dicho dominio mediante el uso de dos péptidos procedentes de diferentes regiones de esta proteína. Para caracterizar dicha interacción se utilizarán las técnicas biofísicas de calorimetría isotérmica de titulación (*ITC*) y de interferometría de bio-capta (*BLI*).

### 3. Material y métodos

Para el estudio de la interacción entre *CIN85* y *MUC1* se han empleado una serie de técnicas muy diversas, entre las cuales se encuentran técnicas microbiológicas, cromatográficas, bioquímicas y biofísicas, que son detalladas a continuación.

Para discernir qué dominio *SH3* de la proteína *CIN85* es el que interacciona con la proteína *MUC1*, se decidió hacer pruebas primero con el dominio *SH3A* y posteriormente con el *SH3C*.

#### 3.1. Dominio *SH3A* de *CIN85*

Durante el desarrollo del trabajo, se utilizaron principalmente dos construcciones para representar al dominio *SH3A*: la construcción *UTS-115* y la *UTS-80*. El dominio *SH3A* se encuentra entre la posición 1 hasta la 58 de la proteína *CIN85*, lo que equivale a una longitud de 58 aminoácidos.

##### 3.1.1. Construcción *UTS-115*

La construcción *UTS-115* está expresada en el vector *pET-29b(+)* que presenta el gen de resistencia a la kanamicina. Este vector tiene una longitud de 5370bp y la secuencia del dominio *SH3A* se encuentra clonada entre los sitios de corte de las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*.

La principal ventaja del uso de esta construcción es que no presenta ninguna *tag* que requiera de su posterior escisión. El tamaño de la construcción es de 174 nucleótidos, es decir de 58 aminoácidos y su secuencia es la mostrada en la figura 7.

```
16012_UTS_115_T7prom_F09_069.seq
C:/Users/i-uts/Downloads/16012_UTS_115_T7prom_F09_069.seq
From 34 to 210.
Translation 58 a.a. MW=6764.6999999999999

MVEAIVEFDYQAQHDELTI
SVGEIITNIRKEDGGWEGQ
INGRRGLFPDNFVREIKK*
```

**Figura 7. Traducción de la secuencia de la construcción *UTS-115*.** Esta secuencia es el resultado del procesado de los datos recibidos del Servicio de secuenciación y análisis de DNA del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV) utilizando el software informático ApE v.1.13 que permite obtener la *ORF* (*Open Reading frame*) y mostrar cual es el resultado de la traducción de la misma.

Otra característica importante es que no presenta ningún aminoácido extra en comparación con la secuencia del dominio *SH3A* en la proteína *full-length*. Para averiguar esto, se alinearon la secuencia de la figura 7 con la secuencia del dominio *SH3A* depositada en *UniProt* (Q96B97[1-58]).

A continuación se describen las diferentes técnicas empleadas para la obtención de la proteína codificada en la construcción *UTS-115*.



### 3.1.1.1. Transformación de *Escherichia coli* y *Mini-prep*

En primer lugar, se procedió a la transformación de bacterias competentes para poder obtener el DNA del plásmido y secuenciarlo. De esta forma saber si la construcción tenía alguna *tag* o no y saber su secuencia.

El proceso de transformación elegido fue el del choque térmico (*heat shock*). Para esto, se cogieron 50  $\mu$ L de bacterias competentes de la cepa DH5 $\alpha$  (*Stratagene*<sup>®</sup>), se dejó que se descongelaran en el hielo y se añadieron cerca de 10 ng (0,5  $\mu$ L) del plásmido de la construcción UTS-115 en un tubo eppendorf de 1,5 mL. La cepa DH5 $\alpha$  presenta como característica que incrementa la estabilidad del inserto y mejora la calidad del DNA plasmídico extraído por *mini-preps*.

A continuación, el tubo se mantuvo en hielo durante 30 minutos como mínimo. Tras este periodo se procedió a realizar el choque térmico. En este caso al ser la cepa DH5 $\alpha$ , se incubó la muestra durante 1 minuto y 30 segundos en el termobloque (*Eppendorf*<sup>®</sup>) a 42 °C.

Una vez terminado el choque térmico, la muestra se dejó reposar 5 minutos en hielo y se añadieron 200  $\mu$ L de medio *Luria Broth* (LB) (*Pronadisa*<sup>®</sup>). Después, la muestra se incubó en el termobloque con agitación (*Eppendorf*<sup>®</sup>) a 37 °C durante 30 minutos.

Por último, se sembró la placa de agar LB (*Pronadisa*<sup>®</sup>) que contenía kanamicina 33  $\mu$ g/mL y se incubó a 37 °C durante toda la noche. A la mañana siguiente se comprobó si había crecido alguna colonia en la placa.

El paso siguiente fue establecer un precultivo para poder realizar una *mini-prep*. Con esta finalidad, se seleccionó y se recogió una colonia de la placa de agar con la ayuda de una punta de pipeta. Ésta se depositó en el interior de un tubo de 50 mL que contenía 6 mL de medio de cultivo LB y 6  $\mu$ L de kanamicina 33  $\mu$ g/mL. El precultivo se incubó durante toda la noche en la cámara de 37 °C.

Por último, se procedió a realizar la *Mini-prep* para extraer el DNA plasmídico. Para hacer la extracción se empleó el kit *QuickGene Plasmid Kit S II* (*LifeScience*). Al finalizar la extracción se midió la concentración de la muestra con el *NanoDrop*<sup>®</sup> ND-1000 *Spectrophotometer* utilizando 2  $\mu$ L y se envió una parte de la muestra (10  $\mu$ L de proteína + 10  $\mu$ L de agua *MiliQ*) al Servicio de secuenciación y análisis de DNA del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV). El resto de la misma se guardó a -20 °C.

Cuando se recibieron los resultados de la secuenciación se analizaron los datos con el programa ApE y las conclusiones extraídas ya han sido mencionadas en el apartado anterior.

Para poder iniciar el proceso de sobreexpresión y de purificación había que volver a transformar bacterias. Pero en este caso se utilizó la cepa *BL21-C+ (DE3)-RIPL* (*Stratagene*<sup>®</sup>) que permite una expresión elevada de proteínas recombinantes heterólogas.

La transformación se realizó de la misma forma que para realizar la *Mini-prep* pero con una diferencia: el tiempo en el que se realiza el choque térmico que para esta cepa es de 45 a 50 segundos a 42 °C. Tras inocular e incubar el precultivo, se preparó un glicerinado utilizando las células del precultivo. Primero, se centrifugaron las células para precipitarlas a 3300g durante 10 minutos con una centrífuga *miniSpin* (*Eppendorf*). En segundo lugar, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 2 mL de LB con glicerol



15% para re-suspenderlas. Finalmente, se transfirió la muestra a un tubo con rosca especial para poder congelarla a -80 °C.

### 3.1.1.2. Sobreexpresión mediante inducción por *IPTG*

Un método para conseguir una sobreexpresión de la construcción deseada es mediante el uso del inductor *IPTG* (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido). Este inductor es un análogo de la alolactosa que induce la transcripción del operón *lac* en bacterias y, por consiguiente, la expresión de la proteína recombinante de interés.

En primer lugar se inoculó un cultivo de 50 mL de medio LB con 50  $\mu$ L de kanamicina 33  $\mu$ g/mL con el glicerinado de *UTS-115*. Estos precultivos se incubaron a 37 °C en agitación a 180 rpm durante toda la noche.

A la mañana siguiente, se inoculó un 1 L de medio LB (*Pronadisa*<sup>®</sup>) con 100  $\mu$ L de kanamicina 33  $\mu$ g/mL por cada precultivo y se dejaron incubando a 37 °C en agitación a 180 rpm hasta que alcanzaron una densidad óptica a 600 nm ( $OD_{600}$ ) de 0,6. Entonces, se añadió 1 mL de 1 mM de *IPTG* para inducir la sobreexpresión y se incubó a 30 °C en agitación a 180 rpm durante 4 horas.

Posteriormente, se centrifugaron los cultivos en la centrífuga *Beckman coulter J6-HC*, con el rotor *JS-4.2A* a 4000 rpm y 4 °C durante 30 minutos. A continuación, se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron las células con 45 mL de PBS 1X ( $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  80 mM,  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4) y se centrifugaron las células en la centrífuga *Sorvall ST16R*, con el rotor *75003629* a 4000 rpm y 4 °C durante 20 minutos. Finalmente, se descartó el sobrenadante y el pellet se congeló a -80 °C.

La concentración de la proteína mediante este proceso no fue la deseada como se explica en el apartado de resultados, por lo que se cambió de técnica para la sobreexpresión. La técnica empleada fue la que se describe en el apartado siguiente.

### 3.1.1.3. Sobreexpresión mediante autoinducción

En general, con esta técnica se obtiene una mayor cantidad de células bacterianas que con la inducción con *IPTG*.

Para comenzar se inoculó un cultivo de 10 mL (9,3 mL de ZY, 10  $\mu$ L de 1M  $MgSO_4$ , 200  $\mu$ L de 40% glucosa, 500  $\mu$ L de 20X NPS, 10  $\mu$ L de kanamicina 33  $\mu$ g/mL). Estos precultivos se incubaron a 37 °C en agitación a 180 rpm durante toda la noche.

Al día siguiente, se inoculó 1 L de medio de cultivo (925 mL de ZY, 1 mL  $MgSO_4$ , 20 mL 5052, 50 mL NPS y 1 mL de antibiótico) con los 10 mL del precultivo y se incubó hasta que se alcanzó una densidad óptica a 600 nm ( $OD_{600}$ ) entre 0,8 y 1. Una vez alcanzada dicha  $OD_{600}$ , se redujo la temperatura del incubador a 20 °C y los cultivos se incubaron a 250 rpm hasta el día siguiente, permitiendo de esta forma la sobreexpresión de la proteína recombinante.

Después del periodo de incubación, se centrifugó en la centrífuga *Beckman coulter J6-HC*, con el rotor *JS-4.2A* a 3500-3700 rpm y a 4 °C durante 40 min. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron con 30 mL de 1X PBS. Después, las células se volvieron a centrifugar en la centrífuga *Sorvall ST16R*, con el rotor *75003629* a 4000 rpm y 4 °C durante 30 minutos. Finalmente, se descartó el sobrenadante y el pellet se congeló a -80 °C.

Una vez realizada la sobreexpresión de la proteína fue el momento de proceder a la purificación de la misma para obtenerla lo más pura posible, es decir, sin otras proteínas que puedan interferir en los ensayos de interacción posteriores.

#### 3.1.1.4. Purificación mediante cromatografía de interacción hidrofóbica

Este tipo de purificación era uno de los más utilizados anteriormente a la aparición de las *tags*. Se basa en una técnica cromatográfica de interacción hidrofóbica en la que las proteínas se separan en función de su hidrofobicidad superficial. Las proteínas presentes en una solución altamente salina se adsorben a la superficie débilmente hidrofóbica de la resina y posteriormente, eluyen al utilizar un gradiente salino negativo.

En primer lugar, se procedió a resuspender el pellet congelado tras la sobreexpresión utilizando 30 mL del *buffer* de lisis (100mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl y 1 mM EDTA) para poder realizar la sonicación. El precipitado disuelto se sonicó durante 15 minutos, con el sonicador *Bioblock scientific Vibra Cell 75042* a modo 1 segundo ON-1 segundo OFF con un 25% de amplitud. El sonicado se colocó en tubos de centrifugación y se centrifugó a 16000g a 4 °C durante 40 minutos empleando el equipo *Sorvall RC 5B Plus (Thermo Scientific)* con el rotor *SS-34*.

El sobrenadante obtenido se hizo pasar por el interior de un filtro de jeringa de 0,45  $\mu$ M de diámetro. A continuación, se añadió sulfato amónico para obtener un porcentaje de éste igual al 50% del peso/volumen del sobrenadante. Tras la adición del sulfato amónico, se mantuvo la muestra durante 15 minutos a 4 °C porque la adición del sulfato desencadena una reacción exotérmica y se centrifugó a 13000g y 4 °C durante 15 minutos utilizando el mismo equipo que en la centrifugación anterior.

Al sobrenadante resultante se le añadió el sulfato amónico necesario para pasar de un 50% de peso/volumen a un 70% de peso/volumen. Para hacer este cálculo, se empleó la tabla de precipitación del sulfato amónico. Una vez añadido, se dejó incubando 15 minutos a 4 °C. Luego, se centrifugó a 13000g y 4 °C durante 15 minutos.

Se hizo atravesar el sobrenadante por un filtro de jeringa idéntico al utilizado anteriormente y se cargó en una columna de interacción hidrofóbica *HiTrap Phenyl FF (high sub) (GE Healthcare)* de 5 mL de volumen. Esta columna se equilibró previamente con 5 volúmenes de columna de tampón A (50% de sulfato amónico con 100 mM Tris pH 7,5 y 1 mM EDTA). Para eluir el contenido de la columna, se realizó un gradiente lineal de sulfato amónico (50%-0%) y se recogieron fracciones de 5 mL. En este paso se empleó el equipo *Äkta Purifier (GE Healthcare)*, el cual se acondicionó previamente para el análisis mediante el lavado de las bombas y el sistema con agua *MiliQ* (se utilizó un programa de lavado del sistema), en primer lugar, y con las soluciones tampón A y B (100 mM Tris pH 7,5 y 1 mM EDTA), en segundo lugar. Para comprobar en qué fracción se encontraba la proteína recombinante se corrió un gel de poliacrilamida al 15% y se concentraron las fracciones que la contenían con un concentrador *Amicon® Ultracel 3K*. Para medir la concentración de la proteína, se realizó una medición empleando el reactivo *Bradford (Biorad® Protein assay dye reagent concentrate)* y se extrapoló la concentración por medio de una curva de calibrado a partir de las medidas de absorbancia de valores conocidos de BSA. Finalmente, se congeló la proteína en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

Tras realizar varios intentos para purificar la proteína de esta construcción y analizando los resultados obtenidos se decidió cambiar de construcción para la expresión del dominio *SH3A*.

### 3.1.2. Construcción *UTS-80*

La construcción *UTS-80* está expresada en una variación del vector *pET-28a* que se ha modificado para poder cortar la proteína con la proteasa *PreScission Protease* en el extremo *N-terminal*. Este vector confiere resistencia a la kanamicina. La secuencia del dominio *SH3A* se encuentra clonada entre los sitios de corte de las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*.

Esta construcción presenta una cola de 6 His en el extremo N-terminal que facilitará la purificación que está descrita en los siguientes apartados. La figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos resultante tras la traducción de la secuencia de nucleótidos de esta construcción.

```
16012_UTS_80_T7prom_D09_073.seq
C:/Users/i-uts/Downloads/16012_UTS_80_T7prom_D09_073.seq
From 10 to 252.
Translation 80 a.a. MW=9202.359999999999

MGSSHHHHHSSGLEVLFGQ
PHMVEAIVEFDYQAQHDEL
TISVGEIITNIRKEDGGWWE
GQINGRRGLFPDNFVREIKK
*
```

**Figura 8. Traducción de la secuencia de la construcción *UTS-80*.** Esta secuencia es el resultado del procesado de los datos recibidos del Servicio de secuenciación y análisis de DNA del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV) utilizando el software informático ApE v.1.13 que permite obtener la *ORF (Open Reading frame)* y mostrar cual es el resultado de la traducción de la misma.

*UTS-80* tiene 22 residuos más que el dominio *SH3A in vivo* pero estos residuos se pueden reducir sólo a 3 tras el corte proteolítico mediante una proteasa. Para conocer estos datos, se alinearon la secuencia de la figura 8 con la secuencia del dominio *SH3A* depositada en *UniProt* (Q96B97[1-58]).

A continuación se describen las diferentes técnicas empleadas para la obtención de la proteína codificada en la construcción *UTS-80*. Estos procedimientos son idénticos a los descritos para la construcción *UTS-115* a excepción del proceso de purificación.

#### 3.1.2.1. Transformación de *Escherichia coli* y *Mini-prep*

Se transformaron primero bacterias de la cepa DH5 $\alpha$  para realizar la *Mini-prep* y enviar parte de la muestra a secuenciar y después bacterias de la cepa *BL21C+ (DE3)-RIPL (Stratagene®)* para la sobreexpresión de la construcción. Los métodos en este apartado son los mismos que en el 3.1.1.1.

### 3.1.2.2. Sobreexpresión mediante autoinducción

Para la sobreexpresión de esta construcción sólo se realizó la técnica de autoinducción debido al bajo rendimiento de expresión mediante inducción por *IPTG* obtenido para la otra construcción. Los pasos seguidos en este apartado son los mismos que en el 3.1.1.3.

### 3.1.2.3. Purificación de *UTS-80*

La purificación de la construcción *UTS-80* se puede dividir en tres pasos diferentes. El primero consistió en purificar la proteína mediante el uso de una *chelating column* cargada con níquel, el segundo fue la digestión de la proteína para eliminar la cola de histidinas y la eliminación de la proteasa a través de una columna de GST y en el tercer paso se realizó una cromatografía de exclusión molecular.

#### 1) Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC)

Esta técnica cromatográfica está basada en las interacciones específicas que se producen entre un ligando químicamente inmovilizado en un soporte sólido y una etiqueta o *tag* que está presente en la proteína recombinante que se quiere purificar. Una de las etiquetas más empleadas para este propósito es la etiqueta de 6 histidinas debido a su pequeño tamaño y a que no altera la conformación de la estructura de la proteína. Además, esta *tag* se une fuertemente con el níquel del interior de la columna.

En primer lugar, se procedió a resuspender el pellet congelado tras la sobreexpresión utilizando 30 mL del *buffer* de lisis (100mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl y 1 mM EDTA) para poder realizar la sonicación. El precipitado disuelto se sonicó durante 15 minutos, con el sonicador *Bioblock scientific Vibra Cell 75042* a modo 1 segundo ON-1 segundo OFF con un 25% de amplitud. El sonicado se colocó en tubos de centrifugación y se centrifugó a 16000g a 4 °C durante 40 minutos empleando un equipo *Sorvall RC 5B Plus (Thermo Scientific)* con el rotor *SS-34*.

El sobrenadante obtenido se hizo pasar por el interior de un filtro de jeringa de 0,45 µm de diámetro y se pasó a cargar la muestra en una columna *HisTrap HP (GE Healthcare®)*. Previamente, se equilibró la columna con un lavado con agua *MiliQ* y posteriormente con uno de tampón A (100 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl). El volumen utilizado para el lavado fue de 6 volúmenes de columna en ambos casos.

Tras cargar la columna con la muestra, la columna de níquel se colocó en el *Äkta Purifier*, el cual se acondicionó previamente para realizar correctamente el análisis mediante el lavado de las dos bombas y el sistema, primero, con agua *MiliQ* y después con el tampón A y el tampón B (100 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl y 0,5 M Imidazol).

En primer lugar, se lavó la columna sólo con el tampón A para eliminar todas aquellas proteínas que no se hubieran unido al níquel. Tras este paso, se comenzó a eluir el contenido de la columna aplicando un gradiente ascendente del tampón B (0% - 100%) recogiendo fracciones de 5 mL. El Imidazol compete por los sitios de unión al níquel con la etiqueta que tiene la proteína de interés. Una vez finalizada la elución, se corrió un gel de poliacrilamida del 15% para averiguar en qué fracciones coincidentes con los picos que aparecían en el cromatograma se encontraba la proteína.

Seguidamente, las fracciones que contenían la proteína fueron depositadas en un concentrador *Amicon® Ultracel 3K*, el cual fue centrifugado en la centrifuga *Sorvall*

*ST16R* hasta llegar a tener un volumen cercano a 1 mL. Se midió la concentración de la proteína mediante un ensayo con Bradford e interpolando la absorbancia obtenida con la recta de calibrado.

## 2) Cromatografía de afinidad utilizando una columna de *GST* (*Glutathione S-transferase*)

El siguiente paso fue la digestión de la proteína recombinante para de esta forma cortar la cola de 6 histidinas y que la proteína sea lo más semejante posible a la realidad. En este caso, la proteasa que se utilizó fue la proteasa *HRV3C* (*Human Rhinovirus 3C*) o también conocida como *PreScission Protease* o *PSP*. Esta proteasa corta específicamente en la secuencia LEVLFQ/GP. Previamente se purificó la proteasa y se congelaron alícuotas para utilizarlas posteriormente. Se utilizaron 200  $\mu$ L de *PSP* (2mg/mL) para digerir la muestra. La digestión se realizó a 4 °C durante 5 horas. También se realizó dejando la solución de la proteasa y la proteína durante toda la noche a 4 °C.

A continuación fue el momento de eliminar de la muestra la *PreScission Protease*. Como está proteasa lleva una *tag* de GST, la mejor solución es utilizar una columna de GST. De esta forma, se cargó la muestra en la columna de GST, previamente acondicionada con un primer lavado de agua *MiliQ* (5 volúmenes de columna) y un segundo lavado del tampón A (5 volúmenes de columna). En este caso, la fracción no retenida en la columna es la de interés. Para poder recogerla, se pasaron dos volúmenes de columna del tampón A (no retenido) y se pasó un volumen más de columna para asegurarse de que no se quedara la proteína dentro de la columna (retenido). Se corrió un gel de poliacrilamida al 15% para comprobar que la proteína estaba en la fracción del no retenido. Finalmente, se concentró con otro concentrador Amicon® *Ultracel 3K* hasta llegar a un volumen inferior a 2 mL.

Finalmente, se optó por pasar el concentrado por una columna de exclusión molecular para separar las proteínas que no eran la de interés y que todavía pudieran quedar en el concentrado.

## 3) Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular (*gel filtration*) emplea una resina porosa para permitir la separación de las moléculas en función de su tamaño. De esta forma, se consigue eliminar cualquier contaminante que tenga un peso molecular distinto al de la proteína de interés y, por lo tanto, permitir la obtención de una proteína totalmente pura para poder realizar estudios de interacción y cristalización.

A partir del concentrado obtenido en los pasos anteriores se realizó esta segunda purificación. Para ello, se empleó el sistema *Äkta Prime* que presenta una columna *Superdex 75 16/60* (Amersham *Pharmacia biotech*®). El tampón que fue empleado para este experimento fue el tampón A que ya utilizamos anteriormente.

En primer lugar había que dejar a punto el sistema para poder comenzar con la purificación. Para conseguirlo, el sistema se lavó previamente con 160 mL de agua *MiliQ* en primer lugar y después con 160 mL del tampón A utilizando el programa de lavado del propio aparato. Una vez puesto a punto, se lavó el loop con 10 mL de tampón A y se cargaron los 2 mL de la proteína concentrada. Así pues, se seleccionó el programa de separación de fracciones de 5 mL, con un flujo de 0,1 mL/min. La elución consistió en hacer pasar por la columna 1,5 veces su volumen (180 mL). Se recogieron las

fracciones en las que se observaba un pico en el cromatograma y se corrieron en un gel de poliacrilamida del 15%.

Una vez se comprobaba que fracción es la que contenía la proteína, se procedía a concentrar la muestra con un concentrador Amicon® *Ultracel 3K* hasta un cierto volumen para poder hacer alícuotas. Como en los casos anteriores también se midió la concentración de la proteína concentrada mediante el uso del reactivo Bradford.

Finalmente, se dividió el volumen de la proteína pura y concentrada en alícuotas de 100 µL, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

### 3.2. Dominio *SH3C* de *CIN85*

*UTS-86* fue la construcción elegida para la purificación del dominio *SH3C* de *CIN85*. Este dominio se encuentra entre la posición 267 y la 328 de la proteína *full-length CIN85*, por lo que su longitud es de 62 aminoácidos.

#### 3.2.1. Construcción *UTS-86*

La construcción *UTS-86* está expresada en el vector modificado de *pET-28a* que presenta el gen de resistencia a la kanamicina y la secuencia de corte de la *PreScission Protease*. La secuencia del dominio *SH3C* se encuentra clonada entre los sitios de corte de las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*.

Esta construcción presenta una cola de 6 His en el extremo N-terminal que facilitará la purificación que está descrita en los siguientes apartados. La figura 9 muestra la secuencia de aminoácidos resultante de la traducción de la secuencia de nucleótidos de esta construcción.

```
16052_UTS_86F_T7promoter_B10_078.seq
C:/Users/moisés/Downloads/16052_UTS_86F_T7promoter_B10_078.seq
From 5071 to 5325.
Translation 84 a.a. MW=9526.87

MGSSHHHHHSSGLEVLFGG
PRMASDYCKVIFPYEAQNDD
ELTIKEGDIVTLINKDCIDV
GWVEGELNGRRGVFPDNFVK
LLPP*
```

**Figura 9. Traducción de la secuencia de la construcción *UTS-86*.** Esta secuencia es el resultado del procesado de los datos recibidos del Servicio de secuenciación y análisis de DNA del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV) utilizando el software informático ApE v.1.13 que permite obtener la *ORF (Open Reading frame)* y mostrar cual es el resultado de la traducción de la misma.

*UTS-86* tiene 22 residuos más que el dominio *SH3C in vivo* pero estos residuos se pueden reducir sólo a 2 tras el corte proteolítico mediante una proteasa. Además, presenta tres sustituciones en el comienzo del extremo N-terminal con respecto a este dominio en la proteína *full-length (MAS por KSK)*. Para conocer estos datos, se alinearon la secuencia de la figura 9 con la secuencia del dominio *SH3C* depositada en *UniProt (Q96B97[267-328])*.

A continuación se describen las diferentes técnicas empleadas para la obtención de la proteína codificada en la construcción *UTS-86*. Estos procedimientos son idénticos a los descritos para la construcción *UTS-80*.

### 3.2.1.1. Transformación de *Escherichia coli* y *Mini-prep*

Se transformaron primero bacterias de la cepa DH5α para realizar la *Mini-prep* y enviar parte de la muestra a secuenciar y después bacterias de la cepa *BL21C+ (DE3)-RIPL (Stratagene®)* para la sobreexpresión de la construcción. Los métodos en este apartado son los mismos que en el 3.1.1.1.

### 3.2.1.2. Sobreexpresión mediante autoinducción

Para la sobreexpresión de esta construcción sólo se realizó la técnica de autoinducción porque había dado mejores resultados que la inducción por *IPTG* en el resto de construcciones. Los pasos seguidos en este apartado son los mismos que en el 3.1.1.3.

### 3.2.1.3. Purificación de *UTS-86*

El proceso de purificación de *UTS-86* seguía los mismos pasos que la purificación empleada para la construcción *UTS-80*. En primer lugar, se hizo pasar la muestra por el interior de una columna de níquel, después se digirió la muestra con la misma proteasa, se utilizó una columna de GST para separar la proteína de interés de la proteasa y finalmente se realizó una filtración en gel. El procedimiento está descrito en el apartado 3.1.2.3

## 3.3. Proteína *MUC 1*

La proteína con la se quiso estudiar si había interacción o no era *MUC1*. En la figura 10 se muestra la secuencia de esta proteína:

```
>sp|P15941|MUC1_HUMAN Mucin-1 OS=Homo sapiens GN=MUC1 PE=1 SV=3
MTFGTQSPFFLLLLLLLVLTVVVTGSGHASSTPGGEKETSATQSSVPSSTEKNAVSMITSSV
LSSHSPGSGSSTTQGGQDVTLAPATEPASGSAATWQGQDVTSPVTRPALGSTTTPAHDVTS
AFDNKRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT
APDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT
APDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT
APDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT
APDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT
APDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT
APDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT
APDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT
APDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT
APDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT
APDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT
APDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT
APDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT
APDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT
APDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT
APDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT SAPDTRPAGSTAPPFHGVT
ASGSASGSASTLVHNGTSARATTPASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHSTKTDASSTHHS
SVPPLTSSNHSTSPQLSTGVSTFVFLSFHISNLQFNSSLEDPSTDYQELQRDISEMFLQI
YKGGFLGLSNIKFRFGVVVVQTLAIREGTINVDHDETQFNQYKTEAASRYNLTISDVS
VSDVFFPFSAQSGAGVPGWGIALLLVLCVLAIAIVYLIALAVQCRRKNYGLDIFPAR
DTYHFMSEYPTYHTRGVPPSSTRSPYKRVSAAGNNGSSLSYINPAVAATSANL
```

**Figura 10. Secuencia de la proteína *MUC1* en humanos.** Esta secuencia está extraída de la base de datos de *UniProt*.

Para determinar si los dominio *SH3* de *CIN85* interaccionan con *MUC1* se utilizaron dos péptidos de esta proteína. Estos dos péptidos presentan una secuencia similar (*PXXRP*) a la secuencia atípica de prolina y arginina (*PXXXPR*) característica de







```

A >Imperfect Repeat
AATWGQDVTSVPVTRPALGSTT

>sp|P15941|MUC1_HUMAN Mucin-1 OS=Homo sapiens GN=MUC1 PE=1 SV=3
MTPGTQSPFFLLLLLVLTWVTGSGHASSTPGGEKETSATORSSVPSSTEKNAVSMSTSSV
LSSHSPGSGSSTTQGQDVTLPAPATEPASGSAAATWGQDVTSVPVTRPALGSTT1PPAHQVTS
APDNKPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSP
APDTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSP
APDTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSP
APDTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSP
APDTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSP
APDTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSP
B APDTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSP
APDTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSP
APDTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSP
APDTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSP
APDTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSP
APDTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSP
APDTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSP
APDTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSP
APDTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPPAHGVTSP
ASGSASGSASTLVHNGTSARATTPASKSTPFESIPSHSODPTTLASHSTKTDASSTHHS

```

**Figura 13. Secuencia del péptido *Imperfect Repeat* y región donde se encuentra en la proteína *MUC1*.** A) Esta es la secuencia del péptido que fue facilitado por la *University of Pittsburgh School of Medicine* para comprobar si existe interacción entre algún dominio de *CIN85* y *MUC1*. B) Se muestra la región en la que se encuentra la secuencia del péptido *Imperfect Repeat*.

### 3.4. Estudio de la interacción entre *CIN85* y *MUC1* utilizando el sistema *BLItz*

El sistema *BLItz* (*forteBIO*<sup>®</sup>) permite la cuantificación en tiempo real de analitos en solución, así como la caracterización cinética de las interacciones entre moléculas. Este sistema utiliza una serie de biosensores de diferentes tipos, entre los cuáles está el biosensor de estreptavidina. Éste biosensor se caracteriza por estar recubierto de moléculas de estreptavidina que permite inmovilizar anticuerpos, proteína o ácidos nucleicos que estén biotinilados. Gracias a estos, se pueden hacer estudios para analizar la afinidad y la cinética entre proteínas.

Este sistema se fundamenta en la tecnología conocida como *BLI* (*bio-layer interferometry*). Esta tecnología consiste en la emisión de luz blanca a través del interior del biosensor y en la captura de cualquier tipo de luz que sea reflejada. La longitud de onda de la luz reflejada está relacionada con el grosor de la cubierta del biosensor. Algunas longitudes de onda muestran interferencia constructiva mientras que otras, interferencia destructiva. Esta interferencia es captada por un espectrómetro como una única firma espectral y la presenta en unidades de intensidad relativas (nm). Cualquier cambio en el número de moléculas unidas al biosensor provoca un cambio en el patrón de interferencia que es medido en tiempo real. Este cambio en la longitud de onda es una medida directa del cambio del grosor óptico (nm) de la capa biológica.

El *BLItz* tiene diferentes programas con los que hacer diferente tipo de ensayos. En este caso, se utilizó el módulo de cinética avanzada (*Advanced kinetics*) que permite obtener los siguientes parámetros cinéticos: la constante de asociación ( $k_a$ ), la constante de disociación ( $k_d$ ) y la afinidad de interacción ( $k_D$ ). Este programa está dividido en cinco fases: *initial baseline*, *loading*, *baseline*, *association* y *dissociation*.

La fase de *initial baseline* sirve para realizar una línea base que se utilizará como control para la medición de la siguiente fase. La fase del *loading* es en la cual se une el ligando al biosensor. En la siguiente fase, se vuelve a medir una línea base para asegurar el análisis correcto de las interacciones entre el ligando y el analito. La fase de *association* consiste en la monitorización de la unión del analito con el ligando que se

encuentra en la superficie del biosensor mientras que en la de *dissociation* se monitoriza la disociación del analito con el ligando. El sistema te indica en pantalla los pasos que has de seguir en cada fase.

Para utilizar el *BLItz*, en primer lugar, se hidrataron dos biosensores nuevos de estreptavidina con 200  $\mu\text{L}$  del tampón A durante 10 minutos como mínimo. A continuación, se prepararon las muestras que se utilizarían durante el experimento. Se utilizó una alícuota de *UTS-80* y los péptidos biotinilados: *VNTR* e *IR* de la proteína *MUC1* que previamente se habían hidratado con tampón A. Los péptidos estaban a una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La figura 14 muestra la configuración del programa que se empleó para la realización del ensayo de afinidad.

	Step Type	Duration (s)	Position
1	Initial Baseline	30	Tube
2	Loading	120	Drop
3	Baseline	30	Tube
4	Association	120	Drop
5	Dissociation	120	Tube

Add Step

Remove Step

Move Up

Move Down

Reset

Run duration:  
> 07:00

**Figura 14. Configuración empleada para llevar a cabo el ensayo de afinidad entre la proteína *UTS-80* y los péptidos *VNTR* e *IR*.** El orden de las fases con su respectiva duración en segundos e indicando el recipiente en el que se realiza el ensayo en cada fase: en un tubo o en el *drop holder* (4  $\mu\text{L}$ ). Captura de pantalla del programa del sistema *BLItz*.

Una vez finalizado el ensayo, se regeneraron los biosensores de la siguiente manera: 10 segundos en agua *MiliQ*, 20 segundos en 0,5M NaOH, 10 segundos en agua *MiliQ* y 5 segundos en 15% de sacarosa en PBS. Finalmente, se secaron los biosensores a temperatura ambiente durante 5 minutos.

### 3.5. Estudio de la interacción entre *CIN85* y *MUC1* empleando *Isothermal Titration Calorimetry (ITC)*

La caracterización termodinámica de un sistema aporta información muy importante sobre la estabilidad, especificidad y la estequiometría de los sistemas que están interactuando. El método elegido para la medida directa de la energética de las interacciones de las proteínas con sus ligandos es la calorimetría isoterma de titulación (en inglés, *Isothermal Titration Calorimetry*). El uso de *ITC* para medir la unión de una macromolécula a su ligando se basa en el *heat effect* provocado por dicha interacción. El calor absorbido (cambio endotérmico) o liberado (cambio exotérmico) después de la interacción ( $Q$ ) es utilizado para obtener información sobre la constante de asociación ( $k_a$ ) y la entalpía de unión ( $\Delta H$ ). La principal ventaja de este sistema es que bajo las condiciones apropiadas con un solo experimento se pueden hallar ambos parámetros. Además permite hallar la estequiometría ( $n$ ), la entropía ( $\Delta S$ ) y la constante de disociación ( $K_d$ ). (Vogel, 2002)

Para realizar los ensayos se ha empleado el equipo *Nano ITC (TA Instruments®)* que se basa en el mantenimiento de la temperatura constante (isoterma) de la celda donde se pone la muestra y la de referencia. Si la interacción entre la proteína y el

ligando es endotérmica, el instrumento aplicará calor para poder mantener la temperatura constante y si es el caso contrario, reacción exotérmica, el instrumento enfriará la muestra con el mismo propósito. Estos cambios de temperatura y la aplicación de calor o frío son los que permiten el cálculo de los parámetros termodinámicos vistos en el párrafo anterior.

Antes de utilizar el equipo, se cambió el tampón en el que estaban contenidas las muestras porque no se recomienda el uso del tampón *TRIS* para realizar un ensayo mediante *ITC*. De esta forma, se asegura que el cálculo de la entalpía sea el correcto. Se utilizó el tampón *HEPES* que presenta una entalpía de ionización baja. El tampón para los ensayos en el *ITC* consistía en 50 mM de *HEPES* y 100 mM *NaCl*. Para poder cambiar el tampón, se realizaron varios pasos de concentración y de dilución con el concentrador Amicon® *Ultracel 3K*. Se añadía el *buffer* nuevo y se concentraba para eliminar el que contenía el *TRIS*. Se emplearon 50 mL de este tampón para asegurar que la proteína estaba diluida al completo en él.

Para poder utilizar el *Nano ITC* primero había que acondicionar el instrumento. Se lavó la celda donde se colocó la muestra con agua *MiliQ* primero y después con *buffer* (50 mM *HEPES* y 100mM *NaCl*). La celda de referencia se llenó con 250  $\mu$ L de agua *MiliQ* y en la otra celda se añadieron 250  $\mu$ L de la construcción que se quería emplear. Para inyectar el péptido en la celda se utilizó una bureta que tenía una jeringa en la que se cargaron 50  $\mu$ L de uno de los péptidos. Las muestras se habían desgasificado anteriormente gracias al uso de una estación desgasificadora 6326 (*TA Instruments*®).

El sistema se programó para que se realizaran 21 inyecciones de 1,96  $\mu$ L cada una, excepto la primera que era de 0,95  $\mu$ L. La temperatura del sistema se ajustó a 20 °C y los resultados se analizaron a través del software NanoAnalyze v3.6 (*TA Instruments*®).

## 4. Resultados y discusión

Se realizaron entre dos y tres purificaciones por construcción, por lo que los resultados presentados a continuación son los característicos de una purificación estándar para cada una de las diferentes construcciones.

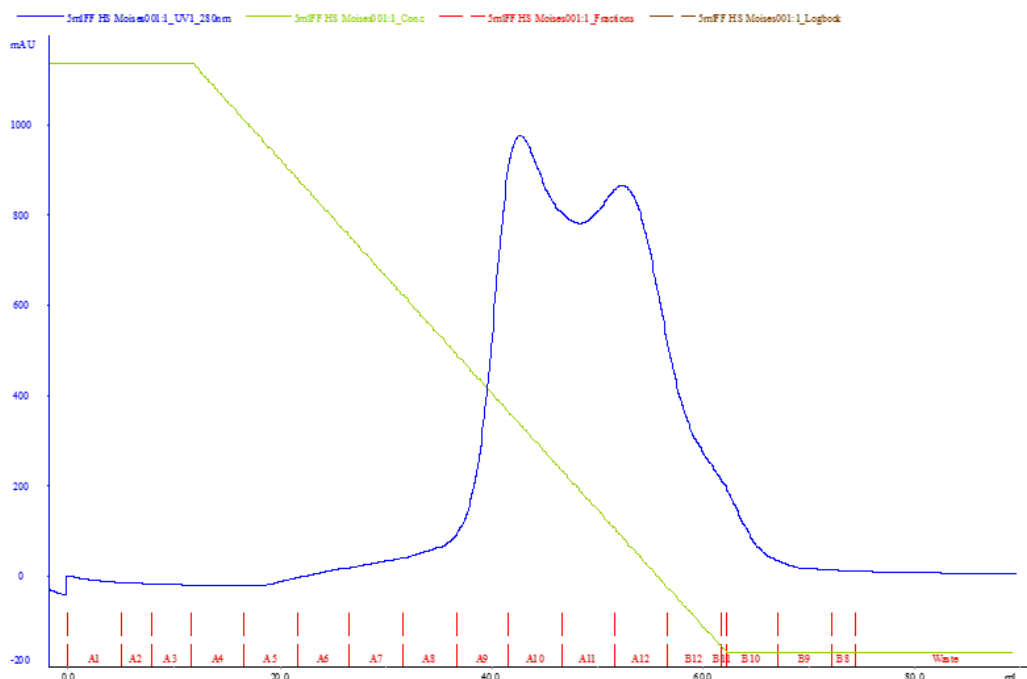
### 4.1. Purificación de la construcción *UTS-115*

Esta construcción es idéntica al dominio *SH3A* de *CIN85*. Está formada por 58 aminoácidos y tiene un peso molecular de 6764,55 Da.

Tras la sobreexpresión por inducción con *IPTG* de esta construcción descrita en el apartado 3.1.1.2, se procedió a la purificación de la misma. Para ello, se hizo pasar el lisado celular con el porcentaje adecuado de sulfato amónico por una columna HiTrap Phenyl FF (high sub) y se colocó ésta en el sistema *Äkta Purifier*.

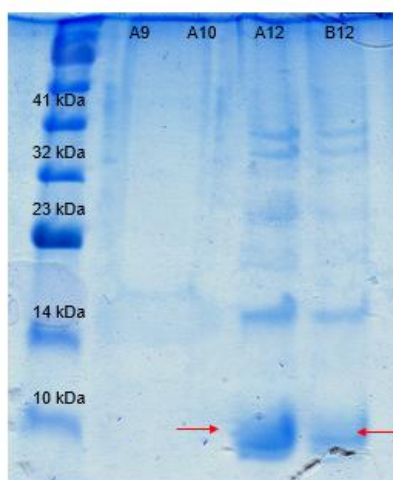
El cromatograma obtenido en el *Äkta Purifier* para esta construcción se muestra en la figura 15. Primero se hizo un lavado durante las 4 primeras fracciones y a continuación se realizó un gradiente descendiente. El primer pico del cromatograma empezó a aparecer al 51,2% del tampón B y tiene su máximo al 36,7% del tampón B.

Mientras que el segundo pico tiene su máximo al 19,6% del tampón B. Las fracciones del primer pico eran: la A9, la A10, la A11 y las del segundo pico: la A12, la B12 y la B11.



**Figura 15. Cromatograma de la purificación de la construcción *UTS-115* mediante el uso del *Äkta Purifier*.** En rojo se pueden apreciar las fracciones de 5 mL que fueron recogidas durante el proceso. La línea de color azul representa la absorbancia a 280 nm y la de color verde el gradiente del tampón B utilizado para la realización de la purificación.

Las fracciones A9, A10, A12 y B12 se cargaron en un gel de poliacrilamida al 15% para confirmar que pico de los dos era el que correspondía con el de la proteína y se inició la electroforesis. La banda correspondiente a la proteína (peso cercano a 7 kDa) apareció por debajo de la banda de 10 kDa del marcador molecular y es la que se marca con la flecha roja en la figura 16.



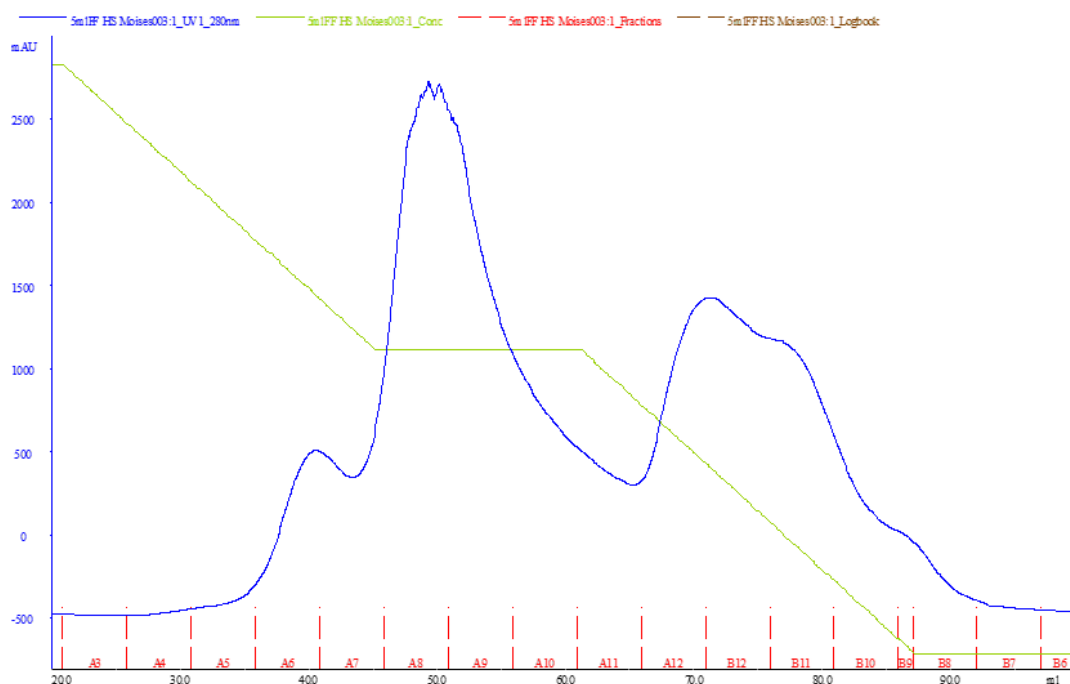
**Figura 16. Gel de poliacrilamida al 15% de las fracciones obtenidas en la purificación de *UTS-115* utilizando la columna *HiTrap Phenyl FF (high sub)*. Se**

cargaron las fracciones A9, A10, A12 y B12. La flecha roja indica la banda característica de la construcción *UTS-115*.

Una vez se sabía que fracciones contenían la proteína de interés, que eran las fracciones A12 y B12, se concentraron y luego se midió la concentración mediante un ensayo con Bradford. La concentración resultante tras la purificación fue aproximadamente de 2 mg/mL que era menor que la que habían obtenido en otros experimentos realizados en el laboratorio. Para tratar de aumentar la cantidad de proteína producida por purificación, se eligió otra técnica de sobreexpresión: la autoinducción (3.1.1.3).

Analizando el cromatograma de la figura 15 se decidió que en la próxima purificación se intentaría separar más el primer pico del segundo que es el que contiene la proteína. De esta forma, se conseguirían eliminar más contaminantes para que no pudieran interferir en los ensayos posteriores.

La figura 17 presenta el cromatograma obtenido en el siguiente intento de purificación de la construcción *UTS-115* intentando separar los dos picos. Para poder separar los dos picos se hizo un *hold* manual, es decir, mantener la concentración del gradiente del tampón B durante un tiempo prolongado. Así, se consigue que todas las proteínas que eluyen a esa concentración queden recogidas en las fracciones anteriores a las que contienen la proteína deseada que eluye a una concentración menor de tampón B.



**Figura 17. Cromatograma de la purificación de la construcción *UTS-115* mediante el uso del *Äkta Purifier*.** En este caso se realizó un *hold* cuando la concentración del tampón B era del 51,6% y se pueden observar tres picos en el cromatograma. En rojo están las fracciones recogidas, en azul la absorbancia a 280 nm y en verde el gradiente del tampón B.

Tras la purificación se concentraron las fracciones A8, A9, A10 y A11 por un lado y después la A12, B12, B11 y B10 por otro lado para comprobar en qué grupo de fracciones se encontraba la construcción de interés. Y con una muestra de cada grupo de fracciones se corrió un gel de poliacrilamida al 15% que se puede ver en la figura 18.



**Figura 18. Gel de poliacrilamida al 15% de las fracciones obtenidas en la purificación de *UTS-115* utilizando la columna *HiTrap Phenyl FF (high sub)* tras aplicar un *hold*. Se cargaron los concentrados de las fracciones A8-A11 y A12-B10. La flecha roja indica la banda característica de la construcción *UTS-115*.**

Ambos grupos de fracciones presentaban la banda de *UTS-115* pero no con el grosor e intensidad esperados. Lo lógico sería esperar que las bandas de la proteína fueran gruesas e intensas, ya que se había realizado una concentración previa a la electroforesis. Para saber cuál podía ser la razón de este resultado imprevisto, se midió la concentración de ambos grupos de fracciones mediante el *NanoDrop* que es más sensible que la medición con un ensayo Bradford. Se cargaron 2  $\mu$ L de muestra y 2  $\mu$ L de cloruro de guanidinio 6M. Las concentraciones obtenidas eran superiores a las obtenidas anteriormente: la del grupo A8-A10 era 6,32 mg/mL y la del grupo A12-B10 era 12,67 mg/mL. En cuanto a la calidad de las muestras, la absorbancia a 260 nm era muy elevada indicando que las muestras estaban contaminadas con DNA. Para el grupo de fracciones A8-A11 el valor era de 11,167 mientras que para el grupo de A12-B10 era 12,671. Esta contaminación con el DNA bacteriano pudo ser debida a que en las centrifugaciones previas a cargar la columna *Phenyl FF* no se consiguiera separar correctamente el DNA de las proteínas.

Los problemas durante el desarrollo de esta parte del trabajo fueron: en la primera purificación, la concentración obtenida de la proteína era baja y en la segunda, la presencia de DNA bacteriano contaminando las muestras. Además, el objetivo de separar los dos picos del cromatograma para reducir el número de contaminantes se cumplió parcialmente. Sí que se consiguió separar más los dos picos pero la proteína eluyó tanto en fracciones del primer como del segundo pico. Esto supuso una pérdida de proteína porque sólo se podría utilizar la muestra del segundo pico que es la que presenta una menor cantidad de contaminantes.

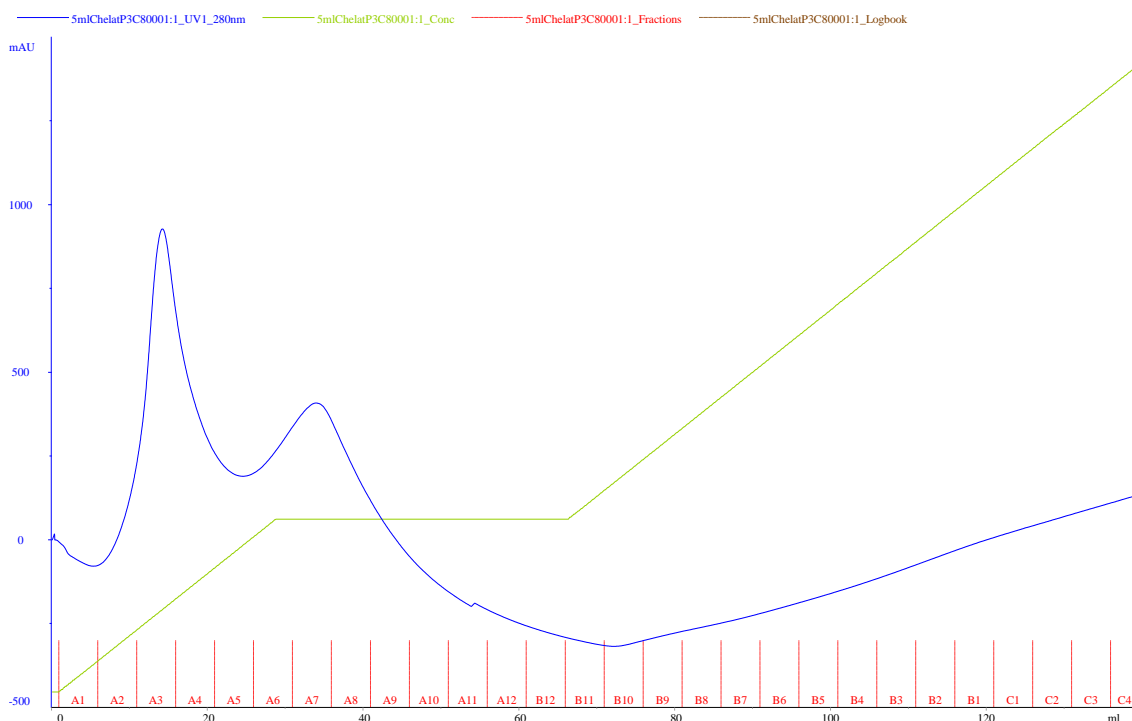
Tras realizar una reflexión sobre los resultados obtenidos a lo largo de los ensayos para purificar esta construcción y del tiempo que se necesita para realizar este tipo de purificación, se decidió optar por la purificación de otra construcción que sí que tuviera una etiqueta para facilitar este proceso y como sistema de sobreexpresión, se empleó sólo la autoinducción.

## 4.2. Purificación de la construcción *UTS-80*

La construcción *UTS-80* presenta una cola de 6 histidinas pero tras la digestión con la proteasa *PSP* la longitud de la proteína obtenida es de 61 aminoácidos (tres más que el dominio *SH3A* de *CIN85*) y su peso molecular es de 7055,86 Da.

Una vez realizada la sobreexpresión y sonificado de las células, se inició el proceso de purificación de la proteína de interés siguiendo lo descrito en material y métodos. El lisado se cargó en la columna quelante cargada con níquel y se preparó el sistema *Äkta Purifier* para eluir la muestra.

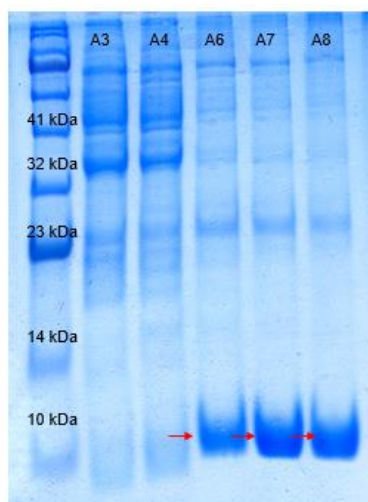
La figura 19 muestra el cromatograma que se obtuvo tras la primera purificación mediante el *Äkta*. Durante el gradiente ascendente de Imidazol aparecieron dos picos, un primer pico que fue recogido por las fracciones A3 y A4 y un segundo pico por las fracciones A6, A7 y A8. Se realizó un *hold* al 27% del *buffer* B para conseguir separar al máximo los dos picos y así, recuperar el máximo de proteína. La pendiente de subida tras el segundo pico es el resultado del aumento de la concentración de Imidazol.



**Figura 19. Cromatograma de la purificación de la construcción *UTS-80* mediante el uso del *Äkta Purifier*.** Las líneas rojas indican las fracciones de 5 mL que fueron recogidas durante el proceso, la línea de color azul representa la absorbancia a 280 nm y la de color verde el gradiente del tampón B utilizado para la realización de la purificación.

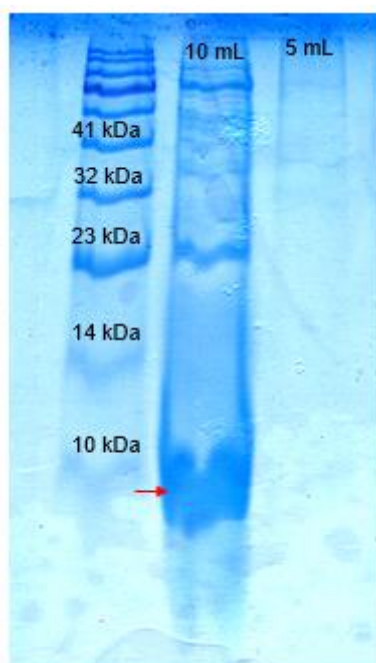
A continuación se cargaron las fracciones A3, A4, A6, A7 y A8 en un gel de poliacrilamida al 15% y se realizó la electroforesis. El gel resultante es el de la figura 20. La proteína de interés eluyó en las fracciones A6, A7 y A8 y por lo tanto el segundo pico del cromatograma corresponde con el de la proteína. Este pico aparece al 37% del tampón B y termina al 72% de B.





**Figura 20. Gel de poliacrilamida al 15% de las fracciones obtenidas en la purificación de *UTS-80* utilizando la columna de níquel.** Como indican las flechas rojas, las fracciones en las que eluyó la proteína fueron la A6, la A7 y la A8.

Se concentraron las fracciones A6, A7, A8, A9 y A10 hasta llegar a un volumen inferior a 2mL para poder realizar la digestión de la muestra. Después de esta, se cargó la muestra en una columna de *GST* para separar la proteasa de la proteína *UTS-80*. Se hicieron pasar 10 mL del buffer A y se recogieron en un tubo. Además se pasaron 5 mL más para asegurarse de que no quedaba proteína en el interior de la columna. Para comprobar que se había recuperado toda la proteína de la columna se cargó un gel de poliacrilamida al 15% con una muestra de los primeros 10 mL y otra muestra de los 5 mL adicionales. El gel resultante es el que se muestra en la figura 21.



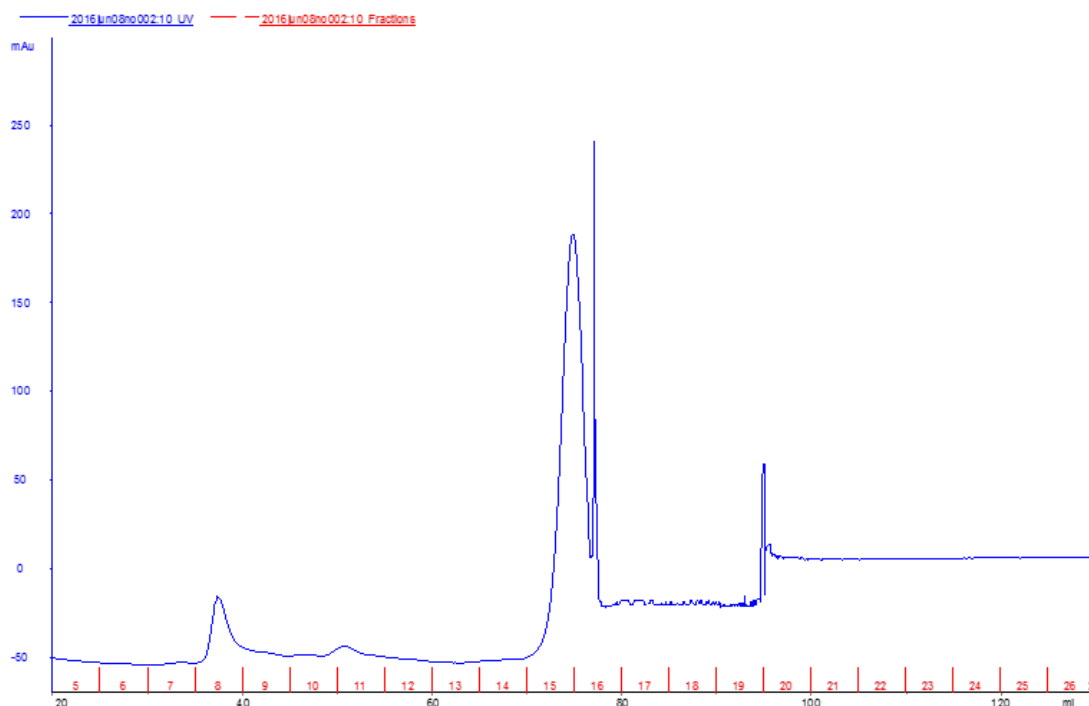
**Figura 21. Gel de poliacrilamida al 15% de la purificación de *UTS-80* en la columna de *GST*.** El segundo carril (10 mL) corresponde a los 10 mL de tampón A que se pasaron por la columna para recuperar la proteína ya que está no queda retenida en su interior mientras que el tercer carril (5 mL) corresponde a los 5 mL que se utilizaron para



asegurar que toda la proteína estuviera ya fuera de la columna. La flecha roja indica la presencia de la banda de la proteína *UTS-80*.

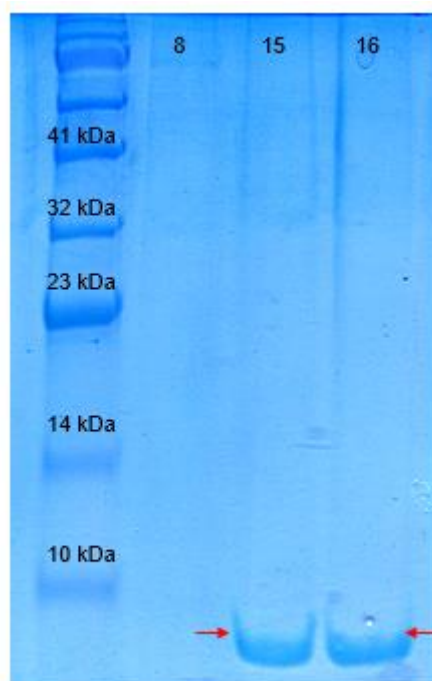
Posteriormente, se concentraron esos 10 mL hasta llegar a un volumen inferior a 2 mL para poder inyectar la muestra en el *Äkta Prime* y realizar de esta forma la cromatografía de exclusión molecular.

La figura 22 es el cromatograma obtenido como resultado de la purificación utilizando el *Äkta Prime*. Se pueden observar la presencia de dos picos, uno en la fracción 8 y el otro en las fracciones 15 y 16. A la derecha del segundo pico, se puede visualizar que tuvo lugar un problema mientras se realizaba la purificación, seguramente debido a la presencia de alguna burbuja en la columna, pero que no tuvo ninguna repercusión en la obtención de la proteína.



**Figura 22. Cromatograma de la purificación de la construcción *UTS-80* mediante el uso del *Äkta Prime*.** En rojo se indican las fracciones que fueron recogidas y en azul la absorbancia a 280 nm.

Para averiguar en qué fracciones eluyó la proteína se preparó un gel de poliacrilamida al 15% en el que se cargaron una muestra de la fracción 8, de la 15 y de la 16. La figura 23 muestra el gel resultante de la electroforesis realizada.



**Figura 23. Gel de poliacrilamida al 15% de las fracciones de la *gel filtration* utilizando el *Äkta Prime* para la purificación de la construcción *UTS-80*. Se cargaron las fracciones 8, 15 y 16. Las flechas rojas indican la banda que corresponde con la construcción de interés.**

Como la proteína se encontraba en las fracciones 15 y 16, se concentró el volumen de ambas, se midió la concentración con Bradford y se prepararon alícuotas de 100  $\mu$ L. La concentración de la proteína en la muestra era de 5 mg/mL.

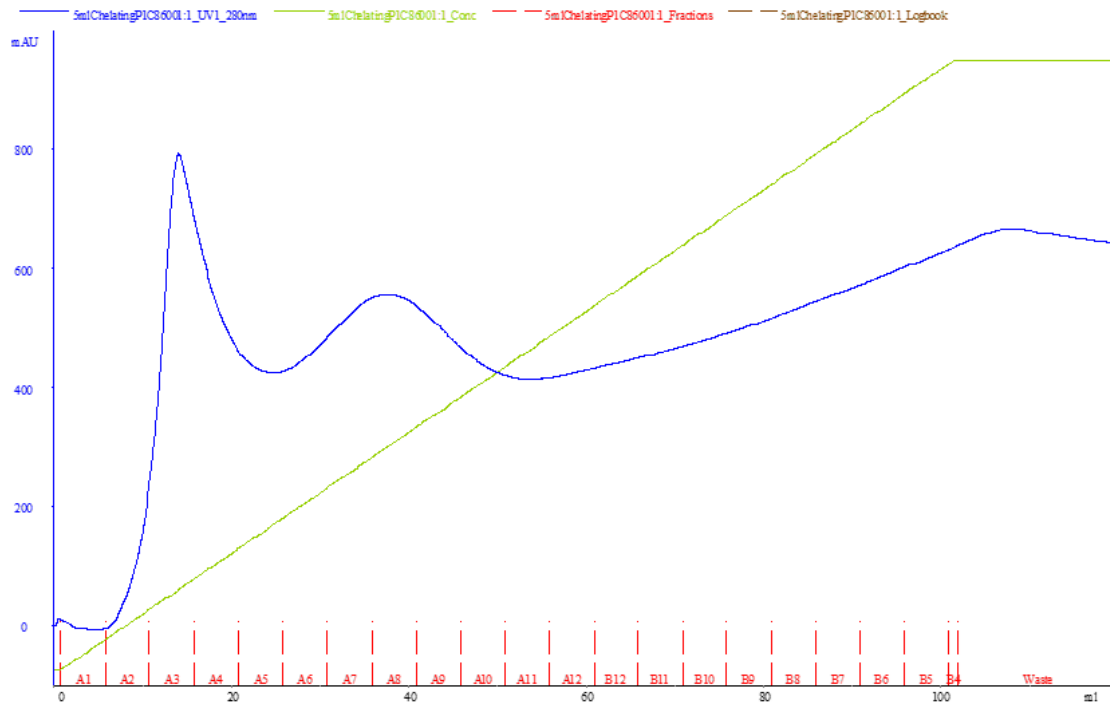
La cantidad de proteína obtenida durante el desarrollo de esta purificación fue la suficiente para poder realizar los ensayos de interacción posteriores tanto mediante la interferometría de bio-capa como mediante calorimetría isoterma de titulación.

### 4.3. Purificación de la construcción *UTS-86*

La construcción *UTS-86* presenta una cola de 6 histidinas pero tras la digestión con la proteasa *PSP* la longitud de la proteína obtenida es de 65 aminoácidos (tres más que el dominio *SH3C* de *CIN85*) y su peso molecular es de 7380,35 Da.

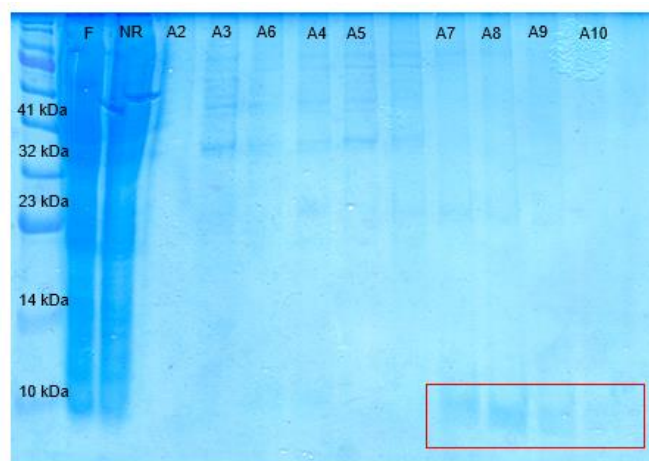
Para realizar la purificación de esta construcción, el lisado se cargó en la columna quelante con níquel y se preparó el sistema *Äkta Purifier* para eluir la muestra.

En la figura 24 se puede apreciar el cromatograma que se obtuvo en la purificación de *UTS-86* mediante el uso del sistema *Äkta*. Se pueden visualizar dos picos uno que fue recogido por las fracciones A2, A3 y A4 y el otro por las fracciones A5, A6, A7, A8, A9 y A10. La subida posterior es a causa del aumento de la concentración de Imidazol.



**Figura 24. Cromatograma de la purificación de la construcción *UTS-86* mediante el uso del *Äkta Purifier*.** En color rojo se marcan las fracciones de 5 mL que fueron recogidas a lo largo del proceso, la línea de color azul corresponde a la absorbancia a 280 nm y la línea verde representa el gradiente ascendente de la concentración del *buffer B*.

El paso siguiente fue comprobar a que pico corresponde la elución de la proteína deseada. Con este propósito, se preparó un gel de poliacrilamida al 15% donde se cargaron las diferentes fracciones desde la A2 a la A10. Además se cargaron también una muestra del lisado después de pasar por el filtro de jeringa y una muestra del no retenido (*flow-through*) en la columna de níquel. La figura 25 muestra el gel en el que se cargaron y se corrieron dichas muestras.

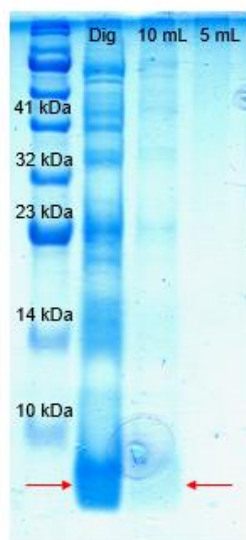


**Figura 25. Gel de poliacrilamida al 15% de las fracciones obtenidas en la purificación de *UTS-86* utilizando la columna de níquel.** Se cargaron muestras de las fracciones de la A2 hasta la A10, junto con una muestra del lisado después de pasar por el filtro de jeringa (F) y otra muestra del *flow-through* de la columna de níquel. El cuadro de color rojo engloba la banda que corresponde a la proteína de interés.

En el carril correspondiente a la muestra F y a la NR, las muestras no corrieron como deberían por lo que no se puede observar la presencia o no de la proteína. Sin embargo, las últimas cuatro fracciones (A7, A8, A9 y A10) sí que presentan la banda que corresponde al peso molecular de la construcción de interés. Por lo que, la proteína sí que debe estar en la muestra F y la NR.

Las fracciones A7, A8, A9 y A10 se concentraron y posteriormente se produjo la digestión de la muestra gracias a la acción de la *PreScission Protease*. Para separar la proteasa del resto de la muestra se utilizó una columna de *GST*. Al igual que con la construcción anterior, la muestra se cargó en la columna y se utilizaron primero 10 mL del tampón A para extraer la proteína de la columna. Después, se pasaron 5 mL más para asegurarse de que la proteína no se había quedado en el interior de la columna.

En la figura 26 se puede observar el gel de poliacrilamida del 15% que se utilizó para comprobar que la proteína se había recuperado del interior de la columna de *GST*. Se cargó una muestra de los primeros 10 mL del tampón A y otra de los 5 mL que se pasaron al final. También se cargó una muestra del resultado de la digestión.

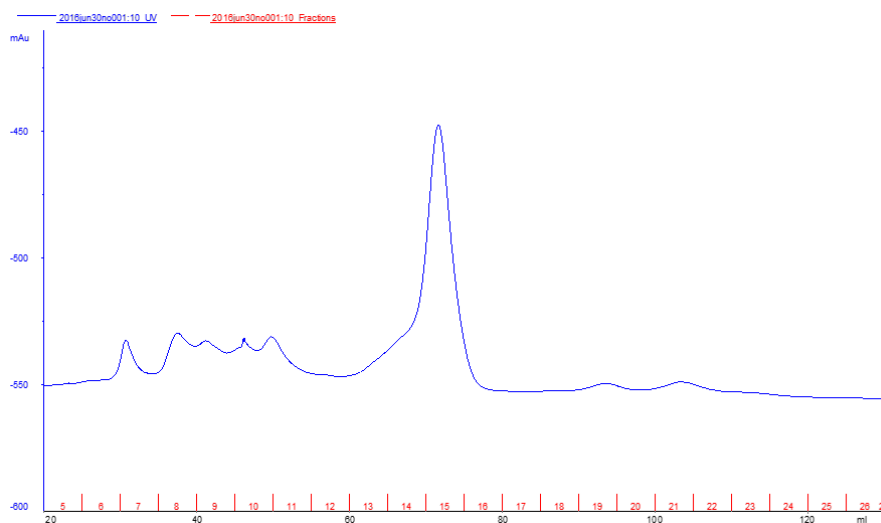


**Figura 26. Gel de poliacrilamida al 15% de la purificación de *UTS-86* en la columna de *GST*.** El primer carril es la muestra de la digestión, el segundo carril (10 mL) corresponde a los 10 mL de tampón A que se pasaron por la columna para recuperar la proteína ya que ésta no queda retenida en su interior mientras que el tercer carril (5 mL) corresponde a los 5 mL de tampón A que se utilizaron para asegurar que toda la proteína estuviera ya fuera de la columna. La flecha roja indica la presencia de la banda de la proteína *UTS-86*.

La banda correspondiente al peso molecular de la proteína se pudo observar tanto en la muestra procedente de la digestión con la proteasa como en la muestra tomada de los 10 mL que se utilizaron para recuperar la proteína del interior de la columna de *GST*. Sin embargo, no era visible en la muestra de los 5 mL.

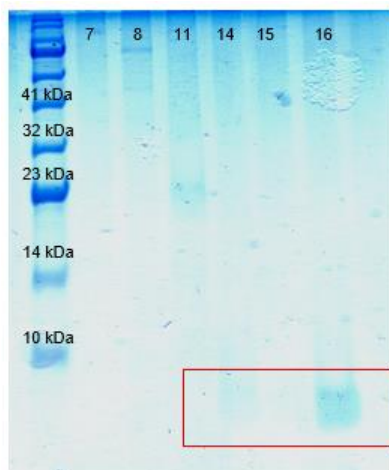
Tras comprobar que se ha conseguido recuperar toda la proteína, se concentró la muestra hasta un volumen inferior a 2 mL para poder inyectarla en el *loop* del *Ákta Prime* para poder realizar la cromatografía de exclusión molecular.

La figura 27 presenta el cromatograma resultante de esta cromatografía utilizando el *Prime*. Alrededor de los primeros 30 mL se puede observar una serie de pequeños picos hasta que a los 60 mL surge un pico más grande.



**Figura 27. Cromatograma de la purificación de la construcción *UTS-86* mediante el uso del *Äkta Prime*.** En rojo se indican las fracciones que se han recogido durante la purificación y la línea azul representa la absorbancia a 280 nm.

Se preparó un gel de poliacrilamida del 15% y se cargaron las fracciones 7, 8, 11, 14, 15 y 16 para conocer en cuál de ellas se encontraba la proteína de interés. La figura 28 muestra el gel resultante de dicha electroforesis.



**Figura 28. Gel de poliacrilamida al 15% de la fracciones de la *gel filtration* utilizando el *Äkta Prime* para la purificación de la construcción *UTS-86*.** Se cargaron las fracciones 7, 8, 11, 14, 15 y 16. El cuadrado rojo engloba la banda a la que corresponde *UTS-86*.

Las fracciones 7 y 8 coincidían con los picos pequeños mientras que las fracciones 11, 14, 15 y 16 al pico grande. La banda de peso molecular correspondiente a la *UTS-86* fue visible sólo en las fracciones del pico grande, indicando de esta forma la presencia de la proteína en dichas fracciones.

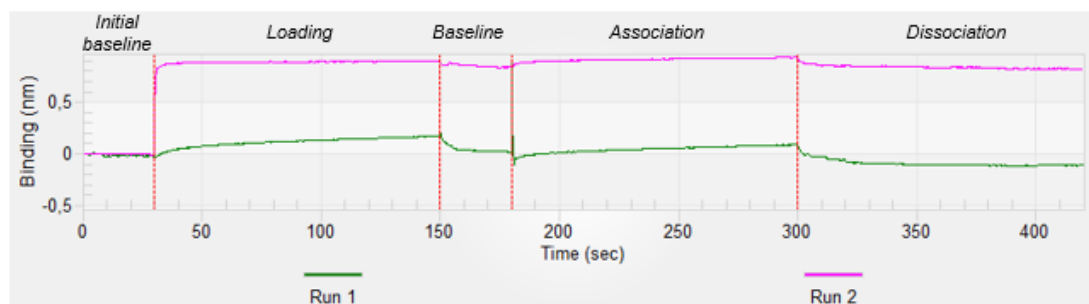
A continuación, se concentraron las fracciones 14, 15 y 16 y se midió la concentración utilizando el *NanoDrop*. La concentración obtenida fue de 0,75 mg/mL. Aunque la concentración era baja, era suficiente para realizar los ensayos de *ITC*.

#### 4.4. Caracterización de la unión de *CIN85* con *MUC1*

##### 4.4.1. Mediante Interferometría de bio-capas

Se realizaron diferentes ensayos aprovechando la tecnología *BLI* (*bio-layer interferometry*) para tratar de caracterizar la unión de *CIN85* con *MUC1*.

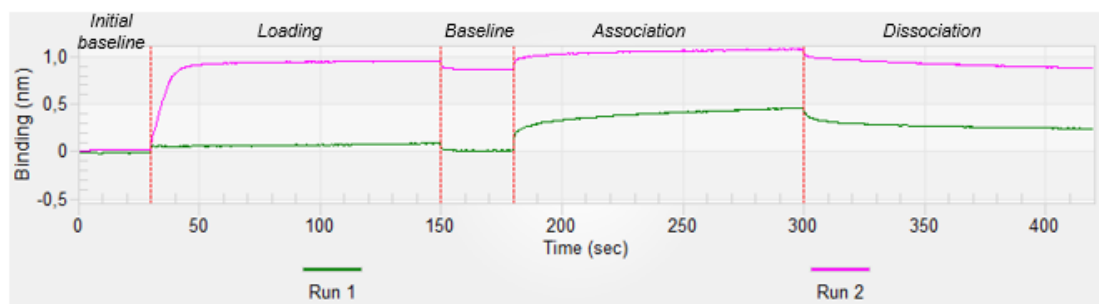
La figura 29 muestra las curvas obtenidas durante el ensayo con el *BLitz*. En este ensayo, se realizaron dos *runs* diferentes. El *run 1* sirvió como control para determinar la unión inespecífica de la construcción *UTS-80* con el biosensor de estreptavidina. Con este fin durante la fase del *initial baseline*, de *loading* y de *baseline* sólo se utilizó tampón A. Mientras que en el *run 2* ya se cargó el péptido *VNTR* en la fase del *loading* y la proteína en la fase de *association*. La concentración de proteína utilizada era de 70,86 nM y la del péptido 24 nM.



**Figura 29. Curvas obtenidas en el ensayo para determinar la interacción entre la construcción *UTS-80* y el péptido *VNTR*.** *Run 1*: se carga el tampón en las tres primeras fases mientras que en la fase de asociación se carga la proteína (70,86 nM). *Run 2*: se carga el péptido *VNTR* (24 nM) en la fase del *loading* y la proteína en la fase de la asociación.

Del análisis de la figura 29 se puede extraer que: en el *run 1*, la proteína se une inespecíficamente al receptor en gran medida en la fase de *association* y en el *run 2*, el péptido *VNTR* se une al biosensor en la fase de carga como se espera, ya que está biotinilado y el biosensor es de estreptavidina. Sin embargo, no se detecta unión entre la construcción y el péptido porque si se observa la curva del *loading* y la de la *association* del *run 2* no se aprecia una gran diferencia entre ellas como cabría esperar si existiera interacción. Parece que la unión inespecífica del dominio *SH3A* al biosensor encubre la unión que pueda haber entre la proteína y el péptido representada por las curvas de la *association* y de la *dissociation* del segundo *run*. Además, la constante de disociación (*kd*), calculada por el software del instrumento, resultante del ensayo es bastante alta ( $1,003 \cdot 10^{-1}$  1/s) y debería ser lo más baja posible.

Se realizó el mismo ensayo pero con el péptido *IR* para averiguar si la interacción entre el dominio *SH3A* y *MUC1* se produce en la región representada por este péptido. La figura 30 presenta las curvas obtenidas en este nuevo experimento. Las concentraciones fueron las mismas que en el ensayo con *VNTR*.



**Figura 30. Curvas obtenidas en el ensayo para determinar la interacción entre la construcción *UTS-80* y el péptido *IR*.** *Run 1*: se carga el tampón en las tres primeras fases mientras que en la fase de asociación se carga la proteína (70,86 nM). *Run 2*: se carga el péptido *IR* (24 nM) en la fase del *loading* y la proteína en la fase de la asociación.

Los resultados fueron similares a los comentados anteriormente para el péptido *VNTR*. Sí que es verdad que la curva de la fase de la asociación en el *run 2* es más pronunciada con respecto a la de la carga del péptido pero no es suficiente para afirmar que pueda existir interacción, ya que la constante de disociación ( $k_d$ ) obtenida ( $4,685 \cdot 10^{-2}$  1/s) sigue siendo bastante alta.

Se realizaron más ensayos aumentando la concentración tanto del péptido como de la proteína pero los resultados no variaban mucho y no permitían afirmar que existiera interacción entre el dominio *SH3A* de *CIN85* con alguno de los dos péptidos. Esto dejaba claro que la afinidad, en caso de existir, entre el dominio *SH3A* y cualquiera de los dos péptidos debe ser muy baja y no está en el rango de afinidad que permite detectar el instrumento *BLITZ* que es entre 1  $\mu$ M y 0,1 nM.

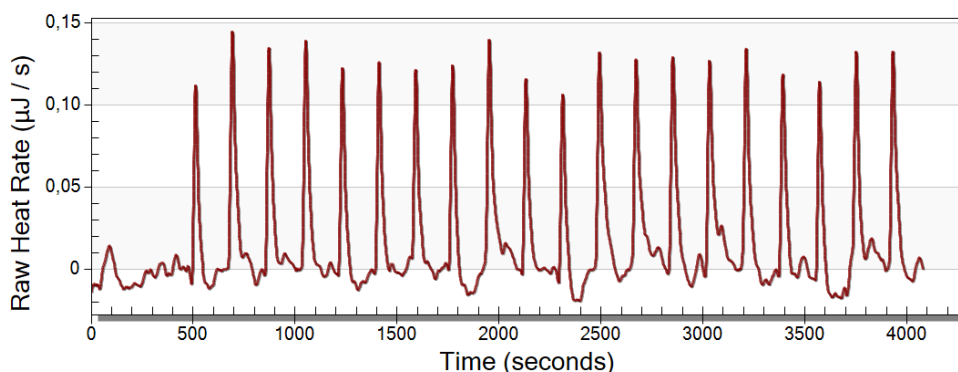
#### 4.4.2. Mediante *ITC*

La técnica biofísica *Isothermal Titration Calorimetry* es muy sensible y permite estudiar y caracterizar la interacción entre proteínas. Por esta razón, se escogió esta técnica tras los ensayos en el *BLITZ*.

Se realizaron cuatro experimentos diferentes: dos con la construcción *UTS-80* para estudiar si el dominio *SH3A* interacciona con los péptidos de *MUC1* y dos con la construcción *UTS-86* para probar si es el dominio *SH3C* el que interacciona con *MUC1*.

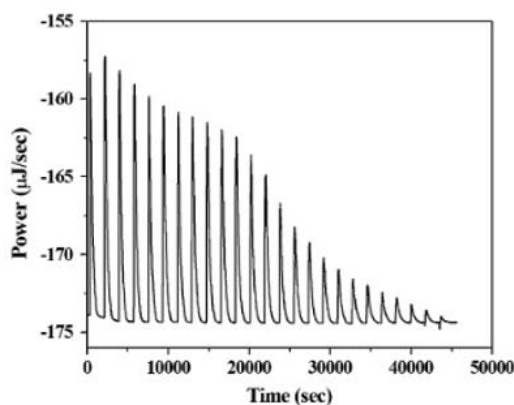
En el primer ensayo se testó la interacción de *UTS-80* con el péptido *VNTR*. Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes: 56,67  $\mu$ M de la proteína y 0,96 mM del péptido *VNTR*. Se cargaron 250  $\mu$ L de la proteína en la celda y 50  $\mu$ L de péptido en la jeringa de la bureta. La figura 31 muestra la gráfica resultante de este ensayo.





**Figura 31. ITC para la construcción UTS-80 y el péptido VNTR.** La gráfica representa el ratio de calor liberado ( $\mu\text{J/s}$ ) frente al tiempo (s). Se realizaron 21 inyecciones (picos), con un intervalo de tiempo entre ellas de 180 s y con una agitación de 200 rpm. La temperatura de la celda era de  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y el volumen de las inyecciones fue de  $1,96\ \mu\text{L}$  con la excepción de la primera fue de  $0,95\ \mu\text{L}$ .

El gráfico que cabría esperar en el caso de que se diera la interacción entre el dominio *SH3* y el péptido debería ser similar al que se puede apreciar en la figura 32 que está extraída del estudio realizado por Li y Ni (2016) para estudiar la interacción entre el glutatión y la pepsina. Cada pico de esta figura representa una inyección de pepsina sobre el glutatión que se encuentra en la celda. Debido a la interacción entre ambas proteínas, el área de los primeros picos es elevada indicando pues que existe mayor cantidad de proteína disponible que permite la asociación entre el glutatión y la pepsina y que desprende una mayor cantidad de calor como resultado de dicha interacción. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración en la celda de la pepsina inyectada, la proteína depositada en la celda se satura y se desprende menos calor en las inyecciones sucesivas, por lo que el área de los picos se va reduciendo.



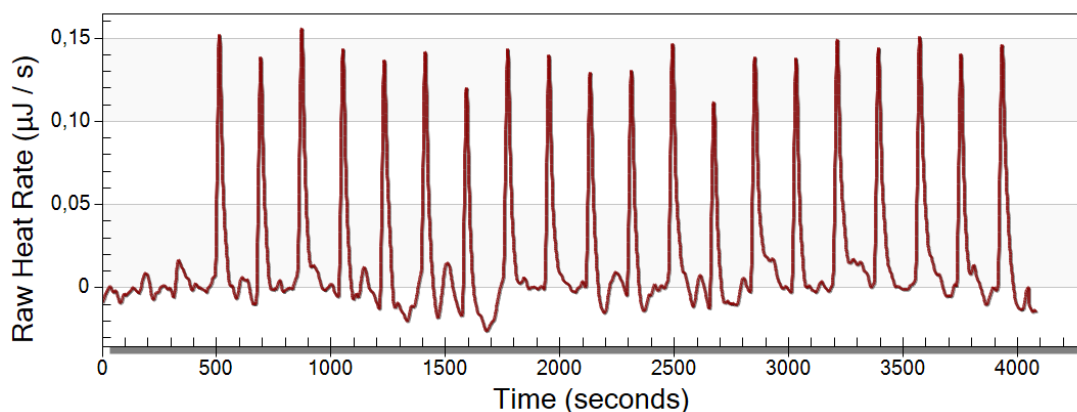
**Figura 32. ITC del ensayo de interacción entre el glutatión y la pepsina.** La gráfica representa el ratio de calor liberado ( $\mu\text{J/s}$ ) frente al tiempo (s). Se realizaron 25 inyecciones con una agitación de 200 rpm. La temperatura de la celda era de  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se emplearon las siguientes concentraciones  $2 \times 10^{-4}\ \text{M}$  de pepsina en la jeringa de la bureta y  $8 \times 10^{-2}\ \text{M}$  de glutatión en la celda. La asociación entre ambas proteínas es exotérmica. La figura está extraída del artículo publicado por Li y Ni (2016).

La comparación entre la figura 31 y la 32 permite señalar que el área de los picos de la figura 31 no desciende progresivamente durante el transcurso del ensayo como sí que ocurre en la figura 32 que sería lo esperado, sino que el área de los picos es muy similar en todas las inyecciones. Esto indica que a las concentraciones utilizadas en este



experimento no se aprecia que haya interacción entre el dominio *SH3A* de *CIN85* con el péptido *VNTR* de *MUC1*.

En el segundo ensayo se utilizó *UTS-80* y el péptido *IR*. Las concentraciones en este caso fueron 56,67  $\mu\text{M}$  de la proteína y 0,78 mM del péptido. Se volvieron a cargar 250  $\mu\text{L}$  de la proteína en la celda y 50  $\mu\text{L}$  de péptido en la jeringa de la bureta. La gráfica obtenida, esta vez, se puede visualizar en la figura 33.

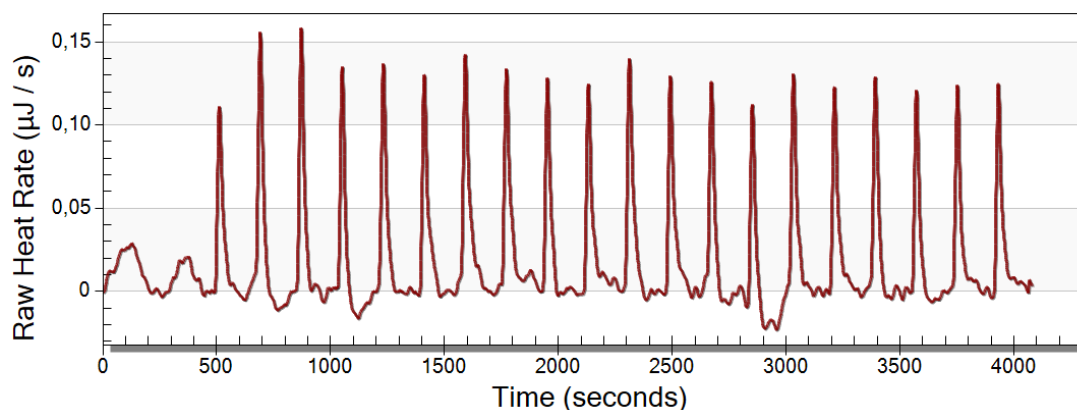


**Figura 33. ITC para la construcción *UTS-80* y el péptido *IR*.** La gráfica representa el ratio de calor liberado ( $\mu\text{J}/\text{s}$ ) frente al tiempo (s). Se realizaron 21 inyecciones, con un intervalo de tiempo entre ellas de 180 s y con una agitación de 200 rpm. La temperatura de la celda era de 20  $^{\circ}\text{C}$  y el volumen de las inyecciones fue de 1,96  $\mu\text{L}$  con la excepción de la primera que fue de 0,95  $\mu\text{L}$ .

Al igual que en el caso anterior, el área de los picos de la figura 33 es muy similar entre las 21 inyecciones y no se observa un descenso progresivo del área como en la figura 32. De esta forma, no se detecta que exista interacción tampoco del dominio *SH3A* de *CIN85* con el péptido *IR* de *MUC1*.

Como no se observó que hubiera interacción entre el dominio *SH3A* y ninguno de los péptidos, se pasó a realizar los ensayos *ITC* con el dominio *SH3C*.

En el tercer ensayo se empleó la construcción *UTS-86* y el péptido *VNTR*. Se cargaron 250  $\mu\text{L}$  de *UTS-86* (20  $\mu\text{M}$ ) en la celda y 50  $\mu\text{L}$  de péptido (0,96 mM) en la jeringa de la bureta. La figura 34 presenta la gráfica resultante de este tercer ensayo.

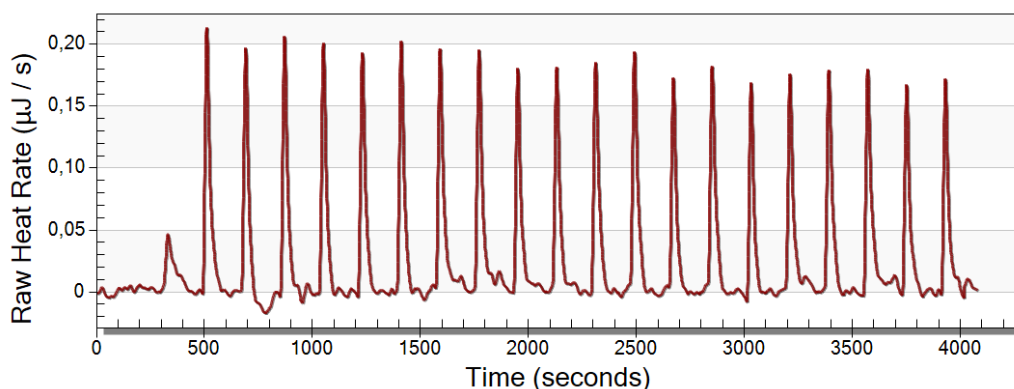


**Figura 34. ITC para la construcción *UTS-86* y el péptido *VNTR*.** La gráfica representa el ratio de calor liberado ( $\mu\text{J}/\text{s}$ ) frente al tiempo (s). Se realizaron 21 inyecciones, con un

intervalo de tiempo entre ellas de 180 s y con una agitación de 200 rpm. La temperatura de la celda era de 20 °C y el volumen de las inyecciones fue de 1,96 µL con la excepción de la primera que fue de 0,95 µL.

En este tercer ensayo tampoco se puede determinar que exista asociación entre el dominio *SH3C* de *CIN85* con el péptido de *VNTR* de *MUC1*, ya que el área de los picos de la figura 34 no disminuye progresivamente como cabría esperar si se produjera interacción entre la proteína y el péptido.

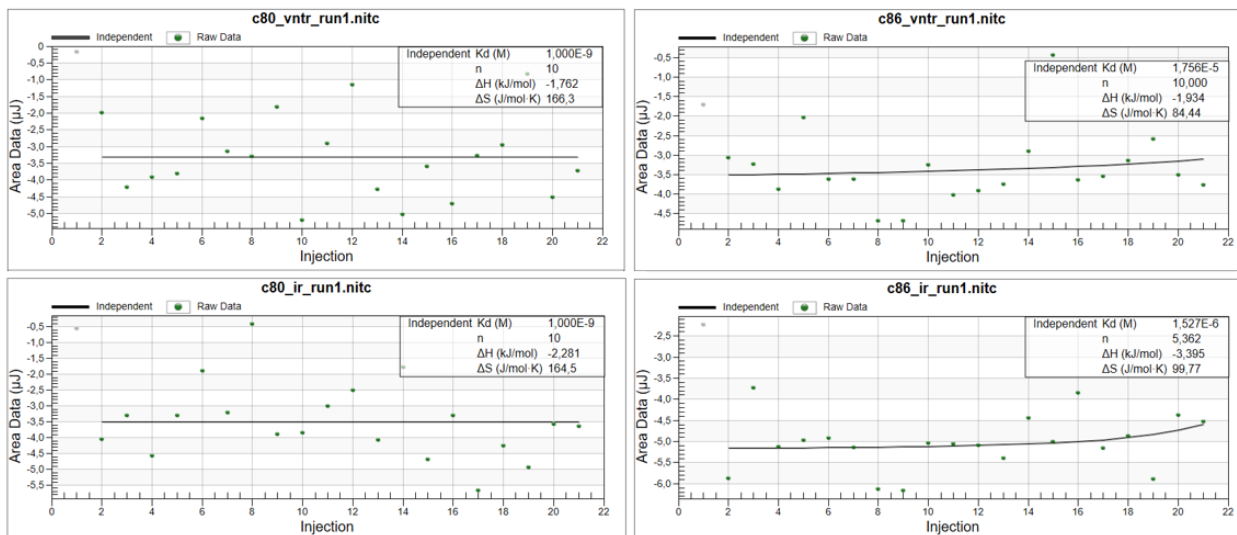
En el último ensayo se probó con la construcción *UTS-86* y con el péptido *IR*. Se cargaron 250 µL de *UTS-86* (50 µM) en la celda y 50 µL de péptido (0,78 mM) en la jeringa de la bureta. La gráfica obtenida se muestra en la figura 35.



**Figura 35. ITC para la construcción *UTS-86* y el péptido *IR*.** La gráfica representa el ratio de calor liberado (µJ/s) frente al tiempo (s). Se realizaron 21 inyecciones, con un intervalo de tiempo entre ellas de 180 s y con una agitación de 200 rpm. La temperatura de la celda era de 20 °C y el volumen de las inyecciones fue de 1,96 µL con la excepción de la primera que fue de 0,95 µL.

En este último ensayo tampoco se puede observar que haya interacción alguna entre el dominio *SH3C* de *CIN85* y el péptido *IR* de *MUC1* por la misma razón que en los tres ensayos anteriores: el área de los picos es similar entre todas las inyecciones. Aunque en este caso parezca que sí que hay una disminución ligera del área, no es suficiente como para determinar que exista interacción.

Para terminar de confirmar estos resultados, se realizó una representación de los valores del área bajo cada pico para cada inyección mediante el software *NanoAnalyze*. Se realizó una representación para cada ensayo realizado. La figura 36 presenta estas representaciones. No existe ajuste posible para estos cuatro ensayos ya que las áreas son planas como muestra esta figura.



**Figura 36. Estequiometría de interacción entre los dominios SH3A y SH3C con los péptidos VNTR e IR.** Se presentan los valores del área ( $\mu\text{J}$ ) bajo cada pico para cada una de las inyecciones. El modelo que se utilizó fue el independiente y está representado por la línea de color negro. Esquina superior izquierda: dominio SH3A con el péptido VNTR; esquina inferior izquierda: dominio SH3A con el péptido IR; esquina superior derecha: dominio SH3C con el péptido VNTR y esquina inferior derecha: dominio SH3C con el péptido IR.

#### 4.5. Discusión

Las rutas de señalización intracelular son fundamentales para el correcto funcionamiento de los procesos biológicos. En estas rutas intervienen un gran número de proteínas que actúan como moléculas señal para integrar, codificar y transportar la señal captada por el receptor de membrana hacia los efectores situados en el interior de las células. Estas proteínas se organizan en complejos y *clusters* para incrementar la eficiencia, la fidelidad y la robustez en la señalización celular (Cebeauer *et al.*, 2010).

En estos *clusters* se encuentra la proteína CIN85 que actúa como una proteína adaptadora que recluta a otras proteínas para formar complejos con ellas. Debido a la importancia de conocer cómo se regula y que proteínas intervienen en las rutas de señalización se han comenzado a realizar una serie de estudios para determinar con que otras proteínas interacciona CIN85. Entre estos estudios destaca el realizado por Moncalián *et al.* (2006) que reveló que los dominios SH3 de CIN85 sólo se unen a un motivo atípico presente en la proteína Cbl.

Después de este hallazgo se están y se han realizando otros estudios para recabar la máxima información sobre la unión de este adaptador con otras proteínas para regular diferentes funciones. En el año 2013, Cascio *et al.* publicaron un artículo en el que describían que la proteína CIN85 y MUC1 interaccionaban tras analizar los resultados obtenidos tras los ensayos de inmunoprecipitación. Las conclusiones mostradas en este artículo fueron las que plantearon la realización del proyecto que se describe en este texto.

El objetivo de este proyecto era determinar si como muestran los resultados de este grupo de investigación algún dominio SH3 de CIN85 interactúa con la proteína MUC1. Pero los resultados obtenidos tras la utilización de dos técnicas biofísicas diferentes como la del ITC y la del BLI no han sido los esperados, ya que todo parecía indicar que la asociación entre estas dos proteínas debía producirse mediante alguno

de estos tres dominios *SH3*. Además, la presencia de la secuencia (*PXXRP*) en los dos péptidos empleados que es muy similar a la presente en *Cbl* apuntaba a que sí que podría darse interacción. Estos resultados generan un debate que se va a exponer a continuación.

En primer lugar, la hipótesis que surge ahora es que la interacción entre *CIN85* y *MUC1* pueda producirse en otra región de la proteína adaptadora porque tanto el dominio *SH3A* como el *SH3C* no tienen implicación alguna en este sentido. Es cierto que faltaría por comprobar si el dominio *SH3B* fuera el responsable de esta interacción pero lo cierto es que este dominio presenta un porcentaje alto de identidad (48%) con el dominio *SH3A*. Por lo que, se podría descartar que este dominio pudiera interactuar con *MUC1*.

Otra hipótesis podría ser que alguno de los tres dominios *SH3* reconociera otra secuencia presente en otra región de *MUC1* pero esta idea no se sostiene si se tiene en cuenta la especificidad de estos dominios por la secuencia específica *PXXXPR* que no se localiza en otra región de *MUC1*.

Por otra parte como se comenta en la introducción y al inicio de este apartado, las proteínas se asocian formando grandes complejos proteicos en los que intervienen un gran número de proteínas durante la transducción y transporte de la señal. De esta forma, podría ser que la proteína *CIN85* y *MUC1* se encuentren formando parte de este gran complejo pero sin interactuar entre ellas directamente sino con otras proteínas. Esta hipótesis sí que podría explicar que no se observe interacción entre las dos proteínas como demuestran los resultados de este trabajo pero que sí que coinmunoprecipiten juntas como indican en el artículo.

También podría ser que la interacción entre *CIN85* y *MUC1* fuera transitoria, es decir, que se formara y se rompiera la asociación muy rápidamente impidiendo de esta forma la detección de la unión entre ambas mediante las dos técnicas empleadas en este trabajo (Perkins *et al.*, 2010).

Para poder discernir cuál de todas las hipótesis es la que se asemeja a lo que ocurre en el interior de las células habría que a realizar otra serie de ensayos. Lo ideal sería purificar tanto *CIN85* como *MUC1* en su forma *full-length* y comprobar experimentalmente si la interacción es directa o por el contrario es indirecta entre ambas. Pero esto es inviable ya que estas proteínas *full-length* son de gran tamaño.

Otra opción que sí que sería viable sería el uso de la técnica de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (*RMN*) cuya sensibilidad permite detectar hasta las interacciones muy débiles. Esta técnica se basa en el fenómeno físico por el cual los núcleos atómicos en presencia de un campo magnético absorben y reemiten la radiación electromagnética. Esta técnica ya se ha utilizado con este objetivo, un ejemplo es el artículo publicado por Qin *et al.* (2001).

Por último también se podría intentar realizar un ensayo *FRET* (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) para comprobar si se produce la interacción entre *MUC1* y *CIN85*. Este ensayo aprovecha el fenómeno físico por el que la energía se puede transferir desde un fluoróforo excitado a otro cromóforo si se encuentra a una distancia mínima, lo que implicaría que ambas proteínas se encontrarían asociadas (Pietraszewska-Bogiel y Gadellal, 2011).

## 5. Conclusiones

1. La sobreexpresión de las diferentes construcciones mediante el método de autoinducción ha sido más efectiva que a través de la inducción por *IPTG*.
2. La construcción *UTS-80* (dominio *SH3A*) ha sido purificada con éxito utilizando la cromatografía de afinidad mediante una columna quelante de níquel y la cromatografía de exclusión molecular.
3. La construcción *UTS-86* (dominio *SH3C*) ha sido purificada con éxito utilizando la cromatografía de afinidad mediante una columna quelante de níquel y la cromatografía de exclusión molecular.
4. No se observa que haya interacción entre los dominios *SH3A* y *SH3C* de *CIN85* con los péptidos *VNTR* e *IR* de *MUC1* bajo las condiciones en las que se han realizado los ensayos de *ITC* y *BLI*.

## 6. Referencias bibliográficas

- Bögler, O., Furnari, F.B., Kindler-Roehrborn, A., Sykes, V.W., Yung, R., Huang, H.J., and Cavenee, W.K. (2000). SETA: a novel SH3 domain-containing adapter molecule associated with malignancy in astrocytes. *Neuro. Oncol.* 2, 6–15.
- Cascio, S., and Finn, O.J. (2015). Complex of MUC1, CIN85 and Cbl in colon cancer progression and metastasis. *Cancers (Basel)*. 7, 342–352.
- Cascio, S., Farkas, A.M., Hughey, R.P., and Finn, O.J. (2013). Altered glycosylation of MUC1 influences its association with CIN85: the role of this novel complex in cancer cell invasion and migration. *Oncotarget* 4, 1686–1697.
- Cebecauer, M., Spitaler, M., Sergé, A., Magee, A.I., Abbe, E., Ames, P., Studdert, C.A., Reiser, R.H., Parkinson, J.S., Andrews, N.L., et al. (2010). Signalling complexes and clusters: functional advantages and methodological hurdles. *J. Cell Sci.* 123, 309–320.
- Dikic, I., Szymkiewicz, I., and Soubeyran, P. (2003). Cbl signaling networks in the regulation of cell function. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1805–1827.
- Gout, I., Middleton, G., Adu, J., Ninkina, N.N., Drobot, L.B., Filonenko, V., Matsuka, G., Davies, a M., Waterfield, M., and Buchman, V.L. (2000). Negative regulation of PI 3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein. *EMBO J.* 19, 4015–4025.
- Jozic, D., Cárdenes, N., Deribe, Y.L., Moncalián, G., Hoeller, D., Groemping, Y., Dikic, I., Rittinger, K., and Bravo, J. (2005). Cbl promotes clustering of endocytic adaptor proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 972–979.
- Langdon, W.Y., Hartley, J.W., Peter Klinken, S., Ruscetti, S.K., Morse, H.C., and Hall, E. (1989). v-cbl, an oncogene from a dual-recombinant murine retrovirus that induces early B-lineage lymphomas (pre-B cell tumors/gag fusion protein/GCN4 homology/hemopoietic cells). *Biochemistry* 86, 1168–1172.
- Li, X., and Ni, T. (2016). Binding of glutathione and melatonin to pepsin occurs via different binding mechanisms. *Eur. Biophys. J.* 45, 165–174.
- Mohapatra, B., Ahmad, G., Nadeau, S., Zutshi, N., An, W., Scheffe, S., Dong, L., Feng, D., Goetz, B., Arya, P., et al. (2013). Protein tyrosine kinase regulation by ubiquitination: critical roles of Cbl-family ubiquitin ligases. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 122–139.

- Moncalián, G., Cárdenes, N., Deribe, Y.L., Spínola-Amilibia, M., Dikic, I., and Bravo, J. (2006). Atypical polyproline recognition by the CMS N-terminal Src homology 3 domain. *J. Biol. Chem.* *281*, 38845–38853.
- Nath, S., and Mukherjee, P. (2014). MUC1: A multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol. Med.* *20*, 332–342.
- Nicholson, R., Gee, J.M., and Harper, M. (2001). EGFR and cancer prognosis. *Eur. J. Cancer* *37*, 9–15.
- Perkins, J.R., Diboun, I., Dessailly, B.H., Lees, J.G., and Orengo, C. (2010). Transient Protein-Protein Interactions: Structural, Functional, and Network Properties. *Structure* *18*, 1233–1243.
- Pietraszewska-Bogiel, A., and Gadella, T.W.J. (2011). FRET microscopy: From principle to routine technology in cell biology. *J. Microsc.* *241*, 111–118.
- Qin, J., Vinogradova, O., and Gronenborn, A.M. (2001). Protein-protein interactions probed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Methods Enzymol.* *339*, 377–389.
- Schlessinger, J. (2002). Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* *110*, 669–672.
- Schmidt, M.H.H., Chen, B., Randazzo, L.M., and Bogler, O. (2003). SETA/CIN85/Ruk and its binding partner AIP1 associate with diverse cytoskeletal elements, including FAKs, and modulate cell adhesion. *J. Cell Sci.* *116*, 2845–2855.
- Schneider, M.R., and Wolf, E. (2009). The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J. Cell. Physiol.* *218*, 460–466.
- Schroeder, B., Srivatsan, S., Shaw, A., Billadeau, D., and McNiven, M. a (2012). CIN85 phosphorylation is essential for EGFR ubiquitination and sorting into multivesicular bodies. *Mol. Biol. Cell* *23*, 3602–3611.
- Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W.Y., and Dikic, I. (2002). Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature* *416*, 183–187.
- Swaminathan, G., and Tsygankov, A.Y. (2006). The Cbl family proteins: Ring leaders in regulation of cell signaling. *J. Cell. Physiol.* *209*, 21–43.
- Take, H., Watanabe, S., Takeda, K., Yu, Z.X., Iwata, N., and Kajigaya, S. (2000). Cloning and characterization of a novel adaptor protein, CIN85, that interacts with c-Cbl. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *268*, 321–328.
- Thien, C.B., and Langdon, W.Y. (2001). Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 294–307.
- Tomas, A., Futter, C.E., and Eden, E.R. (2014). EGF receptor trafficking: Consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol.* *24*, 26–34.
- Vogel, H.J. (2002). Calcium-Binding Protein Protocols: Methods and techniques.
- Watanabe, S., Take, H., Takeda, K., Yu, Z.-X., Iwata, N., and Kajigaya, S. Characterization of the CIN85 Adaptor Protein and Identification of Components Involved in CIN85 Complexes.
- Yewale, C., Baradia, D., Vhora, I., Patil, S., and Misra, A. (2013). Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: A review of trends and strategies. *Biomaterials* *34*, 8690–8707.