



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
UNIDAD DE BIOMEDICINA



**Identificación del Factor de Intercambio de Nucleótidos de Guanina
VAV1 Como un Nuevo Sustrato de la Proteína Fosfatasa de Tirosinas
PTP1B**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA

SUSANA MONSERRAT PATIÑO LEMUS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. LUIS ENRIQUE ARIAS ROMERO

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO



2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

REVISORES

DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA

Laboratorio de Inmunología. UBIMED, Facultad de Estudios Superiores Iztacala,
UNAM.

DR. FELIPE VACA PANIAGUA

Laboratorio Nacional en salud: diagnóstico molecular y efecto ambiental en enfermedades
crónico degenerativas . UBIMED, Facultad de Estudios Superiores Iztacala,
UNAM.

MTRA. OLGA VILLAMAR CRUZ

Laboratorio de Señalización celular del cáncer. UBIMED, Facultad de Estudios Superiores
Iztacala,
UNAM.

MTRO. HÉCTOR IVÁN SALDÍVAR CERON

Profesor de asignatura De La Facultad De Estudios Superiores Iztacala, UNAM

**“LA EDUCACIÓN ES EL ENCENDIDO DE UNA LLAMA,
NO EL LLENADO DE UN RECIPIENTE”
SÓCRATES**

AGRADECIMIENTOS

A mi familia que siempre ha estado ahí para apoyarme en mis momentos de locura y en mis estados de cordura, por la paciencia que han tenido y los ánimos que me han brindado en este camino.

A mis padres y hermano que sin dudarlos han estado en cualquier momento, desde acompañarme a mi primer día en la facultad, hasta esos días pesados llenos de desvelos, agobio e incluso ganas de rendirse. Les agradezco el estar ahí para festejar y sostenerme cuando es necesario.

Y les agradezco a mis amigos de la carrera y de toda la vida el haber compartido este camino, por esas risas, esas aventuras y ese compañerismo que me han brindado.

Les agradezco a mis profesores por enseñarme este mundo maravilloso de la biología.

Agradezco a la M. en C. Olga Villamar Cruz por su ayuda técnica.

Finalmente quiero agradecer al Dr. Arias y a los miembros del Laboratorio 14 de la UBIMED la oportunidad, el apoyo y la paciencia para poder realizar este trabajo.

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Luis Enrique Arias Romero, Profesor Titular "B" de Tiempo Completo de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

La realización de esta Tesis fue posible gracias al financiamiento del proyecto SEP-CONACYT Ciencia Básica **252444**, y del proyecto PAPIIT-UNAM**213218**.

ÍNDICE

Contenido

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 Cáncer	2
2.1.1 CÁNCER DE MAMA.....	4
2.1.2 CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA.....	6
2.2 TERAPIAS PARA CÁNCER DE MAMA.....	8
2.3 PTP1B Y CÁNCER DE MAMA	9
2.5 VAV1 Y CÁNCER DE MAMA	19
2.6.....	20
RELACIÓN VAV1 CON OTRAS ENFERMEDADES	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. HIPÓTESIS.....	21
5. OBJETIVOS.....	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6.1 GENERACIÓN DE UN MODELO <i>in silico</i> DEL DOMINIO CATALÍTICO DE PTP1B EN ASOCIACIÓN CON EL FOSFOPÉPTIDO CORRESPONDIENTE A LOS RESIDUOS 137-147 DE VAV1.....	22
6.1.1 MODELADO POR HOMOLOGÍA <i>in silico</i> Y DOCKING.....	22
6.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PTP1B SOBRE VAV1 <i>in vitro</i>	22
6.2.1 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA <i>in vitro</i>	22
6.3 EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN FÍSICA DE VAV1 Y PTP1B EN UN CONTEXTO CELULAR.....	23
6.3.1 CULTIVO CELULAR	23
6.3.2 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES	23
6.3.3 PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO	24
6.3.4 TRANSFECCIÓN.....	24
6.3.5 CO-INMUNOPRECIPITACIÓN	25
6.3.6 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA	26
7.RESULTADOS	27
7.1 INTERACCIÓN <i>in silico</i> ENTRE EL DOMINIO CATALÍTICO DE PTP1B Y VAV1 ..	27
7.2 EL RESIDUO DE TIROSINA 142 DE VAV1 ES DESFOSFORILADO POR PTP1B <i>in vitro</i>	30

7.3 PTP1B Y VAV1 INTERACTÚAN EN UN CONTEXTO CELULAR.....	32
8.DISCUSIÓN.....	35
9.CONCLUSIONES	38
10.REFERENCIAS	39
11. ANEXO	48

ABREVIATURAS

AC	Región ácida
AKT	Proteína tirosina cinasa que participa en procesos de metabolismo, proliferación, supervivencia, crecimiento y angiogénesis
Arg 221	Residuo de arginina 221, necesario para la actividad de PTP1B
BRCA1	Gen participante en la supresión de replicación celular
CCND1	Ciclina D1
CDC42	Proteína que participa en la regulación del ciclo celular
CH	Región con homología a calponina
Cys 215	Residuo de cisteína 215, necesario para la actividad de PTP1B
DH	Dominio de homología a Dbl
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EMT	Transición Epitelio Mesénquima
Erb2/ HER2	Factor de crecimiento epidermal humano 2
GEFs	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina
GRB7	Proteína ligada al receptor del factor de crecimiento 7
INPUT	Proteínas totales
IR	Receptor de insulina
kDa	Kilo daltones
Ki67	Proteína asociada a proliferación celular
LIV1 mama	Gen asociado a proliferación celular y metástasis en cáncer de mama
MAPK/ ERK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MEK	Proteína cinasa que activa a Map quinasa
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
Neu	Homólogo a HER2 en rata
ng	Nanogramos
nmoles	Nano moles
p62Dok	Proteína que participa como regulador negativo de la insulina

PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGAP3	Gen que codifica proteínas transmembranales en Aparato de Golgi
PH	Dominio con homología a plekstrina
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
PO4	Fosfato inorgánico
PRR	Dominio rico en prolinas
PTKs	Proteínas Tirosinas Cinasas
PTPN1	Gen que codifica a PTP1B
PTPs	Proteínas Tirosinas Fosfatasas
Rac1	Proteína G que participa como GTPasa
RAF	Proteína que participa en la vía de las MAPK
RAS	Proteína G
RE	Receptor de Estrógeno
RH	Receptor de Hormona
Rho	Proteína involucrada en la terminación de la transcripción
RP	Receptor de Progesterona
rpm	Rotaciones por minuto
SH	Dominio con homología a Src
SILAC	Marcaje isotópico estable en cultivo celular
Src	Proteína involucrada en la señalización intracelular
μL	Microlitro
v-Src	n
Y 142	Residuo de tirosina 142
ZF	Dominio dedos de zinc

1. Resumen

Las proteínas fosfatasa de tirosina (PTPs) juegan un papel importante en la regulación de diversos procesos celulares como la proliferación, migración, sobrevivencia y apoptosis entre otros. Una molécula que ha llamado la atención de la industria farmacéutica en los últimos años es la proteína fosfatasa de tirosinas 1B (PTP1B), debido a que se encuentra sobreexpresada en cáncer de mama, hígado, colon, esófago y ovario. Los estudios más detallados sobre la participación de PTP1B en cáncer, han sido en modelos de cáncer de mama positivos a HER2, en los que se ha observado que PTP1B promueve la transformación celular al activar las vías de las MAPK y de Src. Sin embargo, estudios con modelos murinos de cáncer de mama deficientes de PTP1B arrojan resultados inconsistentes en lo que se refiere a los niveles de activación de las vías de señalización antes mencionadas, por lo que es necesario identificar nuevos sustratos de esta fosfatasa que pudiesen estar involucrados en el proceso de transformación celular. Con este propósito, se realizó un estudio de fosfoproteómica, en el que se identificaron más de 380 potenciales nuevos sustratos de PTP1B. De manera interesante, entre estos potenciales sustratos se encuentra el Factor de Intercambio de Nucleótidos VAV1, el cual se encuentra hiperactivo en distintas neoplasias. En este trabajo, mostramos que PTP1B forma un complejo estable con VAV1 *in silico*, y que un péptido correspondiente a los residuos 132-147 de VAV1 fosforilado en el residuo de Y142 es desfosforilado por PTP1B *in vitro*, y que ambas proteínas interactúan en un contexto celular mediante experimentos de co-inmunoprecipitación y co-localización. Estos resultados sugieren fuertemente que VAV1 es un nuevo sustrato de PTP1B.

2. Introducción

2.1 Cáncer

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el cáncer se define como “un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células que puede ocurrir en cualquier órgano o tejido”. El tipo de cáncer se define de acuerdo con el sitio donde este comienza, es decir, el sitio en que las células cancerosas comienzan a aparecer y desarrollarse. La causa del cáncer se ha asociado con diversos factores como son: hereditarios, ambientales, mala alimentación, y síndrome metabólico, entre otros.

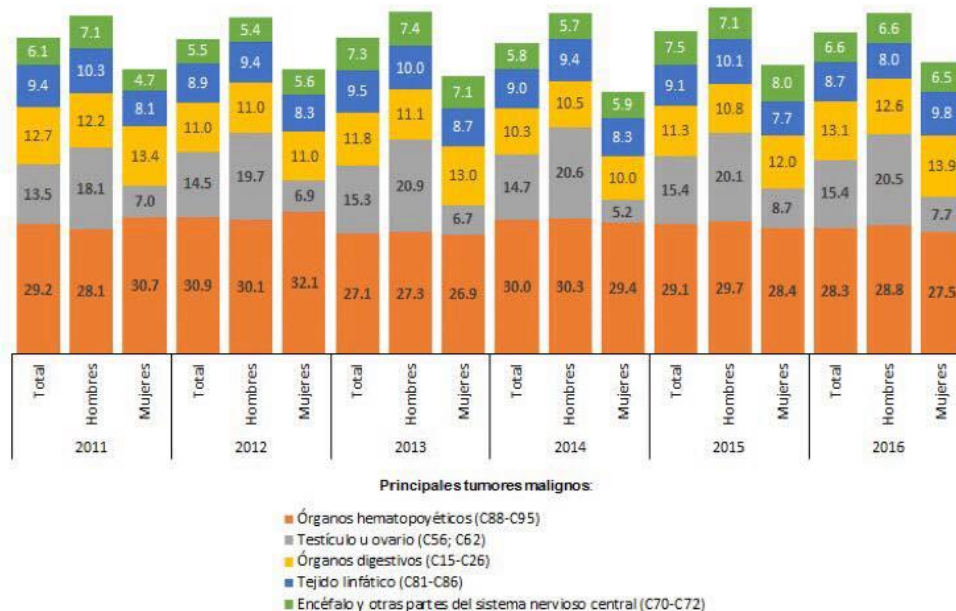
En el caso de las células cancerosas éstas se originan por alguna mutación que no es reparada, lo que ocasiona un funcionamiento anormal. Dentro de las características y capacidades que presentan las células transformadas se encuentran: 1) el mantenimiento de señales para la proliferación, 2) evasión de supresores de crecimiento, 3) resistencia a la muerte celular, 4) capacidad de replicación ilimitada, 5) inducción de angiogénesis, 6) invasión y metástasis, 7) reprogramación de la energía del metabolismo y 8) evasión del sistema inmune.

A nivel mundial el cáncer es de las principales causas de defunciones, destacando los cinco tipos con mayor índice de mortalidad: pulmonar (con 1.69 millones), hepático (788,000), colorrectal (774,000), gástrico (754,000) y de mama (571,000), (OMS, 2017).

La OMS (2017) declaró que el 70% de las muertes registradas por cáncer en 2012 se produjeron en África, Asia, América Central y Sudamérica; y pronostica que los casos anuales de cáncer aumentarán a 22 millones en las próximas dos décadas. De igual manera de acuerdo al trabajo de Siegel et al., 2019 se pronostican para este año 1,762,450 casos nuevos de cáncer y 606,880 defunciones en Estados Unidos de Norte América (Siegel, Miller, & Jemal, 2019).

De acuerdo a datos del INEGI, el número de casos diagnosticados y el número de defunciones por cáncer en México es, por cada 100,000 personas ha aumentado en el transcurso de 5 años de 6.1 a 6.6, para el caso de tumores del sistema nervioso central; 9.4 a 9.8 en tejido linfático; 12.7 a 13.9 en órganos digestivos; para testículo u ovario de 13.5 a 15.4; y para el caso de órganos hematopoyéticos desde 27.1 hasta 30.9, siendo estos últimos los tipos de tumores más frecuentes (Figura 1).

Porcentaje de muertes observadas para los cinco principales tumores malignos en la población de 18 a 29 años según sexo
Serie anual de 2011 a 2016



Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10).
 Excluye defunciones con residencia habitual en el extranjero y edad no especificada.
 Fuente: INEGI. *Estadísticas de Mortalidad. Cubos dinámicos.*

Figura 1. Datos obtenidos y procesados por INEGI sobre el número de defunciones en el lapso de 2011 a 2016 en personas de 30 a 59 años respecto a los principales tumores malignos. Se observa que en la Figura 1 mediante porcentajes de defunción obtenidos de hombres y mujeres durante cinco años, se presentan los tipos de tumores con mayor incidencia de mortalidad en México. En primer lugar, se encuentran los tumores en órganos hematopoyéticos, en segundo los presentes en testículos u ovarios, en tercer lugar, dentro de órganos digestivos, posteriormente en cuarto los tumores en tejido linfático y por último los que se desarrollan en encéfalo y otras partes del sistema nervioso central.

(Fuente: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_nal.pdf)

2.1.1 CÁNCER DE MAMA

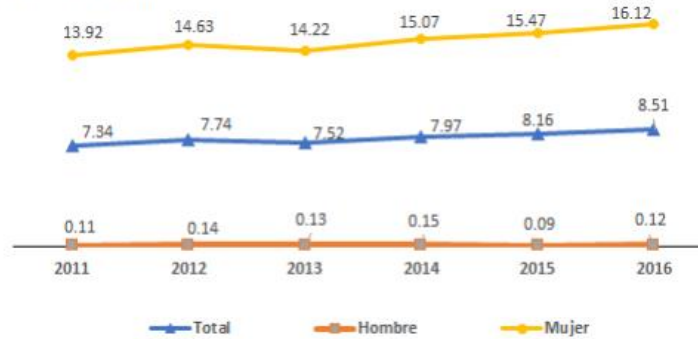
El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Los datos publicados por el Instituto Nacional del Cáncer en el año 2018 estiman que el cáncer de mama representa el 29% del total de neoplasias reportadas (Globocan, 2012).

En México, los registros epidemiológicos muestran que el número de nuevos casos de cáncer de mama van en aumento, así como la tasa de mortalidad por esta causa. Estudios recientes dicen que el cáncer de mama ocupa el primer lugar como causa de muerte por neoplasia maligna en las mujeres mayores de 25 años. En el año 2008 se reportaron 14,000 casos, lo cual representó el 21% del total de neoplasias reportadas en este género. También se presentaron para esta fecha un total de 5,000 muertes por cáncer de mama (13% del total de muertes por neoplasias reportadas) (Globocan, 2012).

En 2015, la Secretaria de Salud reportó el cáncer de mama como la segunda neoplasia más frecuente, estimando 1.67 millones de casos nuevos al año además de considerarlo como la primera causa de muerte en países en desarrollo y la segunda en países desarrollados.

De acuerdo con las estadísticas del INEGI, de 2011 a 2016 el número de muertes por cáncer de mama se incrementó de 7.34 a 8.51 por cada 100,000 habitantes. Sin embargo, al estratificarse por sexo, en mujeres la tasa de incidencia aumentó de 13.92 a 16.12 por cada 100,000 mujeres; y aunque los casos reportados de cáncer de mama en hombres son raros, la tasa de mortalidad por esta enfermedad en la población masculina es de entre 0.11-0.12 por cada 100,000 habitantes (Figura 2).

Tasa de mortalidad observada en la población de 20 años y más por tumor maligno de mama
Serie anual de 2011 a 2016
 Por cada 100 000 habitantes



Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), código C50.
 Excluye defunciones con residencia habitual en el extranjero y edad no especificada.
 Fuente: INEGI. *Estadísticas de Mortalidad. Cubos dinámicos*; y CONAPO. *Proyecciones de la Población 2010-2050*.

Figura 2. Gráfica obtenida de los datos obtenidos del INEGI de defunciones debidas a cáncer de mama entre los años 2011 a 2016. En la presente figura se muestra la tasa de mortalidad por tumores malignos de mama en hombres y mujeres por cada 100,000 habitantes mayores de 20 años en un lapso de cinco años, se puede observar que las mujeres presentan un mayor número de defunciones a comparación de los hombres. **(Fuente: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_nal.pdf)**

Las tasas de sobrevivencia de las pacientes son variables debido en gran parte del estadio y subtipo del tumor, así como el tipo de terapia sistémica que reciba la paciente y la resistencia que pueda desarrollar a esta.

2.1.2 CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA

Los estudios de microarreglos de expresión génica han permitido identificar distintos subtipos moleculares de tumores basados en análisis de expresión simultáneos de miles de genes en un solo experimento. Perou *et al*, analizaron por primera vez los patrones de expresión génica en tejidos de mama humano normales o malignos de individuos con cáncer de mama, logrando identificar los cuatro diferentes subtipos esquematizados en la Figura 3 (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001).

- ❖ **Luminales:** Son aquellos que expresan de forma positiva hacia los Receptores de Hormonas (RH), específicamente a los de estrógeno (RE) y progesterona (RP), su expresión es parecida al epitelio luminal, puesto que expresan citoqueratinas luminales, y los genes asociados con la activación del RE son *LIV1*, el cual puede activarse por estrógenos (observaciones en pacientes y células con cáncer de mama) y asociarse con la metástasis hacia los ganglios linfáticos, y *CCND1* que codifica para la ciclina D1 (Taylor, Morgan, Johnson, Hadley, & Nicholson, 2003). Suelen tener un buen pronóstico y tienen una buena respuesta a la terapia con hormonas. Dentro de este existen 2 tipos:
 - **Luminal A:** Es el más común y corresponde al tipo que expresa el receptor de hormona progesterona y estrógeno, el factor de crecimiento epidermal humano 2 (HER2) negativo, bajos niveles de KI67 quien al estar relacionado con ciclos de proliferación se le considera un marcador en cáncer de mama, una alta expresión de genes relacionados con RE y una baja expresión de genes que participan en la proliferación celular a comparación del subtipo luminal B. El desarrollo del cáncer es lento y el pronóstico suele ser bueno.
 - **Luminal B:** Corresponde al tipo que expresa el receptor de hormona (progesterona y estrógeno) positivo, HER2 positivo o negativo (el tipo negativo suele ser más común) y altos niveles de KI67. Este tipo suele desarrollarse ligeramente más rápido que el Luminal A y ser más agresivo.
- ❖ **Triple negativo:** Corresponde al tipo que expresa el receptor de hormona (progesterona y estrógeno) negativo y HER2 negativo y se presenta de forma similar a como estarían células basales epiteliales en otras partes del cuerpo (área diferente a las mamas) y como células mioepiteliales de la mama en un estado normal. Esta

clasificación suele corresponder a mujeres que presentan una alteración en el gen *BRCA1*, quien participa en la supresión de replicación celular.

- ❖ HER2 positivo: Corresponde al tipo que expresa el receptor de hormona (progesterona y/o estrógeno) negativo, HER2 positivo.

Este subtipo se caracteriza por la sobreexpresión de otros genes en el amplicón de HER2 tal como *GRB7*, ligado al receptor del factor de crecimiento 7, y *PGAP3*, quien codifica a siete proteínas transmembranales en la membrana del complejo de Golgi. En este caso el desarrollo es más rápido que en los luminales y el pronóstico empeora debido a la resistencia que presentan los pacientes, además de que suelen ser sensibles a las quimioterapias con antraciclinas y taxanos. También se ocupa el anticuerpo monoclonal trastuzumab, sin embargo, no todos los casos responden a éste tratamiento.

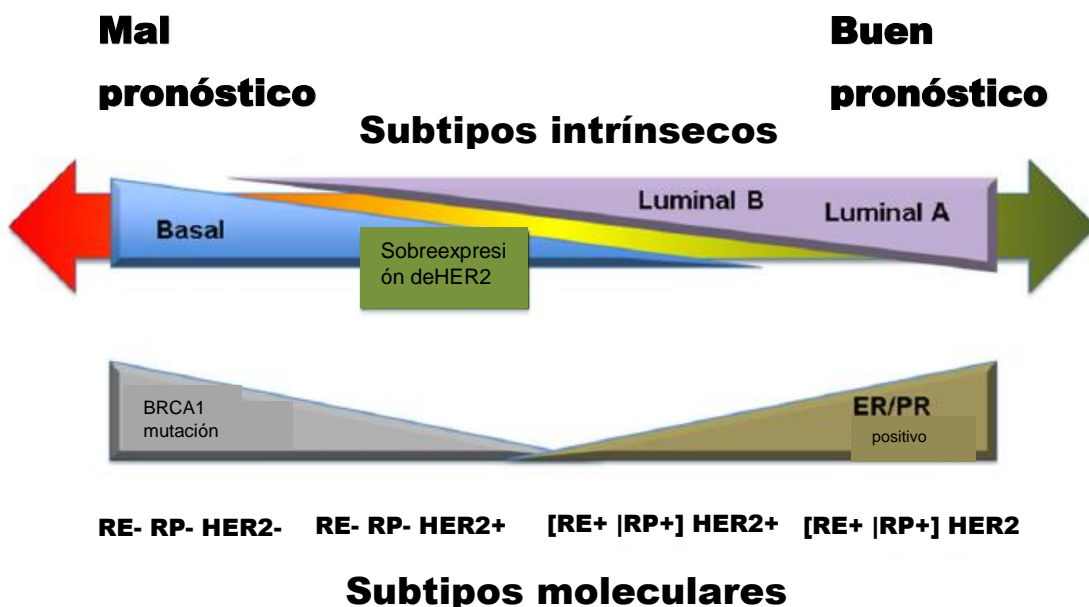


Figura 3. Subtipos moleculares de cáncer de mama agrupados de acuerdo a su positividad para los marcadores moleculares Receptor de Estrógeno (RE), Receptor de Progesterona (RP) y el Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 2 (HER2) Modificado de Dai et al, 2015. En la presente Figura podemos observar los subtipos moleculares de cáncer de mama de acuerdo a sus marcadores, RE, RP y HER2, así mismo vemos el pronóstico que estos tienden a tener, por ejemplo, los subtipos luminales presentan mejores pronósticos a comparación del tipo basal.

2.2 TERAPIAS PARA CÁNCER DE MAMA

Para la elección de la terapia se toman en cuenta: la infiltración de células cancerosas a ganglios linfáticos, la expresión de receptores hormonales (RE, RP), la sobreexpresión de HER2, el grado del tumor y la edad del paciente. Es importante destacar la importancia de la identificación del subtipo del cáncer pues las terapias no actúan de igual manera en todos los casos.

El cáncer de mama generalmente se combate con quimioterapia con antraciclina (doxorrubicina-adriamicina y epirubicina-ellence), taxanos (docetaxel y paclitaxel), terapia hormonal (para el caso de ser positivos RE, RP con inhibidores de aromatasa: anastrozol-arimidex, exemestano-aromasin y letrozol- femara; agonista de la hormona liberadora de gonatropina: goserelin-zoladex y moduladores selectivos del receptor de estrógeno: tamoxifen) y anticuerpos monoclonales como trastuzumab-herceptin para el caso de sobreexpresión de HER2 (Maughan, Lutterbie, & Ham, 2010).

Respecto a este último, su mecanismo de acción es unirse a los receptores HER2 de las células cancerígenas para evitar que estas reciban los estímulos de crecimiento, además de favorecer la citotoxicidad mediada por anticuerpos.

Sin embargo, un problema que se presenta frecuentemente es el desarrollo de resistencia a la terapia y/o la falta de terapias dirigidas. Por ello se ha hecho necesaria la búsqueda de proteínas que pudiesen ser empleadas como nuevos blancos de intervención terapéutica.

2.3 PTP1B Y CÁNCER DE MAMA

La fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, es uno de los mecanismos de modificación postraduccional más importantes para la regulación de diversos procesos celulares, incluyendo la proliferación, migración, transcripción de genes y progresión del ciclo celular entre otros. Las proteínas tirosinas cinasas, PTKs por sus siglas en inglés, *Protein Tyrosine Kinase*, son enzimas que añaden un grupo fosfato sobre residuos de tirosina de proteínas sustrato, causando un cambio conformacional-estructural, y desencadenando cascadas de señalización que participan en proliferación, apoptosis y otras funciones. Una vez que una proteína fosforilada ha cumplido con su propósito, esta requiere ser desfosforilada mediante la acción de otras enzimas llamadas proteínas tirosinas fosfatasas, PTPs por sus siglas en inglés *Protein Tyrosine Phosphatase*. Estas fosfatasas regulan la acción de las PTKs. Por consiguiente, un desbalance entre la actividad de las PTKs y PTPs está estrechamente ligada en la etiología de diversas enfermedades, por ejemplo el cáncer (T. Hunter, 1998).

Las fosfatasas son enzimas que se encargan de catalizar la hidrólisis del enlace éster fosfórico. Estas se dividen en tres grupos de acuerdo con su afinidad: 1) a residuos de serina o treonina, 2) residuos de tirosina y 3) residuos de serina y tirosina. Las fosfatasas pertenecen a una familia génica donde se agrupan en cuatro clasificaciones: 1) proteínas fosfatasas (PPP), 2) proteínas fosfatasas dependientes de metales (PPM), 3) proteínas tirosinas fosfatasas (PTP) y 4) la específica para el dominio carboxilo terminal de la ARN polimerasa II.

La función principal de las PTPs es revertir la acción de fosforilación de las PTKs, pudiendo tener efectos de activación o inactivación sobre sus sustratos (Ostman, Hellberg, & Bohmer, 2006). El dominio catalítico de las PTPs contiene aproximadamente 280 aminoácidos, presentando el residuo de cisteína 215 altamente conservado, que es requerido para la actividad catalítica (Figura 5).

En el genoma humano se han identificado 107 PTPs, los cuales pueden ser de tipo receptor ó no receptores (Figura 4) (Andersen et al., 2001). Las primeras PTPs de tipo no receptor identificadas fueron PTP1B (codificada por el gen *PTPN1*) y TC-PTP (codificada por el gen *PTPN2*).

PTP1B fue la primera de las fosfatasa de su clase (Clase I del tipo no receptores) en ser purificada (Tonks, Diltz, & Fischer, 1988a, 1988b), clonada (Brown-Shimer et al., 1990) y cristalizada (Barford, Flint, & Tonks, 1994). La mayor parte de los descubrimientos sobre los mecanismos de regulación, estructura y función de ésta clase de fosfatasa fueron descritos en PTP1B (Yip, Saha, & Chernoff, 2010). El gen que codifica a la proteína PTP1B (*PTPN1*) se encuentra localizado en el cromosoma 20, en el locus q13.1 – q13.2.

La proteína codificada por este gen tiene un tamaño de 50 KDa; consta de un dominio catalítico de 37KDa en su extremo amino terminal (residuos de 1-300), seguido de una región reguladora que comprende de 80-100 residuos y un dominio de anclaje al retículo endoplásmico (residuos de 400-435) (Figura 5) (Frangioni, Beahm, Shifrin, Jost, & Neel, 1992).

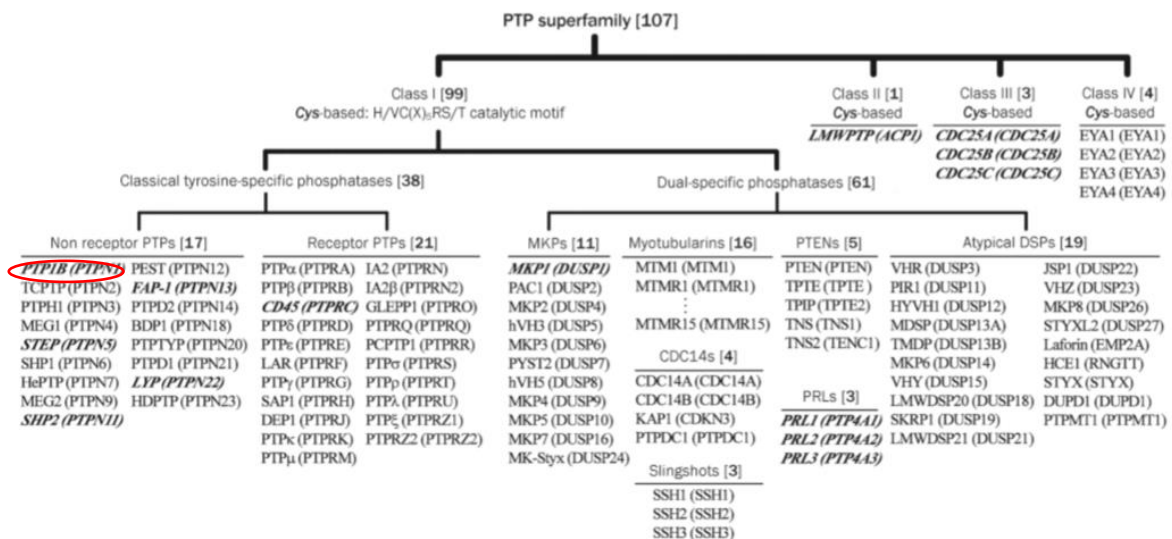


Figura 4. Clasificación de las PTPs, donde PTP1B se encuentra englobado en color rojo dentro de los No receptores. La familia de las fosfatasa está constituida por 107 miembros. Los números presentes en paréntesis corresponden a los genes dentro de la clasificación. Los cuales se dividen en cuatro clases, siendo la clase I la poseedora con más miembros. La clase II está conformada por un miembro el cual se asocia estructuralmente con reductasas de arseniato en bacterias y presenta una estructura más conservada a comparación de la clase I. Dentro de la clase III se encuentran 3 miembros los cuales tienen afinidad por treoninas y tirosinas. Finalmente, la clase IV se conforma por 4 elementos. Esquema extraído de Rong-jun et al., 2014.

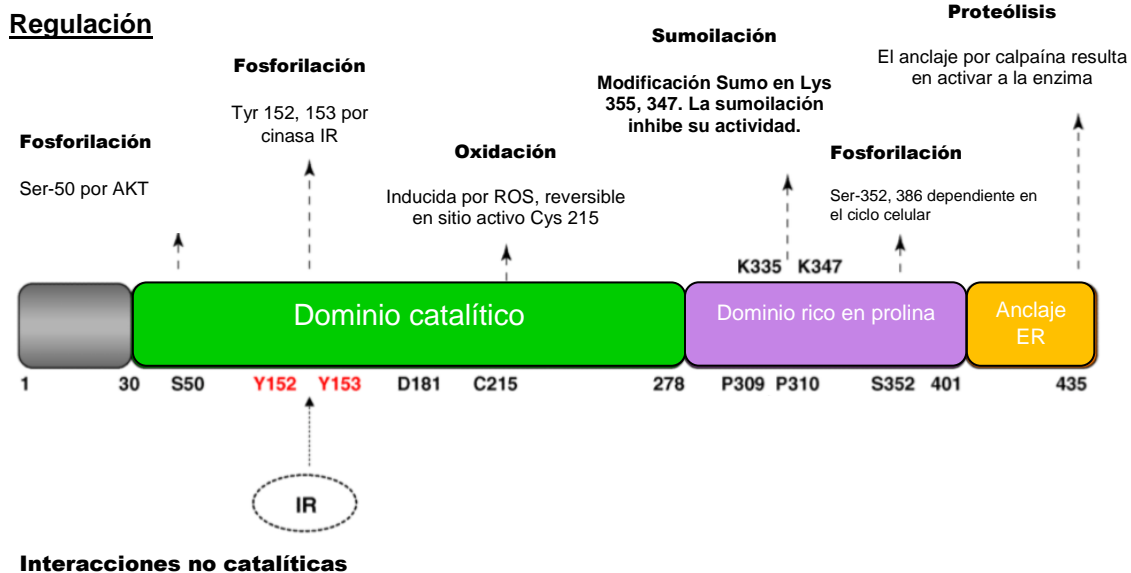


Figura 5. Esquema correspondiente a la estructura de PTP1B. En la primera sección de PTP1B, marcada en gris, el mecanismo de regulación se puede dar por fosforilación en el residuo de Ser50 el cual es desencadenado por AKT. En color verde se puede observar el dominio catalítico de PTP1B y en donde existen puntos de regulación para su activación, ya sea por fosforilación desencadenada como respuesta de la insulina o por Especies Reactivas de Oxígeno (ROS). Para el dominio rico en prolina observamos una regulación por fosforilación en los residuos Ser352 y Ser386, lo cual es vinculado al ciclo celular de PTP1B, igualmente en este dominio se puede regular por medio de sumoilación (con la proteína SUMO E3) en los residuos Lys355 y Lys347. Finalmente, en la región que permite el anclaje al Retículo Endoplasmático puede existir proteólisis de PTP1B, este último medio no suele ser recurrente en las células. Extraído de Yip *et al.*, 2010.

La actividad catalítica de la PTP1B es regulada por su localización en la superficie de membrana del retículo endoplásmico, que puede restringir su acceso a los sustratos. Cabe destacar que procesos como la endocitosis y movimientos citoplasmáticos por el citoesqueleto permiten a PTP1B llegar a sustratos que inclusive se encuentran en la membrana plasmática, por ejemplo, el Receptor de Insulina. Además, esta regulación de la actividad enzimática de PTP1B, puede ser regulada por modificaciones post-traduccionales como oxidación, que ocurre en el sitio activo Cys 215 por peróxido de hidrógeno, en respuesta de activaciones de receptores de proteínas tirosinas cinasas, de integrinas o en respuesta al factor de crecimiento epidermal (EGF), generalmente no es reversible, aunque en condiciones *in vivo* se ha observado que puede suceder, puede ser reversible (van Montfort, Congreve, Tisi, Carr, & Jhoti, 2003), fosforilación en residuos de serina y treonina por cinasas como PKC, CLK1, CLK2 o por el estímulo de la insulina

quien desencadena la fosforilación de tirosina en los residuos Y66, Y152 y Y153 (Ravichandran, Chen, Li, & Quon, 2001), sumoilación donde la proteína SUMO E3 ligasa interactúa con PTP1B, inhibiendo a STAT-1 y reduciendo la actividad enzimática (Dadke et al., 2007) y proteólisis mediada por calpaína, proteínas con una reversión respecto a la oxidación son sensibles a la proteólisis (Figura 5), (Frangioni, Oda, Smith, Salzman, & Neel, 1993)

Desde hace más de dos décadas, se ha reconocido que PTP1B tiene un papel importante en la regulación negativa de la actividad de los receptores de Insulina y Leptina (Seely et al., 1996; Zabolotny et al., 2002), ya que su delección en modelos murinos causa hipersensibilidad a la insulina y está asociado con un incremento marcado de la fosforilación del receptor de insulina, lo que puede generar diabetes.

Los primeros estudios referentes al papel de esta fosfatasa en fibroblastos transformados con *Neu* (el homólogo en rata a HER2), mostraron que la sobre expresión de PTP1B inhibía el crecimiento independiente de contacto, la formación de colonias y el crecimiento tumoral (Brown-Shimer, Johnson, Hill, & Bruskin, 1992); mientras que en fibroblastos transformados con *v-Src*, solo se observó una modesta disminución de la proliferación cuando PTP1B se sobre expresaba (Woodford-Thomas, Rhodes, & Dixon, 1992). Aunque los primeros estudios de la función de PTP1B en células transformadas sugerían que esta enzima podía actuar como un supresor tumoral, durante la década pasada varios reportes mostraron que PTP1B también podía actuar como un oncogén. Específicamente, se reportó que PTP1B desfosforila a la oncoproteína Src en el residuo asociado a su inhibición, la Tirosina 527, promoviendo su activación y aumentando las tasas de proliferación y supervivencia (Arias-Romero et al., 2009; Bjorge, Pang, & Fujita, 2000; F. Liu, Sells, & Chernoff, 1998; Zhu, Bjorge, & Fujita, 2007). Recientemente, se ha sugerido que otro sustrato de PTP1B, la proteína p62^{DOK}, también podría estar involucrada en la transformación celular, ya que al ser desfosforilado por PTP1B, pierde su función de inhibidor de la vía de RAS/RAF/MEK/ERK (Tonks & Muthuswamy, 2007).

Recientemente, se ha reportado que la amplificación del locus 20q13 que es donde se encuentra ubicado el gen que codifica para PTP1B, está asociada en la oncogénesis en diversas neoplasias como cáncer pancreático (Mahlamaki et al., 2002), gástrico (Yang et al., 2005), próstata (Bar-Shira et al., 2002), mama (Tanner et al., 1996; Wiener, Kerns, et al., 1994), y ovario (Wiener, Hurteau, et al., 1994); y se correlaciona con un mal

pronóstico. Por lo tanto, se presume que la sobreexpresión de PTP1B puede promover la tumorigénesis en diferentes tipos de cáncer, por ejemplo, el de mama y ovárico. Sin embargo, el mecanismo por el cual PTP1B promueve la progresión del cáncer de mama, no se ha establecido claramente.

Estudios recientes han mostrado que el silenciamiento de PTP1B disminuye el crecimiento celular e induce el arresto del ciclo celular y la apoptosis. Además el silenciamiento de PTP1B reduce la migración y la invasión, y revierte la transición epitelio-mesénquima (EMT) (Hoekstra et al., 2016).

Consistentemente, la expresión elevada de PTP1B promueve la proliferación celular y la metástasis en el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) mediante la activación mediada por Src de las vías de señalización RAS/RAF/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR (H. Liu et al., 2015).

La participación de PTP1B en el desarrollo de cáncer de mama fue confirmada con la publicación de dos artículos, en donde se demostró que la ausencia de PTP1B en un modelo murino de cáncer de mama dependiente de *Neu* retrasa considerablemente el desarrollo de tumores de mama y evita la metástasis a pulmón (Bentires-Alj & Neel, 2007; Julien et al., 2007). Adicionalmente, se comprobó que la inhibición farmacológica de PTP1B retrasa el inicio de la formación de tumores mamarios y reduce la metástasis pulmonar en el modelo de ratón MMTV HER2/*Neu* al reducir la señalización de RAS/RAF/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR (Julien et al., 2007).

Adicionalmente, se ha reportado que el 49% de los tumores de mama presentan sobreexpresión de PTP1B, y que el 53.9% de los tumores del subtipo luminal B con expresión de HER2, también expresan altos niveles de ésta fosfatasa (Soysal et al., 2013). Por estas razones, PTP1B ha llamado la atención de la industria farmacéutica y se le ha propuesto como un potencial blanco terapéutico para el tratamiento de diabetes, obesidad, y cáncer (Yip et al., 2010).

Uno de los sustratos de PTP1B que como se comentó anteriormente y ha sido asociado al proceso de transformación celular, es la proteína p62^{DOK} (Tonks & Muthuswamy, 2007), adicionalmente, se ha reportado que PTP1B desfosforila a la oncoproteína Src en el residuo asociado a su inhibición, la Tirosina 527, promoviendo su activación y aumentando las tasas de proliferación y la sobrevivencia (Figura 6) (Arias-Romero et al.,

2009; Bjorge et al., 2000; F. Liu et al., 1998; Zhu et al., 2007). Sin embargo, los niveles de fosforilación de los sustratos anteriormente mencionados son inconsistentes en los distintos modelos animales y celulares estudiados hasta la fecha, por lo que es necesario identificar nuevos sustratos de PTP1B que pudiesen estar involucrados en el proceso de transformación celular. Con este objetivo, recientemente el laboratorio del Dr. Arias identificó nuevos potenciales sustratos de PTP1B que pudiesen estar involucrados en el proceso de transformación celular, empleando la técnica de “Marcaje Isotópico Estable en Cultivo Celular” o SILAC por sus siglas en inglés. Uno de estos potenciales nuevos sustratos, es el Factor de Intercambio de Nucleótidos de Guanina VAV1, el cual es un activador de las GTPasas pequeñas RAC1 y CDC42, y es en el que se enfocará el presente trabajo.

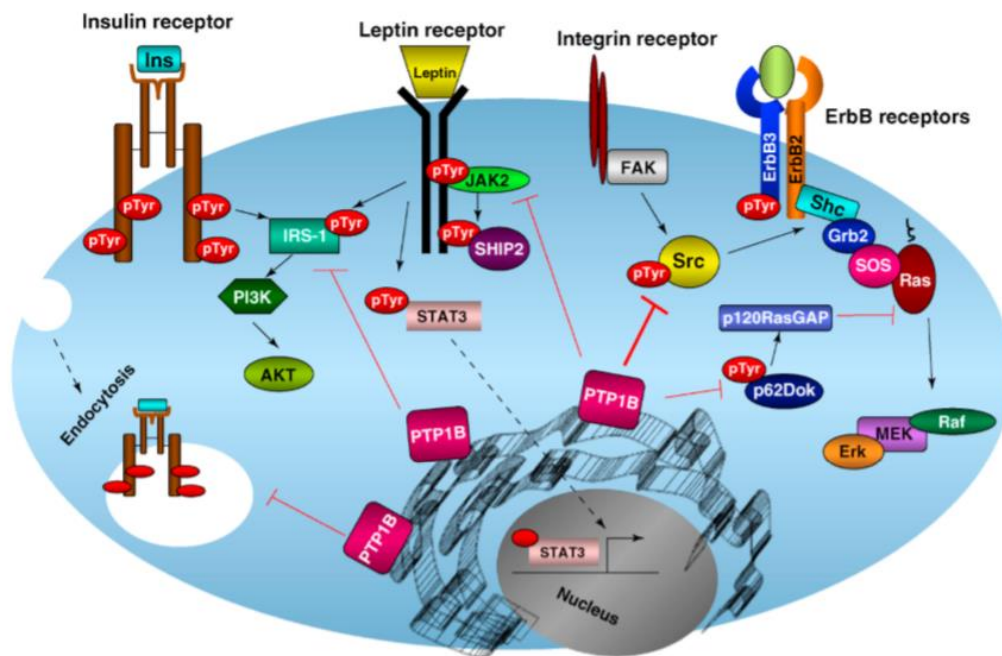


Figura 6. Vías de señalización de rutas metabólicas y oncogénicas de PTP1B. En la figura se muestran las principales rutas donde participa PTP1B. En las rutas metabólicas se encuentran aquellas derivadas de la insulina y la leptina, donde PTP1B actúa como regulador negativo sobre el receptor de Insulina y JAK2. De igual manera se muestra a Src quien al ser desfosforilado activa procesos de proliferación celular, los cuales se han encontrado asociados con el desarrollo de cáncer de mama, de manera similar se encuentra p62Dok el cual al ser inactivado por PTP1B permite el funcionamiento de p120RasGAP activando la vía de las Ras, lo cual también se ha encontrado relacionado con el cáncer de mama. Extraído de Yip et al., 2010.

A continuación, en la Tabla 2, se muestra parte de los resultados obtenidos de esta técnica por el grupo de Investigación del Dr. Arias, señalando en rojo al potencial nuevo sustrato de PTP1B que se estudió en este proyecto.

Genes predicted to contain pY site as PTP1B substrate	Predicted pY site as PTP1B substrate	11-mer peptide around pY site (pY in the middle)	Is the gene a known substrate of PTP1B?	known pY site(s) dephosphorylated by PTP1B on the full sequence
ACTN1	Tyr-12	QQTNDYMQPEE	yes	Tyr-12
DOK1	Tyr-362	KEDPIYDEPEG	yes	Tyr-362
EGFR	Tyr-1016	VDADEYLIPQQ	yes	Tyr-1016
GHR	Tyr-487	SNIDFYAQVSD	yes	Tyr-332, Tyr-487
IGF1R	Tyr-1165	IYETDYRKGK	yes	Tyr-1161, Tyr-1165
INSR	Tyr-1177	YETDYRKGK	yes	Tyr-999, Tyr-1185, Tyr-1189, Tyr-1190
INSR	Tyr-1178	YETDYRKGK	yes	Tyr-999, Tyr-1185, Tyr-1189, Tyr-1190
JAK2	Tyr-1007	PQDKEYYKVKKE	yes	Tyr-1007, Tyr-1008
VAV1	Tyr-142	GEDEDIYSGLSLSD	NO	N/A

Tabla 2. Sustratos reconocidos de PTP1B y nuevo posible sustrato remarcado en rojo. En la presente Tabla se muestran los resultados obtenidos por el Dr. Arias-Romero (datos no publicados) mediante la técnica de SILAC. En la primera columna se encuentran los sustratos obtenidos, algunos de ellos previamente conocidos como el Receptor de Insulina y JAK2, sin embargo, se encuentran nuevos sustratos como es el caso de VAV1, marcado en rojo. En la columna contigua se encuentra el residuo de tirosina donde se predice que PTP1B actúe, y finalmente en las últimas dos columnas si estos se han reportado como sustratos y de ser así los sitios donde actúa PTP1B.

2.4 ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA VAV

Las proteínas de la familia VAV son un grupo de moléculas altamente conservadas a lo largo de la evolución. Pertenecen al grupo de factores de intercambio de nucleótidos de guanina, quienes son los principales activadores de las GTPasas pequeñas de la familia Rho, quienes están involucradas en la reorganización del citoesqueleto de actina, invasión, motilidad, adhesión mediada por integrinas, progresión del ciclo celular y metástasis entre otras funciones celulares. Cabe mencionar que la actividad catalítica de estas proteínas es directamente dependiente de la fosforilación de tirosinas (Figura 7) y que estas se han encontrado desde coanoflagelados hasta mamíferos, presentando en este último grupo tres miembros: VAV1, VAV2 y VAV3. También participa en la amplificación de señales y en la diversificación de los eventos producidos por la estimulación de receptores de membrana en las células hematopoyéticas. Por ello, la regulación adecuada de VAV1 es fundamental para el perfecto funcionamiento de la célula. (Bustelo, 1996; Couceiro, Martin-Bermudo, & Bustelo, 2005; Rodríguez-Fdez & Bustelo, 2019).

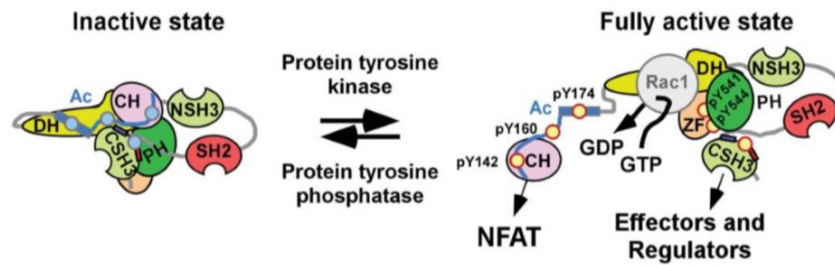


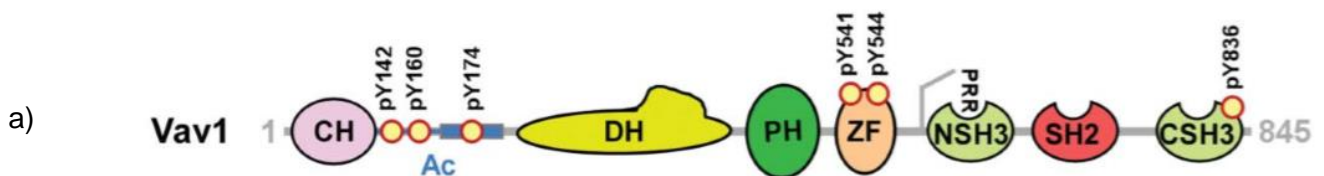
Figura 7. Modelaje de estado inactivo y estado activo mediante fosforilación de VAV en los residuos de tirosina Y142, Y160 y Y174. Inicialmente podemos observar la estructura de VAV1 en una conformación cerrada debido a que los residuos Y142, Y160 y Y174 se encuentran desfosforilados, manteniendo inactiva a la proteína. Situación que cambia cuando estos residuos son fosforilados, permitiendo una estructura abierta que permite la actividad de VAV1. Bustelo, 2014.

VAV1 fue descubierta en 1989 en su versión oncogénica, durante ensayos de formación de focos en células NIH3T3 usando ADN derivado de tumores. La versión oncogénica de VAV1 consiste en la truncación en las regiones CH y Ac, pues esto favorece que se conserve la conformación abierta de la proteína al no presentar los dominios que participan en la autoinhibición de la misma que en un estado sin alteración estabilizarían la conformación cerrada evitando la actividad de VAV1. Con técnicas de hibridación *in situ* y Northern-blot se detectó a VAV1 como una proteína restringida en células hematopoyéticas, sin embargo, con otros trabajos se ha encontrado presente en: células madre embrionarias (Wulf, Adra, & Lim, 1993), células trofoblásticas (Higuchi et al., 1995; Zmuidzinas et al., 1995), neuronas (Betz, Sandhoff, Fischer, & van Echten-Deckert, 2003) melanoma (Bartolome et al., 2006), células tumorales de cáncer de pulmón (Lazer, Idelchuk, Schapira, Pikarsky, & Katzav, 2009), líneas celulares de neuroblastoma (Betz et al., 2003; Hornstein et al., 2003).

Otros mecanismos que regulan la actividad de la proteína VAV1 son el establecimiento de uniones con otras proteínas implicadas en la transducción de señales *in vivo*, las cuales son: receptores transmembrana con actividad tirosina quinasa intrínseca o asociada (como algunos miembros de la familia Src), moléculas adaptadoras y co-receptores, moléculas capaces de activar a VAV1 de una forma no dependiente de fosforilación, factores que contribuyan positivamente a la función efectora de VAV1 y proteínas que contrarrestan la actividad biológica de VAV1 (Crespo, Schuebel, Ostrom, Gutkind, & Bustelo, 1997; Movilla & Bustelo, 1999; Schuebel, Movilla, Rosa, & Bustelo, 1998).

Así mismo, la presencia en tándem de dominios con homología a Dbl (DH), plekstrina (PH) y dedos de zinc (ZF), y son una característica única de VAV, además de un dominio de homología a Src de tipo 2 (SH2) en DH, lo que facilita la función adaptadora. La estructura de VAV se comprende de ocho dominios estructurales conservados: 1) el dominio de caponina con N-terminal (CH) involucrado en la movilización de calcio, 2) una región acídica (acidic domain -AC-) donde se conservan tres sitios de residuos regulatorios de tirosina (Y142, Y160 y Y174) (Figura 7), 3) la región catalítica con homología a Dbl (DH) involucrada con la reacción de intercambio de nucleótidos de guanina, 4) región de homología a pleckstrina (PH) quien media una interacción con los fosfolípidos, 5) un dominio en dedos de zinc (ZF), 6) una región rica en prolinas (PRR) quien media la unión con Src mediante SH3 con N-terminal (NSH3) y SH2 una homología de Src que permite la unión de VAV1 a otras proteínas fosforiladas y 7-8) dos dominios de homología a Src de tipo 3 (SH3) y tipo 2 (SH2) (Bustelo, 2014).

En resumen, el dominio DH en conjunto con los dominios PH y ZF llevan a cabo la actividad GEF; los dominios CH y AC participan en la regulación de la actividad de VAV1 (por un mecanismo de inhibición intramolecular), y las demás regiones se involucran con el establecimiento de interacciones proteína-proteína. Cabe mencionar que debido a la regulación de VAV por proteínas tirosinas cinasas esta actúa por debajo de receptores de membrana que presentan actividad quinasa intrínseca, como EGF y PDGF, o asociada como receptores de antígeno (Bustelo 2000, Bustelo and Couceiro 2008).



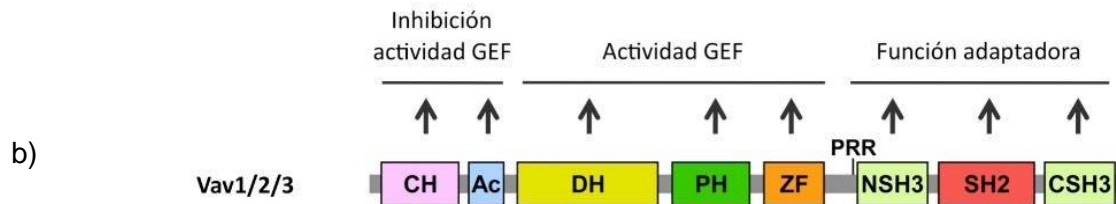


Figura 8. Estructura de VAV1 respecto a sus dominios y actividad. En el inciso a) se presentan los diferentes dominios que posee VAV1, los cuales son: 1) en color rosa el dominio de calponina con un grupo N-terminal, 2) región acídica en color azul, en puntos amarillos los residuos regulatorios de tirosina Y142, Y160 y Y174, 3) región catalítica en amarillo con homología a Dbl, 4) en color verde la región de homología a plekstrina, 5) de color naranjado el dominio de dedos de zinc, 6) una región rica en prolinas (PRR) que en conjunto con SH3 y un grupo N terminal median la unión con Src, 7) en color rojo vemos un dominio con homología a Src tipo 2 y 8) en verde un dominio con homología a Src tipo 3 y un grupo carboxilo terminal. En el inciso b) se observa esta estructura, destacando las funciones que cada dominio tiene para la actividad de VAV1. El conjunto del dominio de calponina con la región acídica participan en la regulación de la actividad de esta proteína, los dominios de homología a Dbl, plekstrina y dedos de zinc son necesarios para la actividad catalítica, y los dominios restantes participan en la interacción con otras proteínas. Extraído de Bustelo, 2014 y Barreira, 2013.

Finalmente, con otros estudios se ha visto que VAV1 está implicada en otros procesos fisiológicos como: desarrollo de cerebelo (Quevedo, Sauzeau, Menacho-Marquez, Castro-Castro, & Bustelo, 2010), homeostasis cardiovascular (Sauzeau, Jerkic, Lopez-Novoa, & Bustelo, 2007; Sauzeau et al., 2006), las respuestas dependientes de óxido nítrico en células del músculo liso (Sauzeau, Sevilla, Montero, & Bustelo, 2010) o los procesos metastáticos a partir de tumores de mama (Citterio et al., 2012).

2.5 VAV1 Y CÁNCER DE MAMA

Con respecto a la relación de VAV1 y cáncer de mama, algunos estudios han mostrado que diversos RhoGEFs se encuentran sobreexpresados. Lane y col. reportaron en el año 2008 la sobreexpresión de tres factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs): Trio, VAV1 y TIAM-I, en tejidos cancerosos a comparación de tejidos normales de mama (Lane, Martin, Mansel, & Jiang, 2008). Recientemente, Grassilli y col. mostraron que existe una correlación entre los niveles de expresión del receptor de estrógenos y de VAV1 en tumores de mama de pacientes menopáusicas (Grassilli et al., 2014). En este estudio, también se observó la presencia de VAV1 en el núcleo celular y se determinó que el silenciamiento de VAV1 con siRNAs afecta la expresión de 84 genes, de entre estos, 9 se sobreexpresan para factores de transcripción, mientras que el resto, que codifica para genes que participan en la migración e invasión celular se ve disminuida. Por lo que se sugiere que VAV1 puede ser un biomarcador para el pronóstico y un blanco para nuevas terapias en cáncer de mama.

Además se ha reportado que los niveles de expresión de VAV1 se encuentran aumentados en distintos tipos de tumores sólidos y de origen linfoide, así como en líneas celulares derivadas de tumores de diversos órganos y tejidos (Gjerstorff et al., 2006; Lane et al., 2008; Sebban et al., 2013; Du et al., 2014).

2.6 RELACIÓN VAV1 CON OTRAS ENFERMEDADES

La actividad de VAV1 también ha sido asociada al desarrollo de diversas patologías, así como a la regulación de diversos procesos biológicos en condiciones fisiológicas normales con distintos tipos celulares. Por ejemplo, la actividad de RhoGEF se ve afectada en el desarrollo de asma (Hwang et al., 2008), aterosclerosis (Rahaman, Li, & Silverstein, 2013), y su hiperactividad ha sido descrita como un factor genético de riesgo para el desarrollo de miastenia gravis (Avidan et al., 2014) y embolismo pulmonar sintomático (Lv et al., 2015); además de ser importante para la fisiología de los leucocitos (Pan et al., 2015), macrófagos (Prod'Homme et al., 2015) y células T (Pedros et al., 2015) como respuesta inflamatoria, así como la alteración de monocitos en hepatitis autoinmune (Lin, Zhang, Zhou, & Wang, 2016). También se tiene reporte de trabajos en donde se ha relacionado a VAV1 con el desarrollo de enfermedades coronarias (Yan et al., 2016), inflamación neuronal (Kassem et al., 2016) y esclerosis múltiple (Pazhouhandeh et al., 2018).

Cabe señalar que también se han reportado distintas mutaciones en VAV1 en distintos tipos de cáncer, como el de mama, páncreas, pulmón, ovario y próstata. En la Figura 7 se presenta un esquema donde se muestra el resumen de las mutaciones en VAV1 identificadas en diferentes tipos de cáncer en humanos (Katzav, 2015).

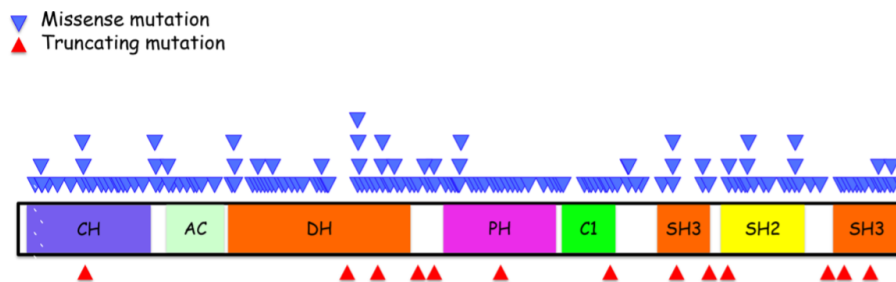


Figura 9. Estructura de VAV1 con marcaciones de mutaciones en cáncer. En color rojo se señalan en que sitio de la estructura de la proteína se encontrarían mutaciones truncas y en color azul mutaciones sin sentido. Estas se han encontrado presentes en distintos tipos de cáncer en seres humanos. Extraído de Katzav, 2015.

3. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas se ha observado un incremento en las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer de mama tanto en países industrializados como en países en vías de desarrollo. Se ha reportado que PTP1B podría estar involucrada en el desarrollo de cáncer de mama ErbB2/HER2 positivo, al regular la actividad de proteínas importantes en los procesos de proliferación, sobrevivencia y migración. Adicionalmente, resultados obtenidos en experimentos de fosfoproteómica han permitido identificar aproximadamente 380 potenciales nuevos sustratos de PTP1B, algunos de los cuales son relevantes para la sobrevivencia, migración y proliferación de las células cancerosas. En este trabajo se propone determinar si VAV1 es un nuevo sustrato de PTP1B, para en el futuro determinar como es que la desfosforilación de VAV1 mediada por PTP1B regula procesos importantes para el inicio y progresión tumoral como la migración celular y la reorganización del citoesqueleto de actina, los cuales son controlados por VAV1.

4. HIPÓTESIS

La proteína fosfatasa de tirosinas PTP1B es capaz de desfosforilar a la Tirosina 142 del Factor de Intercambio de Nucleótidos de Guanina VAV1.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Determinar si el Factor de Intercambio de Nucleótidos de Guanina VAV1 es un nuevo sustrato de PTP1B.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Analizar mediante la técnica de modelaje por homología *in silico* y docking la posible interacción entre PTP1B y VAV1.
- Evaluar mediante un ensayo de actividad de fosfatasa *in vitro*, si PTP1B es capaz de desfosforilar al residuo de Tirosina 142 de VAV1.
- Determinar si las oncoproteínas PTP1B y VAV1 interactúan físicamente en un contexto celular.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 GENERACIÓN DE UN MODELO *in silico* DEL DOMINIO CATALÍTICO DE PTP1B EN ASOCIACIÓN CON EL FOSFOPÉPTIDO CORRESPONDIENTE A LOS RESIDUOS 137-147 DE VAV1

6.1.1 MODELADO POR HOMOLOGÍA *in silico* Y DOCKING

La estructura del fosfopéptido correspondiente a los aminoácidos 137-147 de VAV1 fue diseñada empleando el programa PEPstrMOD, una vez refinada la probable estructura del fosfopéptido se realizó un “docking local” entre el dominio catalítico de PTP1B obtenido a partir de su estructura cristalográfica a una resolución de 1.5 Å (PDB ID: 2HNP) y el fosfopéptido de VAV1, empleando el programa ClusPro 2.0. En este paso se generaron aproximadamente 900,000 probabilidades de interacción agrupadas en grupos y obteniendo un resultado de muy alta probabilidad de asociación entre ambas proteínas. Finalmente, los complejos de PTP1B y el fosfopéptido de VAV1 fueron visualizados en el programa YASARA.

6.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PTP1B SOBRE VAV1 *in vitro*

6.2.1 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA *in vitro*

Con el propósito de determinar si VAV1 es un sustrato directo de PTP1B, se empleó un ensayo colorimétrico para evaluar la actividad de fosfatasa (Protein Tyrosine Phosphatase 1B Assay Kit, Colorimetric. Merck Millipore) de acuerdo con el protocolo sugerido por el proveedor Merck. Brevemente, en una placa de 96 pozos se colocaron 45 µL de Buffer de ensayo 1X por cada reacción, 5 µL de PTP1B recombinante a una concentración de 0.5 ng/µL (2.5 ng concentración final) y 50 µL del fosfopéptido que corresponde a los residuos 137-147 de VAV1, pY¹⁴² a una concentración final de 75 µM diluido en Buffer de ensayo 1X. Como control positivo, se empleó un fosfopéptido que corresponde a los residuos 1142-1153, pY¹¹⁴⁶ del Receptor a Insulina β; y como control negativo se incubó la mezcla en ausencia de péptido. Las muestras fueron incubadas a 30°C durante 30 min, y la reacción se detuvo añadiendo 25 µL de Reactivo Verde. Las muestras fueron incubadas

en la oscuridad durante 30 min y se midió la absorbancia a 620 nm en un lector de placas. Finalmente, se calcularon los nmoles de PO_4^{2-} liberados por los fosfopéptidos de VAV1 y del IR β en presencia de PTP1B, así como la K_m y la V_{\max} empleando el programa Prism 7.

6.3 EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN FÍSICA DE VAV1 Y PTP1B EN UN CONTEXTO CELULAR

6.3.1 CULTIVO CELULAR

La línea celular HEK 293 se cultivó en medio DMEM/F12 (BIOWEST®) suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibiótico/antimicótico al 1%. Las células se mantuvieron en una incubadora con una atmósfera de CO_2 al 5% a una temperatura de 37°C y fueron divididas cuando alcanzaron un 80% de confluencia.

6.3.2 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Los vectores de expresión eucarionte pC.HA VAV1 (que codifica a la proteína VAV1 humana fusionada a la bandera de hemaglutinina de influenza humana (HA) en su extremo N-terminal, (esta bandera corresponde a una glucoproteína requerida para la infectividad del virus), plásmido Addgene 1881) y pcDNA4/myc-His PTP1B (que codifica a la proteína PTP1B de ratón fusionada a una bandera de myc (bandera del polipéptido obtenido del gen *c-myc*) y una de His(6X) (aminoácido de Histidina) en su extremo C-terminal, (plásmido donado por el Dr. Michel Tremblay, McGill University) fueron transformados en bacterias competentes *E. coli* de la cepa XL10 Gold. La transformación se llevó a cabo mezclando 100 ng de los plásmidos con 50 μL de células competentes, la mezcla se incubó por 30 minutos en hielo, posteriormente se aplicó un choque térmico a 42°C durante 2 minutos, para luego añadir 1 mL de medio LB estéril sin antibióticos e incubar durante 1 hora a 37°C en agitación. Después las bacterias se centrifugaron a 10,000 rpm durante 1 minuto, se retiró el sobrenadante y se añadió 0.1 mL de LB estéril para resuspender las bacterias y sembrarlas en placas de agar LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante toda la noche.

6.3.3 PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Para la purificación de los plásmidos, tres colonias candidatas se colocaron en 3 mL de medio LB-Amp (100 µg/mL) y se dejaron crecer durante 15 horas a 37 °C con agitación constante. La purificación de los plásmidos se realizó empleando el kit de mini prep GenJet plasmid miniprep kit, empleando el protocolo sugerido por el proveedor ThermoFisher. Brevemente, el cultivo de bacterias se centrifugó en un tubo eppendorf a 13,000 rpm durante 2 minutos y el sobrenadante fue desechado. El pellet se resuspendió en 250 µL de buffer de resuspensión (suplementado con RNasa A) para luego añadir 250 µL de buffer de lisis y después agregar 350 µL de buffer de neutralización, se mezcló por inversión y se centrifugó la muestra a 13,500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se recuperó, fue transferido a una columna y se centrifugó a 13,500 rpm durante un minuto. Posteriormente, la columna se lavó 2 veces con 700 µL de buffer de lavado centrifugando a 13,500 rpm durante un minuto, y desechando la solución que sale a través de la columna. Finalmente, las columnas fueron transferidas a nuevos tubos de 1.5 mL y los plásmidos se eluyeron de la columna adicionando 30 µL de buffer de elusión y centrifugando las muestras a 13,500 rpm durante un minuto.

La concentración del plásmido se determinó leyendo las muestras en un lector de placas EPOCH BIOTEK a una longitud de onda A260, y su identidad fue verificada mediante restricción enzimática, las enzimas utilizadas para VAV1 fueron XbaI y BclI, para el caso de PTP1B se utilizaron BamHI y AgeI.

6.3.4 TRANSFECCIÓN

Los vectores de expresión eucarionte pcDNA4/myc-His PTP1B y pc.HA VAV1 fueron co-transfectados en la línea celular HEK 293, empleando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogene) con el siguiente protocolo: los complejos de DNA - lípidos catiónicos se prepararon diluyendo 5 µg del vector pcDNA4/myc-His PTP1B junto con 5 µg del vector pc.HA VAV1 y 10 µL de lipofectamina en 750 µL de Opti-MEM®. Las muestras se mezclaron con ayuda de un vortex y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente.

Las células (en una concentración de 0.25×10^6 en una caja de 6 pozos) se lavaron una vez con 5 ml de PBS 1X estéril y se les añadió 5 mL de Opti-MEM®, la mezcla de DNA -

lipofectamina se añadió al cultivo por goteo y las células fueron incubadas a 37° C durante 3 hrs. Finalmente, el medio fue removido y sustituido por el medio de cultivo con antibióticos y suero. 48 horas post transfección las células se lavaron y se procesaron para realizar co-inmunoprecipitación.

6.3.5 CO-INMUNOPRECIPITACIÓN

Las células se lavaron 2 veces con 5 mL de PBS 1x y se adicionaron 500 µL de buffer RIPA [PBS, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 7.4 mM (50 mM), NaCl (150 mM), NP-40 (1%), desoxicolato de sodio (0.5 %), SDS (0.1%), EDTA (5mM), inhibidor de proteasas (COMPLETE, Roche)]. A continuación, se rasparon las células con ayuda de un gendarme, fueron transferidas a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se colocaron en rotación durante 15 minutos a 4°C. Finalmente la solución fue centrifugada a 14000 rpm durante 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante, el cual se almacenó a -80°C hasta su uso.

Las proteínas obtenidas fueron incubadas durante toda la noche en rotación a 4°C con anticuerpos monoclonales dirigidos contra las banderas de HA o de myc, y con 50 µL de proteína A/G Sefarosa previamente lavada con PBS 1X. Al día siguiente, las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. A continuación, las perlas de proteína A/G Sefarosa se lavaron 2 veces con 150 µL de buffer RIPA frío, se resuspendió en 100 µL de buffer Laemli y se hirvieron durante 5 min, para posteriormente ser separadas en geles de poliacrilamida-SDS al 12% 120 V por 1:40 hr, transferidas a membranas de PVDF con un voltaje de 20 V por 30 min e incubadas con anticuerpos primarios dirigidos contra las banderas de HA / myc, respectivamente, durante 1 hora a temperatura ambiente, y anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa por 1 hora, para finalmente visualizar las proteínas mediante quimioluminiscencia, para lo cual, el revelado se llevo a cabo mediante la oxidación de luminol (sustrato para quimioluminiscencia) por la peroxidasa de rábano en presencia de peróxido de hidrógeno. Al ocurrir la reacción la membrana se puso en contacto con una película de autorradiografía para que quedará impresa en esta.

6.3.6 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Con el propósito de determinar si PTP1B y VAV1 se localizaban en el mismo espacio celular se llevo a cabo el siguiente procedimiento. Se sembraron células con una confluencia del 80% en cubreobjetos estériles colocados en una placa de 6 pozos y fueron co-transfectadas con 30 μ L de lipofectamina en 500 μ L de Opti-MEM® con los vectores de expresión eucarionte pcDNA4/myc-His PTP1B y pc.HA VAV1. 48 horas post-transfección, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS, durante 15 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente se bloquearon con BSA al 1% durante una hora y media, se incubaron con los anticuerpos monoclonales dirigidos contra las banderas de HA (en conejo) y myc (en ratón) durante 1 hr a temperatura ambiente. Las laminillas fueron lavadas tres veces con PBS - Tritón X-100 al 0.05% durante 15 minutos e incubadas con anticuerpos secundarios anti-ratón conjugado Alexa Fluor® 594 y anti-conejo conjugado Alexa Fluor® 488 a una dilución de 1:200 durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Las muestras se lavaron nuevamente tres veces con PBS- Tritón-X-100 al 0.05% durante 15 minutos, se montaron en portaobjetos con 25 μ L de Vectashield con DAPI y se sellaron con barníz. Finalmente, las células fueron visualizadas utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP5 X.

7.RESULTADOS

7.1 INTERACCIÓN *in silico* ENTRE EL DOMINIO CATALÍTICO DE PTP1B Y VAV1

Los resultados del modelaje por homología *in silico* y docking mostraron que el fosfopéptido de VAV1 (Figura 10 A), tiene una estructura que se ajusta al dominio catalítico de PTP1B (Figura 10 B), en dónde se puede apreciar que el péptido (mostrado en amarillo, con el residuo de fosfotirosina en la posición 142 en naranja), hace contacto con los residuos de cisteína en la posición 215 y arginina en la posición 221, los cuales son indispensables para la actividad catalítica de PTP1B.

En la Tabla 3, se muestran los resultados obtenidos del análisis bioinformático realizado con el programa Cluspro 2.0, con ello se obtuvo que existen tres posibles grupos, los cuales corresponden a conjuntos de posibilidades de interacción entre las proteínas PTP1B y VAV1. La columna de (%) indica que porcentaje de las 900 mayores probabilidades de interacción pertenece a cada grupo, a su vez este valor arbitrario dado por él programa, está relacionado con la probabilidad de que esa interacción ocurra. Finalmente, el score equivale a un valor que puede tomarse como predicción para la energía de interacción entre las proteínas, en la que entre más negativo sea el valor, más estable es la interacción entre ambas moléculas, es decir, habrá una mayor estabilidad proteómica cuando estas interactúen.

La fila marcada en amarillo indica que, de las 900 mejores posibilidades de asociación de ambas proteínas, en el 77% de los casos el fosfo péptido de VAV1 ocupa el sitio activo de PTP1B, pero la fosfotirosina queda lejos de los residuos de Cys215 y Arg221 que son los que llevan a cabo la actividad catalítica. De las dos filas marcadas en verde (en donde el fosfo péptido de VAV1 ocupa el sitio activo de PTP1B, y el residuo de fosfotirosina queda cerca de los residuos catalíticos), observamos que el Clúster 2 es el mejor modelo de interacción pues presenta la menor energía de interacción. Estos resultados sugieren que PTP1B y VAV1 son capaces de formar un complejo estable *in silico*. La Figura 11 muestra los modelos de interacción para cada uno de los grupos obtenidos previamente descritos de acuerdo con los datos que se muestran en la Tabla 3.

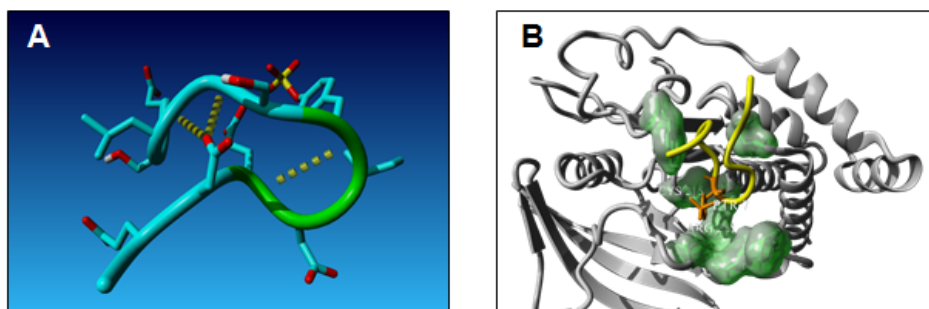


Figura 10. Modelo de la Interacción Entre PTP1B y VAV1 Obtenidos por Docking. A) Estructura del péptido correspondiente a los residuos 137-147 de VAV1 fosforilado en la Tirosina 142 (color verde). B) Estructura del dominio catalítico de PTP1B en gris en complejo con el péptido correspondiente a los residuos 137-147 de VAV1 (amarillo), en verde se muestran los residuos de Cys 215 y Arg 221 del dominio catalítico de PTP1B que hacen contacto con el residuo de fosfo-Tirosina 142 indicado en naranja.

Cluster	VAV	
	%	Score
1	77%	-793
2	14%	-802
3	9%	-796

Tabla 3. Resultados obtenidos de Cluspro entre PTP1B y VAV1. Se muestran el porcentaje de veces correspondiente al número de veces en que las posibilidades coincidían en formas de interacción y en Score la energía resultante de esta interacción. En color verde se muestran los modelos que interactuaban en el sitio activo de PTP1B (interactuaban con Cys 215 y Arg 221) y en amarillo aquella que no se encontraba cerca del sitio activo.

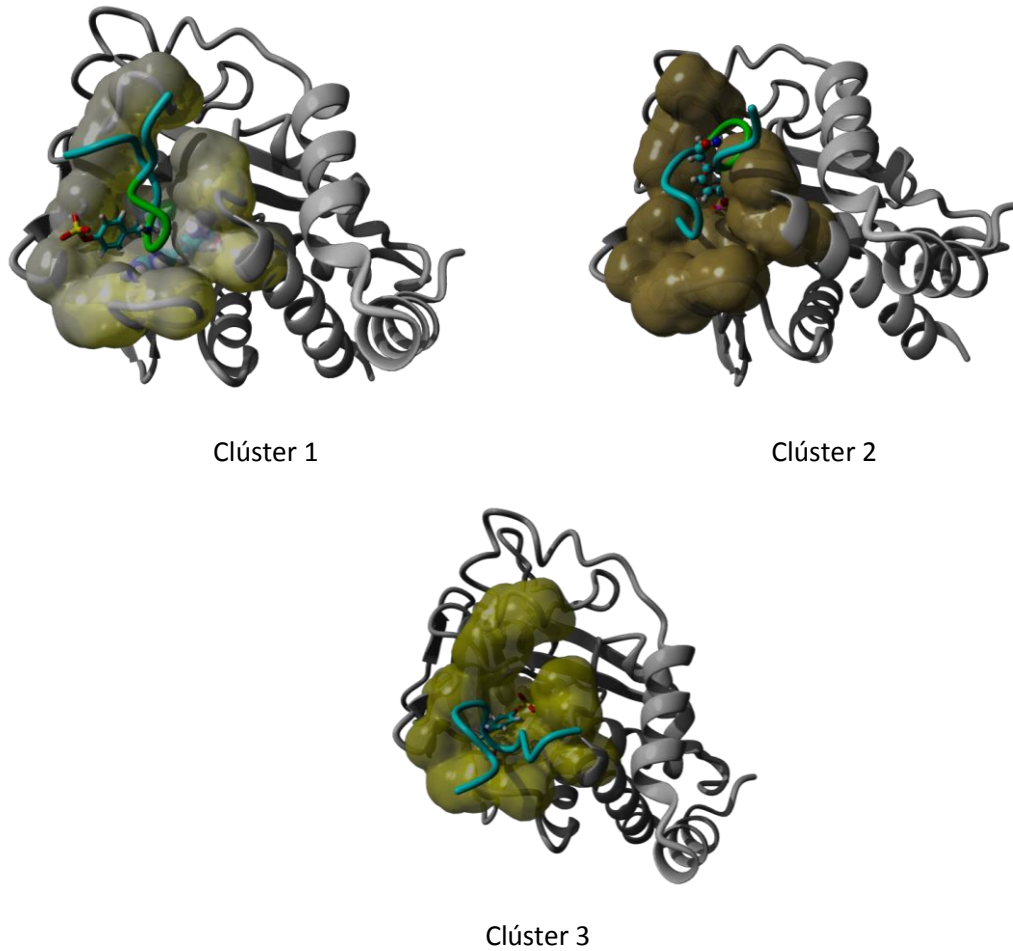


Figura 11. Modelado de posibles interacciones entre PTP1B y VAV1. Como se muestra en la Figura se presentan tres posibles modelos en que podría interaccionar PTP1B con el péptido de VAV1. Para el caso del clúster 1, el péptido de VAV1 embona con la estructura de PTP1B sin embargo el residuo de tirosina se encuentra alejado de los residuos de Cys 215 y Arg 221. En el clúster 2 y 3 el péptido de VAV1 coincide con el sitio catalítico de PTP1B, pero tomando en consideración los valores obtenidos en el Score por el Docking, es el mejor modelo de interacción pues presenta la menor energía de interacción.

7.2 EL RESIDUO DE TIROSINA 142 DE VAV1 ES DESFOSFORILADO POR PTP1B *in vitro*

Una vez que se determinó que PTP1B forma un complejo con el fosfopéptido de VAV1 *in silico*, se procedió a comprobar si VAV1 es un sustrato de PTP1B *in vitro* empleando un ensayo colorimétrico para determinar la actividad de fosfatasa de PTP1B sobre el fosfopéptido de VAV1 (Fig. 12A). Ésta se evaluó a distintos tiempos (0, 5, 10, 20 y 30 min), y se registró midiendo las absorbancias a 620 nm en un espectrofotómetro EPOCH BIOTEK, empleando como control positivo al fosfopéptido del receptor de insulina (RI), el cual es un sustrato conocido de PTP1B. Con los datos obtenidos se calcularon los nmoles de PO_4^{2-} liberados por los fosfopéptidos de VAV1 y del RI en presencia de PTP1B, observándose que PTP1B cataliza la desfosforilación de VAV1 más eficientemente que la del RI (Figs. 12B y 12C). Finalmente, se obtuvieron las constantes cinéticas V_{\max} y K_m mediante un análisis de regresión no lineal de Michaelis-Menten empleando diferentes concentraciones del sustrato (VAV1), y obteniendo valores de 35.04 pmol de PO_4^{2-} /min y 17.06 μM respectivamente, lo que sugiere que PTP1B cataliza eficientemente la desfosforilación de VAV1 (Fig. 12D).

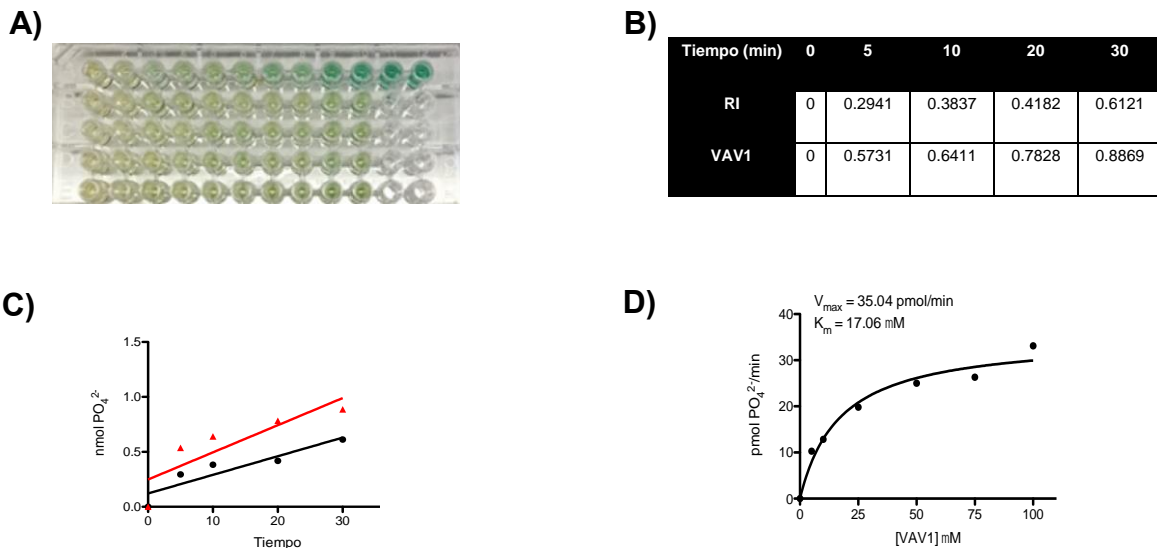


Figura 12. Ensayo de actividad de fosfatasa *in vitro* de PTP1B contra el péptido correspondiente a los residuos 137-147 de VAV1 fosforilado en la tirosina 142. A) Prueba colorimétrica para determinar la actividad *in vitro* de PTP1B contra VAV1. B) nmoles de PO_4^{2-} liberados por el fosfopéptido de VAV1 en presencia de PTP1B a distintos tiempos. C) Curso Temporal de Liberación de Fosfato Mediada por PTP1B del fosfopéptido de VAV1. En rojo se observa la liberación de PO_4^{2-} del péptido de VAV1, y en negro de un fosfopéptido correspondiente al Receptor de Insulina (IR), un sustrato conocido de PTP1B. D) Tasa de desfosforilación del Péptido Correspondiente a los Residuos 137-147 de VAV1 Fosforilado en la Tirosina 142 mediado por PTP1B. La curva se ajustó mediante un análisis de regresión no lineal de Michaelis-Menten.

Una vez que se determinó que VAV1 es un sustrato de PTP1B *in vitro*, se procedió a determinar si estas dos proteínas también interactúan en un contexto celular. En primer lugar, se purificaron y verificaron por restricción enzimática los vectores de expresión eucariote pC.HA VAV1 y pcDNA4/myc-His PTP1B, los cuales contienen los genes que codifican a las proteínas VAV1 fusionada a una bandera de HA en su extremo amino terminal, y a PTP1B fusionada a banderas de myc y 6xHis fusionadas a su extremo carboxilo terminal respectivamente. En la Fig. 13A, observamos los resultados de este análisis para validar la identidad de los vectores, en el carril 2 se muestra el plásmido de VAV1 con un valor correspondiente a su peso de 2.5 kb, para el caso de PTP1B se presenta el resultado en el carril 4, el cual fue identificado con su peso molecular de 1.1 kb. Los carriles 1 y 3 contienen las marcas de los pesos moleculares. Una vez que se corroboró la identidad de los plásmidos, se transfectaron individualmente en células HEK293, posteriormente se lisaron (48 horas post-transfección) y se verificó mediante la técnica de Western blot la expresión de ambas proteínas. Como control negativo se emplearon las proteínas totales de células sin transfectar, y como control de carga se utilizó GAPDH. En la Fig. 13B se muestran los resultados obtenidos, donde en el primer carril como control negativo se tuvieron células no transfectadas, en el segundo se muestra la expresión de PTP1B, el cual presentó un peso de 50 kDa pertenecientes a su peso molecular proteico, en la siguiente columna se tienen la expresión de VAV1 con un peso de 98 kDa. En la parte inferior se muestra el control de carga con 37 kDa.

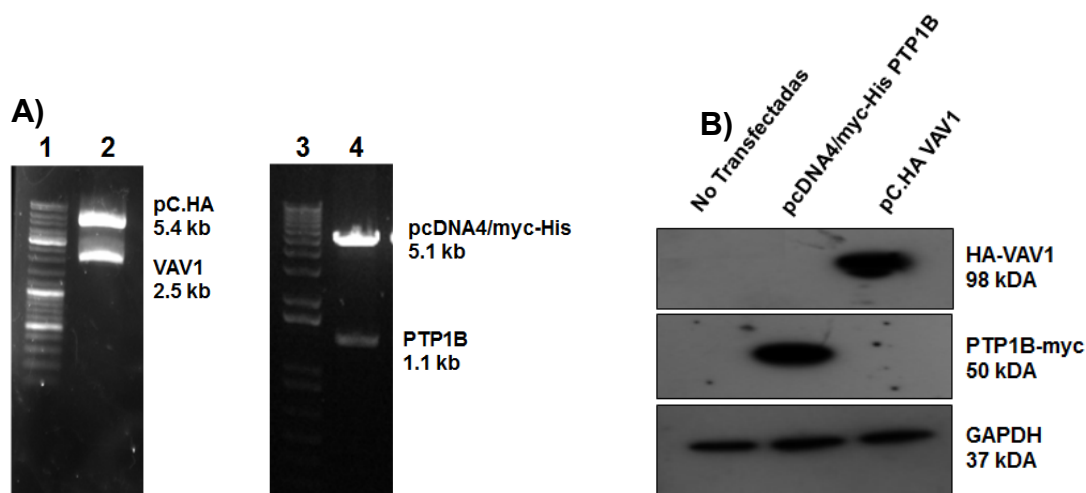


Figura 13. Expresión transitoria de PTP1B y VAV1 en la Línea Celular HEK-293. A) Análisis por restricción de los plásmidos pC.HA VAV1 con las enzimas XbaI y SpeI (carril 2) y pcDNA4/myc-His PTP1B con las enzimas BamHI y ApaI (carril 4). En los carriles 1 y 3 se observan los marcadores de peso molecular. B) Western blot para verificar la expresión de PTP1B-myc y HA-VAV1 en células HEK-293 no transfectadas (carril izquierdo), transfectadas con el vector pC.HA VAV1 (carril central) o transfectadas con el vector pcDNA4/myc-His PTP1B (carril derecho). Como control de carga se usó GAPDH.

7.3 PTP1B Y VAV1 INTERACTÚAN EN UN CONTEXTO CELULAR

Finalmente, para comprobar la asociación de ambas proteínas, células HEK293 fueron co-transfectadas con ambos vectores de expresión (pC.HA VAV1 y pcDNA4/myc-His PTP1B) y se lisaron 48 horas post-transfección. Una parte de los lisados se almacenó para ser utilizada como control con las proteínas totales y se denominó INPUT, y el resto de los lisados se dividió en dos tubos, en uno se incubaron los lisados con IgG de ratón como control negativo (control de isotipo) para comprobar que nuestras proteínas no se unieran de manera inespecífica a otros anticuerpos; y la parte restante de los lisados se incubó con el anticuerpo anti-myc con el propósito de co-inmunoprecipitar a PTP1B y proteínas asociadas a esta fosfatasa. Los western blots se realizaron empleando anticuerpos anti-HA con el propósito de determinar si VAV1 se encontraba formando complejos con PTP1B al momento de realizar la co-inmunoprecipitación. Los resultados obtenidos confirman que VAV1 se encuentra presente tanto en el INPUT (proteínas totales) como en las proteínas que co-inmunoprecipitaron junto a PTP1B, pero no en las proteínas incubadas con el control de isotipo, lo cual confirma que VAV1 se asocia a PTP1B en un contexto celular (Fig. 14A panel superior), mientras que PTP1B se encuentra presente en el INPUT (proteínas totales) y en la inmunoprecipitación, pero no en las proteínas incubadas con el control de isotipo, cabe señalar que en el carril correspondiente al control de isotipo se observa una banda que teóricamente es 2 kDa más grande que PTP1B y que corresponde a las cadenas ligeras de las IgG usadas como control de isotipo (Fig. 14A panel inferior). De manera similar, se realizó el experimento inverso inmunoprecipitando a VAV1 con el anticuerpo anti HA y realizando el Western blot con el anticuerpo anti-myc, obteniendo los resultados que se muestran en la Fig. 14B, podemos observar que PTP1B se encuentra presente en el lisado total (INPUT) así como con las proteínas coimmunoprecipitadas, último carril, en el carril dos confirmamos la ausencia con el control de isotipo con lo que descartamos uniones inespecíficas. Por lo que podemos concluir que PTP1B y VAV1 interactúan en un contexto celular.

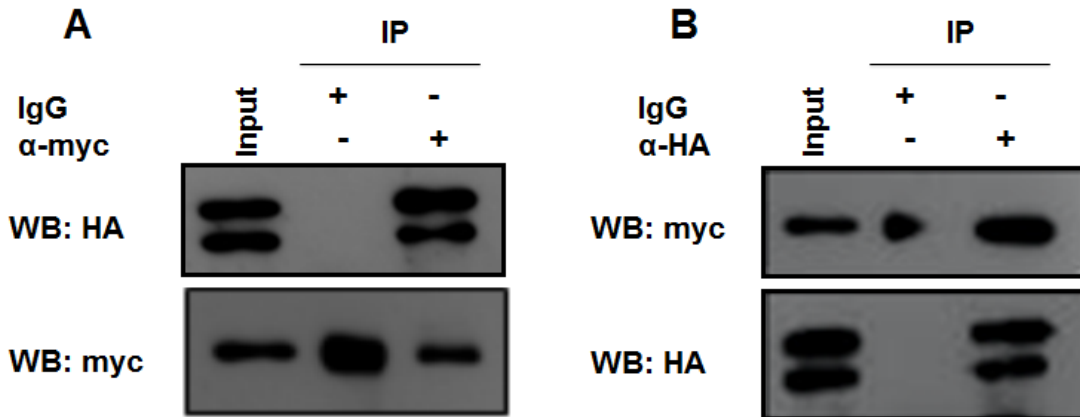


Figura 14. Determinación de interacción entre PTP1B y VAV1 por co-inmunoprecipitación. A) Western blot representativo de la co-inmunoprecipitación entre PTP1B y VAV1. Células HEK293 fueron co-transfectadas con vectores de expresión eucariote para las proteínas PTP1B-myc y HA-VAV1. En el panel superior de la izquierda se muestra la presencia de HA-VAV1 tanto en el lisado total (INPUT) como en la inmunoprecipitación empleando el anticuerpo anti myc, pero está ausente cuando se usó el control de isotipo (IgG). El panel inferior muestra a PTP1B-myc presente en los lisados totales y en la inmunoprecipitación. El panel B muestra el experimento inverso, en el panel superior se muestra la presencia de PTP1B, en el lisado total, así como en el último carril donde se empleó anti myc para identificar a esta proteína. El panel inferior muestra a VAV1-HA presente en los lisados totales y en la inmunoprecipitación.

Por último, para evaluar la interacción de PTP1B y VAV1 en un contexto celular con otra técnica complementaria, se determinó su colocalización mediante microscopía confocal. Células HEK293 fueron cotransfectadas como se describió anteriormente y las proteínas fueron detectadas usando anticuerpos secundarios conjugados a AlexaFluor 488 (verde) para detectar a VAV1 y a AlexaFluor 594 (rojo) para detectar a PTP1B. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal Leica TCS SP5 X. Las imágenes fueron procesadas en el programa ImageJ para su análisis. Imágenes representativas de este experimento se muestran en la Figura 15 A, donde se observa que PTP1B se localiza en el retículo endoplásmico, mientras que VAV1 se encuentra presente en la membrana, citoplasma y retículo endoplásmico de la célula. Las zonas en color amarillo en la imagen, denominado MERGE por las zonas que al sobreponerse coinciden, muestran los sitios donde ambas proteínas co-localizan. Finalmente, el panel de la derecha muestra una reconstrucción en 3D de la distribución celular de ambas proteínas.

Para determinar los índices de colocalización, las imágenes de las localizaciones celulares de PTP1B y VAV1 fueron transformadas a escalas de grises y se trazó una línea en la zona donde ambas proteínas colocalizan (Fig. 15 B), los índices de colocalización se muestran en la Figura 15 C, dónde se observa que en el canal verde (VAV1) el índice de colocalización de ambas proteínas es del 87.7%, mientras que en el canal rojo (PTP1B)

es del 95.3%. Finalmente, en la Figura 15 D, se observa que en la sección seleccionada para calcular los índices de colocalización, los picos de color verde y rojo que corresponden a VAV1 y PTP1B respectivamente tienen una misma distribución. Estos datos en conjunto indican que PTP1B y VAV1 interactúan físicamente en un contexto celular.

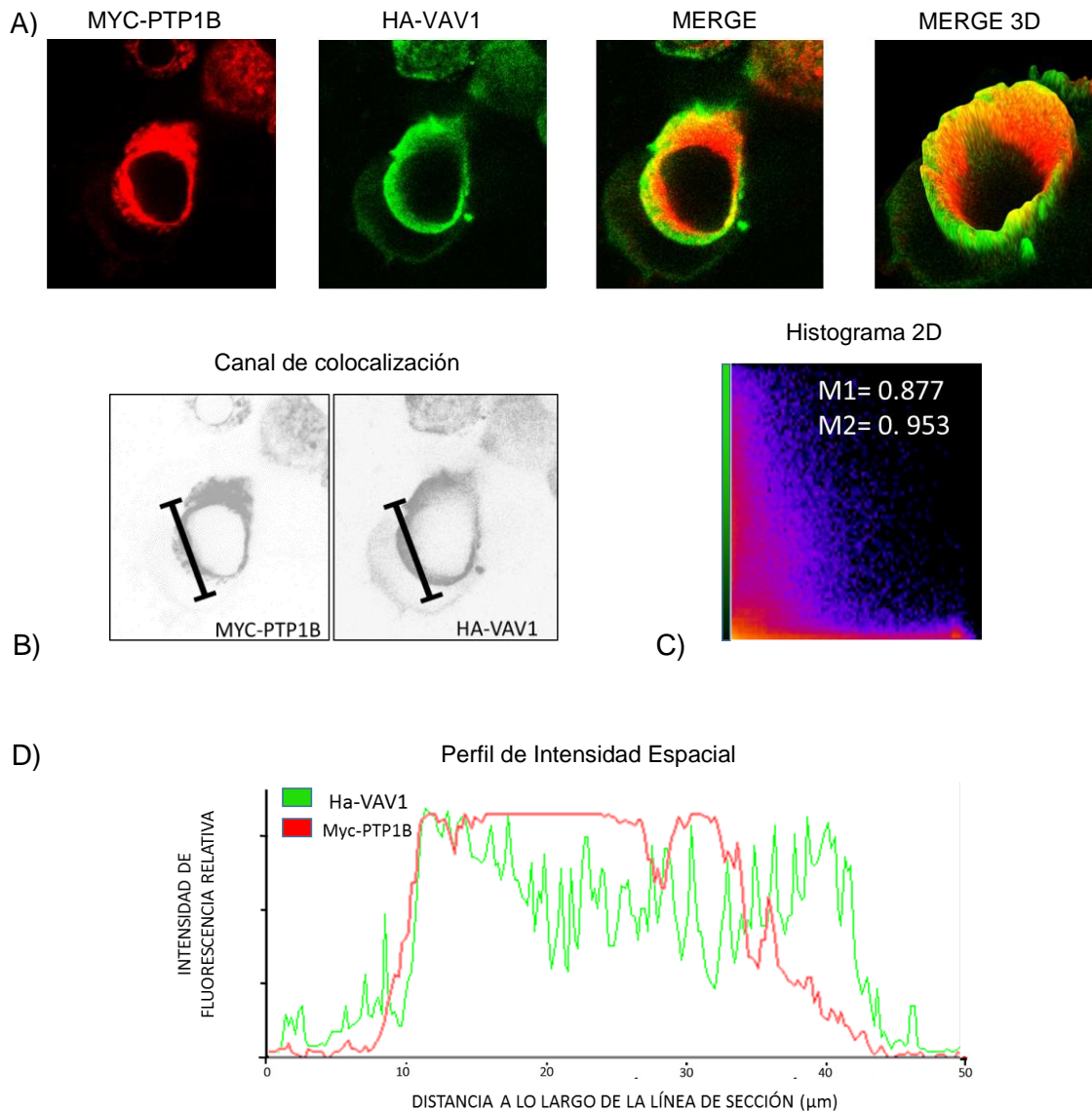


Figura 15. Determinación de (co)localización de PTP1B y VAV1. A) Colocalización llevada a cabo para determinación de ubicación PTP1B mediante anticuerpo Myc, VAV 1 mediante HA y con ayuda de ImageJ unión de estos ambos (en color naranja) desde vista bidimensional y tridimensional. B) Canal en escala de grises de localización de PTP1B y VAV1 con anticuerpos Myc y HA respectivamente. C) Histograma en 2D mostrando coincidencia de ubicación de PTP1B y VAV1. D) Gráfica referente al perfil de intensidad expresado mediante fluorescencia por PTP1B-Myc (rojo) y VAV1-HA (verde).

8.DISCUSIÓN

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte a nivel mundial entre la población del sexo femenino. En algunos países toma mayor importancia por sus altas tasas de incidencia, mientras que en otros lugares se presenta en forma más esporádica. En México, el cáncer de mama ocasiona más muertes que el cáncer cervical desde 2006 (Justo, Wilking, Jonsson, Luciani, & Cazap, 2013). Es la segunda causa de muerte entre las mujeres de 30 a 54 años de edad y afecta a todos los grupos socioeconómicos. Los datos sobre su detección, aunque sub-reportados, muestran 6,000 casos nuevos en 1990, y un aumento previsto en más de 16,500 al año para el 2020. Además, la mayoría de los casos son auto-detectados y sólo el 10% son identificados en etapas tempranas.

Actualmente, en países desarrollados, las biopsias obtenidas de la paciente son empleadas para estudiar los mecanismos de progresión tumoral y metástasis a nivel molecular. En algunos tumores, estos adelantos ya están siendo incorporados a la práctica clínica. Recientemente se ha observado que, en determinados tumores, anomalías de varios genes están correlacionadas con el pronóstico de cada paciente. Por medio de la determinación de diferentes macromoléculas marcadoras, los laboratorios de biología molecular pueden brindar importante información pronóstica y de ayuda en la selección de las estrategias terapéuticas.

Entre las distintas moléculas que han llamado la atención por su participación en el desarrollo del cáncer de mama se encuentra PTP1B, la cual se ha propuesto que promueve la transformación celular al regular la activación de la vía de las MAPK y de Src, sin embargo, diversos estudios que han empleado modelos murinos de cáncer de mama deficientes de PTP1B arrojan resultados inconsistentes en lo que se refiere a los niveles de fosforilación de p62^{DOK} y Src (Bentires-Alj & Neel, 2007; Julien et al., 2007), por lo que es necesario identificar nuevos sustratos de esta fosfatasa que pudiesen estar involucrados en el proceso de transformación celular. Con este objetivo, se realizó un estudio de fosfoproteómica empleando la técnica de SILAC, lo que permitió identificar distintas proteínas señalizadoras que potencialmente son nuevos sustratos de PTP1B, entre los que se encuentra VAV1.

Por lo que en el presente trabajo se evaluó la posible interacción entre PTP1B y el factor intercambiador de nucleótidos de guanina VAV1, tanto *in silico*, *in vitro* y en un contexto celular, con los objetivos de determinar si VAV1 es un nuevo sustrato de esta fosfatasa.

Con el propósito de contestar estas preguntas se emplearon distintas metodologías tanto bioinformáticas, como bioquímicas y de biología celular; y los resultados obtenidos con cada una de ellas confirmaron que PTP1B y VAV1 forman un complejo estable, y que PTP1B es capaz de catalizar eficientemente la desfosforilación del residuo de Tirosina en la posición 142 de VAV1.

Los resultados obtenidos, nos permiten concluir que VAV1 es un nuevo sustrato de PTP1B, lo que abre nuevas preguntas encaminadas a estudiar cual es el efecto que tiene la desfosforilación de VAV1 mediada por PTP1B en la fisiología de la célula sobre todo en el desarrollo del cáncer de mama pues el conocimiento que se tiene de la participación de VAV1 en el desarrollo y progresión de tumores sólidos es escasa (Grassilli et al., 2014). Sin embargo, VAV1 fue originalmente identificado a principios de la década de los 90 del siglo pasado, en su forma oncogénica (Bustelo & Barbacid, 1992), y estudios posteriores determinaron que es un activador de las GTPasas pequeñas Rac1 y Cdc42, cuya actividad es regulada por fosforilación en los residuos de Tirosina 142, 160 y 174. Una vez que VAV1 activa a sus GTPasas blanco, se desencadenan cascadas de señalización involucradas en la regulación de diferentes procesos celulares, como la reorganización del citoesqueleto de actina, la migración celular (Bustelo, 2000), angiogénesis (Bustelo, Sauzeau, & Berenjeno, 2007; S. G. Hunter et al., 2006), así como de distintas vías de señalización involucradas en respuesta inmune, proliferación y sobrevivencia celular en células de cáncer de mama (Grassilli et al., 2018; Mesecke, Urlaub, Busch, Eils, & Watzl, 2011). PTP1B como VAV1 regulan cascadas de señalización involucradas en la regulación de las vías de las MAPK, PI3K/AKT/mTOR y del receptor de estrógenos, modulando así distintos procesos celulares como la proliferación celular, migración, progresión del ciclo celular, muerte celular y transcripción de genes entre otros (Arias-Romero et al., 2009; Du et al., 2014; Grassilli et al., 2018; Yip et al., 2010).

Debido a que PTP1B y VAV1 interactúan y regulan la actividad de distintas moléculas que tienen un papel oncogénico, la inhibición de estas moléculas tiene un potencial de uso terapéutico. Por ejemplo, se ha demostrado que VAV1 estimula la activación de la cascada de MAPK en sistema inmune y cáncer pulmonar, además de que actúa como un regulador río arriba de Rac1, RhoA y Cdc42 involucrados con la migración celular y cambios en el citoesqueleto, mientras que PTP1B inactiva a p62DOK lo que mantiene constitutivamente activa la vía de las MAPK, además de activar a Src, promoviendo la

sobrevivencia y proliferación celular (Arias-Romero et al., 2009; Katzav, 2015; Lei, Wang, Mei, & Wang, 2014).

Otro punto que es importante retomar son los compartimentos subcelulares donde se presentan PTP1B y VAV1, ya que de acuerdo con lo obtenido en el presente trabajo se localizó en retículo endoplasmático a PTP1B y en membrana plasmática, citoplasma y región perinuclear de la célula, lo que concuerda con lo reportado para ambas proteínas pues PTP1B se encuentra principalmente en retículo endoplasmático, y por los movimientos del citoesqueleto puede llegar hasta membrana plasmática y diferentes zonas del citoplasma. Para el caso de VAV1 está se encuentra presente en citoplasma y en núcleo. Debido a que ambas proteínas se encuentran cercanas a la región nuclear y se pueden relacionar con procesos de transcripción, así como sus anomalías (proliferación o resistencia a la apoptosis), podría estudiarse de manera más específica la interacción de estas proteínas a nivel nuclear. (Grassilli et al., 2014).

Para el caso de PTP1B, desde hace más de dos décadas, se ha reconocido que tiene un papel importante en la regulación negativa de la actividad de los receptores de Insulina y Leptina, así como asociación con diferentes enfermedades (diabetes y obesidad) (Seely et al., 1996; Zabolotny et al., 2002). Los primeros estudios referentes al papel de esta fosfatasa en fibroblastos transformados con *Neu* (el homólogo en rata a HER2/ErbB2), mostraron que la sobre expresión de PTP1B inhibía el crecimiento independiente de contacto, la formación de colonias y el crecimiento tumoral (Brown-Shimer et al., 1992); mientras que en fibroblastos transformados con *v-Src*, solo se observó una modesta disminución de la proliferación cuando PTP1B se sobre expresaba (Woodford-Thomas et al., 1992). Aunque los primeros estudios de la función de PTP1B en células transformadas sugerían que esta enzima podía actuar como un supresor tumoral, durante la década pasada varios reportes mostraron que PTP1B también podía actuar como un oncogén. Específicamente, se reportó que PTP1B desfosforila a la oncoproteína Src en el residuo asociado a su inhibición, la Tirosina 527, promoviendo su activación y aumentando las tasas de proliferación y la sobrevivencia (Arias-Romero et al., 2009; Bjorge et al., 2000; F. Liu et al., 1998; Zhu et al., 2007).

Estudios recientes, han mostrado que el silenciamiento de VAV1 con siRNAs en las líneas celulares de cáncer de mama BT-474 y MB-231 incrementa su capacidad de invasión, por lo que se propone que los tumores de mama con alta expresión de VAV1 tendrían un mejor pronóstico y menor potencial metastático a comparación de los que tienen menores

niveles de expresión de VAV1 (Grassilli et al., 2018). Por otra parte, también se ha reportado que la sustitución del residuo de tirosina 174 por fenilalanina incrementa el potencial oncogénico de VAV1 (Lopez-Lago, Lee, Cruz, Movilla, & Bustelo, 2000). Finalmente, se han descrito numerosas mutaciones en el gen que codifica para VAV1 en diferentes tipos de cáncer como mama, pulmón, páncreas, ovario y próstata (Katzav, 2015). Por lo que se ha propuesto que, dependiendo del tipo de tumor, esta proteína puede actuar como oncogén o como supresor tumoral.

Todos estos antecedentes, nos sugieren la existencia de un posible eje de señalización PTP1B-VAV1, el cuál pudiera ser relevante para la regulación de procesos celulares importantes para el desarrollo del cáncer como proliferación, crecimiento, progresión del ciclo celular y transcripción. Este es el primer estudio en el que se demuestra que VAV1 es un sustrato de PTP1B, por lo que, a futuro se pretende estudiar si la actividad biológica de VAV1 en líneas celulares de cáncer de mama es regulada por la desfosforilación mediada por PTP1B, así como el posible uso de estas moléculas como potenciales blancos de intervención terapéutica.

9.CONCLUSIONES

- PTP1B forma un complejo molecular estable con el péptido correspondiente a los residuos 137-147 de VAV1 fosforilado en la Tirosina 142 *in silico*.
- El residuo de fosfotirosina en la posición 142 de VAV1 es un sustrato de PTP1B *in vitro*.
- PTP1B y VAV1 interactúan físicamente en un contexto celular.

10.REFERENCIAS

- Andersen, J. N., Mortensen, O. H., Peters, G. H., Drake, P. G., Iversen, L. F., Olsen, O. H., Moller, N. P. (2001). Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol Cell Biol*, 21(21), 7117-7136.
- Arias-Romero, L. E., Saha, S., Villamar-Cruz, O., Yip, S. C., Ethier, S. P., Zhang, Z. Y., & Chernoff, J. (2009). Activation of Src by protein tyrosine phosphatase 1B is required for ErbB2 transformation of human breast epithelial cells. *Cancer Res*, 69(11), 4582-4588.
- Avidan, N., Le Panse, R., Harbo, H. F., Bernasconi, P., Poulas, K., Ginzburg, E., Miller, A. (2014). VAV1 and BAFF, via NFkappaB pathway, are genetic risk factors for myasthenia gravis. *Ann Clin Transl Neurol*, 1(5), 329-339.
- Bar-Shira, A., Pinthus, J. H., Rozovsky, U., Goldstein, M., Sellers, W. R., Yaron, Y., Orr-Urtreger, A. (2002). Multiple genes in human 20q13 chromosomal region are involved in an advanced prostate cancer xenograft. *Cancer Res*, 62(23), 6803-6807.
- Barford, D., Flint, A. J., & Tonks, N. K. (1994). Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B. *Science*, 263(5152), 1397-1404.
- Bartolome, R. A., Molina-Ortiz, I., Samaniego, R., Sanchez-Mateos, P., Bustelo, X. R., & Teixido, J. (2006). Activation of Vav/Rho GTPase signaling by CXCL12 controls membrane-type matrix metalloproteinase-dependent melanoma cell invasion. *Cancer Res*, 66(1), 248-258.
- Bentires-Alj, M., & Neel, B. G. (2007). Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer. *Cancer Res*, 67(6), 2420-2424.
- Betz, R., Sandhoff, K., Fischer, K. D., & van Echten-Deckert, G. (2003). Detection and identification of Vav1 protein in primary cultured murine cerebellar neurons and in neuroblastoma cells (SH-SY5Y and Neuro-2a). *Neurosci Lett*, 339(1), 37-40.
- Bjorge, J. D., Pang, A., & Fujita, D. J. (2000). Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and

- activating c-Src in several human breast cancer cell lines. *J Biol Chem*, 275(52), 41439-41446.
- Brown-Shimer, S., Johnson, K. A., Hill, D. E., & Bruskin, A. M. (1992). Effect of protein tyrosine phosphatase 1B expression on transformation by the human neu oncogene. *Cancer Res*, 52(2), 478-482.
- Brown-Shimer, S., Johnson, K. A., Lawrence, J. B., Johnson, C., Bruskin, A., Green, N. R., & Hill, D. E. (1990). Molecular cloning and chromosome mapping of the human gene encoding protein phosphotyrosyl phosphatase 1B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(13), 5148-5152.
- Bustelo, X. R. (1996). The VAV family of signal transduction molecules. *Crit Rev Oncog*, 7(1-2), 65-88.
- Bustelo, X. R. (2000). Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol*, 20(5), 1461-1477.
- Bustelo, X. R. (2014). Vav family exchange factors: an integrated regulatory and functional view. *Small GTPases*, 5(2), 9.
- Bustelo, X. R., & Barbacid, M. (1992). Tyrosine phosphorylation of the vav proto-oncogene product in activated B cells. *Science*, 256(5060), 1196-1199.
- Bustelo, X. R., Sauzeau, V., & Berenjano, I. M. (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays*, 29(4), 356-370.
- Citterio, C., Menacho-Marquez, M., Garcia-Escudero, R., Larive, R. M., Barreiro, O., Sanchez-Madrid, F., . . . Bustelo, X. R. (2012). The rho exchange factors vav2 and vav3 control a lung metastasis-specific transcriptional program in breast cancer cells. *Sci Signal*, 5(244), ra71.
- Couceiro, J. R., Martin-Bermudo, M. D., & Bustelo, X. R. (2005). Phylogenetic conservation of the regulatory and functional properties of the Vav oncoprotein family. *Exp Cell Res*, 308(2), 364-380.

- Crespo, P., Schuebel, K. E., Ostrom, A. A., Gutkind, J. S., & Bustelo, X. R. (1997). Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature*, 385(6612), 169-172.
- Dadke, S., Cotteret, S., Yip, S. C., Jaffer, Z. M., Haj, F., Ivanov, A., . . . Chernoff, J. (2007). Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by sumoylation. *Nat Cell Biol*, 9(1), 80-85.
- Du, M. J., Chen, X. D., Zhou, X. L., Wan, Y. J., Lan, B., Zhang, C. Z., & Cao, Y. (2014). Estrogen induces Vav1 expression in human breast cancer cells. *PLoS One*, 9(6), e99052.
- Frangioni, J. V., Beahm, P. H., Shifrin, V., Jost, C. A., & Neel, B. G. (1992). The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. *Cell*, 68(3), 545-560.
- Frangioni, J. V., Oda, A., Smith, M., Salzman, E. W., & Neel, B. G. (1993). Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets. *EMBO J*, 12(12), 4843-4856.
- Gjerstorff, M. F., Benoit, V. M., Laenkholm, A. V., Nielsen, O., Johansen, L. E., & Ditzel, H. J. (2006). Identification of genes with altered expression in medullary breast cancer vs. ductal breast cancer and normal breast epithelia. *Int J Oncol*, 28(6), 1327-1335.
- Grassilli, S., Brugnoli, F., Lattanzio, R., Marchisio, M., Perracchio, L., Piantelli, M., . . . Bertagnolo, V. (2018). Vav1 downmodulates Akt in different breast cancer subtypes: a new promising chance to improve breast cancer outcome. *Mol Oncol*, 12(7), 1012-1025.
- Grassilli, S., Brugnoli, F., Lattanzio, R., Rossi, C., Perracchio, L., Mottolise, M., . . . Bertagnolo, V. (2014). High nuclear level of Vav1 is a positive prognostic factor in early invasive breast tumors: a role in modulating genes related to the efficiency of metastatic process. *Oncotarget*, 5(12), 4320-4336.
- Higuchi, T., Kanzaki, H., Fujimoto, M., Hatayama, H., Watanabe, H., Fukumoto, M., et al. (1995). Expression of vav proto-oncogene by nonhematopoietic trophoblast cells at the human uteroplacental interface. *Biol Reprod*, 53(4), 840-846.

- Hoekstra, E., Das, A. M., Swets, M., Cao, W., van der Woude, C. J., Bruno, M. J., . . . Fuhler, G. M. (2016). Increased PTP1B expression and phosphatase activity in colorectal cancer results in a more invasive phenotype and worse patient outcome. *Oncotarget*, 7(16), 21922-21938.
- Hornstein, I., Pikarsky, E., Groysman, M., Amir, G., Peylan-Ramu, N., & Katzav, S. (2003). The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is expressed in a subset of human neuroblastomas. *J Pathol*, 199(4), 526-533.
- Hunter, S. G., Zhuang, G., Brantley-Sieders, D., Swat, W., Cowan, C. W., & Chen, J. (2006). Essential role of Vav family guanine nucleotide exchange factors in EphA receptor-mediated angiogenesis. *Mol Cell Biol*, 26(13), 4830-4842.
- Hunter, T. (1998). The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 353(1368), 583-605.
- Hwang, S., Son, S. W., Kim, S. C., Kim, Y. J., Jeong, H., & Lee, D. (2008). A protein interaction network associated with asthma. *J Theor Biol*, 252(4), 722-731.
- Julien, S. G., Dube, N., Read, M., Penney, J., Paquet, M., Han, Y., Tremblay, M. L. (2007). Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. *Nat Genet*, 39(3), 338-346.
- Justo, N., Wilking, N., Jonsson, B., Luciani, S., & Cazap, E. (2013). A review of breast cancer care and outcomes in Latin America. *Oncologist*, 18(3), 248-256.
- Kassem, S., Gaud, G., Bernard, I., Benamar, M., Dejean, A. S., Liblau, R., Saoudi, A. (2016). A Natural Variant of the T Cell Receptor-Signaling Molecule Vav1 Reduces Both Effector T Cell Functions and Susceptibility to Neuroinflammation. *PLoS Genet*, 12(7), e1006185.
- Katzav, S. (2015). Vav1: A Dr. Jekyll and Mr. Hyde protein--good for the hematopoietic system, bad for cancer. *Oncotarget*, 6(30), 28731-28742.

- Lane, J., Martin, T. A., Mansel, R. E., & Jiang, W. G. (2008). The expression and prognostic value of the guanine nucleotide exchange factors (GEFs) Trio, Vav1 and TIAM-1 in human breast cancer. *Int Semin Surg Oncol*, 5, 23.
- Lazer, G., Idelchuk, Y., Schapira, V., Pikarsky, E., & Katzav, S. (2009). The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is aberrantly expressed in lung cancer and plays a role in tumourigenesis. *J Pathol*, 219(1), 25-34.
- Lei, Y. Y., Wang, W. J., Mei, J. H., & Wang, C. L. (2014). Mitogen-activated protein kinase signal transduction in solid tumors. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(20), 8539-8548.
- Lin, R., Zhang, J., Zhou, L., & Wang, B. (2016). Altered function of monocytes/macrophages in patients with autoimmune hepatitis. *Mol Med Rep*, 13(5), 3874-3880.
- Liu, F., Sells, M. A., & Chernoff, J. (1998). Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates integrin signaling. *Curr Biol*, 8(3), 173-176.
- Liu, H., Wu, Y., Zhu, S., Liang, W., Wang, Z., Wang, Y., Song, Y. (2015). PTP1B promotes cell proliferation and metastasis through activating src and ERK1/2 in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett*, 359(2), 218-225.
- Lopez-Lago, M., Lee, H., Cruz, C., Movilla, N., & Bustelo, X. R. (2000). Tyrosine phosphorylation mediates both activation and downmodulation of the biological activity of Vav. *Mol Cell Biol*, 20(5), 1678-1691.
- Lv, W., Duan, Q., Wang, L., Gong, Z., Yang, F., & Song, Y. (2015). Expression of B-cell-associated genes in peripheral blood mononuclear cells of patients with symptomatic pulmonary embolism. *Mol Med Rep*, 11(3), 2299-2305.
- Mahlamaki, E. H., Barlund, M., Tanner, M., Gorunova, L., Hoglund, M., Karhu, R., & Kallioniemi, A. (2002). Frequent amplification of 8q24, 11q, 17q, and 20q-specific genes in pancreatic cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 35(4), 353-358.
- Maughan, K. L., Lutterbie, M. A., & Ham, P. S. (2010). Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician*, 81(11), 1339-1346.

- Mesecke, S., Urlaub, D., Busch, H., Eils, R., & Watzl, C. (2011). Integration of activating and inhibitory receptor signaling by regulated phosphorylation of Vav1 in immune cells. *Sci Signal*, 4(175), ra36.
- Movilla, N., & Bustelo, X. R. (1999). Biological and regulatory properties of Vav-3, a new member of the Vav family of oncoproteins. *Mol Cell Biol*, 19(11), 7870-7885.
- Ostman, A., Hellberg, C., & Bohmer, F. D. (2006). Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat Rev Cancer*, 6(4), 307-320.
- Pan, D., Amison, R. T., Riffo-Vasquez, Y., Spina, D., Cleary, S. J., Wakelam, M. J., . . . Welch, H. C. (2015). P-Rex and Vav Rac-GEFs in platelets control leukocyte recruitment to sites of inflammation. *Blood*, 125(7), 1146-1158.
- Pazhouhandeh, M., Sahraian, M. A., Siadat, S. D., Fateh, A., Vaziri, F., Tabrizi, F., . . . Rahimi Jamnani, F. (2018). A systems medicine approach reveals disordered immune system and lipid metabolism in multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol*, 192(1), 18-32.
- Pedros, C., Gaud, G., Bernard, I., Kassem, S., Chabod, M., Lagrange, D., Saoudi, A. (2015). An Epistatic Interaction between Themis1 and Vav1 Modulates Regulatory T Cell Function and Inflammatory Bowel Disease Development. *J Immunol*, 195(4), 1608-1616.
- Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747-752.
- Prod'Homme, V., Boyer, L., Dubois, N., Mallavialle, A., Munro, P., Mouska, X., Deckert, M. (2015). Cherubism allele heterozygosity amplifies microbe-induced inflammatory responses in murine macrophages. *J Clin Invest*, 125(4), 1396-1400.
- Quevedo, C., Sauzeau, V., Menacho-Marquez, M., Castro-Castro, A., & Bustelo, X. R. (2010). Vav3-deficient mice exhibit a transient delay in cerebellar development. *Mol Biol Cell*, 21(6), 1125-1139.

- Rahaman, S. O., Li, W., & Silverstein, R. L. (2013). Vav Guanine nucleotide exchange factors regulate atherosclerotic lesion development in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33(9), 2053-2057.
- Ravichandran, L. V., Chen, H., Li, Y., & Quon, M. J. (2001). Phosphorylation of PTP1B at Ser(50) by Akt impairs its ability to dephosphorylate the insulin receptor. *Mol Endocrinol*, 15(10), 1768-1780.
- Rodriguez-Fdez, S., & Bustelo, X. R. (2019). The Vav GEF Family: An Evolutionary and Functional Perspective. *Cells*, 8(5).
- Sauzeau, V., Jerkic, M., Lopez-Novoa, J. M., & Bustelo, X. R. (2007). Loss of Vav2 proto-oncogene causes tachycardia and cardiovascular disease in mice. *Mol Biol Cell*, 18(3), 943-952.
- Sauzeau, V., Sevilla, M. A., Montero, M. J., & Bustelo, X. R. (2010). The Rho/Rac exchange factor Vav2 controls nitric oxide-dependent responses in mouse vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 120(1), 315-330.
- Sauzeau, V., Sevilla, M. A., Rivas-Elena, J. V., de Alava, E., Montero, M. J., Lopez-Novoa, J. M., & Bustelo, X. R. (2006). Vav3 proto-oncogene deficiency leads to sympathetic hyperactivity and cardiovascular dysfunction. *Nat Med*, 12(7), 841-845.
- Schuebel, K. E., Movilla, N., Rosa, J. L., & Bustelo, X. R. (1998). Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-type and oncogenic Vav-2. *EMBO J*, 17(22), 6608-6621.
- Sebban, S., Farago, M., Gashai, D., Ilan, L., Pikarsky, E., Ben-Porath, I., & Katzav, S. (2013). Vav1 fine tunes p53 control of apoptosis versus proliferation in breast cancer. *PLoS One*, 8(1), e54321.
- Seely, B. L., Staubs, P. A., Reichart, D. R., Berhanu, P., Milarski, K. L., Saltiel, A. R., Olefsky, J. M. (1996). Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with the activated insulin receptor. *Diabetes*, 45(10), 1379-1385.

- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*, 69(1), 7-34.
- Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Borresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(19), 10869-10874.
- Soysal, S., Obermann, E. C., Gao, F., Oertli, D., Gillanders, W. E., Viehl, C. T., & Muenst, S. (2013). PTP1B expression is an independent positive prognostic factor in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 137(2), 637-644.
- Tanner, M. M., Tirkkonen, M., Kallioniemi, A., Isola, J., Kuukasjarvi, T., Collins, C., Kallioniemi, O. P. (1996). Independent amplification and frequent co-amplification of three nonsyntenic regions on the long arm of chromosome 20 in human breast cancer. *Cancer Res*, 56(15), 3441-3445.
- Taylor, K. M., Morgan, H. E., Johnson, A., Hadley, L. J., & Nicholson, R. I. (2003). Structure-function analysis of LIV-1, the breast cancer-associated protein that belongs to a new subfamily of zinc transporters. *Biochem J*, 375(Pt 1), 51-59.
- Tonks, N. K., Diltz, C. D., & Fischer, E. H. (1988a). Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J Biol Chem*, 263(14), 6731-6737.
- Tonks, N. K., Diltz, C. D., & Fischer, E. H. (1988b). Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J Biol Chem*, 263(14), 6722-6730.
- Tonks, N. K., & Muthuswamy, S. K. (2007). A brake becomes an accelerator: PTP1B--a new therapeutic target for breast cancer. *Cancer Cell*, 11(3), 214-216.
- van Montfort, R. L., Congreve, M., Tisi, D., Carr, R., & Jhoti, H. (2003). Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature*, 423(6941), 773-777.
- Wiener, J. R., Hurteau, J. A., Kerns, B. J., Whitaker, R. S., Conaway, M. R., Berchuck, A., & Bast, R. C., Jr. (1994). Overexpression of the tyrosine phosphatase PTP1B is

- associated with human ovarian carcinomas. *Am J Obstet Gynecol*, 170(4), 1177-1183.
- Wiener, J. R., Kerns, B. J., Harvey, E. L., Conaway, M. R., Iglehart, J. D., Berchuck, A., & Bast, R. C., Jr. (1994). Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in human breast cancer: association with p185c-erbB-2 protein expression. *J Natl Cancer Inst*, 86(5), 372-378.
- Woodford-Thomas, T. A., Rhodes, J. D., & Dixon, J. E. (1992). Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src-transformed mouse 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol*, 117(2), 401-414.
- Wulf, G. M., Adra, C. N., & Lim, B. (1993). Inhibition of hematopoietic development from embryonic stem cells by antisense vav RNA. *EMBO J*, 12(13), 5065-5074.
- Yan, W., Song, H., Jiang, J., Xu, W., Gong, Z., Duan, Q., Wang, L. (2016). Characteristics of B cell-associated gene expression in patients with coronary artery disease. *Mol Med Rep*, 13(5), 4113-4121.
- Yang, S. H., Seo, M. Y., Jeong, H. J., Jeung, H. C., Shin, J., Kim, S. C., Rha, S. Y. (2005). Gene copy number change events at chromosome 20 and their association with recurrence in gastric cancer patients. *Clin Cancer Res*, 11(2 Pt 1), 612-620.
- Yip, S. C., Saha, S., & Chernoff, J. (2010). PTP1B: a double agent in metabolism and oncogenesis. *Trends Biochem Sci*, 35(8), 442-449.
- Zabolotny, J. M., Bence-Hanulec, K. K., Stricker-Krongrad, A., Haj, F., Wang, Y., Minokoshi, Y., Neel, B. G. (2002). PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell*, 2(4), 489-495.
- Zhu, S., Bjorge, J. D., & Fujita, D. J. (2007). PTP1B contributes to the oncogenic properties of colon cancer cells through Src activation. *Cancer Res*, 67(21), 10129-10137.
- Zmuidzinas, A., Fischer, K. D., Lira, S. A., Forrester, L., Bryant, S., Bernstein, A., & Barbacid, M. (1995). The vav proto-oncogene is required early in embryogenesis but not for hematopoietic development in vitro. *EMBO J*, 14(1), 1-11.

11. ANEXO

Soluciones

Buffer de transferencia

Reactivo	Concentración	Volumen (1000 mL)
Tris	50 mM	5.8 gr
Glicina	380 mM	29 gr
SDS	0.1%	1.0 gr
Metanol	20%	200 mL
H2O destilada	20%	764.2 mL

Buffer de corrida Laemmli 10X

Reactivo	Volumen (1000 mL)
Tris	30.3 gr
Glicina	144.2 gr
SDS	10 gr

Buffer TBE 50X

Reactivo	Volumen (1000 mL)
Tris	540 gr
Ácido bórico	275 gr
EDTA 0.5 M pH8	200 mL

Rojo de Ponceau

Reactivo	Volumen (100 mL)
Ponceau	0.5 gr
Ácido acético	1 mL

Azul de Coomasie

Reactivo	Volumen
Etanol 96°	450 mL
Ácido acético glacial	50 mL
Azul de coomasie	2.5 gr
H2O destilada	500 mL

Solución desteñidora

Reactivo	Volumen (1000 mL)
Metanol	400 mL
Ácido acético glacial	50 mL
H2O destilada	550 mL

Medio LB

Reactivo	Volumen (1000 mL)
Triptona	10 gr
Extracto de levadura	5 gr
NaCl	10 gr

H2O destilada	975 mL
---------------	--------

PBS 10X

Reactivo	Volumen (1000 mL)
NaCl	80 gr
KCl	2.0 gr
Na ₂ HPO ₄ anhidro	11.5 gr
KH ₂ PO ₄	2.0 gr

TBS 10X

Reactivo	Volumen (1000 mL)
NaCl	88 gr
Tris	24 gr
H ₂ O destilada	990 mL

TBS-0.1% TWEEN

Reactivo	Volumen (1000 mL)
TBS 10x	100 mL
H ₂ O destilada	900 mL
Tween 20	1 mL

Buffer RIPA

Reactivo	Concentración
Tris HCl, pH 8.0	50 mM
NaCl	150 mM
NP-40	1 %
Deoxicolato de sodio	0.5 %
SDS	0.1 %