



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

CARACTERIZACIÓN DEL DOMINIO CONSTANTE DE TIPO
INMUNOGLOBULINA DE CRTAM EN LA INTERACCION CELULAR CON EL
LIGANDO NECTIN-LIKE 2.

TESIS

**QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

JUAN CARLOS BARRAGÁN GÁLVEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR
CINVESTAV

CIUDAD DE MÉXICO, 28 MAYO DEL 2021



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.

Este Trabajo de tesis de doctorado fue realizado en el laboratorio de Inmunología Básica del Dr. Vianney Ortiz Navarrete dentro de las instalaciones del CINVESTAV unidad Zacatenco. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, CP 07360, Ciudad de México, México.

Agradecimientos:

A CONACYT-México por la beca de posgrado nivel de doctorado otorgado con número 489981 durante la realización del doctorado

AGRADECIMIENTOS:

Al Departamento de Biomedicina Molecular CINVESTAV-Zacatenco por las facilidades prestadas de equipo e infraestructura para llevarse a cabo este proyecto

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, por todos los apoyos económicos y académicos que fue proporcionado y que fueron fundamentales en mi formación académica.

A mi director de tesis Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete por el apoyo incondicional por 10 años, que, desde el inicio de la licenciatura hasta el término del doctorado, sus enseñanzas que forjaron mi formación profesional.

Al Dr. Leopoldo Santos Argumedo y Dra. Gloria Soldevila Melgarejo por sus sugerencias profesionales en las reuniones tutorales.

A la Dra. Adela Rodríguez y Dra. Siseth Martínez del Instituto de Química de la UNAM por haber aportado los datos de dicroísmo circular.

A IBT. Yedhani Chávez, IBT. Carla Salinas, QBP. América Longares, Bio. Paola Santana y Dra. Adriana Rodríguez, estudiantes que me ayudaron en muchos de los experimentos en doctorado.

Tabla de contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS	3
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	4
ABSTRACT	5
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
Moléculas de adhesión celular (CAMs).....	7
Superfamilia de las Inmunoglobulinas	9
Familia de las Nectinas y semejantes a Nectina (Nectin-like).....	10
Nectin-like 2 (CADM1).....	13
CRTAM.....	14
Funciones de los dominios constantes IgC en los receptores de tipo Inmunoglobulina	16
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
METODOLOGÍA.....	21
Vectores y Construcciones	21
RT-PCR y PCR.....	21
Mutagénesis de sitio dirigido por PCR	22
Preparación y transformación de bacterias	23
Lisis bacteriana y purificación de proteínas recombinantes.....	23
Preparación de SDS-PAGE y Western Blot	24
Espectros de dicroísmo Circular	25
Resonancia de plasmones de superficie	25
Transfección celular y microscopía confocal.....	26
RESULTADOS	27
Diseño y purificación de proteínas recombinantes de CRTAM.....	27
La región tallo “stalk” de CRTAM promueve solubilidad a las proteínas recombinantes.....	29
Clonación, expresión y purificación de Nectin-like 2	33

Dicroísmo Circular del dominio constante de CRTAM	35
El anticuerpo anti-CRTAM humano “C8” reconoce el dominio constante de CRTAM	37
Las proteínas recombinantes de CRTAM y Necl2 necesitan replegamiento.	40
La región extracelular de CRTAM forma dímeros en solución.....	44
El dominio constante de CRTAM participa en la interacción con Necl2	45
Construcciones de proteínas quiméricas CRTAM-Ypet, CRTAM-Cypet y Necl2-Ypet.	48
Expresión de genes los genes quiméricos de CRTAM-Ypet/Cypet y Necl2-Ypet	52
Coexpresión de CRTAM-Cypet y CRTAM-Ypet en la superficie celular.....	57
Interacciones Heterofílicas y homofílicas de CRTAM y Necl2	60
El dominio constante IgC de CRTAM es importante para la interacción CRTAM-Necl2.....	66
DISCUSIÓN.....	69
CONCLUSIONES	74
PERSPECTIVAS	75
REFERENCIAS.....	76
ANEXOS	82
ANEXO I. Secuencia nucleotídica y aminoacídica de CRTAM.....	82
Anexo II. Secuencia nucleotídica y aminoacídica de Nectin-like 2.....	83
Anexo III. Secuencias de oligonucleótidos.	84
Anexo IV. Publicación	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Tipos de uniones célula-célula.....	7
Figura 2. Principales clases de receptores.....	8
Figura 3: Representación espacial y topológica del dominio variable de tipo inmunoglobulina.	9
Figura 4. Representación esquemática de la composición de moléculas de Nectinas, Nectin-likes (Necls) y Afadin.	11
Figura 5. Interacciones homofílicas y heterofílicas de Nectinas y Necls.	12
Figura 6. Mecanismo de interacción en la formación de "clusters" de Nectinas.	12
Figura 7. Esquema de la estructura de Nectin-like 2.....	14
Figura 8. Esquema de la estructura del receptor CRTAM.....	15
Figura 9. Estructura cristalográfica de los dominios variables en la interacción Necl2-CRTAM.....	16
Figura 10. Disminución de la afinidad en ausencia de los dominios constantes durante la interacción Nectin3-Nectin1.....	17
Figura 11. Esquema del mecanismo de interacción del FcγRI - IgG. A la izquierda se muestra la aproximación de la región Fc de un anticuerpo (elipses grise	18
Figura 12. Análisis electroforético de los plásmidos digeridos que codifican para los genes CRTAM _{IgV} , CRTAM _{IgC} y CRTAM _{IgV-C} . A).....	28
Figura 13. Los dominios expresados de IgV e IgC de CRTAM se encontraron en cuerpos de inclusión.....	29
Figura 14.Análisis de solubilidad de los dominios y región "stalk" de CRTAM. A)...	30
Figura 15. Análisis electroforético de la digestión de los plásmidos que codifican para los genes CRTAM _{EC} , CRTAM _{IgV-Stalk} y CRTAM _{IgC-Stalk}	31
Figura 16. Las proteínas recombinantes de CRTAM que contienen la región del tallo se producen de manera soluble.	32
Figura 17.Generación y producción de Necl2. A).....	34
Figura 18. La proteína recombinante CRTAM _{IgV-stalk} presenta la estructura secundaria de típica de las inmunoglobulinas.	36
Figura 19. El anticuerpo monoclonal C8 anti-CRTAM está dirigido contra el dominio contante y posee una alta afinidad por su proteína blanco.	39
Figura 20. Calibración de la columna de exclusión molecular Sephacryl-S200.	41
Figura 21. Replegamiento de las proteínas recombinantes CRTAM.....	43
Figura 22. Los dominios extracelulares de CRTAM formas dímeros en solución. ...	45
Figura 23. La interacción de alta afinidad de CRTAM con Necl2 requiere de la participación tanto del dominio variable como del dominio constante de CRTAM...	47
Figura 24. Generación de genes quiméricos de CRTAM con las proteínas fluorescentes Ypet y Cypet.	49
Figura 25. Generación de los genes carentes de de los dominios IgV o IgC en los genes quiméricos de Crtam-Ypet.	50

Figura 26. Generación del gen quimérico de Necl2 con la proteína fluorescente Ypet.	51
Figura 27. Patrón de expresión de CRTAM-Ypet, CRTAM-Cypet y Necl2-Ypet en Cos7.	53
Figura 28. Patrón de expresión de las mutantes CRTAM_{IgV}-Ypet, CRTAM_{IgC}-Ypet y CRTAM_{stalk}-Ypet en Cos7.	55
Figura 29. Patrón de expresión de las construcciones quiméricas de CRTAM-Ypet en Jurkat.	56
Figura 30. Patrón de co-expresión de CRTAM-Cypet y CRTAM-Ypet en 3T3.	58
Figura 31. Patrón de co-expresión de CRTAM-Cypet y mutantes de CRTAM fusionados a Ypet en 3T3.	59
Figura 32. Patrón de interacción heterofílica CRTAM-Necl2	61
Figura 33. Interacciones heterotípicas entre-Necl2 y Crtam.	62
Figura 34. Interacciones homofílicas CRTAM-CRTAM.	64
Figura 35. Interacciones homofílicas Necl2-Necl2.	65
Figura 36. Interacción del dominio IgC de CRTAM con Necl2.	67
Figura 37. Interacción del dominio IgV en células Jurkat.	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para el diseño y clonación de las proteínas de CRTAM y Nectin-like 2 expresados en sistema bacteriano Rosetta II star. 84

Tabla 2. Oligonucleótidos usado para el diseño de proteínas quiméricas de CRTAM y Necl2 fusionados a las proteínas fluorescentes Ypet y Cypet. 85

Tabla 3. Oligonucleótidos usados para las deleciones de los dominios extracelulares de CRTAM en las proteínas quiméricas. 86

LISTADO DE ABREVIATURAS

- CRTAM; Class-I restricted T cell-associated molecule.
- Cadm1; Cell adhesion molecule 1
- NK; Natural killer cells
- NKT; Natural killer T cells
- IgSF; Immunoglobulin Superfamily
- mAb; monoclonal antibody
- IFN; Interferon
- IL; Interleukin
- PDZ; Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and zonula occludens-1 protein (zo-1).
- Necl; Nectin-like
- BSA; Bovine Serum Albumin
- OVA; Ovalbumin
- KD; Dissociation constant
- IgV; Immunoglobulin-V domain
- IgC; Immunoglobulin-C domain
- Ypet; Yellow protein for energy transfer
- Cypet; Cyan protein for energy transfer
- ECFP; Eukaryotic Cyan Fluorescent Protein.
- EYFP; Eukaryotic Yellow Fluorescent Protein.
- EGFP; Eukaryotic Green Fluorescent Protein.
- FRET; Förster resonance energy transfer.
- SPR; Surface Plasmon Resonance.
- RU; Response Units

ABSTRACT

CRTAM (Class-I restricted T cell-associated molecule), is a member of the Immunoglobulin Superfamily (IgSF) and is closely related to the family of nectin-like molecules. CRTAM is expressed in CD8, NK, NKT T cells and in a subpopulation of CD4 T cells. In order to purify this protein, we produced the immunoglobulin domains of the extracellular region of CRTAM in a bacterial system, whose solubility is conferred by the stalk region of CRTAM. With the recombinant proteins, it was possible to demonstrate that the anti-CRTAM antibody named "C8" specifically recognizes the constant domain of CRTAM. We also demonstrated that the constant domain of CRTAM forms a dimer in solution and that it also participates in the interaction with the Nectin-like 2 ligand, increasing the affinity in the association. In conclusion, the constant domain is essential for the interaction of CRTAM and Nectin-like 2 giving rise groups of molecules on cell surface that may carry out adhesion between cells.

RESUMEN

CRTAM (Class-I restricted T cell-associated molecule), es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF), y está estrechamente relacionado por la función y similitud en secuencia proteica con la familia de las moléculas semejantes a nectinas (Nectin-Like). CRTAM es expresado en células T CD8, NK, NKT y en una subpoblación de células T CD4. Para poder purificar la proteína, producimos a los dominios de inmunoglobulina de la región extracelular de CRTAM en un sistema bacteriano, los cuales permanecen solubles gracias a la región tallo. La obtención de las proteínas recombinantes permitió demostrar que el anticuerpo anti-CRTAM nombrado "C8" reconoce específicamente al dominio constante de CRTAM. También demostramos que el dominio constante de CRTAM forma dímeros en solución y que además participa en la interacción con el ligando Nectin-like 2, aumentando la afinidad en la asociación. En conclusión, el dominio constante es indispensable para la interacción de CRTAM y Nectin-like 2 que probablemente formen agrupamientos de moléculas en la superficie celular promoviendo la adhesión entre células.

INTRODUCCIÓN

Moléculas de adhesión celular (CAMs).

Las adhesiones célula-células son esenciales para la inducción de las funciones efectoras del sistema inmune y de la señalización celular que se derive de dichas interacciones celulares. Las uniones célula-célula pueden ser clasificados en dos grupos: uniones homotípicas (adhesión entre células del mismo tipo) y heterotípicas (adhesión entre células de diferentes tipos), como se ilustra en la Figura 1A (Rikitake, Mandai, & Takai, 2012). Estas uniones célula-célula se establecen mediante Moléculas de Adhesión Celular (**CAMs**), que son un grupo de glicoproteínas de membrana que tienen funciones esenciales para la integridad del tejido y la comunicación intercelular. Todas las CAMs tienen dominios citoplasmáticos, transmembranales y extracelulares. Los dominios citoplásmicos a menudo anclan a los filamentos del citoesqueleto, mientras que los dominios extracelulares se unen ya sea entre sí (interacciones homofílicas) o entre diferentes CAMs (interacciones heterofílicas) expresadas en células vecinas como se muestra en la Figura 1B (Frenette PS, 1996). Adicionalmente, las interacciones de estas moléculas pueden darse en forma Cis (interacción en la superficie de la misma célula) o en Trans (interacción en la superficie entre células opuestas) (figura 1C).

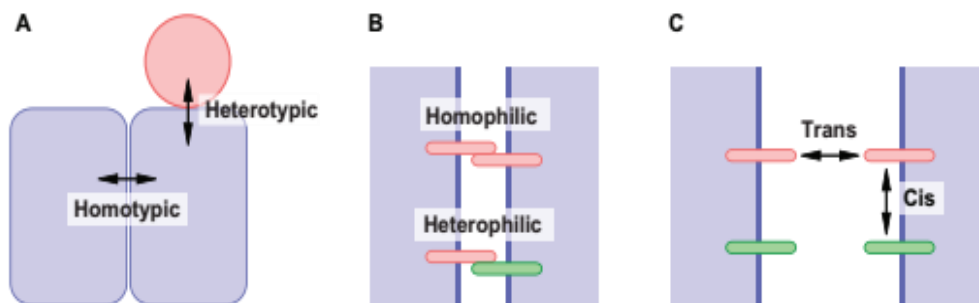


Figura 1.- Tipos de uniones célula-célula. A) Esquema representa uniones celulares homotípicas y heterotípicas. **B)** Interacciones homofílicas y heterofílicas entre moléculas de superficie. **C)** interacciones Trans o Cis entre moléculas de superficie. Tomado de Rikitake, 2012

Las CAMs son receptores de superficie que se agrupan en cuatro familias (Figura 1): Cadherinas, selectinas, integrinas y los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF). A excepción de la superfamilia de las inmunoglobulinas, la interacción que establecen las otras familias dependen de la presencia de calcio (Hynes, 1999).

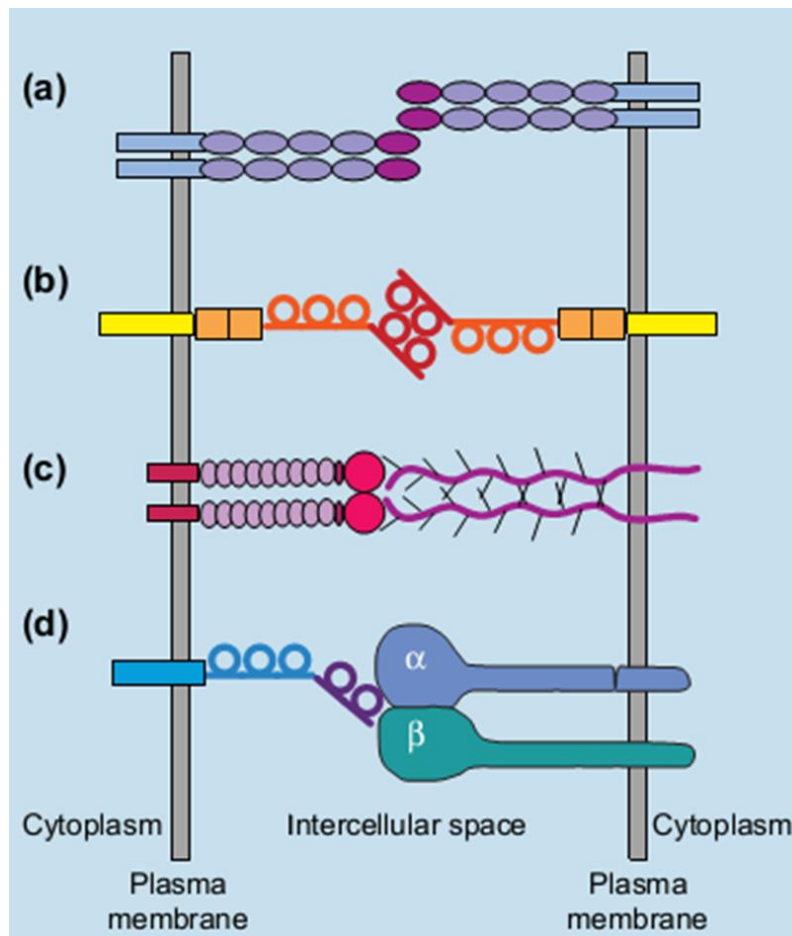


Figura 2. Principales clases de receptores. A) cadherinas. **B)** superfamilia de las inmunoglobulinas. **C)** selectinas. **D)** integrinas. Tomado de Hynes, 1999.

Superfamilia de las Inmunoglobulinas

La superfamilia de las inmunoglobulinas se caracteriza por ser receptores que tienen dominios con plegamiento tipo inmunoglobulina; su estructura secundaria es conformada principalmente de hojas beta que están plegadas en forma antiparalelas, como se muestra en la ilustración derecha de la figura 3. Cada dominio tiene dos subunidades compuestas por grupos de hojas beta íntimamente empacadas por cadenas laterales hidrofóbicas y unidas covalentemente por un puente disulfuro, formando un plegado tipo “sándwich” (Amzel, 1979; Williams & Barclay, 1988) (Figura 3).

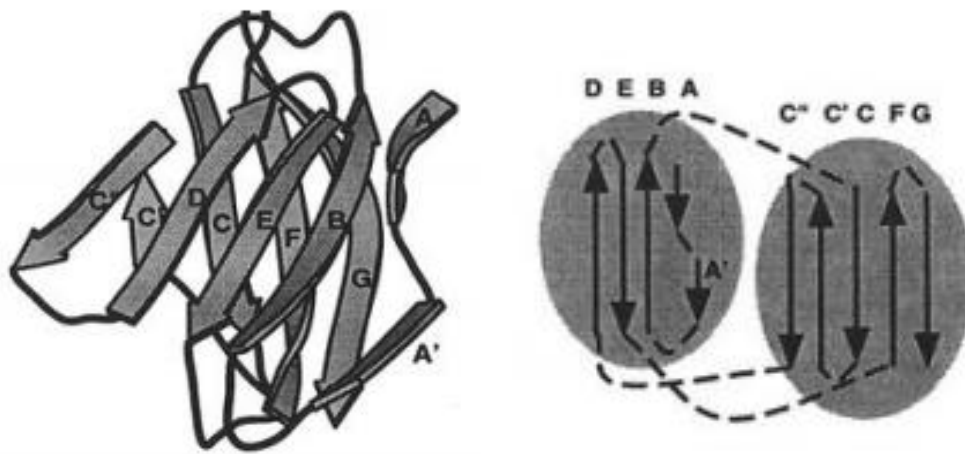


Figura 3: Representación espacial y topológica del dominio variable de tipo inmunoglobulina. La ilustración de la izquierda se muestra una estructura tridimensional de inmunoglobulina representada en listones donde hojas laminas beta que son nombradas con letra de la A-G, mientras que la ilustración de la derecha es una topología de un dominio de inmunoglobulina donde las flechas son estructuras hojas laminas beta nombradas con letras de la A-G. Tomado de Amzel, 1979.

Familia de las Nectinas y semejantes a Nectina (Nectin-like)

Las moléculas de Nectinas y semejantes a Nectina (Nectin-like/Necls) son CAMs y pertenecen a las IgSFs. Son proteínas involucradas en la adhesión celular independiente de Ca^{2+} , que al igual que las cadherinas hacen contacto con el citoesqueleto a través de moléculas de Afadin. La Nectinas tiene cuatro miembros: nectin-1, -2, -3 y -4, mientras que las Necls cinco: Necl-1, -2, -3, -4 y -5 (Ogita & Takai, 2006; Takai, Miyoshi, Ikeda, & Ogita, 2008; Takai & Nakanishi, 2003) (Takai & Nakanishi, 2003). Las características estructurales de las Nectinas y Necls son: tres dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina, dos de tipo constante y uno de tipo variable; una región transmembranal y una región citoplasmática. En el carboxilo terminal de las Nectinas se localiza un motivo de unión a PDZ (*Postsynaptic Density protein-95, Discs-large, Zona occludens-1*) que une moléculas de Afadin (Figura 4), mientras que Necls poseen también motivos similares que no tienen capacidad de unir a Afadin, pero si otras proteínas citoplasmáticas con dominios PDZ (Ogita & Takai, 2006; Takai et al., 2008).

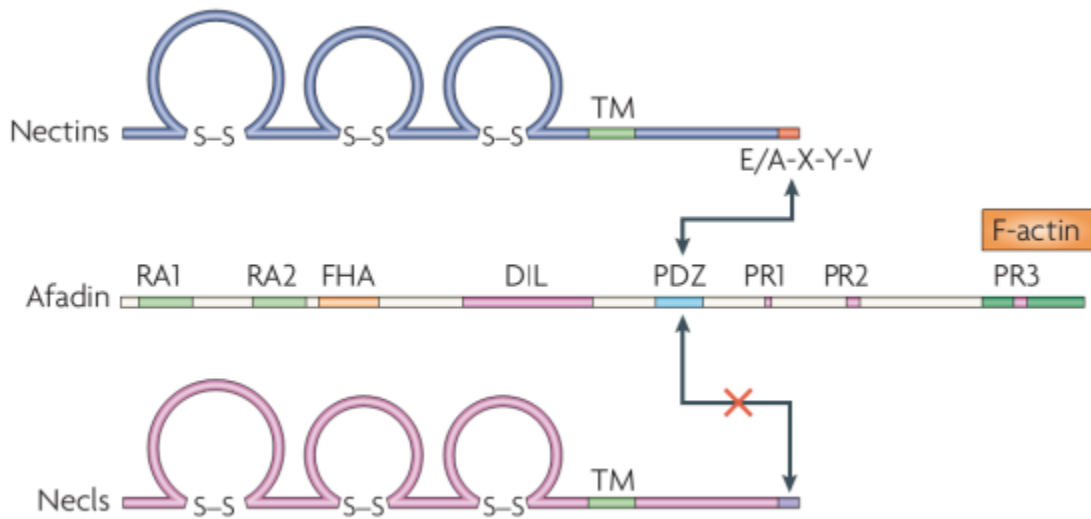


Figura 4. Representación esquemática de la composición de moléculas de Nectinas, Nectin-likes (Necls) y Afadin. Círculos azules y rosas muestran los dominios de inmunoglobulina y sus puentes disulfuro (S-S) intracadena; TM región transmembranal, y en el extremo carboxilo terminal se denota el motivo E/A-X-Y-V que une a dominios PDZ mostrada en flechas. En medio se esquematiza una molécula de Afadin compuestos con los dominios RA1, RA2, FHA, DIL, PDZ, PR1, PR2 y PR2 que está asociada a F-Actina (Cuadro naranja). Tomado de Takai, 2008.

Cada miembro esas familias forman interacciones homofílicas y heterofílicas, tal como se representa en la Figura 5. Se debe recalcar que las interacciones heterofílicas son más fuertes , sus constantes de afinidad están en orden de nanomolar (10^{-9} M) mientras que las uniones trans-homofílicas están en orden de micromolar (10^{-6} M) (Martinet & Smyth, 2015). Una de las características que tiene esta familia es formar “clusters” o agrupamientos en la membrana, donde los dominios constantes (señalados como segundo y tercer dominio de la figura 6) son los responsables de establecer las interacciones en cis, mientras que los dominios variables (señalados como primer dominio de la figura 6)establecen interacciones tipo trans (Takai et al., 2008).

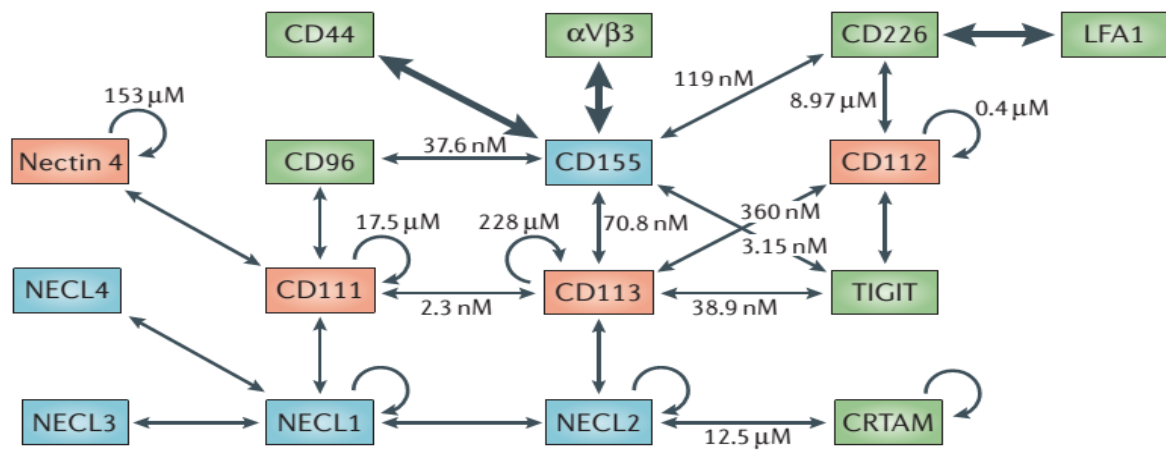


Figura 5. Interacciones homofílicas y heterofílicas de Nectinas y Necls. Cuadros azules denotan a la familia de Necls, en rojo a Nectinas y en verde nuevos miembros de moléculas clasificadas a la familia. Las flechas lineales indican interacción heterofílicas, mientras que flechas circulares interacciones homofílicas. Los valores de las afinidades de las interacciones se indican a un lado de las flechas. Tomado de Martinet & Smyth, 2015.

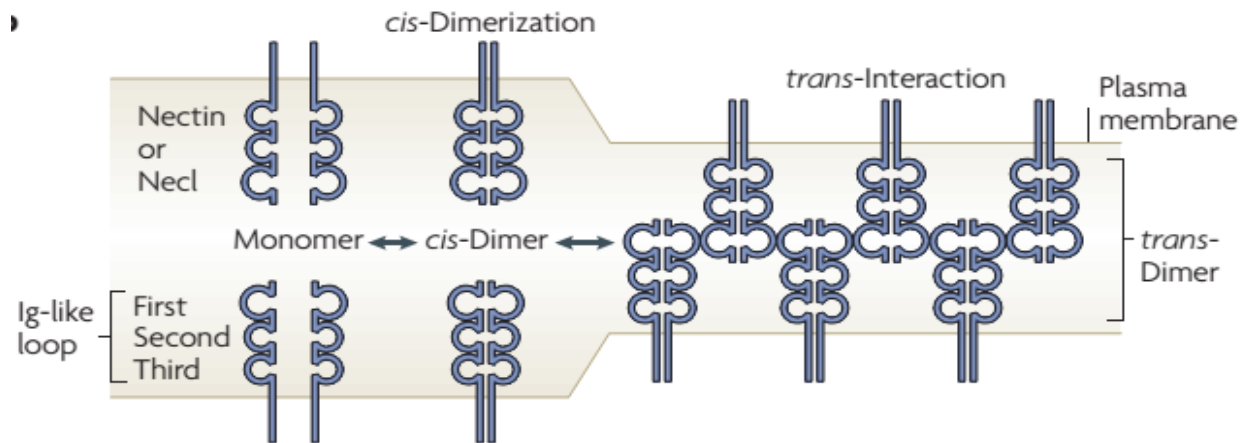


Figura 6. Mecanismo de interacción en la formación de "clusters" de Nectinas. La figura ilustra la dimerización entre dos células que se inicia con monómeros de moléculas de Nectina o Nectin-like (Necl) en posición *cis* (marcado en flecha "*cis*-Dimer") para que los dímeros formen interacciones en *trans* (*trans*-interacción) formando agrupamiento o "clusters" en la superficie celular. Tomado de Takai, 2008.

Nectin-like 2 (CADM1)

La molécula semejante a nectina 2 (Nectin-like 2 o Necl2) se expresa en superficie en células epiteliales, células dendríticas, células neuronales y células de carcinoma. Entre sus funciones se distinguen la adhesión celular, por ello recibe diferentes nombres: CADM1 (*Cell Adhesion Molecule 1*) por su habilidad de ser una molécula de adhesión en células epiteliales, TSLC1 (*tumor supressor lung cancer 1*) por su función como supresor de tumor en cáncer de pulmón, así como SynCAM1 (*Synaptic Cell Adhesion Molecule 1*) por participar en las uniones sinápticas de las células neuronales (Boles, Barchet, Diacovo, Cella, & Colonna, 2005).

Necl-2 puede interaccionar con Nectin-3, Necl-1 y CRTAM (Molécula Asociada a linfocitos T restringidos por la Molécula del Complejo de Histocompatibilidad de Clase I). Por ejemplo, se ha demostrado que Nectin-3 está involucrada en la formación de uniones estrechas (AJ) en las células epiteliales, lo que sugiere que Necl-2 puede reclutarse en la zona de uniones estrechas al interaccionar con Nectin-3 (Shingai et al., 2003; Takai & Nakanishi, 2003). Otro ejemplo es la interacción de Necl2 con la molécula Necl-1, que se expresa principalmente en células neuronales, lo cual sugiere que estaría implicada en la formación de uniones neuronales al establecer esta interacción (Fuchs & Colonna, 2006). La función de la interacción de Necl-2 y CRTAM es de importancia inmunológica, por ejemplo, cuando CRTAM se expresa en linfocitos NK interacciona con Necl-2 expresada en la superficie de células tumorales para incrementar la actividad citotóxica de las NK contra las células tumorales; mientras que en las células T CD8 +, las interacciones entre CRTAM y Necl-2 se requieren para la secreción de IFN- γ (Fuchs & Colonna, 2006).

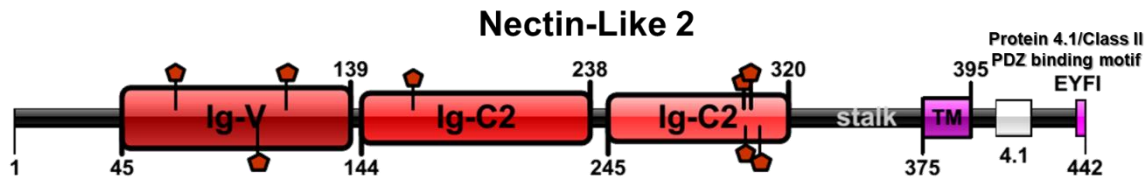


Figura 7. Esquema de la estructura de Nectin-like 2. Representación esquemática donde los dominios de inmunoglobulina variable (IgV) y constante (IgC) son mostrados en cuadros rojos, la región transmembranal (TM) en cuadro morado, el motivo de unión a proteínas 4.1 y a dominios de PDZ. Las ocho glicosilaciones son mostradas como pentágonos rojos y los números marcan la posición de los residuos que comprende cada región de la proteína.

CRTAM

La Molécula CRTAM ó también denominada CD355, es una proteína transmembranal de tipo I, conformada por dos dominios extracelulares de inmunoglobulina, uno de tipo constante y otro de tipo variable, un tallo y una región intracelular donde se localiza un motivo de unión a PDZ de clase I (Figura 8). CRTAM es una proteína que inicialmente se describió como un marcador de activación en linfocitos T CD8+ y células T asesinas naturales (NKT). Posteriormente, se encontró en una subpoblación de células T CD4+ activadas y que se expresa constitutivamente en tejidos no-inmunes como pulmón, hígado, riñón, testículos, cerebro y en intestino (Kennedy et al., 2000; Patiño-Lopez et al., 2006; Yeh, Sidhu, & Chan, 2008). Asimismo, CRTAM se expresa constitutivamente en timocitos inmaduros, mientras que en el timo interacciona heterotípicamente con Nectin-like 2 (CADM1) durante las fases tempranas de desarrollo de los linfocitos tipo T. Como ya se mencionó, en linfocitos T maduros, se expresa tras la activación de los mismos y está involucrada en aumentar los niveles de citotoxicidad y en la producción de INF- γ , IL-17 e IL22 (Arase et al., 2005; Medina-Contreras et al., 2010). Por medio de la interacción intracelular de

CRTAM con dominios PDZs de la proteína Scrib, participa en polarización de CD44, talina, PKC ζ en consecuencia la polarización tardía del TCR y la división asimétrica. Mientras que los dominios extracelulares participan en la adhesión celular entre linfocitos T CD8+ y células presentadoras de antígeno (APC) (Yeh et al., 2008). La expresión constitutiva de CRTAM en células epiteliales y su localización en las uniones adherentes, aunado al estudio evolutivo de la proteína, han llevado a clasificarla dentro de la familia de las Necls, cumpliendo funciones similares. Sin embargo, su mecanismo de interacción no ha sido elucidado completamente (Garay et al., 2010; Rubinstein, Ramagopal, Nathenson, Almo, & Fiser, 2013).

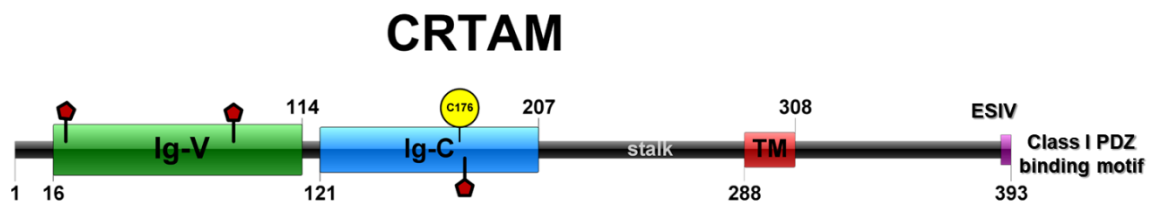


Figura 8. Esquema de la estructura del receptor CRTAM. Los dominios de inmunoglobulina IgV e IgC son marcados en cuadro verde y azul respectivamente. La región del tallo (stalk), la región transmembranal (TM) en cuadro rojo y en el extremo en cuadro morado al motivo de unión a PDZ (ESIV). Tres sitios de glicosilación se señalan en pentágonos rojos y una cisteína libre en la posición 176 se señala en círculo amarillo. Los números marcan la posición de los residuos que comprende cada uno de las regiones del esquema de CRTAM.

Evidencias estructurales ha demostrado que CRTAM establece interacciones tipo trans a través de su dominio variable con el dominio variable de Necl-2 con una constante de afinidad de 1.2×10^{-6} M (Zhang et al., 2013a); así mismo se pudo determinar que CRTAM establece trans-interacción homofílicas con una constante de afinidad de 1.0×10^{-6} M (Rubinstein et al., 2013). Cabe recalcar que la interfase de union es la misma para ambos tipos de interacciones,

aunque ensayos de competencia ha demostrado que la interacción heterofílica de los dominios variables de CRTAM-Necl2 se favorece más que la interacción homofílica CRTAM-CRTAM (Figura 9) (Zhang et al., 2013a). Sin embargo, a la fecha solamente se cuenta con una estructura cristalográfica incompleta de ambas moléculas, por lo que no se ha podido elucidar la función de los dominios constantes tanto en las interacciones heterotípicas como homotípicas de CRTAM. Tampoco se conoce hasta donde los dominios constantes participan en la formación de clústeres y como contribuyen a la avididad durante la interacción.

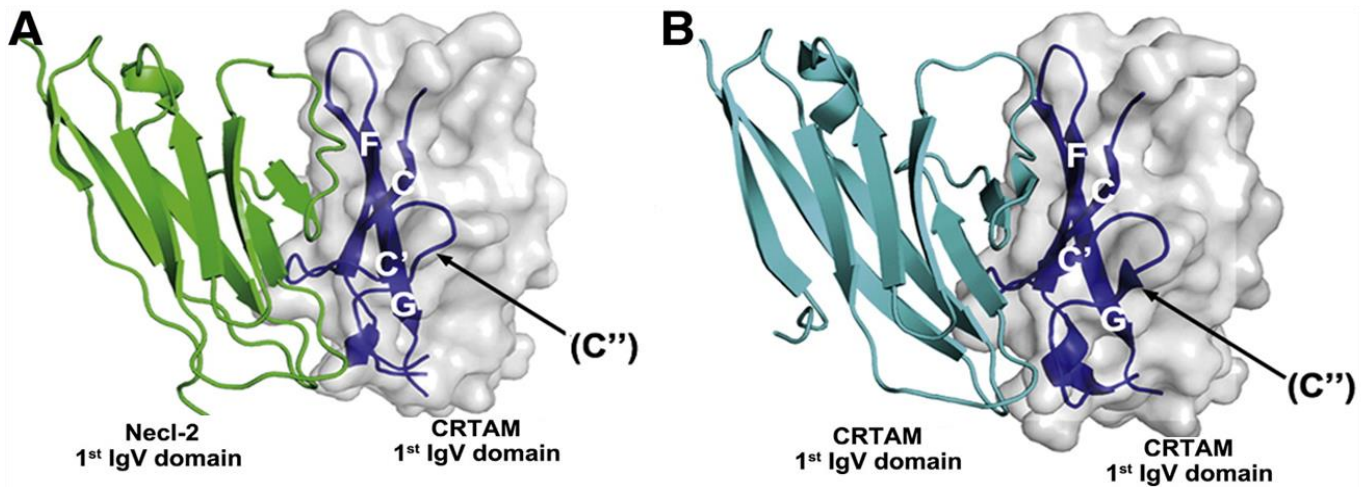


Figura 9. Estructura cristalográfica de los dominios variables en la interacción Necl2-CRTAM. A) estructura tridimensional de los dominios IgV en la interacción heterofílica de Necl2 y CRTAM, en listones verdes Necl2 y en listones azules a CRTAM. B) estructura tridimensional de los dominios IgV en la interacción homofílica de CRTAM-CRTAM. Tomado de Zhang, 2013.

Funciones de los dominios constantes IgC en los receptores de tipo Inmunoglobulina

La importancia de la función biológica de los dominios constantes de los receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas consiste en que son los responsables en el incremento de la avididad en las interacciones y también en establecer asociaciones cis-dímero con moléculas adyacentes. Un ejemplo es la

Nectin-3, que en su interacción con Nectin-1, tiene afinidad de $K_D = 1.3 \text{ nM}$, pero en ausencia de los dominios constantes, la K_D aumenta a 4.0 nM (Yasumi, Shimizu, Honda, Takeuchi, & Takai, 2003) (Figura 10).

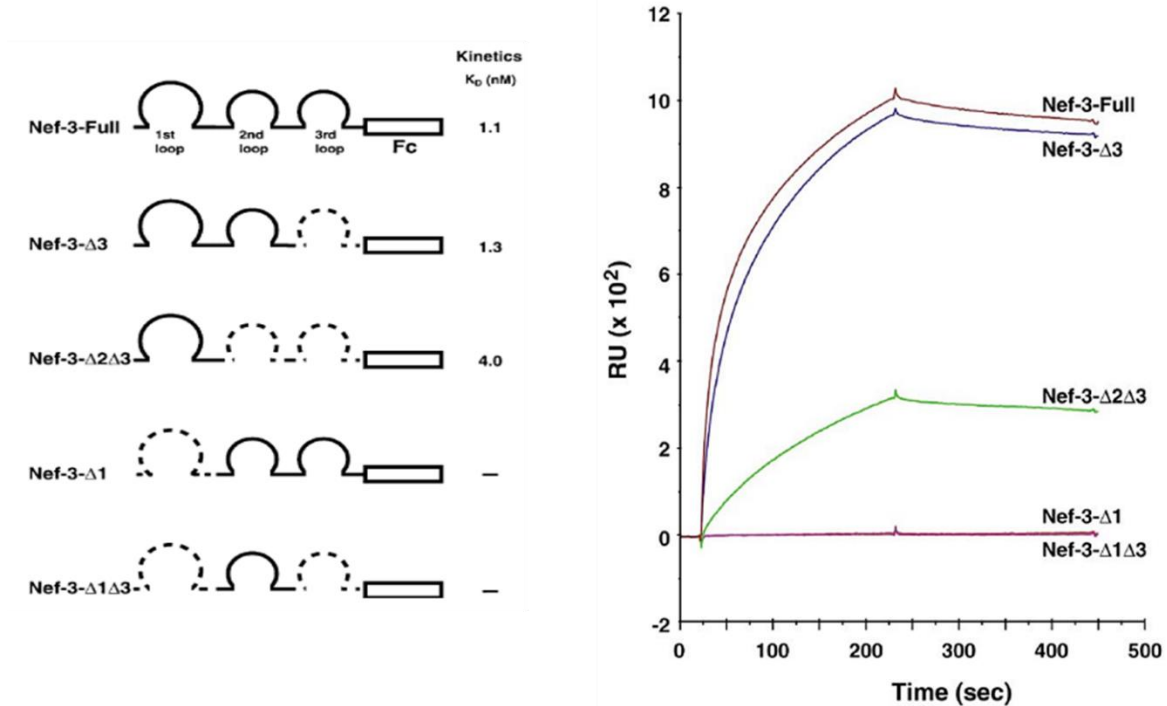


Figura 10. Disminución de la afinidad en ausencia de los dominios constantes durante la interacción Nectin3-Nectin1. Sensograma de las cinéticas de interacción medida por resonancia de plasmones superficiales (SPR), donde Nectin-1 fue inmovilizado en el sensor Chip-CM5 y después se hizo pasar un flujo de diferentes proteínas solubles de Nectin-3 (esquema derecho) sobre el sensor. Las afinidades de las interacciones se muestran a lado de los esquemas. Tomado de Yasumi, Shimizu, Honda, Takeuchi, & Takai; 2003.

Evidencias estructurales también han revelado que los dominios constantes pueden adoptar geometrías flexibles durante la interacción ligando-receptor. Un ejemplo de esto es el receptor Fc tipo gama (Fc γ RI), que está compuesto por tres dominios de tipo constante, y que interacciona con alta afinidad (10^{-9} M) con los dominios constantes de la región Fc de los anticuerpos. Durante esta interacción, los dominios constantes denominados como D1 y D2 del receptor Fc γ RI,

adoptan una geometría “cerrada” o de forma de “corazón” en un ángulo agudo de 70°, estos cambios conformacionales permiten reconocer la interface de la región Fc del anticuerpo el cual también sufre cambios conformacionales, lo que permite una interacción de alta afinidad (Figura 11) (Caaveiro, Kiyoshi, & Tsumoto, 2015).

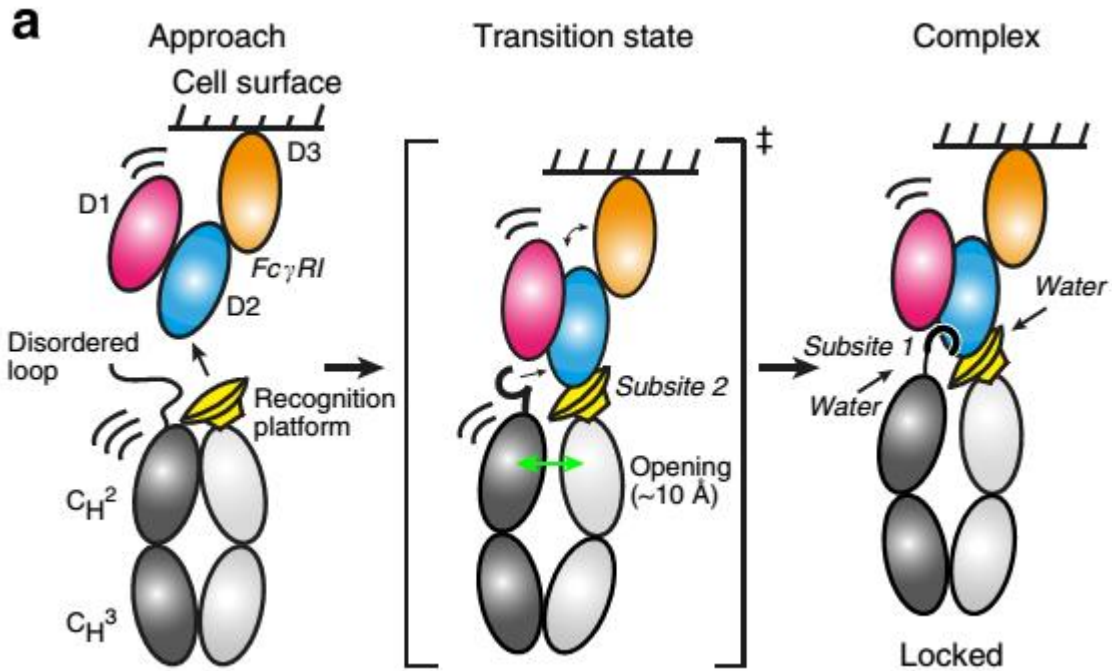


Figura 11. Esquema del mecanismo de interacción del FcγRI - IgG. A la izquierda se muestra la aproximación de la región Fc de un anticuerpo (elipses grises) con el receptor FcγRI (elipses de color magenta, azul y naranja denotan a los dominios D1, D2 y D3 respectivamente). En el esquema de en medio muestra estado de transición entre la región Fc y el receptor FcγRI, donde flechas denotan los cambios conformacionales de las moléculas. Por último, el esquema de la derecha muestra la formación del complejo “cerrado” entre la región Fc y FcγRI, donde hay moléculas de agua participando en la formación de las uniones indicadas con flechas. Tomado de Caaveiro, 2015.

JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que miembros de la familia de las Nectinas y Necls dimerizan en posición *cis* e interaccionan en *trans* para formar multímeros (*clusters*) en la superficie de las membranas, y que los dominios constantes juegan un papel importante de estas asociaciones para favorecer la avidéz y consecuentemente la adhesión celular.

Las evidencias estructurales del dominio variable de CRTAM demostraron que forma heterodímero o bien un homodímero en posición *trans* con el dominio variable de Nectin-Like 2 o CRTAM respectivamente, en una proporción 1:1. Sin embargo, no se ha demostrado que CRTAM forma multímeros en las superficies. Por lo tanto, resulta relevante estudiar el papel del dominio constante en la formación de asociaciones laterales, en la formación de clústeres, y si este dominio tiene un papel en la interacción con Nectin-Like 2.

HIPÓTESIS

El dominio constante tipo inmunoglobulina de CRTAM forma dímeros en solución y colabora a aumentar la afinidad de interacción con el ligando Nectin-Like 2 (Cadm1).

OBJETIVO GENERAL

Elucidar la participación del dominio constante de CRTAM en sus interacciones homotípicas y heterotípicas que establece dicha proteína.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Expresar y producir la región extracelular de CRTAM en un sistema bacteriano.
2. Estimar el perfil oligomérico en solución del dominio constante y del dominio variable de CRTAM.
3. Estudiar el papel del dominio constante en aumentar la afinidad de las interacciones CRTAM-Nectin2.
4. Elucidar la participación del dominio constante de CRTAM en las uniones con el ligando Nectin-like 2 en superficie celular y su función en la agregación celular.

METODOLOGÍA

Vectores y Construcciones

Las diferentes construcciones de CRTAM y Nectin-Like 2 (Ver Figura 12A y 15A) se clonaron en los vectores pET28a (+) y pET32a (+) (Novagen) entre los sitios de restricción BamHI y XhoI en el extremo 5' y 3' respectivamente y se expresaron en la cepa *RosettaTM 2(DE3)*. El vector pUB6/V5-His A (Invitrogen) se empleó para clonar los genes de CRTAM y Nectin-like para su expresión en líneas celulares.

RT-PCR y PCR

La síntesis del DNA codificante de Nectin-like 2 se realizó a partir de 100 ng de RNA obtenido de 2.5×10^5 de células HEK293 utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen), subsecuentemente el cDNA se obtuvo utilizando el sistema "Super Script One-Step RT-PCR Platinum Taq" (Invitrogen). Las reacciones se realizaron en el termociclador GeneAmp 2400 (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: Primer paso: RT a 55°C por 30 min; segundo paso: desnaturalización de la transcriptasa reversa y activación de Taq a 94°C durante 2 minutos; tercer paso: 35 ciclos a 94°C/30 segundos, 57°C/30 segundos, 72°C/70 segundos; y cuarto paso: un ciclo a 72°C por 10 min.

Los amplicones de CRTAM se obtuvieron a partir de una amplificación simple de PCR (primer paso: 94°C/2 minutos; segundo paso: 35 ciclos de 94°C/30 segundos, 57°C/30 segundos, 72°C/60 segundos; y cuarto paso: un ciclo de 72°C durante 10 min). Se utilizaron como molde 20 ng de DNA plasmídico de una construcción previamente hecha en el laboratorio por Patino-Lopez (2006), cuyo inserto se localiza en el marco abierto de lectura de CRTAM insertado en el vector pCIneo (Promega). Los oligonucleótidos utilizados iban dirigidos a los extremos 5' y 3' del inserto. Los oligonucleótidos usados en todas las amplificaciones se describen en la tabla I del anexo III. Los fragmentos amplificados se separaron en electroforesis de geles de agarosa al 1 % en TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM Acetato de sodio, 2 mM EDTA) y fueron corridos a 100V durante 40 minutos y posteriormente teñidos con bromuro de etidion.

Los genes de las proteínas fluorescentes Ypet (EYFP) y Cypet (EYFP) fueron obtenidos por una amplificación simple de PCR (primer paso: 94°C/2 minutos; segundo paso: 35 ciclos de 94°C/30 segundos, 55°C/30 segundos, 72°C/60 segundos; y cuarto paso: un ciclo de 72°C durante 10 min) usando como templado 10 ng de los vectores pYPET-N1 (Addgene #54637) y pCypet-N1 (Addgene #54638) (Nguyen & Daugherty, 2005). Los oligonucleótidos usados iban dirigidos a los extremos 5' y 3' de los insertos (ver tabla II del anexo III).

Mutagénesis de sitio dirigido por PCR

El plásmido pUB6V5/His que tiene clonado el gen quimérico de CRTAM-Ypet fue sometido a mutagénesis por PCR usando la DNA polimerasa de alta fidelidad "Express High Fidelity" (Biomiga, Inc.). Para la reamplificación del plásmido se empleó una PCR de 16 ciclos de 98°C/15s; 55°C/30s y 72°C/2'. Para eliminar el plásmido parental, el producto de PCR fue digerido con 2 unidades de la enzima DpnI (NEB) a 37°C por 1 hora, seguido de la inactivación de la enzima a 75°C/10'. El producto resultante se sometió a una ligación usando 2 unidades de la T4 DNA ligasa (NEB) a 16°C/15 h. Con esta construcción se transformó la cepa

bacteriana Top10, se sembraron cajas Petri de LB agar con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron las placas a 37°C/18h. Para identificar los plásmidos mutados, las colonias fueron sometidas a PCR de colonia usando oligonucleótidos que reconocen a la secuencia péptido señal y la región intracelular de CRTAM. Los oligonucleótidos usados para la delección de los dominios usando mutagénesis dirigida, están descritos en la tabla III del anexo III.

Preparación y transformación de bacterias

Bacterias competentes de *RosettaTM 2(DE3)*, *pRARE2 (Cam^R)* y *Top10* se prepararon mediante el método del cloruro de rubidio y se transformaron por choque térmico (Sambrook & Russell, 2006). *RosettaTM 2(DE3)* se usó para expresar las diferentes construcciones generadas en el desarrollo del presente trabajo, y *Top10* para la propagación de los diversos plásmidos. Las minipreparaciones de plásmidos se llevaron a cabo con el sistema de Qiagen siguiendo las instrucciones del proveedor. Para la expresión de las proteínas recombinantes, las bacterias fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (Invitrogen) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, cloranfenicol 34 µg/ml y crecidas a 37°C durante 6 h con agitación de 200 rpm. Posteriormente, se agregó el agente inductor Isopropil-β-D-thio-galactopiranosido (IPTG; Sigma-Aldrich) y se continuó el cultivo a 20°C/16 h. Una vez cumplido el tiempo de inducción, las bacterias se cosecharon a 4000 x g durante 5 minutos.

Lisis bacteriana y purificación de proteínas recombinantes.

Las bacterias previamente cosechadas se resuspendieron en solución amortiguadora de lisis (40mM Tris pH 8.5, 300 mM NaCl) y se dejaron reposar 30 min, a 4°C; después se sonicaron durante 6 ciclos de 1 min a una frecuencia de 60 Hz. El lisado se centrifugó a 15, 000 rpm/30 min/ 4°C, y la fracción soluble

(sobrenadante) se cargó a columnas de afinidad preempacadas HisTrap™ (Cytiva) con metal inmovilizado (IMAC) para unir a las proteínas acopladas a etiquetas de Histidinas. El sobrenadante se hizo pasar por la columna dos veces, y el exceso de proteína remanente se removió lavando la columna con la misma solución amortiguadora de lisis. La recuperación de la proteína se realizó eluyendo la columna con 10 ml de 500 mM Imidazol pH 8.5.

Para las proteínas fusionadas con Tiorredoxina (Trx), el sobrenadante descrito arriba se sometió a diálisis contra una solución amortiguadora (40 mM Tris pH 8.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) por 24 h y al dializado se le agregaron 50 µg de la proteasa PreScission Protease (Cytiva) para liberar la etiqueta fusionada a la proteína recombinante. Esta última se sometió a cromatografía de intercambio aniónico en una columna HiTrap™ Q-HP (Cytiva) eluyendo con un gradiente de 0-500 mM de NaCl.

Las proteínas recolectadas se concentraron con filtros para centrifugación Amicon® Ultra-15 (límite de peso molecular nominal (NMWL) de 3,000) hasta un volumen mínimo de 1.0 ml, el cual se inyectó a columnas de filtración en gel de Sephacryl s-200, Superdex™ 200 10/300 GL o Superdex™ 75 10/300 GL (Cytiva) dependiendo de la proteína de interés y se colectaron fracciones de 1 ml.

Preparación de SDS-PAGE y Western Blot

La electroforesis de las proteínas (SDS-PAGE) se realizó utilizando geles de poliacrilamida del 12 al 15 %. Previo a la electroforesis, las muestras colectadas de cada uno de los pasos de purificación se mezclaron con amortiguador de muestra Laemmli 2x (20% glicerol, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8; 4% SDS; 0.02 % azul de bromofenol, 150 mM β-Mercaptoetanol) y las muestras se sometieron a electroforesis a 120 V por 80 min. Después de la electroforesis, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) en una cámara

semiseca (Bio-Rad) a 20V/30min. La membrana se incubó toda la noche a 4°C en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4 suplementado con leche en polvo al 5 % y Triton X-100 0.05% (solución de bloqueo). Posteriormente se incubó con anticuerpo C8 anti-CRTAM durante toda la noche a 4°C, seguido de tres lavados con PBS-Tween 0.5 %. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario IgG de cabra anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (HRP) (Sigma no A-8924) a una dilución 1:5000, seguido de un lavado con PBS y revelado con reactivos de quimioluminiscencia ECL (Amersham Pharmacia. Biotech). Para remover el anti-CRTAM, la membrana se trató a 50°C/30' con la solución removedora ("Stripping") compuesta de 0.5 M Tris pH 6.8, 10% SDS y 1% β -mercaptoetanol. Posteriormente la membrana se incubó con solución de bloqueo, seguido de una incubación a 4° durante toda la noche con un anticuerpo Anti-His6x acoplado a HRP (Clona J099B12, Biolegend). Al término, se lavó con PBS y se reveló la membrana con quimioluminiscencia ECL (Amersham Pharmacia, Biotech).

Espectros de dicroísmo Circular

La proteína recombinante CRTAM_{IgC-stalk}-His6x y CRTAM-Trx a una concentración de 2 mM, se dializaron contra una solución de Tris 25 mM pH 8.0/ NaCl 100 mM. Posteriormente, se analizaron en el espectropolarímetro J-1500 (Jasco, Tokyo, Japón), empleando una celda de 1 cm (equilibrada a temperatura ambiente), a una longitud de onda de 190 a 260 nm con 1 nm de resolución a una velocidad de 20 nm/min y una respuesta de 1s.

Resonancia de plasmones de superficie

La proteína recombinante Necl2_{EC} se capturó en un chip sensor Biacore CM5 (GE Healthcare) hasta una densidad de inmovilización final de ~1500 unidades de resonancia (RU). Todos los experimentos de unión se realizaron a 25 °C a una

velocidad de flujo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$, y se inyectaron diluciones seriadas de las recombinantes CRTAM_{EC} y CRTAM_{IgV} en una solución tampón HBS-P+ (GE Healthcare) sobre el chip CM5. La cinética de unión se obtuvo mediante el análisis de los sensogramas que se ajustan a un modelo de unión Langmuir 1: 1 utilizando el software de evaluación BIAcore T200 (GE Healthcare).

Transfección celular y microscopía confocal.

Las líneas celulares Cos7, Jurkat y 3T3 fueron preparadas previamente a la transfección, con una confluencia del 60% usando una placa de cultivo con 12 pozos con un área de crecimiento 3.8 cm^2 ; cubreobjetos de 16 mm de diámetro fueron previamente montados al fondo de los pozos. La transfección se preparó en 30 μL , a una dilución 1:1 usando 15 μg de liposomas catiónicos (LipofectamineTM 2000, Thermo Fisher) y 5 μg del plásmido pUB6/V5-His clonado con las construcciones quiméricas de Crtam-Ypet (con sus respectivas mutantes), CRTAM-Cypet y Necl2-Ypet. La mezcla lípidos/plásmido fue incubado por 20 minutos y luego fue añadida por goteo a los pozos hasta 1ml de volumen. Esta mezcla de transfección se incubó durante 18h, después se removió del medio, se lavó con solución salina PBS 1x y se añadió medio fresco. A las 48 h postransfección, las células fueron cosechadas, lavadas con PBS1x y se tiñeron los nucleos con 2 gotas del Hoechst 33342 (NucblueTM Live ReadyProbes®, Thermo Fisher) durante 20 minutos. Posteriormente, se fijaron las células con 2 ml de paraformaldehído al 4% en PBS por 20 minutos. Finalmente, los cubreobjetos con las células fijadas en su superficie fueron removidos del pozo y usando glicerol al 70% como solución de montaje, fueron montados en portaobjetos cuyos bordes fueron sellados con barniz.

Las imágenes obtenidas de las células transfectadas, fueron visualizadas con objetivo 60x usando un microscopio confocal LEICA SP8, ubicado en las instalaciones del CINVESTAV, Zacatenco.

RESULTADOS

Diseño y purificación de proteínas recombinantes de CRTAM

Con la finalidad de cumplir con el primer objetivo del presente trabajo, que fue expresar y producir la proteína recombinante de CRTAM para poder estimar el perfil oligomérico en solución promovido por el dominio constante de CRTAM, se diseñaron las proteínas recombinantes que se ilustran en la figura 12A. Los genes que codifican para esas proteínas recombinantes se clonaron en el vector pET32a que codifica para una etiqueta de tiorredoxina (Trx) junto con una bandera de 6 histidinas (6xHis), en la posición amino. La clonación de las construcciones CRTAM_{IgC} y CRTAM_{IgV} en pET32a fue corroborada por restricción enzimática usando a BamHI y XhoI como se muestra en la Figura 12B y 12C, donde se observan bandas con tamaños de ~270pb y ~320pb que corresponden a los genes que codifican para CRTAM_{IgC} y CRTAM_{IgV}, respectivamente. Una tercera construcción que codifica tanto para dominio constante como el variable de la proteína (CRTAM_{IgV-C}) se clonó en pET28a (+) (Novagen) que solo adiciona una etiqueta de 6xHis, y el fragmento clonado fue liberado por la digestión con BamHI y XhoI, dando un tamaño de ~700 pb (Figura 12D). Cabe mencionar que la finalidad de utilizar a la proteína tiorredoxina (Trx, con peso de ~15 kDa) como proteína de fusión, es que esta proteína tiene actividad redox y por lo tanto promueve la formación de puentes disulfuro que son esenciales para el plegamiento correcto de los dominios de inmunoglobulina (Symersky, Novak, McPherson, DeLucas, & Mestecky, 2000; Yasukawa et al., 1995) y con ello se favorece la producción de proteínas solubles. Las construcciones se utilizaron para transformar a la cepa *RosettaTM 2(DE3)* que contiene un plásmido pRARE2 (con el gen de resistencia a cloranfenicol: Cam^R), el cual favorece la expresión de codones raros presentes en el gen recombinante Crtam. Posteriormente, las bacterias se cultivaron en presencia de 0.8mM de IPTG por 18 h a 20°C para inducir la expresión de las proteínas recombinantes. Contrario a lo esperado, las diferentes proteínas recombinantes se expresaron en cuerpos de inclusión, aun

teniendo fusionada a la tiorredoxina. Como se puede observar en el gel de SDS-PAGE, la construcción CRTAM_{IgC} se expresó en la fracción insoluble, presentando un peso molecular aparente de ~35 kDa. De la misma manera, la construcción CRTAM_{IgV} expresó una proteína con peso molecular de ~34 kDa que se encontró en la fracción insoluble (Figura 13A y 13B). Por lo que respecta a la construcción CRTAM_{IgV-C} fusionada solamente a una etiqueta de 6xHis, como se esperaba, la proteína recombinante se encontró en cuerpos de inclusión (fracción insoluble), y mostró un peso molecular aparente de ~25 kDa (Figura 13C).

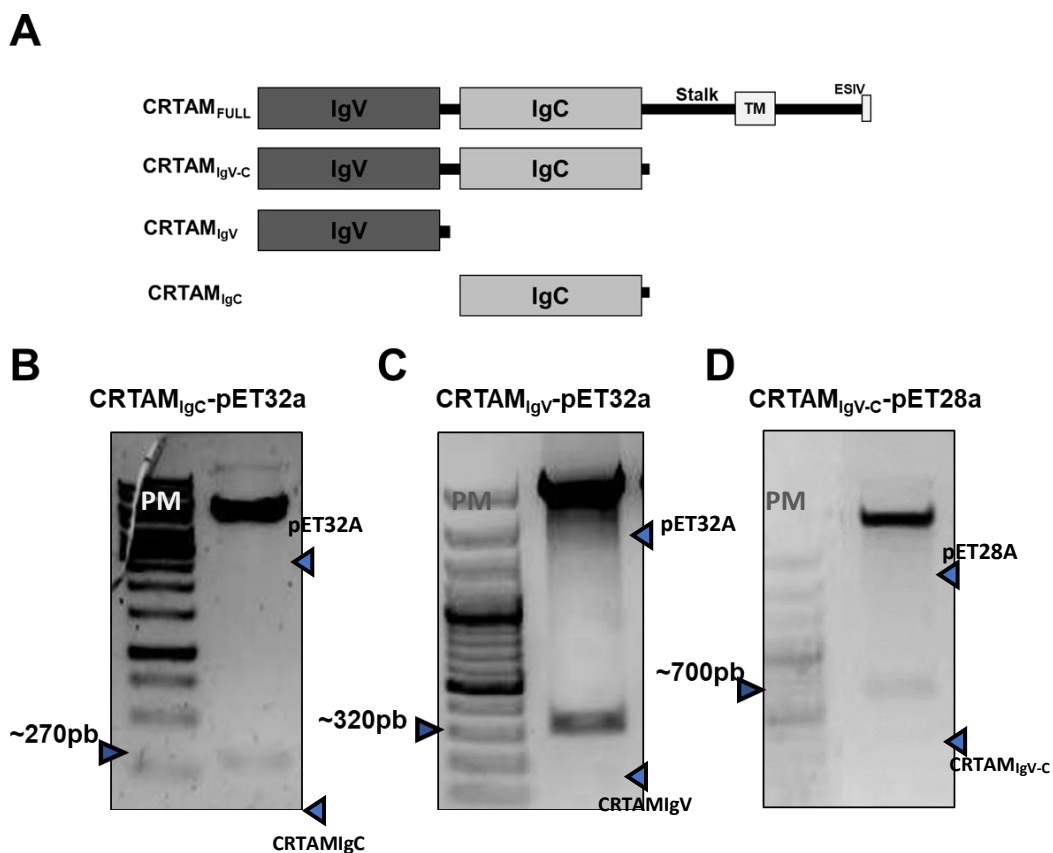


Figura 12. Análisis electroforético de los plásmidos digeridos que codifican para los genes CRTAM_{IgV}, CRTAM_{IgC} y CRTAM_{IgV-C}. A) esquema representativo de las diferentes construcciones de CRTAM clonado en pET32a y pET28a. Las clonaciones de CRTAM_{IgC} (B), CRTAM_{IgV} (C) y CRTAM_{IgV-C} (D) en los respectivos vectores se verificaron por restricción enzimática usando las enzimas BamHI y XhoI. Los plásmidos digeridos fueron revelados en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio. PM, marcador de peso molecular 1 kb.

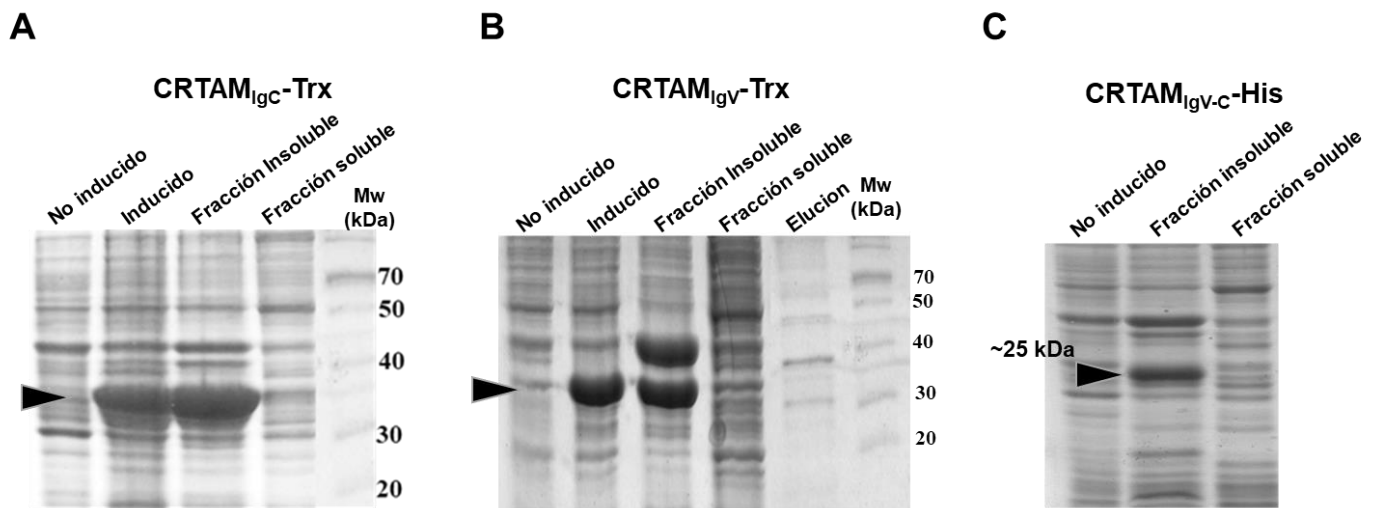


Figura 13. Los dominios expresados de IgV e IgC de CRTAM se encontraron en cuerpos de inclusión. Análisis electroforético de las proteínas recombinantes esquematizadas en la Figura 12A. (A) CRTAM_{IgC}-Trx (B), CRTAM_{IgV}-Trx (C) y CRTAM_{IgV-C}-His. Los cultivos bacterianos se disolvieron en amortiguador de Laemmli 2x y se sometieron a electroforesis SDS-PAGE. La fracción soluble, e insoluble corresponde a muestra obtenidas durante el proceso de purificación de las proteínas recombinantes. Las flechas señalan las proteínas recombinantes de interés. Mw, marcador de peso molecular para proteínas, Trx es la proteína de Tiorredoxina usada como proteína de fusión.

La región tallo “stalk” de CRTAM promueve solubilidad a las proteínas recombinantes.

Debido a que CRTAM posee un tallo (*stalk*) de 77 aminoácidos y 46 de ellos son hidrofílicos hipotetizamos que la insolubilidad de las proteínas recombinantes, descritas en la sección anterior se podía deber a la carencia de los 77 aminoácidos del tallo. Por lo tanto, se analizó la solubilidad de la región tallo utilizando el programa bioinformático “Protein-Sol”, disponible gratuitamente en el sitio <https://protein-sol.manchester.ac.uk/>. Los resultados mostraron que la región tallo tiene un valor alto de solubilidad de 0.94 en comparación del valor de referencia promedio de solubilidad (*protein average solubility*: PopAvrSol), que es de 0.45, mientras que los dos dominios extracelulares (IgV/IgC) es de 0.4, mientras que los dominios extracelulares junto con el tallo (CRTAM_{EC}) poseen un valor de 0.6 (Figura 14A). Se hace notar, que los valores altos de solubilidad se conservan en la región tallo de CRTAM de diversas especies (Figura 14B). Por lo tanto, con el objetivo de obtener proteínas recombinantes soluble, se diseñaron tres construcciones que fueron clonadas en el vector pET28a (+) (Novagen) o en

el vector pET32a: una que comprende toda la región extracelular, es decir, los dos dominios IgV-IgC más la región tallo, denominada como CRTAM_{EC}; una segunda que comprende el dominio constante y la región tallo denominado CRTAM_{IgC}-Stalk; y una tercera con el dominio variable y la región tallo denominada CRTAM_{IgV}-Stalk (Figura 15A).

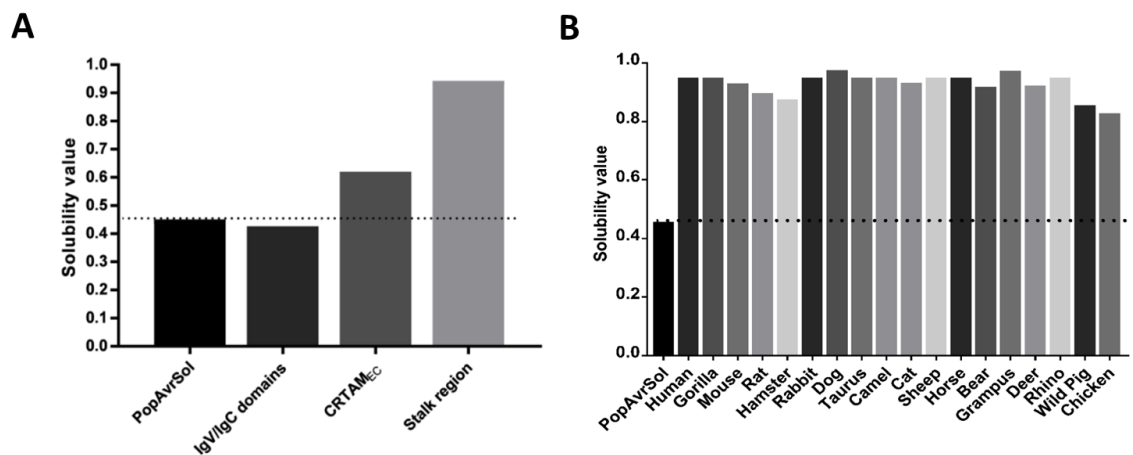


Figura 14. Análisis de solubilidad de los dominios y región “stalk” de CRTAM. **A)** La secuencia aminoacídica de los dominios IgV/IgC, región extracelular (EC) y tallo (stalk) de CRTAM; y **B)** las secuencias de las regiones del tallo (stalk) CRTAM de diversas especies fueron sometida al software Protein-Sol para el cálculo de solubilidad. Valores de solubilidad comprenden entre 0.0-1.0, donde el valor 0.45 fue usado como un valor promedio de solubilidad (PopAvrSol), valores arriba de este significa mayor solubilidad, y menores a este significa insolubilidad.

La correcta clonación de los genes que codifican para las construcciones CRTAM_{EC} y CRTAM_{IgC}-Stalk, se verificó por digestión enzimática usando las enzimas BamHI y XhoI. Las figuras 15B y 15C muestran los fragmentos liberados de un tamaño de ~550pb correspondiente al cDNA de CRTAM_{IgC}-Stalk, y otro fragmento de ~900pb corresponde a CRTAM_{EC}. La construcción CRTAM_{IgV}-stalk fue clonada solamente en pET28a y fue liberada por BamHI y XhoI dando lugar a un fragmento liberado de ~600pb (Figura 15D).

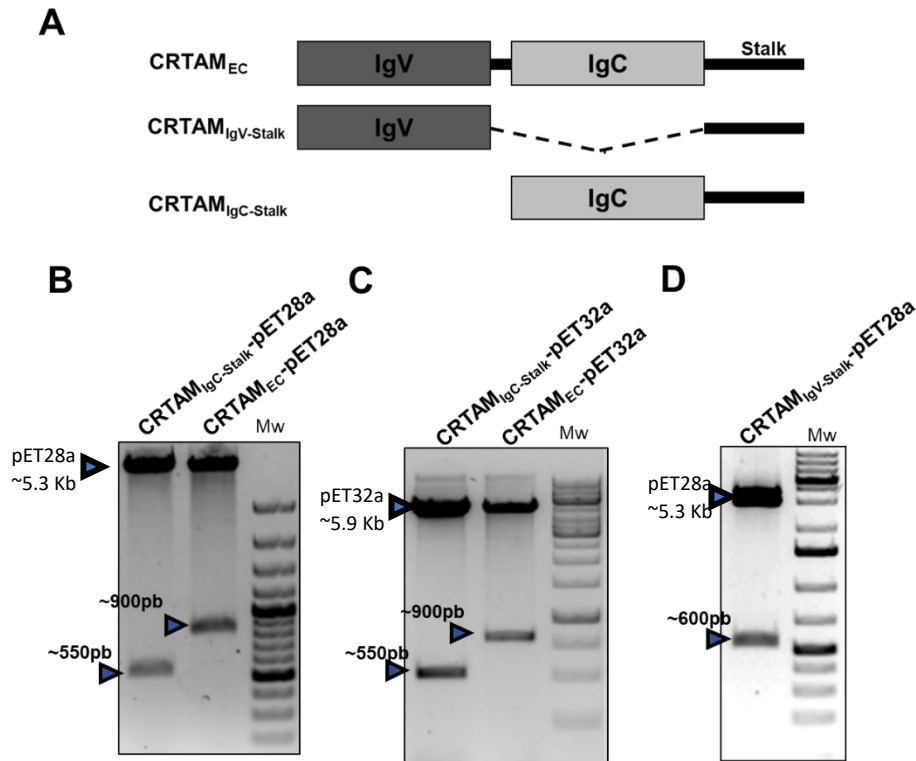


Figura 15. Análisis electroforético de la digestión de los plásmidos que codifican para los genes CRTAM_{EC}, CRTAM_{IgV-Stalk} y CRTAM_{IgC-Stalk}. A) Esquema de las diferentes construcciones de CRTAM. Patrón electroforético de las construcciones B), C) y D). Debido a que todos los genes se clonaron en los sitios de restricción BamHI en 5' y XhoI en 3', se emplearon esas enzimas para la digestión y liberar al fragmento deseado (cabeza de flecha), el vector lineal es denotado con su nombre y su tamaño en la parte superior de la imagen.

Las construcciones anteriores que contiene la región tallo se usaron para transformar a la cepa *RosettaTM 2(DE3)* y la producción de las proteínas recombinantes se llevó a cabo induciendo con 0.8 mM de IPTG por 18 h a 20°C. De acuerdo con lo hipotetizado, las proteínas recombinantes que incluyen la región tallo y a pesar de contener solamente una etiqueta de 6xHis en el amino terminal, se produjeron como proteínas solubles, lo que permitió purificarlas por cromatografía de afinidad IMAC. En la Figura 16A-C, se observan claramente bandas con un peso molecular de ~35kDa, ~26 kDa y ~28 kDa en las fracciones inducidas, solubles y en la elución, que corresponden a CRTAM_{EC}, CRTAM_{IgC-Stalk} y CRTAM_{IgV-Stalk} respectivamente. Por su parte, las construcciones de CRTAM_{EC} y

CRTAM_{IgC-Stalk} que fueron clonadas en pET32a (Novagen) en fusión con la proteína Trx, también se expresaron en la fracción soluble. En la Figura 16D y 16E, se observan las bandas con pesos moleculares de ~70 kDa y ~45 kDa que corresponden a las recombinantes fusionadas CRTAM_{EC}-Trx y CRTAM_{IgC-Stalk}-Trx respectivamente; también es evidente que hay una mayor expresión de estas construcciones que cuando se adicionó una sola etiqueta de 6xHis.

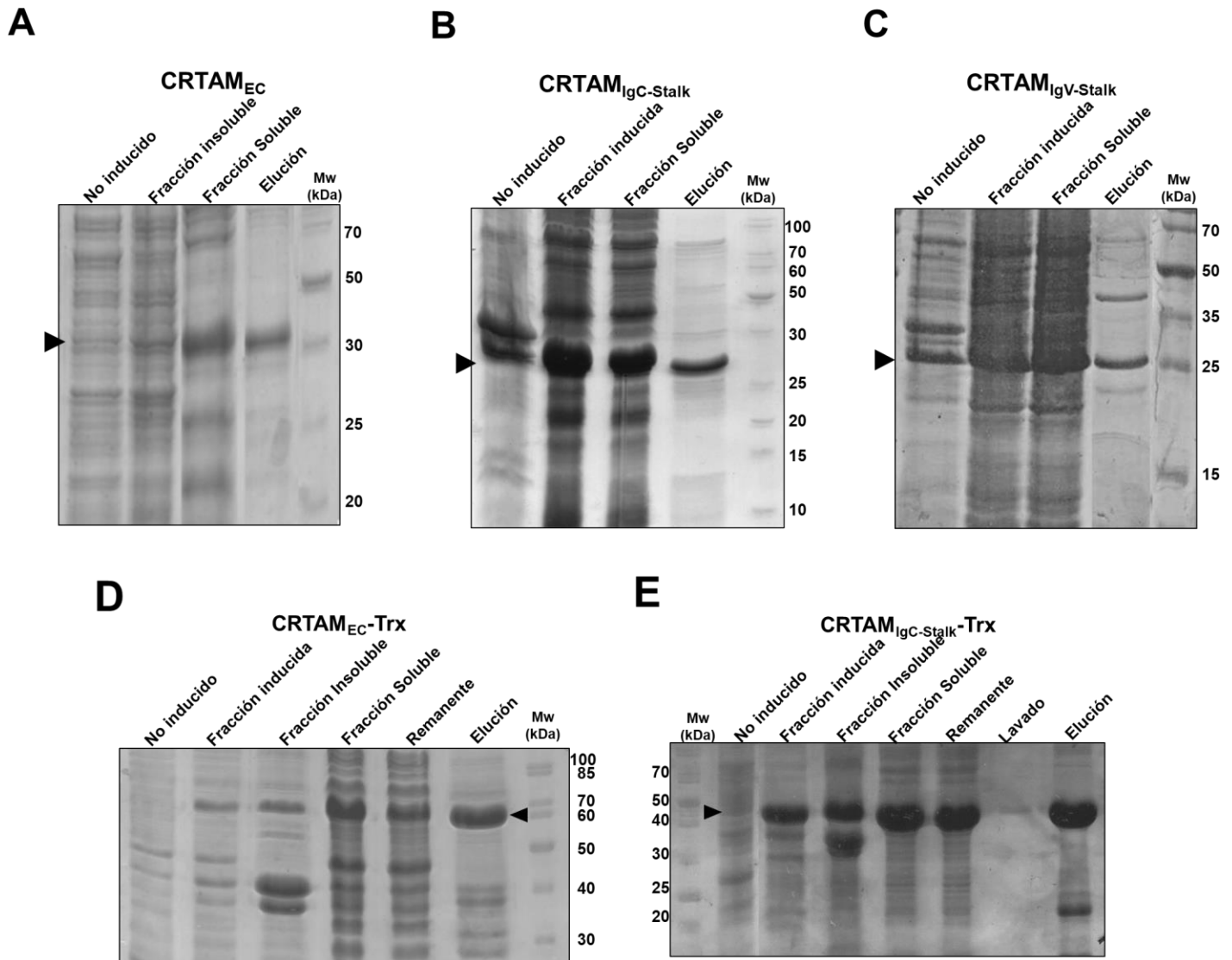


Figura 16. Las proteínas recombinantes de CRTAM que contienen la región del tallo se producen de manera soluble. Análisis electroforético de las construcciones CRTAM_{EC} (A), CRTAM_{IgC-Stalk} (B) y CRTAM_{IgV-stalk} (C) que fueron clonadas en pET28a con una etiqueta simple de 6xHis. D y E muestra el análisis electroforético de CRTAM_{EC} y CRTAM_{IgC-Stalk} clonados en pET32a fusionado Trx (15kDa). Cada carril de los geles de SDS-PAGE muestra la fracción que fue colectada durante los pasos de la purificación desde la inducción hasta la elución de cada una de las proteínas recombinantes. Las cabezas de las flechas indican los pesos moleculares aparentes de las proteínas recombinantes de interés. Mw indica los pesos moleculares en kDa.

Clonación, expresión y purificación de Nectin-like 2

Ya que uno de los objetivos es estudiar el papel del dominio constante de CRTAM en la interacción con el ligando Necl2, fue necesario clonar y expresar como proteína recombinante a Necl2. La región extracelular de Necl2 (Necl2_{EC}), comprende al dominio variable (IgV), los dos dominios constantes y la región tallo (Figura 17A). Esta región extracelular fue clonada en los vectores pET28a y pET32a, y la inserción se corroboró por digestión con las enzimas de restricción BamHI y XhoI; como se observa en la Figura 17B, se liberó un fragmento de ~950pb que corresponde a la región extracelular de Necl2. Los plásmidos se emplearon para transformar la cepa *RosettaTM 2(DE3)* y las proteínas recombinantes se indujeron con 0.8 mM de IPTG por 18 h a 20°C. Las proteínas se purificaron por cromatografía IMAC, y en la Figura 17C, se observa una banda con un peso molecular de ~39 kDa que corresponde a la proteína fusionada con 6xHis y en la Figura 17D una banda de ~57 kDa que corresponde a la proteínas fusionada con Trx. Esta última parece expresarse en mayor cantidad que la recombinante con etiqueta de histidinas. Para remover a la proteína Trx fusionada a Necl2, se usó la proteasa PreScission (Cytiva), y la Figura 17E se puede observar a la proteína Necl2_{EC} con un peso de ~39 kDa, a la Trx con un peso ~18 kDa; aunque la digestión no fue completa, dado que aún se observa a la recombinante fusionada. La proteína digerida, fue sometida a cromatografía de intercambio aniónico para obtener la Necl2_{EC} libre de Trx, el perfil cromatográfico muestra que en las primeras en primeras 7 fracciones, que corresponden a la elución con 0-200 mM de NaCl, se obtuvo Tiorredoxina liberada, y a partir de la fracción 8 al 12, corresponde a las eluciones con 200-300 mM de NaCl, se obtuvo a Necl2_{EC} (Figura 17F).

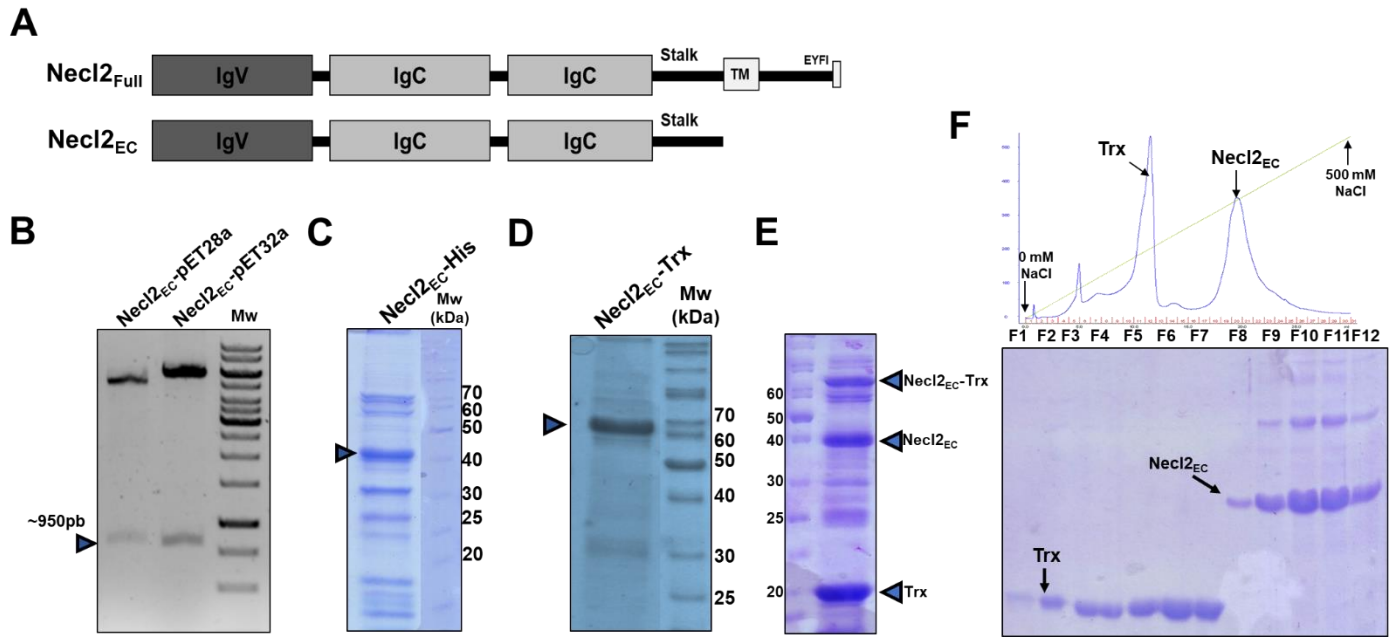


Figura 17. Generación y producción de Necl2. **A)** Representación esquemática de Necl2 completa y región extracelular Necl2_{EC}. **B)** análisis de restricción enzimática con BamHI y XhoI de los plámidos pET28a y pET32a que contienen a la construcción de NECL2_{EC}. **C)** SDS-PAGE DE de Necl2_{EC}-6xHis y **D)** Necl2_{EC}-Trx purificadas por IMAC. **E)** SDS-PAGE de la proteína recombinante Necl2_{EC}-Trx digerida con la proteasa PreScission de fusión **F)** Perfil Cromatográfico de intercambio iónico con un gradiente de 0-500mM de NaCl para purificar Necl2_{EC}, después de digerirla enzimáticamente. Las primeras fracciones F1-F7 corresponde a Trx liberada y las fracciones F8-F12 a la elución de Necl2_{EC}.

Dicroísmo Circular del dominio constante de CRTAM

Con las proteínas recombinantes solubles, se procedió a hacer un estudio de dicroísmo circular para corroborar si la recombinante CRTAM_{IgC-stalk} contiene laminas beta en su estructura secundaria. Para ello las recombinante CRTAM_{IgV-stalk-6xHis} y CRTAM_{IgV-stalk-Trx} se suspendieron en un amortiguador de Tris 25 mM pH 8.0 y la solución se analizó en un espectropolarímetro J-1500 en las condiciones descritas en materiales y métodos. Los espectros de dicroísmo circular de ambas recombinantes fueron muy similares y fue muy parecido al espectro que presentan ambas proteínas a las láminas beta antiparalela de referencia (Kelly, Jess, & Price, 2005) (Fig.18C). En la proteína CRTAM_{IgC-stalk} se observó una clara curva negativa entre 210-220 nm, semejante al patrón de referencia, sugiriendo que en efecto la composición de la proteína recombinante es principalmente de láminas beta (Figura 17A y 17B). Cabe mencionar que se observa también la presencia de α -hélices a 208 nm, que podrían deberse a la composición la región tallo y/o a la proteína de fusión Tiorredoxina. Estos datos indican que las recombinantes expresadas y obtenidas de sistema bacteriano usando a la cepa *RosettaTM 2(DE3)*, tienen estructura secundaria típica de una inmunoglobulina, pero se requieren estudios sobre la estructura terciaria para determinar si las estructuras secundarias observadas están correctamente plegadas.

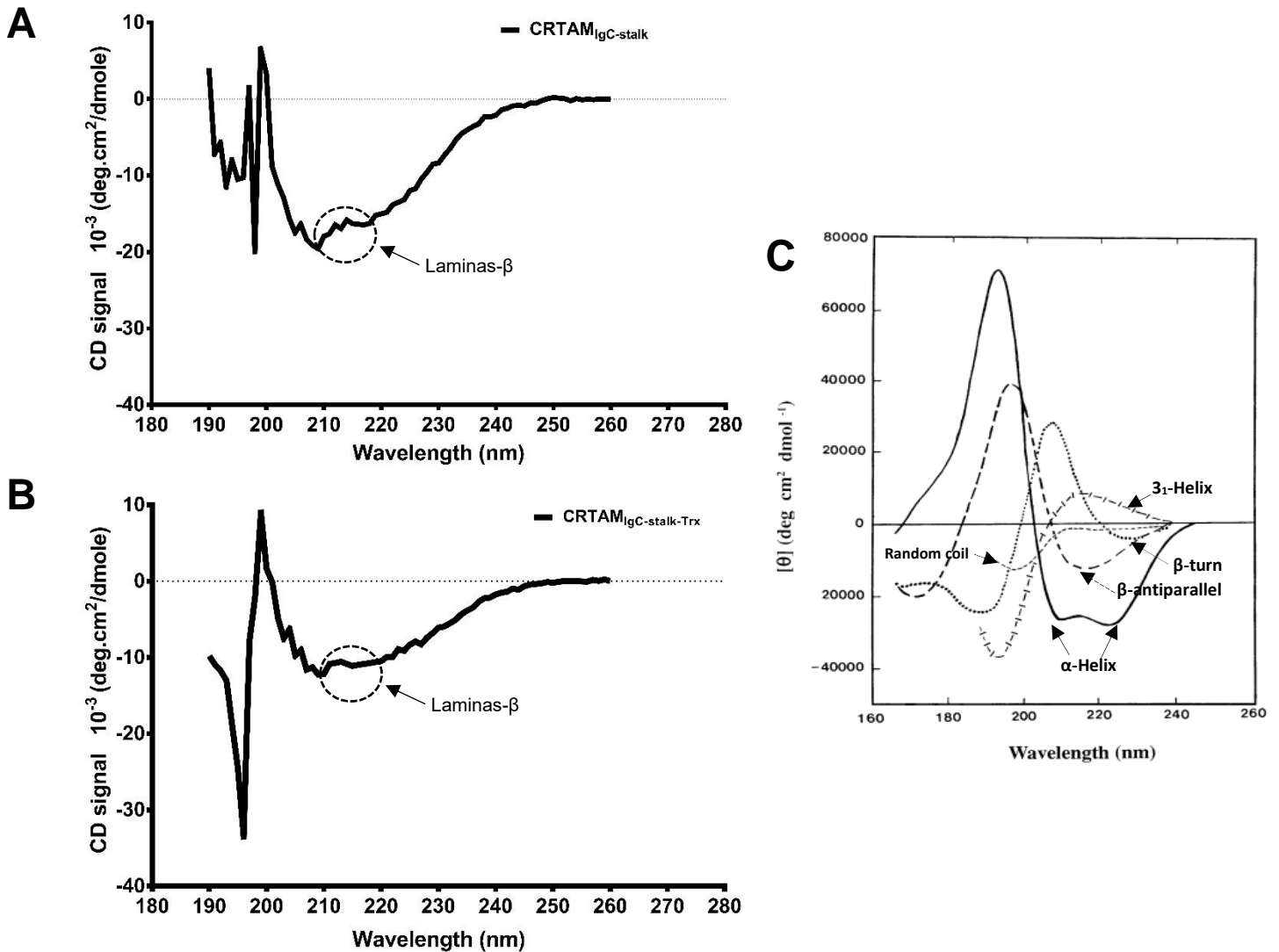


Figura 18. La proteína recombinante CRTAM_{IgV-stalk} presenta la estructura secundaria de típica de las inmunoglobulinas. Espectro de dicroísmo circular de la recombinante CRTAM_{IgV-stalk-His} (A) y de CRTAM_{IgV-stalk-Trx} (B). El círculo punteado con flecha denota al espectro típico de estructura secundaria conformado por láminas beta anti paralela .C) Espectro de dicroísmo de referencia (tomado y modificado de: Kelly, 2005) de estructuras secundarias donde la absorbancia de hélice alfa (línea continua) se denota como dos curvas negativos a 208 y 222 nm, la lámina beta antiparalela (líneas punteadas largas) se muestra con una curva negativa a 218 nm, y las estructuras "random coil" o estructura irregular (líneas punteadas cortas) se muestra como un curva positiva a 212 nm.

El anticuerpo anti-CRTAM humano “C8” reconoce el dominio constante de CRTAM

Previamente nuestro grupo produjo un anticuerpo monoclonal anti-CRTAM humano llamado clona 8 (mAbC8), después de inmunizar a ratones Balb/c con la versión completa de la recombinante CRTAM, (Patiño-Lopez et al., 2006). Este anticuerpo reconoció en Western Blots a CRTAM de linfocitos CD8, pero a la fecha se desconoce, a cuál de los dominios extracelulares de CRTAM reconoce el mAbC8. Aprovechando que se obtuvo las recombinantes de CRTAM, así como sus dos dominios por separado, se usaron dichas proteínas recombinantes para identificar el dominio que reconoce el anticuerpo. Las recombinantes CRTAM_{EC}, CRTAM_{IgV-Stalk}, CRTAM_{IgC-Stalk}, Necl2_{EC} se usaron en análisis de Western blot donde se exploró la reactividad de mAbC8. En la Figura 19A se muestra reacción del anticuerpo con las recombinante de CRTAMEC (~37 kDa) y también reactividad en el carril con CRTAM_{IgC-Stalk} (~27 kDa) pero no en el carril de CRTAM_{IgV-Stalk}. Este resultado demostró que mAbC8, reconoce al dominio constante de CRTAM. La misma membrana previamente utilizada fue tratada con la solución “stripping” para remover el mAbC8, e incubada con el anticuerpo anti-His6x. De acuerdo a lo esperado, se observó reactividad en todas las recombinantes Debido a que el dominio constante 1 de Necl2 comparte una identidad del 27.2% y una similitud del 54.3 %, con CRTAM (Figura 19E). También se exploró si existía reactividad cruzada del mAb C8 con la recombinante Necl2_{EC}, sin detectar una señal positiva (Figura 19A), aunque el anticuerpo anti-His si reconoció a la proteína recombinante (Figura 19B). Para sustentar estas observaciones, también se incubó a la recombinante soluble CRTAM_{IgC-Stalk} a 37°C/30 min con el mAb C8 previo a incubarlo con la membrana que contenía CRTAM_{IgC-Stalk}; en la Figura 19C, se puede observar disminución de la señal en el western blot cuando se realizó la pre-absorción, lo que corrobora la especificidad de C8.

Una vez establecido que el mAbC8 reconoce el dominio constante de CRTAM, se procedió a determinar la afinidad de dicho anticuerpo. Para ello, se hizo una cinética de afinidad del anticuerpo frente a la recombinante CRTAM_{IgC-Stalk} usando concentraciones de la recombinante de 3-250-nM inyectadas al Chip con el anticuerpo C8 inmovilizado. Se observó una respuesta de resonancia de máxima 1000 RU en disminución conforme se disminuye las concentraciones de la proteína recombinante, pudiéndose calcular afinidad de $KD=6.28 \times 10^{-10}$ M (0.628 nm) (Figura 19D).

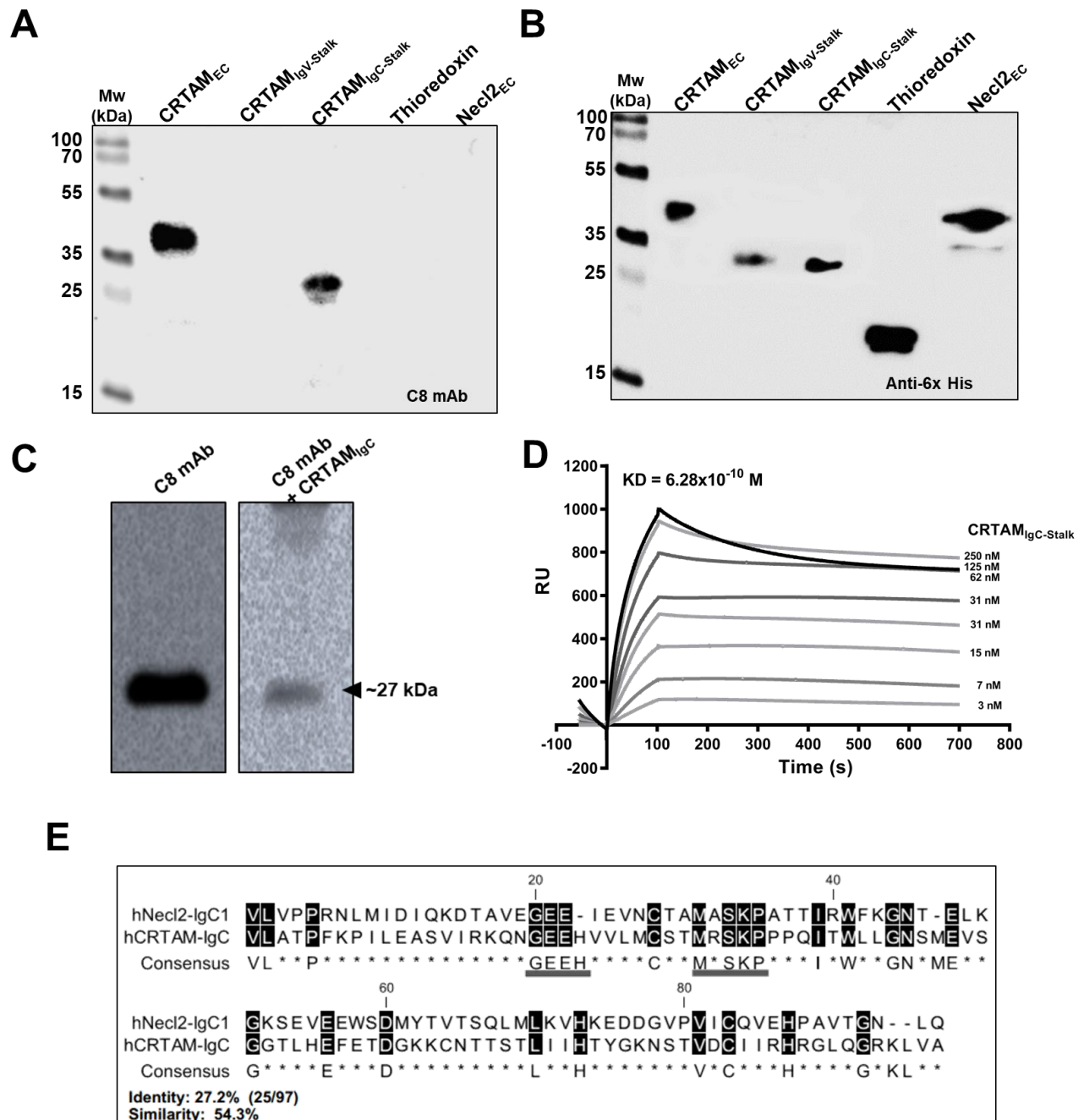


Figura 19. El anticuerpo monoclonal C8 anti-CRTAM está dirigido contra el dominio contante y posee una alta afinidad por su proteína blanco. **A)** Análisis por western blot de la reactividad del anticuerpo C8 contra las recombinantes CRTAM_{EC}, CRTAM_{IgV-stalk}, CRTAM_{IgC-stalk}, Tioredoxina y Necl2_{EC}. **B)** reactividad del anticuerpo anti-Histidina con las proteínas recombinantes. **C)** reactividad del anticuerpo C8 previamente absorbido con la recombinante CRTAM_{IgC-stalk} soluble. **D)** análisis de resonancia de plasmones (SPR) para determinación de la KD, el anticuerpo C8 fue inmovilizada covalentemente en un Chip CM5 y se hizo pasar un gradiente con concntraciones crecientes de la recombinante CRTAM_{IgC-Stalk} **E)** alineamiento del dominio constante 1 de Necl2 humano y dominio constante de CRTAM humano, se indica el porcentaje de identidad y similitud; y en fondo negro son los residuos idénticos en ambas secuencias.

Las proteínas recombinantes de CRTAM y Necl2 necesitan replegamiento.

Para conocer los perfiles oligoméricos de los dominios de CRTAM, las recombinantes CRTAM_{EC}, CRTAM_{IgV-Stalk}, CRTAM_{IgC-Stalk} y Necl2_{EC} que fueron previamente purificadas por IMAC y analizadas por dicroísmo circular, se sometieron a la cromatografía de exclusión molecular en una columna Sephacryl S-200, para analizar su perfil oligomérico y su plegamiento. Previo a ello, la columna fue calibrada con proteínas con pesos moleculares conocidos como: γ -Globulina (158 kDa), BSA (66 kDa), DNase I (33 kDa), RNase (13 kDa) y también azul de dextrano (2000 kDa), obteniendo una R^2 de 0.93 (Figura 20). Las recombinantes antes mencionadas se inyectaron y se dejó correr la cromatografía a un flujo de 1 ml/min. En el cromatograma se observa que todas las recombinantes se obtuvieron en el mismo pico de elución donde se recupera el Azul de dextrano, lo que indica que el peso molecular de las recombinantes es mayor de 250 kDa. Lo anterior sugiere que a pesar de ser proteínas solubles con peso molecular monomérico entre 26 kDa a 39 kDa, están formando agregados de alto peso molecular (Figura 21A).

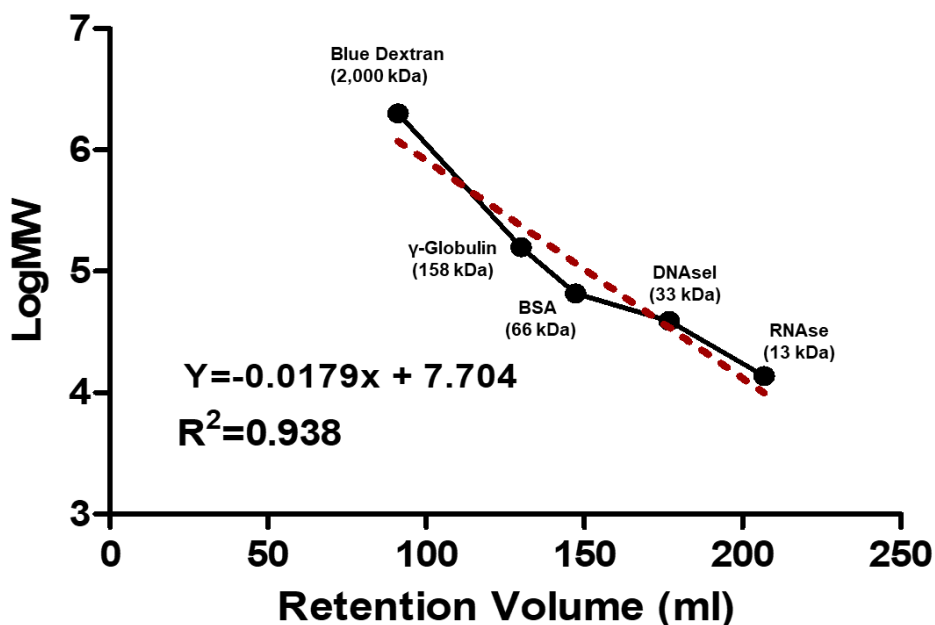


Figura 20. Calibración de la columna de exclusión molecular Sephacryl-S200. Estándares de peso molecular: Azul de dextrano (Blue dextran), γ -Globulina, BSA, DNaseI y RNase con pesos moleculares de 2000, 158, 66, 33 y 13 kDa respectivamente; fueron inyectados en la columna de exclusión molecular Sephacryl S-200 a un flujo de 1ml/min. Se graficó los logaritmos de los pesos moleculares contra los y volúmenes de retención. El cálculo de una regresión lineal con un R^2 fue de 0.938.

Los pesos moleculares obtenidos en la cromatografía de exclusión molecular podrían deberse a la agregación de proteínas por mal plegamiento, ya que los dominios de inmunoglobulina necesitan de la formación de un puente disulfuro intracadena para formar el plegamiento tipo “Sandwich” que las caracteriza. Por otro lado, la cepa *RosettaTM 2(DE3)* no está optimizada para formar puentes disulfuro, por lo cual deducimos que la falta de éstos podría estar promoviendo la agregación. Para resolver ese problema, se decidió promover un replegamiento químico de las proteínas recombinantes, que consiste en un primer paso de desnaturalizar para linealizar a la proteína y un segundo paso de inducir su renaturalización. Para ello ~5mg de cada una de las proteínas recombinantes purificadas CRTAM_{EC}, CRTAM_{IgV-Stalk}, CRTAM_{IgC-Stalk} y Necl2_{EC} fueron resuspendidas en 10 mL de una solución desnaturalizante (6M de Guanidina y 50mM de β -mercaptoetanol) e incubadas a temperatura durante 30 min. Las

muestras de cada proteína de interés fueron dializadas contra una solución renaturalizante que contenía 500 mM de L-Arginina, 1 mM de glutatión reducido y 0.5 mM de glutatión oxidado, pH 8.0. El glutatión es comúnmente usado para replegar inmunoglobulinas ya que promueve la formación de puentes disulfuro (Song et al., 2014; Thomson, Olson, Jackson, & Schrader, 2012). Este proceso de renaturalización de proteínas se llevó a cabo a 4°C por 48 horas. Después, las proteínas replegadas se sometieron a cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephacryl S-200.

Como se muestra en la Figura 21B, el perfil de elución de las proteínas renaturalizadas fue diferente al observado en la Figura 21A. A pesar de que no fue posible evitar la formación de agregados, ya que estos siguen eluyendo en la misma fracción que el azul dextrano, fue posible obtener a las proteínas con el plegamiento correcto, ya que eluyeron en las fracciones que corresponden a los pesos moleculares esperados. CRTAM_{EC} exhibió un peso molecular cercano a γ -Globulina de 158 kDa, mientras que CRTAM_{IgV-Stalk} y CRTAM_{IgC-Stalk} eluyeron con pesos moleculares mayores a BSA (66 kDa) y por último a Necl2_{EC} se encontró con un peso cercano a OVA (45kDa) (Figura 20B). Todo esto sugiere que una parte de las proteínas recombinantes de CRTAM, se replegaron correctamente evitándose su agregación. Sin embargo, las proteínas aún pudieran estar formando dímeros en solución.

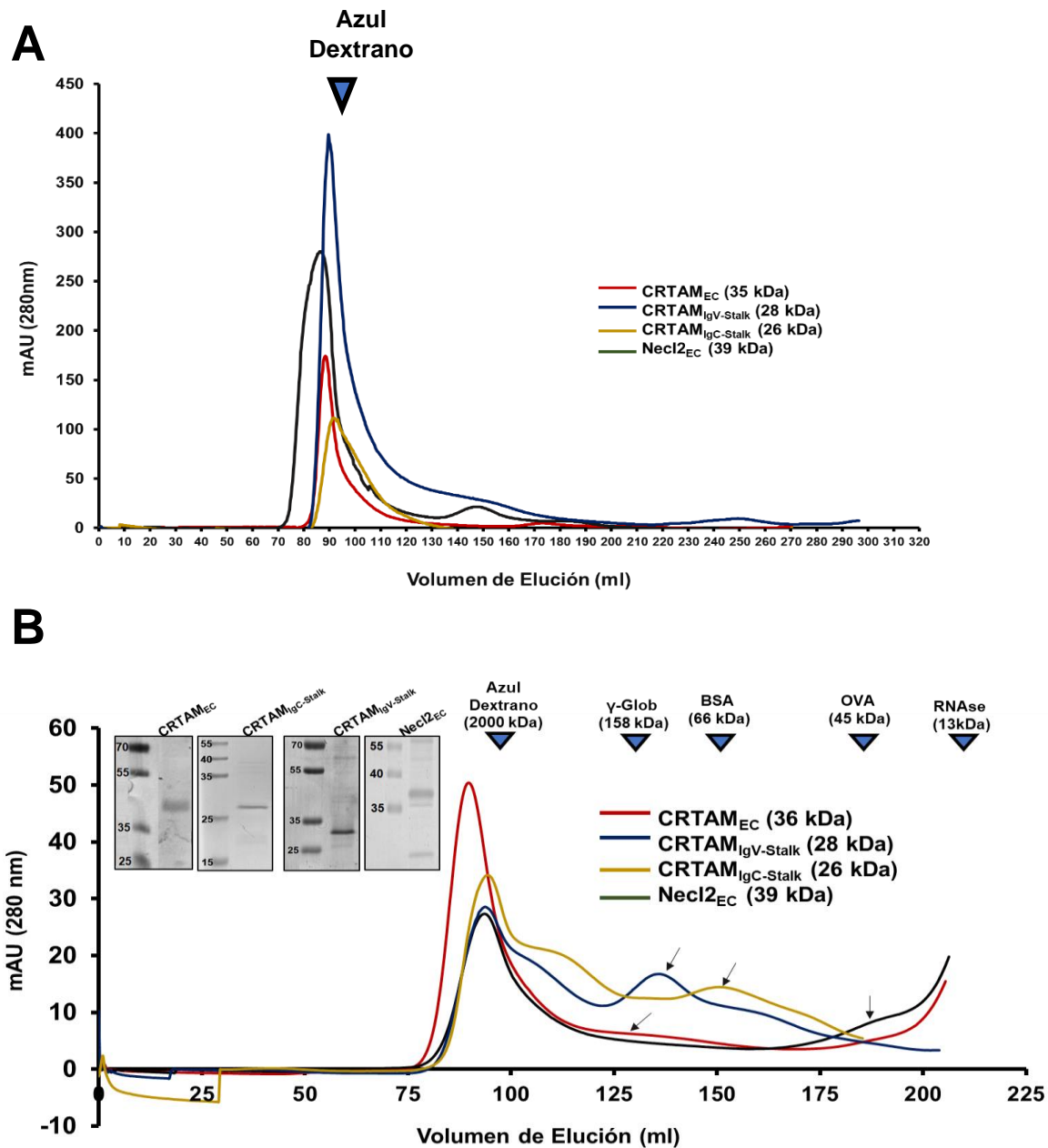


Figura 21. Replegamiento de las proteínas recombinantes CRTAM. A) perfil cromatográfico de exclusión molecular las proteínas recombinantes que eluyeron de una columna de Sephacryl S-200. B) perfil cromatográfico de las proteínas recombinantes posterior a un proceso replegamiento químico. Las cabezas de flechas indican a las moléculas usadas en la calibración de la columna y sus pesos moleculares. Las flechas indican las fracciones colectadas que se sometieron a electroforesis SDS-PAGE mosstrado en el panel superior izquierdo.

La región extracelular de CRTAM forma dímeros en solución.

Para conocer el perfil de oligomerización de CRTAM, es decir, si los dominios son capaces de formar dímeros, tetrámeros o complejos en solución; las recombinantes adecuadamente plegadas que se purificaron en la columna de Sephacryl-200, se sometieron a una segunda cromatografía de exclusión molecular empleando una columna de Superdex-75 10/300 (Cytiva) que permite separar proteínas de pesos moleculares entre 75 y 3 kDa. Previo al análisis de las recombinantes, la columna de exclusión molecular fue calibrada con estándares de pesos moleculares conocidos, BSA (66kDa), OVA (45 kDa), Mioglobina (16.7 kDa) y Vitamina B-12 (1.4 kDa), seguido del cálculo de una regresión lineal ($R^2 = 0.98$), como se muestra en el panel superior derecho de la Figura 22. Los pesos moleculares de las recombinantes fueron calculados usando la ecuación obtenida de la calibración de la columna y los volúmenes de elución de cada proteína. La recombinante CRTAM_{EC}, con un peso monomérico estimado de ~37 kDa, mostró un peso molecular superior al de BSA (66kDa), aproximadamente de 70 kDa; para CRTAM_{IgC} con un peso monomérico estimado de ~27 kDa, mostró un peso molecular entre OVA (45 kDa) y BSA, sugiriendo también una dimerización en solución alrededor de 55 kDa, y por último CRTAM_{IgV} eluyeron como monómero de 28 kDa y dímero de 57 kDa (Figura 22). Estos datos sugieren que la región extracelular de CRTAM se capaz de formar dímeros en solución.

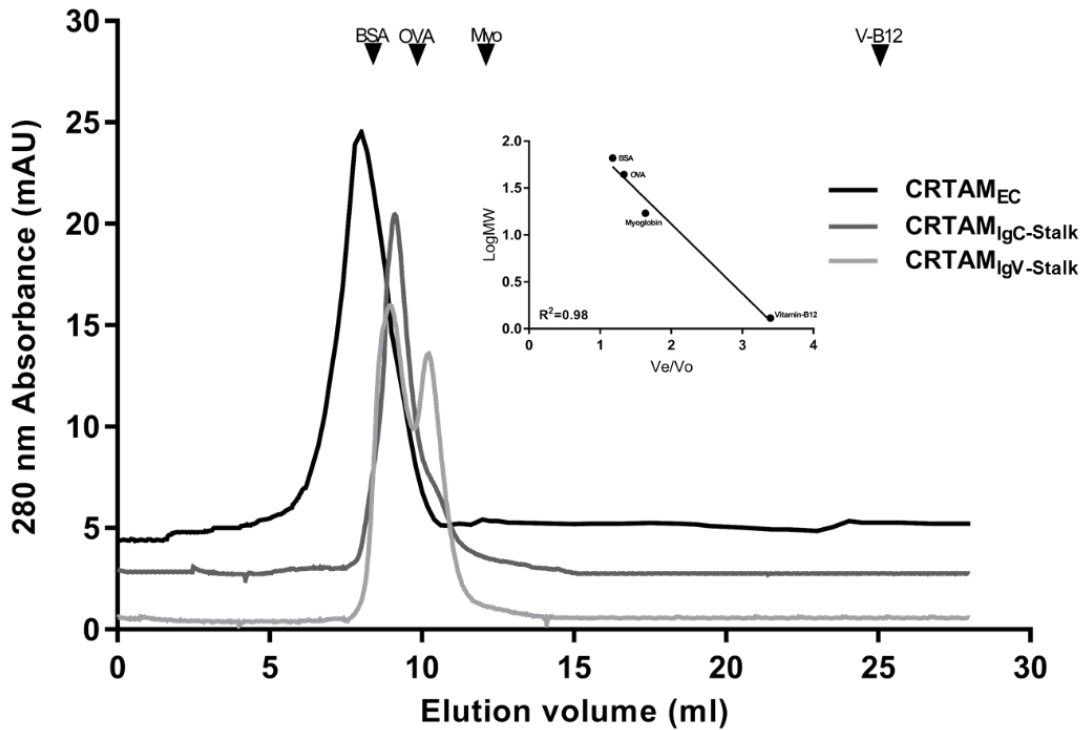


Figura 22. Los dominios extracelulares de CRTAM forman dímeros en solución. Cromatograma de las proteínas recombinantes de CRTAM separadas en una columna de exclusión molecular Superdex-75. La curva de calibración de la columna se muestra en el panel. Las recombinantes CRTAM_{EC}, CRTAM_{IgC-Stalk}, CRTAM_{IgV-Stalk} se separaron a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. Las cabezas de flecha señalan los marcadores moleculares.

El dominio constante de CRTAM participa en la interacción con Necl2

Resultados publicados señalan que el dominio variable de CRTAM interactúa con el dominio variable Necl2 con una constante de afinidad de $12.5 \times 10^{-6} \text{M}$ ($12.5 \mu\text{M}$), es decir, se trata de una interacción débil cuando se compara con otras afinidades reportadas para miembros de la familia de Nectinas y Nectin-like, que ubican en el orden nanomolar ($1 \times 10^{-9} \text{M}$) (Figura 5). Por lo tanto, evaluamos si el dominio constante de CRTAM podría estar jugando un papel en la interacción y afinidad con el ligando Necl2. Para ello, la recombinante Necl2_{EC} fue inmovilizada covalentemente a un Chip CM5 a 1500 unidades de respuesta (RU), al que se hizo pasar un gradiente de concentración de la recombinante CRTAM_{EC} desde 0.3125 hasta $0.0095 \mu\text{M}$. En la Figura 23, se muestra el sensograma con una

respuesta de hasta 1300 RU para la concentración mayor que va disminuyendo de acuerdo a las diluciones. La cinéticas obtenidas para los dos dominios extracelulares de CRTAM permitió determinar una afinidad de interacción de $K_D=2.6 \times 10^{-9}$ M (2.6 nM), una asociación de $K_{on}=6.04 \times 10^4/M^{-1}s^{-1}$ y una disociación $K_{off}=1.30 \times 10^{-4}s^{-1}$ (Figura 23A). Por otro lado, la cinética usando solamente el dominio variable (CRTAM_{IgV-stalk}), mostró una asociación rápida pero también una disociación rápida, pudiéndose calcular una constante de afinidad de $K_D=0.971 \times 10^{-6}$ M (0.9 μ M), una asociación $K_{on}=5.76 \times 10^2/M^{-1}s^{-1}$ y una disociación de $K_{off}=5.6 \times 10^{-4}s^{-1}$ (Figura 23B). La cinética usando únicamente el dominio constante (CRTAM_{IgC-stalk}), evidenció una clara asociación, la cual cae rápidamente en la etapa de disociación, demostrando que el dominio constante de CRTAM interacciona débilmente con Necl2EC (Figura 23C), sin embargo, no se pudo determinar la afinidad usando el modelo Langmuir de unión 1:1.

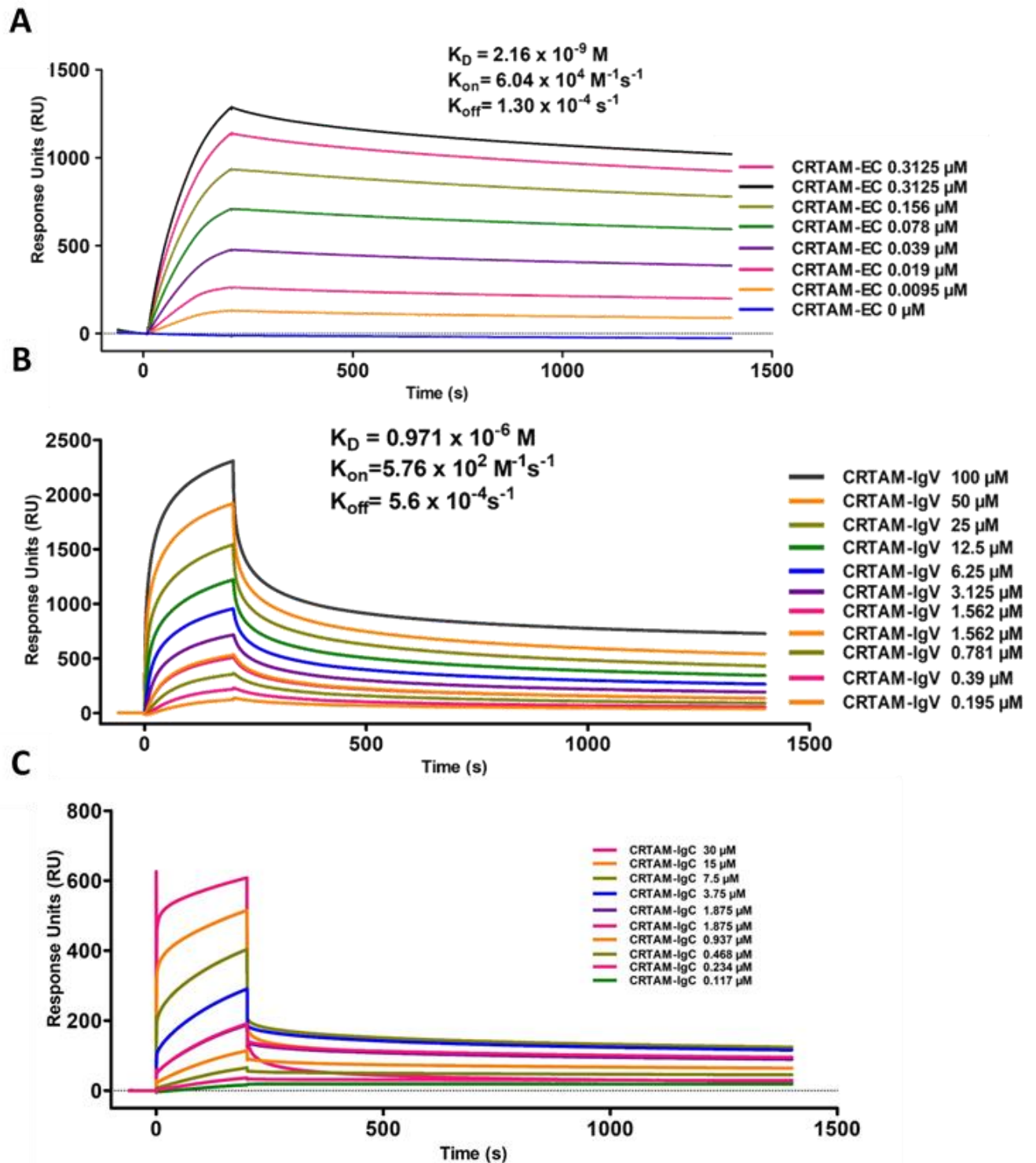


Figura 23. La interacción de alta afinidad de CRTAM con Necl2 requiere de la participación tanto del dominio variable como del dominio constante de CRTAM. Análisis de resonancia de plasmones de superficie (SPR) donde diluciones seriadas de las recombinantes CRTAMEC (A), CRTAM-IgV (B), y CRTAM-IgC (C) fueron inyectadas a un chip que lleva inmovilizado Necl2EC. Las concentraciones señalan las concentraciones de las recombinantes empleadas.

Construcciones de proteínas quiméricas CRTAM-Ypet, CRTAM-Cypet y Necl2-Ypet.

El hallazgo de que la región extracelular de CRTAM forma dímeros en solución y que además el dominio constante puede interactuar con el ligando Necl2, nos sugiere que, en la superficie celular, CRTAM pudiera establecer interacciones laterales (cis) y formar agrupamientos (*clusters*). Para abordar ese aspecto, se diseñaron genes quiméricos que codificaran a CRTAM fusionada a las proteínas Ypet, o a la proteína Cypet. La proteína Ypet (*Yellow protein for energy transfer*) es un derivado de la proteína YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) y Cypet (*Cyan protein for energy transfer*) es derivado de la proteína CFP (*Cyan Fluorescent Protein*), ambas proteínas fueron optimizados para dar una señal más grande en ensayos FRET (*Förster resonance energy transfer*) (Nguyen & Daugherty, 2005). De esta manera, la interacción de proteínas en la superficie celular o en el medio intracelular pueden ser detectadas.

Para obtener las proteínas quiméricas se usó un método de clonación denominado ensamble de Gibson por su nombre en inglés: “*Gibson’s Assembly*” (Gibson et al., 2009) usando el sistema comercial de NEBAsembly (NEB). Para ello, el marco abierto de lectura completo de *Crtam* se ligó en el plásmido pUB6V5-His A linearizado con KpnI y XhoI (Figura 24A). Al cDNA de CRTAM se le eliminó la secuencia que codifica al motivo ESIV en el extremo 3’ y se agregó una secuencia nucleotídica que codifica a un conector (*linker*) de 8 aminoácidos, LAAALAAA (LAAAx2). Este espaciador es requerido para optimizar la movilidad de las proteínas fusionadas a Ypet y Cypet (Malik-Chaudhry, Saavedra, & Liao, 2014), como resultado se obtuvo un gen de 1.3 kb (Figura 24B-C, panel izquierdo). Por otro lado, a los amplicones de 0.7kb de Ypet y Cypet se les agregó en su extremo 5’ la secuencia del linker (LAAA)x2 para que los genes de *Crtam* y Ypet/Cypet puedan hibridar con el método de ensamble de Gibson (Esquema de la Figura 23B-C). Con el producto de la ligación se transformó *E. coli* Top10 y las clonas positivas con los genes fusionados se detectaron por PCR de colonia, y se observaron los amplificadores esperados de 2kb (Figura 23B-C, panel derecho).

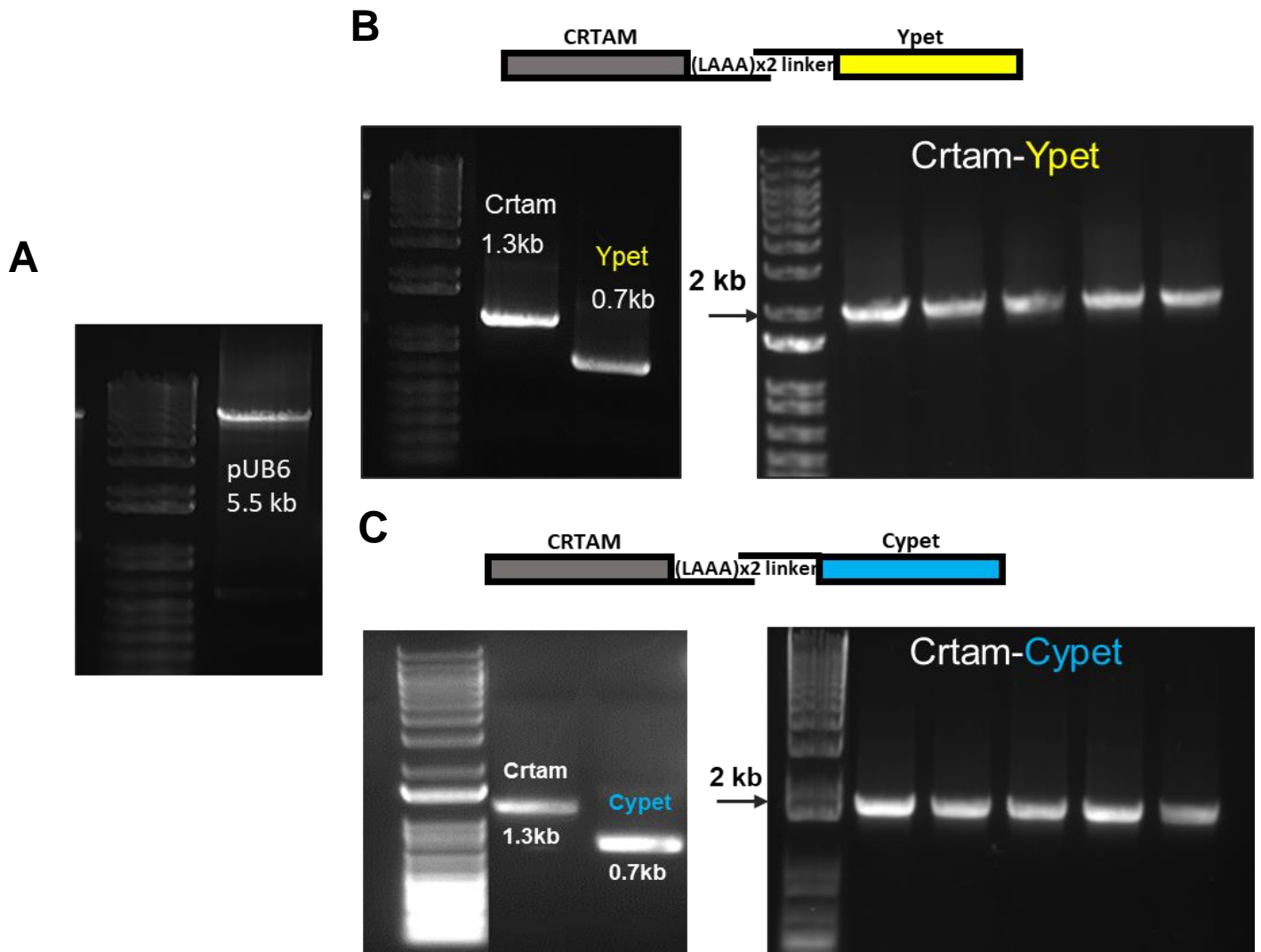


Figura 24. Generación de genes quiméricos de CRTAM con las proteínas fluorescentes Ypet y Cypet. **A)** vector pUB6V5/His-A digerido con KpnI y XhoI. **B)** parte superior, esquema de los genes a fusionar que llevan el fragmento linker. Abajo geles que muestran los amplificados de los Crtam y Ypet (panel izquierdo) y de los productos de PCR de colonia de los plásmidos clonados con la fusión de genes Crtam-Ypet (panel derecho). **C)** esquema de los genes a fusionar que llevan el fragmento linker, y geles que muestran los amplificados de los genes Crtam y Cypet (panel izquierdo) y los productos de PCR de colonia de los plásmidos clonados con la fusión de los genes Crtam-Cypet.

Una vez obtenida los genes quiméricos Crtam-Ypet y Crtam-Cypet, se procedió a eliminar el dominio variable y constante de CRTAM en la construcción Crtam-Ypet. Para ello se usó el método de mutagénesis de sitio dirigida por PCR y para eliminar el dominio constante fue necesario usar el oligonucleótido reverso que reconoce el extremo 5' del dominio variable y otro que reconoce el extremo 3' de la región tallo (tabla III del anexo III), con el fin de poder reamplificar al gen carente del dominio seleccionado (ejemplificado en el esquema de la figura 25 A). La misma estrategia se usó para eliminar el dominio variable o ambos dominios (ver esquema Figura 25 B y C). Mediante PCR se confirmó la obtención de los genes mutantes, donde los amplicones de ~1kb corresponden a la eliminación de la secuencia del dominio variable o constante, y los amplicones de 0.7 kb son el resultado de haber eliminado ambos dominios (Figura 25 A, B y C).

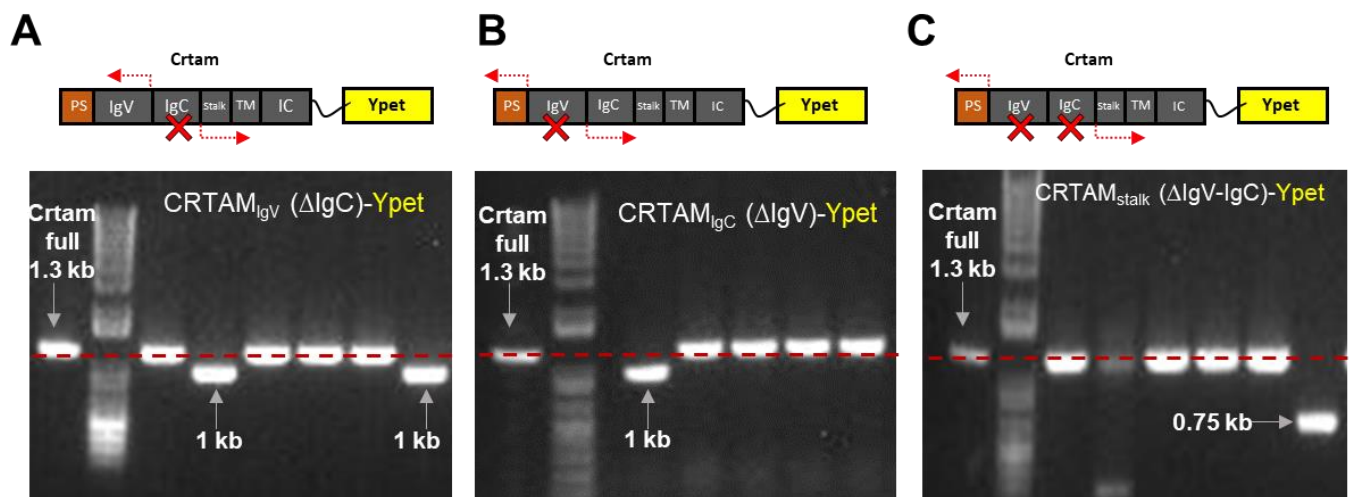


Figura 25. Generación de los genes carentes de de los dominios IgV o IgC en los genes quiméricos de Crtam-Ypet. El gen quimérico de Crtam-Ypet fue sometido a mutagénesis dirigida por PCR para la delección del dominio constante (A), del dominio variable (B) y de ambos dominios (C). El primer carril de los paneles A, B y C se muestra el producto de PCR que corresponde a Crtam completo. En flechas grises se indican los amplicados y sus pesos moleculares, en la parte superior de cada panel se muestra un esquema del gen quimérico de Crtam donde "PS" es péptido señal; "IgV" es dominio variable; "IgC" es el dominio constante; "Stalk" es la región tallo; "TM" es región transmembranal e "IC" es la región intracelular. En el esquema también se muestra con una X roja los dominios eliminados y con flechas rojas de oligonucleótidos usados para amplificar cada región.

También se generó el gen quimérico Necl2 fusionado a Ypet, para ello, se amplificó el marco abierto de lectura de Necl2 agregando en el extremo 3' la secuencia nucleotídica que codifica al conector LAAALAAA, que tiene un tamaño de 1.4 kb (Figura 26 panel izquierdo) el cual se fusiono con el gen de Ypet con una secuencia que codifica al conector en el 5'. Las clonas positivas fueron confirmadas por PCR de colonia donde la presencia de amplicones de 2kb indican la fusión de Necl2-Ypet (Figura 26, panel derecho).

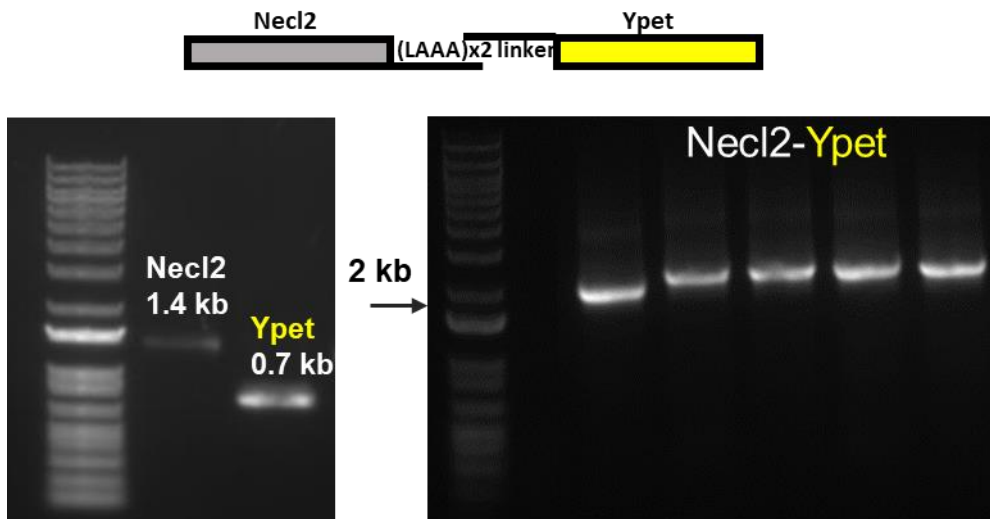


Figura 26. Generación del gen quimérico de Necl2 con la proteína fluorescente Ypet. Geles que muestran los fragmentos de amplificación de Necl2 y Ypet (panel izquierdo); y de los productos de PCR de colonia de la fusión de genes (panel derecho). El esquema muestra los genes que llevan el fragmento del conector.

Expresión de genes los genes quiméricos de CRTAM-Ypet/Cypet y Necl2-Ypet

Para comprobar que los genes quiméricos CRTAM-Ypet/Cypet y Necl2-Ypet se expresaban en células eucariotas, se transfectó la línea celular de fibroblasto Cos7, usando liposomas catiónicos (Lipofectamine™ 2000, Thermo Fisher). El análisis realizado mediante microscopía confocal se puede apreciar en la Figura 27A. Las construcciones quiméricas CRTAM-Ypet y Necl2-Ypet se expresan principalmente en el citoplasma, posiblemente en vesículas donde se notan regiones de diferentes tamaños que emiten fluorescencia amarilla, y lo más importante, también se observan en los bordes y en las extensiones de la membrana plasmática. En las células transfectadas con la construcción Necl2-Ypet, es más evidentemente su expresión en las conexiones con la célula vecina (flechas grises, figura 27A). De igual manera sucede con CRTAM-Cypet, donde la expresión es abundante en vesículas citoplasmáticas, como lo denotan los focos de fluorescencia color turquesa (Figura 27B, panel superior). Cabe aclarar que, para esta transfección, no se hizo tinción de núcleo, ya que el espectro de emisión de luz Hoetchs 33342 es muy cercana a CFP (452 y 475 nm respectivamente), por esto, se usó campo claro como referencia y no se aprecia CFP en núcleo. Por otro lado, se empleó el vector pLCMV:ECFP(loxp)EYFP, que coexpresa a las proteínas fluorescentes EYFP y ECFP (Addgene #31306) como control de transfección y expresión (Ryffel et al., 2003). En las células transfectadas con dicho vector se observa una distribución de las proteínas fluorescente principalmente en núcleo y citoplasma de la proteína (Figura 27B, panel inferior), corroborando que los sistemas de transfección y expresión son funcionales.

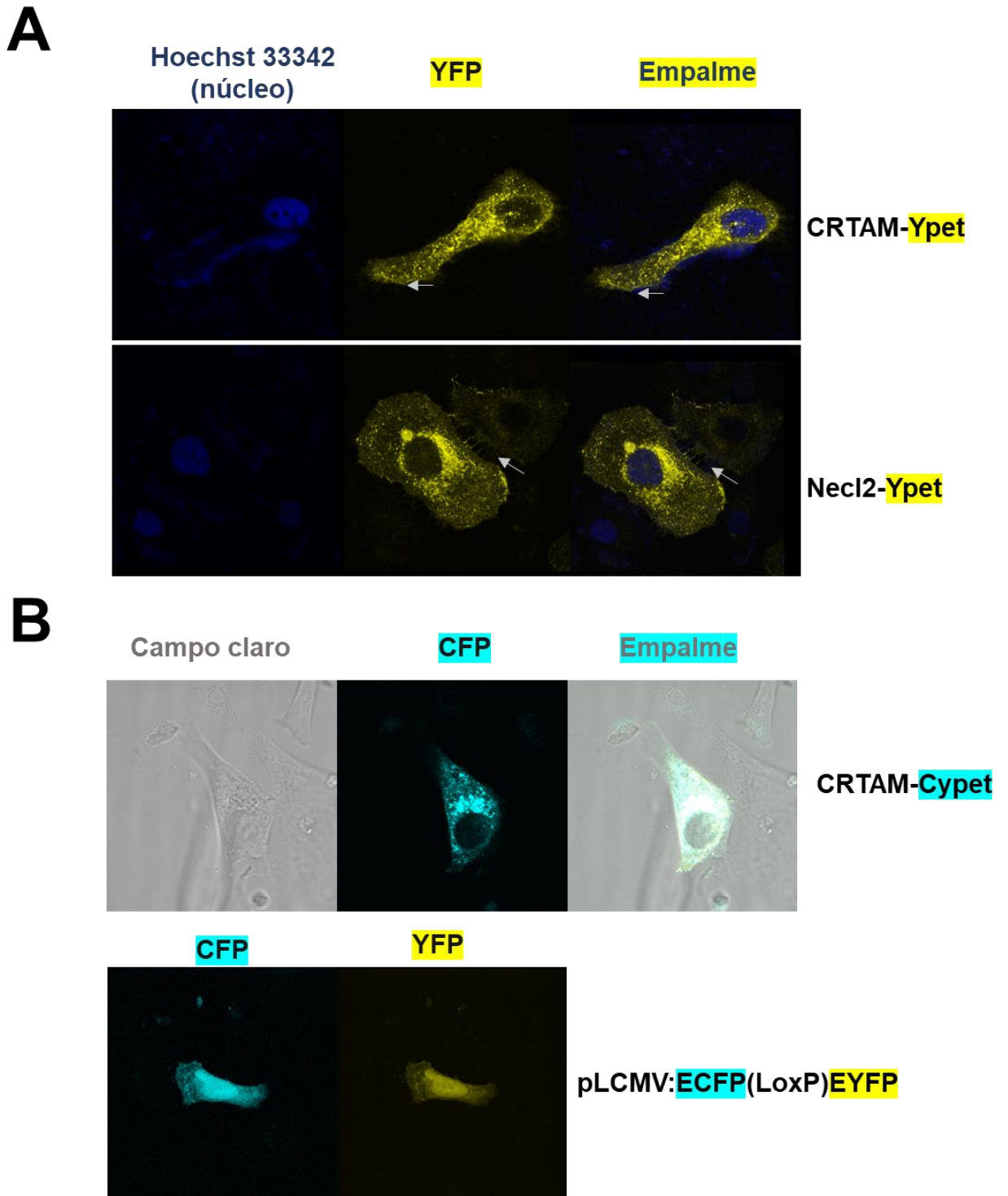


Figura 27. Patrón de expresión de CRTAM-Ypet, CRTAM-Cypet y Necl2-Ypet en Cos7. A) Expresión de las proteínas quiméricas CRTAM-YPET y Necl2-Ypet, a las 48h pos-transfección. El núcleo se tiñó con Hoechst 33342 (NucBlue™). **B)** Expresión de la proteínas quimérica CRTAM-Cypet y el plásmido control pLCMV:ECFP(LoxP)EYFP 48h pos-transfección. Las flechas grises denotan expresión en bordes y extensiones de la membrana de la célula. La emisión de luz de Hoechst 33342, ECFP y EYFP ocurre a 452, 475 y 530 nm respectivamente. Se muestra una columna de empalme de las emisiones de fluorescencia de EYFP y Hoechst.

De manera semejante a lo descrito para las construcciones de las proteínas completas, la expresión de las tres construcciones mutantes, llamadas CRTAM_{IgV}(Δ IgC)-Ypet, CRTAM_{IgC}(Δ IgV)-Ypet y CRTAM_{Stalk}(Δ IgV-IgC)-Ypet se evaluó en células Cos7 transfectadas con cada uno de los genes quiméricos. Se observó un patrón de expresión similar a CRTAM-Ypet, localizándose principalmente en vesículas citoplasmáticas y en bordes y extensiones de membrana plasmática (Flechas grises, figura 28).

Debido a que CRTAM es una molécula que se expresa en linfocitos T, las construcciones también fueron transfectadas en la línea celular Jurkat. De igual manera, la transfección se llevó a cabo usando liposomas catiónicos 1:1 con las siguientes construcciones: CRTAM-Ypet, CRTAM_{IgV}(Δ IgC)-Ypet, CRTAM_{IgC}(Δ IgV)-Ypet y CRTAM_{Stalk}(Δ IgV-IgC)-Ypet. A pesar de que la eficiencia de transfección fue del 20%, fue suficiente para poder analizar el patrón de expresión. En la Figura 29 se muestran los patrones de expresión, que son muy parecidos a los observados en células Cos7 (Figura 27 y 28), es decir, se observó que las proteínas se localizan en vesículas citoplasmáticas y además hay emisión de fluorescencia debida a Ypet en las prolongaciones de membrana o vellosidades en la superficie de Jurkat. Estos resultados demuestran que, conforme a lo esperado, las moléculas quiméricas son transportadas a la superficie celular. La presencia de proteínas en vesículas podría deberse a una expresión abundante que hace que queden retenidas en tráfico vesicular hacia la superficie.

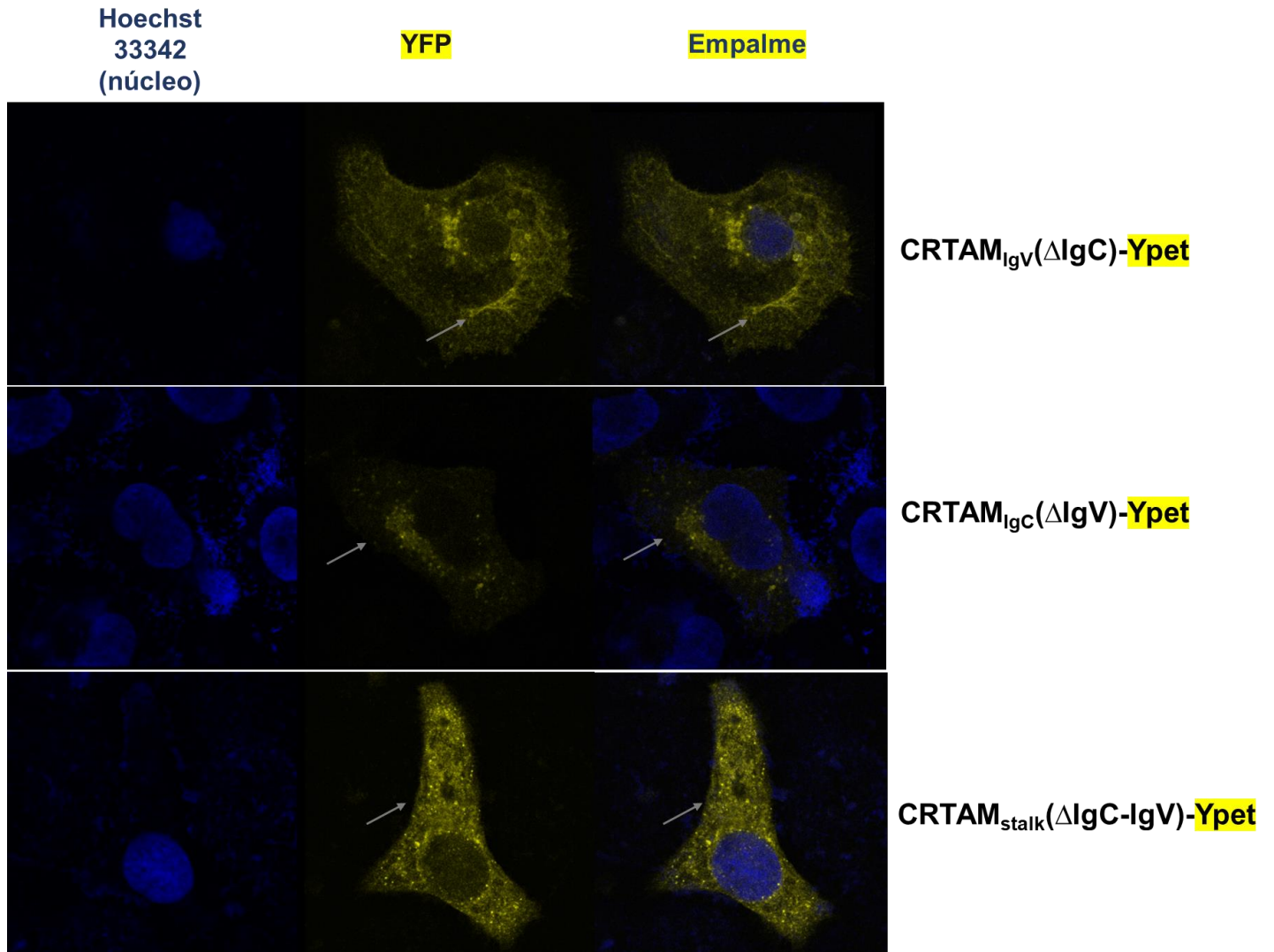


Figura 28. Patrón de expresión de las mutantes CRTAM_{IgV}-Ypet, CRTAM_{IgC}-Ypet y CRTAM_{stalk}-Ypet en Cos7. Las proteínas mutantes con delección en los dominios IgV y IgC del gen quimérico CRTAM-Ypet, fueron analizadas 48 h pos-transfección. Flechas grises denotan expresión en bordes y extensiones de la membrana de la célula. La misión de luz de Hoechst 33342, y EYFP ocurre 452, y 530 nm respectivamente. La tercera columna muestra los empalmes de las emisiones de fluorescencia de EYFP y Hoechst.

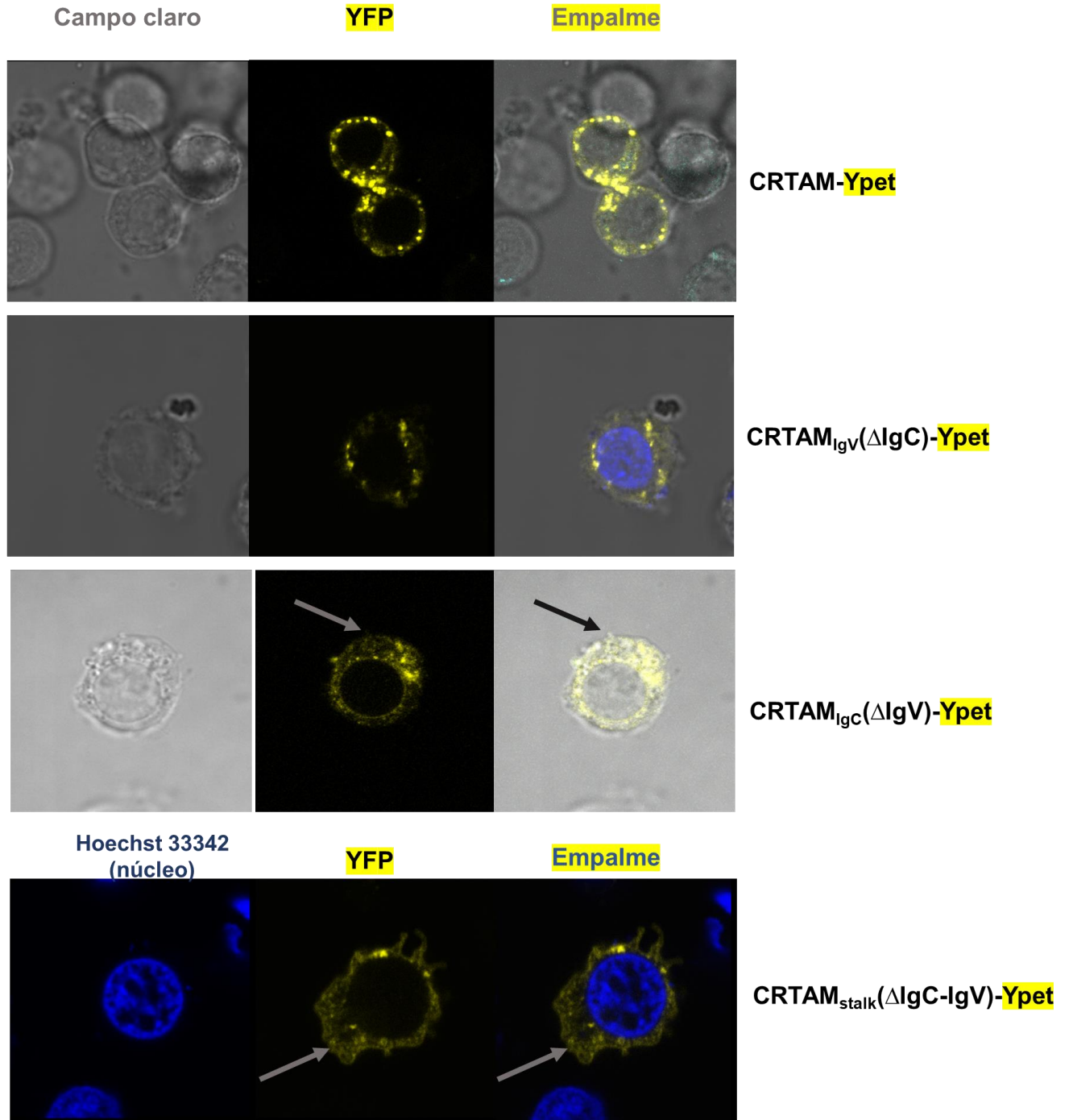


Figura 29. Patrón de expresión de las construcciones quiméricas de CRTAM-Ypet en Jurkat. La expresión de CRTAM-Ypet, CRTAM_{I_{gV}}(ΔI_{gC})-Ypet, CRTAM_{I_{gC}}(ΔI_{gV})-Ypet y CRTAM_{stalk}(ΔI_{gC}-I_{gV})-Ypet, fueron analizadas 48 h postransfección. Flechas grises denotan expresión en bordes y extensiones de la membrana celular. La emisión de luz de Hoechst 33342, y EYFP es de 452, y 530 nm respectivamente. La tercera columna muestra el empalme de las emisiones de fluorescencia de EYFP y Hoechst/campo claro.

Coexpresión de CRTAM-Cypet y CRTAM-Ypet en la superficie celular.

Ya que uno de los objetivos a futuro es determinar si existe interacción entre moléculas CRTAM en la membrana plasmática usando el sistema de FRET; se optimizó la doble transfección celular para lograr la co-expresión de las construcciones quiméricas CRTAM-Ypet y CRTAM-Cypet. Para ello, se transfectó con liposomas catiónicos a la línea de fibroblasto de ratón 3T3 con los dos plásmidos pUB6V5/His que contienen a CRTAM-Ypet y CRTAM-Cypet. Cuarenta y ocho horas postransfección se analizó por microscopia confocal la emisión de fluorescencia; en la figura 30A se muestran dos ejemplos de co-expresión. De igual manera a lo observado en células transfectadas independientemente con cada uno de los genes, se detecta la presencia de proteínas en vesículas (puntos amarillos y turquesa) así como en la superficie celular (flechas grises) (ver panel superior de la figura 30A). Para estos experimentos, se usaron como controles los plásmidos pCypetN1 y pYpetN1 que expresan a las proteínas fluorescentes Ypet y Cypet respectivamente; y siguiendo la misma estrategia que las construcciones quiméricas, combinando ambos plásmidos en la transfección. Se observó presencia de dichas proteínas tanto en el citoplasma como en el núcleo, pero no en vesículas, a diferencia de las construcciones de CRTAM (Figura 30 B). De igual manera se hicieron combinaciones del plásmido CRTAM-Cypet con las construcciones mutantes CRTAM_{IgV}(Δ IgC)-Ypet, CRTAM_{IgC} (Δ IgV)-Ypet ó CRTAM_{stalk}(Δ IgV-IgC)-Ypet; y como se esperaba la co-expresión de ambas construcciones se observan en superficie donde se empalma las fluorescencias de Ypet y Cypet (Figura 31, flechas grises).

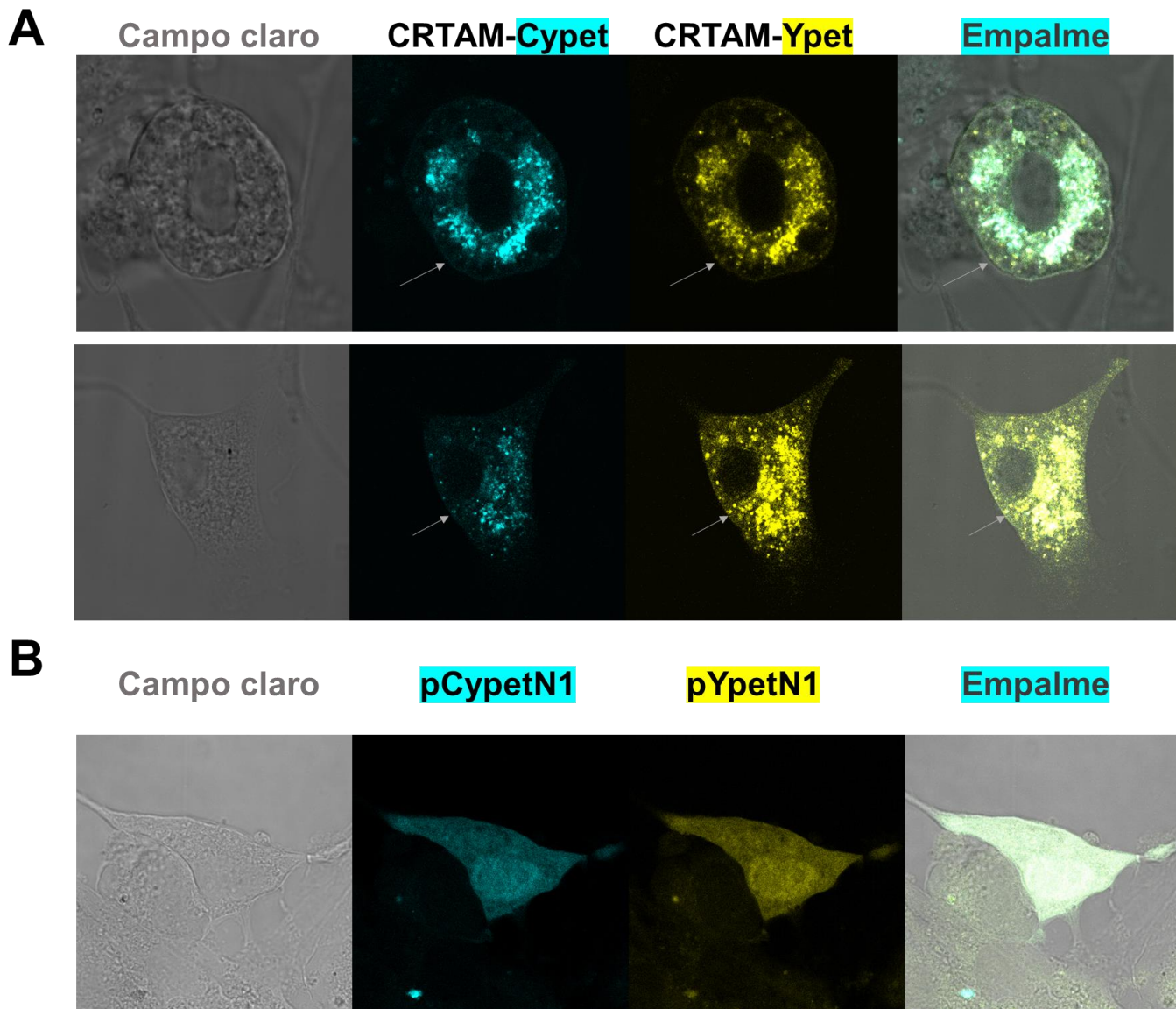


Figura 30. Patrón de co-expresión de CRTAM-Cypet y CRTAM-Ypet en 3T3. A) dos ejemplos de doble transfección celular con los plásmidos de CRTAM-Cypet y Ypet, usando liposomas catiónicos y visualizadas 48 h postransfección. B) como control de la doble transfección, se transfectaron los plásmidos pCypetN1 y pYpetN1 de la misma manera que en A. Flechas grises en A señalan expresión en los bordes de la célula. La emisión de luz ECFP y EYFP ocurre a 475 y 530 nm respectivamente. La tercera columna muestra los empalmes de las emisiones de fluorescencia de ECFP, EYFP y campo claro.

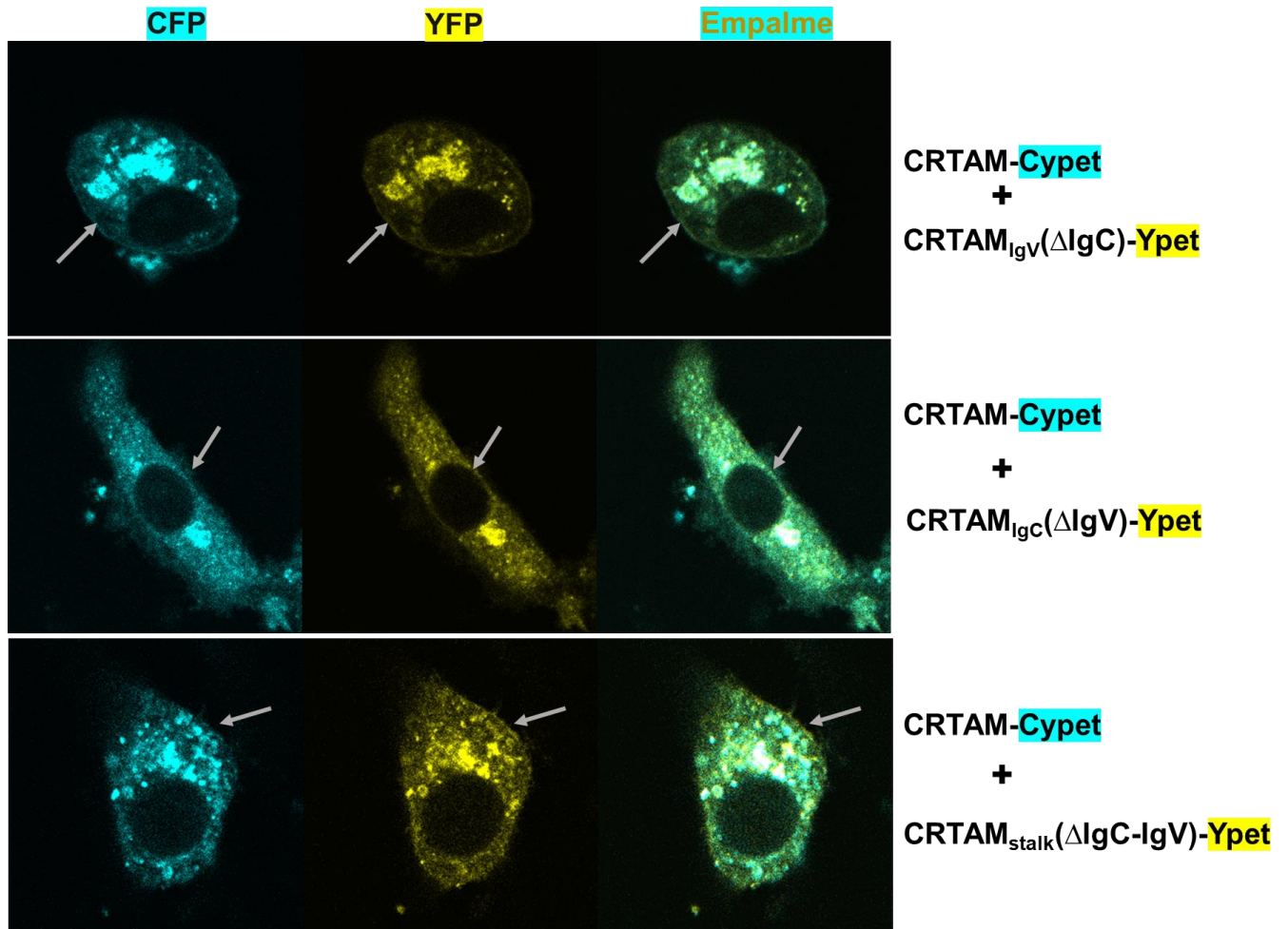


Figura 31. Patrón de co-expresión de CRTAM-Cypet y mutantes de CRTAM fusionados a Ypet en 3T3. Cotransfección de la construcción CRTAM-Cypet con CRTAM_{I_{gV}}(ΔI_{gC})-Ypet, CRTAM_{I_{gC}}(ΔI_{gV})-Ypet ó CRTAM_{stalk}(ΔI_{gC}-I_{gV})-Ypet, usando liposomas catiónicos. El análisis se realizó a 48 h posttransfección las células fueron cosechadas y preparadas para visualizarlo por microscopía confocal. Las flechas grises señalan expresión en los bordes de la célula. La emisión de luz ECFP y EYFP ocurre 475 y 530 nm respectivamente. La tercera columna muestra los empalmes de ambas emisiones.

Interacciones Heterofílicas y homofílicas de CRTAM y Necl2

CRTAM expresada en la superficie celular puede establecer interacciones homofílicas, es decir entre la misma molécula localizada en la superficie de células vecinas, pero también heterofílicas con su ligando Necl2. Para poder evidenciar esos tipos de uniones, se co-cultivaron células 3T3, unas expresaban CRTAM-Cypet y otras Necl2-Ypet. Como se observa en la figura 32A y 32B, existe empalme en la fluorescencia de las células 3T3-Necl2-Ypet (fluorescencia amarilla) con otra célula 3T3-CRTAM-Cypet (fluorescencia turquesa).

Para explorar si también células de distinto linaje podían establecer interacciones, se co-cultivaron, células Cos7 que expresaban Necl2-Ypet y células Jurkat que expresaban CRTAM-Ypet. Entre las células Cos7 y Jurkat se observa un borde de interacción fluorescente (señalados con flecha punteada roja) que podría corresponder a la interacción de CRTAM-Ypet con Necl2-Ypet (Figura 33A). Como control negativo de este experimento se empleó Jurkat transfectada con el plásmido pYpetN1 que solo expresa a la proteína Ypet y a Cos7 transfectando con la construcción Necl2-Ypet, donde a pesar de la cercanía entre ambas células, no parece establecerse una interacción (Figura 33B). Este control sugiere que interacciones observadas no se debe a simple adhesión entre células debido a su cercanía.

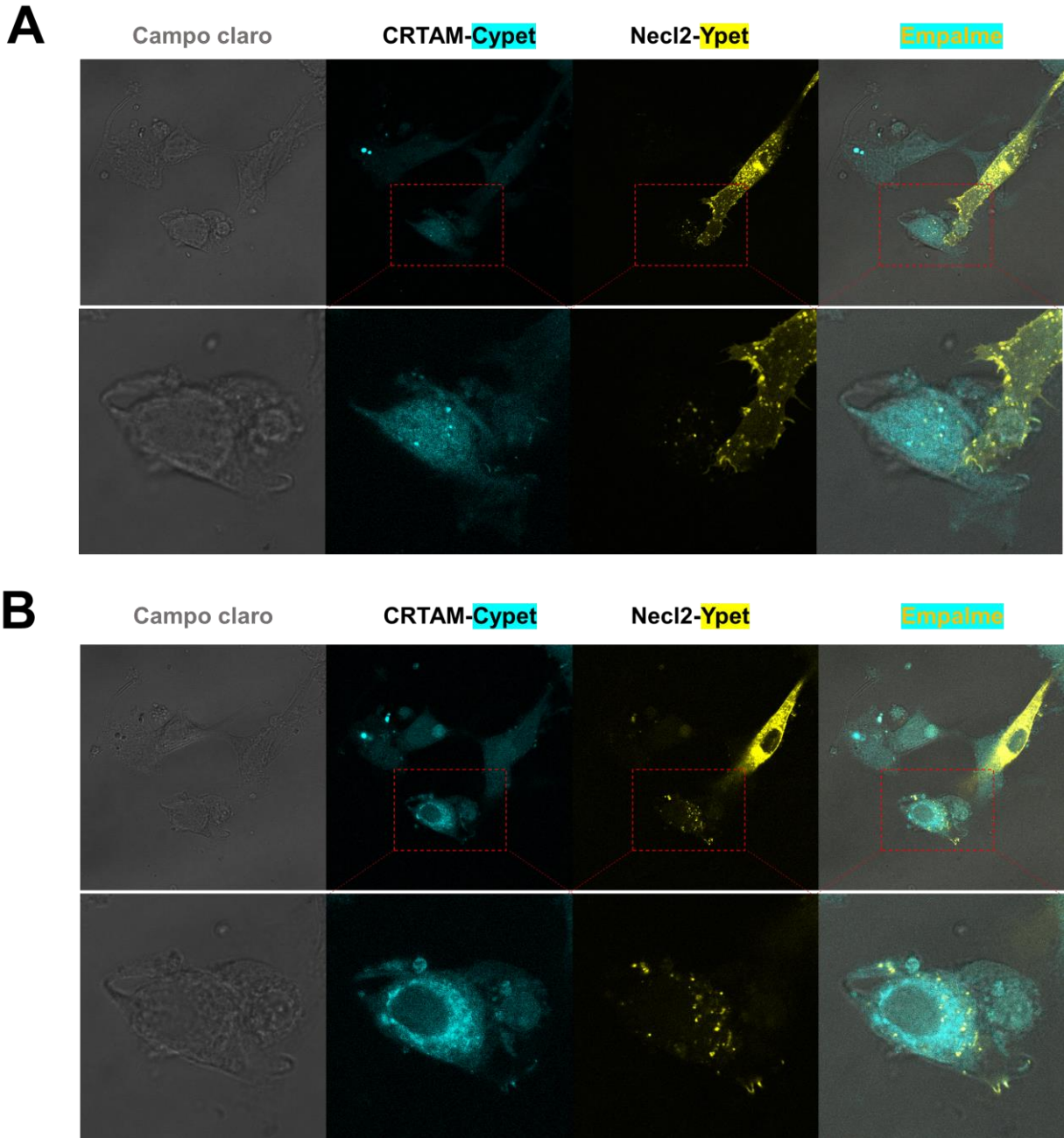


Figura 32. Patrón de interacción heterofílica CRTAM-Necl2. A) interacción vista desde la parte superior de dos células 3T3 expresando CRTAM-Cypet (Cian) y Necl2-Ypet(amarillo), la interacción es marcada en rectángulo rojo en panel superior y haciendo una ampliación mostrado en el panel inferior. B) interacción desde vista inferior de dos células 3T3 expresando CRTAM-Cypet (Cian) y Necl2-Ypet(amarillo), la interacción es marcada en rectángulo rojo en panel superior y haciendo una ampliación mostrado en el panel inferior. Imágenes tomadas por microscopia confocal donde una columna en el extremo derecho muestra el empalme de ambas fluorescencias de CFP y YFP.

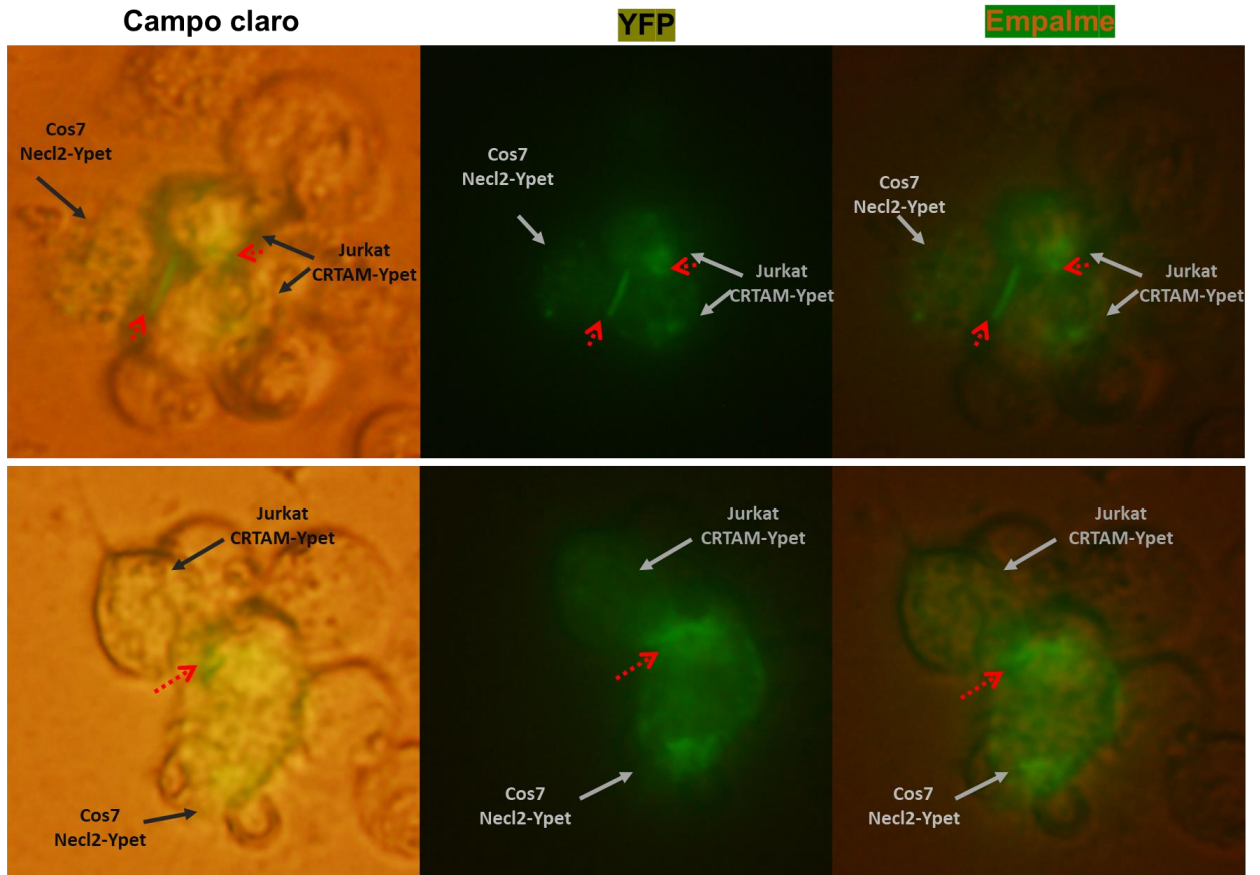
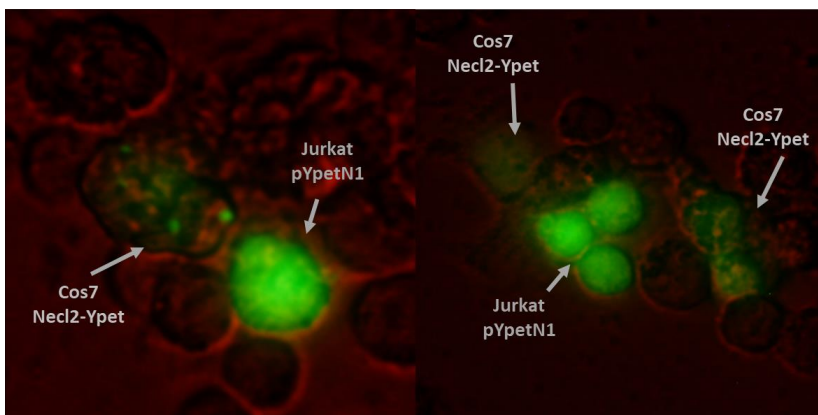
A**B**

Figura 33. Interacciones heterotípicas entre-Necl2 y Crtam. A) dos ejemplos (panel superior e inferior) de interacciones entre Cos7 expresando Necl2-Ypet y Jurkat expresando CRTAM-Ypet, las células fueron cultivadas juntas por 24 h p. B) control de interacción células Jurkat transfectadas con el plásmido pYpetN1 fueron cultivadas juntas con células Cos7-Necl2-Ypet. Todas las imágenes fueron tomadas por microscopio de epifluorescencia directo de la caja de cultivo con células vivas. Las flechas grises señalan la línea celular Jurkat o Cos7 transfectadas emitiendo fluorescencia. Flechas rojas con línea punteada muestra el área de interacción entre células.

También se observaron interacciones homofílicas de CRTAM-CRTAM y Necl2-Necl2. Dos ejemplos de interacción CRTAM-CRTAM se muestra en las imágenes de microscopía confocal en los dos paneles de la figura 34A, donde dos células Cos7 interactúan a través de extensiones de sus membranas, en las cuales es evidente la expresión de CRTAM-Ypet sobre estas prolongaciones.

Observaciones de microscopía de epifluorescencia de cultivos de células Cos7 y Jurkat que transfectadas con CRTAM-Ypet pero no fueron fijadas, denotan la presencia de bordes fluorescente de interacción entre dos Cos7-CRTAM-Ypet (Figura 34B, panel superior) y dos Jurkat-CRTAM-Ypet (Panel inferior). Por otro lado, la presencia de bordes fluorescentes entre células sugiere que hay interacciones homofílicas de Necl2-Necl2 tanto en células Cos7 que expresan Necl2-Ypet (Figura 35A), como en células vivas de cultivos de Jurkat expresando la misma construcción (Figura 35B).

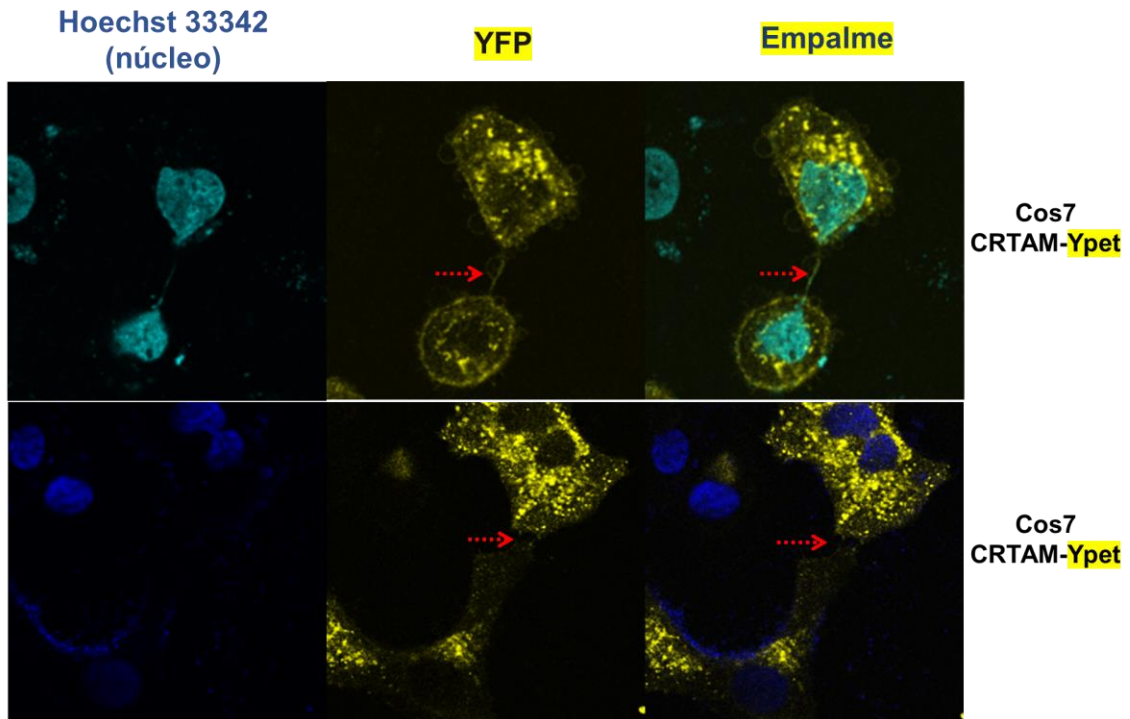
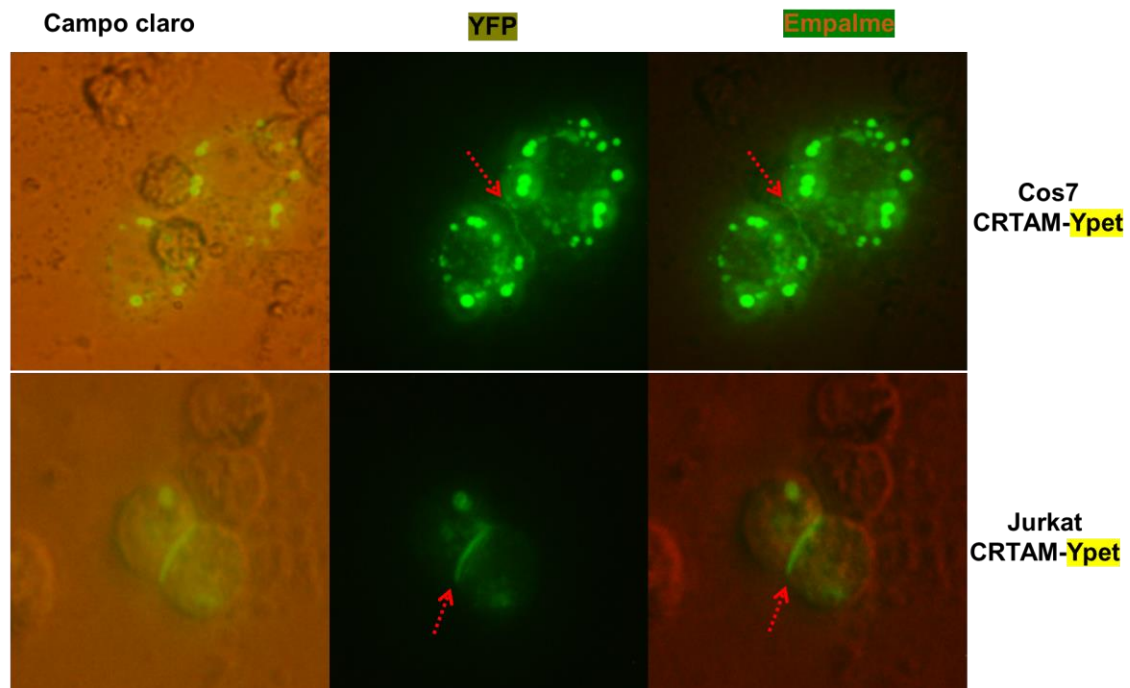
A**B**

Figura 34. Interacciones homofílicas CRTAM-CRTAM. A) dos ejemplos de interacción entre dos células Cos7 expresando CRTAM-Ypet captadas por microscopía confocal. **B)** dos ejemplos de interacción entre Cos7 expresando CRTAM-Ypet (panel superior) y entre dos células Jurkat expresando CRTAM-Ypet (panel inferior); interacciones observadas bajo microscopio de epifluorescencia con células vivas. Flechas rojas con línea punteada señalan los sitios de interacción entre células.

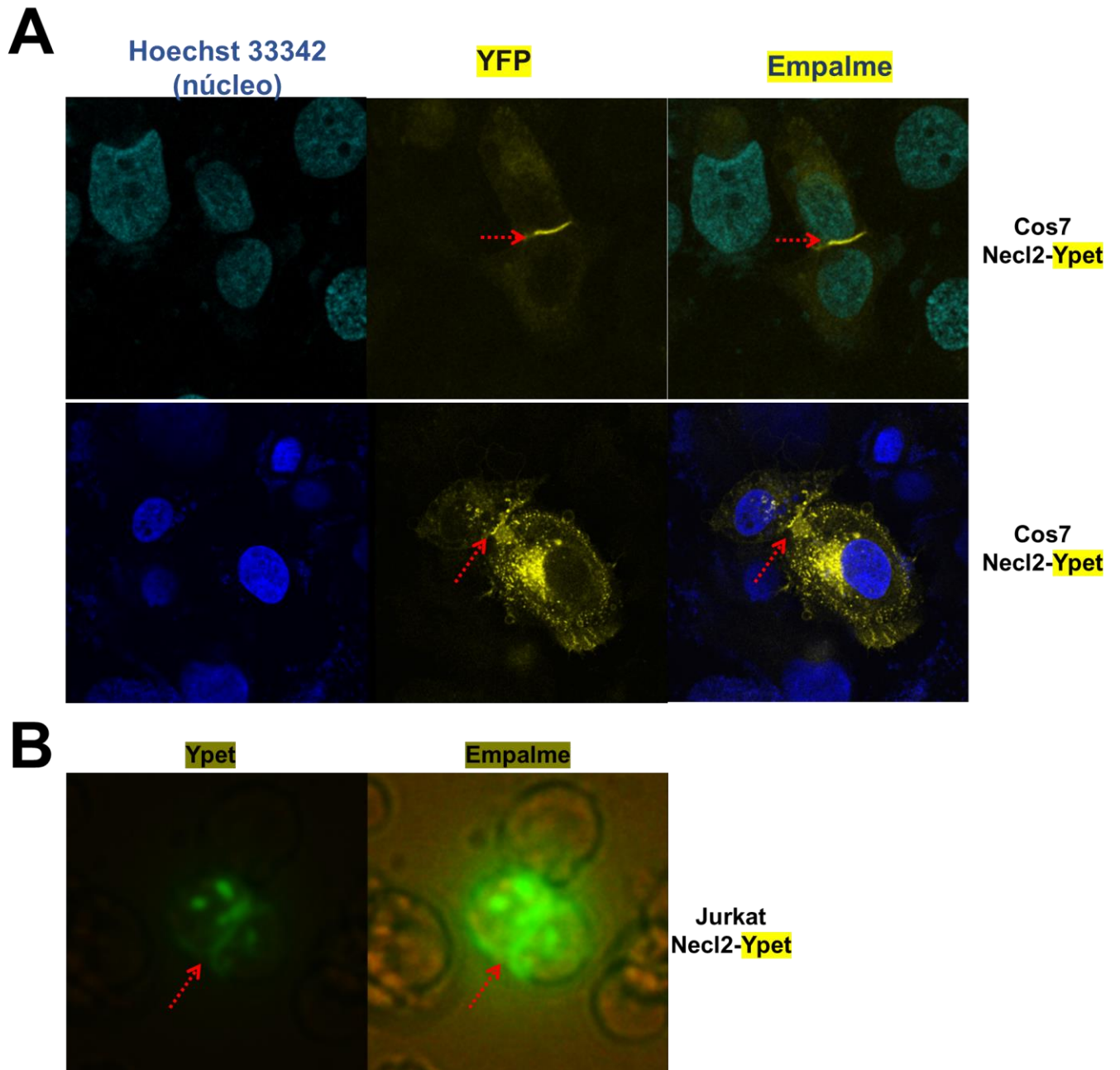


Figura 35. Interacciones homofílicas Necl2-Necl2. A) dos ejemplos de interacción entre dos células Cos7 expresando Necl2-Ypet captadas por microscopía confocal. **B)** interacción entre dos células Jurkat expresando Necl2-Ypet, observadas bajo microscopio de epifluorescencia con células vivas (no fijadas). Flechas rojas con línea punteada señalan los sitios de interacción entre células.

El dominio constante IgC de CRTAM es importante para la interacción CRTAM-Nectin2.

Con la finalidad de determinar la participación del dominio constante de CRTAM en la unión a su ligando Nectin2 y para conocer además si esta proteína también participa en la agregación celular; se transfectó líneas celulares Cos7 transfectada con Nectin2-Ypet y células Jurkat con CRTAM_{IgC} (Δ IgV)-Ypet. Las células se cocultivarán durante 24 h, con la finalidad de favorecer las interacciones célula-célula. En las imágenes de microscopía de epifluorescencia, se observó un borde intenso fluorescente entre ambas células (Figura 36A). Por su parte, en la Figura 36B se observa un agregado de células Jurkat sobre células Cos7 adheridas al fondo del pozo con puntos intensos de fluorescencia, que interpretamos como una interacción del dominio constante de CRTAM con Nectin2 en células Cos7. Además, se observó un pequeño agregado de células Jurkat fluorescentes expresando CRTAM_{IgC}-(Δ IgV) en su superficie, sugiriendo que el dominio variable podría también participar en la interacción.

En la Figura 37A se muestra imágenes de células que expresan CRTAM_{IgV}(Δ IgC)-Ypet y en la Figura 37B células que solamente expresan el tallo de CRTAM sin sus dominios extracelulares. Aunque se puede observar a las células Jurkat en franca cercanía, no se observa un borde de fluorescencia como en las imágenes de la Figura 36, reforzando la idea de que para que se establezcan interacciones célula-célula a través de interacciones CRTAM-CRTAM y CRTAM-Nectin-like2, es fundamental la presencia del dominio constante IgC de CRTAM.

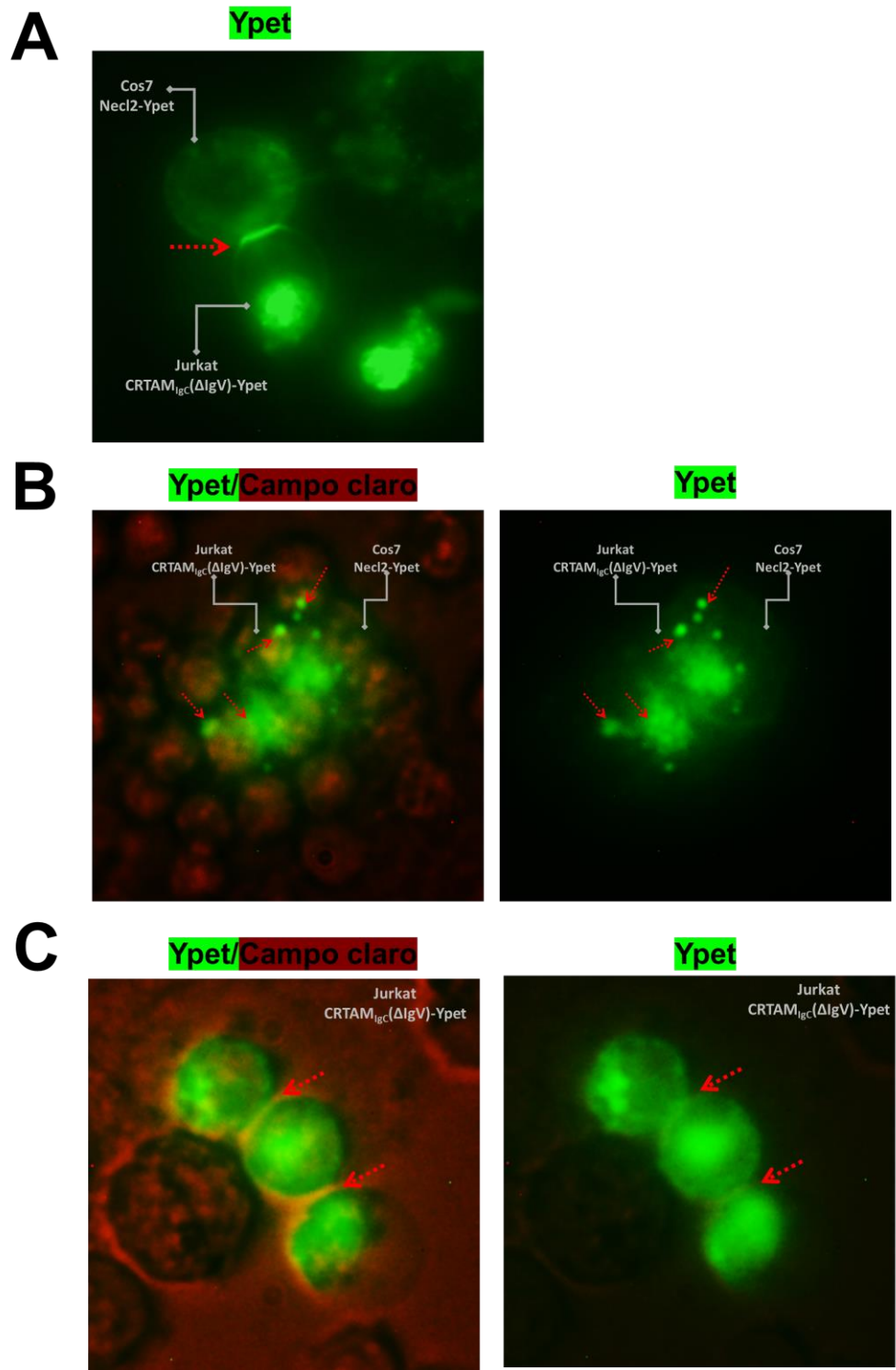


Figura 36. Interacción del dominio IgC de CRTAM con Necl2. **A)** interacción de una célula Cos7 expresando Necl2-yPET con una Jurkat expresando CRTAM_{IgC} (ΔIgV)-Ypet. **B)** interacciones en agregación celular de Cos7 expresando Necl2 con células Jurkat expresando CRTAM_{IgC} (ΔIgV)-Ypet. **C)** interacción de tres células Jurkat expresando CRTAM_{IgC} (ΔIgV)-Ypet. Todas las imágenes fueron tomadas con microscopio de epifluorescencia en el canal de GFP, directamente sobre células sin fijar. Flechas rojas con línea punteada señalan los sitios de interacción entre células

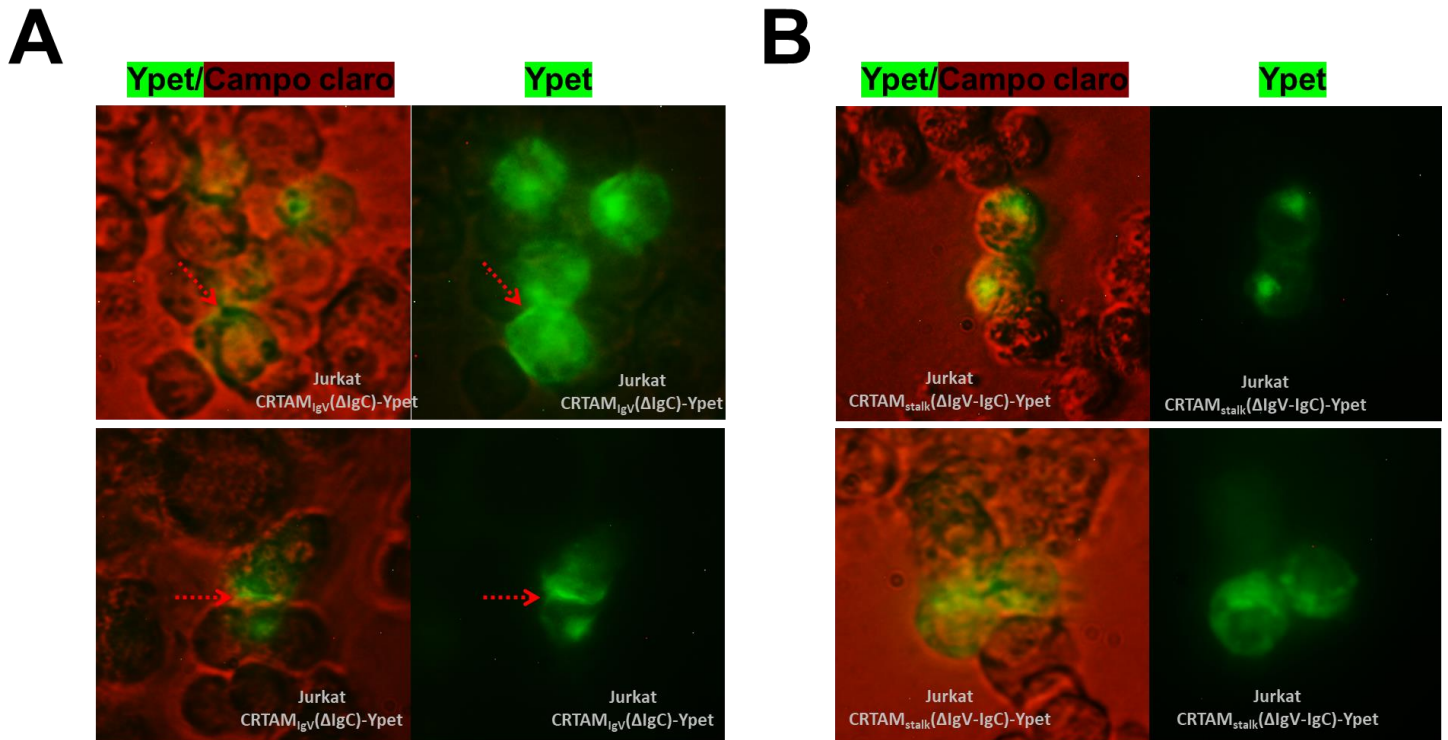


Figura 37. Interacción del dominio IgV en células Jurkat. A) dos ejemplos (panel superior e inferior) de interacciones de células Jurkat expresando CRTAM_{IgV}(ΔIgC)-Ypet. **B)** dos ejemplos (panel superior e inferior) del acercamiento de células Jurkat expresando CRTAM_{stalk}(ΔIgV-IgC)-Ypet. Flechas rojas señalan los sitios de interacción. Todas las imágenes fueron tomadas con microscopio de epifluorescencia en el canal de GFP, directamente sobre el cultivo celular vivo sin ser fijadas. Flechas rojas con línea punteadas señalan los sitios de interacción entre células

DISCUSIÓN

CRTAM fue inicialmente identificada en linfocitos T CD8 y células NKT activadas. Más adelante se observó que también se expresaban en una subpoblación de linfocitos CD4 activados, así como en neutrófilos y eosinófilos de pacientes con asma alérgica. Además, CRTAM se expresa constitutivamente en timocitos y en células epiteliales polarizadas. De acuerdo con análisis bioinformáticos, CRTAM pertenece a la familia de las proteínas semejantes a nectinas; a pesar de que, a diferencia de éstas, solamente posee dos dominios extracelulares de inmunoglobulina. Sin embargo, comparte con los miembros de esa familia, la presencia de un motivo de unión a dominios PDZ localizado en el carboxilo terminal. Otra característica distintiva de CRTAM, es la presencia de un tallo de 77 aminoácidos de longitud entre el dominio IgC y el inicio de su región transmembranal.

Un primer hallazgo del presente trabajo fue demostrar que la región tallo es importante para la expresión de CRTAM en un sistema bacteriano, esta región le confiere una mayor solubilidad a la proteína recombinante que lleva una etiqueta de histidinas, facilitando su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad. Es importante mencionar que los dominios de inmunoglobulina de CRTAM fueron clonados como proteínas de fusión a la proteína GST, y que a pesar de que éstas también contribuyeron a hacer que la proteína recombinante fuera más soluble, las proteínas recombinantes purificadas formaban agregados y se precipitaban. Asimismo, la fusión de CRTAM con la proteína tiorredoxina, la cual promueve la formación de puentes disulfuro intracatenarios, enlaces importantes para el buen plegamiento de muchas proteínas y en especial para los dominios de inmunoglobulina (Austin, 2003; Symersky et al., 2000; Thomson et al., 2012; Yasukawa et al., 1995), tampoco contribuyó a aumentar la solubilidad y plegamiento de la proteína, pero si a incrementar la producción de las recombinante. Al respecto, se ha reportado que la unión con la proteína gp5 endógena de *E. coli*, incrementa la procesividad de la T7 DNA polimerasa ((Bedford, Tabor, & Richardson, 1997; Ghosh, Hamdan, Cook, & Richardson,

2008; Tabor, Huber, & Richardson, 1987; Tran, Lee, Akabayov, Johnson, & Richardson, 2012) .

A pesar de que no hemos encontrado referencias de que la región tallo sea necesaria para la solubilidad de las proteínas recombinantes de la familia de las inmunoglobulinas, un aspecto a considerar es que de los 77 aminoácidos que lo constituyen, 46 son aminoácidos hidrofílicos que podrían contribuir a la solubilidad de las proteínas recombinantes de CRTAM. Una evidencia indirecta de la participación de estos residuos es que se han podido producir antisueros en conejo que reconocen el epítipo DKEEKE de la región tallo de la proteína CRTAM (Garay et al., 2010). Este resultado sugiere que dicho epítipo está expuesto al solvente y que probablemente el resto de los residuos hidrofílicos mencionados, también lo estén. Además, los anticuerpos anti-DKEEKE, permitieron identificar a CRTAM en la región lateral de células epiteliales, en la zona donde se ubican los desmosomas. Sin embargo, serán necesarios más estudios para determinar el papel del tallo en las funciones que lleva a cabo CRTAM en la superficie de los linfocitos T y de las otras estirpes celulares que expresan dicha proteína. En ese sentido, se han descrito diversas funciones de la región del tallo de proteínas que se expresan en la superficie de células del sistema inmune; por ejemplo, las regiones tallo del receptor de IL-6 (IL-6R) y del receptor de IL-1 (IL-1R) son indispensables para la señalización intracelular pero no para su transporte a la superficie (Baran, Nitz, Grötzinger, Scheller, & Garbers, 2013; Lokau & Garbers, 2018). También se sabe que el tallo del receptor inhibitorio de células NK, Ly49A, participa en la interacción con sus ligandos (moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad), expresados en las células blanco y por tanto juega un papel en la superficie de la célula así como en la señalización intracelular (Ito, Iizuka, Katepalli, & Iizuka, 2009). Otro aspecto de señalar, es que los dos grupos (Rubinstein et al., 2013; Zhang et al., 2013b); que describieron la estructura cristalográfica del dominio variable de CRTAM, reportaron que la proteína expresada en *E. coli* se localizaba en cuerpos de inclusión. Por lo mismo, tuvieron que recurrir a procedimientos de renaturalización, es decir, tuvieron los mismos problemas a los que nosotros nos enfrentamos, cuando produjimos los

dominios IgC o IgV sin el tallo. Nuestros hallazgos podrían mejorar la solubilidad de los miembros de la super familia de inmunoglobulinas cuando se produzcan de forma recombinante en sistemas bacterianos.

El haber obtenido las proteínas recombinantes solubles, no significó que éstas tuvieran un plegamiento correcto, ya que podrían formar agregados sin llegar a precipitarse. Lo anterior se puso de manifiesto durante la purificación de dichas proteínas mediante cromatografía de exclusión molecular. Los cromatogramas obtenidos mostraron que tanto el dominio variable como el constante de las proteínas recombinantes solubles de CRTAM formaban agregados de alto peso molecular que se recuperaron en las primeras fracciones del volumen vacío de la columna Sepharcryl S-200. Dado que el límite de exclusión permite la separación de proteínas de entre 250,000 a 5,000 daltones, los agregados de CRTAM que eluyeron en el volumen vacío (peso molecular de azul de dextrano como referencia) podrían tratarse de al menos de hexámeros, que probablemente se forman por interacciones entre residuos hidrófobos presentes en ambos dominios. Cuando dichas proteínas se sometieron a un proceso desnaturalización seguido de un replegamiento químico, se logró recuperar a las proteínas recombinantes, en las fracciones con pesos moleculares cercanas 66 kDa (referencia del peso molecular de la proteína BSA), lo cual sugiere que el dominio constante forma un dímero en solución, ya que el peso molecular estimado de ese dominio junto con la región tallo, es de aproximadamente ~26 kDa. Los espectros de dicroísmo circular también sugirieron que las proteínas se habían replegado correctamente, ya que exhibían una estructura secundaria preponderante de láminas beta características de los dominios de inmunoglobulina. Es de resaltar, que ninguna proteína eluyó en la región de peso molecular menores a 45 kDa (referencia del peso molecular de la proteína Ovalbumina), lo que indica que no había monómeros del dominio constante en solución. En cambio, para el dominio variable se recuperaron tanto dímeros peso aproximado de 57 kDa, como monómeros con un peso molecular de 28 kDa, semejante a lo reportado para en la producción del dominio variable que fue cristalizado (Zhang et al., 2013b).

También pudimos purificar la región extracelular de Necl2 (Necl2_{EC}) de la fracción soluble, y de manera similar a CRTAM, incluimos su región tallo para aumentar la solubilidad de la proteína recombinante. Sin embargo, también fue necesario llevar a cabo un replegamiento químico y en este caso, la proteína se obtuvo en un peso molecular alrededor de 40 kDa, lo que indica que se obtuvo en su forma monomérica. Por lo tanto, la formación de dímeros en solución no es una característica única de las proteínas semejantes a nectinas, sino que también lo sea de otras proteínas como CRTAM (Hagiyama et al., 2011; Moiseeva, Roach, Leyland, & Bradding, 2013).

Las recombinantes de CRTAM, nos permitieron caracterizar la reactividad del anticuerpo monoclonal anti-CRTAM humano, denominado mAbC8, (Patiño-Lopez et al., 2006). Demostramos que el mAbC8 reconoce a la recombinante IgC-tallo pero no a la IgV-tallo, por lo tanto, su reactividad no es contra la región tallo, sino que el epítipo que reconoce parece estar localizado en la región constante, y su reactividad tiene una constante de afinidad de 6.28×10^{-10} M, valor de afinidad semejante a otros anticuerpos monoclonales contra diversas proteínas (Bee, Abdiche, Pons, & Rajpal, 2013; Caaveiro et al., 2015). Además, mAbC8 no presenta reactividad cruzada con la región extracelular del ligando Necl2 (Necl2_{EC}), a pesar de que el Ig-C de CRTAM presenta una identidad del 27.2% (25/97 aminoácidos) y similitud del 54.3% con el dominio constante Ig-C1 de Necl2. Lo anterior nos hace pensar que el epítipo se encuentra en las secuencias que no se comparten por dichos dominios, y que debe encontrarse entre las regiones 6-19, 61-69, y 74-80 de acuerdo a la numeración de la figura 7.

Las proteínas recombinantes producidas en *E. coli* no son glicosiladas y aunque los carbohidratos participan en diversos procesos biológicos, con base en la estructura cristalográfica del dominio variable de CRTAM unido a Necl2, sabemos que los carbohidratos no participan en la interacción que establecen estas dos proteínas (Rosano & Ceccarelli, 2014; Zhang et al., 2013b). Los datos obtenidos en este trabajo están en concordancia con esas publicaciones, pero nosotros contribuimos con nuevos hallazgos ya que demostramos la participación del

dominio constante de CRTAM en una unión con Necl2, esta interacción tiene una KD de 2.6×10^9 M que contrasta con la Kd de 1.26×10^6 reportada para la unión de los dominios variables de estas proteínas (Zhang et al., 2013b). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que durante la interacción célula-célula, CRTAM y Necl2 deberán adoptar una conformación que favorezca las interacciones de los dominios IgV y del IgC de CRTAM con el dominio Ig-C1 de Necl2.

Los hallazgos anteriores se reforzaron con el análisis por microscopia de fluorescencia de células transfectadas, quedando de manifiesto la interacción célula-célula, cuando se co-cultivaron las células Jurkat que expresan el dominio IgC de CRTAM en su superficie, con células Cos7 que expresan Necl2 en superficie. La interacción establecida pudiera ser responsable de los agregados celulares entre ambas poblaciones (Figura 36), dado que dichas interacciones no se establecen cuando se transfecta a las células con vectores vacíos.

Por otro lado, usando construcciones quiméricas fusionadas a las proteínas fluorescentes Cypet y Ypet, pudimos demostrar de manera directa las interacciones CRTAM-CRTAM, Necl2-Necl2 y CRTAM-Necl2 en la superficie celular. Se observaron bordes de interacción entre células transfectadas, e inclusive en las prolongaciones de membrana, en particular entre los fibroblastos 3T3 que expresan Necl2 con las células que expresan CRTAM (Figura 32). Se advierten puntos de co-localización de fluorescencia amarillos y turquesa de diferentes tamaños en superficie, lo que sugiere que “clusters” o agrupamientos de moléculas de CRTAM y Necl2 en la superficie son necesarios para llevar a cabo la interacción célula-célula, aspecto que a la fecha no ha sido reportado en la literatura (Arase et al., 2005; Garay et al., 2010; Giangreco, Hoste, Takai, Rosewell, & Watt, 2012; Kennedy et al., 2000). Puesto que se logró la transfección con los genes que codifican para proteínas carentes de algunos de los dominios, esto da pie para poder realizar ensayos ulteriores de FRET para dilucidar el papel del dominio constante en la formación de los “clusters” de CRTAM por interacciones laterales entre los dominios constante de moléculas adyacentes y como esos agrupamientos podrían favorecer la interacción con el ligando Necl2

expresado en una célula vecina. El estudio de los dominios constantes de Necl2 y de otras proteínas de la misma familia expresada en células neuronales ha puesto de manifiesto el papel fundamental del dominio contante en las interacciones laterales y en la interacción de dichas proteínas con sus ligandos (Fogel et al., 2010; Fogel, Stagi, Perez De Arce, & Biederer, 2011; Martinet & Smyth, 2015).

CONCLUSIONES

- La región tallo promueve solubilidad a la proteína CRTAM cuando se produce de manera recombinante.
- La proteína recombinante CRTAM forma complejos diméricos en solución.
- El dominio constante de CRTAM es indispensable para que la proteína pueda unirse con alta afinidad a su ligando Necl2
- El dominio constante pudiera contribuir a interacciones laterales CRTAM-CRTAM y favorece su unión a Necl2.

PERSPECTIVAS

1. Comprobar mediante ensayos FRET que los grupos de CRTAM en la superficie células, se debe a que están interaccionando lateralmente.
2. Explorar si el agrupamiento de moléculas CRTAM en superficie de la célula se localizan en balsas lipídicas.
3. La obtención de una estructura cristalográfica de la interacción entre moléculas completas de CRTAM y Necl2 sería ideal para poder comprender cabalmente como los mecanismos de interacción entre ambas moléculas.

REFERENCIAS

- Amzel, M. (1979). *Three-dimensional structure of .12030 immunoglobulins*. (L).
- Arase, N., Takeuchi, A., Unno, M., Hirano, S., Yokosuka, T., Arase, H., & Saito, T. (2005). Heterotypic interaction of CRTAM with Necl2 induces cell adhesion on activated NK cells and CD8+ T cells. *International Immunology*, *17*(9), 1227–1237. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh299>
- Austin, C. (2003). Novel approach to obtain biologically active recombinant heterodimeric proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *786*(1–2), 93–107. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00720-1](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00720-1)
- Baran, P., Nitz, R., Grötzinger, J., Scheller, J., & Garbers, C. (2013). Minimal Interleukin 6 (IL-6) receptor stalk composition for IL-6 receptor shedding and IL-6 classic signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(21), 14756–14768. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.466169>
- Bedford, E., Tabor, S., & Richardson, C. C. (1997). The thioredoxin binding domain of bacteriophage T7 DNA polymerase confers processivity on *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.2.479>
- Bee, C., Abdiche, Y. N., Pons, J., & Rajpal, A. (2013). Determining the binding affinity of therapeutic monoclonal antibodies towards their native unpurified antigens in human serum. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080501>
- Boles, K. S., Barchet, W., Diacovo, T., Cella, M., & Colonna, M. (2005). The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8. *Culture*, *106*(3), 779–786. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0817>.The
- Caaveiro, J. M. M., Kiyoshi, M., & Tsumoto, K. (2015). Structural analysis of Fc/FcγR complexes: A blueprint for antibody design. *Immunological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/imr.12365>
- Fogel, A. I., Li, Y., Giza, J., Wang, Q., Lam, T. K. T., Modis, Y., & Biederer, T. (2010). N-glycosylation at the SynCAM (Synaptic Cell Adhesion Molecule) immunoglobulin interface modulates synaptic adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(45), 34864–34874. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.120865>
- Fogel, A. I., Stagi, M., Perez De Arce, K., & Biederer, T. (2011). Lateral assembly of the immunoglobulin protein SynCAM 1 controls its adhesive function and instructs synapse formation. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.336>

- Frenette PS, W. D. (1996). Adhesion Molecules. *New England Journal of Medicine*, 335(1), 43–45.
- Fuchs, A., & Colonna, M. (2006). The role of NK cell recognition of nectin and nectin-like proteins in tumor immunosurveillance. *Seminars in Cancer Biology*.
<https://doi.org/10.1016/j.semcan.2006.07.002>
- Garay, E., Patiño-López, G., Islas, S., Alarcón, L., Canche-Pool, E., Valle-Rios, R., ... González-Mariscal, L. (2010). CRTAM: A molecule involved in epithelial cell adhesion. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(1), 111–122. <https://doi.org/10.1002/jcb.22673>
- Ghosh, S., Hamdan, S. M., Cook, T. E., & Richardson, C. C. (2008). Interactions of Escherichia coli thioredoxin, the processivity factor, with bacteriophage T7 DNA polymerase and helicase. *Journal of Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M805062200>
- Giangreco, A., Hoste, E., Takai, Y., Rosewell, I., & Watt, F. M. (2012). Epidermal Cadm1 Expression Promotes Autoimmune Alopecia via Enhanced T Cell Adhesion and Cytotoxicity. *The Journal of Immunology*, 188(3), 1514–1522.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003342>
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Hagiyama, M., Furuno, T., Hosokawa, Y., Iino, T., Ito, T., Inoue, T., ... Ito, A. (2011). Enhanced Nerve–Mast Cell Interaction by a Neuronal Short Isoform of Cell Adhesion Molecule-1. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002244>
- Hynes, R. O. (1999). Cell adhesion: Old and new questions. *Trends in Cell Biology*, 9(12), 33–37. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(99\)01667-0](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(99)01667-0)
- Ito, D., Iizuka, Y. M., Katepalli, M. P., & Iizuka, K. (2009). Essential role of the Ly49A stalk region for immunological synapse formation and signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(27), 11264–11269. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900664106>
- Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1751(2), 119–139.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>
- Kennedy, J., Vicari, A. P., Saylor, V., Zurawski, S. M., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., ... Zlotnik, A. (2000). A molecular analysis of NKT cells : identification of a class-I restricted T cell-associated molecule (CRTAM). *Journal of Leukocyte Biology*, 67(May), 725–734.
- Lokau, J., & Garbers, C. (2018). The length of the interleukin-11 receptor stalk determines its capacity for classic signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 293(17), 6398–6409.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.001879>

- Malik-Chaudhry, H. K., Saavedra, A., & Liao, J. (2014). A linker strategy for trans-FRET assay to determine activation intermediate of NEDDylation cascade. *Biotechnology and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1002/bit.25183>
- Martinet, L., & Smyth, M. J. (2015). Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nature Reviews Immunology*, *15*(4), 243–254. <https://doi.org/10.1038/nri3799>
- Medina-Contreras, O., Soldevila, G., Patiño-Lopez, G., Canche-Pool, E., Valle-Rios, R., & Ortiz-Navarrete, V. (2010). Role of CRTAM during mouse early T lymphocytes development. *Developmental and Comparative Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.09.009>
- Moiseeva, E. P., Roach, K. M., Leyland, M. L., & Bradding, P. (2013). CADM1 Is a Key Receptor Mediating Human Mast Cell Adhesion to Human Lung Fibroblasts and Airway Smooth Muscle Cells. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061579>
- Nguyen, A. W., & Daugherty, P. S. (2005). Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt1066>
- Ogita, H., & Takai, Y. (2006). Nectins and nectin-like molecules: Roles in cell adhesion, polarization, movement, and proliferation. *IUBMB Life*. <https://doi.org/10.1080/15216540600719622>
- Patiño-Lopez, G., Hevezi, P., Lee, J., Willhite, D., Verge, G. M., Lechner, S. M., ... Zlotnik, A. (2006). Human class-I restricted T cell associated molecule is highly expressed in the cerebellum and is a marker for activated NKT and CD8+ T lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology*, *171*(1–2), 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.09.017>
- Rikitake, Y., Mandai, K., & Takai, Y. (2012). The role of nectins in different types of cell-cell adhesion. *Journal of Cell Science*, *125*(16), 3713–3722. <https://doi.org/10.1242/jcs.099572>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rubinstein, R., Ramagopal, U. A., Nathenson, S. G., Almo, S. C., & Fiser, A. (2013). Functional classification of immune regulatory proteins. *Structure*, *21*(5), 766–776. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.02.022>
- Ryffel, G. U., Werdien, D., Turan, G., Gerhards, A., Goosses, S., & Senkel, S. (2003). Tagging muscle cell lineages in development and tail regeneration using Cre recombinase in transgenic *Xenopus*. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gng044>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Purification of Nucleic Acids by Extraction with

- Phenol:Chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*.
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot4455>
- Shingai, T., Ikeda, W., Kakunaga, S., Morimoto, K., Takekuni, K., Itoh, S., ... Takai, Y. (2003). Implications of nectin-like molecule-2/IGSF4/RA175/SgIGSF/TSLC1/SynCAM1 in cell-cell adhesion and transmembrane protein localization in epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 35421–35427.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M305387200>
- Song, H. N., Jang, J. H., Kim, Y. W., Kim, D. H., Park, S. G., Lee, M. K., ... Woo, E. J. (2014). Refolded scFv antibody fragment against myoglobin shows rapid reaction kinetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 23658–23671.
<https://doi.org/10.3390/ijms151223658>
- Symersky, J., Novak, J., McPherson, D. T., DeLucas, L., & Mestecky, J. (2000). Expression of the recombinant human immunoglobulin J chain in *Escherichia coli*. *Molecular Immunology*, 37(3–4), 133–140. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(00\)00035-3](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(00)00035-3)
- Tabor, S., Huber, H. E., & Richardson, C. C. (1987). *Escherichia coli* thioredoxin confers processivity on the DNA polymerase activity of the gene 5 protein of bacteriophage T7. *The Journal of Biological Chemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47718-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47718-6)
- Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda, W., & Ogita, H. (2008). Nectins and nectin-like molecules: Roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(8), 603–615. <https://doi.org/10.1038/nrm2457>
- Takai, Y., & Nakanishi, H. (2003). Nectin and afadin: Novel organizers of intracellular junctions. *Journal of Cell Science*, 116(1), 17–27. <https://doi.org/10.1242/jcs.00167>
- Thomson, C. A., Olson, M., Jackson, L. M., & Schrader, J. W. (2012). A Simplified Method for the Efficient Refolding and Purification of Recombinant Human GM-CSF. *PLoS ONE*, 7(11), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049891>
- Tran, N. Q., Lee, S. J., Akabayov, B., Johnson, D. E., & Richardson, C. C. (2012). Thioredoxin, the processivity factor, sequesters an exposed cysteine in the thumb domain of bacteriophage T7 DNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.409235>
- Williams, A. F., & Barclay, A. N. (1988). The immunoglobulin superfamily - Domains for cell surface recognition. *Annual Review of Immunology*.
<https://doi.org/10.1146/annurev.iy.06.040188.002121>
- Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Maekawa, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T., & Ishii, S. (1995). Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 270(43), 25328–25331.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.43.25328>
- Yasumi, M., Shimizu, K., Honda, T., Takeuchi, M., & Takai, Y. (2003). Role of each

immunoglobulin-like loop of nectin for its cell-cell adhesion activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00106-2](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00106-2)

Yeh, J. H., Sidhu, S. S., & Chan, A. C. (2008). Regulation of a Late Phase of T Cell Polarity and Effector Functions by Crtam. *Cell*, *132*(5), 846–859. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.013>

Zhang, S., Lu, G., Qi, J., Li, Y., Zhang, Z., Zhang, B., ... Gao, G. F. (2013a). Competition of cell adhesion and immune recognition: Insights into the interaction between CRTAM and nectin-like 2. *Structure*, *21*(8), 1430–1439. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.06.006>

Zhang, S., Lu, G., Qi, J., Li, Y., Zhang, Z., Zhang, B., ... Gao, G. F. (2013b). Competition of cell adhesion and immune recognition: Insights into the interaction between CRTAM and nectin-like 2. *Structure*, *21*(8), 1430–1439. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.06.006>

ANEXOS

ANEXO I. Secuencia nucleotídica y aminoacídica de CRTAM

La secuencia sombreada en color fucsia corresponde al péptido señal; en verde al dominio IgV; en azul al dominio IgC; en negro a la región Tallo (*Stalk*); en rojo oscuro a la región transmembranal; en gris claro la región intracelular donde en morado se denota al motivo ESIV y en rojo con un asterisco indica el codón de paro.

1	ATGTGGTGGAGAGTTCTCAGCTTGCTGGCA	TGGTTCCCCTTGCAAGAGGCC	TCTCTGACT	AACCACACAGAAACCATCACCGTGGAGGAA
1	M W W R V L S L L A	W F P L Q E A S L T	N H T E T I T V E E	
91	GGCCAGACGCTCACTCTAAAAGTGTGTC	TCTCTGAGGAAGAAGCTCCTCCCTCCAGTGG	CTGACCCCTCAGGGTTCACCATTTTTTTA	
31	G Q T L T L K C V T	S L R K N S S L Q W	L T P S G F T I F L	
181	AATGAGTATCCTGCTTTAAAAAATTCAAA	TACCAGCTTCTTCATCACTCGGCCAATCAG	CTCTCCATCACTGTGCCTAACGTAACCTG	
61	N E Y P A L K N S K	Y Q L L H H S A N Q	L S I T V P N V T L	
271	CAAGATGAAGCGGTGACAAAGTGTACAT	TACAGCGACTCTGTAAGCACAAAGGAAGT	AAAGTGATTGTGCTGGCAACTCCTTTCAAG	
91	Q D E G V Y K C L H	Y S D S V S T K E V	K V I V L A T P F K	
361	CCAATCCTGGAAGCTTTCAGTTATCAGAAAAG	CAAAATGGAGAAGAACATGTTGTACTCATG	TGCTCCACCATGAGAAGCAAGCCCCTCCG	
121	P I L E A S V I R K	Q N G E E H V V L M	C S T M R S K P P P	
451	CAGATAACCTGGCTACTTGGGAATAGCATG	GAAGTGTCCGGTGAACGCTCCATGAATTT	GAAACTGATGGGAAGAAATGTAATACTACC	
151	Q I T W L L G N S M	E V S G G T L H E F	E T D G K K C N T T	
541	AGCACTCTCATAATCCACACTTATGGCAAA	AATTCAACGGTGGACTGCATTATCCGACAC	AGAGGCCTGCAAGGGAGAAAAGTAGTAGCA	
181	S T L I I H T Y G K	N S T V D C I I R H	R G L Q G R K L V A	
631	CCCTTCCGTTTGAAGATTTGGTACTGAT	GAAGAGACAGCTTCAGATGCTCTGGAGAGA	AACTCTCTATCCTCTCAAGACCCACAGCAG	
211	P F R F E D L V T D	E E T A S D A L E R	N S L S S Q D P Q Q	
721	CCCACCAGTACTGTCTCAGTAACGGAAGAT	TCTAGTACATCGGAGATTGACAAGGAAGAG	AAAGAACAACCCTCAAGATCCTGACTTG	
241	P T S T V S V T E D	S S T S E I D K E E	K E Q T T Q D P D I	
811	ACCACCGAAGCAAATCCTCAGTATTTAGGA	CTGGCAAGAAAAGAAAAGTGGC	ATCCTGCTG	CTCACGCTGGTGTCCCTTCCTCATTTCATA
271	T T E A N P Q Y L G	L A R K K S G I L L	L T L V S F L I F I	
901	CTCTTCATCATAGTCCAGCTCTTCATCATG	AAGCTGAGGAAAAGCACATGTGATATGGAAG	AGAGAAAACGAAGTTTCAGAACACACACTA	
301	L F I I V Q L F I M	K L R K A H V I W K	R E N E V S E H T L	
991	GAAAGTTACAGATCAAGGTCAAATAATGAA	GAAACATCATCTGAAGAGAAAAATGGCCAA	TCTTCCCACCTATGCGTTGCATGAAGTAC	
331	E S Y R S R S N N E	E T S S E E K N G Q	S S H P M R C M N Y	
1081	ATCACAAAGTTGTACTCAGAAGCAAAAACA	AAGAGGAAGAAAATGTACAACATTCAAAA	TTAGAAGAAAAGCACATCCAAGTACCA	GAG
361	I T K L Y S E A K T	K R K E N V Q H S K	L E E K H I Q V P E	
1171	AGTATTGTGTAG			
391	S I V *			

Anexo II. Secuencia nucleotídica y aminoacídica de Nectin-like 2

Traducción de la secuencia nucleotídica codificante de la molécula Nectin-Like 2 (CADM1) objeto de este estudio, se denotan en sombreado color rosa la secuencia correspondiente al péptido señal, en naranja la secuencia correspondiente al primer dominio (Ig1-V), en verde al segundo dominio (Ig2-C), en azul al tercer dominio (Ig3-C), en rojo vino la región transmembranal, en púrpura a la región intracelular y sombreado negro indica el codón de paro.

1	ATGGCGAGTGTAGTGCTGCCGAGCGGATCC	CAGTGTGCGGGCGGCAGCGGGCGGGCGGGCG	CCTCCCGGGCTCCGGCTCCGGCTTCTGCTG
1	M A S V V L P S G S	Q C A A A A A A A A	P P G L R L R L L L
91	TTGCTCTTCTCCGCCGCGGCACTGATCCCC	ACAGGTGATGGG	CAGAATCTGTTTACGAAA
31	L L F S A A A L I P	T G D G	Q N L F T K
181	ACCATCAGTTGCCAAGTCAATAAGAGTGAC	GACTCTGTGATTCAGCTACTGAATCCCAAC	AGGCAGACCATTTATTTTCAGGGACTTCAGG
61	T I S C Q V N K S D	D S V I Q L L N P N	R Q T I Y F R D F R
271	CCTTTGAAGGACAGCAGGTTTTCAGTTGCTG	AATTTTTCTAGCAGTGAAGTCA	TTGACAAACGTCTCAATTTCTGATGAAGGA
91	P L K D S R F Q L L	N F S S S E L K V S	L T N V S I S D E G
361	AGATACTTTTGCAGCTCTATAACCGATCCC	CCACAGGAAAGTTACACCACCATCACAGT	CTGGTCCCACCACGTAATCTGATGATCGAT
121	R Y F C Q L Y T D P	P Q E S Y T T I T	V L V P P R N L M I D
451	ATCCAGAAAGACACTGCGGTGGAAGGTGAG	GAGATTGAAGTCAACTGCACTGCTATGGCC	AGCAAGCCAGCCACGACTATCAGGTGGTTC
151	I Q K D T A V E G E	E I E V N C T A M A	S K P A T T I R W F
541	AAAGGGAACACAGAGCTAAAAGGCAAATCG	GAGGTGGAAGAGTGGTCAGACATGTACT	GTGACCAGTCAGCTGATGCTGAAGGTGCAC
181	K G N T E L K G K S	E V E E W S D M Y T	V T S Q L M L K V H
531	AAGGAGGACGATGGGGTCCCAGTGATCTGC	CAGGTGGAGCACCTGCGGTCAGTGGAAAC	CTGCAGACCCAGCGGTATCTAGAAGTACAG
211	K E D D G V P V I C	Q V E H P A V T G N	L Q T Q R Y L E V Q
721	TATAAGCCTCAAGTGCACATTCAGATGACT	TATCCTCTACAAGGCTTAACCCGGGAAGGG	GACGCGCTTGAGTTAACATGTGAAGCCATC
241	Y K P Q V H I Q M T	Y P L Q G L T R E G	D A L E L T C E A I
311	GGGAAGCCCCAGCCTGTGATGGTAACCTTGG	GTGAGAGTCGATGATGAAATGCCTCAACAC	GCCGTAAGTGTCTGGGCCCAACCTGTTCATC
271	G K P Q P V M V T W	V R V D D E M P Q H	A V L S G P N L F I
301	AATAACCTAAACAAAACAGATAATGGTACA	TACCGCTGTGAAGCTTCAAACATAGTGGGG	AAAGCTCACTCGGATTATATGCTGTATGTA
301	N N L N K T D N G T	Y R C E A S N I V G	K A H S D Y M L Y V
391	TACGATTCCCAGCAGGTGAAGAAGGCTCG	ATCAGGGCAGTGGATCAT	GCCGTGATCGGT
331	Y D S R A G E E G S	I R A V D H	A V I G G V V A V V V F A M
381	CTGTGCTTGTTCATCATTCTGGGGCGCTAT	TTTGCCAGACATAAAGGTACATACTTCACT	CATGAAGCCAAAGGAGCCGATGACGCAGCA
361	L C L L I I L	G R Y F A R H K G T Y F T	H E A K G A D D A A
171	GACGCAGACACAGCTATAATCAATGCAGAA	GGAGGACAGAACAACCTCCGAAGAAAAGAAA	GAGTACTTCATC
391	D A D T A I I N A E	G G Q N N S E E K K	E Y F I

Anexo III. Secuencias de oligonucleótidos.

Tabla 1. Oligonucleotidos usados para el diseño y clonación de las proteínas de CRTAM y Nectin-like 2 expresados en sistema bacteriano Rosetta II star.

Nombre	Secuencia	Descripción
FwCRTAMlg1BamHI	GAAAAGGGGGATCC GAGGCCTCTC TGACTAACCAC	Letras negritas es el extremo 5' del primer dominio de CRTAM; subrayado indica el sitio restricción de BamHI
RvCRTAMlg1Xhol	TTCTCTAACTCGAG CAGCACAAATC ACTTTCACTTC	Letras negritas es el extremo 3' del primer dominio de CRTAM; subrayado indica el sitio restricción de XhoI
FwCRTAMlg2BamHI	GAAAAGGGGGATCC GTGCTGGCAA CTCCTTCAAG	Letras negritas es el extremo 5' del segundo dominio de CRTAM; subrayado indica el sitio restricción de BamHI
RvCRTAMlg2Xhol	TTCTCTAACTCGAG TCATGCTACTA GTTTTCTCCCTTG	Letras negritas es el extremo 3' del segundo dominio de CRTAM; subrayado indica el sitio restricción de XhoI
RvCRTAMStalkXhol	TTCTCTAACTCGAG TCAACTTTTCT TTCTTGCCAGTCC	Letras negritas es el extremo 3' de la región tallo de CRTAM; subrayado indica el sitio restricción de XhoI
FwNectl2lg1BamHI	GAAAAGGGGGATTCC CAGAATCTGTT TACGAAAGAC	Letras negritas es el extremo 5' del primer dominio de Nectin-like2; subrayado indica el sitio restricción de BamHI
RvNectl2Xhol	TTCTCTAACTCGAG TCAATGATCCA CTGCCCTGATCGA	Letras negritas es el extremo 3' del primer dominio de Nectin-like2; subrayado indica el sitio restricción de XhoI

***Rv, Reverse primer; Fw, Forward primer**

Tabla 2. Oligonucleotidos usado para el diseño de proteínas quiméricas de CRTAM y Necl2 fusionados a las proteínas fluorescentes Ypet y Cypet.

Nombre	Secuencia	Descripción
pUB6KpnIKozakCRTAM Fw	<u>TTTTTGTAGACGAAGCTTGGTA</u> <u>CCGCCACCGCCATGTGGTGGA</u> GAGTTCTCAG	Azul secuencia complementaria del vector pUB6; fondo gris sitio restricción KpnI; subrayado secuencia Kozak; Letras negritas extremo 5' del codón inicio de CRTAM.
CRTAMLinkerRv	<u>CGCGGCCGCCAGCGCGGCCGC</u> <u>CAGTGGTACTTGGATGTGCTTT</u>	Letras negritas es el extremo 3' de la región intracelular de CRTAM; subrayado indica el sitio de linker LAAALAAA
LinkerYpetFw	<u>CTGGCGGCCGCGCTGGCGGCC</u> <u>GCGATGGTGAGCAAAGGCGAA</u> GA	Letras negritas es el extremo 5' de la proteína Ypet; subrayado indica el sitio del linker LAAALAAA
YpetNotIRv	<u>GAAGGGCCCTCTAGACTCGAGC</u> <u>GGCCGCTCA</u> CTTATAGAGCTCGTTCATGCC T	Azul secuencia complementaria del vector pUB6; subrayado indica el sitio de restricción NotI; rojo el codon de paro; letras negritas es el extremo 3' de la proteína Ypet.
LinkerCypetFw	<u>CTGGCGGCCGCGCTGGCGGCC</u> <u>GCGATGGTGAGCAAAGGGAGAG</u> GA	Letras negritas es el extremo 5' de la proteína Cpet; subrayado indica el sitio del linker LAAALAAA
CypetNotIpUB6Rv	<u>GAAGGGCCCTCTAGACTCGAGC</u> <u>GGCCGCTCA</u> <u>TTTGTACAGTTCCG</u> TCCATGCC	Azul secuencia complementaria del vector pUB6; subrayado indica el sitio de restricción NotI; rojo el codon de paro; letras negritas es el extremo 3' de la proteína Cypet.
pUB6KozakNecl2Kpnfw	<u>TTTTTGTAGACGAAGCTTGGT</u> <u>ACCGCCACCGCCATGGCGAGT</u> GTAGTGCTGCCG	Azul secuencia complementaria del vector pUB6; fondo gris sitio restricción KpnI; subrayado secuencia kozak; Letras negritas extremo 5' del codón inicio de Nectin-like2.
Necl2linkerRv	<u>CGCGGCCGCCAGCGCGGCCGC</u> <u>CAGGTCGACTTTCTTTTCTTCGG</u> AGTTGTTCTGTCTCC	Letras negritas es el extremo 3' de la región intracelular de CRTAM; subrayado indica el sitio de linker LAAALAAA

*Rv, Reverse primer; Fw, Forward primer

Tabla 3. Oligonucleotidos usados para las deleciones de los dominios extracelulares de CRTAM en las proteínas quiméricas.

Nombre	Secuencia	Descripción
>Ig2CrtamdeletionFw	CCCTTCCGGTTTGAAGATTTG	Oligo para eliminar Ig2 que reconoce el extremo 3' del final del dominio Ig2 e inicio de la región tallo de CRTAM
>Ig2CrtamdeletionRv	TGCCAGCACAATCACTTTCAC	Oligo para eliminar Ig2 que reconoce el extremo 5' del inicio del dominio Ig2 de Crtam
>Ig1Crtamdeletionfw	AAAGTGATTGTGCTGGCAACT	Oligo para eliminar Ig1 que reconoce el extremo 3' del final del dominio Ig1
>ExtracellularDeletionRv	AGAGGCCTCTTGCAAGGGGAA	Oligo para eliminar la región extracelular que reconoce el extremo 5' del inicio del primer dominio Ig1
<p>* consultar esquema de la Figura 25 para mejor descripción de los primers usados para eliminar los dominios y región extracelular de CRTAM. *Rv, Reverse primer; Fw, Forward primer</p>		



Prokaryotic Expression of the Immunoglobulin's Domains of CRTAM to Characterize a Monoclonal Antibody

Juan Carlos Barragan-Galvez⁵ · Maria Gonzalez-Orozco^{1,2} · Araceli Hernandez-Flores³ · Jose Luis Maravillas-Montero⁴ · Yedhani Chavez-Guerrero¹ · Vianney Ortiz-Navarrete¹

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Class-I restricted T cell-associated molecule (CRTAM) is a member of the immunoglobulin superfamily, and it is closely related to nectin-like protein. CRTAM is expressed in activated CD8 T cells, NKT cells, NK cells and in a subpopulation CD4 T cells. In this study, we produce as recombinant proteins, the Ig-domains of CRTAM (IgV–IgC), the IgV, and the IgC. These proteins were successfully purified in the soluble fraction only if the stalk region was included. The recombinant CRTAM recognizes its ligand nectin-like 2 in a cell-free system. We also demonstrate that the IgC domain of CRTAM is recognized by the anti-hCRTAM monoclonal antibody C8 with a 0.62 nM affinity. In conclusion, the stalk region of CRTAM provides solubility for the expression of its Ig-domains as recombinant proteins.

Keywords CRTAM · Nectin-like 2 · Recombinant protein · Superfamily of immunoglobulins

1 Introduction

Cell adhesion molecules (CAMs) are a group of glycoproteins that have cytoplasmic, transmembrane, and extracellular domains and have essential roles in cell–cell communication and tissue integrity [1]. Within this group of molecules

is the superfamily of immunoglobulins (IgSFs), which are receptors characterized by having immunoglobulin-like domains, with a predominant secondary structure of beta-sheets, folded antiparallel forming a "sandwich" fold with cell signaling and effector functions [2, 3].

The family of nectin and nectin-like proteins belong to the IgSFs and mainly function as adhesion molecules in epithelial tissues [4, 5]. Bioinformatics studies have classified Class-I restricted T cell-associated molecule (CRTAM) to the family of nectin-like proteins due to their similarity in sequence and function [6, 7]. CRTAM comprises two extracellular domains, one variable Ig-like (IgV), one constant Ig-like domain (IgC), a stalk region, a transmembrane region, and a cytoplasmic domain with an intracellular motif (ESIV) to bind PDZ domains of scaffold proteins [8, 9]. However, no function of the CRTAM stalk region has been described.

CRTAM is expressed post-activation of CD8 and CD4 T lymphocytes, NKT cells, and NK cells, while constitutive expression of CRTAM is observed in double-negative thymocytes, epithelial cells, Purkinje cells and diverse tissues [6, 8–11]. CADM1/Nectin-like 2 (Nectl2), which is expressed in dendritic, epithelial, and tumor cells, is a CRTAM ligand [10]. It has been shown that interaction between these molecules increases IFN γ production and antitumor activity of CD8 T lymphocyte and NK cells [11]. Also, CRTAM on a subset of CD4 T cells coordinates a Scrib-centered signaling

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10930-020-09896-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Vianney Ortiz-Navarrete
vortiz@cinvestav.mx

- ¹ Department of Molecular Biomedicine, Center for Research and Advanced Studies (CINVESTAV), Av. IPN 2508. Col. San Pedro Zacatenco, Gustavo A Madero, 07360 Mexico City, Mexico
- ² Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA
- ³ Universidad de la Sierra Sur, Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca, Mexico
- ⁴ Research Support Network, Universidad Nacional Autónoma de México and Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Mexico City, Mexico
- ⁵ Biomedical Sciences Program, National Autonomous University of Mexico, Circuito Interior s/n, Cd. Universitaria, Mexico City, Mexico

Published online: 16 April 2020

Springer

complex during a late phase of T cell polarity and regulates IFN γ , IL-17, and IL-22 cytokine production [9].

We generated a monoclonal antibody (C8 mAb) from mice immunized with recombinant GST-CRTAM (full length). The C8 was able to recognize human CRTAM in activated CD8 lymphocytes [12]. However, which domain of CRTAM recognizes the C8 mAb has not yet described. The identification of the fine specificity of the C8 mAb provides a platform to use this antibody for wide-ranging experimental applications such as western blot, endogenous localization of CRTAM by immunohistochemical or affinity purification of the native protein. In this study, to identify the target of this antibody, we produced different constructions of CRTAM in *Escherichia coli* and we measured the affinity of C8 by surface plasmon resonance. We show that the stalk region of CRTAM provides solubility to the recombinant proteins, and we also show that C8 mAb recognizes the IgC domain of CRTAM with high affinity.

2 Materials and Methods

2.1 Cell Lines and Culture

The hybridoma clone “C8” and Jurkat-hCRTAMFC line was cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS as described previously [12].

2.2 Amplification of CRTAM Domains by PCR

DNA fragments encoding the extracellular region without stalk (CRTAM_{IgV-C}), extracellular region with stalk (CRTAM_{EC}), variable domain without stalk region (CRTAM_{IgV}), variable domain with stalk (CRTAM_{IgV-stalk}), constant domain without stalk region (CRTAM_{IgC}), and constant domain with stalk (CRTAM_{IgC-stalk}) were amplified by PCR from the plasmid CRTAM-pGEX-6P3 [12]. The sequences of primers used in this study are given in Table 1.

All forward and reverse primers contain a BamHI and XhoI site restriction at the 5'-end and 3'-end, respectively.

2.3 Cloning Constructions of CRTAM

cDNA fragments encoding Nectin-like 2 (NECL2_{EC}), CRTAM_{EC}, CRTAM_{IgV-C}, CRTAM_{IgV}, CRTAM_{IgV-stalk}, CRTAM_{IgC}, and CRTAM_{IgC-stalk} were cloned into the prokaryotic expression vector pET28a (+) (Novagen), which carries a histidine tag sequence, and the fragments were also cloned into the pET32a (+) vector (Novagen), which carries a thioredoxin-histidine tag. All the constructs were cloned in BamHI 5' and XhoI 3' end sites, and restriction and correct PCR amplification was verified by sequencing using the Cellular Physiology Institute-UNAM sequencing service.

2.4 Purification of Recombinant Proteins and C8 mAb

Escherichia coli Rosetta 2-star (DE3) pRARE (Novagen) was transformed with the resultant plasmids by electroporation. One clone of the transformed cells was transferred from a Petri dish to a flask with 5 ml of LB medium containing ampicillin (100 μ g/ml) and chloramphenicol (40 μ g/ml), and the cells were grown overnight at 37 °C. The overnight culture (200 μ l) was inoculated into 2-l flasks containing 1 l of LB medium and ampicillin (100 μ g/ml) and chloramphenicol (40 μ g/ml). The culture was grown at 37 °C with shaking until the OD600 value reached 0.6–0.8, then IPTG was added (final concentration 0.8 mM), and the cells were incubated overnight (20 h) with shaking at 18 °C. The cells were harvested by centrifugation, the pellet was resuspended in lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM imidazole and 50 mM TRIS, pH 8.0), and the cells were disrupted by sonication. The cell lysate was centrifuged at 15,000 rpm for 30 min, and the supernatant was purified. The clear supernatant was loaded onto the HisTrap HP™ column (GE Healthcare), previously equilibrated with the binding buffer (500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 50 mM Tris pH 8.0). The protein

Table 1 Nucleotide sequences of the primers used in the study

Primer name	Sequence (5'–3')
CRTAM-IgV-Fw	G AAAAGGGGGAT <u>CCG</u> AGGCCCTCTCTGACTAACCAC
CRTAM-IgV-Rv	TTCTCTAACTCGAGCAGCACAAATCACTTTCAC TTC
CRTAM-IgC-Fw	G AAAAGGGGGAT <u>CCG</u> TGCTGGCAACTCCTTTCAAG
CRTAM-IgC-Rv	TTCTCTAACTCGAGTCAATGCTACTAGTTTTCTCCCTTG
CRTAM-Stalk Rv	TTCTCTAACTCGAGTCAACTTTTTCTTTCTTGCCAGTCC
NECL2-Fw	G AAAAGGGGGAT <u>CCG</u> AATCTGTTTACGAAAGAC
NECL2-Rv	TTCTCTAACTCGAGTCAATGATCCACTGCCCTGATCGA

Bold nucleotide indicates, to the left, nucleotide added for optimal activity of the restriction enzyme, to the right nucleotide sequence of CRTAM or NECL-2. Underline nucleotide indicates the restriction enzyme cutting site

was eluted using three volumes of an elution buffer (500 mM NaCl, 500 mM imidazole, 50 mM TRIS pH 8.0) with a low flow rate of 0.5 ml/min. 10 μ L of the elution fraction eluent was subjected by SDS-PAGE. In addition, 10 μ L of no-induced, induced, insoluble and soluble extracts were also analyzed by SDS-PAGE.

Generation of C8 mAb was described previously (12), by using a standard protocol for production of monoclonal antibodies. Briefly, 6- to 8-week-old female BALB/c mice were immunized by intraperitoneal injection of 100 μ g of GST-CRTAM in Freund's complete adjuvant and boosted by subsequent intraperitoneal immunizations of 50 μ g fusion protein in Freund's incomplete adjuvant every 2 weeks. Four days after the last immunization of 50 μ g fusion protein in PBS. Spleen cells were fused with mouse myeloma P3XG3-Ag8-653. Reactivity of hybridoma supernatants against fusion protein was assessed by ELISA. Antibody-producing hybridomas were cloned by limiting dilution and subjected to isotype characterization by using a mouse monoclonal antibody isotyping kit. The C8 mAb (IgG2b) was purified from cell lines supernatants using a HiTrapTM Protein G column (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions.

2.5 Western Blot Analysis

The fractions from chromatography were resolved by 12% SDS-PAGE according to the standard procedure and transferred to a nitrocellulose membrane. The membranes were blocked in skim milk (5%) in PBS containing 0.2% Tween-20 and incubated overnight at 4 °C with purified C8 mAb (100 μ g/ml) or with anti-histidine tag antibody (Clone # 210,213, R&D Systems, Inc). After being washed with PBS-Tween, the membranes were incubated with a 1:5000 dilution of a horseradish peroxidase-conjugated goat-anti-mouse (Sigma product no. A-8924) at room temperature for 1 h. The proteins were detected by chemiluminescence (Thermo Scientific).

2.6 Surface Plasmon Resonance Analysis

The purified C8 mAb was captured on a Biacore CM5 sensor chip (GE Healthcare) to a final immobilization density of ~1500 resonance units (RUs). All binding experiments were performed at 25 °C at a flow rate of 30 μ L/min. Two-fold serial dilutions of CRTAM_{EC} in HBS-P + buffer (GE Healthcare) were injected over the CM5 chip. The binding kinetics were derived by analysis of the generated sensorgrams fit a 1:1 Langmuir binding model using the Biacore T200 evaluation software (GE Healthcare). For the binding analysis for CRTAM_{EC} and Necl2_{EC} interactions, Necl2 was immobilized to a density of 2000 resonance units on a CM5 sensor chip (GE Healthcare) and four two-fold serial

dilutions of CRTAMEC in HBS-P + buffer were injected over the CM5 chip at a flow rate of 30 μ L/min.

3 Results

3.1 Insoluble Expression of Immunoglobulin Domains of CRTAM

First, we expressed immunoglobulin domains of CRTAM in bacterial systems to produce the antigens for identification of the target domain for C8 monoclonal. Three constructions designated as CRTAM_{IgV-C}, CRTAM_{IgV}, and CRTAM_{IgC} (Fig. 1a) were expressed in *E. coli* Rosetta 2-star (DE3). To confirm the expression of the recombinant proteins, a preliminary expression experiment was conducted in 5 mL of LB medium. All recombinant proteins were identified in the insoluble fraction, even though the constructions CRTAM_{IgV} and CRTAM_{IgC} were tagged with a thioredoxin protein (Fig. 1b middle and right panel). In addition to the insolubility, we observed, based on the thickness of the bands of the SDS-PAGE gels, higher expression of the proteins tagged with thioredoxin compared with CRTAM_{IgV-C} tagged with His6x (Fig. 1b left panel). CRTAM recombinant proteins tagged with GST were slightly soluble but the majority were expressed as inclusion bodies (data not shown). These results allow us to hypothesize that the insolubility of these proteins could be due to the absence of the stalk region. Therefore, we analyzed the solubility of the stalk region. We used the web software "Protein-Sol" [13] to predict the solubility of the stalk region. The stalk region is highly conserved among the CRTAM molecules of diverse species (Supplementary Fig. 1a and b) is composed of 77 residues, localized downstream of the immunoglobulin domains, and linked to the transmembrane region. The results showed that the stalk region alone has a high value of solubility (0.94) in comparison to the IgV-IgC domains (without a stalk), which showed a lower (0.40) value (Fig. 1c). This solubility value is also conserved among the stalk region of CRTAM molecules of various species (Supplementary Fig. 1c). Moreover, CRTAM_{EC} (IgV-IgC-stalk) has a solubility value of 0.6 (Fig. 1c). This data suggest that the stalk region is essential to provide solubility to CRTAM-Ig-domains as recombinant proteins.

3.2 Stalk Region Confers Solubility to Recombinant Immunoglobulin Domains of CRTAM

To assess whether the stalk region indeed confers solubility to immunoglobulin domains, we generated three constructions, which included the stalk region, CRTAM_{EC}, CRTAM_{IgV-Stalk}, and CRTAM_{IgC-Stalk}. These genes were cloned in the pET28a (+) plasmid (Novagen) with a

antisera identified CRTAM expressed in epithelial cells along the lateral membrane [6]. This particular finding demonstrates the solvent-exposition of the DKEEKE epitope and, most likely other residues of the stalk region. Indeed, the expression in *E. coli* of three different recombinant proteins of CRTAM (IgV-C, IgV, and IgC), which incorporate the stalk region, were recovered in the soluble fraction (Fig. 2). This result could be applied to improve solubility of other members of immunoglobulins superfamily. Further studies are needed to determine whether the stalk region of CRTAM plays a role in the functions of CRTAM at the cell surface of T lymphocytes.

These soluble recombinant proteins lack glycosylation, which, according to the resolved structure of the CRTAM IgV, glycosylation does not participate in the interaction with their Necl2 ligand [14]. In agreement, we found that the recombinant CRTAM_{EC} bind to Necl2 (Fig. 2e) in a cell-free system, and this interaction was stable during the dissociation stage, which suggests a high-affinity interaction. (Fig. 2e). Furthermore, previously we have shown that CRTAM_{EC} recognized Necl2 on the surface of dendritic cells, suggesting that the CRTAM_{EC} produce in *E. coli* has the native conformation [22]. These results demonstrate that the recombinant CRTAM_{EC} produced in bacterial without glycosylation is enough to recognize Necl2 to the same extent as the chimeric CRTAM-FC expressed in mammalian cells, which is available commercially. Moreover, these recombinant proteins allow identifying the IgC domain as the target of the C8 monoclonal antibody.

In summary, we described a system to produce and purify the CRTAM recombinant protein in *E. coli*. Remarkably, we described that the stalk region of CRTAM provides solubility to the recombinant protein. Our results also demonstrated that the recombinant CRTAM produced in *E. coli* has a natural conformation because it binds its ligand Nectin-like 2, and a specific monoclonal antibody recognizes it. Thus, our study is crucial for the production of CRTAM, but it may also be useful to produce other IgSFs in *E. coli*.

Funding The present work was supported by Cinvestav Grant to Vianey Ortiz Navarrete. Barragan-Galvez Juan Carlos is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomedicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) scholarship 489981. The funding agencies had no role in study design, data collection and analysis, preparation of the manuscript or the decision to publish.

References

- Frenette PSWD (1996) Adhesion molecules. *N Engl J Med* 335:43–45
- Poljak RJ, Amzel LM, Avey HP, Chen BL, Phizackerley RP, Saul F (1973) Three dimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3305–3310. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3305>
- Biophys B, Commun R, Sci CRA, Rivier J, Endocrine T, June S, Schitter M, Girling RL, Ely KR, Edmundson AB (1972) Structure of a λ-type Bence-Jones protein at 3.5-Å resolution. *Biochemistry* 12:4620–4631
- Takai Y, Nakanishi H (2003) Nectin and afadin: novel organizers of intracellular junctions. *J Cell Sci* 116:17–27. <https://doi.org/10.1242/jcs.00167>
- Takai Y, Miyoshi J, Ikeda W, Ogita H (2008) Nectins and nectin-like molecules: Roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:603–615. <https://doi.org/10.1038/nrm2457>
- Garay E, Patiño-López G, Islas S, Alarcón L, Canche-Pool E, Valle-Rios R, Medina-Contreras O, Granados G, Chávez-Munguía B, Juaristi E, Ortiz-Navarrete V, González-Mariscal L (2010) CRTAM: a molecule involved in epithelial cell adhesion. *J Cell Biochem* 111:111–122. <https://doi.org/10.1002/jcb.22673>
- Rubinstein R, Ramagopal UA, Nathenson SG, Almo SC, Fiser A (2013) Functional classification of immune regulatory proteins. *Structure* 21:766–776. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.02.022>
- Kennedy J, Vicari AP, Saylor V, Zurawski SM, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Zlotnik A (2000) A molecular analysis of NKT cells: identification of a class-I restricted T cell-associated molecule (CRTAM). *J Leukoc Biol* 67:725–734
- Yeh JH, Sidhu SS, Chan AC (2008) Regulation of a late phase of T cell polarity and effector functions by Crtam. *Cell* 132:846–859. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.013>
- Arase N, Takeuchi A, Unno M, Hirano S, Yokosuka T, Arase H, Saito T (2005) Heterotypic interaction of CRTAM with Necl2 induces cell adhesion on activated NK cells and CD8+ T cells. *Int Immunol* 17:1227–1237. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh299>
- Boles KS, Barchet W, Diacovo T, Cella M, Colonna M (2005) The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8. *Culture* 106:779–786. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0817.The>
- Patiño-Lopez G, Hevezi P, Lee J, Willhite D, Verge GM, Lechner SM, Ortiz-Navarrete V, Zlotnik A (2006) Human class-I restricted T cell associated molecule is highly expressed in the cerebellum and is a marker for activated NKT and CD8+ T lymphocytes. *J Neuroimmunol* 171:145–155. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.09.017>
- Hebditch M, Carballo-Amador MA, Charonis S, Curtis R, Warwicker J (2017) Protein-sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. *Bioinformatics* 33:3098–3100. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx345>
- Zhang S, Lu G, Qi J, Li Y, Zhang Z, Zhang B, Fan Z, Yan J, Gao GF (2013) Competition of cell adhesion and immune recognition: Insights into the interaction between CRTAM and nectin-like 2. *Structure* 21:1430–1439. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.06.006>
- Yasukawa T, Kanei-Ishii C, Maekawa T, Fujimoto J, Yamamoto T, Ishii S (1995) Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J Biol Chem* 270:25328–25331. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.43.25328>
- Austin C (2003) Novel approach to obtain biologically active recombinant heterodimeric proteins in *Escherichia coli*. *J Chromatogr B* 786:93–107. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00720-1](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00720-1)
- Symersky J, Novak J, McPherson DT, DeLucas L, Mestecky J (2000) Expression of the recombinant human immunoglobulin J chain in *Escherichia coli*. *Mol Immunol* 37:133–140. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(00\)00035-3](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(00)00035-3)
- Wong JS, Wang X, Witte T, Nie L, Carvou N, Kern P, Chang H-C (2003) Stalk region of β-chain enhances the coreceptor function

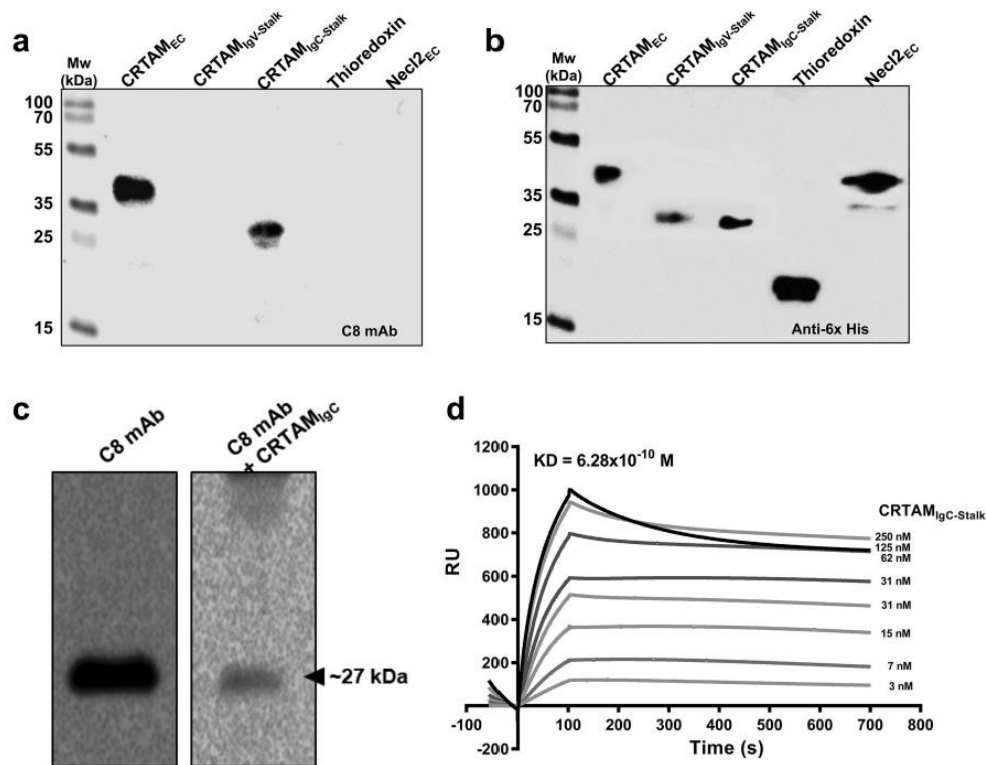


Fig. 3 C8 monoclonal antibody recognizes the constant domain of CRTAM with high affinity. **a** Western blot analysis of C8 mAb against CRTAM_{EC}, CRTAM_{IgV-Stalk}, CRTAM_{IgC-Stalk}, Thioredoxin and Necl2_{EC} recombinant proteins samples. **b** Anti-6x his tag antibody used for western blot against the recombinant samples above mentioned. **c** Western blot analysis was performed in the presence of 100 µg of CRTAM_{IgC-Stalk} protein to inhibit C8 mAb recognition

(right panel). **d** C8 mAb was captured to ~1500 RU on a CM5 sensor chip by amine coupling, and two-fold serial dilutions of CRTAM_{EC} (from 250 to 3 nM) were injected onto the immobilized C8 mAb. The binding curve response was measured in arbitrary resonance units (RU). The Langmuir binding 1:1 model was applied on this kinetic for KD determination. Mw, protein Ladder. EC extracellular region, IgV variable Ig-like domain, IgC constant Ig-like domain

4 Discussion

Two different groups have reported the crystal structure of the human Ig-V domain of CRTAM. In both cases, the Ig-V domain was expressed in *E. coli* as inclusion bodies, and it was successfully refolded [7, 14]. In agreement with those results, we expressed in *E. coli*, as inclusion bodies, either the two extracellular domains (IgV–IgC) or single variable domain (IgV) or single constant domain (IgC). On the contrary, with results obtained with other proteins [15–17], tagging the Ig-domains of CRTAM with thioredoxin did not improve the solubility, but it increased the expression of the insoluble aggregates, neither tagging proteins with GST solved the insolubility problems. Thus, the expression of the Ig-domains of CRTAM as recombinant proteins in *E. coli* represents a challenge. To overcome this problem, we considered the absence of the stalk region in those constructs. To the best of our knowledge, there is no description of the

importance of a stalk region in improving the solubility of an IgSF member produced in bacterial systems. However, various functions of stalk regions of protein expressed at the cell surface of different cells of the immune system have been described. For instance, the stalk region of CD8 β-chain is capable of fine-tuning the coreceptor function of CD8 [18]. The stalk region of IL-6R and IL-11R are required for classical signal transduction but not for their transport to the cell surface [19, 20]. The stalk region of Ly49A plays a fundamental role in receptor interactions with ligands on target cells and for signaling [21]. Nevertheless, we estimated the possible role of the stalk for improving the solubility of the recombinant proteins, because out of its 77 residues, 46 are hydrophilic, suggesting that these hydrophilic residues (shown in arrows in Supplementary Fig. 1a) might support solubility to CRTAM IgV–C domains. Besides, a B-cell epitope (DKEEKE) localized within the stalk region was used for raising a rabbit polyclonal antiserum. This

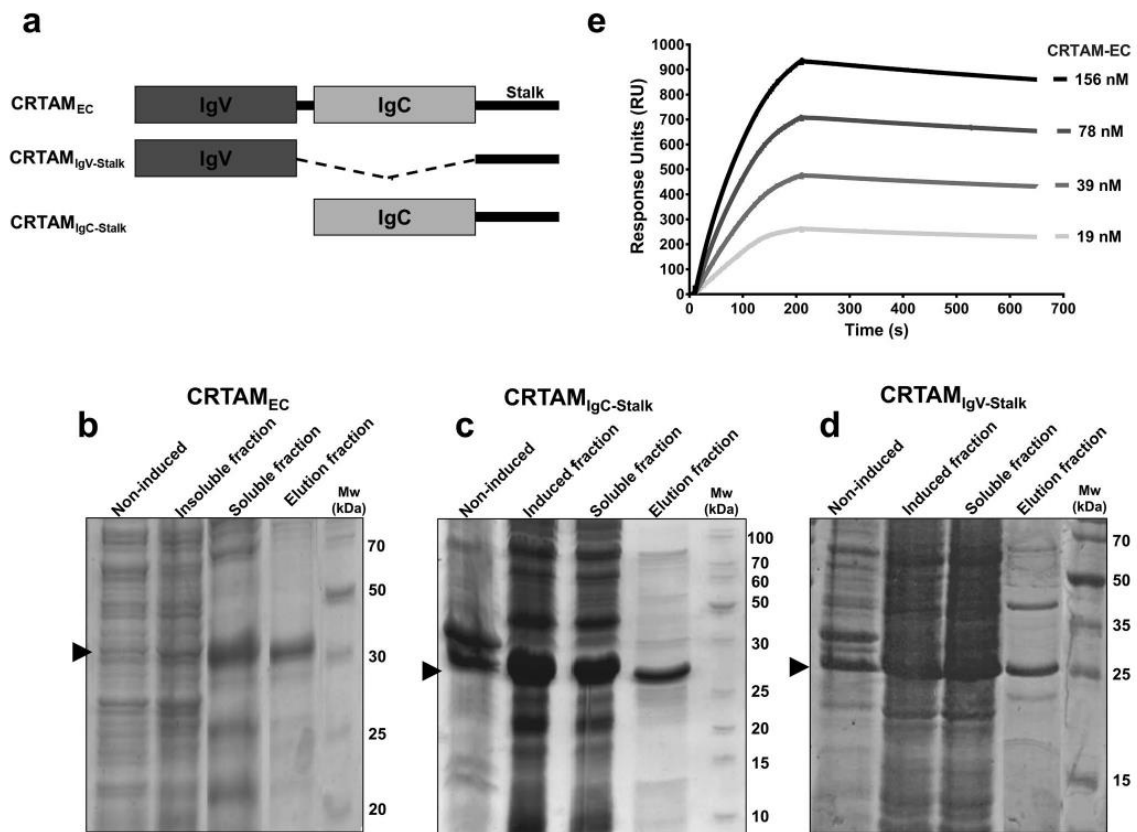


Fig. 2 Stalk region of CRTAM promotes soluble expression of recombinant proteins. **a** Schematic representation of the different constructions of CRTAM cloned in the pET28a bacterial expression system with a His₆x tag. SDS-PAGE analysis of bacterial lysates of non-induced, induced-insoluble, induced-soluble and purified fractions of the CRTAM_{EC} (**b**), CRTAM_{IgC-stalk} (**c**) or CRTAM_{IgV-stalk} (**d**) recombinant proteins. Bacterial lysates expressing the different con-

structions were purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). **e** SPR analysis of the CRTAM_{EC} and NECL2_{EC} interactions. Necl2 was covalently immobilized on a CM5 Chip and four two-fold serial dilutions of CRTAM_{EC} was injected into Chip at flow rate of 30 μ l/min. Mw, protein markers. EC, extracellular region; IgV, variable Ig-like domain; IgC, constant Ig-like domain. Arrowhead indicates the purified protein

has the adequate conformation to interact with its ligand *in vitro*.

3.4 C8 mAb Recognizes the Second IgC Domain of CRTAM with High Affinity

Finally, the recombinant proteins were used to evaluate the reactivity of the C8 mAb. As shown in Fig. 3a, western blot analysis, C8 mAb reacts with CRTAM_{EC} and with CRTAM_{IgC-Stalk}, while no signal was detected with CRTAM_{IgV-Stalk}, neither with thioredoxin protein used as a control of irrelevant protein (Fig. 3a). The C8 antibody did not show cross-reactivity with Necl2 (Fig. 3a lane 6), beside that IgC1 domain shares a similarity of 54.3% and identity of 27.2% with respect to IgC of CRTAM (Supplementary Fig. 3b). While all recombinant proteins were

identified with anti-6x His tag antibody in the western blot experiment (Fig. 3b). The reactivity of C8 mAb with CRTAM_{IgC-Stalk} was inhibited if the soluble recombinant CRTAM_{IgC-Stalk} was added to C8 mAb before incubation with blotted CRTAM_{IgC-Stalk} protein (Fig. 3c). These data demonstrate that C8 is specific recognizing the IgC domain of CRTAM. We also tested the anti-human CRTAM from R&D systems (clone #210213). This antibody also reacts with both the CRTAM_{EC} and CRTAM_{IgC-stalk} recombinant proteins (Supplementary Fig. 4). Furthermore, we determined the affinity of C8 mAb. For it, the purified antibody was covalently bound to a CM5 chip, and a gradient of CRTAM_{IgC-Stalk} was used to measure affinity by SPR. C8 mAb bound to CRTAM_{IgC-stalk} with a K_d value of 6.2×10^{-10} M (0.62 nM) as it is shown in the kinetics (Fig. 3d).

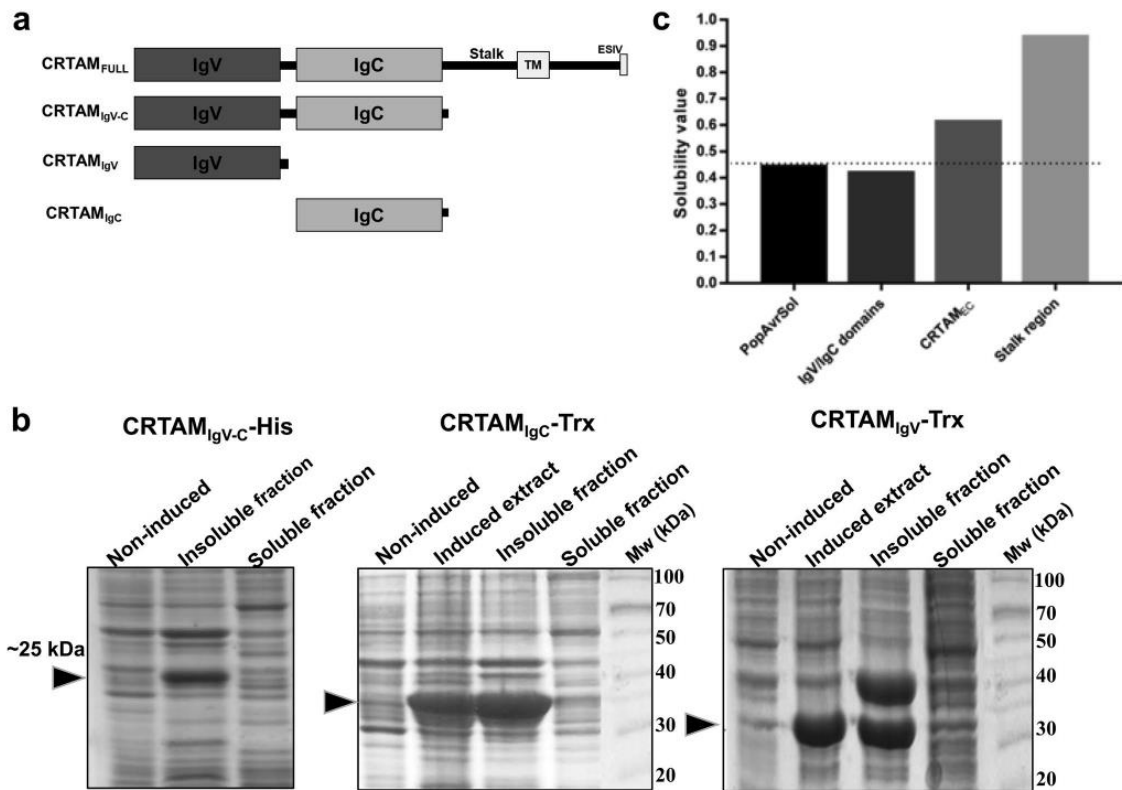


Fig. 1 Expression of CRTAM immunoglobulin domains as inclusion bodies **a** Schematic representation of the constructions of CRTAM cloned in the pET28a (+) and pET32a (+) plasmids with His or Trx tags, respectively. **b** SDS-PAGE analysis of bacterial lysates of non-induced, induced- insoluble and induced-soluble fractions of the constructions CRTAM_{IgV-C}, CRTAM_{IgC} and CRTAM_{IgV}. **c** Solubility analysis of the IgV–C domains, CRTAM_{EC} and Stalk regions.

The amino acid sequence of each region was inputted into software Protein-Sol for calculation of solubility values. A value of 0.45 was used as the PopAvrSol average of solubility. Mw, protein markers. CRTAM_{EC}, extracellular region of CRTAM; IgV, variable Ig-like domain; IgC, constant Ig-like domain; Trx, thioredoxin; His, histidine.

single His6x tag (Fig. 2a), and the plasmids were electroporated in *E. coli* Rosetta 2-star. The three recombinant proteins were expressed and recovered in the soluble fractions. Then, these recombinant proteins were purified by IMAC chromatography. SDS-PAGE showed that they have the expected molecular mass of ~35 kDa for CRTAM_{EC}, ~27 kDa for CRTAM_{IgV-Stalk}, and ~26 kDa for CRTAM_{IgC-Stalk} (Fig. 2b–d). The constructions of CRTAM_{EC} and CRTAM_{IgC-Stalk} have also cloned in the pET32a (+) plasmid (Novagen) and tagged with thioredoxin. These recombinant proteins were also recovered in the soluble fractions and purified by IMAC chromatography. Moreover, we also observed, based on the thickness of the bands of the SDS-PAGE gels, higher expression in comparison with the single His6x tag-recombinant proteins (Supplementary Fig. 2a and b). These results demonstrated that the stalk region is necessary for soluble expression, while thioredoxin increases

expression of the extracellular domains of CRTAM as recombinant proteins in *E. coli*.

3.3 The Recombinant CRTAM_{EC} Recognizes Its Nectin-Like 2 Ligand

An SPR analysis was used to determine if the recombinant CRTAM_{EC} recognized Nectin-Like 2. The extracellular region of Nectin-Like 2 (Nectin-Like 2_{EC}) was cloned into pET28a and expressed in Rosetta 2-star, and it was purified by IMAC (Supplementary Fig. 3a). Nectin-Like 2_{EC} was immobilized to a CM5 chip sensor covalently, and two-fold serial dilutions of CRTAM_{EC} was injected into the chip. The sensorgram shows that CRTAM_{EC} recognizes Nectin-Like 2_{EC} with a minimal concentration of 19 nM. Moreover, the binding was stable during the dissociation stage (Fig. 3e). This data suggest that soluble recombinant protein produced in bacteria besides lacking glycosylation

- of CD8. *J Immunol* 171:867–874. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.2.867>
19. Lokau J, Garbers C (2018) The length of the interleukin-11 receptor stalk determines its capacity for classic signaling. *J Biol Chem* 293:6398–6409. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.001879>
 20. Baran P, Nitz R, Grotzinger J, Scheller J, Garbers C (2013) Minimal interleukin 6 (IL-6) receptor stalk composition for IL-6 receptor shedding and IL-6 classic signaling. *J Biol Chem* 288:14756–14768. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.466169>
 21. Ito D, Iizuka YM, Katepalli MP, Iizuka K (2009) Essential role of the Ly49A stalk region for immunological synapse formation and signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:11264–11269. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900664106>
 22. Beristain-Covarrubias N, Canche-Pool EB, Ramirez-Velazquez C, Barragan-Galvez JC, Gomez-Diaz RA, Ortiz-Navarrete V (2017) Class I-restricted T cell-associated molecule is a marker for IFN- γ -producing iNKT cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes. *J Interf Cytokine Res* 37:39–49. <https://doi.org/10.1089/jir.2016.0006>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.