



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“Identificación de proteínas modificadas por la proteína ISG15”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

I.Q. Juan Eduardo Cruz Ramos

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Marina Macías Silva
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Ángeles Tecalco Cruz
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Leticia Rocha Zavaleta
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Ciudad de México. Marzo, 2019



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.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Marina Macías Silva del laboratorio 225 Norte del Departamento de Biología Celular y Desarrollo, en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y bajo la asesoría de la Dra. Angeles C. Tecalco Cruz en el laboratorio C-138 del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (con apoyo de PAPIIT No. IA200916).

A la Biol. Marcela Sosa Garrocho, Técnica Académica del laboratorio, por su asesoría durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez, responsable de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por su respaldo técnico.

Al Dr. Josué O. Ramírez Jarquín por su asesoría técnica, y a la Dra. Bibiana Ortega-Domínguez por su apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A los miembros de mi Comité Tutoral: Dra. Angeles C. Tecalco y Dra. Leticia Rocha, por los comentarios y sugerencias sobre mi trabajo.

A los miembros de mi Jurado de examen: Dra. Mahara Valverde, Dra. Martha Robles, Dr. Leonardo Peraza, Dr. Francisco Torres y Dra. Claudia Gonzalez, por la revisión y los comentarios sobre mi trabajo.

A los miembros de la Unidad de Biología Molecular del IFC, UNAM, por su asesoría, apoyo técnico y servicios de generación de oligonucleótidos y secuenciación: Dra. Laura Ongay Larios, Biól. Ma. Guadalupe Códiz Huerta y M. en C. Minerva Mora Cabrera.

A los miembros del Taller de Mantenimiento del IFC, UNAM: el Ing. Aurey Lobato Galván y el Ing. Manuel Ortíz Benavides, por su aportación en el mantenimiento del equipo del laboratorio.

A los miembros de la Unidad de Cómputo del IFC, UNAM, por su asesoría, apoyo técnico y servicios prestados: M. en C. Gerardo Coello Coutiño, M. en C. Ana María Escalante Gonzalbo, Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo y Ing. Ivett Rosas Arciniega, y demás miembros de la Unidad.

A los miembros de la Unidad de Imagenología del IFC, UNAM, por su asesoría y apoyo técnico: Dra. Ruth Rincón Heredia, Dr. Abraham Rosas Arellano y Med. Cir. Rodolfo Paredes Díaz.

A los miembros de Bioterio del IFC, UNAM, por su asesoría y apoyo técnico: M.V.Z. Claudia V. Rivera Cerecedo, M.V.Z. Héctor Malagón Rivero, y M.V.Z. Gabriela Xochitl Ayala Méndez.

Al Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM, al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría y al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo proporcionado para el VI Congreso de Transducción de Señales (22-26 de octubre de 2017).

ÍNDICE

	Resumen	1
	Abreviaturas	2
I	INTRODUCCIÓN	3
	1. Ubiquitina y proteínas parecidas a la ubiquitina	3
	2. ISG15 y la ISGilación	5
	3. Proteínas ISGiladas	8
II	ANTECEDENTES	14
	1. ISG15 y la ISGilación es dependiente del tipo celular	14
	2. Transición epitelio-mesénquima	14
III	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
IV	HIPÓTESIS	17
V	OBJETIVOS	17
VI	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	18
VII	MATERIALES Y MÉTODOS	19
VII	RESULTADOS	25
	1. Perfil de ISGilación en células con fenotipo epitelial y mesenquimal	25
	2. Inmunoprecipitación de complejos proteicos	28
	3. Identificación de proteínas asociadas a ISG15 por espectrometría de masas	29
	4. Análisis bibliográfico de las proteínas identificadas.	29
	5. Interacción de ISG15 y NMIIA <i>in vivo</i>	34
	6. Interacción endógenas de ISG15 y NMIIA en células de cáncer de mama	35
	7. Análisis de las modificaciones post traduccionales e interactoma	37
	8. Identificación de sitios de ISGilación de NMIIA	38
IX	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	41
X	CONCLUSIONES	47
XI	PERSPECTIVAS	47
XII	REFERENCIAS	48
XIII	ANEXOS	57

RESUMEN

La proteína ISG15 pertenece a la familia de proteínas parecidas a la ubiquitina. Puede ser encontrada en dos formas: ISG15 libre; y ISG15 unida a proteínas de manera covalente, proceso que es conocido como ISGilación. La ISGilación es una modificación post-traducciona que sigue un proceso similar a la ubiquitinación, pero las funciones de esta modificación aún no son claras y son pocos los blancos que se han caracterizado para determinar el efecto de la ISGilación sobre ellas. El patrón de ISGilación y la presencia de ISG15 libre, es dependiente del contexto celular.

En este trabajo se elucidaron las diferencias en el patrón de ISGilación entre células de cáncer de mama con fenotipo predominantemente epitelial (MCF-7) y células con un fenotipo que exhibe características epiteliales y mesenquimales (MDA-MB-231); y en hepatocitos primarios de rata cultivados *in vitro*, los cuales, al inicio del cultivo (1 a 2 días) tienen un fenotipo predominantemente epitelial, pero sufren una transición epitelio-mesénquima parcial tras varios días de cultivo (3 a 7 días), adquiriendo un fenotipo que exhibe tanto características epiteliales como mesenquimales. Las células MDA-MB-231 y los hepatocitos de 1 a 2 días de cultivo mostraron un patrón de ISGilación incrementado.

Por medio de un ensayo de co-inmunoprecipitación se purificó a la proteína ISG15, y mediante un análisis por espectrometría de masas se identificó, entre las proteínas asociadas, a la proteína endógena NMIIA como un blanco de ISGilación en las células de cáncer de mama y en los hepatocitos cultivados *in vitro*, ambos con características mesenquimales; mientras que en los hepatocitos cultivados *in vitro* con un fenotipo predominantemente epitelial, se identificó a la proteína Cps1 como otro blanco de ISGilación.

La proteína NMIIA es importante en la remodelación del citoesqueleto de actina, formando la actomiosina, además de contraer las fibras de actina. Por medio de inmunofluorescencia fue analizada la distribución subcelular de esta proteína en células de cáncer de mama, en donde se observó que se encuentra principalmente en el citoplasma, y también en este compartimento, presenta colocalización con la proteína ISG15.

La interacción específica entre NMIIA e ISG15 se demostró en un sistema de sobre-expresión por transfección en células AD293, así como de manera endógena en células de cáncer de mama por medio de una coimmunoprecipitación. Estos resultados comprueban la modificación de NMIIA por ISG15. NMIIA es altamente regulada por modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, además el análisis del interactoma de NMIIA mostró a proteínas involucradas en la regulación del citoesqueleto de actina, en las adhesiones focales y en las uniones estrechas.

Los resultados permiten concluir que NMIIA es modificada covalentemente por ISG15; sin embargo, queda por determinar si esta modificación podría modular la actividad de NMIIA, así como sus interacciones con otras proteínas reguladoras de la arquitectura del citoesqueleto.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Trifosfato
CHMP	Proteína cargada con cuerpo multivesicular
Cps1	Carbamoil fosfato sintetasa
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DNA	Ácido dexosirribonucleico
EFP	Proteína de dedo responsiva a estrógeno
EMT	Transición epitelio-mesénquima
ER α	Receptor de estrógenos α
HECT	Homólogo al carboxil terminal de E6-AP
HERC5	Proteína que contiene al dominio HECT y al dominio parecido a RCC1 5
IQGAP1	Proteína con motivo IQ activadora de GTPasa 1
IRF3	Factor regulador de interferón 3
ISG15	Gen 15 estimulado por interferón
LB	Luria Bertani
MALDI-TOF	Desorción/Ionización láser asistida por matriz
NK	Asesina Natural
NMIIA	Miosina IIA no muscular
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
PKR	Proteína cinasa R
RBR	RING-betweenRING-RING
RIG-I	Proteína del gen inducible por ácido retiónico 1
RING	Gen Nuevo Realmente Interesante
RIPA	Radioimmnunoprecipitation
RNA	Ácido Ribonucleico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
STAT1	Transductor de señal y activador de transcripción 1
SUMO	Pequeño modificador relacionado a la ubiquitina
Ubc13	Enzima E2 conjugadora de ubiquitina 13
USP18	Peptidasa específica de ubiquitina 18

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Ubiquitina y proteínas parecidas a la ubiquitina

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos y con un peso molecular de 8.5 kDa que se encuentra presente en células eucariontes y es muy conservada entre especies. Esta proteína es capaz de unirse covalentemente a otras proteínas mediante un proceso denominado ubiquitinación. Tal proceso requiere de tres enzimas: E1 es la enzima activadora de la ubiquitina, que cataliza una reacción de dos pasos dependiente de ATP (Adenosina Trifosfato), resultando en la unión de ubiquitina en el sitio activo de cisteína de la E1, y en la liberación de AMP (Adenosina Monofosfato). Después, la ubiquitina es transferida a la enzima E2 conjugadora que cataliza la transferencia de ubiquitina hacia su sitio activo de cisteína. Por último, la ubiquitina es ligada a la proteína blanco por la enzima E3 ligasa. Esta modificación post-traducciona ocurre principalmente en residuos de lisina, aunque se ha visto que también puede ocurrir en treoninas, cisteínas o serinas (van der Veen & Ploegh, 2012).

Hay tres clases de ligasas: las RING (por sus siglas en inglés, Really Interesting New Gene), las HECT (por sus siglas en inglés, Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus) y las RBR (por sus siglas en inglés, RING-between-RING-RING). Las E3 ligasas RING pueden transferir la ubiquitina a la proteína blanco en una forma directa, mientras que las E3 ligasas HECT primero transfieren a la ubiquitina a sí mismas y luego a la proteína (Zheng & Shabek, 2017). Las E3 ligasas RBR se caracterizan por tener dos dedos RING y en medio un dominio de unión a Zinc. También existen enzimas que rompen el enlace isopeptídico revirtiendo la ubiquitinación y son conocidas como desubiquitininas (DUB) (D'Arcy et al., 2015).

Las funciones de esta modificación post-traducciona dependen del tipo de ubiquitinación que la proteína sufra. Existen la monoubiquitinación, la multimonoubiquitinación y la poliubiquitinación. La monoubiquitinación se ha relacionado a procesos de regulación de proteínas como las histonas, factores de transcripción y proteínas involucradas en la endocitosis, mientras que la poliubiquitinación se ha ligado a la degradación de proteínas

mediada por el proteasoma (Schnell & Hicke, 2003). La multimonoubiquitinación consiste en la monoubiquitinación en varios residuos de lisina y se ha descrito que es importante para la endocitosis y degradación de receptores de tirosina cinasa (Haglund et al., 2003). La poliubiquitinación tiene variantes en donde puede formarse una cadena de ubiquitinas homogénea, que se enlazan por medio del mismo residuo de lisina de las ubiquitinas, o una cadena mezclada, en donde las ubiquitinas forman el enlace covalente en diferentes residuos de lisina de las ubiquitinas. Se ha propuesto que este arreglo de ubiquitinación es capaz de guardar y transmitir información formando el código de la ubiquitina (Komander & Rape, 2012).

Existen proteínas que son parecidas a la ubiquitina y que comparten similitud estructural, ya que contienen un arreglo beta compuesto de cinco hojas beta que envuelven parcialmente a una hélice alfa central (Cappadocia & Lima, 2018).

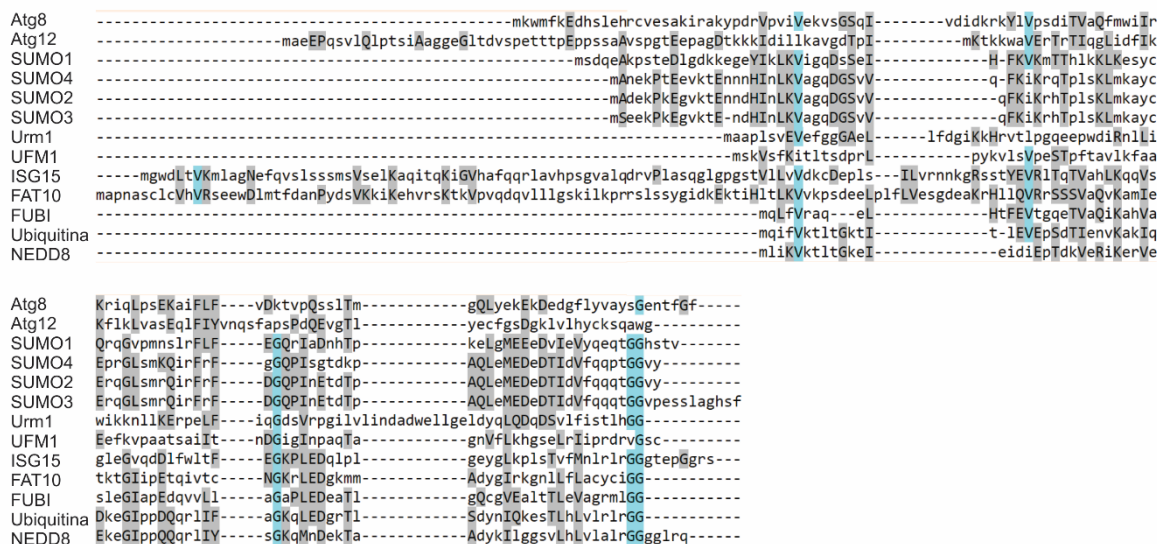


Figura 1. Ubiquitina y proteínas parecidas a la ubiquitina en *Homo sapiens*. El formato usa la convención del editor Belvu que colorea a los residuos de acuerdo a su similitud promedio por la matriz BLOSUM62 (Barson & Griffiths, 2016), donde el color cyan indica una conservación mayor o igual a 3.0, en azul mayor o igual a 1.5 y en gris mayor o igual a 0.5. Las letras en mayúsculas indican residuos conservados en el alineamiento.

Ejemplos de estas proteínas son SUMO1 (por sus siglas en inglés, Small Ubiquitin-Related Modifier), SUMO2, SUMO3, SUMO4, NEDD8 (por sus siglas en inglés, Neural Precursor Cell Expressed Developmentally Down-Regulated Protein 8), FUBI, FAT10, ISG15 (por sus siglas en inglés, Interferon Stimulated Gene 15), Atg8 (por sus siglas en inglés, Autophagy-Related Protein), Atg12, URM1 (por Ubiquitin-Related Modifier 1), y UFM1 (por sus siglas en inglés, Ubiquitin-Fold Modifier 1), entre otras. Estas proteínas conservan el motivo que permite a la ubiquitina ser enlazada a proteínas (Figura 1).

La primera proteína parecida a la ubiquitina en ser identificada fue ISG15, la cual es capaz de modificar covalentemente a proteínas (Hochstrasser, 2009) y sobre la que se enfoca este trabajo.

I.2. ISG15 y la ISGilación

Hasta hace poco tiempo, la inducción de la expresión del gen *ISG15* había sido reportada exclusivamente por interferones tipo I. No obstante, se ha identificado que la expresión de *ISG15* también se modula por el estímulo del interferón gamma (Tecalco-Cruz & Mejía-Barreto, 2017, Tecalco-Cruz & Cruz-Ramos, 2018). Este gen codifica a una proteína de 165 aminoácidos y 17 kDa de peso molecular, la cual sufre un procesamiento proteolítico que consiste en la remoción de 8 residuos en el extremo C-terminal y de la metionina del extremo N-terminal, para llegar a su forma madura que consiste en una proteína de 15 kDa (Knight et al., 1988). Estructuralmente la proteína ISG15 contiene dos dominios parecidos a la ubiquitina, identificados como dominio amino terminal de ISG15 y dominio carboxilo terminal de ISG15. La proteína de ISG15 en su forma madura tiene en el extremo carboxilo terminal la secuencia LRLRGG al igual que la ubiquitina. A pesar de que el porcentaje de identidad de aminoácidos entre la ubiquitina y los dominios de ISG15 es de aproximadamente 30%, sus estructuras son muy similares (Figura 2).

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 (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 3). 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 extremo carboxilo terminal 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. Por último, la E3 ligasa cataliza el enlace isopeptídico entre ISG15 y un residuo de lisina de la proteína blanco. Se han reportado 3 diferentes E3 ligasas de ISG15: EFP (por sus siglas en inglés, Estrogen-responsive Finger Protein), cuyo sustrato es 14-3-3 σ ; HHARI (por sus siglas en inglés, Human Homolog of Ariadne), que conjuga a ISG15 con 4EHP (por sus siglas en inglés, 4E Homolog Protein); y HERC5, la cual se considera la principal E3 ligasa de ISG15 para la mayoría de sus sustratos.

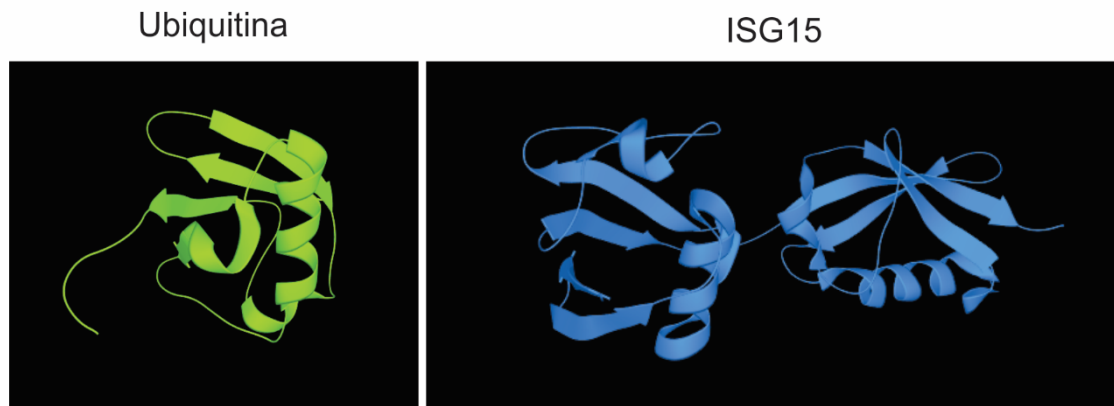


Figura 2. **Estructura de ubiquitina e ISG15.** Imágenes tomadas de Protein Data Bank in Europe (1c3t y 1z2m, respectivamente).

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-traducciona l dinámica de proteínas, que a la fecha ha sido poco estudiada. Adicionalmente, ISG15 puede encontrarse en forma libre.

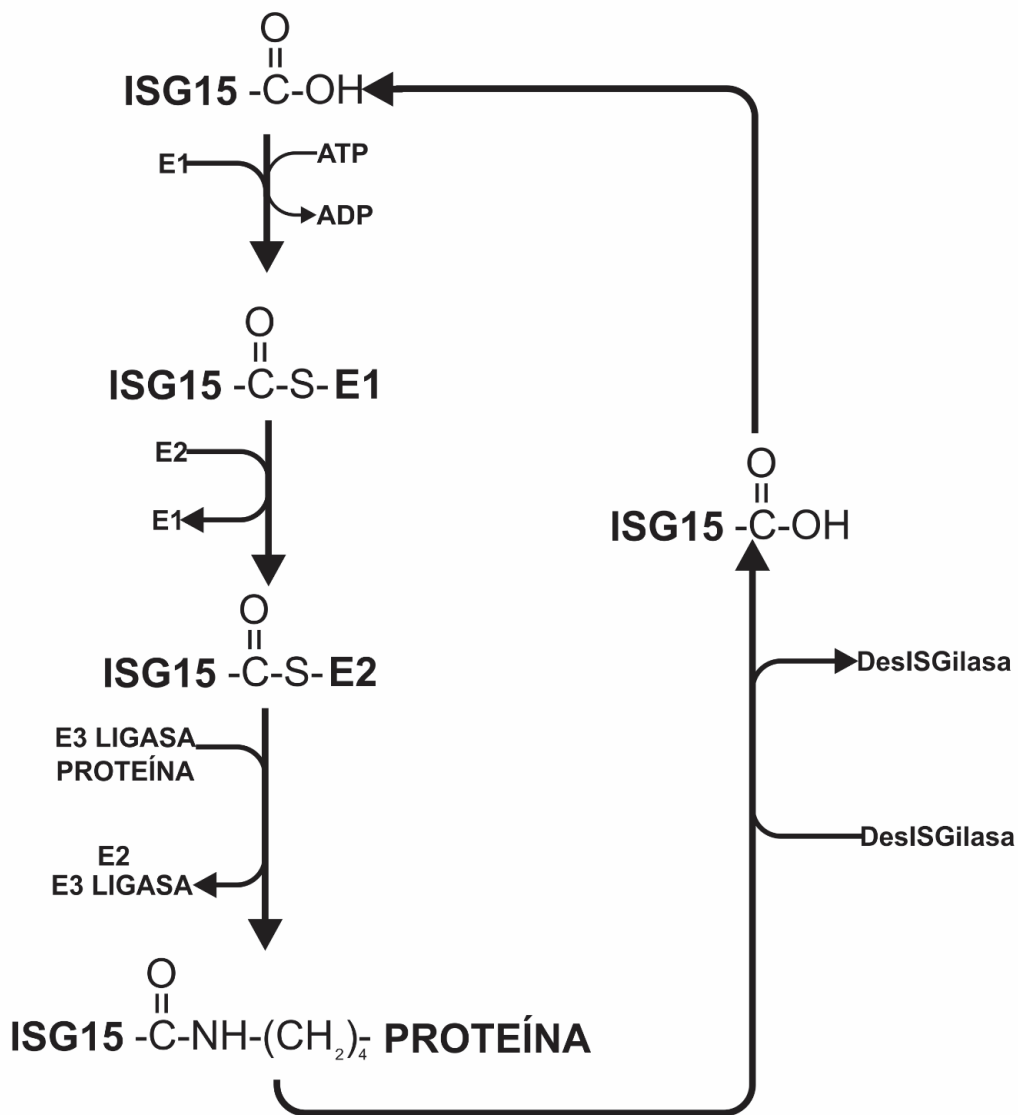


Figura 3. Mecanismo de ISGilación en *Homo sapiens*. Adaptado de Zhang & Zhang, 2011.

Se ha propuesto que ISG15 puede ser una proteína secretada por linfocitos y monocitos, actuando como una citocina que tiene efecto sobre células T, promoviendo la producción de interferón gamma para 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 o de sus conjugados, 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 rol en la respuesta inmune al determinarse que la conjugación de ISG15 podría estar dirigida a proteínas virales recién sintetizadas haciéndolas no funcionales (Durfee et al., 2010).

Por otro lado, también se ha demostrado que la ISGilación puede regular negativamente a la ubiquitinación. El silenciamiento de ISG15 o de la enzima UbcH8 incrementa los niveles de proteínas ubiquitinadas en células de cáncer de mama. De esta manera, la ISGilación puede conferir estabilidad a proteínas evitando su degradación (Desai et al, 2006).

Interesantemente, ISG15 también interviene en la ubiquitinación uniéndose a la ubiquitina. En un estudio, Fan et al., mediante estudios *in vitro*, propusieron que la ubiquitina es blanco de ISGilación sufriendo esta modificación en los residuos 29 y 48, además de que ISG15 también es capaz de modificar a la ubiquitina unida covalentemente a proteínas regulando negativamente su degradación (Fan et al., 2015).

1.3 Proteínas ISGiladas

A pesar de que se han realizado estudios para identificar a proteínas que sufren la modificación post-traducciona por ISG15, y de que a la fecha se han propuesto más de 300 proteínas como blancos putativos de ISGilación (Sgorbissa & Brancolini, 2012), estos estudios no demuestran la relevancia funcional de esta unión covalente. Existen algunos reportes que describen el efecto que tiene la ISGilación sobre alguna proteína en específico. En las tablas 1 y 2 se muestran algunas proteínas ISGiladas, en donde se ha descrito la funcionalidad de ISG15 sobre ellas. Entre las proteínas que se conoce el sitio de ISGilación están 4EFP (por sus siglas en inglés, 4E Homologous Protein), CHIP (por sus siglas en inglés, Carboxyl Terminus of HSC70-interacting Protein), EFP, filamina B, Ubc13 (por sus siglas

en inglés, Ubiquitin-conjugation Enzyme E2 13), IRF3 (por sus siglas en inglés, Interferon Regulatory Factor 3), PKR (por sus siglas en inglés, Protein Kinase R), BECN1, PCNA (por sus siglas en inglés, Proliferating Cell Nuclear Antigen) y ubiquitina; mientras en las que se desconoce el sitio de ISGilación se encuentran RIG-I (por sus siglas en inglés, Retionic Acid-Inducible Gene 1 Protein), CHMP2A (por sus siglas en inglés, Charged Multivesicular Body Protein), CHMP5, CHMP4B, CHMP6, p53, STAT1 (por sus siglas en inglés, Signal Transducer and Activator of Transcription 1), IQGAP1 (por sus siglas en inglés, IQ Motif Containing GTPases Activating Proteín 1) y Tsg101 (por sus siglas en inglés, Tumor Susceptibility Gene 101). Como se muestra en las tablas 1 y 2, son pocos los blancos de ISGilación que se han caracterizado, y en los cuales se ha identificado el sitio de ISGilación.

Tabla 1. **Proteínas ISGiladas con sitios de ISGilación identificados.**

Proteína	Sitio de ISGilación	Contexto celular	Efecto de la ISGilación	E3 Ligasa	Referencia
4EFP (supresor de traducción)	Lys134 y Lys222	Células 293T transfectadas con ISG15, E1, E2, E3 y 4EFP.	Incrementa su unión a ARNs mensajeros evitando su traducción.	HHARI	Okumura et al., 2007.
CHIP (E3 ligasa de ubiquitina)	Lys287 y Lys143/144/145	Células A549 tratadas con interferón alfa.	Promueve su actividad de E3 ligasa de ubiquitina.	HERC5 y EFP	Yoo et al., 2018.
EFP (E3 ligasa)	Lys117	Células 293T transfectadas con ISG15, E1 y EFP.	Regula negativamente su actividad como E3 ligasa de ISG15.	EFP	Zou et al., 2007.
Filamina B (Proteína de unión a actina)	Lys2467	Células A549 estimuladas con interferón alfa o beta.	Evita la interacción de filamina B con MEKK1, MKK4 y RAC1 resultando en una regulación negativa de la atenuación de la vía de JNK activada por interferón.	No especificado.	Jeon et al., 2009.

Ubc13 (E2 de ubiquitina)	Lys92	Células A549 transfectadas con ISG15, E1 y Ubc13.	Previene la formación del enlace tioéster con ubiquitina.	No especificado.	Takeuchi & Yokosawa, 2005.
IRF3 (regulador de transcripción)	Lys193, Lys360, Lys366	Células HEK293 infectadas con virus Sendai.	Atenúa la interacción de IRF3 con Pin1 resultando una prolongada activación de IRF3.	HERC5	Shi et al., 2010.
PKR	Lys69 y Lys159	Células HEK293T transfectadas con E1, E2, E3, ISG15 y PKR.	Activa a PKR fosforilando a eIF2 α para atenuar la traducción de proteínas.	HERC5	Okumura et al., 2013
BECN1 (Activación de complejos PIK3C3)	Lys117, Lys263, Lys265, Lys266	Células H4 estimuladas con interferón alfa.	Inhibe la actividad de las PI3K que es necesaria para la autofagia y la degradación de EGFR.	HERC5	Xu et al., 2015
PCNA (Respuesta daño del ADN)	Lys164, Lys168	Células HeLa irradiadas con UV.	La modificación por ISG15 de PCNA está involucrada en el mecanismo de terminación de la síntesis de translesión de ADN.	EFP	Park et al., 2014.

Ubiquitina (proteína modificadora)	Lys29, Lys48	Células 293T transfectadas con ubiquitina, ISG15, E1 y E2.	Evita la degradación de proteínas ubiquitinadas formando cadenas mixtas de ubiquitina e ISG15.	No especificado.	Fan et al, 2015.
--	--------------	---	--	---------------------	------------------

Tabla 2. **Proteínas ISGiladas con sitios de ISGilación no identificados.**

Proteína	Tipo de ISGilación	Contexto celular	Efecto de la ISGilación	E3 Ligasa	Referencia
RIG-I (inducción de producción de interferón)	MonoISGilación	Células COS-7 transfectadas con ISG15, E1, E2 y RIG-1.	Regula negativamente la respuesta inmune mediada por RIG-I	No especificado.	Kim et al., 2008.
CHMP2A (transporte de proteínas)	MonoISGilación	Células 293E transfectadas con CHMP2A, CHMP5, CHMP4B, CHMP6, ISG15, E1 y E2.	Evita su interacción con LIP5 y VPS4.	HERC5.	Kuang et al., 2011.

CHMP5 (transporte de proteínas)	MonoISGilación	Células 293E transfectadas con CHMP2A, CHMP5, CHMP4B, CHMP6, ISG15, E1 y E2.	Evita su interacción con LIP5.	HERC5.	Kuang et al., 2011.
CHMP4B (Transporte de proteínas)	MonoISGilación	Células 293E transfectadas con CHMP2A, CHMP5, CHMP4B, CHMP6, ISG15, E1 y E2.	Evita su interacción con VSP4.	HERC5.	Kuang et al., 2011.
CHMP6 (Transporte de proteínas)	MonoISGilación	Células 293E transfectadas con CHMP2A, CHMP5, CHMP4B, CHMP6, ISG15, E1 y E2.	Evita su interacción con VSP4.	HERC5.	Kuang et al., 2011.
p53 (Factor de transcripción)	BiISGilación	Células HEK293T transfectadas con p53, E1, E2, E3 e ISG15.	Induce su degradación.	HERC5.	Huang et al., 2014.

STAT1	MonoISGilación	Células RLW infectadas con virus de Hepatitis C y expuestas al sistema de generación de acetaldehído.	Evita la ubiquitinación y degradación de STAT1, prolongando la señalización por interferón.	No especificado.	Ganesan et al., 2016.
IQGAP1 (Proteína de andamiaje)	MonoISGilación	Células HeLa	Regula negativamente su afinidad por las formas activas de RAC1/CDC42.	No especificado.	Cerikan et al, 2016; Cerikan & Schiebel, 2016.
TSG101 (Regulador del tráfico vesicular)	MonoISGilación	Células HEK293 transfectadas con E1, E2, E3 e ISG15.	Promueve su degradación evitando la secreción de exosomas.	No especificado.	Villarroya-Beltri et al., 2016.

II. ANTECEDENTES

II.1. ISG15 y la ISGilación es dependiente del tipo celular

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 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-traducciona se encuentran principalmente en el núcleo.

En un estudio se determinó que la sensibilidad a camptotecina (un inhibidor de la topoisomerasa que es usado en quimioterapia) en células de cáncer de mama depende de la expresión de ISG15, ya que las células que expresan niveles altos de ISG15 tienen mayor sensibilidad a este fármaco, en comparación con células que presentan niveles bajos de ISG15. Al silenciar a UbcH8 (enzima E2 de la ISGilación), las células disminuyen su sensibilidad a camptotecina, demostrando que la ISGilación es responsable de este efecto (Desai et al., 2008). Las diferencias entre el patrón de ISGilación y la cantidad de ISG15 podrían ser clave para el comportamiento de las células. También se demostró que entre las células de cáncer de mama que expresan al receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$) y las que no lo expresan, existen diferencias en la cantidad de ISG15 libre. Las células $ER\alpha+$ tienen una mayor cantidad de ISG15 libre que las células $ER\alpha-$, y además, las células $ER\alpha-$ presentan una mayor ISGilación (Tecalco-Cruz & Cruz-Ramos, 2018).

II.2. Transición epitelio-mesénquima

La transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso que ocurre naturalmente durante el desarrollo de órganos, en la embriogénesis, en la reparación de tejidos, y en la metástasis. Durante la EMT las células epiteliales adquieren una mayor capacidad migratoria, invasiva, resistencia a apoptosis, además de un aumento en la producción de componentes de la matriz extracelular, adoptando un fenotipo mesenquimal (Kalluri & Weinberg, 2009). Se han clasificado tres tipos de EMT basándose en el contexto biológico donde éstas ocurren: el tipo

1 corresponde a la EMT asociada a la implantación, embriogénesis y desarrollo de órganos; el tipo 2 está relacionada con la regeneración de tejido y la fibrosis de órganos; la tipo 3 está involucrada con la progresión del cáncer y la metástasis (Kalluri & Weinberg, 2009). Esta última se ha establecido como un distintivo (hallmark) para el desarrollo de la carcinogénesis, en donde la EMT confiere a las células epiteliales transformadas la capacidad para invadir, resistir la apoptosis, y que logren diseminarse (Hanahan & Weinberg, 2011).

En muestras de lesiones benignas, de carcinomas infiltrantes ductales de bajo grado y de carcinomas infiltrantes ductales de alto grado, todos provenientes de tejido mamario, se encontró que los niveles de vimentina, β -catenina y CD44 aumentaban, sugiriendo que la EMT puede estar relacionada con la desdiferenciación de las células de cáncer de mama (Scimeca et al., 2016).

Respecto al papel de ISG15 en la EMT no se tienen muchos reportes. Sin embargo, un estudio describió que el silenciamiento de ISG15 en células de cáncer de mama, provocaba una disminución en su capacidad de proliferación y migración, además de que había un avance en la transición mesénquima-epitelio (Burks et al., 2014). Debido a que ISG15 puede encontrarse en su forma libre o conjugada a proteínas, no es posible determinar cuál forma de ISG15 es responsable de conferir estas características malignas a las células cancerosas. De esta forma, al también silenciar a la enzima UbcH8 (E2), disminuyen los niveles de proteínas ISGiladas, y se observaban los mismos efectos que al silenciar a ISG15, concluyendo que la ISGilación confiere dichas capacidades oncológicas a las células de cáncer de mama (Burks et al., 2014).

Para comprender la importancia de ISG15 y la ISGilación durante el proceso de la EMT sería muy útil analizar un contexto celular que fácilmente cambie su fenotipo epitelial a uno mesenquimal.

Se ha descrito que los hepatocitos cultivados in vitro en monocapa son capaces de obtener, tras varios días de cultivo, una morfología parecida a la de los fibroblastos (Tuschl & Mueller, 2006). De hecho, también se demostró que sufren una transición epitelio-mesénquima de manera espontánea la cual es acelerada con el estímulo de TGF- β (por sus siglas en inglés, Transforming Growth Factor beta) (Godoy et al., 2009). Con esto, los hepatocitos cultivados

in vitro, pueden ser un modelo ideal para estudiar la ISGilación durante la transición epitelio-mesénquima.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El gen de *ISG15* se induce fuertemente por interferones de tipo I, y recientemente se ha demostrado que también es regulado por el interferón de tipo II; observándose también que el patrón de ISGilación y los niveles de ISG15 libre, así como su modulación por el interferón, son dependientes del contexto celular (Tecalco-Cruz & Mejía-Barreto, 2017).

Además, se ha observado un enriquecimiento de las marcas de ISGilación dentro del compartimento nuclear, sugiriendo que diversas proteínas con actividad dentro del núcleo podrían sufrir esta modificación que podría modular su estabilidad y/o su actividad (Tecalco-Cruz & Cruz-Ramos, 2018).

ISG15 se encuentra sobreexpresado en diferentes tipos de cáncer y, aunque todavía no es claro el rol de ISG15 en estos desórdenes, se ha propuesto que los conjugados de ISG15 podrían tener funciones tumorigénicas mientras que la forma libre tendría propiedades antitumorales (Desai, 2015, Burks et al., 2014). Sin embargo, aún no es completamente clara la función biológica de la ISGilación en procesos como la tumorigénesis y la metástasis. La EMT es un proceso importante en procesos patológicos como la carcinogénesis y en procesos fisiológicos como la embriogénesis, el desarrollo de los órganos y la regeneración de los tejidos, entre otros. La modificación de proteínas por ISGilación podría ser central en el proceso de EMT. De esta manera, inicialmente nos propusimos analizar si existían diferencias en el patrón de ISGilación de proteínas entre células con fenotipo epitelial y fenotipo mesenquimal. Posteriormente, nos enfocamos en identificar proteínas que se asocien a ISG15 covalentemente de manera endógena, en células con fenotipo epitelial y con fenotipo mesenquimal, lo cual nos dió pauta al estudio de la caracterización de las proteínas ISGiladas y de su relevancia funcional.

IV. HIPÓTESIS

Los patrones totales de ISGilación, así como la ISGilación de proteínas específicas serán diferentes en células con características predominantemente epiteliales en comparación con células con una combinación de características epiteliales y mesenquimales, ya sean sanas (hepatocitos en cultivo primario) o transformadas (células de cáncer de mama).

V. OBJETIVOS

General

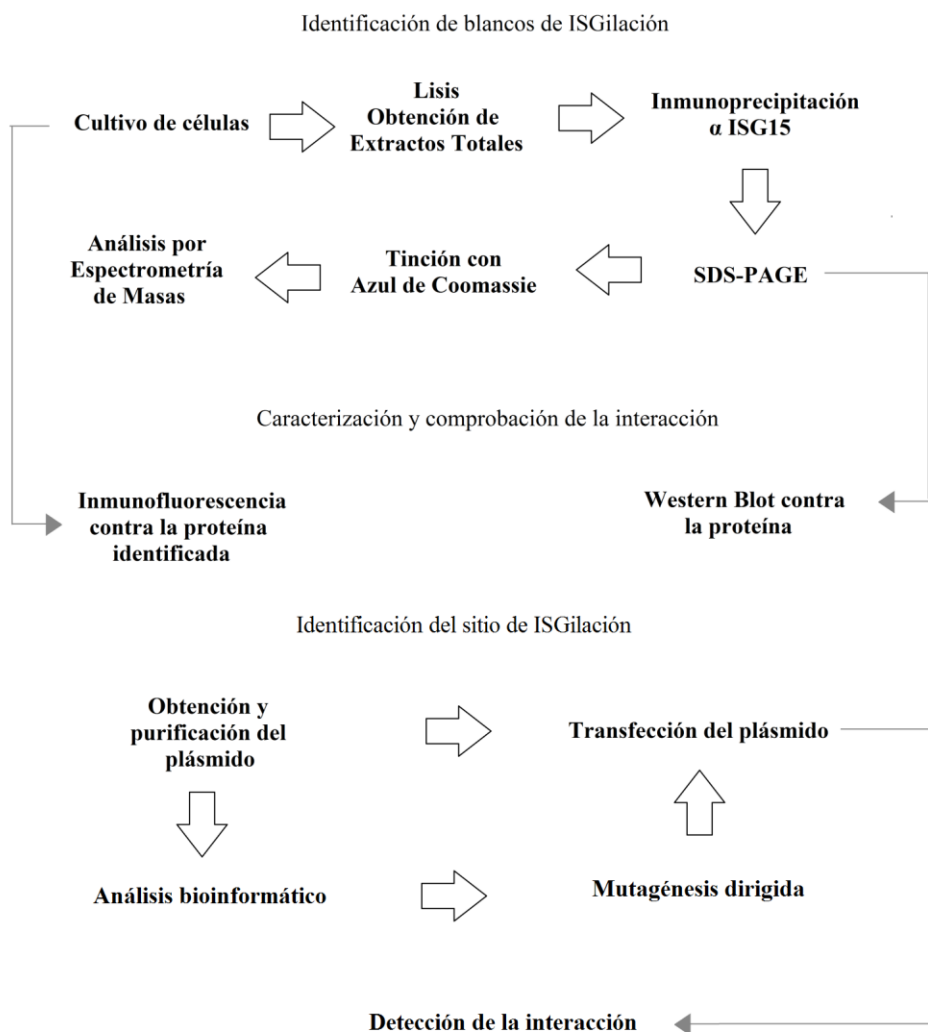
Investigar los patrones totales de ISGilación, así como la ISGilación de proteínas específicas en células sanas y células transformadas, que presenten características predominantemente epiteliales y en células con características epiteliales y mesenquimales.

Particulares

1. Evaluar y comparar los patrones totales de ISGilación entre células de cáncer de mama que presentan predominantemente características epiteliales (MCF-7) y células con una combinación de características epiteliales y mesenquimales (MDA-MB-231).
2. Evaluar los patrones totales de ISGilación en hepatocitos de rata que atraviesan por un proceso tipo EMT parcial, al ser mantenidos en cultivo primario.
3. Identificar proteínas putativas como blanco de ISGilación, en ambos modelos de estudio: hepatocitos primarios y células de cáncer de mama, por espectrometría de masas.
4. Comprobar la unión covalente de ISG15 a las proteínas identificadas como blanco de ISGilación.
5. Investigar el efecto de la ISGilación sobre las proteínas que se identificaron como blanco de ISGilación.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se usaron dos modelos de estudio: el primero de ellos son células de cáncer de mama de las líneas MDA-MB-231 y MCF-7, y el segundo son hepatocitos de rata en cultivos primarios. De estas células se obtuvieron extractos totales de proteínas, con los cuales se realizó una inmunoprecipitación contra ISG15, usando anticuerpos específicos. Las proteínas inmunoprecipitadas se separaron mediante una electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). El gel resultante se tiñó con azul de Coomassie para poder visualizar a las proteínas ISGiladas. Por último, las bandas obtenidas fueron identificadas por espectrometría de masas realizado en el INMEGEN, y así revelar su identidad. Este proceso se muestra en el siguiente Diagrama.



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos y anticuerpos

Los anticuerpos anti-ISG15 (sc-166755), y 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-NMIIA (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). Los medios de cultivo, la solución ProLong Diamond Antifade Mountant con 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) y la Lipofectamina 2000 se obtuvieron de Invitrogen (Waltham, Massachusetts, EEUU). El paquete QIAGEN Plasmid Midi Kit se obtuvo de QIAGEN (Hilden, Alemania). Los reactivos SuperSignal West Pico Stable Peroxidase Solution y Immobilon Western, se obtuvieron de Thermo Fischer Scientific (Waltham, Massachusetts, EEUU) y Millipore (Burlington, Massachusetts, EEUU), respectivamente. El kit de mutagénesis QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (210515) se obtuvo de Agilent Technologies (Santa Clara, California, EEUU). Todos los experimentos fueron realizados en triplicado y las composiciones de las soluciones empleadas se detallan en la sección de Anexos.

2. Cultivo celular

Las células MDA-MB-231 (cáncer de mama humano ER α -/PR-/HER2-), MCF-7 (cáncer de mama humano ER α + /PR+ /HER2-) y AD293 (riñón embrionario de humano) fueron mantenidas en medio DMEM, donde el medio fue complementado con suero bovino fetal al 10% con antibióticos (penicilina y estreptomina 100U/mL).

Los hepatocitos fueron obtenidos de ratas Wistar y se resuspendieron en medio de "Attachment" (suplementado con suero bovino fetal al 10%; detallado en la sección de anexos), se sembraron en cajas Petri y se incubaron 3 h a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se les retiró el medio y se adicionó el medio "Feeding" (sin suero; detallado en la sección de

anexos) para continuar su incubación de 1 a 7 días. La morfología de las células fue evaluada con el microscopio Invitrogen EVOS FL Cell Imaging System.

3. Obtención de extractos celulares

La obtención de los extractos celulares totales, citoplasmáticos y nucleares de las células MDA-MB-231 control y estimuladas con interferón gamma se llevaron a cabo de acuerdo con lo reportado por Tecalco-Cruz & Mejía-Barreto, 2017. Para los extractos totales se utilizó buffer TNTE 0.5% con inhibidores de proteasas y fosfatasas (detallado en la sección de anexos), mientras que el buffer para llevar a cabo el fraccionamiento subcelular consistió en buffer de homogenización con los mismos inhibidores. Los extractos totales se mantuvieron en rotación por 15 min a 4°C para después centrifugar a 14,000 rpm por 5 min y el sobrenadante se recuperó. Las muestras del fraccionamiento subcelular se pasaron 15 veces por una aguja 22G y esta suspensión se centrifugó a 3,400 rpm durante 10 min. El sobrenadante corresponde a la fracción citoplasmática y la pastilla a la fracción nuclear. Estas fracciones se lisaron con RIPA (detallado en la sección de anexos) de 30 a 60 min. La fracción nuclear se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min, y se recuperó el sobrenadante.

4. Inmunoprecipitación

A los extractos obtenidos (1-2 mg de proteína) se les agregó 3 μ L de anticuerpo (para dar una concentración final de 0.6 μ g/mL) y se pusieron en rotación toda la noche a 4°C. Luego se les agregó 90 μ L de la solución proteína G –sefarosa diluída 1:5 y se mantuvieron en rotación por 1.5 h. Después se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm por 10 seg, donde se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con una solución de TNTE 0.1% tres veces. Se agregaron 20 μ L de una solución de Laemmli 2X y se hirvieron las muestras por 5 min. Por último, se almacenaron a -20°C hasta su uso.

5. Electroforesis SDS-PAGE

Las muestras de proteínas en Laemmli se cargaron en geles de acrilamida con concentraciones del 7.5 al 15%. Terminado el tiempo de la electroforesis, el gel fue teñido

con azul de Coomassie G o fue usado para transferir las proteínas a una membrana de PVDF, según fuera el caso.

6. Western Blot

La transferencia se realizó con un voltaje de 100V durante 80 min. Luego la membrana se bloqueó usando una solución de leche desgrasada en polvo al 5% en TBS-T por 1 h, para luego ser incubada con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C (anti-ISG15 1:1000, anti-alfa tubulina 1:3000, anti-lámina 1:3000). Después la membrana se lavó con TBS-T para incubarse con el anticuerpo secundario durante 1 h (anti-mouse 1:3000 para la detección de ISG15 ó 1:10000 para la detección del resto de las proteínas evaluadas). Posteriormente, se volvió a lavar la membrana. Por último, se realizó el ensayo de quimioluminiscencia con SuperSignal West Pico Stable Peroxidase Solution y Immobilon Western.

7. Espectrometría de masas

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

La técnica usada para el análisis fue MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight), la cual consiste en 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

En cubreobjetos que fueron tratados con poli-L-lisina (0.01%), fueron sembradas las células. Luego se fijaron con PFA (Paraformaldehído al 4% en PBS) por 15 min a temperatura ambiente y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% por 8 min. La solución de bloqueo

consistió en albúmina al 1% que se usó por 1 h a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario (anti-ISG15 1:100 y anti-Miosina IIA 1:200) toda la noche a 4°C. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-mouse AlexaFluor 647 1:500 o anti-rabbit AlexaFluor 488 1:750) durante 1 h. Por último, las muestras se montaron en el portaobjetos con ProLong Diamond Antifade Mountant con 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI). Las muestras fueron visualizadas con los microscopios Olympus IX2 e Invitrogen EVOS FL Cell Imaging System.

9. Transformación bacteriana

Las bacterias de la cepa DH5 α se incubaron 30 min en hielo con solución de KCM y el plásmido pEGFP/MIIAP3 que contiene a la región codificante para NMIIA unida a EGFP (donado por la Dra. Anne Bresnick de la Escuela de Medicina 'Albert Einstein', Nueva York, EEUU). Posteriormente se pusieron a 42°C por 2 min para luego ser regresadas al hielo. Se agregó 1 mL de medio LB y después fueron incubadas a 37°C por 1 h. 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 se incubó a 37°C de 12 a 16 h.

10. Purificación del plásmido por MIDI-PREP

Se tomó una colonia de DH5 α 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 se purificó con el kit QIAGEN Plasmid Midi Kit.

11. Transfección de células

Se usó el método de transfección con Lipofectamina en células AD293. El plásmido se incubó con la solución de Lipofectamina 2000, donde se pusieron 2.5 μ g de plásmido en 500 μ L de medio de ayuno y 12 μ L de lipofectamina en 500 μ L de medio, por 15 min para permitir la formación de los complejos de DNA/lípido. Esta solución se agregó a las cajas de las células AD293 en medio de ayuno y se añadió medio DMEM con suero bovino fetal al 10% con antibióticos (penicilina y estreptomicina 100U/mL). Después de 48 h se lisaron las células para hacer una inmunoprecipitación contra ISG15. Luego los complejos formados se

separaron por electroforesis y se transfirieron a una membrana de PVDF. Se realizó una inmunodetección de NMIIA para comprobar la interacción entre esta proteína y EGFP-NMIIA.

12. Mutagénesis

Para efectuar el reemplazo del residuo de lisina 1937 de la proteína EGFP-NMIIA se usó el kit de mutagénesis QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis, con el oligo 5'-GAATGGCCCGGGCAGGCGCCGGGG-3' para mutar el codón del residuo Lys1937 por Ala1937. El oligo se diseñó con un programa desarrollado en el laboratorio que se encuentra detallado en la sección de anexos solamente en la versión electrónica de este trabajo. De acuerdo con el protocolo, se usaron los siguientes reactivos para la síntesis del gen mutante:

Reactivo	Cantidad
10x QuikChange Lightning Multi reaction Buffer	2.5 μ L
H2O	Ajustar para un volumen final de 25 μ L
QuikSolution	1.0 μ L
Plásmido	100 ng
Primer	100 ng
dNTP mix	1 μ L
QuikChange Lightning Multi enzyme blend	1 μ L

Se programó el termociclador de la siguiente manera:

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	2 min
2	30	95°C	20 s
		55°C	30 s
		65°C	6 min
3	1	65°C	5 min

Terminado el tiempo de reacción se adicionó 1 μL de la enzima DpnI y se incubó a 37°C toda la noche.

La transformación bacteriana se realizó con las células ultracompetentes XL10-Gold, mezclando 45 μL con 2 μL del mix de β -ME y con 1.5 μL del producto de la reacción de mutagénesis. El choque térmico se hizo a 42°C por 30 s.

13. Análisis bioinformático

Se usó la base de datos PhosphositePlus (Hornbeck et al., 2015) para analizar las modificaciones post-traduccionales disponible en www.phosphosite.org. Se buscó a la proteína NMIIA en esta plataforma. Para determinar las proteínas con las que NMIIA interactúa se utilizó la base de datos STRING (Szklarczyk et al., 2017) disponible en string-db.org. Se buscó a la proteína MYH9 y se seleccionó la especie *Homo sapiens*. En los parámetros “active interaction sources” se eligieron “textmining”, “experiments” y “databases”; y en “minimum required interaction score” se seleccionó “highest confidence (0.900)”

VIII. RESULTADOS

VIII.1. Perfil de ISGilación en células con características epiteliales y mesénquimales

Se buscaron proteínas blanco de ISGilación usando células de cáncer de mama de las líneas MDA-MB-231 y MCF-7, y en hepatocitos primarios de rata cultivados *in vitro*. Estudiar estos modelos paralelamente ofrecería una visión más amplia del rol biológico de ISG15 y la ISGilación. De esta forma, las células MDA-MB-231 y MCF-7 constituyen un modelo celular transformado, mientras que los hepatocitos representan a un contexto de células normales, siendo así células de especies y tejidos diferentes. De esta manera los resultados obtenidos podrían ofrecer un panorama de las funciones de ISG15 y sus posibles blancos de ISGilación en contextos diferentes.

Las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 presentan características diferentes. En reports previamente publicados, se habían caracterizado diferentes marcadores de fenotipo epitelial y mesenquimal en las células MCF-7 y MDA-MB-231, donde la línea MCF-7 expresa marcadores de fenotipo epitelial como las desmoplaquinas I y II, ZO-1, uvomorulin, E-caderina, Muc1 y CD24, mientras que en la línea MDA-MB-231 no presentan esos marcadores, pero expresan otros propios un de fenotipo mesenquimal como vimentina, tenascina y CD44 (Sommers et al., 1992; Sheridan et al., 2006; Gordon et al., 2003). Con esto se podría identificar a las células MCF-7 con un fenitipo predominantemente epithelial, mientras que las MDA-MB-231 exhiben marcadores de un fenotipo parecido al de células mesénquimales. Las diferencias entre estas dos líneas celulares son evidentes a nivel morfológico (Figura 4A); las células MDA-MB-231 tienen una forma estrellada y no presentan tantos contactos entre células vecinas, mientras que las células MCF-7 tienen una forma más cuadrada y tienen muchos contactos entre células. Aparte tienen diferencias moleculares de los cuales se han caracterizado diversos marcadores entre estos dos fenotipos. Las células MCF-7 expresan al receptor de estrógenos alfa y al receptor de progesterona, mientras que las células MDA-MB-231 son triple negativo (Subik et al., 2010), donde las primeras representan una línea celular poco agresiva, no invasiva y con poco potencial

metastásico, mientras que las últimas son una línea celular altamente invasiva y metastásica (Comşa et al., 2015; Rhodes et al., 2015).

Perfil de ISGilación en células derivadas de cáncer de mama. Para empezar el estudio de ISG15 en las células de cáncer de mama, primero se evaluó el perfil de ISGilación en estas células practicando una inmunodetección de ISG15 en extractos totales de estas células (Figura 4B), donde fue evidente que las células MCF-7 presentan un patrón de ISGilación moderado y abundante ISG15 libre. Por su parte, las células MDA-MB-231 tienen muchas más marcas de ISGilación, es decir, más proteínas ISGiladas, y muy poco ISG15 libre, el cual sólo es visible en placas con exposiciones largas. Estos resultados indican que las células de cáncer de mama primario, con un fenotipo epitelial, tienen un perfil de ISGilación diferente al de las células de cáncer de mama avanzado, con un fenotipo con características mesenquimales.

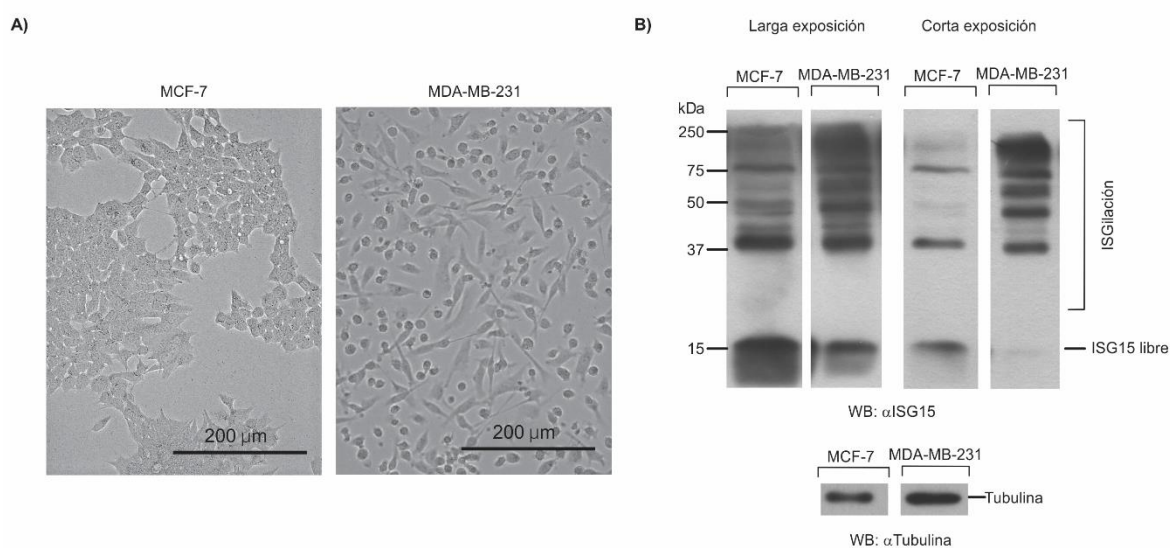


Figura 4. **Perfil de ISGilación en células de cáncer de mama.** A) Comparación de la morfología de células de cáncer de mama epiteliales (MCF-7) y mesenquimales (MDA-MB-231). B) Inmunodetección de ISG15 en extractos totales comparando del perfil de ISGilación de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7.

Perfil de ISGilación en cultivo primario de hepatocitos de rata. Se ha reportado que los hepatocitos cultivados *in vitro* sufren una transición epitelio-mesénquima parcial, lo cual significa un cambio en el fenotipo de la célula confiriéndole características mesenquimales, ya que se ha observado una disminución en la expresión de E-caderina y albúmina, y un aumento en la expresión de vimentina, caveolina-1 y α SMA, conforme avanza el tiempo de cultivo (Pagan et al., 1999; Godoy et al., 2009; Mehta et al., 2016; Haque et al., 2016) (Figura 5A). Estos cambios ocurren en los hepatocitos con 7 días de cultivo, por lo que se obtuvieron extractos totales de estas células a 1 día y a 7 días de cultivo. Como se observa en la Figura 5B, el perfil de ISGilación cambia. Sin embargo, no se logró observar la forma libre de ISG15 en estas células. Estas diferencias en el perfil de ISGilación en los hepatocitos sugieren que algunas proteínas involucradas en el proceso de EMT podrían cambiar su asociación con ISG15.

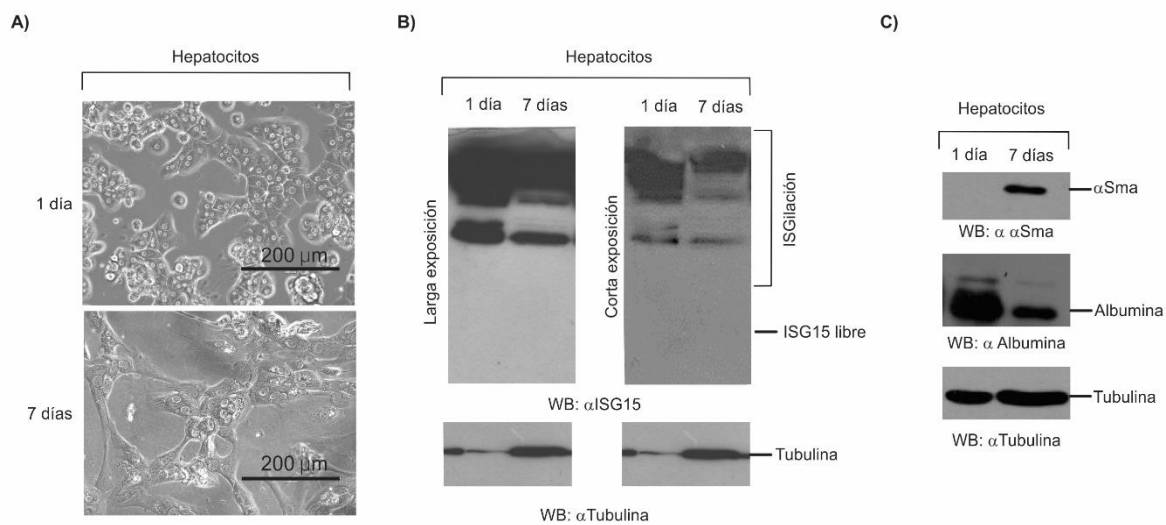


Figura 5. Morfología e ISGilación de hepatocitos con fenotipo epitelial y mesenquimal cultivados *in vitro*. A) Comparación de la morfología de los hepatocitos a 1 día y 7 días de cultivo, B) Comparación de la ISGilación en extractos totales de los hepatocitos a 1 día y 7 días de cultivo. C) Inmunodetección de marcadores de fenotipo epitelial y de fenotipo mesenquimal en extractos totales de los hepatocitos cultivados *in vitro*.

Además de presentar cambios morfológicos que sugieren la asociación a un fenotipo epitelial de los hepatocitos a 1 día de cultivo, y a un fenotipo con características mesenquimales de los hepatocitos a 7 días de cultivo, se presenta un marcador de hepatocitos con un fenotipo epitelial (albúmina) y un marcador de un fenotipo mesenquimal (alfa-actina de músculo liso o α -sma) como control (Figura 5C).

VIII.2. Inmunoprecipitación de complejos proteicos

Considerando estos resultados, se obtuvieron extractos totales de las células MDA-MB-231 y se procedió a hacer una inmunoprecipitación usando un anticuerpo monoclonal contra la proteína ISG15 endógena. De esta manera se aislaron a las proteínas que interactúan con ISG15 y se separaron por electroforesis en un gel de acrilamida. Posteriormente, este gel se tiñó con Azul de Comassie. El análisis del patrón de las proteínas que coprecipitaron con ISG15 mostró a una proteína de peso cercano a 250 kDa (Figura 6A).

También se realizó una inmunoprecipitación contra ISG15 endógena en muestras de cultivos primarios de hepatocitos, tomadas a 1 y 7 días de cultivo, y se separaron en un gel de acrilamida el cual también se tiñó con Azul de Comassie. Como se puede observar en la Figura 6B hay una banda abundante cerca de 250 kDa en las muestras de hepatocitos de 7 días de cultivo, además de otra banda cerca de 150 kDa en la muestra de hepatocitos de 1 día correspondientes a proteínas que coprecipitaron con ISG15.

El resultado diferencial de estas bandas al día 1 y 7 de cultivo de hepatocitos fue reproducible, por lo que se decidió analizar estas muestras mediante espectrometría de masas para revelar la identidad de estas proteínas. Resulta interesante que, a pesar de que se ha visto que la ISGilación parece reducida, y de que el patrón de ISGilación se modifica conforme avanza el tiempo de cultivo de los hepatocitos, la banda encontrada cerca de 250 kDa es muy abundante en un tiempo avanzado de cultivo, que corresponde con el fenotipo mesenquimal que van adquiriendo estas células. La modificación de esta proteína podría quizás estar involucrada en esta transición.

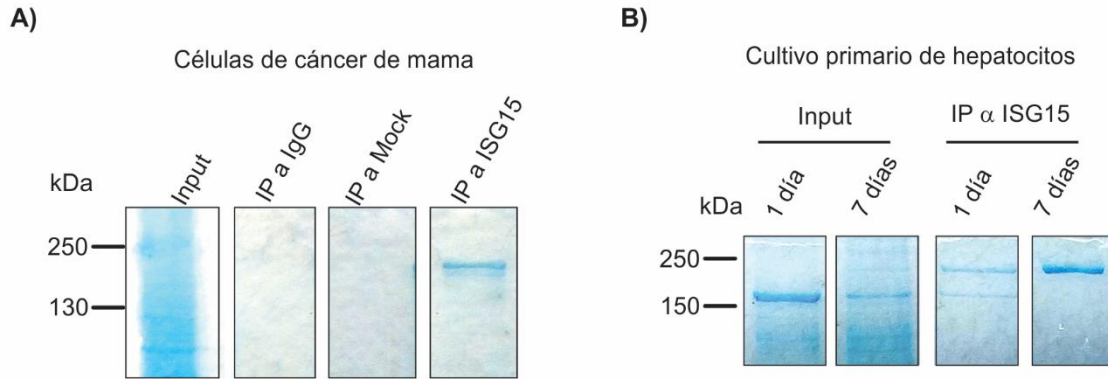


Figura 6. **Identificación de blancos de ISGilación en células de cáncer de mama y hepatocitos cultivados in vitro.** Inmunoprecipitación usando el anticuerpo monoclonal de ISG15 en extractos totales y posterior tinción con azul de Coomassie en A) células de cáncer de mama MDA-MB-231 y B) Hepatocitos a 1 y 7 días de cultivo.

VIII.3. Identificación de proteínas asociadas a ISG15 por espectrometría de masas

Aunque en los geles aparecen otras bandas con menor abundancia que las anteriores con pesos moleculares más ligeros, se seleccionó y se procedió a analizar a las proteínas asociadas a ISG15 detectadas en una mayor cantidad.

Los resultados de la espectrometría mostraron que la banda cercana a 250 kDa se trata de la cadena pesada de la Miosina IIA no muscular, también conocida como NMIIA, la cual se encontró tanto en las células MDA-MB-231 como en los hepatocitos de 7 días de cultivo, mientras que la banda de 150 kDa encontrada en los hepatocitos de 1 día de cultivo, corresponde a la carbamoil-fosfato sintetasa, también conocida como Cps1 (Figura 7A, 7B y 7C).

VIII.4. Análisis bibliográfico de las proteínas identificadas.

La proteína NMIIA pertenece a la clase II de la familia de miosina, la cual se divide en musculares y no musculares. Las miosinas II no musculares están involucradas en procesos como la citocinesis, la migración celular, la polarización celular, la adhesión celular, el mantenimiento de la forma celular y la transducción de señales. Como se puede ver, todos ellos son procesos que requieren generación de fuerza y remodelamiento del citoesqueleto de actina (Pecci et al., 2018).

La estructura de la miosina II consta de dos cadenas pesadas, dos cadenas regulatorias ligeras y dos cadenas esenciales ligeras. Cada cadena pesada consiste en un dominio globular que tiene actividad de ATPasa, un dominio de cuello, una región que se enrolla con la otra cadena pesada y una pequeña región que no se encuentra enrollada (Dulyaninova & Bresnick, 2013). Cuando la cadena regulatoria ligera es fosforilada, la estructura de anillo que forma el dominio de la cadena pesada pasa a formar una cadena larga que interactúa con filamentos de actina de manera no covalente (Vicente-Manzanares et al., 2009).

Se ha reportado que modificaciones post-traduccionales en la cola no enrollada de NMIIA, que es una pequeña región en el extremo carboxilo, pueden modular sus funciones. Por ejemplo, está demostrado que la fosforilación del residuo de serina 1943 de NMIIA, provoca que esta proteína ya no se organice en filamentos, y que se inhiba su asociación con MTS1 (S100A4), la cual es una proteína clave de la regulación de la migración celular e invasión (Dulyaninova et al., 2005; Dulyaninova et al., 2018).

Figura 7. **Proteínas identificadas por espectrometría de masas en las células de cáncer de mama y en los hepatocitos cultivados *in vitro*.** A) En las células MDA-MB-231 se identificó a miosina IIA no muscular. B) En los hepatocitos a 1 día de cultivo se identificó a la proteína carbamoil fosfato sintasa. C) En los hepatocitos a 7 días de cultivo se identificó a miosina IIA no muscular. 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 en la secuencia (Zhou & Chen, 2011).

Tabla 1. **Propiedades generales de la Miosina IIA**

Gen	<i>MYH9</i>
Proteína	NMIIA
Tamaño de proteína	1960 aminoácidos y 226.5 kDa en humano; 1961 aminoácidos y 226.3 kDa en rata.
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>BRC1A1</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 humano; 10.45% en rata.

Tabla 2. **Propiedades generales de la Carbamoil fosfato sintasa**

Gen	<i>CPSI</i>
Proteína	CPSase I
Tamaño de proteína	1500 aminoácidos, 165 kDa
Función	Esta proteína forma parte del ciclo de la urea,
Patologías	Mutaciones en el gen de la carbamoil fosfato sintasa está ligada a hiperamonemia, retraso mental y muerte (de Cima et al., 2015).
Rol en cáncer	Se encuentra sobre expresado en cáncer rectal y está asociado con efectos adversos a terapias CCRT (Lee et al. 2014).
Ratones Knock Out	Mueren después de un día de nacidos (Schofield et al. 1999).
Porcentaje de residuos de Lisina	6.93% en humano; 6.6% en rata.

En un estudio se demostró que la expresión de las mutantes de NMIIA (S1943D o S1943E) en células MDA-MB-231, las cuales corresponden a mutaciones fosfomiméticas, incrementaba la migración de las células y tenían una mayor extensión del lamellipodio; mientras que las células que expresan a la mutante S1943A, que no es fosforilada, tienen una migración reducida, así como una menor extensión del lamelipodio (Dulyaninova et al., 2007).

Además, se ha establecido que desórdenes que tienen en común trombocitopenias hereditarias, macrocitos de plaquetas e inclusiones de NMIIA en el citoplasma de neutrófilos, como la anomalía de May Hegglin, el síndrome de Sebastian, el síndrome de Fetchner y el síndrome de Epstein, están asociados a mutaciones en el gen MYH9, y en conjunto son conocidos como MYH9-RD (MYH9 Related Disorders) (Pecci et al., 2018; Saposnik et al., 2014).

En la tabla 1 se enlistan algunas propiedades importantes de NMIIA.

La proteína carbamoil-fosfato sintetasa forma parte del ciclo de la urea por lo que es importante en la remoción del exceso de amonio. Cataliza una reacción de tres pasos donde requiere de 2 moléculas de ATP. Primero fosforila a la molécula de bicarbonato para producir carboxifosfato, el cual, a su vez, reacciona con amonio para formar carbamato. Este último es fosforilado para obtener carbamoil fosfato (de Cima et al., 2015). Es una enzima mitocondrial de 1500 aminoácidos y un peso molecular de 165 kDa. Algunas propiedades importantes de esta proteína se enlistan en la tabla 2.

VIII.5. Interacción de ISG15 y NMIIA *in vivo*

Ya identificadas a estas proteínas, se concentró este trabajo en estudiar la ISGilación de NMIIA, la proteína que se encontró en los diferentes modelos celulares. Para comprobar la interacción específica entre NMIIA e ISG15, las células AD293 fueron transfectadas con el plásmido pEGFP-MIIAC3, el cual codifica a la proteína NMIIA que está enlazada a la proteína verde fluorescente (EGFP). Estas células son un buen modelo para sobre-expresar a las proteínas dado que tienen una alta eficiencia de transfección y la forma de ISG15 libre se encuentra ausente, por lo que se puede inferir que las proteínas que interactúen con ISG15 lo hacen de una manera covalente (Figura 8A). Por medio de epifluorescencia se analizó la distribución de esta proteína observándose que es principalmente citoplasmática, aunque se observaron regiones donde se encuentra más concentrada sugiriendo que se podría encontrar también en organelos como las mitocondrias (Figura 8B). En estas células transfectadas se realizó una inmunoprecipitación contra ISG15 y se realizó un inmunoblot contra NMIIA la cual se detectó en estos extractos (Figura 8C). Aquí se observa un doblete donde la banda más ligera corresponde a la NMIIA endógena, y la banda más pesada se trata de la construcción EGFP-NMIIA. Aparte en la IP contra ISG15 se ve que las bandas detectadas son más pesadas que las bandas detectadas en los *inputs* sugiriendo que son modificadas por ISG15. Con esto se demuestra la especificidad de la interacción entre NMIIA e ISG15 en un sistema de transfección.

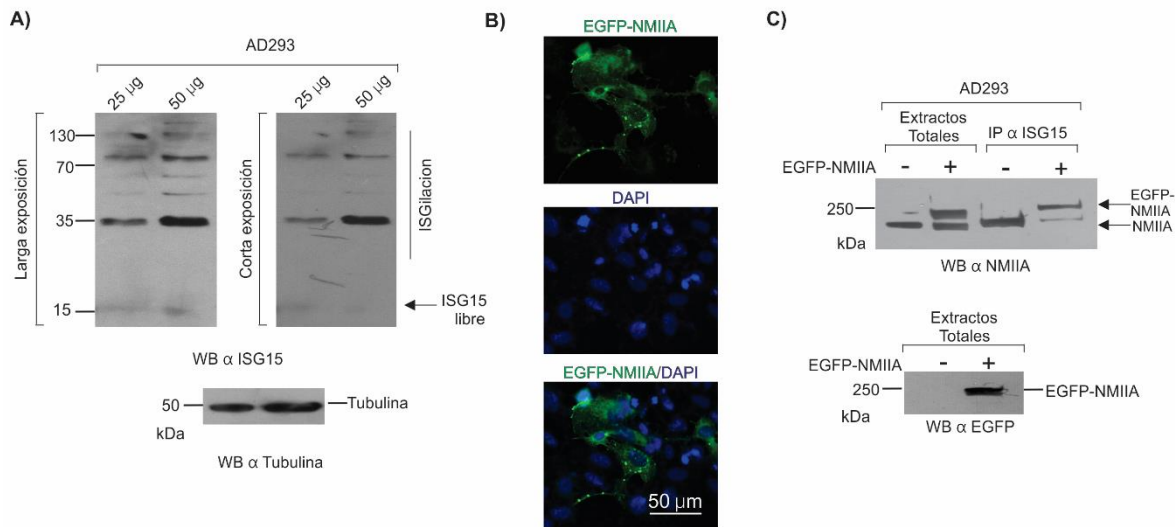


Figura 8. Distribución celular de EGFP-NMIIA e interacción EGFP-NMIIA-ISG15 en células AD293. Se transfeció el plásmido pEGFPMIIAC3 en células AD293. A) Perfil de ISG15 de las células AD293. B) Distribución subcelular de EGFP-NMIIA usando microscopía de epifluorescencia. C) Co-inmunoprecipitación de las células transfectadas inmunodetectando a NMIIA y a EGFP-NMIIA más pesadas que en los extractos totales.

VIII.6. Interacción endógena de ISG15 y NMIIA en células de cáncer de mama

Ya identificada la proteína NMIIA y corroborada su interacción con ISG15, se procedió a determinar su distribución celular mediante un ensayo de inmunofluorescencia en células MDA-MB-231 y MCF-7. En este ensayo se visualizó a ISG15 y a NMIIA, así como su colocalización dentro de la célula (Figura 9A).

Como se aprecia en las imágenes de la Figura 9A, ISG15 se encuentra distribuido en toda la célula, mientras que la Miosina IIA se localiza principalmente en el citoplasma en ambas células de cáncer de mama. Además, se observó que la distribución de ISG15 sigue un patrón granular, mientras que NMIIA se concentra en los extremos de las células. Es importante resaltar que no es posible con este ensayo discriminar entre la forma libre y conjugada de ISG15. Estas proteínas colocalizan en el núcleo, pero mayoritariamente en el citoplasma

celular, además se observó que las células MDA-MB-231 tienen un porcentaje de colocalización más alto que las células MCF-7 (Figura 9B).

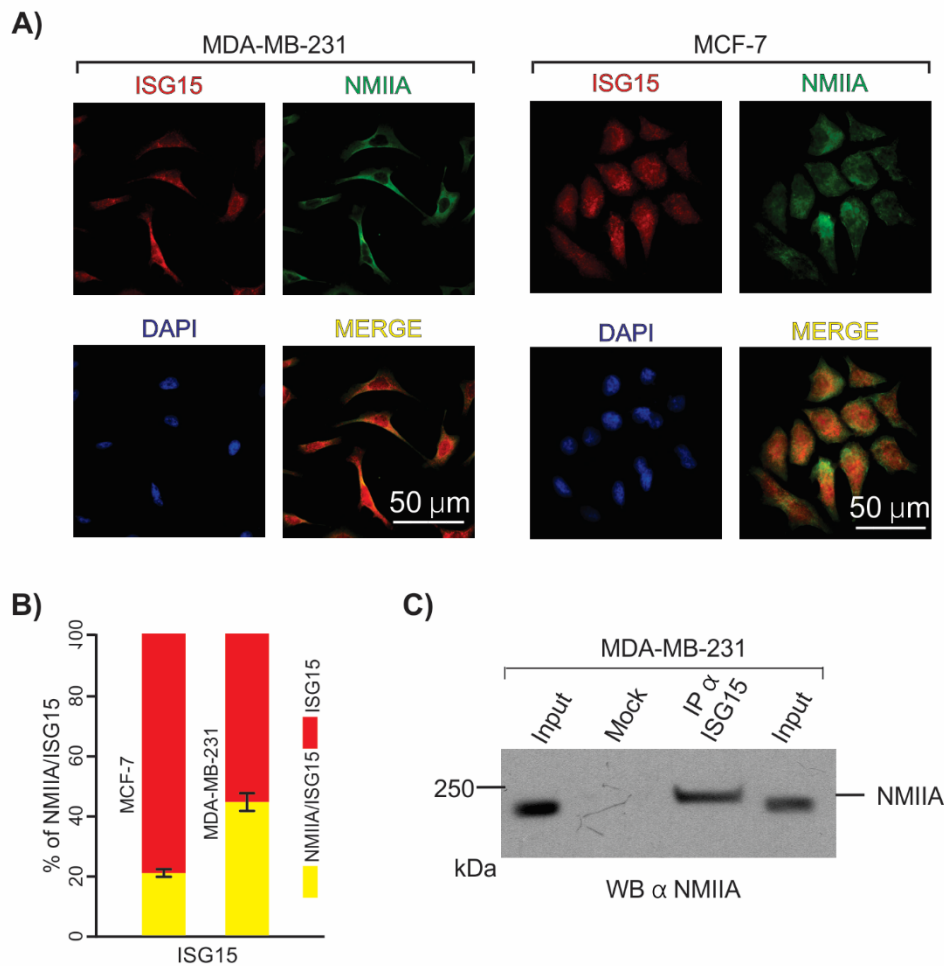


Figura 9. **Interacción endógena de NMIIA e ISG15.** A) Distribución subcelular de NMIIA e ISG15 en células MDA-MB-231 y MCF-7 usando microscopía confocal. B) Colocalización de NMIIA/ISG15. C) Co-inmunoprecipitación identificando la interacción endógena de NMIIA con ISG15 en células MDA-MB-231.

Para confirmar la interacción entre ISG15 y NMIIA de manera endógena, se realizó una inmunoprecipitación de extractos totales de las células usando el anticuerpo anti-ISG15. Estos complejos fueron separados por medio de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. En esta membrana se practicó un inmunoblot para detectar a la NMIIA, la cual se encontró presente validando el resultado obtenido por medio de la espectrometría de masas. Además, en las células AD293 transfectadas con EGFP-NMIIA se observó que la banda de NMIIA detectada en los complejos inmunoprecipitados con anti-ISG15, es más pesada que la NMIIA en los extratos totales (Figura 9C).

VIII.7. Análisis de las modificaciones post traduccionales e interactoma de NMIIA

Para indagar la importancia de la participación de la ISGilación de NMIIA en su regulación, se analizó a NMIIA, mediante un estudio bioinformático, para identificar a sus residuos blanco de modificaciones post-traduccionales y evaluar su interactoma, es decir, las proteínas con las que NMIIA interactúa y que podrían ser clave para la regulación de diversos procesos celulares.

Se usó la base de datos PhosphositePlus para analizar las modificaciones reportadas para esta proteína, y como se puede observar en la Figura 10A, son las fosforilaciones que se tienen más reportes de modificar a NMIIA, además de acetilación y ubiquitinación. También se utilizó la base de datos STRING para identificar a las proteínas con las cuales NMIIA interactúa. Este análisis arrojó proteínas involucradas en el citoesqueleto, fibras de estrés, y adhesiones focales, entre otras. Estos resultados sugieren que NMIIA es una proteína cuya actividad podría estar fuertemente regulada por modificaciones post-traduccionales, así como por su interacción con proteínas del citoesqueleto, y en conjunto con estas, podría modular la remodelación del citoesqueleto (Figura 10B).

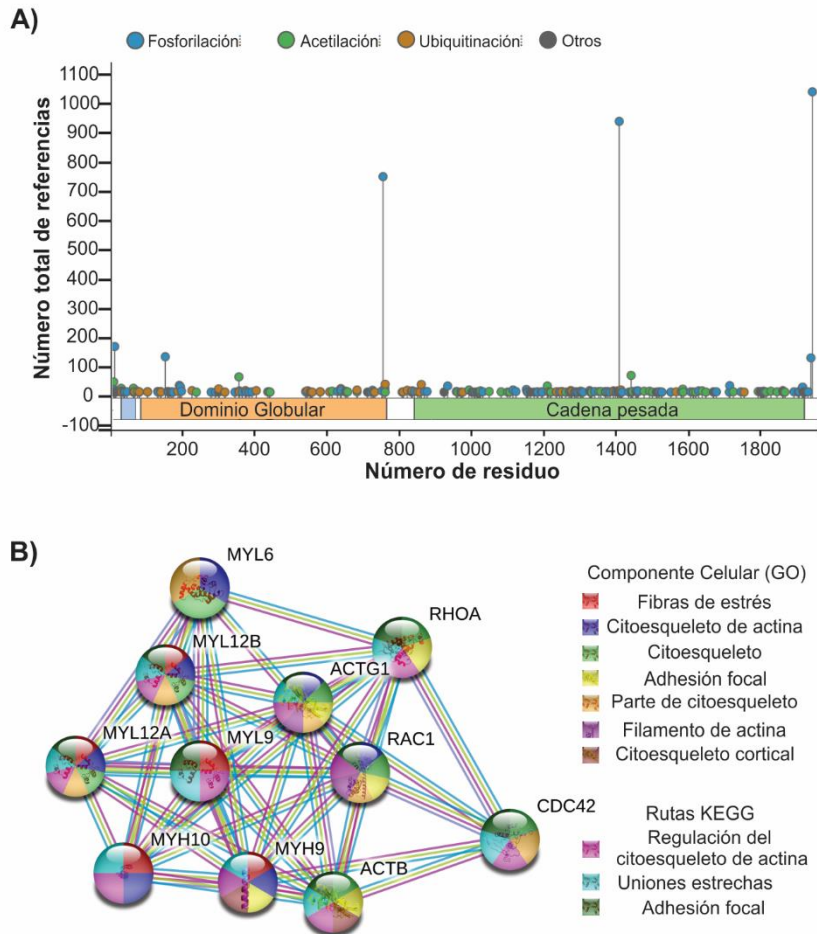


Figura 10. **Modificaciones post traducciónales e interacciones con proteínas de NMIIA.** A) Reportes que indicant los residuos de la proteína NMIIA que sufren modificaciones post traduccional usando la base de datos PhosphositePlus. B) Análisis del interactoma de NMIIA (MYH9) usando la base de datos STRING mostrando las proteínas con las que NMIIA interactúa y los componentes celulares y rutas a las que estas proteínas pertenecen.

VIII.8. Identificación de sitios de ISGilación de NMIIA

El resultado de la espectrometría identificó a la isoforma de la Miosina IIA como un blanco de ISGilación. Si sólo esta forma está siendo ISGilada, es pertinente pensar 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 C-terminal, que comprende aproximadamente 160 aminoácidos, se encuentran 3 residuos de lisina que solamente posee la isoforma A: lys1920, lys1937 y lys1957 (Figura 11A). De hecho, haciendo un alineamiento con las secuencias de los otros miembros de la familia de las miosinas, dos de estos aminoácidos son compartidos con otras miosinas, excepto la lys1937.

Dado este análisis se realizó una mutagénesis para cambiar ese residuo de lisina por una alanina y analizar sus efectos sobre la interacción con ISG15. El paso crucial para la mutagénesis es el diseño de los oligos. Se desarrolló un *software* (detallado en Anexos) que proporciona los oligos óptimos de acuerdo con su longitud y Tm para llevar a cabo este experimento, y mutar el residuo de lisina por uno de alanina (Figura 11B).

Luego de realizar la mutagénesis, se secuenció el plásmido resultante para corroborar que las bases deseadas fueran mutadas. En el resultado de la secuenciación se mostró que el codón para el residuo 1937 fue correctamente mutado. Posteriormente se procedió a detectar la interacción de EGFP-NMIIA^{K1937A} con ISG15 en las células AD293. Como se mostró previamente, las células AD293 no presentan ISG15 libre, por lo que la forma en que interactúe ISG15 con las proteínas será de forma covalente. El resultado obtenido mostró la interacción entre EGFP-NMIIA^{K1937A} con ISG15 de manera similar a la interacción con EGFP-NMIIA. Dado que la interacción de la mutante de NMIIA con ISG15 no se perdió, este dato indica que el sitio mutado no es el sitio de ISGilación (Figura 11B). Consistente con este hallazgo, resalta la dificultad de establecer una secuencia consenso para la ISGilación.

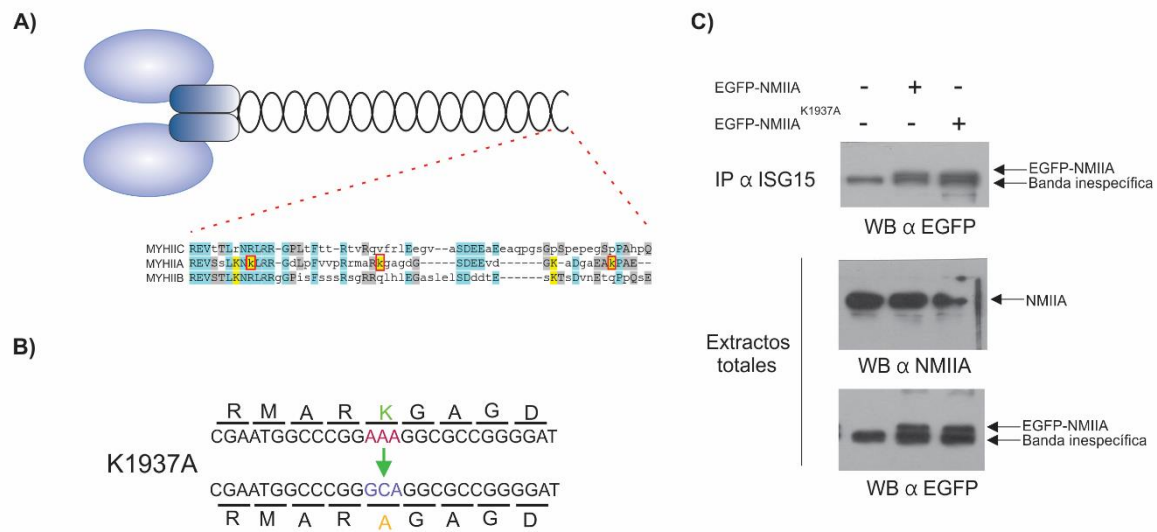


Figura 11. Identificación del sitio putativo de ISGilación de NMIIA. A) Alineamiento entre las isoformas de la miosina II no muscular mostrando los residuos de lisina que sólo pertenecen a la isoforma A. El formato usa la convención del editor Belvu que colorea a los residuos de acuerdo a su similitud promedio por la matriz BLOSUM62 (Barson & Griffiths, 2016), donde el color cyan indica una conservación mayor o igual a 3.0, en azul mayor o igual a 1.5 y en gris mayor o igual a 0.5. Las letras en mayúsculas indican residuos conservados en el alineamiento. B) Secuencias de ADN y aminoácidos con los sitios propuestos para mutagénesis. C) Interacción entre ISG15 y EGFP-NMIIA^{K1937A}.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La relevancia biológica de ISG15 y la ISGilación aún no es muy clara. Se ha propuesto que la ISGilación confiere o inhibe estabilidad a sus proteínas blanco y, por su parte, ISG15 libre actúa como citocina promoviendo la producción de interferón gamma en células T CD3+ (Fan & Zhang, 2013). Respecto a la ISGilación, se tienen pocos ejemplos de proteínas ISGiladas en que se haya comprobado esta interacción y explicado su efecto sobre éstas. Usando como estrategia la sobre-expresión de la maquinaria de ISGilación, se han reportado muchas proteínas candidato. De estos resultados no ha sido posible encontrar un patrón que permita saber qué requiere una proteína para sufrir esta modificación post-traducciona.

Por otra parte, la transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso crítico para la carcinogénesis. Este proceso implica una serie de cambios en el transcriptoma y proteoma. Sin embargo, no se conocen completamente los mecanismos que regulan este proceso. Dado que ISG15 y la ISGilación tienen un perfil característico que depende del tipo celular, (Tecalco-Cruz & Mejía-Barreto, 2017) esta modificación podría regular proteínas involucradas en la transición epitelio-mesénquima o proteínas que regulan las características de estos fenotipos y, por tanto, tener un perfil y proteínas blanco específicas en un contexto epitelial diferente al de un contexto donde las células adquieren características mesenquimales.

Para determinar la importancia de la ISGilación en células con fenotipo epitelial y en células con características mesenquimales, se utilizaron dos contextos. El primero de ellos consistió en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231. El segundo modelo fueron cultivos primarios de hepatocitos de rata cultivados *in vitro* por 1 y 7 días de cultivo. Las células MCF-7 y los hepatocitos de 1 día de cultivo tienen un fenotipo predominantemente epitelial, mientras que las células MDA-MB-231 y los hepatocitos de 7 días de cultivo presentan algunas características mesenquimales. En ambos hubo diferencias en el patrón de ISGilación y la cantidad de ISG15 libre: en las células de cáncer de mama MCF-7 hay poca ISGilación y bastante ISG15 libre, mientras que las células MDA-MB-231 presentan un patrón de ISGilación abundante y poco ISG15 libre; los hepatocitos de 1 día de cultivo muestran abundantes marcas de ISGilación, y los hepatocitos de 7 días de cultivo presentan una ISGilación reducida, pero en ninguna de estas condiciones se detectó a la forma libre de

ISG15. Esto plantea la cuestión sobre si la ISGilación también podría regular a proteínas durante el proceso de EMT, o ser una modificación para proteínas específicas requerida para mantener un fenotipo epitelial o mesenquimal.

Mediante la estrategia experimental utilizada basada en el MALDI-TOF, se identificó a NMIIA como una proteína blanco de ISGilación en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y en los hepatocitos cultivados *in vitro* por 7 días, mientras que en los hepatocitos de 1 día de cultivo se identificó a Cps1. Dado que NMIIA fue común en los hepatocitos y en las células de cáncer de mama, se procedió a estudiar más a fondo su interacción con ISG15. La identificación de NMIIA como una proteína blanco de ISGilación es interesante, dado que esta proteína es importante en la migración celular y en las células en las que fue identificada de manera endógena cuentan con mayor facilidad de migración debido a sus características mesenquimales.

En células transfectadas, se detectó a la proteína EGFP-NMIIA donde se observó una distribución citoplasmática de esta proteína, además de que se detectó, en algunas zonas mayor concentración de ésta, sugiriendo que también podría localizarse en algunos organelos como las mitocondrias. Un estudio propuso que las proteínas NMIIA, NMIIB y la β -actina son importantes para el mantenimiento del DNA mitocondrial, así como la morfología de las mitocondrias, y, en una forma dependiente del contexto celular, afectaría el número de copias del DNA mitocondrial (Reyes et al., 2011). De manera exógena se detectó la interacción entre EGFP-NMIIA e ISG15 comprobando la especificidad de esta asociación y posteriormente también se detectó de manera endógena en las células de cáncer de mama. En ambos casos se observó un incremento discreto entre la proteína en los extractos totales y la proteína detectada en los extractos en que se inmunoprecipitó a ISG15, sugiriendo que es la forma modificada covalentemente de NMIIA.

Realizando una búsqueda en la literatura sobre NMIIA e ISG15, se encontró que previamente fue identificada como blanco de ISGilación en células provenientes de fibroblastos embrionarios de un ratón *knock-out* para USP18, y en células de humano de la línea U937, ambas tratadas con interferón beta y sobre-expresando el sistema enzimático de ISGilación e ISG15 (Giannakopoulos et al., 2005). Estos datos coinciden con nuestros resultados, y fortalecen nuestra propuesta de que la ISGilación de esta proteína podría ser crucial en el contexto de células derivadas de cáncer de mama, y en los hepatocitos durante su

transdiferenciación. En células MDA-MB-231 se ha descrito que tanto NMIIA como NMIIB son importantes para la migración celular, pero NMIIB tiene un papel importante en la protrusión lamelar (Betapudi et al., 2006). Se ha reportado que NMIIA actúa como supresor de tumores interviniendo en la migración e invasión celular en carcinomas de células escamosas (Ouderkirk & Krendel, 2014), por lo que sería interesante determinar cómo la ISGilación afecta las funciones de NMIIA en diversos contextos celulares.

La proteína NMIIA se regula por modificaciones post-traduccionales, y por proteínas con las que interactúa. Se encontró que sufre fosforilaciones principalmente, y estas modulan su actividad y su interacción con otras proteínas. En su interactoma fueron evidentes diversas proteínas que forman parte del citoesqueleto, como era de esperarse, ya que NMIIA es una proteína citoplasmática, como se observó en el ensayo de inmunofluorescencia, y se une a fibras de actina para formar la actomiosina. De las proteínas reveladas en su interactoma, caben resaltar RAC1, CDC42 y RHO que pertenecen a la familia de las Rho GTPasas. Estas proteínas funcionan como interruptores moleculares, oscilando entre un estado activo y un estado inactivo, unido a GTP y GDP, respectivamente. Uno de los mediadores de la actividad de las Rho GTPasas son los GEFs que catalizan la remoción de GDP y la unión de GTP. La activación de RAC1, CDC42 y RHO conlleva a la formación de filamentos de actina y miosina, lamelipodio protrusivo y filopodio protrusivo. Estas Rho GTPasas promueven la polimerización de actina mediante diversos mecanismos: RAC1 y CDC42 activan al complejo Arp2/3, usando a las proteínas WAVE o WASP, respectivamente; mientras que RHO activa a proteínas forminas para inducir la polimerización de actina (Jaffe & Hall, 2005). Se encontró que la proteína IQGAP1 interactúa con las formas activas de RAC1 y CDC42 en una manera dependiente de la ISGilación, donde es un regulador negativo de estas interacciones, además de que es disminuida cuando es silenciado el gen de DOCK6, que es el GEF para RAC1 y CDC42. El silenciamiento de DOCK6 ocasiona el colapso del citoesqueleto de actina y previene la unión de los cinetocoros a los microtubulos, pero cuando el silenciamiento es prolongado o el gen es bloqueado, las células logran adaptarse. El mecanismo de adaptación involucra a la maquinaria de factor de transcripción de MRTF-A/SFR, el cual induce la expresión de ISG15, y es retenido en el citoplasma cuando es silenciado el gen de DOCK6, evitando la ISGilación de IQGAP1 y permitiendo que este

interactúe con las formas activas de RAC1 y CDC42 (Cerikan et al., 2016). Además, se encontró que IQGAP1 interactúa con la proteína transportadora de lípidos Arv1 promoviendo el progreso de la telofase y, mediante el reclutamiento posterior de NMIIA en el surco de escisión, facilitan la formación del anillo de actomiosina (Sundvold et al., 2016). En un estudio en células de cáncer de mama se demostró que la ISGilación es responsable de la desorganización de la arquitectura del citoesqueleto y que esto podría deberse a que ISG15 es un antagonista de la ubiquitinación evitando la degradación de proteínas asociadas a la invasión y metástasis (Desai et al., 2012).

A pesar de ser diferentes, la filamina B e IQGAP1 son proteínas grandes que son importantes en el citoesqueleto. Estas proteínas son ISGiladas y el efecto de ISG15 sobre ellas no es la regulación de su estabilidad, sino la modulación de su interacción con otras proteínas como MEKK1, MKK4 y RAC1 con la filamina B (Jeon et al., 2009), y de RAC1/CDC42 con IQGAP1 (Cerikan et al., 2016; Cerikan & Schiebel, 2016). Además, se reportó que NMIIA es monoubiquitinada por Ubr3 promoviendo su interacción con la proteína MYO7A (Li et al., 2016). Con base en esto, se podría proponer que el efecto de la modificación post-traducciona de NMIIA por ISG15, también podría regular su interacción con otras proteínas. De hecho, se sabe que la fosforilación del residuo de serina 1943 de NMIIA inhibe su interacción con S100A4, además de que, en células de cáncer de mama al mutar este residuo por alanina, la migración de las células se veía reducida (Dulyaninova & Bresnick, 2013; Dulyaninova et al., 2007). Con lo anterior se deduce que NMIIA interactúa con proteínas responsables del remodelamiento del citoesqueleto en diversos procesos celulares, por lo que su modificación post-traducciona por ISG15, podría regular las interacciones con estas proteínas ó mediar su actividad y de esta manera influir en la dinámica del citoesqueleto. Se han descrito las funciones de NMIIA sobre la extensión celular, y se determinó que actúa en conjunto con NMIIIB, pero teniendo estas funciones distintas: NMIIA favorece la extensión del lamelipodio, mientras que NMIIA atenúa su extensión. Además, en células MDA-MB-231 en las que fue silenciada la expresión de NMIIA, los arcos de actina fueron perdidos, así como pocos fragmentos centrales de actina, y en los márgenes de la extensión celular fue evidente una red de actina difusa y la falta de contactos focales. El silenciamiento de NMIIIB provocó la falta de arcos de actina en los márgenes de la extensión celular, pero si había

filamentos largos de actina en el citoplasma (Betapudi, 2010). Estas funciones de NMIIA podrían estar reguladas por sus interacciones con otras proteínas involucradas en los procesos de formación de filamentos de actina, así como por modificaciones post-traduccionales para mediar su actividad.

Se ha estudiado el “*crosstalk*” entre los procesos de ubiquitinación y de SUMOilación, por ejemplo, la modificación por la proteína SUMO de 53BP1 y BRCA1, que están involucradas en la respuesta al daño del DNA, incrementa su actividad como E3 ligasas de ubiquitina. También se ha especulado que la E3 ligasa RNF4 podría ser clave para el “*crosstalk*” entre la ubiquitinación y la sumoilación y participar en la señalización mediada por ATM y la respuesta al daño del DNA (Wei & Lin, 2012). Se ha reportado que las ligasas STUbL (SUMO-targeted Ubiquitin Ligase), como Slx8-Rfp, MIP1, Slx5-Slx8 y RNF4, reconocen a proteínas sumoiladas y las ubiquitinan para su degradación con el objetivo de mantener la supervivencia de la célula y la estabilidad genómica. (Kuo et al., 2012). Un ejemplo del “*crosstalk*” entre la fosforilación, sumoilación y ubiquitinación es la proteína PLM, la cual tras el tratamiento con ATO (tríóxido de arsénico) incrementa los niveles de fosforilación y de sumoilación de PLM, lo que conduce a su posterior degradación y que, aunque no se ha establecido si es necesaria la fosforilación para la sumoilación de esta proteína, no hay efectos de ATO sobre mutantes de PLM que no son fosforiladas o sumoiladas. Además, en la estructura de RNF4, aparte de los motivos de interacción con SUMO (SIM), existe una región rica en argininas (ARR) la cual podría reconocer a proteínas fosforiladas por ATM (Kuo et al., 2012).

En cuanto a la relación entre la ISGIlación y la fosforilación, se reportó que la proteína PKR es ISGIlada para promover su activación en ausencia de infección viral y fosforila a eIF2 α para inhibir la traducción de proteínas, pero para que ocurra la activación de PKR por medio de ISG15, esta necesita autofosforilarse en el residuo de treonina 451 (Okumura et al., 2013). Otro ejemplo es la proteína STAT1, que pertenece a la vía JAK-STAT que modula la cascada de señalización inducida por los interferones y otras señales. STAT1 es activada por medio de fosforilación en el residuo de tirosina 701 por las cinasas JAK para promover la formación de homodímeros de pSTAT1 (GAF) que después son translocados hacia el núcleo e inducen

la expresión de genes estimulados por interferón (ISG) (Khodarev et al., 2012). La ISGilación de pSTAT1 prolonga la señalización por interferón, ya que previene que pSTAT1 sea ubiquitinada y degradada por el 26S proteosoma. La des-ISGilasa USP18 no sólo remueve a ISG15 de pSTAT1, atenuando la vía de señalización, sino que también se une al receptor 2 del interferón α (IFN α R2) inhibiendo la fosforilación de STAT1 en respuesta al interferón (Ganesan et al., 2016).

En el caso de la proteína NMIIA, por ser altamente regulada por fosforilaciones principalmente, la modificación por ISGilación podría estar directamente relacionada con esta otra modificación, necesitando que ciertos residuos sean fosforilados para que algún residuo de lisina sea posteriormente ISGilado. Los residuos de treonina 1800 y serinas 1803, 1808, 1916 y 1943 son fosforilados en la región no enrollada de NMII (Vicente-Manzanarez et al., 2009). En esta región hay varios residuos de lisina, pero la mayoría son compartidos con las otras dos isoformas de la mioina II no muscular. Sólo 3 de estas lisinas son únicas en NMIIA. Al analizar el sitio posible de ISGilación, se mutó el residuo de lisina 1937 por alanina, pero la interacción entre ISG15 y esta mutante fue similar a la de ISG15 con la forma WT de NMIIA, por lo que este residuo no es blanco de ISGilación. Con este resultado, se demuestra la dificultad para encontrar una secuencia consenso para la modificación por ISG15, a diferencia de otras modificaciones como la SUMOilación. A pesar de esto, sería interesante demostrar si la ISGilación de NMIIA podría ser relevante en el proceso de EMT, o si puede ser una modificación necesaria para mantener un fenotipo del tipo mesenquimal.

X. CONCLUSIONES

- ✓ En las células de cáncer de mama se observó que la línea MCF-7 presenta poca ISGilación pero abunda ISG15 libre, mientras que la línea MDA-MB-231 mostró una ISGilación abundante y la ISG15 libre fue apenas detectable.
- ✓ Los hepatocitos con 1 día de cultivo en comparación con los de 7 días de cultivo presentaron abundantes marcas de ISGilación, evidenciando que en el avance de la adquisición de características mesenquimales, la ISGilación de proteínas parece disminuir.
- ✓ Aunque se evaluaron dos contextos celulares que poseían características epiteliales y/o mesenquimales, el perfil total de ISGilación fue opuesto entre las células transformadas y las células sanas, evidenciando que éste es dependiente del tipo celular.
- ✓ A pesar de poseer patrones de ISGilación muy diferentes, la NMIIA resultó ser una proteína blanco de ISGilación en común, tanto en las células de cáncer de mama y en los hepatocitos cultivados *in vitro*, principalmente en las células con características mesenquimales.
- ✓ Por medio de ensayos de co-inmunoprecipitación se comprobó la unión covalente de ISG15 a la proteína NMIIA, tanto en un sistema transfectado en células AD293, así como de manera endógena en células de cáncer de mama MDA-MB-231.

XI. PERSPECTIVAS

1. Determinar el sitio de ISGilación de la proteína NMIIA.
2. Elucidar la relevancia funcional de la modificación de NMIIA por ISG15.
3. Caracterizar otras posibles proteínas como candidatos de ISGilación en los modelos estudiados.

XII. REFERENCIAS

1. Althaus, K & Greinacher, A. (2010). MYH-9 related platelet disorders: strategies for management and diagnosis. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 37:260-267.
2. Barson, G. & Griffiths, E. (2016). SeqTools: visual tools for manual analysis of sequence alignments. *BMC Research Notes*, 9:39.
3. Betapudi, V. (2010). Myosin II motor proteins with different functions determine the fate of lamellipodia extension during cell spreading. *PloS ONE*, 5(1):e8560.
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.
5. Bresnick, A. R. (1999). Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 11:26-33.
6. Burks, J., Reed, R. E. & Desai, S. D. (2014). ISGylation governs the oncogenic function of Ki-Ras in breast cancer. *Oncogene*, 33, 794-803.
7. 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.
8. Cappadocia, L. & Lima, C. D. (2018). Ubiquitin-like protein conjugation: structures, chemistry, and mechanism. *Chemical Reviews*, 118, 889-918.
9. Cerikan, B., Shaheen, R., Colo, G. P., Gläßer, C., Hata, S., Knobloch, K.-P., Alkuraya, F. S., Fässler, R. & Schiebel, E. (2016). Cell-intrinsic adaptation arising from chronic ablation of a key Rho GTPase regulator. *Developmental Cell*, 39:28-43.
10. Cerikan, B. & Schiebel, E. (2016). DOCK6 inactivation highlights ISGylation as Rho-GTPase balancer. *Cell Cycle*, 16(4):304-305.
11. Comşam, Ş., Cîmpean, A. M. & Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell lines: 40 years of experience in research. *Anticancer Research*, 35:3147:3154.
12. D'Arcy, P., Wang, X. & Linder, S. (2015). Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy. *Pharmacology & therapeutics*, 147, 32-54.
13. de Cima, S., Polo, L. M., Díez-Fernández, C., Martínez, A. I., Cervera, J., Fita, I. & Rubio, V. (2015). Structure of human carbamoyl phosphate synthetase: deciphering the on/off switch of human ureagenesis. *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/srep16950.

14. Desai, S. D. (2015). ISG15: A double edged sword in cancer. *Oncolmmunology*, 4: 12.
15. Desai, S. D., Haas, A. L., Wood, L. M., Tsai, Y.-C., Pestka, S., Rubin, E. H., Saleem, A., Nur-E-Kamal, A. & Liu, L. F. (2006). Evated expression of ISG15 in tumor cells interferes with the ubiquitin/26S proteasome pathway. *Cancer Research*, 66(2):921-928.
16. Desai, S. D., Reed, R. E., Burks, J., Wood, L. M., Pullikuth, A. K., Hass, 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.
17. Desai, S. D., Wood, L. M., Tsai, Y.-C., Hsieh, T.-S., Marks, J. R., Scott, G. L., Giovanella, B. C. & Liu, L. F. (2008). ISG15 as a novel tumor biomarker for drug sensitivity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(6):1430-1439.
18. Dulyaninova, N. G. & Bresnick, A. R. (2013). The heavy chain has its day. *BioArchitecture*, 3(4):77-85.
19. Dulyaninova, N. G., House, R. P., Betapudi, V. & Bresnick, A. R. (2007). Myosin-IIA heavy-chain phosphorylation regulates the motility of MDA-MB-231 carcinoma cells. *Molecular Biology of the Cell*, 18(8):3144-3155.
20. Dulyaninova, N. G., Malashkevish, V. N., Almo, S. C. & Bresnick, A. R. (2005). Regulation of Myosin IIA assembly and Mts1 binding by heavy chain phosphorylation. *Biochemistry*, 44:6867-6876.
21. Dulyaninova, N. G., Ruiz, P. D., Gamble, M. J., Backer, J. M. & Bresnick, A. R. (2018). S100A4 regulates macrophage invasion by distinct myosin-dependent and myosin-independent mechanisms. *Molecular Biology of the Cell*, 29(5):632-642.
22. 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.
23. Fan, J.-B., Arimoto, K.-I., Motamedchaboki, k., Yan, M., Wolf, D. A. & Zhang, D.-E. (2015). Identification and characterization of a novel ISG15-ubiquitin mixed chain and its role in regulating protein homeostasis. *Scientific Reports*, 5:12704.

24. Fan, J.-B. & Zhang, D.-E. (2013). ISG15 regulates IFN-gamma immunity in human mycobacterial disease. *Cell Research*, 23:173-175.
25. Ganesan, M., Poluektova, L. Y., Tuma, D. J., Kharbanda, K. K. & Osna, N. A. (2016). Acetaldehyde disrupts interferon alpha signaling in hepatitis C virus-infected liver cells by up-regulating USP18. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 40(11):2329-2338.
26. Giannakopoulos, N. V., Luo, J.-K., Papov, V., Zou, W., Lenschow, D. J., Jacobs, B. S., Borden, E. C., Li, J., Virgin, H. W. & Zhang, D.-E. (2005). Proteomic identification of proteins conjugated to ISG15 in mouse and human cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(2):496-506.
27. Godoy, P., Hengstler, J. G., Ilkavets, I., Meyer, C., Bachmann, A., Müller, A., Tuschl, G., Mueller, S. O. & Dooler, S. (2009). Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor beta-induced apoptosis. *Hepatology*, 49(6):2031-2043.
28. Gordon, L. A., Mulligan, K. T., Maxwell-Jones, H., Adams, M., Walker, R. A. & Jones, J. L. (2003). Breast cancer invasive potential relates to the myoepithelial phenotype. *International Journal of Cancer*, 106:8-16.
29. Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P. P. & Dikic, I. (2003). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nature Cell Biology*, 5:461-466.
30. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646-674.
31. Haque, A., Gheibi, P., Gao, Y., Foster, E., Son, K. J., You, J., Stybayeva, G., Patel, D. & Revzin, A. (2016). Cell biology is different in small volumes: endogenous signals shape phenotype of primary hepatocytes cultured in microfluidic channels. *Scientific Reports*, 6:33980.
32. Hochstrasser, M. (2009). Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature*, 458(7237): 422-429.
33. Hornbeck, P. V., Zhang, B., Murray B., Kornhauser, J. M., Latham, V. & Skrzypek, E. (2015). PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Research*, 43:D512-D520.

34. Huang, Y.-F., Wee, S., Gunaratne, J., Lane, D. P. & Bulavin, D. V. (2014). ISG15 controls p53 stability and functions. *Cell Cycle*, 13(14):2200-2210.
35. Jeon, Y. J., Choi, J. S., Lee, J.Y., Yu, K. R., Kim, S. M., Ka, S. H., Oh, K. H., Kim, K. I., Zhang, D. E., Bang, O. S. & Chung, C. H. (2009). "ISG15 modification of filamin B negatively regulates the type I interferon-induced JNK signalling pathway". *EMBO reports*, 10, 374-380.
36. Jeon, Y. J., Yoo, H. M. & Chung, C. H. (2010). ISG15 and immune diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1802, 485-496.
37. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119:1420-1428.
38. Khodarev, N. N., Roizman, B. & Weichselbaum, R. R. (2012). Molecular pathways: interferon/STAT1 pathway: role in the tumor resistance to genotoxic stress and aggressive growth. *Clinical Cancer Research*, 18(11):3015-3021.
39. Kim, M. J., Hwang, S. Y., Imaizumi, T. & Yoo, J. Y. (2008). Negative feedback regulation of RIG-I-mediated antiviral signaling by interferon-induced ISG15 conjugation. *Journal of Virology*, 82(3), 1474-1483.
40. Knight, E. Jr., Fahey, D., Cordova, B., Hillman, M., Kutny, R., Reich, N. & Blomstrom, D. (1988). A 15-kDa interferon-induced protein is derived by COOH-terminal processing of a 17-kDa precursor. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(10):4520-4522.
41. Komander, D. & Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annual Reviews of Biochemistry*, 81: 203-229.
42. Kuang, Z., Seo, E. J. & Leis, J. (2011). Mechanism of inhibition of retrovirus release from cells by interferon-induced gene ISG15. *Journal of Virology*, 85(14): 7153-7161.
43. Kuo, C.-Y., Shieh, C., Cai, F. & Ann, D. K. (2012). Coordinate to guard: crosstalk of phosphorylation, sumoylation, and ubiquitylation in DNA damage response. *Frontiers in Oncology*, DOI: 10.3389/fonc.2011.00061.
44. Lee, Y. Y., Li, C. F., Lin, C. Y., Lee, S. W., Sheu, M. J., Lin, L. C., Chen, T. J., Wu, T. F. & Hsing, C. H. (2014). Overexpression of CPS1 is an independent negative

- prognosticator in rectal cancers receiving concurrent chemoradiotherapy. *Tumor Biology*, 35(11):11097-11105.
45. Li, T., Giagtzoglou, N., Eberl, D., Jaiswal, S., Cai, T., Godt, D., Groves, A. & Bellen, H. (2016). The E3 ligase Ubr3 regulates Usher Syndrome and MYH9 disorder proteins in the auditory organs of *Drosophila* and mammals. *eLife*, 5, e15258.
46. 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.
47. Mehta, A., Comunale, M. A., Rawat, S., Casciano, J. C., Lamontagne, J., Herrera, H., Ramanathan, A., Betesh, L., Wang, M., Norton, P., Steel, L. F. & Bouchard, M. J. (2016). Intrinsic hepatocyte dedifferentiation is accompanied by upregulation of mesenchymal markers, protein sialylation and core alpha 1,6 linked fucosylation. *Scientific Reports*, 6:27965.
48. 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.
49. Okumura, F., Okumura, A. J., Uematsu, K., Hatakeyama, S., Zhang, D.-E. & Kamura, T. (2013). Activation of double-stranded RNA-activated Protein Kinase (PKR) by interferon-stimulated gene 15 (ISG15) modification down-regulates protein translation. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(4):2839-2847.
50. Okumura, F., Zou, W. & Zhang, D. E. (2007). "ISG15 modification of the eIF4E cognate 4EFP enhances cap structure-binding activity of 4EFP". *Genes & Development*, 21:255-260.
51. Ouderkerk, J. L. & Krendel, M. (2014). "Non-Muscle Myosins in Tumor Progression, Cancer Cell Invasion, and Metastasis". *Cytoskeleton*, 71, 447-463.

52. Pagan, R., Sánchez, A., Martín, I., Llobera, M., Fabregat, I. & Vilaró, S. (1999). Effects of growth and differentiation factor on the epithelial-mesenchymal transition in cultured neonatal rat hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 31:895-904.
53. Park, J. M., Yang, S. W., Yu, K. R., Ka, S. H., Lee, S. W., Seol, J. H., Jeon, Y. J. & Chung, C. H. (2014). Modification of PCNA by ISG15 plays a crucial role in termination of error-prone translesion DNA synthesis. *Molecular Cell*, 54, 626-638.
54. Pecci, A., Ma, X., Savoia, A. & Adelstein, R. S. (2018). MYH9: structure, functions and role of non-muscle myosin IIA in human disease. *Gene*, 664:152-167.
55. 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.
56. Reyes, A., He, J., Mao, C. C., Bailey, L. J., Di Re, M., Sembongi, H., Kazak, L., Dzionek, K., Holmes, J. B., Cluett, T. J., Harbour, M. E., Fearnley, I. M., Crouch, R. J., Conti, M. A., Adelstein, R. S., Walker, J. E. & Holt, I. J. (2011). Actin and myosin contribute to mammalian mitochondrial DNA maintenance. *Nucleic Acids Research*, 12(39): 5098-5108.
57. Rhodes, L. V., Tate, C. R., Hoang, V. T., Burks, H. E., Gilliam, D., Martin, E. C., Elliott, S., Miller, D. B., Buechlein, A., Rush, D., Tang, H., Nephew, K. P., Burow, M. E., & Collins-Burow, B. M. (2015). Regulation of triple-negative breast cancer cell metastasis by the tumor-suppressor liver kinase B1. *Oncogenesis*, 4, e168.
58. Sapoznik, B., Binard, S., Fenneteau, O., Nurden, A., Nurden, P., Hurtaud-Roux, M.-F., Schlegel, N. & French MYH9 Network. (2014). Mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in a large french cohort of MYH9-Related Disorders. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 2(4):297-312.
59. Scimeca, M., Antonacci, C., Colombo, D., Bonfiglio, R. Buonomo, O. C. & Bonanno, E. (2016). Emerging prognostic markers related to mesenchymal characteristics of poorly differentiated breast cancers. *Tumor Biology*, 37(4):5427-5435.
60. Schnell, J. D. & Hicke, L. (2003). Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(38): 35857-35860.

61. Sheridan, C., Kishimoto, H., Fuchs, R. K., Mehrotra, S., Bhat-Nakshatri, P., Turner, C. H., Goulet, R. Jr., Badve, S. & Nakshatri, H. (2006). CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: and early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Research*, 8(5):R59.
62. Schofield, J. P., Schofield, J. P. Cox, T. M., Caskey, C. T. & Wakamiya, M. (1999). Mice deficient in the urea-cycle enzyme, carbamoyl phosphate synthetase 1, die during the early neonatal period from hyperammonemia. *Hepatology*, 29, 181-185.
63. Sgorbissa, A. & Brancolini, C. (2012). IFNs, Isgylation and cancer: Cui prodest?. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 23:307-314.
64. Shi, H., Yang, K., Liu, X., Liu, X., Wei, B., Shan, Y., Zhu, L. & Wang, C. (2010). Positive regulation of interferon regulatory factor 3 activation by Herc5 via ISG15 modification. *Molecular and Cellular Biology*, 30(10): 2424-2436.
65. Sommer, C. L., Heckford, S. E., Skerker, J. M., Worland, P., Torru, J. A., Thompson, E. W., Byers, S. W. & Gelmann, E. P. (1992). Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression in adriamycin- and vinblastine-resistant human breast cancer cell lines. *Cancer Research*, 52:5190-5197.
66. Subik, K., Lee, J.-F., Baxter, L., Strzepek, T., Costello, D., Crowley, P., Xing, L., Hung, M.-C., Bonfiglio, T., Hicks, D. G. & Tang, P. (2010). The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 4:35-41.
67. Sundvold, H., Sundvold-Gjerstad, V., Malerød-Fjeld, H., Haglund, K., Stenmark, H. & Malerød L. (2016). Arv1 promotes cell division by recruiting IQGAP1 and myosin to the cleavage furrow. *Cell Cycle*, 15(5):628-643.
68. Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N. T., Roth, A., Bork, P., Jensen, L. J. & von Mering, C. (2017). The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research*, 45:D362-D368.
69. Takeuchi, T. & Yokosawa, H. (2005). ISG15 modification of Ubc13 suppresses its ubiquitin-conjugation activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(1): 9-13.

70. Tan, F., Wahdan-Alaswad, R., Yan, S., Thiele, C. J. & Li, Z. (2013). Dihydropyrimidinase-like protein 3 expression is negatively regulated by MYCN and associated with clinical outcome in neuroblastoma. *Cancer Science*, 104(12): 1586-1592.
71. Tecalco-Cruz, A. C. & Cruz-Ramos, E. (2018). Protein ISGylation and free ISG15 levels are increased by interferon gamma in breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 499:973-978.
72. Tecalco-Cruz, A. C. & 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.
73. Tuschl, G. & Mueller, S. O. (2006). Effects of cell culture conditions on primary rat hepatocytes-cell morphology and differential gene expression. *Toxicology*, 218:205-215.
74. van der Veen, A. G. & Ploegh, H. L. (2012). Ubiquitin-like proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 81:323-357.
75. 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.
76. Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Mittelbrunn, M., Fernández-Delgado, I., Torralba, D., Moreno-Gonzalo, O., Baldanta, S., Enrich, C. & Guerra, S. (2016). ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. *Nature Communications*, 7:13588.
77. Wei, W. & Lin, H.-K. (2012). The key role of ubiquitination and sumoylation in signaling and cancer: a research topic. *Frontiers in Oncology*, DOI: 10.3389/fonc.2012.00187.
78. Xu, D., Zhang, T., Xiao, J., Zhu, K., Wei, R., Wu, Z., Meng, H., Li, Y. & Yuan, J. (2015). Modification of BECN1 by ISG15 plays a crucial role in autophagy regulation by type I IFN/interferon. *Autophagy*, 11:4, 617-628.
79. Yasukawa, M., Ishida, K., Yuge, Y., Hanaoka, M., Minami, Y., Ogawa, M., Sasaki, T., Saito, M. & Tsuji, T. (2013). Dpysl4 is involved in tooth germ morphogenesis through

- growth regulation, polarization and differentiation of dental epithelial cells. *International Journal of Biological Sciences*, 9(4):382-390.
80. Yoo, L., Yoon, A., Yun, C. & Chung, K. C. (2018). “Covalent ISG15 conjugation to CHIP promotes its ubiquitin E3 ligase activity and inhibits lung cancer cell growth in response”. *Cell Death and Disease*, 9:97.
81. Zhang, D. & Zhang, D. E. (2011). Interferon-Stimulated Gene 15 and the Protein ISGylation System. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 31, 1.
82. Zheng, N. & Shabek, N. (2017). Ubiquitin ligases: structures, function, and regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 86:129-157.
83. Zhou, Y. & Chen, W. N. (2011). iTRAQ-coupled 2-D LC-MS/MS analysis of membrane protein profile in *Escherichia coli* incubated with Apidaecin IB. *PLOS One*, 6(6): e20442.
84. Zou, W., Wang, J. & Zhang, D. E. (2007). “Negative regulation of ISG15 E3 ligase EFP through its autoISGylation”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354, 321-327.

XIII. ANEXOS

1. SOLUCIONES Y MEDIOS

MEDIOS

Medio de Attachment, 500MI	
BSA	100mg
Hepes	1.5mL
NaHCO ₃	255mg
Galactosa	500mg
Prolina	15mg
Glutamina	10mL
ITS	5mL
SFB	50mL
Penicilina/Estreptomicina 100x	5mL
Gentamicina 50mg/mL	0.5mL

Medio de Feeding, 500mL	
BSA	100mg
Hepes	1.5mL
NaHCO ₃	255mg
Galactosa	500mg
Prolina	15mg
Glutamina	10mL
ITS	5mL
Penicilina/Estreptomicina 100x	5mL
Gentamicina 50mg/mL	0.5mL

SOLUCIONES

PBS	
NaCl	137mM
KCl	2.7mM
Na ₂ HPO ₄	10mM
KH ₂ PO ₄	1.8mM

TN 10x	
Tris	0.5M
NaCl	1.5M

TNTE	
TN 10x	50mM
Triton	0.5% (1.0%)
EDTA pH 8	1mM

RIPA	
Tris-HCl	50mM
NaCl	150mM
EDTA pH 8	1mM
Nonidet P-40	1%
Desoxicolato de sodio	0.5%
SDS	0.1%

Inhibidores de fosfatasas	
NaF	25mM
NaPPi	1mM
NaVO ₄	1mM
Inhibidores de proteasas	
PMSF	1mM
Inhibidor de tripsina	0.1mg/mL

Peptatina A	0.1mg/mL
Leupeptina	0.1mg/mL
Benzamidina	0.1mg/mL
β -glicerofosfato	0.1mg/mL

Laemmli 2x	
Tris pH 6.8	100mM
Glicerol	20%
SDS	2%
Bromophenol Blue	0.05%
β -mercaptoetanol	100mM

Buffer de transferencia 1x	
Tris base	25mM
Glicina	192mM
Metanol	20%

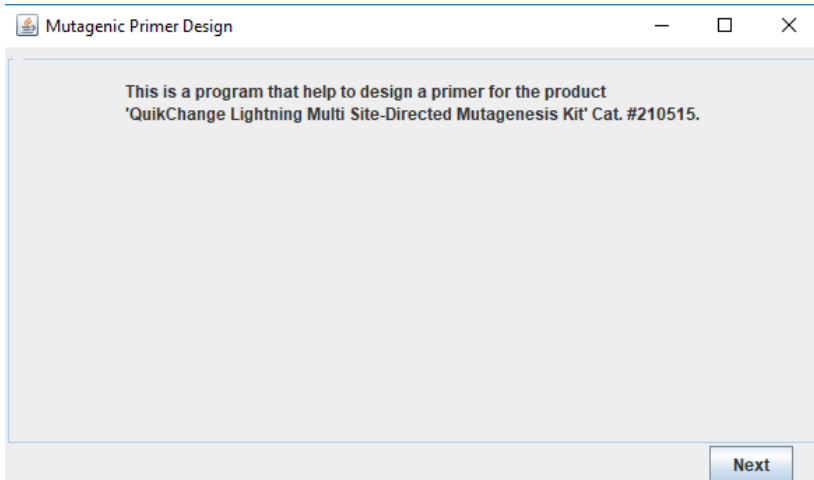
TBS-T 1x	
Tris base	20mM
NaCl	137mM
HCl	38M
Tween-20	0.1%

Coomassie Blue G-250	
Coomassie Blue G-250	0.5%
Metanol	50%
Ácido acético	10%
H2O	49.5%

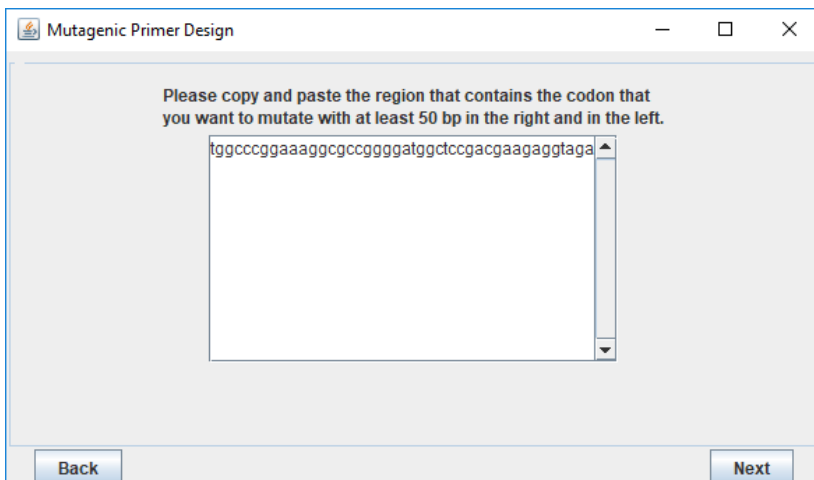
Buffer de corrida 1x	
Tris base	25mM
Glicina	192mM
SDS	0.1%

2. SOFTWARE PARA DISEÑO DE PRIMERS

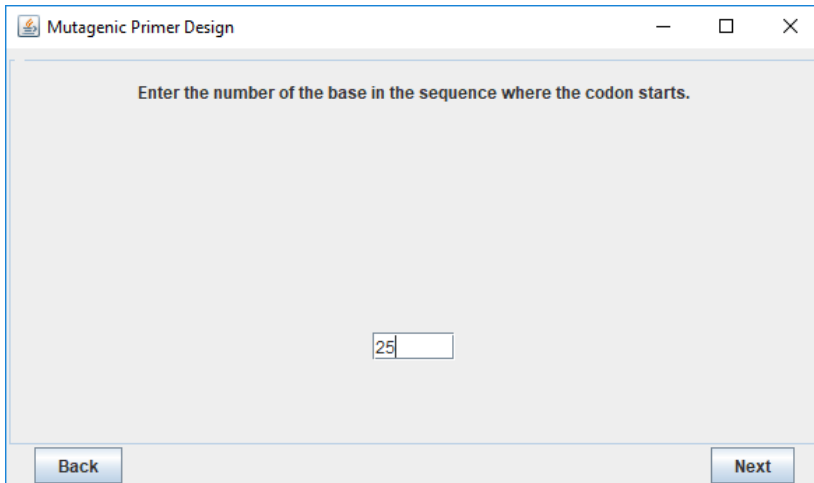
Se desarrolló un programa en el lenguaje de programación Java para diseñar los primers de acuerdo a las especificaciones del kit de mutagenesis. Al ejecutar el programa muestra una Ventana de bienvenida:



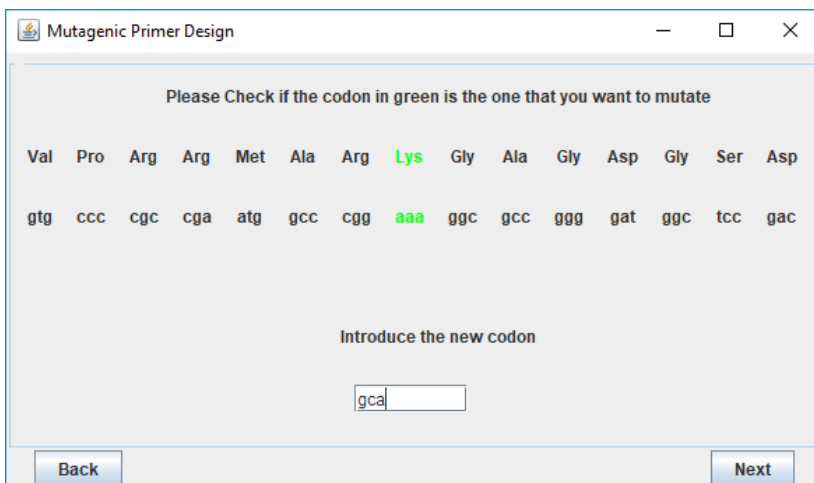
Al presionar el botón “Next” va a indicarnos que debemos de pegar en el área de texto la secuencia que contenga el codón que deseamos cambiar. Es importante conocer dónde se sitúa este codón, y que tenga suficientes bases en cada extremo. En este caso la secuencia que se pegó en el sentido 5’ a 3’ fue “tgctcgtgccccgccgaatggcccggaaaggcgccggggatggctccgacgaagaggtaga”.



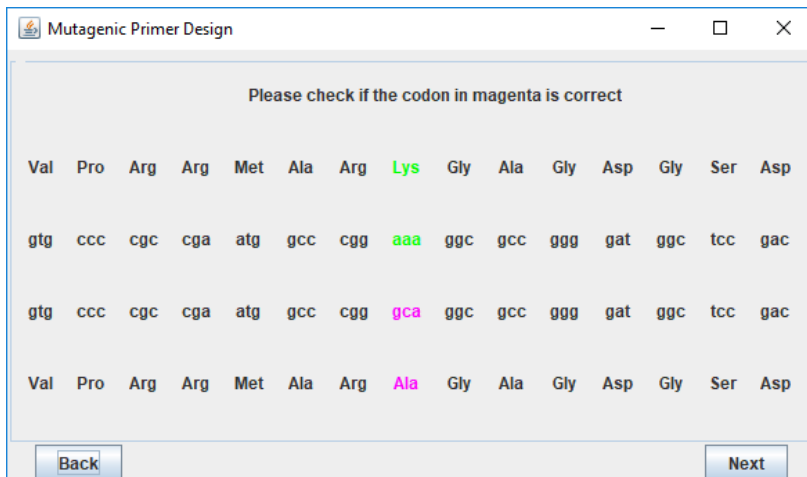
Después debemos de presionar el botón “Next” y el programa nos va a solicitar el número de base donde empieza el codón.



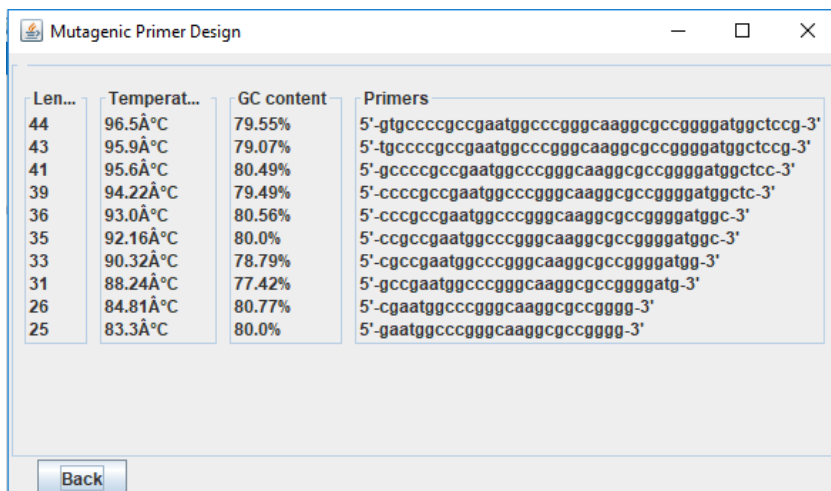
Con esto, el programa desplegará en la parte de abajo la secuencia de nucleótidos y en la parte de arriba de aminoácidos que corresponden al número de base que se indicó en el paso anterior. En color verde se encuentra el codón indicado y el aminoácido correspondiente. Ahora tenemos que indicar el codón que deseamos obtener. Si cometemos algún error, es posible regresar al paso anterior con el botón “Back”.



Después se tiene que presionar el botón “Next” y el programa desplegará las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la version original y la version mutada en la parte de arriba y abajo, respectivamente. En color magenta está indicado el codón deseado y su respectivo aminoácido.



Por ultimo, debemos de presionar el botón de “Next”, y el programa ejecutará las operaciones para calcular la Tm, el porcentaje de contenido de G y C, los primers propuestos, y la longitud de los mismos. Las especificaciones del producto indica que estos deben de tener una Tm mayor a 75°C, un porcentaje de GC mayor a 40% y debe de ser mayor a 25 y menor que 45 bases.



A continuación se adjunta el código en Java de este programa.

```

import javax.swing.*;
import java.awt.*;
import javax.swing.border.*;
import java.awt.event.*;
import java.util.*;
import java.text.*;

public class PrimerDesign extends JFrame {
    public static void main(String[] args) {
        new PrimerDesign();
    }
    JButton NextButton1, NextButton2, NextButton3, NextButton4, NextButton5, BackButton1, BackButton2, BackButton3,
    BackButton4, BackButton5;
    final JLabel label1, label2, label3;
    JPanel messagePanel1, messagePanel2, messagePanel3, messagePanel4, messagePanel5, messagePanel6;
    JTextArea sequenceArea;
    JTextField codon, newcodon;
    JScrollPane scroll;
    Container contentPane;
    Box box1, box2, box3, box4, box5, box6;
    String sequence, codontomutate, sequencetomutate;
    int startcodon, codonstart;
    public PrimerDesign() {
        this.setSize(600, 350);
        this.setTitle("Mutagenic Primer Design");
        this.setDefaultCloseOperation(EXIT_ON_CLOSE);
        NextButtonListener1 nt1 = new NextButtonListener1();
        NextButtonListener2 nt2 = new NextButtonListener2();
        NextButtonListener3 nt3 = new NextButtonListener3();
        NextButtonListener4 nt4 = new NextButtonListener4();
        NextButtonListener5 nt5 = new NextButtonListener5();
        BackButtonListener1 bk1 = new BackButtonListener1();
        BackButtonListener2 bk2 = new BackButtonListener2();
        BackButtonListener3 bk3 = new BackButtonListener3();
        BackButtonListener4 bk4 = new BackButtonListener4();
        BackButtonListener5 bk5 = new BackButtonListener5();
        contentPane = getContentPane();
        contentPane.setLayout(new BorderLayout());
        messagePanel1 = new JPanel();
        messagePanel2 = new JPanel();
        messagePanel3 = new JPanel();
        messagePanel4 = new JPanel();
        messagePanel5 = new JPanel();
        messagePanel6 = new JPanel();
        Border b1 = BorderFactory.createTitledBorder(" ");
        messagePanel1.setBorder(b1);
        messagePanel2.setBorder(b1);
        messagePanel3.setBorder(b1);
        messagePanel4.setBorder(b1);
        messagePanel5.setBorder(b1);
        messagePanel6.setBorder(b1);
        messagePanel3.setLayout(new GridBagLayout());
        messagePanel4.setLayout(new GridBagLayout());
        messagePanel5.setLayout(new GridBagLayout());
        label1 = new JLabel("<html>This is a program that help to design a primer for the product<br/>'QuikChange
Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit' Cat. #210515.</html>");
        label2 = new JLabel("<html>Please copy and paste the region that contains the codon that<br/>you want to
mutate with at least 50 bp in the right and in the left.</html>");
        label3 = new JLabel("<html>Enter the number of the base in the sequence where the codon
starts.<br/></html>");
        messagePanel1.add(label1);
        messagePanel2.add(label2);
        addItem(messagePanel3, label3, 1, 1, 10, 1, GridBagConstraints.NORTH);
    }
}

```

```

sequenceArea = new JTextArea(10, 25);
scroll = new JScrollPane(sequenceArea, JScrollPane.VERTICAL_SCROLLBAR_ALWAYS,
JScrollPane.HORIZONTAL_SCROLLBAR_NEVER);
messagePanel2.add(scroll);
codon = new JTextField(5);
addItem(messagePanel3, codon, 5, 2, 2, 1, GridBagConstraints.CENTER);
contentPane.add(messagePanel1, BorderLayout.CENTER);
box1 = Box.createHorizontalBox();
box2 = Box.createHorizontalBox();
box3 = Box.createHorizontalBox();
box4 = Box.createHorizontalBox();
box5 = Box.createHorizontalBox();
box6 = Box.createHorizontalBox();
box1.add(Box.createHorizontalGlue());
NextButton1 = new JButton("Next");
NextButton2 = new JButton("Next");
NextButton3 = new JButton("Next");
NextButton4 = new JButton("Next");
NextButton5 = new JButton("Next");
BackButton1 = new JButton("Back");
BackButton2 = new JButton("Back");
BackButton3 = new JButton("Back");
BackButton4 = new JButton("Back");
BackButton5 = new JButton("Back")
NextButton1.addActionListener(nt1);
NextButton2.addActionListener(nt2);
NextButton3.addActionListener(nt3);
NextButton4.addActionListener(nt4);
NextButton5.addActionListener(nt5);
BackButton1.addActionListener(bk1);
BackButton2.addActionListener(bk2);
BackButton3.addActionListener(bk3);
BackButton4.addActionListener(bk4);
BackButton5.addActionListener(bk5);
box1.add(NextButton1);
box1.add(Box.createHorizontalStrut(20));
box2.add(Box.createHorizontalStrut(20));
box2.add(BackButton1);
box2.add(Box.createHorizontalGlue());
box2.add(NextButton2);
box2.add(Box.createHorizontalStrut(20));
box3.add(Box.createHorizontalStrut(20));
box3.add(BackButton2);
box3.add(Box.createHorizontalGlue());
box3.add(NextButton3);
box3.add(Box.createHorizontalStrut(20));
box4.add(Box.createHorizontalStrut(20));
box4.add(BackButton3);
box4.add(Box.createHorizontalGlue());
box4.add(NextButton4);
box4.add(Box.createHorizontalStrut(20));
box5.add(Box.createHorizontalStrut(20));
box5.add(BackButton4);
box5.add(Box.createHorizontalGlue());
box5.add(NextButton5);
box5.add(Box.createHorizontalStrut(20));
box6.add(Box.createHorizontalStrut(20));
box6.add(BackButton5);
box6.add(Box.createHorizontalGlue());
contentPane.add(box1, BorderLayout.SOUTH);
this.setVisible(true);
}
private class NextButtonListener1 implements ActionListener {
public void actionPerformed(ActionEvent e) {
if (e.getSource() == NextButton1) {
contentPane.remove(messagePanel1);

```

```

        contentPane.remove(box1);

        contentPane.add(messagePanel2, BorderLayout.CENTER);
        contentPane.add(box2, BorderLayout.SOUTH);
        contentPane.repaint();
        contentPane.revalidate();
    }
}

private class BackButtonListener1 implements ActionListener {
    public void actionPerformed(ActionEvent e) {
        if (e.getSource() == BackButton1) {
            contentPane.remove(messagePanel2);
            contentPane.remove(box2);
            contentPane.add(messagePanel1, BorderLayout.CENTER);
            contentPane.add(box1, BorderLayout.SOUTH);
            contentPane.repaint();
            contentPane.revalidate();
        }
    }
}

private class NextButtonListener2 implements ActionListener {
    public void actionPerformed(ActionEvent e) {
        if (e.getSource() == NextButton2) {
            contentPane.remove(messagePanel2);
            contentPane.remove(box2);
            contentPane.add(messagePanel3, BorderLayout.CENTER);
            contentPane.add(box3, BorderLayout.SOUTH);
            contentPane.repaint();
            contentPane.revalidate();
        }
    }
}

private class NextButtonListener3 implements ActionListener {
    public void actionPerformed(ActionEvent e) {
        if (e.getSource() == NextButton3) {
            contentPane.remove(messagePanel3);
            contentPane.remove(box3);
            messagePanel4.removeAll();
            sequence = sequenceArea.getText();
            codonstart = Integer.parseInt(codon.getText());
            int firstcodon = codonstart - 21;
            int j = 0;
            String[] codons = new String[15];
            for (int i=0; i<15; i++) {
                codons[i] = sequence.substring(firstcodon + (j*3), firstcodon + (j*3+3));
                j = j+1;
            }
            JLabel[] codonslabel = new JLabel[15];
            JLabel[] aminoacidslabel = new JLabel[15];
            for (int i=0; i<15; i++) {
                if (codons[i].equals("ttt") || codons[i].equals("ttc")) {
                    aminoacidslabel[i] = new JLabel("Phe ");
                } else if (codons[i].equals("tta") || codons[i].equals("ttg") ||
codons[i].equals("ctt") || codons[i].equals("ctc") || codons[i].equals("cta") || codons[i].equals("ctg")) {
                    aminoacidslabel[i] = new JLabel("Leu ");
                } else if (codons[i].equals("att") || codons[i].equals("atc") ||
codons[i].equals("ata")) {
                    aminoacidslabel[i] = new JLabel("Ile ");
                } else if (codons[i].equals("atg")) {
                    aminoacidslabel[i] = new JLabel("Met ");
                } else if (codons[i].equals("gtt") || codons[i].equals("gtc") ||
codons[i].equals("gta") || codons[i].equals("gtg")) {
                    aminoacidslabel[i] = new JLabel("Val ");
                }
            }
        }
    }
}

```



```

        } else if (codons[i].equals("tct") || codons[i].equals("tcc") ||
codons[i].equals("tca") || codons[i].equals("ctg") || codons[i].equals("agt") || codons[i].equals("agc")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Ser ");
        } else if (codons[i].equals("cct") || codons[i].equals("ccc") ||
codons[i].equals("cca") || codons[i].equals("ccg")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Pro ");
        } else if (codons[i].equals("act") || codons[i].equals("acc") ||
codons[i].equals("aca") || codons[i].equals("acg")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Thr ");
        } else if (codons[i].equals("gct") || codons[i].equals("gcc") ||
codons[i].equals("gca") || codons[i].equals("gcg")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Ala ");
        } else if (codons[i].equals("tat") || codons[i].equals("tac")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Tyr ");
        } else if (codons[i].equals("cat") || codons[i].equals("cac")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("His ");
        } else if (codons[i].equals("caa") || codons[i].equals("cag")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Gln ");
        } else if (codons[i].equals("aat") || codons[i].equals("aac")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Asn ");
        } else if (codons[i].equals("aaa") || codons[i].equals("aag")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Lys ");
        } else if (codons[i].equals("gat") || codons[i].equals("gac")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Asp ");
        } else if (codons[i].equals("gaa") || codons[i].equals("gag")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Glu ");
        } else if (codons[i].equals("tgt") || codons[i].equals("tgc")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Cys ");
        } else if (codons[i].equals("tgg")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Trp ");
        } else if (codons[i].equals("cgt") || codons[i].equals("cgc") ||
codons[i].equals("cga") || codons[i].equals("cgg") || codons[i].equals("aga") || codons[i].equals("agg")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Arg ");
        } else if (codons[i].equals("ggg") || codons[i].equals("ggc") ||
codons[i].equals("gga") || codons[i].equals("ggg")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Gly ");
        } else {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("--- ");
        }
    }
    aminoacidslabel[7].setForeground(Color.green);
    JLabel verified = new JLabel("<html>Please Check if the codon in green is the one that you
want to mutate</html>");

    addItem(messagePanel4, verified, 1, 0, 15, 1, GridBagConstraints.NORTH);
    for (int i=0; i<15; i++) {
        addItem(messagePanel4, aminoacidslabel[i], i, 1, 1, 1,
GridBagConstraints.NORTH);
    }
    for (int i=0; i<15; i++) {
        codonslabel[i] = new JLabel(codons[i]+" ");
    }
    codonslabel[7].setForeground(Color.green);
    for (int i=0; i<15; i++) {
        addItem(messagePanel4, codonslabel[i], i, 2, 1, 1, GridBagConstraints.NORTH);
    }
    JLabel verified2 = new JLabel("<html> </html>");
    addItem(messagePanel4, verified2, 1, 3, 15, 1, GridBagConstraints.NORTH);
    JLabel verified3 = new JLabel("<html>Introduce the new codon</html>");
    addItem(messagePanel4, verified3, 1, 4, 15, 1, GridBagConstraints.NORTH);
    newcodon = new JTextField(7);
    addItem(messagePanel4, newcodon, 4, 5, 7, 1, GridBagConstraints.NORTH);
    contentPane.add(messagePanel4, BorderLayout.CENTER);
    contentPane.add(box4, BorderLayout.SOUTH);
    contentPane.repaint();
    contentPane.revalidate();
}

```

```

    }
}
private class NextButtonListener4 implements ActionListener {
    public void actionPerformed(ActionEvent e) {
        if (e.getSource() == NextButton4) {
            contentPane.remove(messagePanel4);
            contentPane.remove(box4);
            messagePanel5.removeAll();
            codontomutate = newcodon.getText();
            sequence = sequenceArea.getText();
            int codonstart = Integer.parseInt(codon.getText());
            int firstcodon = codonstart - 21;
            int j = 0;
            int k = 0;
            String[] codons = new String[15];
            String[] codons2 = new String[15];
            for (int i=0; i<15; i++) {
                codons[i] = sequence.substring(firstcodon + (j*3), firstcodon + (j*3+3));
                j = j+1;
            }
            for (int i=0; i<7; i++) {
                codons2[i] = sequence.substring(firstcodon + (k*3), firstcodon + (k*3+3));
                k = k+1;
            }
            codons2[7] = codontomutate;
            j = 8;
            for (int i=8; i<15; i++) {
                codons2[i] = sequence.substring(firstcodon + (j*3), firstcodon + (j*3+3));
                j = j+1;
            }
            JLabel[] codonslabel = new JLabel[15];
            JLabel[] aminoacidslabel = new JLabel[15];
            for (int i=0; i<15; i++) {
                if (codons[i].equals("ttt") || codons[i].equals("ttc") ) {
                    aminoacidslabel[i] = new JLabel("Phe ");
                } else if (codons[i].equals("tta") || codons[i].equals("ttg") ||
codons[i].equals("ctt") || codons[i].equals("ctc") || codons[i].equals("cta") || codons[i].equals("ctg")) {
                    aminoacidslabel[i] = new JLabel("Leu ");
                } else if (codons[i].equals("ata") || codons[i].equals("atc") ||
codons[i].equals("ata")) {
                    aminoacidslabel[i] = new JLabel("Ile ");
                } else if (codons[i].equals("atg")) {
                    aminoacidslabel[i] = new JLabel("Met ");
                } else if (codons[i].equals("gtt") || codons[i].equals("gtc") ||
codons[i].equals("gta") || codons[i].equals("gtg")) {
                    aminoacidslabel[i] = new JLabel("Val ");
                } else if (codons[i].equals("tct") || codons[i].equals("tcc") ||
codons[i].equals("tca") || codons[i].equals("ctg") || codons[i].equals("agt") || codons[i].equals("agc")) {
                    aminoacidslabel[i] = new JLabel("Ser ");
                } else if (codons[i].equals("cct") || codons[i].equals("ccc") ||
codons[i].equals("cca") || codons[i].equals("ccg")) {
                    aminoacidslabel[i] = new JLabel("Pro ");
                } else if (codons[i].equals("act") || codons[i].equals("acc") ||
codons[i].equals("aca") || codons[i].equals("acg")) {
                    aminoacidslabel[i] = new JLabel("Thr ");
                } else if (codons[i].equals("gct") || codons[i].equals("gcc") ||
codons[i].equals("gca") || codons[i].equals("gcg")) {
                    aminoacidslabel[i] = new JLabel("Ala ");
                } else if (codons[i].equals("tat") || codons[i].equals("tac")) {
                    aminoacidslabel[i] = new JLabel("Tyr ");
                } else if (codons[i].equals("cat") || codons[i].equals("cac")) {
                    aminoacidslabel[i] = new JLabel("His ");
                } else if (codons[i].equals("caa") || codons[i].equals("cag")) {
                    aminoacidslabel[i] = new JLabel("Gln ");
                } else if (codons[i].equals("aat") || codons[i].equals("aac")) {
                    aminoacidslabel[i] = new JLabel("Asn ");
                }
            }
        }
    }
}

```

```

        } else if (codons[i].equals("aaa") || codons[i].equals("aag")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Lys ");
        } else if (codons[i].equals("gat") || codons[i].equals("gac")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Asp ");
        } else if (codons[i].equals("gaa") || codons[i].equals("gag")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Glu ");
        } else if (codons[i].equals("tgt") || codons[i].equals("tgc")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Cys ");
        } else if (codons[i].equals("tgg")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Trp ");
        } else if (codons[i].equals("cgt") || codons[i].equals("cgc") ||
codons[i].equals("cga") || codons[i].equals("cgg") || codons[i].equals("aga") || codons[i].equals("agg")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Arg ");
        } else if (codons[i].equals("ggt") || codons[i].equals("ggc") ||
codons[i].equals("gga") || codons[i].equals("ggg")) {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("Gly ");
        } else {
            aminoacidslabel[i] = new JLabel("--- ");
        }
    }
    aminoacidslabel[7].setForeground(Color.green);
    for (int i=0; i<15; i++) {
        codonslabel[i] = new JLabel(codons[i]+" ");
    }
    codonslabel[7].setForeground(Color.green);
    JLabel verified4 = new JLabel("<html>Please check if the codon in magenta is
correct</html>");

    addItem(messagePanel5, verified4, 1, 0, 15, 1, GridBagConstraints.NORTH);
    for (int i=0; i<15; i++) {
        addItem(messagePanel5, aminoacidslabel[i], i, 1, 1, 1,
GridBagConstraints.NORTH);
    }
    for (int i=0; i<15; i++) {
        codonslabel[i] = new JLabel(codons[i]+" ");
    }
    codonslabel[7].setForeground(Color.green);
    for (int i=0; i<15; i++) {
        addItem(messagePanel5, codonslabel[i], i, 2, 1, 1, GridBagConstraints.NORTH);
    }
    JLabel[] codonslabel2 = new JLabel[15];
    for (int i=0; i<15; i++) {
        codonslabel2[i] = new JLabel(codons2[i] + " ");
    }
    codonslabel2[7].setForeground(Color.magenta);
    for (int i=0; i<15; i++) {
        addItem(messagePanel5, codonslabel2[i], i, 3, 1, 1, GridBagConstraints.NORTH);
    }
    JLabel[] aminoacidslabel2 = new JLabel[15];
    for (int i=0; i<15; i++) {
        if (codons2[i].equals("ttt") || codons2[i].equals("ttc")) {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("Phe ");
        } else if (codons2[i].equals("tta") || codons2[i].equals("ttg") ||
codons2[i].equals("ctt") || codons2[i].equals("ctc") || codons2[i].equals("cta") || codons2[i].equals("ctg")) {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("Leu ");
        } else if (codons2[i].equals("att") || codons2[i].equals("atc") ||
codons2[i].equals("ata")) {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("Ile ");
        } else if (codons2[i].equals("atg")) {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("Met ");
        } else if (codons2[i].equals("gtt") || codons2[i].equals("gtc") ||
codons2[i].equals("gta") || codons2[i].equals("gtg")) {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("Val ");
        } else if (codons2[i].equals("tct") || codons2[i].equals("tcc") ||
codons2[i].equals("tca") || codons2[i].equals("ctg") || codons2[i].equals("agt") || codons2[i].equals("agc")) {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("Ser ");
        }
    }

```

```

        } else if (codons2[i].equals("cct") || codons2[i].equals("ccc") ||
codons2[i].equals("cca") || codons2[i].equals("ccg")) {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("Pro ");
        } else if (codons2[i].equals("act") || codons2[i].equals("acc") ||
codons2[i].equals("aca") || codons2[i].equals("acg")) {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("Thr ");
        } else if (codons2[i].equals("gct") || codons2[i].equals("gcc") ||
codons2[i].equals("gca") || codons2[i].equals("gcg")) {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("Ala ");
        } else if (codons2[i].equals("tat") || codons2[i].equals("tac")) {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("Tyr ");
        } else if (codons2[i].equals("cat") || codons2[i].equals("cac")) {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("His ");
        } else if (codons2[i].equals("caa") || codons2[i].equals("cag")) {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("Gln ");
        } else if (codons2[i].equals("aat") || codons2[i].equals("aac")) {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("Asn ");
        } else if (codons2[i].equals("aaa") || codons2[i].equals("aag")) {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("Lys ");
        } else if (codons2[i].equals("gat") || codons2[i].equals("gac")) {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("Asp ");
        } else if (codons2[i].equals("gaa") || codons2[i].equals("gag")) {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("Glu ");
        } else if (codons2[i].equals("tgt") || codons2[i].equals("tgc")) {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("Cys ");
        } else if (codons2[i].equals("tgg")) {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("Trp ");
        } else if (codons2[i].equals("cgt") || codons2[i].equals("cgc") ||
codons2[i].equals("cga") || codons2[i].equals("cgg") || codons2[i].equals("aga") || codons2[i].equals("agg")) {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("Arg ");
        } else if (codons2[i].equals("ggg") || codons2[i].equals("ggc") ||
codons2[i].equals("gga") || codons2[i].equals("ggg")) {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("Gly ");
        } else {
            aminoacidslabel2[i] = new JLabel("--- ");
        }
    }
    aminoacidslabel2[7].setForeground(Color.magenta);
    for (int i=0; i<15; i++) {
        addItem(messagePanel5, aminoacidslabel2[i], i, 4, 1, 1,
GridBagConstraints.NORTH);
    }
}
contentPane.add(messagePanel5, BorderLayout.CENTER);
contentPane.add(box5, BorderLayout.SOUTH);
contentPane.repaint();
contentPane.revalidate();
}
}
}
private class NextButtonListener5 implements ActionListener {
    public void actionPerformed(ActionEvent e) {
        if (e.getSource() == NextButton5) {
            contentPane.remove(messagePanel5);
            contentPane.remove(box5);
            messagePanel6.removeAll();
            startcodon = Integer.parseInt(codon.getText());
            double mismatches = 0.0;
            String mutation = newcodon.getText();
            String originalsequence = sequenceArea.getText();
            String originalcodon = originalsequence.substring(startcodon-1, startcodon + 2);
            for (int i=0; i<3; i++) {
                if (originalcodon.charAt(i) == mutation.charAt(i)) {
                    mismatches = mismatches + 0.0;
                } else {
                    mismatches = mismatches + 1.0;
                }
            }
        }
    }
}

```

```

    }
    sequencetomutate = originalsequence.substring(startcodon - 21, startcodon) + mutation +
originalsequence.substring(startcodon + 2, startcodon + 23);
    String[] primers = new String[11];
    String[] primersleft = new String[11];
    String[] primersright = new String[11];
    for (int i=0; i<11; i++) {
        primers[i] = sequencetomutate.substring(i, 45-i);
        primersleft[i] = sequencetomutate.substring(i, 44-i);
        primersright[i] = sequencetomutate.substring(i+1, 45-i);
    }
    int[] primers_length = new int[11];
    int[] primersleft_length = new int[11];
    int[] primersright_length = new int[11];
    for (int i=0; i<11; i++) {
        primers_length[i] = primers[i].length();
        primersleft_length[i] = primersleft[i].length();
        primersright_length[i] = primersright[i].length();
    }
    double[] gc_primers = new double[11];
    double[] gc_primersleft = new double[11];
    double[] gc_primersright = new double[11];
    for (int i=0; i<11; i++) {
        gc_primers[i] = 0.0;
        gc_primersleft[i] = 0.0;
        gc_primersright[i] = 0.0;
    }
    for (int i=0; i<11; i++) {
        for (int j=0; j<primers_length[i]; j++) {
            if (primers[i].charAt(j) == 'g' || primers[i].charAt(j) == 'c') {
                gc_primers[i] += 1.0;
            } else {
                gc_primers[i] += 0.0;
            }
        }
    }
    for (int i=0; i<11; i++) {
        for (int j=0; j<primersleft_length[i]; j++) {
            if (primersleft[i].charAt(j) == 'g' || primersleft[i].charAt(j) == 'c') {
                gc_primersleft[i] += 1.0;
            } else {
                gc_primersleft[i] += 0.0;
            }
        }
    }
    for (int i=0; i<11; i++) {
        for (int j=0; j<primersright_length[i]; j++) {
            if (primersright[i].charAt(j) == 'g' || primersright[i].charAt(j) == 'c') {
                gc_primersright[i] += 1.0;
            } else {
                gc_primersright[i] += 0.0;
            }
        }
    }
    double[] temperatureprimers = new double[11];
    double[] temperatureprimers_left = new double[11];
    double[] temperatureprimers_right = new double[11];
    for (int i=0; i<11; i++) {
        temperatureprimers[i] = 81.5 + 0.41*100.0*(gc_primers[i]/primers_length[i]-
(675.0/primers_length[i])-(100.0*mismatches/primers_length[i]));
        temperatureprimers_left[i] = 81.5 +
0.41*100.0*(gc_primersleft[i]/primersleft_length[i])-(675.0/primersleft_length[i])-(100.0*mismatches/primersleft_length[i]);
        temperatureprimers_right[i] = 81.5 +
0.41*100.0*(gc_primersright[i]/primersright_length[i])-(675.0/primersright_length[i])-(100.0*mismatches/primersright_length[i]);
    }
    double[] gcprimers_percentage = new double[11];

```

```

double[] gcprimersleft_percentage = new double[11];
double[] gcprimersright_percentage = new double[11];
for (int i=0; i<11; i++) {
    gcprimers_percentage[i] = 100*(gc_primers[i]/primers_length[i]);
    gcprimersleft_percentage[i] = 100*(gc_primersleft[i]/primersleft_length[i]);
    gcprimersright_percentage[i] = 100*(gc_primersright[i]/primersright_length[i]);
}
ArrayList<String> primerslist = new ArrayList<String>();
ArrayList<Double> temperaturelist = new ArrayList<Double>();
ArrayList<Double> gcpercentagelist = new ArrayList<Double>();
ArrayList<Integer> sizeprimerslist = new ArrayList<Integer>();
for (int i=0; i<11; i++) {
    if (gcprimers_percentage[i] > 40.0 & temperatureprimers[i] > 75.0 &
(primers[i].charAt(primers_length[i]-1) == 'g' || primers[i].charAt(primers_length[i]-1) == 'c' )) {
        primerslist.add(primers[i]);
        temperaturelist.add(temperatureprimers[i]);
        gcpercentagelist.add(gcprimers_percentage[i]);
        sizeprimerslist.add(primers[i].length());
    } else if (gcprimersleft_percentage[i] > 40.0 & temperatureprimers_left[i] > 75.0
& (primersleft[i].charAt(primersleft_length[i]-1) == 'g' || primersleft[i].charAt(primersleft_length[i]-1) == 'c' )) {
        primerslist.add(primersleft[i]);
        temperaturelist.add(temperatureprimers_left[i]);
        gcpercentagelist.add(gcprimersleft_percentage[i]);
        sizeprimerslist.add(primersleft[i].length());
    } else if (gcprimersright_percentage[i] > 40.0 & temperatureprimers_right[i] >
75.0 & (primersright[i].charAt(primersright_length[i]-1) == 'g' || primersright[i].charAt(primersright_length[i]-1) == 'c' )) {
        primerslist.add(primersright[i]);
        temperaturelist.add(temperatureprimers_right[i]);
        gcpercentagelist.add(gcprimersright_percentage[i]);
        sizeprimerslist.add(primersright[i].length());
    }
}
}
NumberFormat nf = NumberFormat.getNumberInstance();
nf.setMinimumFractionDigits(1);
nf.setMaximumFractionDigits(2);
JLabel[] primersfinals = new JLabel[primerslist.size()];
JLabel[] temperaturefinals = new JLabel[primerslist.size()];
JLabel[] gcfinals = new JLabel[primerslist.size()];
JLabel[] sizefinals = new JLabel[primerslist.size()];
Box primersbox = Box.createVerticalBox();
Box temperaturebox = Box.createVerticalBox();
Box gcbox = Box.createVerticalBox();
Box sizebox = Box.createVerticalBox();
for (int i=0; i<primerslist.size(); i++) {
    primersfinals[i] = new JLabel("5'-" + primerslist.get(i) + "-3'");
    temperaturefinals[i] = new JLabel(nf.format(temperaturelist.get(i)) + "°C ");
    gcfinals[i] = new JLabel(nf.format(gcpercentagelist.get(i)) + "% ");
    sizefinals[i] = new JLabel(String.valueOf(sizeprimerslist.get(i)) + " ");
    primersbox.add(primersfinals[i]);
    temperaturebox.add(temperaturefinals[i]);
    gcbox.add(gcfinals[i]);
    sizebox.add(sizefinals[i]);
}
primersbox.setBorder(BorderFactory.createTitledBorder("Primers"));
temperaturebox.setBorder(BorderFactory.createTitledBorder("Temperature"));
gcbox.setBorder(BorderFactory.createTitledBorder("GC content"));
sizebox.setBorder(BorderFactory.createTitledBorder("Length"));
addItem(messagePanel6, sizebox, 0, 1, 1, 1, GridBagConstraints.NORTH);
addItem(messagePanel6, temperaturebox, 1, 1, 1, 1, GridBagConstraints.NORTH);
addItem(messagePanel6, gcbox, 2, 1, 1, 1, GridBagConstraints.NORTH);
addItem(messagePanel6, primersbox, 3, 1, 4, 1, GridBagConstraints.NORTH);
contentPane.add(messagePanel6, BorderLayout.CENTER);
contentPane.add(box6, BorderLayout.SOUTH);
contentPane.repaint();
contentPane.revalidate();
}

```

```

    }
}
private class BackButtonListener2 implements ActionListener {
    public void actionPerformed(ActionEvent e) {
        if (e.getSource() == BackButton2) {
            contentPane.remove(messagePanel3);
            contentPane.remove(box3);
            contentPane.add(messagePanel2, BorderLayout.CENTER);
            contentPane.add(box2, BorderLayout.SOUTH);
            contentPane.repaint();
            contentPane.revalidate();
        }
    }
}
private class BackButtonListener3 implements ActionListener {
    public void actionPerformed(ActionEvent e) {
        if (e.getSource() == BackButton3) {
            contentPane.remove(messagePanel4);
            contentPane.remove(box4);
            contentPane.add(messagePanel3, BorderLayout.CENTER);
            contentPane.add(box3, BorderLayout.SOUTH);
            contentPane.repaint();
            contentPane.revalidate();
        }
    }
}
private class BackButtonListener4 implements ActionListener {
    public void actionPerformed(ActionEvent e) {
        if (e.getSource() == BackButton4) {
            contentPane.remove(messagePanel5);
            contentPane.remove(box5);
            contentPane.add(messagePanel4, BorderLayout.CENTER);
            contentPane.add(box4, BorderLayout.SOUTH);
            contentPane.repaint();
            contentPane.revalidate();
        }
    }
}
private class BackButtonListener5 implements ActionListener {
    public void actionPerformed(ActionEvent e) {
        if (e.getSource() == BackButton5) {
            contentPane.remove(messagePanel6);
            contentPane.remove(box6);
            contentPane.add(messagePanel5, BorderLayout.CENTER);
            contentPane.add(box5, BorderLayout.SOUTH);
            contentPane.repaint();
            contentPane.revalidate();
        }
    }
}
private void addItem(JPanel p, JComponent c, int x, int y, int width, int height, int align) {
    GridBagConstraints gc = new GridBagConstraints();
    gc.gridx = x;
    gc.gridy = y;
    gc.gridwidth = width;
    gc.gridheight = height;
    gc.weightx = 100.0;
    gc.weighty = 100.0;
    gc.insets = new Insets(5, 5, 5, 5);
    gc.anchor = align;
    gc.fill = GridBagConstraints.NONE;
    p.add(c, gc);
}
}

```