



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**MYHIIA es una proteína blanco de ISGilación en células
de cáncer de mama**

TESIS

Que para obtener el título de

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA

JUAN EDUARDO CRUZ RAMOS



Ciudad de México, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

VOCAL: CARMEN ADRIANA MENDOZA RODRIGUEZ

SECRETARIA: ÁNGELES CONCEPCIÓN TECALCO CRUZ

1ER SUPLENTE: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

2DO SUPLENTE: MARÍA ELENA IBARRA RUBIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
LABORATORIO C-138 (NUEVA SEDE)

ASESORA DEL TEMA:

DRA. ÁNGELES CONCEPCIÓN TECALCO CRUZ

SUSTENTANTE:

JUAN EDUARDO CRUZ RAMOS

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

El presente trabajo se desarrolló en el departamento de Biología Molecular y Biotecnología, del Programa de Investigación de Cáncer de Mama, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México en el laboratorio C-138 de la **Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz**, con los apoyos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, **UNAM-DGAPA-PAPIIT** No. **IA200916** y por el No. **IA201618**.

Se reconocen las valiosas observaciones y correcciones del jurado asignado conformado por:

PRESIDENTE	Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre
VOCAL	Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez
SECRETARIO	Dra. Ángeles C. Tecalco Cruz
SUPLENTE	Dr. José Pedraza Chaverri
SUPLENTE	Dra. María Elena Ibarra Rubio

Se reconoce el apoyo y la asesoría técnica otorgada por:

Dr. Miguel Tapia Rodríguez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Dr. Sergio Agustín Román González	Instituto de Medicina Genómica.
MVZ Claudia Rivera Cerecedo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
M en C. Gabriela Xóchitl Ayala Méndez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Biol. Marcela Sosa Garrocho	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Dra. Beatriz Ruiz Villafán	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Dr. Sergio Agustín Román González	Instituto de Medicina Genómica.

RESUMEN

El gen estimulado por interferón 15 (*ISG15*) codifica para una proteína parecida a la ubiquitina de 15 kDa, la cual se ha detectado en dos formas: 1) unida covalentemente a ciertas proteínas y 2) no conjugada, que se denomina ISG15 libre. La unión covalente de ISG15 a las proteínas constituye una modificación post traduccional poco conocida llamada ISGilación. Las funciones de la ISGilación no están completamente claras, y aunque algunas proteínas se ha propuesto que algunas proteínas se modificadan por ISGilación, no todas ellas han sido validadas, ni se ha demostrado su relevancia biológica. En nuestro laboratorio hemos observado que la expresión y la abundancia de ISG15 libre y la ISGilación son dependientes del tipo celular, y al parecer también de la condición normal o transformada. En particular, en células de cáncer de mama, la expresión de ISG15 es más alta que en condiciones normales. De esta manera, consideramos que la identificación de proteínas modificadas por ISGilación o que interactúen con ISG15 podrían contribuir a entender la relevancia biológica de ISG15 en células de cáncer de mama. Para la identificación de las proteínas ISGiladas se usaron células de cáncer de mama MDA-MB-231, las cuales cuentan con características mesenquimales. Los extractos totales de estas células se inmunoprecipitaron usando un anticuerpo específico monoclonal para ISG15 y después las proteínas se separaron por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) seguida de tinción con azul de Coomassie. Una de las bandas visibles se analizadó por espectrometría de masas. Los resultados revelaron que la MYHIIA es una proteína que se modifica por ISGilación. Esta interacción se confirmó por medio de co-inmunoprecipitación. Mediante análisis bioinformáticos se han identificado los posibles sitios que podrían ser ISGilados.

En conclusión, todos los resultados indican que ISG15 se une a la proteína MYHIIA en estas células de cáncer de mama, y esta interacción podría tener impacto en los procesos de migración celular, donde MYHIIA participa regulando su actividad.

LISTA DE ABREVIATURAS

DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada
GAS	Secuencia activada por interferón gamma
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidermal humano
IFNGR1	Receptor 1 de interferón gamma
IFNGR2	Receptor 2 de interferon gamma
IFN γ	Interferón gamma
IRF1	Factor regulatorio de interferón 1
IP	Inmuprecipitación
ISG15	Gen estimulado por interferón 15
JAK1	Cinasa de Janus 1
JAK2	Cinasa de Janus 2
MYHIIA	Miosina IIA No Muscular
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight
NK	Asesina natural
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
STAT1	Transductor de señal y activador de transcripción 1
Ube1L	Homólogo de la enzima E1 activada por ubiquitina
UBE2L6	Enzima conjugadora de ubiquitina E2 L6
USP18	Peptidasa específica de ubiquitina 18
WB	Western Blot

ÍNDICE GENERAL

I	Introducción	1
	1. Generalidades de los interferones	1
	2. La vía del interferón gamma	4
	3. ISG15 y la ISGilación	4
II	Antecedentes	9
	1. ISG15 y la ISGilación es dependiente del tipo celular	9
III	Planteamiento del problema	10
IV	Hipótesis	11
V	Objetivos	11
VI	Estrategia experimental	12
VII	Materiales y métodos	13
VIII	Resultados	18
	1. Las células MDA-MB-231 como modelo de estudio para la identificación de blancos de ISGilación.	18
	2. Estudio bibliográfico de MYHIIA	22
	3. Confirmación de la interacción MYHIIA-ISG15.	25
	4. Asociación de EGFP-MYHIIA e ISG15.	27
	5. Identificación del sitio putativo de ISGilación.	29
IX	Discusión	31
X	Conclusiones	35
XI	Perspectivas	35
XII	Referencias	36
XII	Anexos	39

I. Introducción

1. Generalidades de los interferones.

Los interferones son proteínas conocidas como citocinas las cuales son importantes en la señalización celular, y que son inducidas por infecciones virales o bacterianas (Lin & Young, 2014). Los interferones se clasifican en tres grupos. El primer grupo, conocido como interferones tipo I, comprende a los interferones α , β , δ , ϵ , κ , τ y ω , los cuales guardan entre sí una gran homología estructural. Todas las células que poseen núcleo son capaces de producir este tipo de interferones (Lin & Youth, 2014). Los interferones tipo II sólo tienen a un miembro que es el interferón gamma (IFN γ) el cual se sabe que es secretado principalmente por células T y Natural Killer (NK), y en menor medida en macrófagos, células dendríticas, B, entre otras (Pollard et al., 2013). El tercer grupo que son del tipo III está conformado por un conjunto de interferones λ , que son los de más reciente descubrimiento. Al igual que los interferones tipo I, los tipo III son inducidos por infecciones virales (Fensterl & Sen, 2009). Estos interferones son producidos principalmente por células primarias del linaje hematopoyético y células epiteliales (Wack et al., 2015).

En general, los interferones se caracterizan por su importancia en la respuesta antiviral, antitumorigénica y en la regulación del sistema inmunológico (Fensterl & Sen, 2009). A pesar de tener funciones similares, cada uno de los tres grupos de interferones cuenta con receptores específicos. Dentro de la familia de interferones, el interferón gamma tiene importantes implicaciones en la regulación de la función inmunológica, pero además en alteraciones como el cáncer, regulando diversos genes que modulan el transcriptoma, el proteoma y el secretoma celular.

2. La vía del Interferón Gamma

El IFN γ está formado por dos subunidades idénticas las cuales se asocian antiparalelamente (Bach et al. 1997), mediante fuerzas no covalentes. Cada una de estas subunidades consiste en 143 residuos de aminoácidos y les corresponde un peso molecular de 17.1 kDa.

El receptor del interferón tipo II consta de dos receptores de interferón gamma 1 (IFNGR1) y dos receptores de interferón gamma 2 (IFNGR2), que en sus dominios intracelulares están unidas las cinasas JAK1 y JAK2, respectivamente. La vía empieza cuando el IFN γ se une al dominio extracelular de IFNGR1. La unión del ligando promueve la autofosforilación de JAK2, que acto seguido fosforila a JAK1. JAK1 posteriormente fosforila a los residuos 440 de tirosina de cada receptor IFNGR1 creando sitios de acoplamiento para STAT1. Los residuos de tirosina 701 de las STAT1 son fosforilados ocasionando su disociación del receptor y la formación de un complejo compuesto por dos STAT1 fosforilados. Por último este homodímero es transportado al núcleo donde induce la expresión de los genes regulados por IFN γ y al unirse a secuencias denominadas GAS (por sus siglas en inglés Interferon Gamma Activated Sequences) como se muestra en la Figura 1. Dichos genes son denominados genes primarios regulados por el IFN γ , entre ellos, el factor IRF-1, el cual a su vez regula diversos genes denominados genes secundarios. De esta manera, el estímulo con el IFN γ promueve la expresión de estos factores de transcripción que, posteriormente inducen la expresión de otros genes. En el laboratorio recientemente se ha identificado a *ISG15* como un gen blanco del interferón gamma.

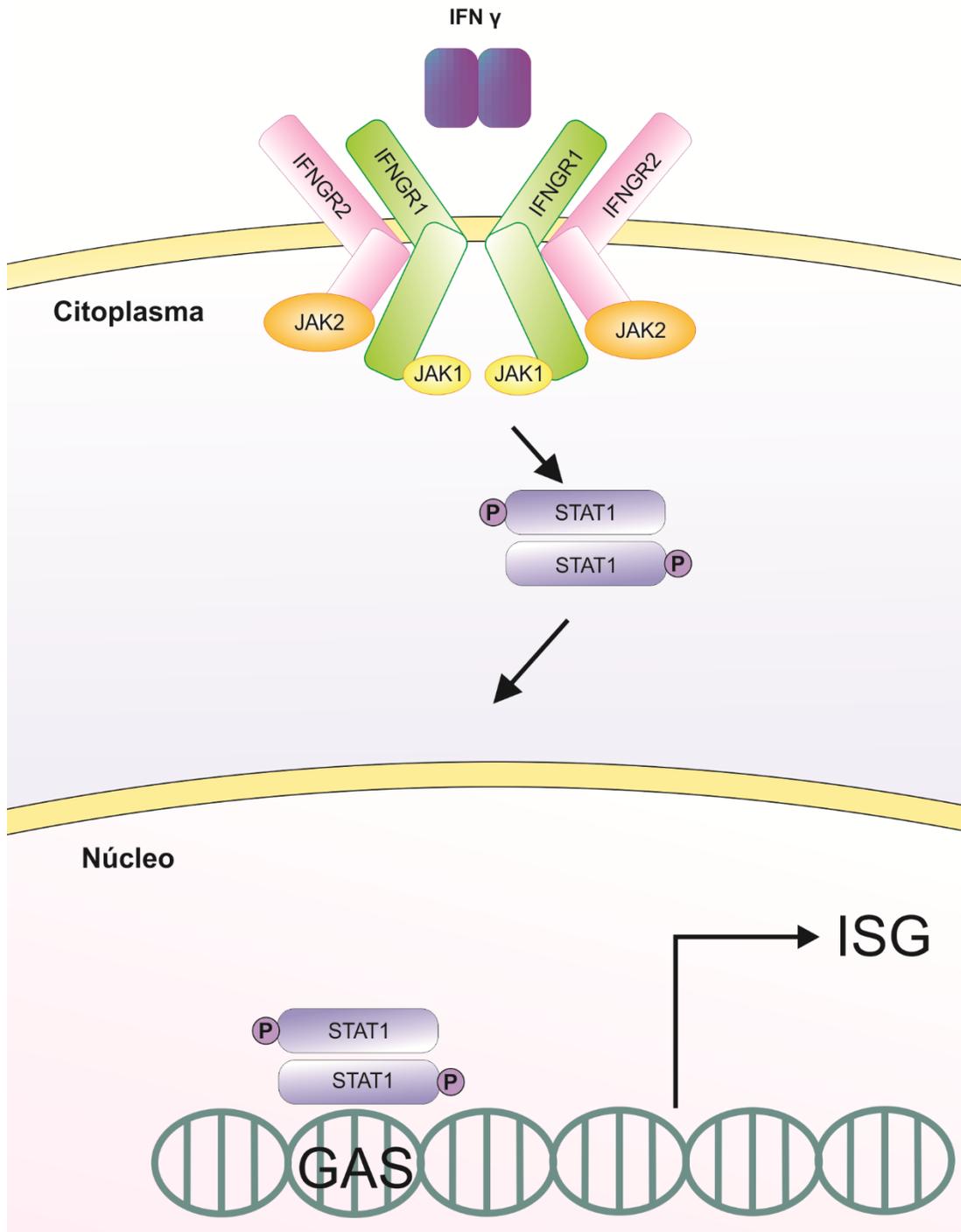


Figura 1. **Vía del interferón gamma.** El interferón gamma (IFN γ) se une al receptor 1 (IFNGR1), lo que facilita el reclutamiento del receptor 2 (IFNGR2). Luego las cinasas de Janus (JAK) son activadas por medio de auto y transfosforilaciones, creando sitios de unión para los transductores de señal y activadores de transcripción 1 (STAT1) en IFNGR1 y la fosforilación de este. Un par de STAT1 fosforilados forman un homodímero que es translocado al núcleo donde se une a las secuencias activadas por IFN γ (GAS) induciendo la expresión de los genes estimulados por interferón (ISG). Modificado de Green et al., 2017.

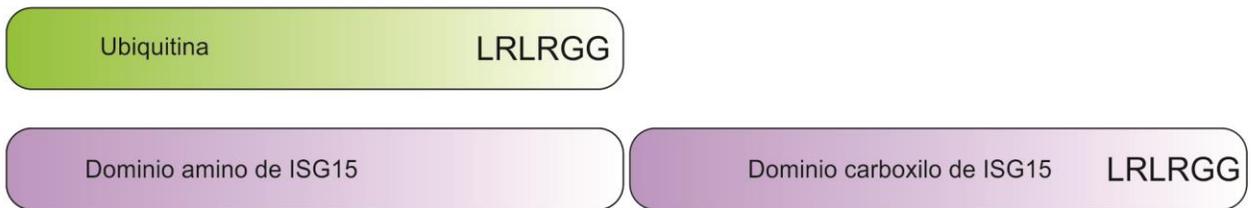
3. ISG15 y la ISGilación

Se había descrito que la expresión del gen *ISG15* es inducida exclusivamente por interferones tipo I (Knight & Cordova, 1991). No obstante, recientemente en nuestro laboratorio se ha identificado que *ISG15* es también modulado por el estímulo del IFN γ . Este gen codifica a una proteína de 165 aminoácidos y 17 kDa, la cual sufre un procesamiento proteolítico que consiste en la remoción de 8 residuos en el extremo C y de la metionina del extremo N, para llegar a su forma madura que consiste en una proteína de 15 kDa. Estructuralmente la proteína ISG15 contiene dos dominios parecidos a la ubiquitina, identificados como dominio amino de ISG15 y dominio carboxilo de ISG15 (Figura 2 a). La proteína de ISG15 en su forma madura tiene en el dominio carboxilo la secuencia LRLRGG al igual que la ubiquitina. A pesar de que el porcentaje de identidad de aminoácidos es de aproximadamente 30% entre la ubiquitina y los dominios de ISG15, sus estructuras son muy similares (Figura 2 b).

A diferencia de la ubiquitina que es altamente conservada en organismos tan diferentes como la levadura y el humano, ISG15 solamente se encuentra presente en organismos vertebrados y es poco conservada entre especies diferentes como se puede observar en la Figura 3 (Zhang & Zhang, 2011).

La proteína ISG15 se enlaza covalentemente a diversas proteínas mediante un proceso denominado ISGilación. En la ISGilación son necesarias tres enzimas (E1, E2 y E3) para unir a ISG15 con las proteínas blanco, siguiendo un patrón igual a la ubiquitinación (Figura 4). La primera de ellas UbE1L activa a ISG15 por medio de un mecanismo de dos pasos que depende de ATP. Primero efectúa una adenilación del dominio carboxilo de ISG15 y luego realiza una tioesterificación para enlazar el carboxilo con un residuo de cisteína de la enzima E1. Luego ISG15 es transferido a UbCH8 por medio de una reacción de transtioesterificación.

A)



B)

```
Ubiquitina      --mqIfVKtlTGKtITLEVepSdTienvKAKIqdKeGippdQqrLiF--aGKqLEDgrtL
ISG15_carboxilo --lsIlVrnnkGRssTyEVrltqTVahLKqQvsgleGVqddlfwLtf--eGKpLEDqlPL
ISG15_amino     mgwdltVKmlaGnefqvsLssSmsVsELKAQItqKiGVhafQqrLavhpsGvalqDrvPL

Ubiquitina      SDYniqkeSTlhLvLRlrGG-----
ISG15_carboxilo gEYGLkPlSTVfnnLRlrGGgtepggrs
ISG15_amino     AsqGLgPgSTVllvvdkcdep-----
```

Figura 2. **Comparación entre ubiquitina e ISG15.** a) ISG15 tiene dos dominios parecidos a la ubiquitina: el dominio amino y el dominio carboxilo. b) Alineamiento de la ubiquitina y los dos dominios de ISG15, mostrándose en azul los residuos más conservados. Modificado de Jeon et al., 2010. Ubiquitina de Homo sapiens NP_066289 e ISG15 de Homo sapiens NP_005092.

Por último la E3 ligasa cataliza el enlace isopeptídico entre ISG15 y un residuo de lisina de la proteína blanco. Se han descrito 3 E3 ligasas de ISG15: EFP cuyo sustrato es 14-3-3 σ , HHARI que conjuga a ISG15 con 4EHP y HERC5 la cual se considera la principal E3 ligasa de ISG15 para la mayoría de sus sustratos. Además existe el proceso inverso, denominado desISGilación el cual es llevado a cabo por la enzima USP18 que desconjuga a ISG15 de la proteína. De esta forma, la ISGilación constituye una modificación post traduccional dinámica de proteínas, que a la fecha ha sido poco estudiada.

<i>Elephantulus edwardii</i>	mailqddvikqnatmprcrpvtsmvvyetevgtQmpSqGWeLkVKMvsG-EiMVpmTDSM
<i>Mus musculus</i>	-----MaWDLkVKMLGGNdFLVsvTnSM
<i>Rattus norvegicus</i>	-----MtWnLkVKMLGGkEFLVSmTnSM
<i>Homo sapiens</i>	-----MGWDLTVKMLaGNEFqVSLSSSM
<i>Pan troglodytes</i>	-----MGWDLTVKMLaGNEFqVSLSnSM
<i>Bos Taurus</i>	-----MGgDLTVKMLGGqEiLVpLrDSM
<i>Canis lupus familiaris</i>	-----mLEptAMagnLTVKMLGGeEFLVpLrDSM
<i>Elephantulus edwardii</i>	q1SnLKK11AQKLeVfpFQ1RLA-HldGqALQndVPLtRQGLGPsSaVsLIVtNC-EPvt
<i>Mus musculus</i>	tVSELKKQIAQKIGVPAFQQRRLA-Hqta-vLQDGltLSs1GLGPsSTVMLVqNCsEPLS
<i>Rattus norvegicus</i>	m1SELKKQvAQKsGVPAFQQRRLA-HqSGemLQDGVaLiRQGLssGSTVMLmVENCshPLS
<i>Homo sapiens</i>	sVSELKaQItQKIGVhAFQQRRLAvHpSGvALQDrVPLAsQGLGPGSTVLLVVDkCDEPLS
<i>Pan troglodytes</i>	sVSELKaQItQKIGVhAFQQRRLAvHpSGvALQDGVPLAsQGLGPGSTVLLVVDkCDEPLn
<i>Bos Taurus</i>	tVSELKQfIAQKInVPAFQQRRLAhldSrevLQeGVPLv1QGLraGSTVLLVqNC---iS
<i>Canis lupus familiaris</i>	laSELKQQIAIKtGVPAFQQRRLAtHpaGtvLQDGIslIRQGLcPGSTVLLVwKNCndPLS
<i>Elephantulus edwardii</i>	ILVhN-KGRSrpYtVkLTdaVAkLKQQVcQqEkVEvnLFWLaFEGRPMEHrmLGdYdLt
<i>Mus musculus</i>	ILVRNerGhSNiYEVfLTQTVdtLKKkVSQRqEqVheDqFWLSFEGRPMEKELGEYGLK
<i>Rattus norvegicus</i>	ILVRNerGRSNvYEVqLTQTVevLmrQVSQhEqVsQDqFWLSFnGRPMEDKePLGEYGLT
<i>Homo sapiens</i>	ILVRNNKGRSStYEVrLTQTVAhLKQQVSg1EgVQdDLFWLtfEGkP1EDq1PLGEYGLK
<i>Pan troglodytes</i>	ILVRNNKGRSStYEVrLTQTVAhLKQQVSg1EgVQdDLFWLtfEGkP1EDq1PLGEYGLK
<i>Bos Taurus</i>	ILVRNdKGRSSpYEVqLkQTVaEKLQQVcQqErVQaDqFWLSFEGRPMDDehPLEEYGLm
<i>Canis lupus familiaris</i>	ILVRNNKGRSiaYEVwLTQTVaEKLQQVcQqEhVQaDLFWLtfEGkPMEDKhqLGEYGLT
<i>Elephantulus edwardii</i>	PqCTVFMNfRLRGGs-----iG1Qg1
<i>Mus musculus</i>	PqCTVikhLRLRGGG-----GdQca
<i>Rattus norvegicus</i>	PhCTViMNLRLR-GG-----Gdyyf
<i>Homo sapiens</i>	P1sTVFMNLRRLRGGG---TEPGgrs-
<i>Pan troglodytes</i>	P1sTVFMNLRRLRGGG---TEPGgrs-
<i>Bos Taurus</i>	kgCTVFMNLRRLRGG-----
<i>Canis lupus familiaris</i>	PqCTVFMNLRRLRGGGgnwagPGgQc-

Figura 3. **Conservación de ISG15.** Alineamiento de ISG15 proveniente de especies diferentes, marcando en azul los residuos más conservados. *Homo sapiens* NP_005092, *Mus musculus* NP_056598, *Rattus norvegicus* XP_006239625, *Pan troglodytes* XP_009452953, *Elephantulus edwardii* XP_006886017, *Bos taurus* NP_776791 y *Canis lupus familiaris* XP_003639101.

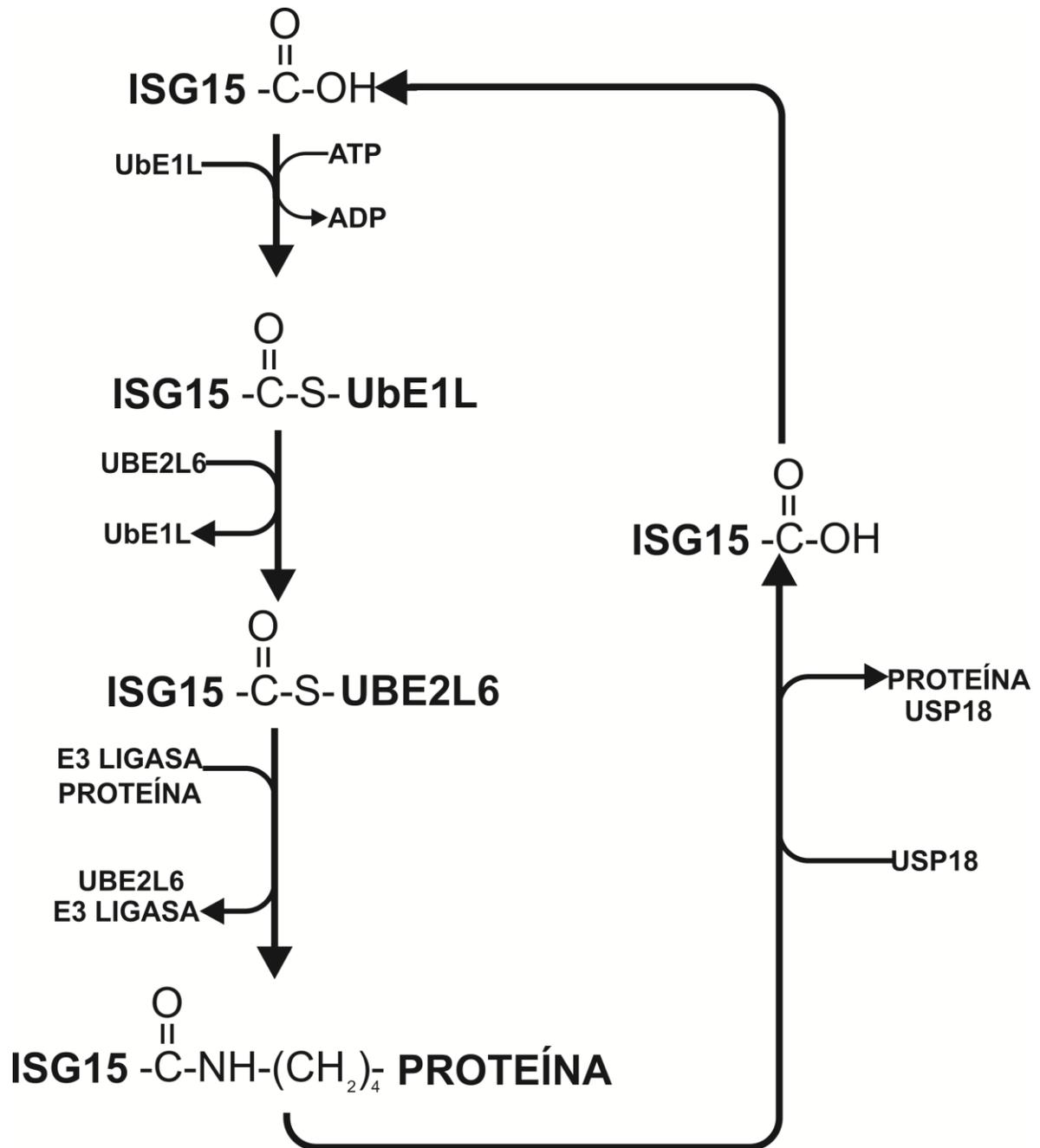


Figura 4. **Sistema de ISGilación.** La ISGilación, al igual que la ubiquitinación, requiere de 3 enzimas para enlazar covalentemente a ISG15 a las proteínas blanco. Modificado de Zhang & Zhang, 2011.

Adicionalmente, la proteína ISG15 puede encontrarse en forma libre. Se ha propuesto que ISG15 puede ser una proteína secretada de linfocitos y monocitos actuando como una citocina que tiene efecto sobre células T promoviendo la producción de IFN γ y con ello aumentar la proliferación de células NK (Jeon et al., 2010)

A pesar de que todavía no se tienen claras las funciones biológicas de esta proteína libre y conjugada, se ha encontrado que la forma libre está involucrada en la respuesta inmune ante diversos agentes virales o bacterianos. Similarmente, la ISGilación también tiene un papel en la respuesta inmune al determinarse que la conjugación de ISG15 podría estar diseñada para proteínas virales recién sintetizadas haciéndolas no funcionales (Durfee et al., 2010). Se ha sugerido que la ISGilación como un mecanismo que afecta la estabilidad a las proteínas a las cuales se enlaza (Zhang & Zhang, 2011).

II. Antecedentes

1. ISG15 y la ISGilación es dependiente del tipo celular

En nuestro laboratorio recientemente se observó que la proporción de la proteína ISG15 y los niveles de ISGilación no son iguales en todos los tipos celulares, sino que son dependientes del tipo celular (Tecalco-Cruz & Mejía Barreto, 2017). De esta manera, las células derivadas de cáncer de mama MCF-7 tienen elevados niveles de ISG15 libre y bajos niveles de ISGilación, en contraste con otros tipos celulares provenientes de otros tejidos que no muestran ISG15 libre pero sí tienen ISGilación.

Además se demostró que los niveles de la proteína ISG15 y la ISGilación se incrementan diferencialmente en distintos tipos de células normales y transformadas en respuesta al tratamiento con IFN γ . Este estímulo incrementa los niveles de ISGilación y de ISG15 libre en la línea MCF-7 (cáncer de mama), mientras que en las A549 (cáncer de pulmón) y HepG2 (hepatoma), las cuales carecen de la forma libre, incrementa la abundancia de conjugados, además de inducir la aparición de ISG15 libre. Por otro lado, en la línea de células no transformadas AD293 (células de riñón embrionario humano) solamente se percibe un incremento discreto en la ISGilación, pero en C9 (células de hígado de rata) y CHO (células de ovario de hámster chino) el efecto del IFN γ no es significativo.

De manera interesante se encontró que la forma libre de ISG15 se localiza mayoritariamente en el citoplasma, mientras que las proteínas que sufren esta modificación post traduccional se encuentran principalmente en el núcleo.

III. Planteamiento del problema

Se ha descrito al gen de *ISG15* como un gen fuertemente inducido por interferones de tipo I, y recientemente se ha demostrado que también es regulado por el interferón de tipo II. El gen de *ISG15* se encuentra sobreexpresado en diferentes tipos de cáncer y aunque todavía no es claro el papel de *ISG15* en estos desórdenes, se ha propuesto que los conjugados de *ISG15* podrían tener funciones tumorigénicas mientras que la forma libre podría tener propiedades antitumorales (Desai, 2015, Burks et al., 2014). De acuerdo con esta propuesta, la identificación de proteínas *ISG*iladas podría ser clave para entender las funciones de *ISG15* en la tumorigénesis. Adicionalmente, en nuestro laboratorio se ha observado un enriquecimiento de las marcas de *ISG*ilación dentro del compartimento nuclear, sugiriendo que diversas proteínas con actividad dentro del núcleo podrían sufrir esta modificación para modular su estabilidad y/o actividad. Además, se ha sugerido que la forma libre de *ISG15* es capaz de promover la infiltración de células NK inhibiendo el crecimiento de tumor (Burks et al., 2015), pero se desconocen si esta proteína en su forma libre requiere de la interacción con otras proteínas para cumplir sus funciones.

Dada la poca información que hay disponible sobre las funciones de *ISG15* es importante determinar a qué proteínas se enlaza covalentemente o mediante interacciones proteína-proteína, y de esta forma dilucidar cuál es el efecto de *ISG15* sobre ellas en contextos celulares específicos. Es por ello que en este trabajo se pretende identificar proteínas que se asocien a *ISG15* en células de cáncer de mama, lo cual dará pauta a la caracterización molecular y al estudio funcional de sus interacciones, lo cual contribuirá a entender su relevancia biológica.

IV. Hipótesis

La proteína ISG15 podría estar asociada a proteínas funcionalmente importantes en la biología de células derivadas de cáncer de mama.

V. Objetivos

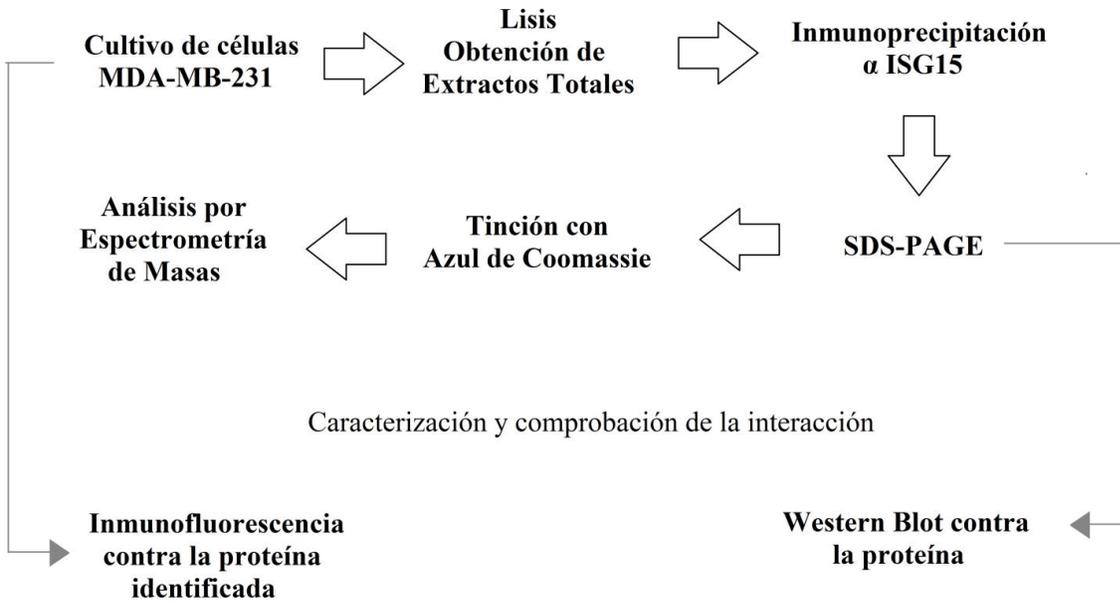
Identificar y caracterizar a las proteínas asociadas a ISG15 y/o modificadas por ISGilación.

Objetivos Particulares

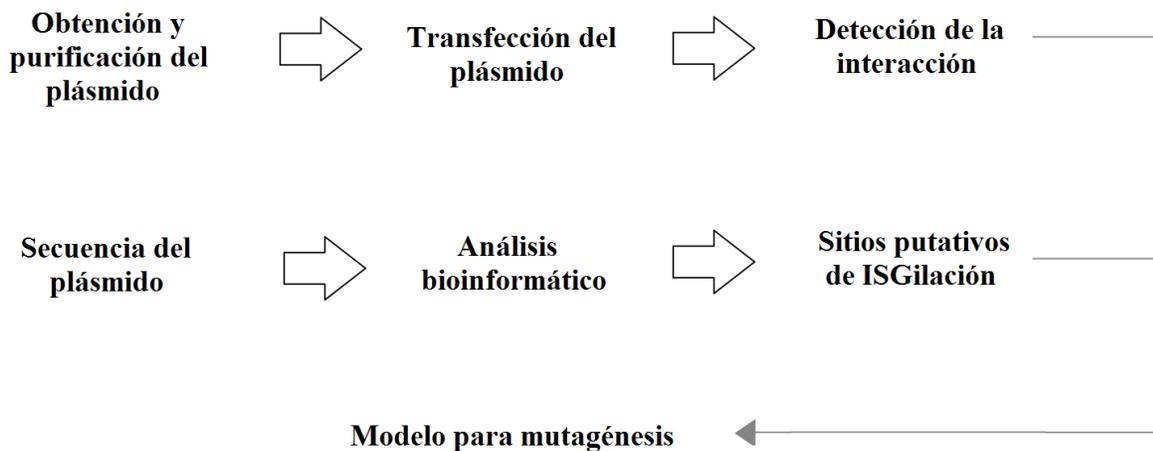
- ✓ Identificar a las proteínas que están asociadas a ISG15 por medio de inmunoprecipitación y espectrometría de masas.
- ✓ Caracterizar a las proteínas que están asociadas o modificadas por ISG15

VI. Estrategia experimental

VI.1. Para la identificación de los blancos de ISGilación se llevará a cabo el siguiente procedimiento.



VI.2. Para la determinación del sitio putativo de ISGilación se llevará a cabo el siguiente procedimiento.



VII. Materiales y métodos

1. Reactivos y anticuerpos

El IFN γ recombinante se obtuvo de R&B Systems (Mineápolis, Minesota, EEUU). Los anticuerpos anti-ISG15 (sc-166755), anti-lámina (sc-20682), así como los anticuerpos anti-ratón (sc-2005) y anti-conejo (sc-2004) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, EEUU). Los anticuerpos anti-MYHIIA (M8064) y anti- α -tubulina (T-5293) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EEUU) y los anticuerpos Alexa Fluor 647 anti-ratón (ab-150107) y Alexa Fluor anti-conejo (ab-150073) se obtuvieron de Abcam (Cambridge, Reino Unido). El anticuerpo anti-EGFP (632592) se obtuvo de ClonTech (Mountain View, California, EEUU).

2. Cultivo Celular

Las células MDA-MB-231 y AD293 (provenientes de cáncer mamario humano y de riñón embrionario de humano, respectivamente) se mantuvieron en medio DMEM complementado con suero bovino fetal al 10% con antibióticos (penicilina y estreptomina).

3. Obtención de extractos celulares

La obtención de los extractos totales, citoplasmáticos y nucleares de las células MDA-MB-231 se llevaron a cabo de acuerdo a lo descrito por Tecalco-Cruz & Mejía-Barreto, (2017). Para los extractos totales se utilizó amortiguador TNTE al 0.5% con inhibidores de proteasas y fosfatasa, mientras que el amortiguador para el fraccionamiento subcelular consistió de amortiguador de homogenización (Imidazol 3mM pH 7.4 y Sacarosa 250 mM) con los mismos inhibidores. Los extractos totales se mantuvieron en rotación por 15 minutos a 4°C para después

centrifugar a 13 200 g por 5 minutos y el sobrenadante es recuperado. Las muestras del fraccionamiento subcelular se pasaron 15 veces por una aguja 22G y esta suspensión fue centrifugada a 700 g durante 10 minutos. El sobrenadante corresponde a la fracción citoplasmática y la pastilla a la fracción nuclear. Estas fracciones se lisaron con RIPA de 30 a 60 minutos. La fracción nuclear se centrifugó a 13 200 g durante 5 minutos, y el sobrenadante fue recuperado.

4. Inmunoprecipitación

A los extractos obtenidos (1-2 mg de proteína) se les agregaron 3 µL de anticuerpo y se pusieron en rotación toda la noche a 4°C. Luego se añadieron 90 µL de la solución proteína G –sefarosa diluida 1:5 y se mantuvieron en rotación por 1 ½ horas. Después se centrifugaron los tubos tres veces a 13 200 g por 10 segundos, donde se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con una solución de TNTE al 0.1%. Se agregaron 20 µL de una solución de Laemmli 2X y las muestras se hirvieron por 5 minutos. Por último se almacenaron a -20°C.

5. Electroforesis SDS-PAGE

Las muestras en Laemmli fueron cargadas en geles de acrilamida con concentraciones del 5 al 15%. Terminado el tiempo de la electroforesis, el gel se tiñó con azul de Coomassie G o se usó para transferir las proteínas a una membrana de PVDF.

6. Western Blot

La transferencia se realizó a 100V durante 80 minutos. Luego la membrana se bloqueó usando una solución de leche en polvo al 5% en TBS-T por 1 hora, para luego ser incubada con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C (anti-ISG15 1:1,000, anti-α-tubulina 1:3,000, anti-lámina 1:3,000, anti-MYHIIA 1:3,000, anti-EGFP 1:3,000). Después la

membrana se lavó con TBS-T para incubarse con el anticuerpo secundario durante 1 hora (anti-mouse 1:3,000 para la detección de ISG15 ó 1:10,000 para tubulina y anti-rabbit 1:10.000 para la detección de lámina y EGFP o 1:30,000 para MYHIIA). Se lavó nuevamente la membrana. Por último, se realizó el ensayo de quimioluminiscencia con SuperSignal West Pico Stable Peroxidase Solution y Luminol/Enhancer Solution.

7. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas se llevó a cabo en el Instituto de Medicina Genómica (INMEGEN). Para preparar las muestras se corrieron en un gel de acrilamida y se tiñeron con azul de Coomassie G, y se entregó el gel en solución fijadora (50% metanol, 40% agua y 10% ácido acético glacial). Se cortaron manualmente las bandas y se almacenaron para su análisis.

La técnica usada es MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight) la cual consiste de tres etapas. Primero, la muestra es dispersada en una solución matriz y es puesta en una base de metal. Luego un láser irradia la muestra causando la ablación y desorción de la misma. Por último, las moléculas de la muestra son ionizadas y aceleradas para ser analizadas por el espectrómetro, que en este caso determina el radio masa/carga con la medición de tiempo.

8. Inmunofluorescencia

Las células se sembraron en cubreobjetos que fueron tratados con polilisina por 10 minutos e irradiados con luz UV por 30 minutos. Luego las células se fijaron con PFA al 4% por 15 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con tritón al 0.1% por 8 minutos. La solución de bloqueo consistió de albúmina al 1.0% que se usó por 1

hora a temperatura ambiente. Las células se incubaron con el anticuerpo primario (ISG15 1:100 y MYHIIA 1:200) toda la noche a 4°C. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-mouse AlexaFluor 647 1:500 y anti-rabbit AlexaFluor 488 1:750 para ISG15 y MYHIIA, respectivamente) durante 1 hora. Por último las muestras se montaron en el portaobjetos con solución DAPI.

9. Transformación bacteriana

Las bacterias de la cepa DH5 α se incubaron por 30 minutos en hielo con solución de KCM (KCl 100 mM, CaCl₂ 30 mM y MgCl₂ 50 mM) y el plásmido pEGFPMIIAP3 (donado por la Dra. Anne Bresnick de la Escuela de Medicina 'Albert Einstein', Nueva York, EEUU). Posteriormente se mantuvieron a 42°C por, exactamente, 2 minutos para luego ser regresadas al hielo nuevamente. Se agregó 1 mL de medio LB (Luria-Bertani: 10g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura y 10 g/L NaCl) y entonces se incubaron a 37°C por 1 hora. Terminado este tiempo, las células se centrifugaron y se sembraron en una caja Petri con agar y con el antibiótico kanamicina a una concentración de 40 μ g/mL. La caja fue incubada a 37°C de 12 a 16 horas.

10. Purificación del plásmido MIDI-PREP

Fue tomada una colonia resultante de la transformación y se incubó en 400 mL de medio LB con el antibiótico (kanamicina 40 μ g/mL) a 37°C toda la noche con agitación. El plásmido fue purificado con el estuche QIAGEN Plasmid Midi Kit.

11. Transfección del plásmido

Se usó el método de transfección de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en células AD293. El plásmido se incubó con la solución de Lipofectamina 2000 por 30 minutos para permitir la formación de los

complejos de ADN/lípido. Esta solución se agregó a las cajas de las células AD293 y estas fueron visualizadas 48 horas después. Se lisaron las células para hacer una inmunoprecipitación contra ISG15. Luego los complejos formados se separaron por electroforesis y se transfirieron. Se practicó un ensayo de coinmunoprecipitación y una inmunodetección de ISG15 para comprobar la interacción entre esta y EGFP-MYHIIA.

12. Análisis bioinformático

Los alineamientos se realizaron usando el programa bioinformático MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) (Edgar, 2004) disponible en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>.

VIII. Resultados

1. Las células MDA-MB-231 como modelo de estudio para la identificación de blancos de ISGilación.

La unión covalente de ISG15 a proteínas blanco es una novedosa modificación post traduccional conocida como ISGilación cuya relevancia funcional no es del todo clara debido a que pocas proteínas se han identificado y validado como proteínas modificadas por ISG15. Con el objetivo de identificar proteínas que pudieran ser modificadas por ISGilación críticas en procesos biológicos se eligió el contexto de cáncer de mama. Se ha descrito que el gen de *ISG15* se sobre expresa en cáncer de mama, en comparación con células de epitelio mamario (Bektas et al., 2008). De los distintos tipos de células derivadas de cáncer de mama, las que se usaron para este estudio pertenecen a la línea MDA-MB-231 la cual proviene de cáncer de mama triple negativo, es decir, no expresan al receptor de estrógenos, el receptor de progesterona ni a HER2, además que son células que tienen características mesenquimales. Como previamente nuestro grupo encontró que los niveles de ISG15 y la porción de ISG15 libre y conjugada dependen del tipo celular, así como su regulación por el IFN- γ , inicialmente se evaluó el perfil de ISG15 y la ISGilación basal y en respuesta al IFN- γ en estas células. De este modo, al realizar una inmunodetección contra ISG15 en extractos totales de estas células basalmente y estimuladas con IFN- γ a diferentes tiempos, se observó que tienen altos niveles de ISGilación y una pequeña porción de ISG15 libre que se ven incrementados con el estímulo del interferón (Figura 5A). Por lo tanto, las células MDA-MB-231 presentan basalmente una gran cantidad de marcas de ISGilación, y consecuentemente constituyen un buen modelo para encontrar blancos de esta modificación post traduccional ISGilación.

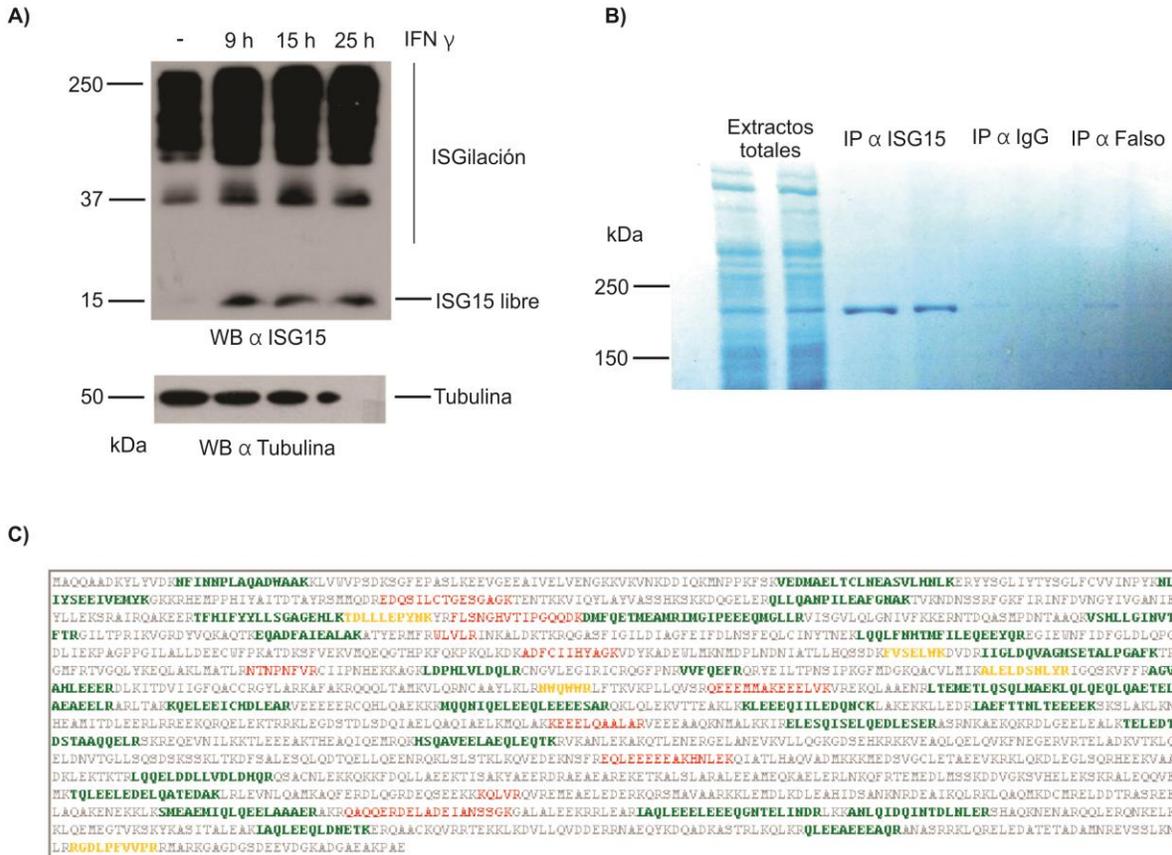


Figura 5. **Identificación de Miosina IIA como posible blanco de ISGilación.** a) Inmunodetección de ISG15 en extractos totales de células MDA-MB-231 con y sin el estímulo de IFN γ a diferentes tiempos. b) Por medio de una inmunoprecipitación contra ISG15, seguida de electroforesis SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, se detectó una banda abundante en extractos totales de estas células (aproximadamente de 250 kDa) que posteriormente se analizó por espectrometría de masas. c) Cobertura en la secuencia de la proteína identificada, donde las secuencias en verde indican una coincidencia exacta con la secuencia de la base de datos, las secuencias en amarillo indican que para que la secuencia sea igual a la secuencia de la base de datos es necesario considerar algún cambio como sustitución de un aminoácido o una desaminación, mientras que las secuencias en rojo denota que es necesario considerar varios cambios para que las secuencias sean idénticas.

En lisados totales obtenidos de estas células se hizo una inmunoprecipitación usando un anticuerpo específico monoclonal contra ISG15 endógena. Los complejos formados fueron separados por medio de SDS-PAGE y el gel resultante fue teñido con azul de Comassie G250 (Figura 5B). En el gel teñido se observaron varias bandas con poca intensidad, pero hay una banda muy enriquecida localizada entre las marcas de pesos moleculares de 150 y 250 kDa. Esta banda fue analizada por medio de espectrometría de masas, que de acuerdo a la cobertura de la secuencia y el grado de similitud con la base de datos de UniProt (Figura 5C) arrojó algunas proteínas candidato tomando a la base de datos de manera general (Tabla 1) y filtrando sólo las pertenecientes a humano (Tabla 2). De acuerdo a estos resultados, la proteína más probable es la miosina 9, también conocida como miosina IIA no muscular (MYHIIA).

Tabla 1. Resultados del análisis de espectrometría de masas usando la base de datos general al 66%.

Unused ProtScore	Total ProtScore	% Cov	Número de acceso	Nombre	Especie	Péptidos mayor a 95
65.3	65.3	31.7	MYH9_HUMAN (P35579)	Myosin 9	HUMAN	35
1.34	41.22	30.6	MYH9_CHICK (P14105)	Myosin 9	CHICK	20
1.15	1.15	4.9	DPLD_DROME (Q9V4M2)	Protein wech	DROME	0
0.92	0.92	5.5	OR33B_DROME (P81915)	Odorant receptor 33b	DROME	0
0.77	0.77	1.9	ZIC3_MOUSE (Q62521)	Zinc finger protein ZIC 3	MOUSE	0
0.74	47.81	29.5	MYH9_RAT (Q62812)	Myosin 9	RAT	23
0.49	0.56	7.1	DNLJ_ZYMMO (P28719)	DNA ligase	ZYMMO	0

Tabla 2. Resultados del análisis de espectrometría de masas usando la base de datos específica de *Homo sapiens* al 66%.

Unused ProtScore	Total ProtScore	% Cov	Número de acceso	Nombre	Especie	Péptidos mayor a 95
66.29	66.29	29.9	A0A024R1N1_HUMAN	Myosin 9	HUMAN	34
0.82	0.82	2.1	I1TBJ5_9VIH	Envelope glycoprotein	9VIH	0
0.7	0.7	4.8	A0A0S3QLS2_9VIH	Gag polyprotein	9VIH	0
0.62	0.62	3	A0A193L0H5_9VIH	Envelope glycoprotein gp160	9VIH	0

Tabla 1 y Tabla 2. El parámetro Unused ProtScore refleja la cantidad total de péptidos únicos relacionados a la proteína analizada, mientras que el número Total ProtScore es la suma de todos los péptidos relacionados a la proteína analizada. El parámetro %Cov indica el porcentaje de aminoácidos que fueron emparejados de los péptidos identificados que tienen un nivel de confianza mayor a 0 dividido por el número total de aminoácidos in la secuencia.

2. Estudio bibliográfico de MYH11A.

Para comprender la relevancia que podría tener la asociación de ISG15 y la MYH11A es necesario conocer a fondo a esta proteína. Algunas características generales se resumen en la Tabla 3.

La proteína MYH11A está constituida por 1960 residuos y tiene un peso molecular de 226.5 kDa. Pertenece a la familia de miosinas las cuales son motores proteicos que producen fuerza y tensión al unirse a filamentos de actina (Dulyanova & Bresnick, 2013). En especial, la miosina II no muscular está involucrada en procesos celulares como la adhesión celular, la migración celular, así como en la arquitectura del celular (Vicente-Manzanares et al., 2009). Esta proteína se encuentra formando un dímero de manera que consta de un dominio globular, un dominio de cuello y el dominio de cola enrollada. En el dominio globular se localizan los motores de ATP-Mg⁺² y las regiones que interactúan con actina. En el dominio de cuello existen dos cadenas ligeras esenciales (ELC) y dos cadenas ligeras regulatorias (RLC). La cola enrollada está formada por dos cadenas largas pesadas que, como su nombre lo indica, se encuentran enrolladas una con la otra, excepto en una pequeña región al final de estas cadenas. La miosina II tiene tres isoformas que son la Miosina IIA, IIB y IIC las cuales son muy parecidas en su secuencia de aminoácidos, difiriendo principalmente en la parte de la cola no enrollada, y son producto de genes independientes (*MYH9*, *MYH10* y *MYH14*, respectivamente). Los filamentos de miosina II pueden asociarse uno con otro de forma antiparalela, y de esta manera, interactúan con filamentos de actina siendo necesaria la hidrólisis de ATP (Newell-Litwa et al. 2015).

Las enfermedades en las que se han detectado mutaciones en el gen *MYH9* son la anomalía de May-Hegglin, el síndrome de Epstein, el síndrome de Fechtner y el síndrome de Sebastian, donde todos los afectados padecen de macrotrombocitopenia (Althaus & Greinacher, 2010).

Tabla 3. Propiedades generales de la Miosina IIA

Gen	<i>MYH9</i>
Loci	22q12.3
Proteína	NMHC IIA
Tamaño de proteína	1960 aminoácidos, 226.5 kDa
Función	Interactúa con fibras de actina controlando la contractilidad celular y la organización de las fibras de estrés. Durante la migración está involucrada en la localización del núcleo.
Patologías	Macrotrombocitopenia, Síndrome de May-Hegglin, Síndrome de Epstein, Síndrome de Fechtner y Síndrome de Sebastian (Althaus & Greinacher, 2010)
Rol en cáncer	Sobre expresado en pacientes con cáncer de mama con mutaciones en el gen <i>BRCA1</i> (Prat et al., 2014)
Ratones Knock Out	Mueren en etapa embrionaria (Matsushita, et al., 2004)
Modificaciones post traduccionales	Sitio
Fosforilación	1800T, 1803S, 1808S, 1916S, 1927P y 1943S (Vicente-Manzanares et al., 2009)
Ubiquitinación	Sitio no identificado (Li et al., 2016)
ISGilación	Sitio no identificado (Giannakopoulos et al., 2005)
Porcentaje de residuos de Lisina	10.56%

En cáncer se ven cambios en la expresión de las isoformas de la miosina II, así como de sus reguladores, dando como resultado el avance de la migración y tumorigénesis (Newell-Litwa et al., 2015). Estos cambios en la expresión de las isoformas de la miosina pueden ser producto de mutaciones en genes supresores de tumores, como el gen *BRCA1*, que en una comparación entre tumores de pacientes con el tipo silvestre de este gen y tumores de pacientes con variantes mutantes, se observó que en estos últimos se sobre expresa el gen *MYH9* (Prat et al., 2014).

La expresión de las diferentes isoformas de la miosina II son específicas del tejido celular (Beach & Hammer, 2015), y en las células MDA-MB-231 sólo están presentes las isoformas A y B teniendo un papel importante durante la migración celular, donde se observó que el silenciamiento de MYHIIA por medio de siRNA ocasiona una reducción en la migración y un incremento en la extensión laminar (Betapudi et al., 2006).

3. Confirmación de la interacción MYHIIA-ISG15.

Ya identificada a la proteína MYHIIA, se investigó en la literatura el anticuerpo para esta proteína que fuera adecuado para las técnicas que se practicaron. Una vez que se adquirió el anticuerpo primeramente se estandarizaron las condiciones de uso del anticuerpo anti-MYHIIA para las técnicas de Western Blot e Inmunofluorescencia. En la Tabla 4 se presentan las condiciones establecidas para estos ensayos. Con estas condiciones se evaluó la distribución celular de ISG15 y MYHIIA en las células MDA-MB-231. En este ensayo se visualizó a ISG15 y a MYHIIA, así como su colocalización dentro de la célula (Figura 6A). Como se aprecia en las imágenes, ISG15 se encuentra distribuido en toda la célula, mientras que la proteína MYHIIA se localiza principalmente en el citoplasma. Ambas proteínas colocalizan mayoritariamente en el citoplasma celular, en la región perinuclear. No obstante, una discreta colocalización de dichas proteínas es detectada en el núcleo. Este resultado nos indica una colocalización endógena de MYHIIA e ISG15 principalmente en el citoplasma de las células derivadas de cáncer de mama MDA-MB-231.

Considerando estos resultados se procedió a la inmunodetección de MYHIIA y posteriormente analizar la interacción entre ISG15 y la MYHIIA. Tomando en cuenta las condiciones estandarizadas para esta técnica (Tabla 4), primero se realizó una inmunoprecipitación en extractos totales de las células usando el anticuerpo anti-ISG15. Estos complejos se separaron por medio de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana para detectar a la MYHIIA mediante un inmunoblot contra esta proteína. Los resultados revelan que en donde fue inmunoprecipitada ISG15, la MYHIIA es detectada, validando el resultado de la espectrometría de masas. Esto sugiere que de manera endógena, esta proteína podría ser ISGilada. (Figura 6B).

Tabla 4. Estandarización del anticuerpo anti-MYHIIA

	Anticuerpo Primario	Anticuerpo secundario
Inmunofluorescencia	1:200	1:750
Western Blot	1:3000	1:25000

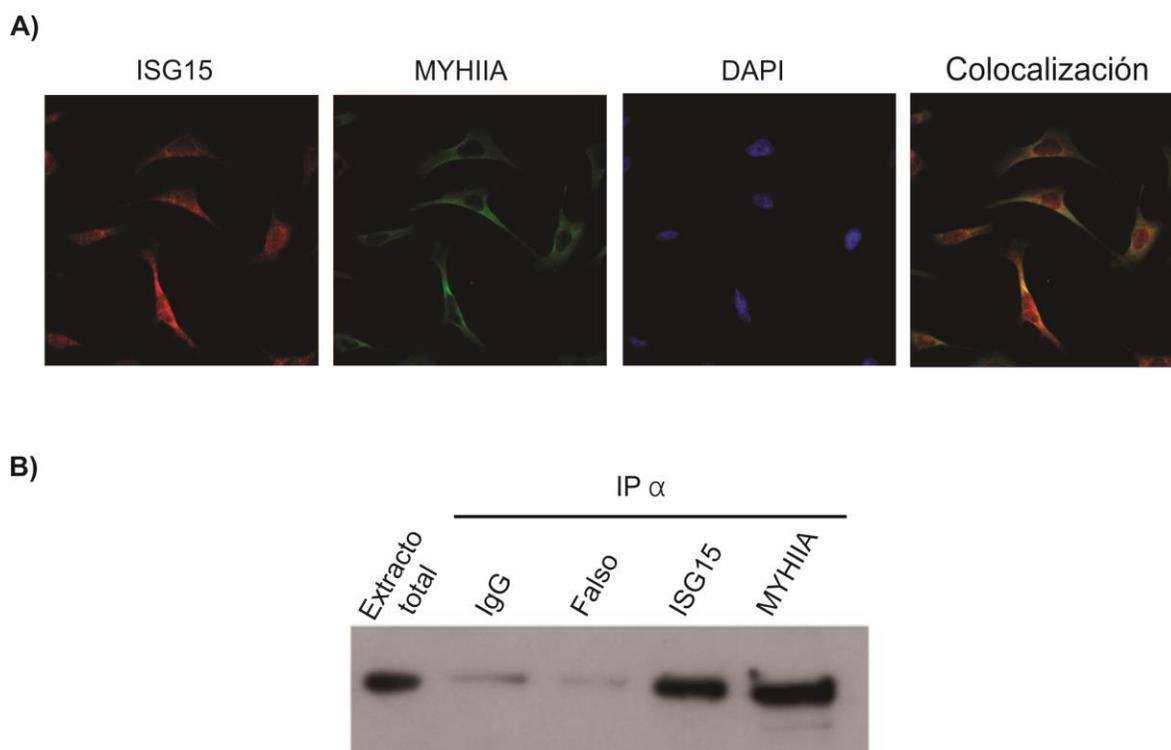
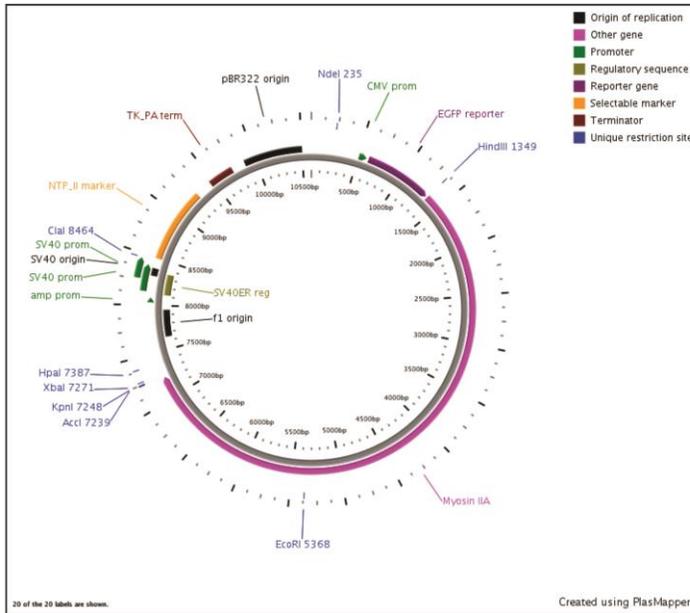


Figura 6. **Confirmación de la interacción MYHIIA-ISG15.** a) El ensayo de inmunofluorescencia reveló que la proteína MYHIIA se encuentra principalmente en el citoplasma, mientras que ISG15 está presente tanto en el núcleo como en el citoplasma, pero ambas proteínas colocalizan en ambos compartimentos. b) Para comprobar la interacción entre estas dos proteínas, se realizó una inmunoprecipitación contra ISG15 y una inmunodetección contra MYHIIA.

4. Asociación de EGFP-MYHIIA e ISG15.

Para ratificar la asociación de ISG15 y MYHIIA se realizó un ensayo de coimmunoprecipitación empleando las células AD293 y la construcción pEGFPMIIAC3 (Figura 7A). Por una parte, las células AD293 derivadas de riñón embrionario humano previamente fueron analizadas y descritas por nuestro grupo, evidenciando también su perfil de ISGilación y sus bajos niveles de ISG15 (Tecalco-Cruz & Mejía-Barreto, 2017) (Figura 7B, panel izquierdo). Estas células resultan un sistema ideal para la expresión de proteína exógenas, por lo que se transfectó por el método de lipofectamina el plásmido pEGFPMIIAC3 que contiene el DNA codificante para la proteína MYHIIA fusionado a la proteína EGFP. En extractos totales de estas células se realizó una inmunoprecipitación usando el anticuerpo monoclonal de ISG15, para luego ser separados por SDS-PAGE y transferidos a una membrana. En esta membrana, por medio de un inmunoblot, la proteína EGFP-MYHIIA fue detectada, demostrando que esta construcción interactúa con ISG15 endógena. Además, en los extractos totales de las células no transfectadas y transfectadas con el plásmido se realizó un Western Blot contra EGFP que fue detectada en las células que fueron transfectadas y contra MYHIIA, detectando dos bandas en las células con la construcción y sólo una banda en las células no transfectadas. La banda más pesada corresponde a EGFP-MYHIIA, mientras que la más ligera es MYHIIA endógena (Figura 7B).

A)



B)

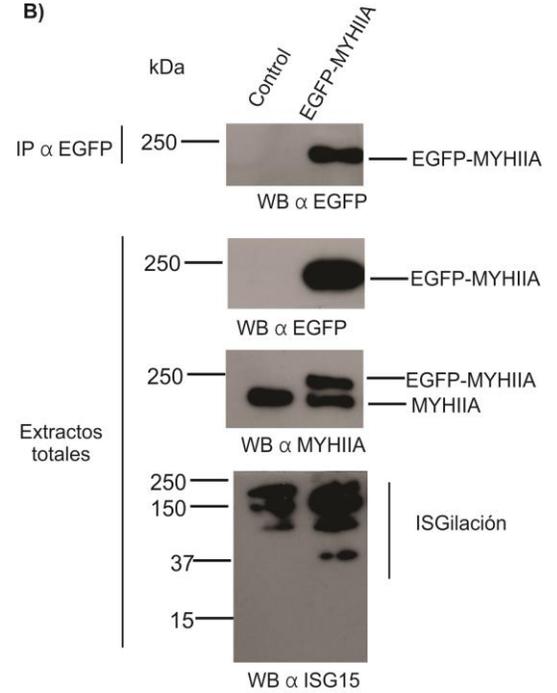


Figura 7. **Modelo de estudio de MYHIIA.** a) Estructura del plásmido pEGFPMIAC3. b) El plásmido fue transfectado en células AD293 en cuyos extractos totales y en extractos inmunoprecipitados contra ISG15 se detectan a las proteínas ISG15, MYHIIA y EGFP.

5. Identificación del sitio putativo de ISGilación.

Aún no se identifica algún patrón compartido en las proteínas ISGiladas para ser susceptibles a esta modificación. Es claro que la MYHIIA es una proteína involucrada en procesos celulares importantes, por lo que su modificación por ISG15 podría interferir en su actividad y contribuir al fenotipo característico del contexto celular. Para identificar el sitio donde la MYHIIA es ISGilada y elucidar la relevancia de la modificación de esta proteína es necesario determinar los posibles residuos modificados por ISG15 y posteriormente llevar a cabo un ensayo de mutagénesis dirigida.

Para abordar este aspecto, se consideró que el resultado de la espectrometría expuso a la isoforma A de la miosina II. Si sólo esta forma está siendo ISGilada, es posible que esta modificación está ocurriendo en algún residuo de lisina que no comparte con las otras dos isoformas en cualquiera de los dominios de estas proteínas. Lo más probable es que estos residuos se encuentren en la cola no enrollada ya que esta parte confiere la especificidad de cada isoforma, además de que ocurren otras modificaciones post traduccionales como fosforilaciones. En esta región, que comprende 160 aminoácidos, se encuentran 3 residuos de lisina que solamente posee la isoforma A (Figura 8).

Este resultado bioinformático sugiere que se puede realizar una mutagénesis dirigida a estos sitios de lisina y cambiarlos a otro residuo, y de esta manera no habría conjugación de ISG15 a MYHIIA. Esto de ser cierto, reduciría a sólo tres probables sitios de unión, para luego ser mutado uno por uno hasta identificar el residuo exacto. En suma, con estos datos obtenidos del análisis bioinformático se propone que los sitios potenciales de ISGilación son los residuos de lisina 1920, 1937 y 1957.

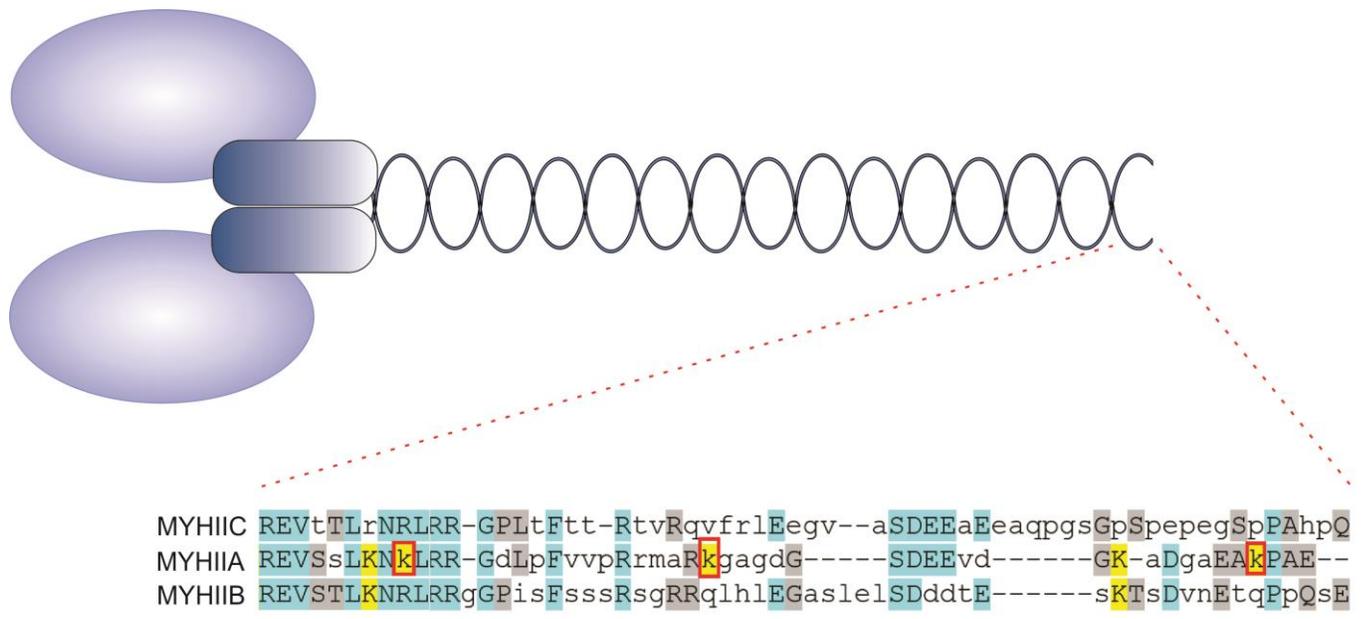


Figura 8. **Posibles sitios modificados por ISG15 de Miosina IIA.** En esta pequeña región de la Miosina II se observan más diferencias entre las isoformas A, B y C. En rojo están marcados los residuos de lisina de la MYHIIA que no comparte con las otras dos isoformas, donde probablemente ocurre la ISGilación.

IX. Discusión

La ISGilación de proteínas es una novedosa modificación post traduccional que a la fecha no ha sido ampliamente estudiada como otras modificaciones post traduccionales. Pocas proteínas han sido identificadas y validadas como proteínas reguladas por la ISGilación, y no es completamente clara su relevancia en contextos fisiopatológicos.

A la fecha se ha propuesto que en el sistema inmune, la ISGilación confiere o disminuye la estabilidad de las proteínas blanco y, por su parte, la proteína ISG15 libre actúa como citocina promoviendo la liberación de IFN- γ . El comportamiento como citocina quedaba en duda ya que el receptor no se había identificado. En un estudio reciente, ya se comprobó esta función como citocina, siendo LFA-1 el receptor para ISG15 (Swaim et al., 2017). Usando como estrategia la sobre expresión de la maquinaria de ISGilación, se han descrito algunas proteínas candidato. De estos resultados no ha sido posible encontrar un patrón que permita saber qué requiere una proteína para sufrir esta modificación post traduccional. De manera interesante, la proporción de ISGilación e ISG15 libre es diferente en cada tipo celular, (Tecalco-Cruz & Mejía-Barreto, 2017) por lo que un sistema que contenga abundantes marcas de ISGilación de manera basal sería útil para estudiar la relevancia de esta modificación post traduccional.

En este proyecto hemos evidenciado que las células de cáncer de mama MDA-MB-231 tienen altos niveles de ISGilación a nivel basal y que tras el estímulo con interferón gamma, se incrementa la ISGilación y se detecta la forma libre de ISG15. Estos datos sugieren que la ISGilación de proteínas a nivel basal podría ser crítica para el mantenimiento de las características tumorigénicas de estas células, que como se explicó, tienen una alta capacidad de migración y proliferación. Utilizando estas células bajo condiciones basales, en este trabajo se identificó a MYHIIA como blanco de ISGilación como resultado de la

inmunoprecipitación endógena de ISG15 y su posterior análisis por medio de espectrometría de masas.

La interacción entre ISG15 y MYHIIA se comprobó por medio de una coimmunoprecipitación, además que se observó que esta proteína se localiza principalmente en el citoplasma, mientras que ISG15 se encuentra en ambos compartimentos. También se demostró que estas dos proteínas colocalizan en el citoplasma, en la región perinuclear, y un poco en el núcleo de las células.

Dado que basalmente en estas células no se detectó ISG15 en su forma libre, es posible considerar que esta proteína encontrada está unida de forma covalente a ISG15. Además, las células AD293 en las cuales se transfectó el plásmido de EGFP-MYHIIA, no presentan ISG15 libre y es evidente que existe esta interacción con ISG15 endógena y EGFP-MYHIIA mediante ISGilación. Realizando una búsqueda en la literatura sobre MYHIIA e ISG15, se encontró que previamente se había sugerido a esta proteína como blanco de ISGilación en células provenientes de fibroblastos embrionarios de ratón knock-out para USP18 (enzima des-ISGilasa) y en células de humano de la línea U937 provenientes de linfoma de histiocitos, y tratadas con interferón beta y sobreexpresando el sistema enzimático de ISGilación e ISG15 por Giannakopoulos et al., 2005. Este estudio refuerza el resultado obtenido de que la MYHIIA es una proteína modificada por ISGilación de manera endógena en células de cáncer de mama. De hecho, siguiendo metodologías similares en otros tipos celulares, se han reportado otras proteínas que podrían estar siendo modificadas, pero no se confirman estas interacciones ni la función de la ISGilación en esas células. De acuerdo con esto, la ISGilación de la MYHIIA establecida en este trabajo resulta crítica por identificarse como una modificación post traduccional endógena en células derivadas de cáncer de mama con características mesenquimales bajo condiciones basales sugiriendo que la ISGilación de MYHIIA podría ser necesaria para el fenotipo de estas células.

De manera relevante se ha encontrado que el silenciamiento de ISG15 en las células MDA-MB-231 disminuye la capacidad migratoria y proliferativa de estas células, además de que observaron un avance en la transición mesénquima-epitelio (Burks et al., 2014, Desai et al., 2012). Dado que las marcas de ISGilación son muy abundantes en estas células, es probable que la interacción covalente entre ISG15 y sus proteínas blanco promuevan el comportamiento invasivo de estas células de cáncer de mama. En cuanto a la MYHIIA, esta proteína es crítica en la migración celular siendo clave en el control de la extensión laminar (Betapudi et al., 2006), por lo que su modificación por ISGilación podría ser clave en el control de sus funciones.

La miosina II forma dímeros de forma antiparalela, y de esta forma los dominios globulares pueden interactuar con las fibras de actina formando la actomiosina (Vicente-Manzanares, et al. 2009). La miosina II es clave para la contracción y la extensión de las fibras de actina (Murrel, et al., 2015). Cabe mencionar que estas proteínas son altamente reguladas por medio de fosforilaciones ya que se ha visto que la fosforilación de la cadena ligera regulatoria, que es compartida por las tres isoformas, aumenta la actividad de estas proteínas. Las fosforilaciones en la cadena pesada pueden afectar la interacción con otras proteínas como S100A4 debido a la fosforilación del residuo de serina 1943 de la MYHIIA (Vicente-Manzanares et al., 2009). La ISGilación de esta proteína podría estar asociada a la modificación de MYHIIA por diversas cinasas ó que la modificación por ISG15 module su fosforilación. De ser cierto lo último, la ISGilación controlaría la actividad e interacción con otras proteínas de la MYHIIA (Figura 9).

Las células MDA-MB-231 presentan características mesenquimales y son altamente invasivas y muestran un patrón de alta ISGilación, siendo una de sus proteínas blanco MYHIIA. Por otro lado, se ha descrito que la MYHIIA se encuentra fosforilada durante la transición epitelio-mesénquima (Beach et al., 2011), por lo que es posible que la interacción entre ISG15 y la MYHIIA ocurra en

otros contextos celulares con fenotipo mesenquimal, y que incluso esta modificación sea importante para la transición epitelio-mesénquima teniendo relación con el estado de fosforilación de esta proteína.

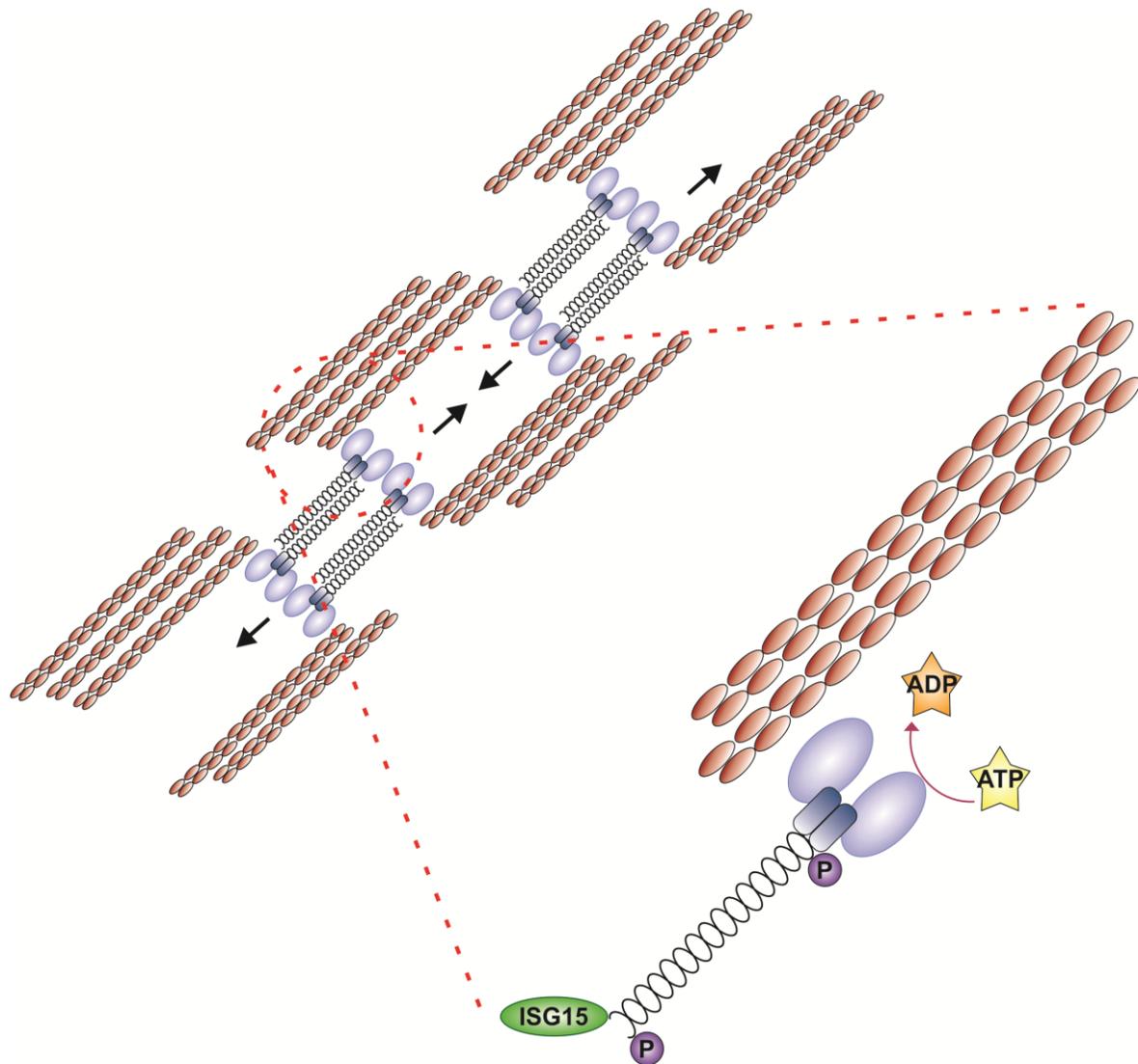


Figura 9. **Modelo propuesto sobre la modulación de la actividad de MYHIIA por medio de ISGilación.** La proteína MYHIIA interactúa con actina formando la actomiosina, llevando a cabo el proceso de contracción de las fibras de actina. Su actividad como motor a base de ATP está modulada por fosforilaciones en su dominio regulador, así como en la cola no enrollada. En este proyecto se propone que su modificación mediante ISGilación podría regular su actividad en conjunto con la fosforilación.

X. Conclusiones

La proteína ISG15 se encuentra asociada a la proteína MYHIIA en las células derivadas de cáncer de mama MDA-MB-231 bajo condiciones basales. Dado que MYHIIA es importante en la migración celular su modificación por ISGilación podría modular su actividad e influir sobre las características tumorigénicas de estas células dando a ISG15 una función regulatoria al enlazarse con esta proteína.

XI. Perspectivas

En este proyecto se identificó la interacción entre ISG15 y MYHIIA de manera endógena, y puesto que los niveles de ISGilación e ISG15 libre se modulan por IFN γ , se estudiará la regulación de la interacción por este interferón.

Es conveniente realizar la mutagénesis de los sitios propuestos en el plásmido de la construcción de EGFP con MYHIIA para poder determinar el residuo que sufre esta modificación y con ello conducir estudios funcionales comparando el efecto de la expresión de la forma mutada de la MYHIIA con respecto a la no mutada y así identificar el efecto que tiene la ISGilación de MYHIIA.

El estudio de la ISGilación de esta proteína ayudaría a entender la importancia de la sobre expresión de ISG15 encontrada en el cáncer de mama y su posible establecimiento como blanco terapéutico para este desorden.

XII. Referencias

- Althaus, K & Greinacher, A. (2010). MYH-9 related platelet disorders: strategies for management and diagnosis. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 37:260-267.
- Bach, E. A., Aguet, M. & Schreider, R. D. (1997). The IFN γ receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling". *Annual Reviews Immunology*, 15: 563-591.
- Beach, J. R. & Hammer, J. A. (2015). Myosin II isoform co-assembly and differential regulation in mammalian systems. *Experimental Cell Research*, 334(1), 2-9.
- Beach, J. R., Hussey, G. S., Miller, T. E., Chaudhury, A., Patel, P., Monslow, J., Zheng, Q., Keri, R. A., Reizes, O., Bresnick, A. R., Howe, P. H. & Egelhoff, T. T. (2011). Myosin II isoform switching mediates invasiveness after TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition. *PNAS*, 108 (44), 17991-17996.
- Bektas, N., Noetzel, E., Veeck, J., Press, M. F., Kristiansen, G., Naami, A., Hartmann, A., Dimmler, A., Beckmann, M. W., Knüchel, R., Fasching, P. A. & Dahl, E. (2008). The ubiquitin-like molecule interferon-stimulated gene 15 (ISG15) is a potential prognostic marker in human breast cancer. *Breast Cancer Research*, 10, 4.
- Betapudi, V., Licate, L. S. & Egelhoff, T. T. (2006). Distinct roles of nonmuscle myosin II isoforms in the regulation of MDA-MB-231 breast cancer cell spreading and migration. *Cancer Research*, 66, 9.
- Burks, J., Reed, R. E. & Desai, S. D. (2014). ISGylation governs the oncogenic function of Ki-Ras in breast cancer. *Oncogene*, 33, 794-803.
- Burks, J., Reed, R. E. & Desai, S. D. (2015). Free ISG15 triggers an antitumor immune response against breast cancer: a new perspective. *Oncotarget*, 6, 9.
- Desai, S. D. (2015). ISG15: A double edged sword in cancer. *Oncolmmunology*, 4: 12.
- Desai, S. D., Reed, R. E., Burks, J., Wood, L. M., Pullikuth, A. K., Haas, A. L., Liu, L. F., Breslin, J. W., Meiners, S. & Sankar, S. (2012). ISG15 disrupts cytoskeletal architecture and promotes motility in human breast cancer cells. *Experimental Biology and Medicine* 237: 38-49.

Dulyaninova, N. G. & Bresnick, A. R. (2013). The heavy chain has its day. *BioArchitecture*, 3:4, 77-85.

Durfee, L. A., Lyon, N., Seo, K. & Huibregtse, J. M. (2010). The ISG15 conjugation system broadly targets newly synthesized proteins: implications for the antiviral function of ISG15. *Molecular Cell*, 38, 722-732.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797.

Fensterl, V. & Sen, G. C. (2009). Interferons and viral infections. *BioFactors*, DOI: 10.1002/biof.6.

Giannakopoulos, N. V, Luo, J. K., Papov, V., Zou, W., Lenschow, D. J., Jacobs, B. S., Borden, E. C., Li, J., Vingin, H. W. & Zhang, D. E. (2005). Proteomic identification of protein conjugated to ISG15 in mouse and human cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336, 496-506.

Green, D. S., Young, H. A. & Valencia, J. C. (2017). Current prospects of type II interferon γ signaling and autoimmunity. *Journal of Biological Chemistry*, 292(34), 13925-13933.

Jeon, Y. J., Yoo, H. M. & Chung, C. H. (2010). "ISG15 and immune diseases". *Biochimica et Biophysica Acta* 1802, 485-496.

Knight Jr, E. & Cordova, B. (1991). IFN-induced 15-kDa protein is released from human lymphocytes and monocytes. *The Journal of Immunology*, 146(7), 2280-2284.

Lin, F. & Young, H. A. (2014). Interferons: Success in anti-viral immunotherapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 25, 369-376.

Matsushita, T., Hayashi, H., Kunishima, S., Hayashi, M., Ikejiri M., Takeshita, K., Yuzawa, Y., Adachi, T., Hirashima, K., Sone, M., Yamamoto, K., Takagi, A., Katsumi, A., Kawai, K., Nezu, T., Takahashi, M., Nakashima, T., Naoe, T., Kojima, T. & Saito, H. (2004). Targeted disruption of mouse ortholog of the human MYH9 responsible for macrothrombocytopenia with different organ involvement: hematological, nephrological, and otological studies of heterozygous KO mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325(4), 1163-1171.

Murrel, M., Oakes, P. W., Lenz, M. & Gardel, M. L. (2015). Forcing cells into shape: the mechanics of actomyosin contractility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(8), 486-498.

Newell-Litwa, K. A., Horwitz, R. & Lamers, M. L. (2015). Non-muscle myosin II in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Disease Models & Mechanisms*, 8, 1495-1515.

Prat, A., Cruz, C., Hoadley, K. A., Díez, O., Perou, C. M. & Balmaña, J. (2014). Molecular features of the basal-like breast cancer subtype based on BRCA1 mutation status. *Breast Cancer Res Treat*, 147, 185-191.

Pollard, K. M., Cauvi, D. M., Toomer, C. B., Morris, K. V. & Kono, D. H. (2013). Interferon- γ and systemic autoimmunity. *Discovery Medicine*, 16(87), 123-131.

Swaim, C. D., Scott, A. F., Canadeo, L. A. & Huibregtse, J. M. (2017). Extracellular ISG15 signals cytokine secretion through the LFA-1 integrin receptor. *Molecular Cell*, 68, 581-590.

Tecalco-Cruz & Mejía-Barreto (2017). Cell type-dependent regulation of free ISG15 levels and ISGylation. *Journal of Cell Communication and Signaling*, DOI:10.1007/s12079-017-0385-7.

Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S. & Horwitz, A. R. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(11), 778-790.

Wack, A., Terczyńska-Dyla, E. & Hartmann, R. (2015). Guarding the frontiers: the biology of type III interferons. *Nature Immunology*, 16, 802-809.

Zhang, D. & Zhang, D. E. (2011). Interferon-stimulated gene 15 and the protein ISGylation system. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 31, 1.

XIII. Anexos

Este trabajo se presentó en el XX Congreso de Carteles “Lino Díaz de León”, el día 29 de septiembre de 2017 en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, resultando ganador a nivel licenciatura.



Miosina IIA es una proteína blanco de ISGilación en células de cáncer de mama

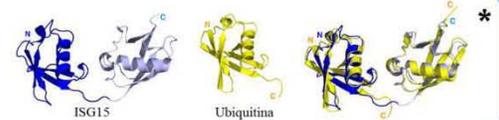
Eduardo Cruz & Ángeles C. Tecalco-Cruz*
 Departamento de Biología Molecular y Biotecnología
 Programa de Investigación de Cáncer de Mama.
 Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Introducción

La inducción de la expresión del gen *ISG15* había sido reportada exclusivamente por interferones α/β . No obstante, recientemente en nuestro laboratorio se ha identificado que *ISG15* es también modulado por el estímulo del interferón γ . Este gen codifica para una proteína de 15 kDa, la cual contiene dos dominios parecidos a la ubiquitina. La proteína *ISG15* se enlaza covalentemente a diversas proteínas mediante un proceso denominado ISGilación, pero cuando no se encuentra unida a proteínas se conoce como *ISG15* libre (Burks et al., 2015). En nuestro laboratorio hemos observado que la expresión y la abundancia de *ISG15* libre y la ISGilación son dependientes del tipo celular y al parecer también de la condición normal o transformada (Tecalco-Cruz & Mejía Barreto, 2017), y en particular en cáncer de mama *ISG15* es sobreexpresado. Las funciones de la ISGilación no son completamente claras, y aunque algunas proteínas se han propuesto como proteínas modificadas por ISGilación, no todas ellas han sido validadas, ni ha sido demostrada su relevancia biológica.

Comparación entre ubiquitina e ISG15.

	Ubiquitina	ISG15
N-terminus	MDIYK	MDIYK
C-terminus	GG	GG
Ubiquitina	--mqIfVKtlGKtIlEVEpSdTienvKAKIqdkeGippdQrLrLif--aGKqLEDgrtLSDYniqkeSTlhLVLRIrGG-----	
ISG15_carboxilo	--LsIlVrnkGRssTyEVrItqVahLkQvsgleGvqddlFwLTF--eGKpLEDqLPLgEYGLkP1STVfnnLRlR6Gtepggrs	
ISG15_amino	mgwdltVKmlaGnefvslssSmsVsELKAQItqKIGVhafQrLlavhpsGvalQdrvPLAsqLgPgSTVIlvvdKcdep-----	



Hipótesis. La identificación de proteínas que son modificadas por ISGilación y/o interactúan con ISG15 podría ayudar a entender la relevancia biológica de ISG15 en células de cáncer de mama.

Objetivo. Identificar y caracterizar a las proteínas asociadas a ISG15 y/o modificadas por ISGilación.

Metodología. Para la identificación de las proteínas ISGiladas se usaron las células de cáncer de mama MDA-MB231. Los extractos totales de estas células fueron inmunoprecipitados usando un anticuerpo específico monoclonal para ISG15, y posteriormente fueron separados por medio de electroforesis SDS-PAGE seguida de tinción con azul de Coomassie. Una de las bandas visibles fue analizada por espectrometría de masas. Además se realizaron ensayos de inmunofluorescencia, co-inmunoprecipitación y análisis bioinformáticos.

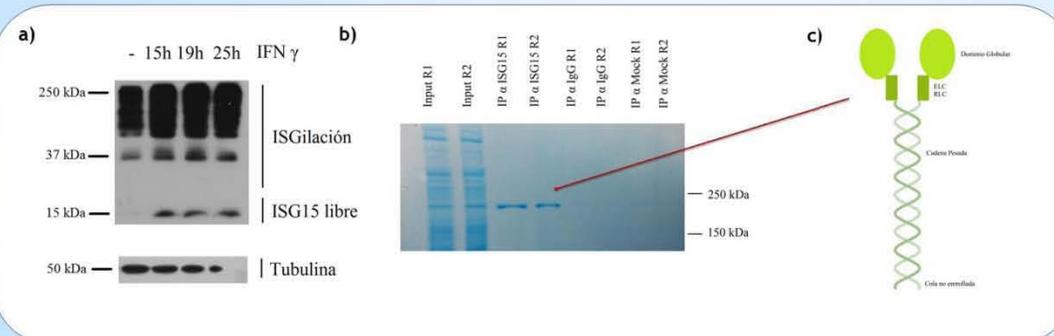


Figura 1. Identificación de Miosina IIA como posible blanco de ISGilación. a) Las células de la línea MDA-MB-231 presentan basalmente altos niveles de ISGilación, que se ven enriquecidos con el estímulo del IFN γ . b) Por medio de una inmunoprecipitación contra ISG15, seguida de electroforesis SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, se detectó una banda abundante en extractos totales de estas células (aproximadamente de 250 kDa) que posteriormente se analizó por espectrometría de masas. c) El resultado de la espectrometría reveló que esa banda es Miosina IIA no muscular.

Figura 2. Confirmación de la interacción Miosina IIA-ISG15. a) El ensayo de inmunofluorescencia reveló que la Miosina IIA no muscular se encuentra principalmente en el citoplasma, mientras que ISG15 está presente tanto en el núcleo como en el citoplasma, pero ambas proteínas colocalizan en ambos compartimentos. B) Para comprobar la interacción entre estas dos proteínas, se realizó una inmunoprecipitación contra ISG15 y una inmunodetección contra Miosina IIA no muscular.

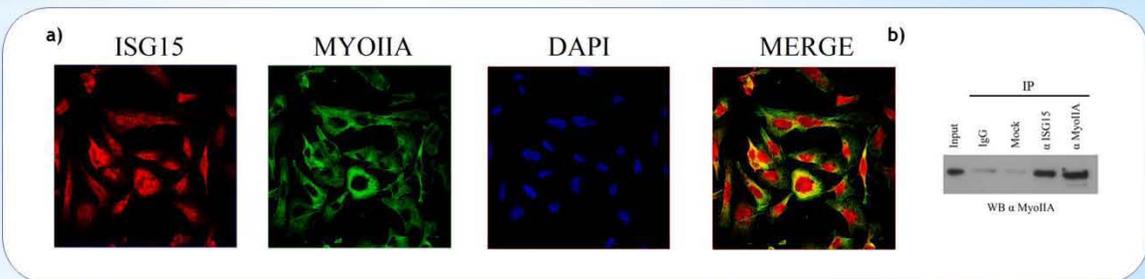
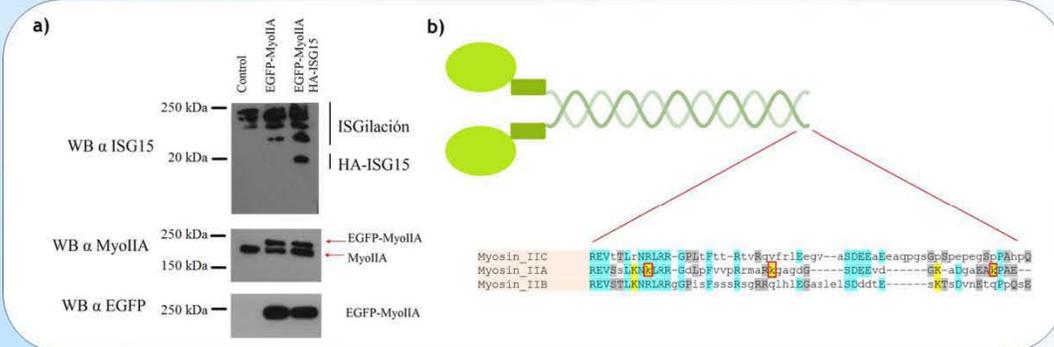


Figura 3. Determinación del sitio de ISGilación. a) Análisis de la expresión de EGFP-Miosina IIA y HA-ISG15 en células AD293. b) Análisis bioinformático de los probables residuos de la Miosina IIA no muscular modificados por ISGilación.



Conclusiones

ISG15 se une a la Miosina IIA no muscular en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 donde podría tener impacto en la migración celular.

Referencias

Burks, J., Reed, R. E. & Desai, S. (2015). Free ISG15 Triggers an Antitumor Immune Response Against Breast Cancer: A New Perspective. *Oncotarget*, 6, 9.
 Jeon, Y., Yoo, H. & Chung, C. (2010). ISG15 and Immune Diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1802, 485-496.*
 Tecalco Cruz, A. & Mejía-Barreto, K. (2017). Cell Type-Dependent Regulation of Free ISG15 Levels and ISGylation. *Journal of Cell Communication and Signaling*, DOI:10.1007/s12079-017-0385-7.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Instituto de Investigaciones Biomédicas

otorga el presente

Reconocimiento

A **Juan Eduardo Cruz Ramos**

como autor del

Cartel Ganador del Departamento de Biología
Molecular y Biotecnología en la categoría de
Licenciatura del

XX Congreso de Carteles “Lino Díaz de León”

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad Universitaria, a 29 de septiembre de 2017



Dra. Patricia Ostrosky Shejet
Directora

