



CENTRO DE INVESTIGACIÓN
Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO

Cinvestav

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“IDENTIFICACIÓN DE LA ONCOPROTEÍNA LYN COMO UN
POTENCIAL NUEVO SUSTRATO DE LA PROTEÍNA
FOSFATASA DE TIROSINAS PTP1B”**

T E S I S

QUE PRESENTA:
MIGUEL RUIZ DE LA CRUZ

PARA OBTENER EL GRADO DE
**MAESTRO EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOMEDICINA MOLECULAR**

Directores de tesis:

Dr. Luis Enrique Arias Romero
Dra. Isaura Meza Gómez Palacio

Ciudad de México

Agosto, 2019

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Luis Enrique Arias Romero, Profesor Titular B de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM y en el laboratorio de la Dra. Isaura Meza Gómez Palacio, Investigadora emérita del Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados de IPN.

Durante la realización de esta tesis, el estudiante recibió el apoyo de la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número (CVU/Becario): **854825/632405**.

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

ASESORES

Dr. Vianney F. Ortiz Navarrete

Investigador Principal en el Departamento de Biomedicina Molecular
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados.- IPN

Dr. Marco A. Loza Mejía

Maestro de tiempo completo/Investigador B en la Facultad de Ciencias
Químicas
Universidad La Salle

Dr. Michael Schnoor

Investigador Principal en el Departamento de Biomedicina Molecular
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados.- IPN

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
LISTADO DE ABREVIATURAS	8
I. ABSTRACT.....	11
II. RESUMEN	12
III. INTRODUCCIÓN	13
3.1. Generalidades de cáncer de mama	13
3.1.1 Epidemiología	13
3.1.2 Epidemiología en México	14
3.1.3. Subtipos moleculares de cáncer de mama.....	14
3.1.3.1 Luminal-A	14
3.1.3.2 Luminal-B	14
3.1.3.3 HER2 positivo.....	15
3.1.3.4 Triple negativo	15
3.2. Proteínas tirosina cinasas (PTKs) y proteínas fosfatasas de tirosina (PTPs). 16	
3.2.1. PTP1B (Protein Tyrosine Phosphatase 1 B)	17
3.2.1.1 PTP1B en cáncer	18
3.2.1.2 PTP1B en cáncer de mama.....	19
3.2.2. Proteína tirosina cinasa Lyn	20
3.2.2.1 Lyn en cáncer	23
3.2.2.2 Lyn en cáncer de mama	24

IV. JUSTIFICACIÓN	25
V. HIPÓTESIS.....	26
VI. OBJETIVOS	26
6.1. Objetivo general	26
6.2. Objetivos específicos	26
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	27
7.1. Estudios <i>in silico</i> : docking péptido Lyn-proteína PTP1B y dinámica molecular.....	27
7.2. Ensayo de fosfatasa <i>in vitro</i>	28
7.3. Cultivo celular	28
7.3.1. HEK293T	28
7.4. Proteína mutante trampa Myc/His- PTP1B D181A	28
7.5. Clonación del cDNA de Lyn en el vector de expresión eucarionte pDest520 HA	29
7.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) del pHA-Lyn.....	29
7.7. Transformación en bacterias competentes.....	30
7.7.1 pHA-Lyn	30
7.7.2 pCDNA4 Myc/His-PTP1B D181A	30
7.8. Purificación de DNA plasmídico (miniprep)	31
7.9. Determinación de la concentración de DNA plasmídico.....	32
7.10. Secuenciación de plásmidos purificados.....	32
7.11. Transfección transitoria de pCDNA4 Myc/His-PTP1B D181A.....	32
7.12. Transfección transitoria de pHA-LYN.....	33
7.13. Cuantificación de proteínas	33

7.14. SDS-PAGE	34
7.15. Western Blot	34
7.16. Co-inmunoprecipitación.....	35
7.17. Colocalización mediante microscopía confocal	36
VIII. RESULTADOS	37
8.1. El análisis por homología <i>In silico</i> y docking identificó a Lyn como un posible sustrato directo de PTP1B.....	37
8.1.1 Modelado <i>In silico</i> del péptido Lyn.....	38
8.1.2 Docking local del fosfopéptido Lyn – Proteína PTP1B	39
8.1.3 Simulación dinámica molecular del complejo formado entre PTP1B y péptido Lyn.....	42
8.2. El residuo de tirosina 397 de Lyn es desfosforilado por PTP1B <i>In vitro</i>	44
8.3. Expresión en células de mamífero de la proteína Myc-PTP1B D181A	47
8.4. Clonación del ORF de Lyn y obtención de la proteína HA-Lyn	48
8.5. PTP1B y Lyn interactúan en un contexto celular	51
8.5.1 Co-inmunoprecipitación de PTP1B D181A y Lyn	51
8.5.2 Colocalización de PTP1B D181A y Lyn.....	53
IX. DISCUSIÓN	54
X. CONCLUSIONES	57
XI. REFERENCIAS	58
XII. TABLAS ANEXO.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diez tipos de cáncer más importantes para los nuevos casos y muertes estimadas por sexo, Estados Unidos, 2018	13
Figura 2. Dominios estructurales y regulación de PTP1B	17
Figura 3. Señalización metabólica y oncogénica de PTP1B	19
Figura 4. Dominios estructurales de la familia Src	21
Figura 5. La familia de Src es subdivida en 3 grupos: Lyn-related, Src-related y PTK6/Brk.....	21
Figura 6. Regulación y vías de señalización de Lyn	23
Figura 7. Estrategia de modelado por homología del péptido Lyn y Docking local del péptido Lyn y proteína PTP1B.....	37
Figura 8. Predicción de la estructura tridimensional del fosfopéptido Lyn	38
Figura 9. Potenciales interacciones del péptido Lyn con PTP1B.....	41
Figura 10. Selección de cluster de acuerdo a la conformación estable	42
Figura 11. Variación de la posición atómica (RMSD) del complejo PTP1B y fosfopéptido Lyn.....	43
Figura 12. Distancia del átomo de fósforo (pY ³⁹⁷) de la secuencia del péptido Lyn al sitio catalítico del residuo de Cys215 de PTP1B	44
Figura 13. Ensayo de actividad enzimática de PTP1B <i>in vitro</i>	45
Figura 14. Cinética enzimática de Michaelis-Menten (MM).....	47
Figura 15. Expresión en células de mamífero de la proteína Myc-PTP1B D181A.48	

Figura 16. Clonación del ORF del cDNA Lyn.....	49
Figura 17. Identificación de colonias positivas mediante PCR	49
Figura 18. Electroferograma del plásmido HA-Lyn	50
Figura 19. Expresión en células de mamífero de la proteína HA-Lyn	51
Figura 20. Co-inmunoprecipitación entre PTP1B D181A y Lyn	52
Figura 21. La oncoproteína PTP1B y Lyn colocalizan en un contexto celular	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Subtipos intrínsecos de cáncer de mama	15
Tabla 2. Resultados del docking péptido-proteína realizado con ClusPro®	40

LISTADO DE ABREVIATURAS

µg	microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
AML	Leucemia mieloide Aguda
ATP	Adenosín trifosfato
BCLL	Leucemia linfoide de células B
BLK	Cinasa de linfocitos B
CD45	Cúmulo de diferenciación 45 o Antígeno común leucocitario
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CM	Cáncer de mama
CML	Leucemia mieloide crónica
CSK	Cinasa del extremo C-terminal de Src
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
EMT	Transición epitelio mesénquima
EphA2	Receptor de efrinas tipo A2
ER	Receptor de estrógenos
FcεR1	Receptor de alta afinidad de eosinófilos tipo 1
FcRγ	Receptor Fc de inmunoglobulina G
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GTP	Guanosín trifosfato
HCK	Cinasa de células hematopoyéticas
HEK	Riñón embrionario humano
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidermal tipo 2
IgG	Inmunoglobulina G
IR	Receptor de Insulina
ITAM	Motivo de activación basado en inmunoreceptor de tirosina
ITIM	Motivo de inactivación basado en inmunoreceptor de tirosina

Kb	Kilobase
LB	Medio Luria Bertani
LCK	Proteína tirosina cinasa de linfocitos
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensajero
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
NRTK	Tirosina cinasa no receptora
NSCLC	Cáncer de pulmón no microcítico
OD	Densidad óptica
ORF	Marco abierto de lectura
p53	Proteína supresora de tumores 53
p62Dok	Proteína de acoplamiento 1
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfatidil Inositol 3 cinasa
PLCγ	Fosfolipasa C Gamma
PR	Receptor de progesterona
PTK	Proteína tirosina cinasa
PTM	Modificaciones postraduccionales
PTP	Proteína tirosina fosfatasa
PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
PTPN2	Proteína tirosina fosfatasa no receptor tipo 2
pY	Fosfotirosina
Ps	Picosegundos
PVDF	Difluoruro de polivinilidieno
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Revoluciones por minuto

SDS	Dodecil sulfato de sodio
SH2/3	Homólogo a Src 2/3
SHP1/2	Fosfatasa con homología Src 1/2
SILAC	Marcaje isotópico estable con aminoácidos en cultivo celular
TBS	Buffer de tris salino
TEMED	Tetrametiletilendiamina
Tm	Temperatura media de desnaturalización

I. ABSTRACT

PTP1B is a classical non-transmembrane protein tyrosine phosphatase that plays a key role in metabolic signaling and is a promising drug target for type 2 diabetes and obesity. Mounting evidence also indicates that PTP1B is overexpressed in colon, breast and ovarian cancers, and plays an unexpected positive role in HER2 signaling. In addition, experiments using cultured cells and mouse models of breast cancer have yielded conflicting results regarding the identity of the key substrates of PTP1B that mediate its positive role in HER2 driven transformation. In order to identify possible molecular targets of PTP1B that mediate its positive role in HER2 positive breast cancer cells, we undertook a SILAC-based strategy, followed by phospho-peptide enrichment, and quantitative MS. This proteomic approach allowed us to identify more than 380 potential novel targets of PTP1B. In this work, we will focus on Lyn, a non-receptor tyrosine kinase that is frequently hyperactive in several types of cancer as a novel PTP1B substrate. Molecular docking studies revealed stable interactions between the PTP1B catalytic domain and Lyn. In addition, *in vitro* phosphatase assays confirmed that a phosphopeptide corresponding to the residues 392-402 of Lyn is dephosphorylated by PTP1B at Tyrosine residue 397. Finally, co-immunoprecipitation and co-localization experiments showed that PTP1B interacts with Lyn in a cellular context, suggesting novel roles of this phosphatase in the regulation of several Lyn-controlled cellular processes, including proliferation, differentiation, apoptosis and activation of immune cells.

II. RESUMEN

Las proteínas fosfatasa de tirosina (PTPs) juegan un papel importante en la regulación de diversos procesos celulares como la proliferación, migración, sobrevivencia y apoptosis entre otros. Una molécula que ha llamado la atención de la industria farmacéutica en los últimos años es la proteína fosfatasa de tirosinas 1B (PTP1B), debido a que se encuentra sobreexpresada en cáncer de mama, hígado, colon, esófago y ovario. Los estudios más detallados sobre la participación de PTP1B en cáncer, han sido en modelos de cáncer de mama positivos a HER2, en los que se ha observado que PTP1B promueve la transformación celular al activar las vías de las MAPK y de Src. Sin embargo, estudios con modelos murinos de cáncer de mama deficientes de PTP1B arrojan resultados inconsistentes en lo que se refiere a los niveles de activación de las vías de señalización antes mencionadas, por lo que es necesario identificar nuevos sustratos de esta fosfatasa que pudiesen estar involucrados en el proceso de transformación celular. Con este propósito, se realizó un estudio de fosfoproteómica, en el que se identificaron más de 380 potenciales nuevos sustratos de PTP1B. De manera interesante, entre estos potenciales sustratos se encuentra la proteína tirosina cinasa de tipo no receptor Lyn, la cual se encuentra hiperactiva en distintas neoplasias. En este trabajo, mostramos que PTP1B forma un complejo estable con Lyn *in silico*, y que un péptido correspondiente a los residuos 392-402 de Lyn fosforilado en el residuo de Y397 es desfosforilado por PTP1B *in vitro*, y que ambas proteínas interactúan en un contexto celular mediante experimentos de co-inmunoprecipitación y co-localización. Estos resultados sugieren fuertemente que Lyn es un nuevo sustrato de PTP1B.

III. INTRODUCCIÓN

3.1. Generalidades del cáncer de mama.

3.1.1. Epidemiología.

En la población femenina, el cáncer de mama es la primera causa de muerte por neoplasias a nivel mundial. En el 2017 hubo 1.7 millones de casos nuevos (25% de todos los cánceres en las mujeres) y 571 mil muertes por cáncer de mama (15% de todas las muertes por cáncer en las mujeres) [1].

Cerca del 43% de los casos nuevos estimados y el 34% de las muertes por cáncer se produjeron en Europa y América del Norte.

Se estima que en el año 2018, se diagnosticarán 266,120 casos nuevos de cáncer de mama invasivo en mujeres; 2,550 casos en hombres; y 63,960 nuevos casos de lesiones mamarias *in situ* en mujeres en los Estados Unidos [2]. Figura 1.

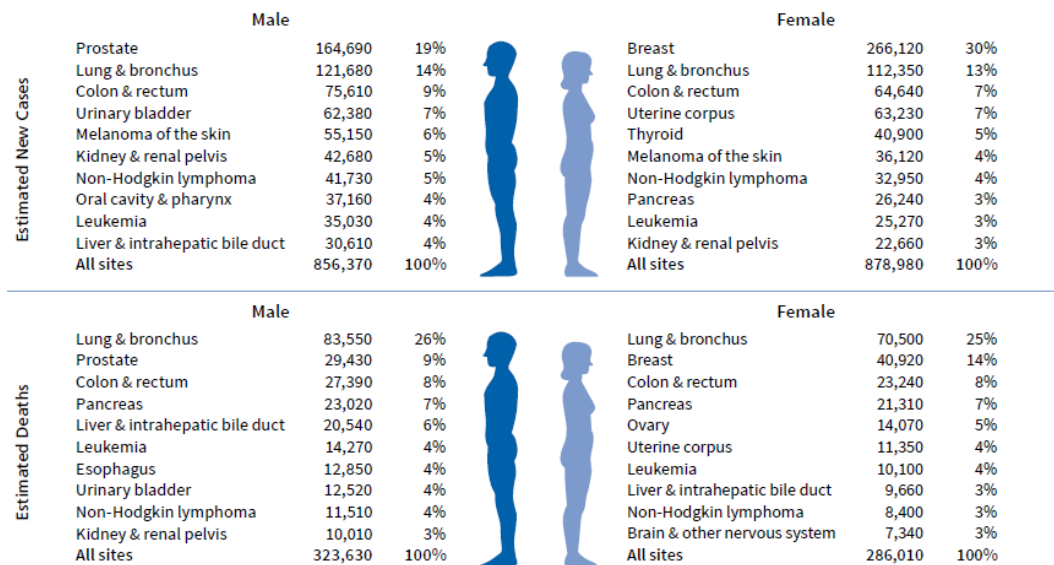


Figura 1. Diez tipos de cáncer más importantes para los nuevos casos y muertes estimadas por sexo, Estados Unidos, 2018 [2].

3.1.2. Epidemiología en México.

En México, cada año se registran más de 13,700 nuevos casos de cáncer de mama, de los cuales el 90% se detectan en estadio tardío. La edad promedio de diagnóstico es a los 58 años.

En la población mexicana, el cáncer de mama se encuentra como la primera causa de fallecimiento por cáncer en la mujer a partir del año 2006. En el año 2009, se registraron 4,854 muertes en mujeres de 25 años y más; registrándose alrededor de 13 muertes diarias, es decir, alrededor de cada 2 horas muere una mujer por esta causa [3]. Es en 2016 donde se ubica la tasa de mortalidad más alta en mujeres, con 16 defunciones por cada 100 000 mujeres de 20 años y más. Las tasas de mortalidad por esta enfermedad entre los varones son muy bajas; sin embargo, estos registros evidencian la presencia de este padecimiento también en hombres [4].

3.1.3. Subtipos moleculares de cáncer de mama.

Los estudios de microarreglos de expresión génica han permitido identificar distintos subtipos moleculares de tumores basados en análisis de expresión simultáneos de miles de genes en un solo experimento (Tabla 1). Perou et al. (2000) analizaron por primera vez los patrones de expresión génica en tejidos de mama humano normales o malignos de individuos con cáncer de mama, logrando identificar cuatro diferentes subtipos [5, 6].

3.1.3.1. Luminal A

El luminal A es el subtipo más frecuente y representa entre el 40% -50% de todos los tumores de mama. Este subtipo comúnmente tiene bajo grado histológico, bajo grado de pleomorfismo nuclear, baja actividad mitótica e histológicamente se correlaciona con buen tratamiento [7, 8].

3.1.3.2. Luminal B.

Los tumores del subtipo Luminal B oscilan entre el 15% -20% de los cánceres de mama y tienen un fenotipo más agresivo, mayor grado histológico, índice proliferativo y peor pronóstico [9]. Éste subtipo tiene una tasa de recurrencia más

alta y tasas de supervivencia disminuida después de la recaída comparándolo con el subtipo luminal A [10].

3.1.3.3. HER2 positivo.

Los tumores HER2 positivo alcanzan el 15-20% de los cánceres de mama. La positividad de HER2 confiere un comportamiento biológico y clínico más agresivo. Estos tumores se caracterizan por una expresión alta del gen HER2 y otros genes asociados con la ruta HER2 y/o la amplificación del gen HER2 localizado en el cromosoma 17q12 [11]. Estos tumores tienen alto grado de proliferación, el 75% tienen un alto grado histológico y más del 40% tienen mutaciones de p53 [12]. Los tumores del subtipo HER2 positivos son negativos para el receptor de estrógenos y progesterona.

3.1.3.4. Triple negativo

El subtipo triple negativo comprende del 5% al 10% de todos tipos de cánceres de mama [13]. Se asocian con una mala formación de túbulos, infiltrado linfocítico visible e índices mitóticos y proliferativos considerablemente altos. Frecuentemente son tumores ductales infiltrantes con un esquema de desarrollo sólido, comportamiento clínico agresivo y una alta tasa de metástasis al cerebro y al pulmón [14].

Tabla 1. Subtipos intrínsecos de cáncer de mama.

Subtipo intrínseco	Definición clínico-patológicas	*Un nivel de <14% mejor correlacionado con la definición de expresión génica de Luminal A basada en los resultados en un solo laboratorio de referencia. Punto de corte PR de $\geq 20\%$ para corresponder mejor al subtipo Luminal A.
Luminal-A [15]	<ul style="list-style-type: none"> - ER and PR positivo, - HER2 negativo, - Ki-67 "Bajo" * 	
Luminal-B	<ul style="list-style-type: none"> - ER positivo - PR positivo - HER2 positivo/negativo - Ki-67 "alto" 	
HER2 positivo	<ul style="list-style-type: none"> - HER 2 positivo (no-luminal) - HER2 sobreexpresado ó amplificado - ER y PR ausente 	

Triple negativo	<ul style="list-style-type: none"> - Triple negativo (ductal) - ER and PR ausente - HER2 negativo 	En ocasiones es referido como "basal", debido a que expresa proteínas comúnmente expresadas en las células basales mioepiteliales de la glándula mamaria, como las citoqueratinas 14 y 16. Existe una coincidencia del 80% entre subtipo "triple negativo" e intrínseco "basal"
-----------------	--	---

Modificado de [16]

3.2. Proteínas tirosina cinasas (PTKs) y proteínas fosfatasas de tirosina (PTPs)

La fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, es uno de los mecanismos de modificación postraduccional más importantes para la regulación de diversos procesos celulares, incluyendo la proliferación, migración, transcripción de genes y progresión del ciclo celular entre otros. Las PTKs (*Protein Tyrosine Kinase*) son enzimas que añaden un grupo fosfato sobre residuos de tirosina de proteínas sustrato, causando un cambio conformacional-estructural, y desencadenando cascadas de señalización. Una vez que una proteína fosforilada ha cumplido con su propósito, ésta requiere ser desfosforilada mediante la acción de otras enzimas llamadas PTPs (*Protein Tyrosine Phosphatases*). Estas fosfatasas regulan la acción de las PTKs. Por consiguiente, un desbalance entre la actividad de las PTKs y PTPs está estrechamente ligado en la etiología de diversas enfermedades, como por ejemplo el cáncer [17].

PTPs (*Protein Tyrosine Phosphatases*)

La función principal de las PTPs es revertir la acción de fosforilación de las PTKs, pudiendo tener efectos de activación o inactivación sobre sus sustratos [18]. El dominio catalítico de las PTPs contiene aproximadamente 280 aminoácidos y un residuo de cisteína altamente conservado, que es requerido para la actividad catalítica.

En el genoma humano se han identificado 107 PTPs, las cuales pueden ser de tipo receptor o no receptor[19]. Las primeras PTPs de tipo no receptor identificadas fueron PTP1B (PTPN1) y TC-PTP (PTPN2).

3.2.1. PTP1B (*Protein Tyrosine Phosphatase 1 B*)

PTP1B fue la primera de las fosfatasa de su clase (Clase I del tipo no receptor) en ser purificada [20, 21], clonada [22] y cristalizada [23]. La mayor parte de los descubrimientos sobre los mecanismos de regulación, estructura y función de esta clase de fosfatasa fueron descritos en PTP1B [24]. El gen PTP1B (PTPN1), se encuentra localizado en el cromosoma 20, en el locus q13.1 – q13.2. La proteína codificada por este gen tiene un peso de 50 KDa; consta de un dominio catalítico de 37KDa en su extremo amino terminal (residuos de 1-300), seguido de una región reguladora que comprende de 80-100 residuos y un dominio de anclaje al retículo endoplásmico (residuos de 400-435) [25].

La actividad catalítica de la PTP1B es regulada por su localización en la superficie de la membrana del retículo endoplásmico, lo cual puede restringir su acceso a los sustratos. Además, la actividad enzimática de PTP1B, puede ser regulada por modificaciones post-traduccionales como oxidación [26], fosforilación [27], sumoilación [28] y proteólisis [29]. Figura 2.

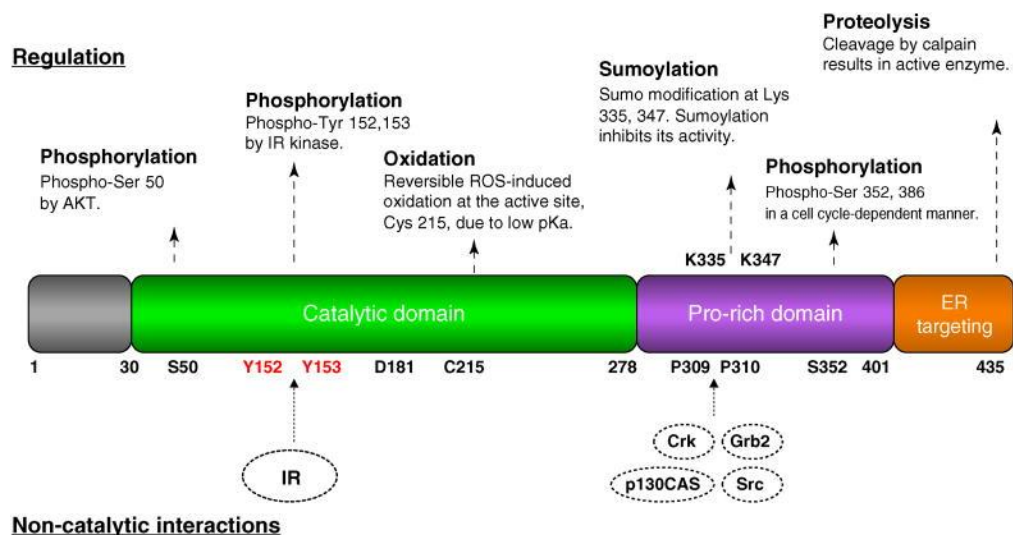


Figura 2. Dominios estructurales y regulación de PTP1B [24]

Desde hace más de dos décadas, se ha reconocido que PTP1B tiene un papel importante en la regulación negativa de la actividad de los receptores de Insulina y Leptina [30, 31], ya que su delección en modelos murinos causa hipersensibilidad a la insulina que está asociada con un incremento marcado de la fosforilación del receptor de insulina y sus elementos río abajo del receptor.

3.2.1.1. PTP1B en cáncer.

Los primeros estudios referentes al papel de esta fosfatasa en fibroblastos transformados con Neu (el homólogo en rata a HER2), mostraron que la sobreexpresión de PTP1B inhibe el crecimiento independiente de contacto, la formación de colonias y el crecimiento tumoral [32]; mientras que en fibroblastos transformados con v-Src, solo se observó una modesta disminución de la proliferación cuando PTP1B se sobreexpresa [33]. Aunque los primeros estudios de la función de PTP1B en células transformadas sugerían que esta enzima podía actuar como un supresor tumoral, durante la década pasada varios reportes mostraron que PTP1B también podía actuar como un oncogén. Específicamente, se reportó que PTP1B desfosforila a la oncoproteína Src en el residuo de Tirosina 527 asociado a su inhibición, promoviendo su activación y aumentando las tasas de proliferación y la sobrevivencia [34-37]. Recientemente, se ha sugerido que otro sustrato de PTP1B, la proteína p62^{DOK}, también podría estar involucrada en la transformación celular, ya que al ser desfosforilada por PTP1B, pierde su función inhibitoria de la vía de Ras/RAF/MEK/ERK [38].

Más recientemente, se ha reportado que la amplificación del locus 20q13, donde se encuentra ubicado el gen que codifica para PTP1B, está asociada con la oncogénesis en diversas neoplasias como son los cánceres pancreático [39], gástrico [40], próstata [41], mama [42, 43], y ovario [44]. Esto se correlaciona con un mal pronóstico. Por lo tanto, la sobreexpresión de PTP1B puede promover la tumorigénesis. Sin embargo, el mecanismo por el cual PTP1B promueve la progresión del cáncer de mama, no se ha establecido por completo.

Estudios recientes han mostrado que el silenciamiento de PTP1B disminuye la proliferación e induce el arresto del ciclo celular y la apoptosis. Además, el silenciamiento de PTP1B reduce la migración y la invasión y revierte la transición epitelio-mesénquima (EMT) [45].

Consistentemente, la expresión elevada de PTP1B promueve la proliferación celular y la metástasis en el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) mediante la activación, mediada por Src, de las vías de señalización Ras/Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt/mTOR [46].

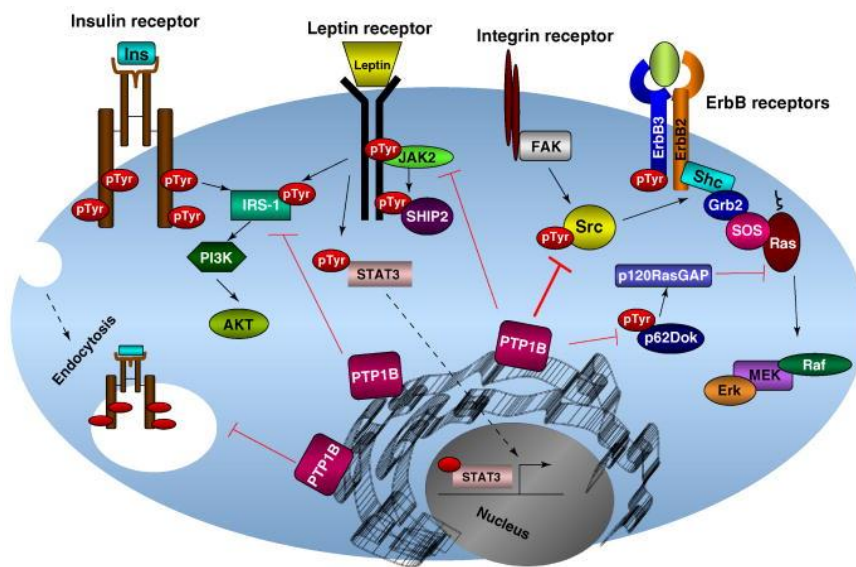


Figura 3. Señalización metabólica y oncogénica de PTP1B [24]

3.2.1.2. PTP1B en cáncer de mama.

La participación de PTP1B en el desarrollo de cáncer de mama fue confirmada con la publicación de dos artículos [47, 48], en donde se demostró que la ausencia de PTP1B en un modelo murino de cáncer de mama dependiente de Neu retrasa considerablemente el desarrollo de tumores de mama y evita la metástasis al pulmón. Adicionalmente, se comprobó que la inhibición farmacológica de PTP1B retrasa el inicio de la formación de tumores mamarios y reduce la

metástasis pulmonar en el modelo de ratón MMTV HER2/Neu a través de la señalización de Ras/Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt/mTOR [48].

Adicionalmente, se ha reportado que el 49% de los tumores de mama presentan sobreexpresión de PTP1B y que el 53.9% de los tumores del subtipo luminal B con expresión de HER2, también expresan altos niveles de esta fosfatasa [49]. Por estas razones, PTP1B ha llamado la atención de la industria farmacéutica y se le ha propuesto como un potencial blanco terapéutico para el tratamiento de diabetes, obesidad, y cáncer [24].

Uno de los sustratos de PTP1B que ha sido asociado al proceso de transformación celular, es la proteína p62^{DOK}, ya que al ser desfosforilada por PTP1B, pierde la función inhibitoria sobre la vía de Ras/RAF/MEK/ERK [38]. Adicionalmente, se ha reportado que PTP1B desfosforila a la oncoproteína Src en el residuo Tirosina 527 que está asociado a su inhibición, promoviendo su activación y aumentando las tasas de proliferación y la sobrevivencia [34-37] Sin embargo, los niveles de fosforilación de los sustratos anteriormente mencionados es inconsistente en los distintos modelos animales y celulares estudiados hasta la fecha, por lo que es necesario identificar nuevos sustratos de PTP1B que pudiesen estar involucrados en el proceso de transformación celular. Con este objetivo, recientemente el laboratorio del Dr. Arias identificó nuevos sustratos potenciales de PTP1B, que pudiesen estar involucrados en este proceso. de transformación celular, empleando la técnica de “Marcaje Isotópico Estable en Cultivo Celular” o SILAC, por sus siglas en inglés. Uno de estos potenciales nuevos sustratos, la proteína cinasa de tirosinas Lyn, es en el cual he enfocado mi proyecto de maestría.

3.2.2. Proteína tirosina cinasa Lyn

Las PTKs catalizan la transferencia de un grupo fosfato de ATP a los residuos de tirosina en los sustratos, creando sitios de unión para el reclutamiento de proteínas de señalización río abajo. Existen dos clases de PTK presentes en las células: los receptores de membrana con actividad de PTK y las PTK no receptoras

(NRTK) [50]. Las NRTK se subdividen en 9 familias principales, con base en la similitud en las secuencias de sus dominios de cinasa [51, 52].

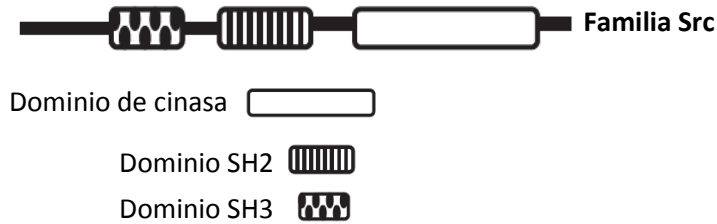


Figura 4. Dominios estructurales de la familia Src [50].

El grupo más grande de NRTK es la familia Src. Figura 4. Se divide en 3 subfamilias principales: la relacionada con Lyn, la relacionada con Src y la relacionada con PTK6/Brk. La familia relacionada con Lyn consta de cuatro miembros: Lyn, la cinasa de células hematopoyéticas (Hck), la proteína tirosina cinasa específica de linfocitos (Lck) y la cinasa de linfocitos B (Blk) [53]. Las demás subfamilias de Src se muestran en la figura 5.

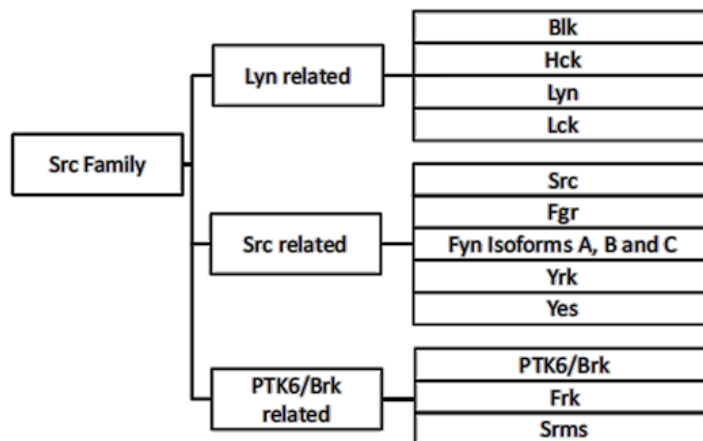


Figura 5. La familia de Src es subdivida en 3 grupos: Lyn-related, Src-related y PTK6/Brk. modificada de [50].

Lyn se identificó inicialmente como una cinasa que se expresa preferencialmente en células de origen hematopoyético. Estudios posteriores mostraron que Lyn se expresa en diversos tejidos y participa en la transmisión de señales de varios receptores, como el receptor de células B [54], el receptor de GM-CSF [55], FcER1 [56], Eporeceptor [57], y c-kit [58], entre otros. Lyn fosforila varias moléculas de señalización, incluidos los motivos de inhibición/activación basados en tirosina del inmunoreceptor (ITIM/ITAM) [59], PIR-B/SIRP α y FcR γ [55], así como PI3K, FAK, Ras-GAP, PLC γ 1/2, HS1, Cbp/PAG1, STAT5 y MAPK.

Estructuralmente Lyn posee una región N-terminal con un dominio único (UN) que funcionalmente le permite su anclaje a la membrana plasmática. Este dominio contiene un sitio de miristoilación, además de un sitio de palmitoilación [60], seguido de dominios canónicos de homología a Src (SH2 y SH3) para su asociación con otras proteínas [51]. Hacia su extremo carboxilo terminal se encuentra un dominio catalítico con actividad de cinasa de tirosinas. Figura 6A.

En su estado inactivo, Lyn es fosforilada por la cinasa del extremo C-terminal de Src (Csk), creando un sitio de unión para su propio dominio SH2. El dominio SH3 de Lyn puede unirse en cis a un motivo rico en prolina situado entre los dominios SH2 y de cinasa (región de bisagra), lo que ayuda a generar una confirmación de cinasa inactiva estable.

La activación de Lyn implica desfosforilación de la tirosina 508 por fosfatasas tales como CD45 [61] y SHP-2 [62], así como a través de interacciones con motivos de unión al dominio SH2 y/o SH3, liberando la configuración autoinhibitoria del dominio de cinasa. Lyn puede entonces autofosforilarse en el residuo de activación Tirosina 397 para generar una enzima catalíticamente activa. La fosforilación de este “bucle” altera su estructura de modo que el dominio de unión Mg-ATP se vuelve más accesible, lo que aumenta el potencial de actividad de la cinasa [63].

El análisis *in vitro* indica que el estado de fosforilación del residuo Y397 incrementa la actividad de Lyn [64, 65]. Sin embargo, *in vivo*, esto puede modularse sustancialmente a través de modificaciones post-traduccionales en su extremo C-terminal y/o las interacciones de los dominios SH2/SH3. De hecho, el ciclo

regulatorio de activación/inactivación de Lyn se controla adicionalmente por su asociación con diferentes moléculas adaptadoras que están restringidas a diferentes compartimentos subcelulares, tales como el de Cbp/PAG1, que reside predominantemente dentro de las balsas lipídicas [66, 67].

En el ciclo de inactivación de Lyn, se sabe que las fosfatasa como SHP-1 y SHP-2, que son atraídas por las moléculas fosforiladas por Lyn, defosforilan el sitio del “bucle” de activación pY³⁹⁷, y por lo tanto, son importantes para regular negativamente la actividad de esta enzima [68]. Figura 6B.

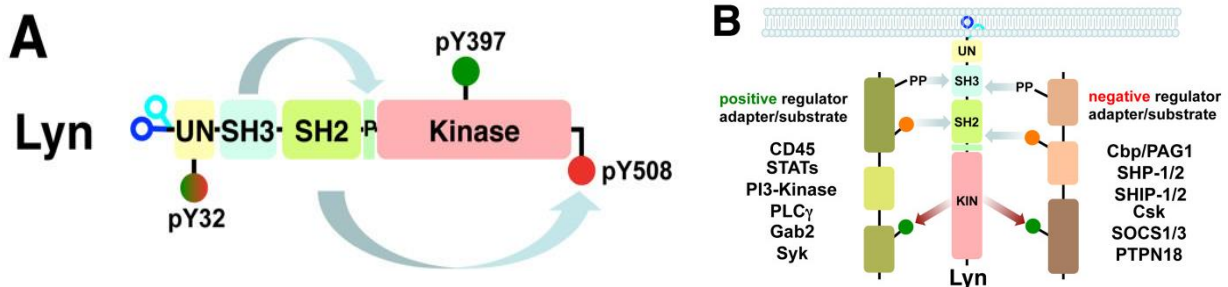


Figura 6. Regulación y vías de señalización de Lyn. A) Dominios regulatorios de Lyn. B) Vías de señalización de regulación positiva y negativa de Lyn [69].

3.2.2.1. Lyn en cáncer

Los primeros estudios que mostraron una relación entre Lyn y cáncer, fueron en distintos tipos de cáncer de origen linfocítico, incluida la leucemia mieloide aguda (AML) [70], la leucemia mieloide crónica (CML) [71] y la leucemia linfocítica de células B (BCLL) [72].

Estudios posteriores mostraron que Lyn también se expresa en algunos tumores sólidos como en el cáncer de próstata [73], cáncer de colon [74], Sarcoma de Ewing [75], glioblastoma [76], y cáncer de mama [77]. Recientemente, se realizó un análisis proteómico en 130 líneas tumorales, donde se observó que distintos miembros de la familia de Src, entre los que se encuentran Lyn, Src y Lck; se encuentran frecuentemente activadas, y que su actividad contribuye a la sobrevivencia y proliferación de estas células [78].

3.2.2.2. Lyn en cáncer de mama

Las vías de Lyn también están implicadas en los mecanismos de señalización dentro de las líneas celulares de cáncer de mama [70].

En un estudio detallado de la expresión de Lyn en los cánceres de mama primarios y las líneas celulares derivadas de estos tumores sugiere que Lyn es importante para el desarrollo de este tipo de cáncer [79]. La estratificación de las líneas de cáncer de mama por histología epitelial/mesenquimal identificó a Lyn en asociación con un subtipo molecular de cáncer de mama de tipo mesenquimatoso o "basal", que se ha correlacionado con una supervivencia global disminuida [79] y que explicaría por qué los cánceres de mama basales son más agresivos que sus homólogos luminal A/B, de tipo normal y HER2 [16].

Estudios en los cuales se produjo el silenciamiento de Lyn en líneas celulares de cáncer de mama de tipo triple negativo mostraron una reducción significativa en las tasas de su migración e invasión, pero no en proliferación. Adicionalmente se ha observado mediante el uso de técnicas de fosfoproteómica que distintas líneas celulares de cáncer de mama triple negativo presentan niveles elevados de la forma activa de Lyn. Estos resultados han sido confirmados por estudios en los que las células de tipo triple negativo presentan una fosforilación incrementada de Lyn, así como de Met, EphA2, EGFR, FAK y p130Cas [80].

IV. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es hoy en día la primera causa de muerte en las mujeres a nivel mundial. En México, desde el 2006 el cáncer de mama ocasiona 16 defunciones por cada 100 000 mujeres de 20 años y mayores [81].

Estudios recientes han demostrado que PTP1B se sobreexpresa en más del 50% de los tumores de mama [82]. Por lo cual, el estudio de los mecanismos moleculares a través de los cuales esta enzima controla dichos procesos es de particular importancia para comprender mejor la fisiopatología del cáncer de mama.

En estudios previos, se ha demostrado el papel importante de PTP1B en la activación de las proteínas tirosina cinasas, específicamente de la familia Src (proteína Src) [37]. También la proteína Lyn es considerada un factor participante en la oncogénesis de diversos tumores sólidos, como sucede en el cáncer de mama [79, 83].

Experimentos de “Marcaje Isotópico Estable con aminoácidos en Cultivo Celular” o SILAC por sus siglas en inglés, realizados por el grupo de investigación del Dr. Arias, han permitido identificar aproximadamente 300 potenciales nuevos sustratos de PTP1B (datos no publicados). Entre estos potenciales nuevos sustratos se encuentra la proteína tirosina cinasa Lyn, cuya actividad depende de fosforilaciones en distintos residuos de tirosina y participa en la activación de cascadas de señalización involucradas en sobrevivencia y proliferación celular, migración y transcripción de genes entre otros. En este proyecto pretendemos validar si el residuo de Tirosina en la posición 397 de Lyn, es desfosforilado por PTP1B *in vitro*, y si ambas proteínas interactúan en un contexto celular.

V. HIPÓTESIS

La proteína fosfatasa de tirosinas 1B (PTP1B) desfosforila a la tirosina cinasa Lyn *in vitro*.

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Determinar si la proteína cinasa de tirosinas Lyn es un nuevo sustrato de PTP1B.

6.2. Objetivos específicos

1. Analizar mediante la técnica de modelaje por homología *in silico* y docking la posible interacción entre PTP1B y Lyn.
2. Evaluar mediante un ensayo de actividad de fosfatasa *in vitro*, si PTP1B es capaz de desfosforilar al residuo de Tirosina 397 de Lyn.
3. Determinar si las oncoproteínas PTP1B y Lyn interactúan físicamente en un contexto celular.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Estudios *in silico*: docking péptido Lyn-proteína PTP1B y dinámica molecular

La estructura del fosfopéptido correspondiente a la secuencia de aminoácidos 392-402 de Lyn (IEDNEYTAREG) se diseñó empleando el programa PEPstrMOD (<http://osddlinux.osdd.net/raghava/pepstrmod/>), haciendo la consideración de aminoácidos no canónicos no-naturales (que incluyen modificaciones post-traduccionales) y la secuencia se sometió a 50 ciclos de dinámica molecular usando el protocolo incluido en la misma página en ambiente acuoso. Una vez refinada la probable estructura del fosfopéptido se realizó un “docking local” entre el dominio catalítico de PTP1B obtenido a partir de su estructura cristalográfica a una resolución de 1.5 Å (PDB ID: 2CM2) y el fosfopéptido de Lyn, empleando el programa ClusPro 2.0 (<https://cluspro.bu.edu.>). En este paso se generaron aproximadamente 900,000 probabilidades de interacción (poses de unión) agrupadas en clusters y se obtuvo un resultado de muy alta probabilidad de asociación entre ambas proteínas. Finalmente, los complejos de PTP1B y el fosfopéptido de Lyn se visualizaron en el programa YASARA®.

El complejo descrito como clúster 5, donde se observó la mejor interacción de Y³⁹⁷ con el sitio catalítico de PTP1B se seleccionó para estudios de dinámica molecular en el programa YASARA Dynamics. Para ello se colocó el complejo en una caja cúbica de 40x40x40 Å, se adicionaron moléculas de agua TIP3 a una densidad de 1 g/cm³ y se añadieron iones Na⁺ y Cl⁻ para neutralización. Se utilizó el campo de fuerza AMBER14 y la simulación duró 80 ns grabando la información cada 200 ps.

7.2. Ensayo de Fosfatasa *in vitro*

Con el propósito de determinar si Lyn es un sustrato directo de PTP1B, se empleó un ensayo colorimétrico para evaluar la actividad de fosfatasa (Protein Tyrosine Phosphatase 1B Assay Kit, Colorimetric. Merck Millipore) de acuerdo al protocolo sugerido por el proveedor. Para esto en una placa de 96 pozos se colocaron 45 μ L de Buffer de ensayo 1X por cada reacción, 5 μ L de PTP1B a una concentración de 0.5 ng/ μ L (2.5 ng concentración final) y 50 μ L de un péptido que corresponde a los residuos 392-402 de Lyn, pY³⁹⁷, a una concentración final de 75 μ M diluido en Buffer de ensayo 1X. Como control positivo, se empleó un fosfopéptido que corresponde a los residuos 1142-1153, pY¹¹⁴⁶ del receptor de Insulina β ; y como control negativo se incubó la mezcla en ausencia del péptido. Las muestras se incubaron a 30°C durante 30 min, y la reacción se detuvo añadiendo 25 μ L de reactivo verde de malaquita. Las muestras fueron incubadas en la oscuridad durante 30 min y se midió la absorbancia a 620 nm en un lector de placas. Finalmente, se calcularon los nmoles de PO₄²⁻ liberados por los fosfopéptidos de Lyn y del IR β en presencia de PTP1B, así como la K_m y la V_{max} empleando el programa Prism 7[®].

7.3. Cultivo celular

7.3.1. HEK293T

La línea celular de riñón embrionario humano HEK293T se cultivó en medio DMEM (GIBCO). Este medio se complementó con suero bovino fetal al 10% (GIBCO), 2 mM de L-glutamina (GIBCO) y 1X de penicilina-estreptomicina 100X (10,000U / mL, BIOWEST). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 ° C en una incubadora humidificada en una atmósfera de 5% de CO₂ / 95% de aire.

7.4. Proteína mutante trampa Myc/His-PTP1B D181A

Para generar la proteína mutante trampa Myc/His-PTP1B D181A utilizamos el vector pcDNA4/myc-His PTP1B D181A, que codifica a la proteína PTP1B D181A de

ratón fusionada a una bandera de myc y una de His(6X) en su extremo C-terminal. Este vector tiene la propiedad de expresar una versión catalíticamente inactiva de PTP1B, la cual es capaz de unirse a sus sustratos, pero no puede desfosforilarlos, por lo que el sustrato queda “atrapado” y formando un complejo estable con el dominio catalítico de PTP1B. El plásmido fue donado por el Dr. Michel Tremblay, McGill University.

7.5. Clonación del cDNA de Lyn en el vector de expresión eucarionte pDest520 HA

El cDNA de Lyn humano (ORF de Lyn) se transfirió del vector pDONR223_LYN al vector de expresión eucarionte pDest520 HA mediante recombinación homóloga empleando el sistema Gateway®. Para esto se preparó la mezcla de reacción a un volumen final de 10µL, a una concentración de vectores de 150ng y 250ng, se añadió para cada caso la cantidad suficiente de buffer TE-EF y de LR clonasa II enzima mix. La mezcla se incubó por 1hr a 25°C, posteriormente se agregó 1µL proteinasa K para detener la reacción, se agitó en un vórtex y se incubó a 37°C por 10 min. Las cantidades empleadas para cada ensayo se encuentran descritas en tabla anexa de este documento.

7.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) del pHA-Lyn

Para determinar las colonias bacterianas que fueron transfectadas con la construcción se realizó una PCR de los plásmidos. Brevemente, se seleccionaron 20 colonias y se tomaron con la ayuda de una micropunta y se usaron para replicarse en un tubo con medio LB-Amp, que se incubó a 37 °C hasta que se observó el crecimiento bacteriano. Se hizo la extracción del DNA plasmídico por medio del kit de miniprep GenJet plasmid miniprep kit (Thermo®) y se cuantificó mediante un espectrofotómetro EPOCH BIOTEK®. Se llevó a cabo la PCR por medio de DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo®).

La reacción de PCR punto final “Dream PCR[®]”, se hizo con el siguiente procedimiento: En un volumen final de 12.5µL; La mezcla compuesta por 6.25µL de DNA polimerasa de DreamTaq 2X (Thermo Fisher Scientific[®]), 1µL de primer Forward Lyn, 1µL de Reverse Lyn, 1µL del pHA-Lyn (0.1ng), 3.25µL de agua grado PCR.

Las condiciones utilizadas para la PCR fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 95°C durante 3 minutos, 35 ciclos (desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, alineación a 56.1 °C por 30 segundos, extensión a 72°C durante 30 segundos, una etapa de extensión final a 72°C durante 5 min y la reacción se mantuvo a 4°C. Posteriormente, los productos amplificados de cada plásmido se resolvieron en un gel de agarosa al 0,8% teñido con 3µL de bromuro de etidio.

7.7. Transformación en bacterias competentes

7.7.1. pHA-Lyn

El vector de expresión eucarionte pHA-Lyn se expresó en bacterias competentes *E. coli* de la cepa TOP 10 y DH5α. La transformación se llevó a cabo mezclando 1µL de los plásmidos con 45µL de células competentes, la mezcla se incubó por 30 minutos en hielo, posteriormente se aplicó un choque térmico a 42°C durante 2 minutos, para luego añadir 1mL de medio LB estéril sin antibióticos e incubar durante 1 hora a 37°C en agitación. Después, las bacterias se centrifugaron a 10,000 RPM durante 1 minuto, se retiró el sobrenadante y se añadió 0.1 mL de LB estéril para resuspender las bacterias y sembrarlas en placas de agar LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) durante toda la noche.

7.7.2. pcDNA4/myc-His PTP1B D181A

El vector de expresión eucarionte pcDNA4/myc-His PTP1B D181A, se transformó en bacterias competentes *E. coli* de la cepa XL10 Gold. La transformación se llevó a cabo mezclando 100ng del plásmido con 50µL de células competentes, la mezcla se incubó por 30 minutos en hielo, posteriormente se aplicó

un choque térmico a 42°C durante 2 minutos, para luego añadir 1mL de medio LB estéril sin antibióticos e incubar durante 1 hora a 37°C en agitación. Después, las bacterias se centrifugaron a 10,000 RPM durante 1 minuto, se retiró el sobrenadante y se añadió 0.1 mL de LB estéril para resuspender las bacterias y sembrarlas en placas de agar LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) durante toda la noche.

7.8. Purificación de DNA plasmídico (Miniprep)

Para la purificación de los plásmidos, las colonias candidatas se colocaron en 3 mL de medio LB-Amp (100 µg/mL) y se dejaron crecer durante 15 horas a 37 °C con agitación constante. La purificación de los plásmidos se realizó empleando el kit de mini prep GenJet plasmid miniprep kit (Thermo®), empleando el protocolo sugerido por el proveedor. Posteriormente, el cultivo de bacterias se centrifugó en un tubo Eppendorf a 13,000 RPM durante 2 minutos y el sobrenadante se desechó. El pellet se resuspendió en 250 µL de buffer de resuspensión (suplementado con RNasa A) para luego añadir 250 µL de buffer de lisis (NaOH y SDS, de tal manera que el SDS solubiliza los fosfolípidos de membrana y las proteínas de la pared celular y permitiendo así la lisis y liberación de contenidos celulares y el NaOH desnaturaliza el DNA cromosómico y las proteínas, lo que culmina en la liberación del plásmido en el sobrenadante). Se agregaron 350 µL de buffer de neutralización y se mezcló por inversión y se centrifugó la muestra a 13,500 RPM por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante que contiene el plásmido se recuperó, se transfirió a una columna (compuesta por una membrana de sílice que se une al DNA en presencia de una alta concentración de sal caotrópica y permite la elución en un pequeño volumen de tampón con bajo contenido de sal) y se centrifugó a 13,500 RPM durante un minuto. Posteriormente, la columna se lavó 2 veces con 500 µL de buffer de lavado (para remover el exceso de detergente de la muestra) centrifugando a 13,500 RPM durante un minuto, y desechando la solución que sale a través de la columna. Finalmente las columnas se transfirieron a tubos de 1.5 mL nuevos y los plásmidos se eluyeron de la columna adicionando 30 µL de buffer de

elusión y centrifugando las muestras a 13,500 RPM durante un minuto. La integridad del plásmido se evaluó separando 100ng de DNA en un gel de agarosa al 0.8%.

7.9. Determinación de la concentración de DNA plasmídico.

La concentración del ADN plasmídico se midió mediante un espectrofotómetro EPOCH BIOTEK®. Se usó 1µL de buffer de elución como blanco. Se usó 1µL de la muestra de plásmido para la medición.

7.10. Secuenciación de los plásmidos purificados.

La secuencia del plásmido purificado se determinó mediante secuenciación utilizando el pHA-Lyn Fwd 5' . Secuenciación en una sola dirección. Las muestras fueron enviadas a UBIPRO en la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala-UNAM.

7.11. Transfección transitoria de pcDNA4 myc/His-PTP1B D181A

Se efectuó la transfección de DNA del plásmido pcDNA4/myc-His PTP1B D181A en células HEK293T, el método de lipofección se usó bajo el siguiente protocolo: se sembraron 5×10^6 células en placas de 6 pozos (80% de confluencia) y se transfectaron con 4 µL de reactivo de Lipofectamine® LTX (Invitrogen) que se diluyó en 125µl de Opti-MEM® (GIBCO) y combinado con 2.5µg del plásmido (pcDNA4/myc-His PTP1B 3.0) diluido con 125µL de Opti-MEM® y luego se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. El complejo DNA-lipídico se añadió posteriormente a las células con 1 ml de Opti-MEM® por goteo en cada pozo y se colocó en una incubadora (37 ° C) durante 24 h para la transfección.

Se dejó que las células expresaran la proteína durante 24 h después de la transfección, se lavaron en solución salina ajustada a pH 7.4 con fosfatos (PBS, 137mM NaCl, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM) y se despegaron en 1000 µl de RIPA 1X [Tris-HCl , pH 7,4 (50 mM), NaCl (150 mM), NP-40 (1%),

desoxicolato de sodio (0,5%), SDS (0,1%), EDTA (5 mM), cóctel inhibidor de la proteasa (COMPLETE, Roche)]. La suspensión celular se lisó luego mediante agitación con vórtex y el homogeneizado se centrifugó a 13.500 rpm en una microcentrífuga para eliminar las células intactas y los residuos celulares.

7.12. Transfección transitoria de pHA-LYN.

Se efectuó la transfección del DNA del plásmido pHA-Lyn en células HEK293T por lipofección usando el siguiente protocolo: se sembraron 5×10^6 células en placas de 6 pozos (80% de confluencia) y se transfectaron con 4 μ L de reactivo de Lipofectamine® LTX (Invitrogen) que se diluyó en 125 μ l de Opti-MEM® (GIBCO) y combinado con 2.5 μ g del plásmido (pHA-Lyn) diluido con 125 μ L de Opti-MEM® y luego se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. El complejo DNA-lipídico se añadió posteriormente a las células con 1 ml de Opti-MEM® por goteo en cada pozo y se colocó en una incubadora (37 °C) durante 24 h para la transfección.

Se dejó que las células expresaran la proteína durante 24 h después de la transfección, se lavaron en solución salina (PBS, 137mM NaCl, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7,4) y se despegaron en 1000 μ l de RIPA 1X [Tris-HCl , pH 7,4 (50 mM), NaCl (150 mM), NP-40 (1%), desoxicolato de sodio (0,5%), SDS (0,1%), EDTA (5 mM), cóctel inhibidor de la proteasa (COMPLETE, Roche)]. La suspensión celular se lisó luego mediante agitación con vórtex y el homogeneizado se centrifugó a 13.500 rpm en una microcentrífuga para eliminar las células intactas y los residuos celulares.

7.13. Cuantificación de proteínas

Las concentraciones de proteína total se midieron a partir de los lisados celulares. El ensayo hizo con el método de Lowry, que se basa en la reacción de Cu²⁺, producida por la oxidación de los enlaces peptídicos, utilizando el kit DC Protein Assay (BioRad), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se preparó una curva estándar con albúmina de suero bovino con concentraciones de 0 hasta

1 mg/ml. Las lecturas de absorbancia se registraron a 750 nm y todas las muestras se midieron por triplicado.

7.14. SDS-PAGE

Para determinar si las transfecciones de Lyn y PTP1B fueron exitosas, se migraron 15 μ L del lisado en geles de SDS-poliacrilamida. El gel inferior (resolución) se preparó con las siguientes concentraciones finales: acrilamida al 10%, bis-acrilamida al 1%, Tris base 375 mM pH = 8,8 y 0,1% de SDS. Para lograr la polimerización del gel se añadió persulfato de amonio al 0.05% y TEMED al 0.003%. Respecto al gel superior (compactador), las concentraciones finales fueron: acrilamida al 4%, bis-acrilamida al 0,1%, tris base 125 mM pH = 6,8 y SDS al 0,1%, 0,05% de persulfato de amonio y 0,005% de TEMED. Después de que ambas fases del gel (el apilamiento y la resolución) se polimerizaran y antes de iniciar el ensayo, buffer Laemmli a una concentración 6X (Tris-HCl 375 mM pH = 6.8, SDS al 9%, glicerol al 50%, beta-mercaptoetanol al 9%, bromofenol al 0.03% azul) se añadió al lisado para tener una concentración final de 1X, y se hirvió a 96°C durante 5 min y se cargó directamente en el gel SDS-PAGE. La electroforesis se inició utilizando un buffer de corrida Tris-Glicina a pH 8.3 (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1%) y la separación de proteínas se realizó a un voltaje constante de 120V. Una vez que se completó la migración, se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se preparó para la inmunotransferencia (western blot).

7.15. Western Blot

Las proteínas separadas electroforéticamente en un gel de SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de Difluoruro de Polivinilideno (PVDF). Para realizar la transferencia se preparó un sandwich de transferencia como sigue: primero una esponja previamente humedecida en buffer de transferencia, luego dos papeles de Whatman también humedecidos en el mismo tampón, luego el gel, luego colocamos la membrana PVDF seguida de dos papeles de Whatman y una esponja. Al realizar este sandwich se cuidó de no dejar burbujas que pudieran interferir con la

transferencia de las proteínas a la membrana. La transferencia de proteínas se realizó desde el polo negativo (gel) al polo positivo de la membrana PVDF. Este sandwich se introdujo en la cámara de transferencia que se llenó con tampón de transferencia hasta el límite indicado. La transferencia se realizó en el equipo Thermoblot® durante 30 minutos a 400 mA. Una vez completada la transferencia y para verificar la transferencia de las proteínas, la membrana se tiñó con una solución de Ponceau rojo al 0,5% en ácido acético al 2% durante 5 minutos a temperatura ambiente y se lavó en agua bidestilada. Si la transferencia fue correcta, las membranas se bloquearon en leche descremada sin grasa al 5% en TBS-Tween 0,1% (Tris base 50 mM, pH = 7,5, NaCl 150 mM) durante 1 hora a temperatura ambiente, y se incubaron con el anticuerpo primario. [Anti-myc 1: 1,000 ó anti-HA 1:1,000] durante la noche a 4°C y en agitación suave constante. Al día siguiente, la membrana se lavó 3 veces cada 15 minutos con TBS-Tween al 0,1%. Después del último lavado, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario, anticuerpo anti-ratón o anti-conejo (1: 10.000) marcado con peroxidasa de rábano durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron 3 lavados adicionales de 15 minutos con TBS-Tween al 0,1%. Las membranas se sumergieron en 0.5 mL de solución del sustrato Clarity Western ECL (BIO-RAD). Después de este tiempo, las membranas se expusieron a una placa autorradiográfica HyBlot ES®.

7.16. Co-Inmunoprecipitación

Las células HEK293T se lavaron 2 veces con 5 mL de PBS 1X y se adicionaron 500 µL de buffer RIPA [PBS, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 7.4 mM (50 mM), NaCl (150 mM), NP-40 (1%), desoxicolato de sodio (0.5 %), SDS (0.1%), EDTA (5mM), inhibidor de proteasas (COMPLETE, Roche)]. A continuación, se despegaron las células con ayuda de un gendarme, fueron transferidas en un tubo de 1.5 mL y se colocaron en rotación durante 15 minutos a 4°C. Finalmente la solución se centrifugó a 14,000 RPM durante 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante, el cual se almacenó a -80°C hasta su uso.

Las proteínas obtenidas fueron incubadas durante toda la noche en rotación a 4°C con anticuerpos monoclonales dirigidos contra las banderas de HA o de Myc y con 50µL de proteína A/G Sefarosa previamente lavada con PBS 1X. Al día siguiente, las muestras fueron centrifugadas a 1500 RPM durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. A continuación, las perlas de proteína A/G Sefarosa se lavaron 2 veces con 150 µL de buffer RIPA frío, se suspendió en 100 µL de buffer Laemmli y se hirvieron por 5 min, para posteriormente ser separadas en geles de poliacrilamida-SDS al 10%, transferidas a membranas de PVDF e incubadas con anticuerpos primarios dirigidos contra las banderas de HA o Myc y anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa, para finalmente visualizar las proteínas mediante quimioluminiscencia.

7.17. Colocalización mediante microscopía confocal

Los vectores de expresión eucarionte pcDNA4/myc-His PTP1B y pHA-Lyn se cotransfectaron en células Phoenix-AMPHO (HEK293T modificadas) y fueron sembradas sobre un cubreobjeto de vidrio estéril. 48 horas post-transfección las células fueron fijadas durante 30 min con PFA al 4% en PBS, lavadas 3 veces con glicina 100 mM en PBS y permeabilizadas durante 15 min con PBS-Tritón X-100 al 0.5%. Posteriormente se bloquearon las laminillas con BSA al 5% en PBS-Tritón X-100 al 0.1%. Una vez bloqueadas fueron incubadas con anticuerpos primarios dirigidos contra la bandera de Myc (PTP1B) generados en ratón y contra la bandera de HA (Lyn) generados en conejo, durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las laminillas se lavaron 3 veces con glicina 100 mM en PBS e incubadas con anticuerpos secundarios anti-conejo conjugado con Alexa Flúor 488 (verde) y anti-ratón (Dilución 1:200) conjugado con Alexa Flúor 594 (rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI durante 5 min y las laminillas se montaron con Vectashield. Finalmente, las muestras se observaron en un microscopio confocal y la colocalización de ambas proteínas se visualizó y cuantificó empleando el software LAS X.

VIII. RESULTADOS

8.1. El análisis por homología *in silico* y docking identificó a Lyn como un posible sustrato directo de PTP1B.

El propósito de esta primera parte del proyecto se enfocó a predecir la estructura del complejo PTP1B-Lyn, a partir de la estructura de la proteína y la secuencia peptídica, incluidos los sitios de unión y/o conformación (**Ver Materiales y métodos**).

Éste primer acercamiento nos permitió identificar si PTP1B tiene la capacidad de desfosforilar a Lyn de manera *in silico*; para ello, se realizó un modelado *in silico* del péptido Lyn y docking local de PTP1B-Lyn como se muestra en la **Figura 7**, el cuál detalla la estrategia que se utilizó para lograr visualizar la posible interacción entre péptido-Proteína [84].

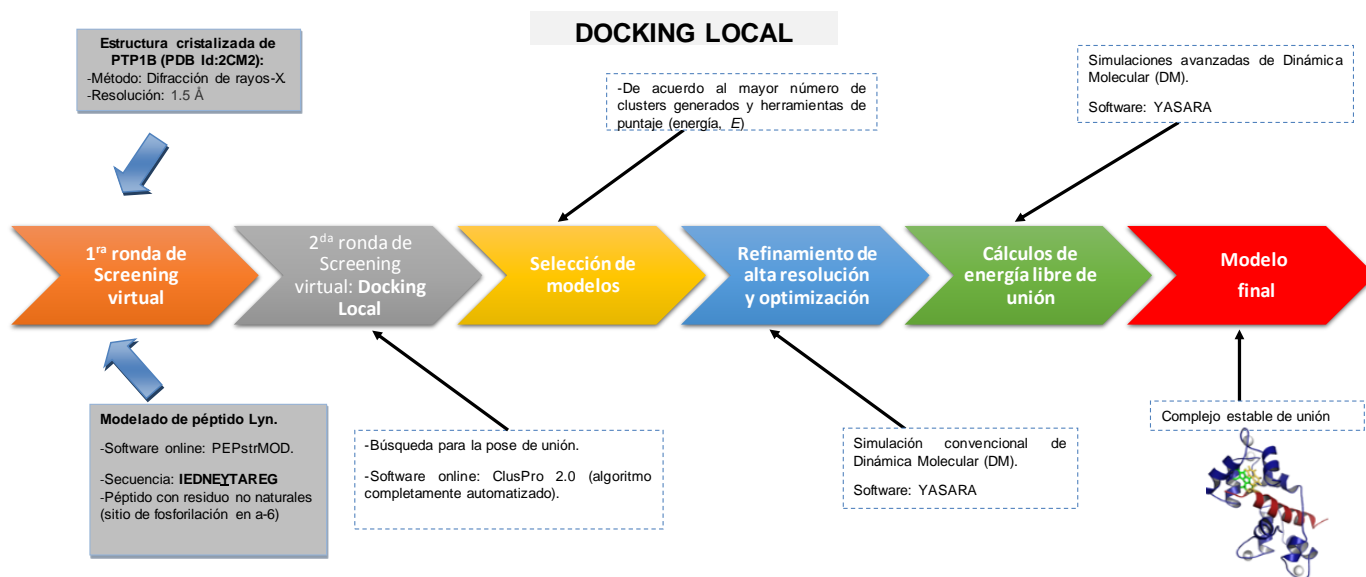


Figura 7. Estrategia de modelado por homología del péptido Lyn y Docking Local del péptido Lyn y proteína PTP1B.

8.1.1. Modelado *In silico* del péptido Lyn.

Como primer paso de la estrategia del docking molecular, se efectuó el modelado del péptido Lyn, Correspondiente a los residuos 392-402 de Lyn con una fosforilación en la Y³⁹⁷, el cual se construyó a partir de su secuencia en el servidor de PeptStrMod® [85, 86], que nos permite predecir la estructura tridimensional de secuencias de péptidos entre 7 y 25 residuos, que incluyan aminoácidos modificados (metilados, acetilados, fosforilados). La obtención de la potencial estructura tridimensional se basa inicialmente en la identificación de secuencias que están asociadas a plegamientos beta, seguida de minimización de energía y simulaciones de dinámica molecular. Para este péptido se empleó el módulo de modificaciones post-transduccionales (PTM of Residues) con un tiempo de simulación de 100 ps en ambiente hidrofílico. La **figura 8** muestra la estructura predicha mediante esta metodología.

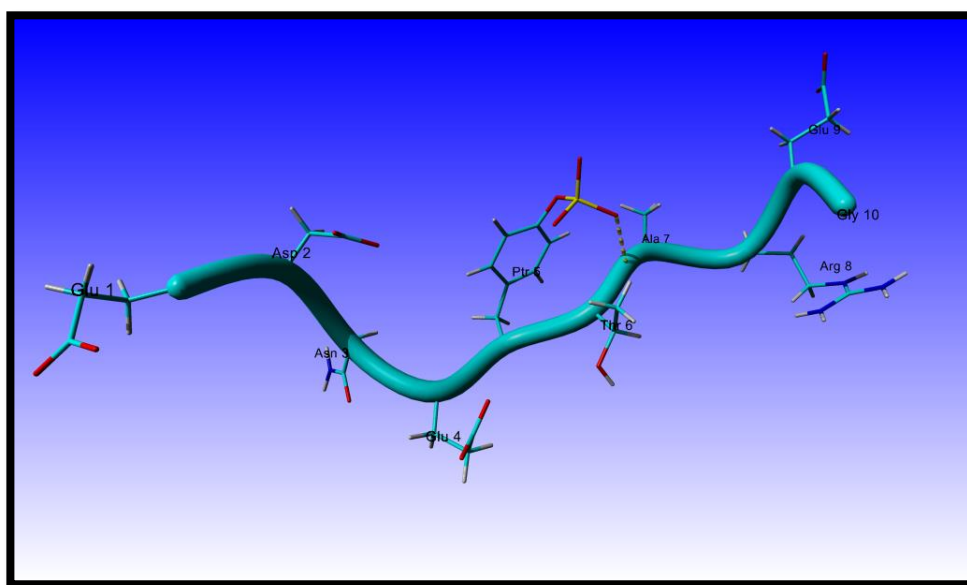


Figura 8. Predicción de la estructura tridimensional del fosfopéptido Lyn. Se empleó el servidor PeptStrMod® con base en la secuencia del péptido Lyn (IEDNEYTAREG) en condiciones hidrofílicas. Se muestra el posible plegamiento del péptido y en el residuo de tirosina de la secuencia peptídica se adicionó el grupo fosfato mediante el módulo de “PTM of Residues”.

8.1.2. Docking Local fosfopéptido Lyn – proteína PTP1B

Una vez realizado el modelado estructural del fosfopéptido Lyn, se procedió a evaluar la posible interacción *in silico* entre PTP1B y el péptido Lyn. Se decidió realizar un docking de tipo local péptido-proteína, debido a que se ya se contaba con la estructura cristalográfica de PTP1B y el modelado del péptido Lyn. Bajo el siguiente esquema:

- a) Selección de la estructura de la enzima PTP1B. Se seleccionó la estructura del Protein Data Bank [87] con código 2CM2 [88], al ser ésta la que cuenta con la mayor resolución.
- b) Docking péptido-proteína. El docking péptido-proteína se realizó en el servidor ClusPro[®]. [89]. Este servidor requiere únicamente dos archivos en formato PDB como antecedentes. En forma breve, el servidor realizó tres etapas para la identificación de los modos más probables de interacción péptido-proteína o proteína-proteína [90]:
 - a. Docking rígido de billones de potenciales conformaciones estructurales.
 - b. Agrupamiento (*clusters*) de las 1000 probabilidades de menor energía (máximo 30 estructuras).
 - c. Refinamiento de estas estructuras mediante minimización de energía usando CHARMM.

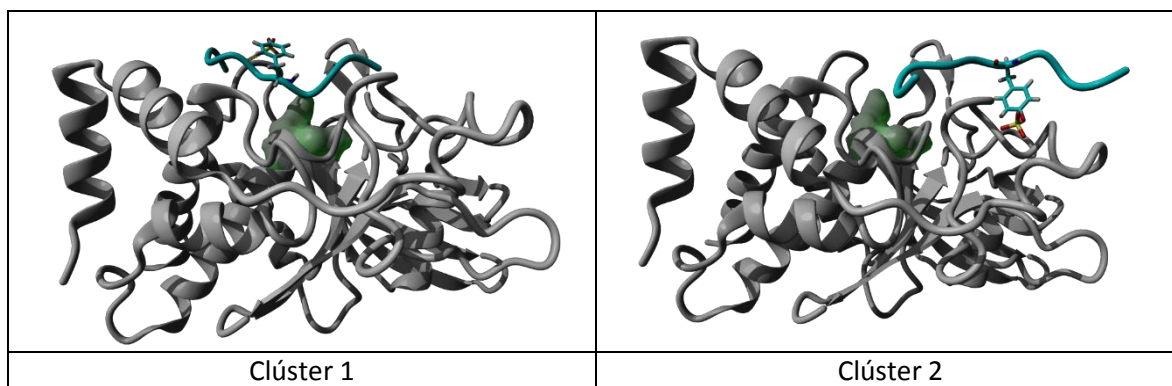
El servidor genera como resultado los “clusters” ordenados en términos del número de miembros que contiene cada clúster, representándolo como un porcentaje de miembros. Este valor está relacionado con la probabilidad de que ocurra esta interacción, aunque no necesariamente sea la de menor energía.

La **Tabla 2** muestra los resultados obtenidos en el estudio de docking péptido-proteína. En esta Tabla se muestra el % de miembros que se encuentran en cada clúster, el score (el cual entre más negativo indicaría menor energía de interacción), además si en dicho clúster el péptido ocupa el sitio activo de la PTP1B y si el residuo de pY está cerca de los residuos catalíticos Cys215 y Arg221.

Tabla 2. Resultados del docking péptido-proteína realizado con ClusPro®

Cluster	%	Score	Interpretación
1	15%	-837	El péptido ocupa el sitio activo pero la pY queda lejos de los residuos catalíticos (Cys 215 y Arg 221)
2	13%	-824	El péptido queda lejos del sitio activo
3	13%	-759	El péptido queda lejos del sitio activo
4	11%	-762	El péptido ocupa el sitio activo pero la pY queda lejos de los residuos catalíticos (Cys 215 y Arg 221)
5	10%	-815	El péptido ocupa el sitio catalítico y la pY queda cerca de los residuos catalíticos (Cys 215 y Arg 221)
6	9%	-770	El péptido queda lejos del sitio activo
7	8%	-771	El péptido queda lejos del sitio activo
8	8%	-849	El péptido queda lejos del sitio activo
9	7%	-796	El péptido queda lejos del sitio activo
10	6%	-798	El péptido queda lejos del sitio activo

En la **Figura 9** se muestran estos clústers, mientras que la **Figura 10** muestra en detalle la estructura del clúster 5, en la cual la pY ocupa el sitio catalítico, el cual es la conformación más estable posible que se adquiriera al interactuar PTP1B con el péptido Lyn.



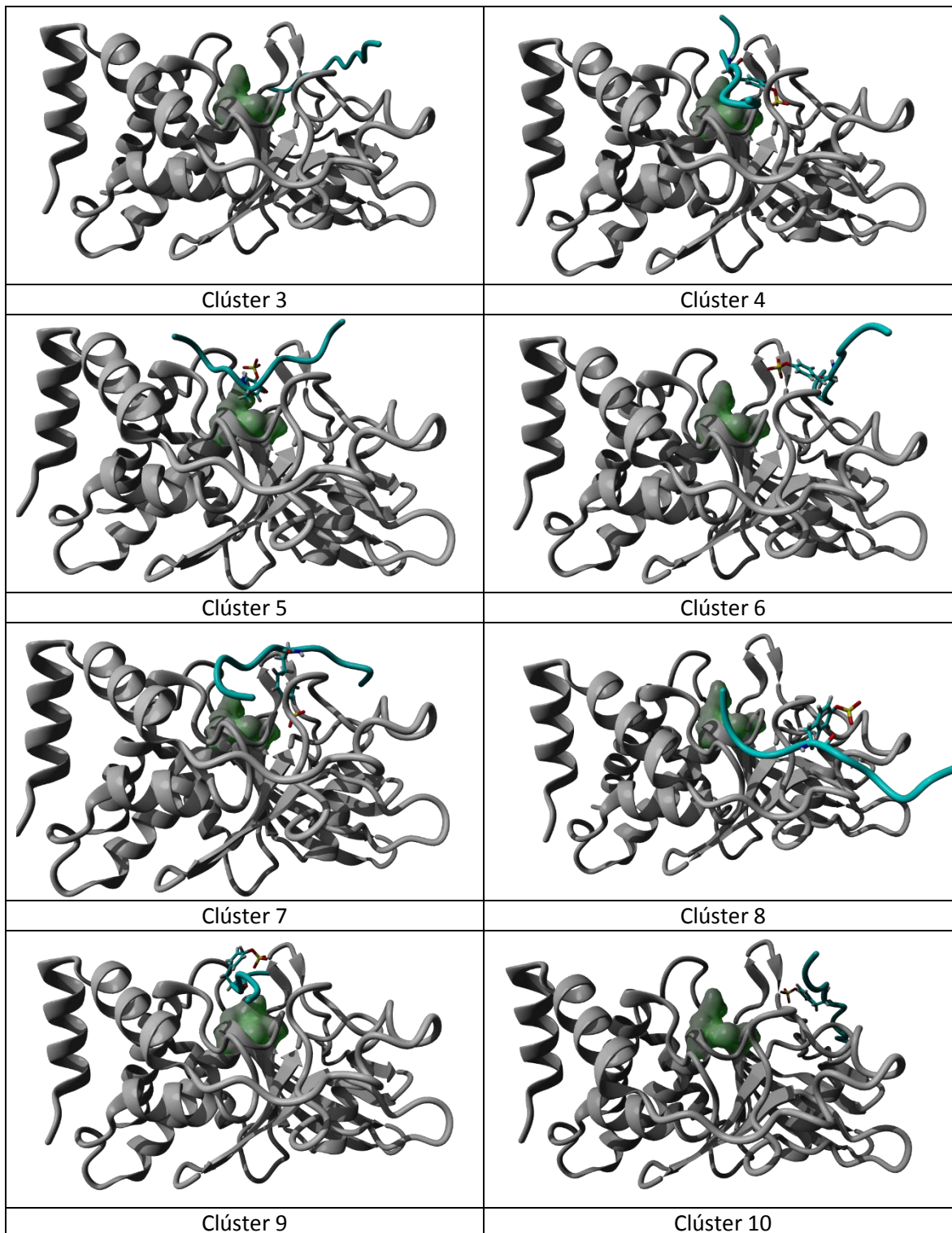


Figura 9. Potenciales interacciones del péptido Lyn con PTP1B. Se muestran las diferentes conformaciones estructurales agrupadas en 10 clusters correspondiente a la **tabla 2**. En gris se muestra PTP1B, en verde el sitio catalítico y péptido Lyn en cian, mostrando los átomos del residuo de pY.

El modelo propuesto de interacción más probable de la proteína PTP1B con el fosfopéptido Lyn, como se muestra en la **Figura 10**, indica el acoplamiento del residuo fosforilado de Lyn en el pocket catalítico (residuo C215) de PTP1B, lo cual sugiere que por su cercanía PTP1B tiene la capacidad de desfosforilar a Lyn.

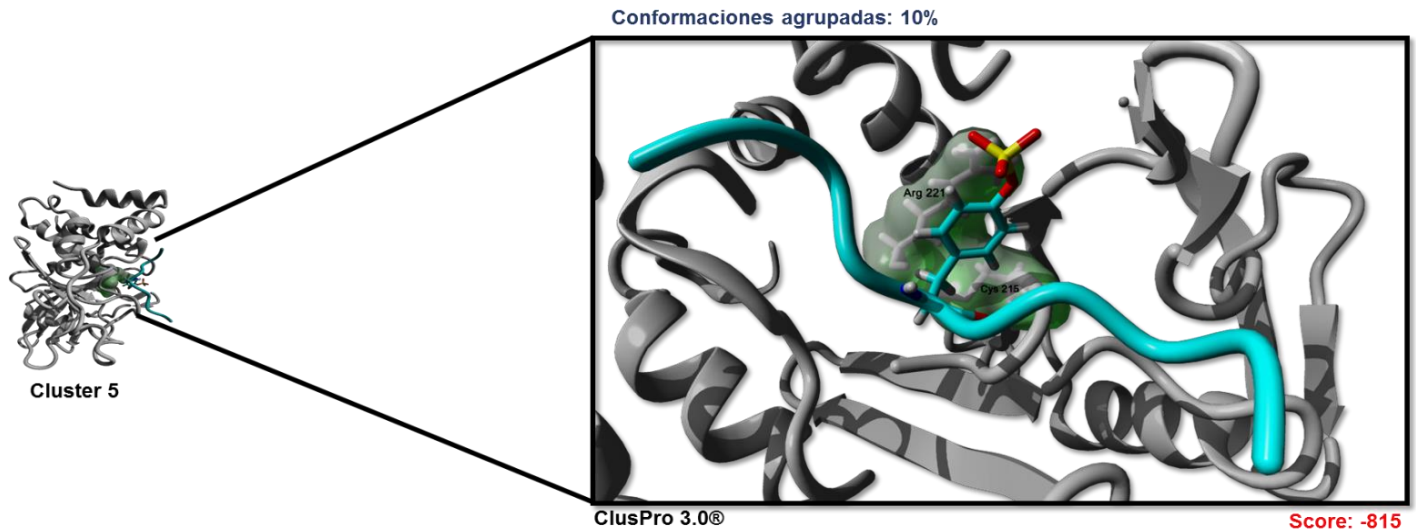


Figura 10. Selección de cluster de acuerdo a la conformación estable. Se muestra la posible interacción *in silico* de PTP1B y el fosfopéptido Lyn en condiciones hidrofílicas. En gris se muestra PTP1B, en verde el sitio catalítico y péptido Lyn en cian, mostrando los átomos del residuo de pY.

8.1.3. Simulación dinámica molecular del complejo formado entre PTP1B y péptido Lyn.

Una vez que se demostró mediante docking molecular que es posible la interacción *in silico* entre el fosfopéptido Lyn y PTP1B, se evaluó el complejo para determinar la estabilidad en un entorno acuoso utilizando simulación de dinámica molecular en empleando el software YASARA®.

Al comparar los valores de desviación media cuadrática atómica (RMSD) del complejo PTP1B-Lyn, basándonos en la posición del C α de cada aminoácido

(RMSDC α), en la cadena lineal ó principal “Backbone” (RMSDBb) y RMSD de todos los átomos pesados (RMSDAII) (**Figura 11**), se observó que el complejo entre la proteína PTP1B y el péptido Lyn, alcanza su mayor estabilidad en aproximadamente 80 ns, presentando valores promedio de RMSD de 1.2 y 2.0 Å, respectivamente. (RMSD \leq 3). Cabe mencionar, que los valores de RMSD de todos los átomos pesados suele ser un poco más grande, debido a que la cadena principal ó del C α están más restringidos que las cadenas laterales de los aminoácidos (considerado en RMSDAII).

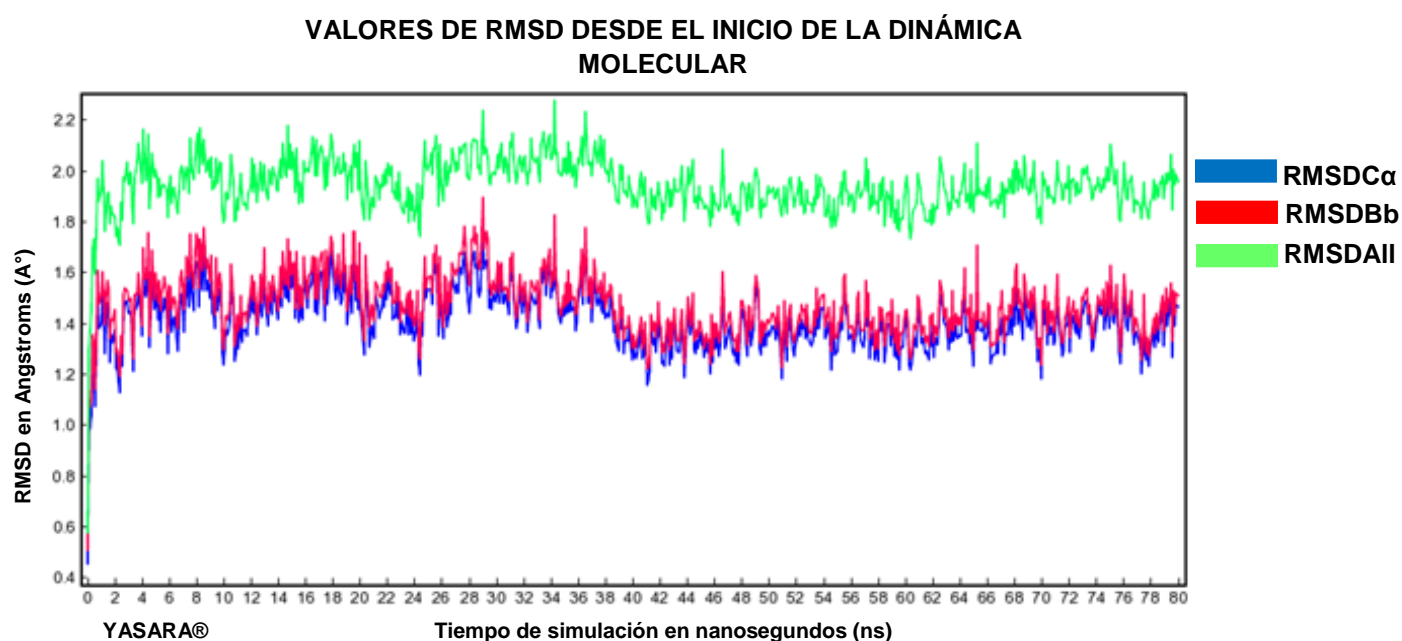


Figura 11. Variación de la posición atómica (RMSD) de PTP1B y fosfopéptido Lyn. La comparación de los valores RMSD en la posición de C α (línea azul), RMSD de la cadena principal ó lineal “Backbone” de PTP1B (línea roja) y RMSD de todos los átomos pesados RMSDAII (línea verde) en 80ns de simulación de la dinámica molecular, nos indica que el complejo se mantiene estable.

Asimismo, cuando calculamos la distancia del átomo de Fósforo (que corresponde a la pY³⁹⁷) de la secuencia del péptido Lyn al sitio catalítico del residuo de Cys215 de PTP1B, durante una simulación de 80 ns (**Figura 12**), de manera importante hallamos que durante los primeros 20 ns de simulación hay un acercamiento notable en estos residuos llegando hasta casi 5 Å de distancia y

posteriormente la interacción se mantiene a una distancia entre 7.5-10 Å, lo que sugiere que éste proceso de desfosforilación se efectúa de una manera muy rápida, tal como ocurre en un evento enzimático de tipo “Kiss-and-run”.

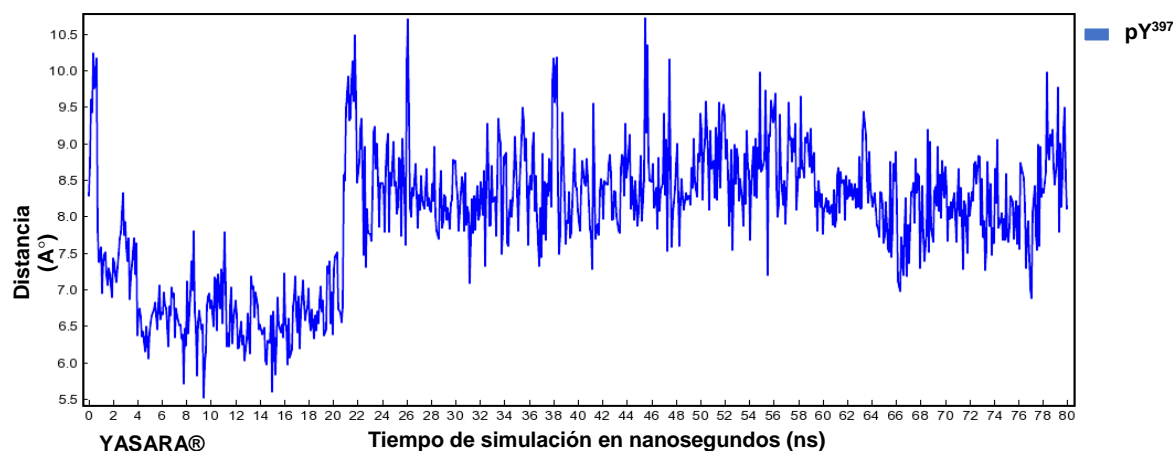


Figura 12. Distancia del átomo de fósforo (pY³⁹⁷) de la secuencia del péptido Lyn al sitio catalítico del residuo de Cys215 de PTP1B.

Esta primera parte del diseño racional bioinformático del acoplamiento molecular ó “Docking” entre PTP1B y el fosfopéptido Lyn, sugiere que es viable ésta interacción *in silico*. Por lo tanto, a continuación se realizaron ensayos de interacción *in vitro* y en un contexto celular para confirmar estos hallazgos. En los siguientes apartados se detallan los resultados experimentales obtenidos.

8.2. El residuo de tirosina 397 de Lyn es desfosforilado por PTP1B *in vitro*.

Una vez que se determinó que PTP1B forma un complejo estable con el fosfopéptido de Lyn *in silico*, se procedió a comprobar si Lyn es un sustrato de PTP1B *in vitro* empleando un ensayo enzimático-colorimétrico para determinar actividad de fosfatasa (**Figura 13**). Para ello, primeramente para cumplir este objetivo, se realizó una curva de estándar de fosfatos con el propósito de generar

una ecuación algebraica que facilite determinar los nmoles de fosfatos liberados en los ensayos siguientes (**Figura 13A**). Posteriormente, la actividad de fosfatasa de PTP1B sobre el fosfopéptido de Lyn se midió a distintos tiempos (0, 5, 10, 20 y 30 min), y se registró midiendo las densidades ópticas (OD) a 620 nm en un espectrofotómetro EPOCH BIOTEK, empleando al fosfopéptido del Receptor de Insulina (IR pY¹¹⁴⁶), el cual es un sustrato conocido de PTP1B, como control positivo. Con los datos obtenidos se calcularon los nmoles de PO₄²⁻ liberados por los fosfopéptidos de Lyn y del IR en presencia de PTP1B, observándose que PTP1B cataliza la desfosforilación de Lyn, aunque con menor eficiencia para nuestro control positivo, el IR (**Figura 13B**).

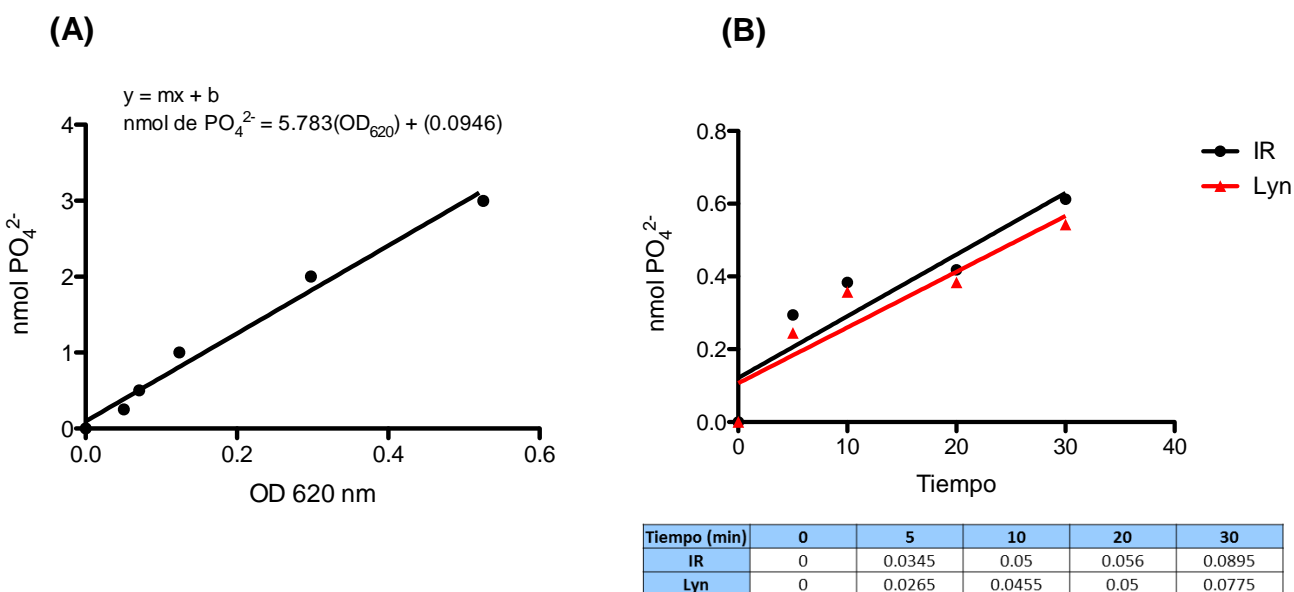
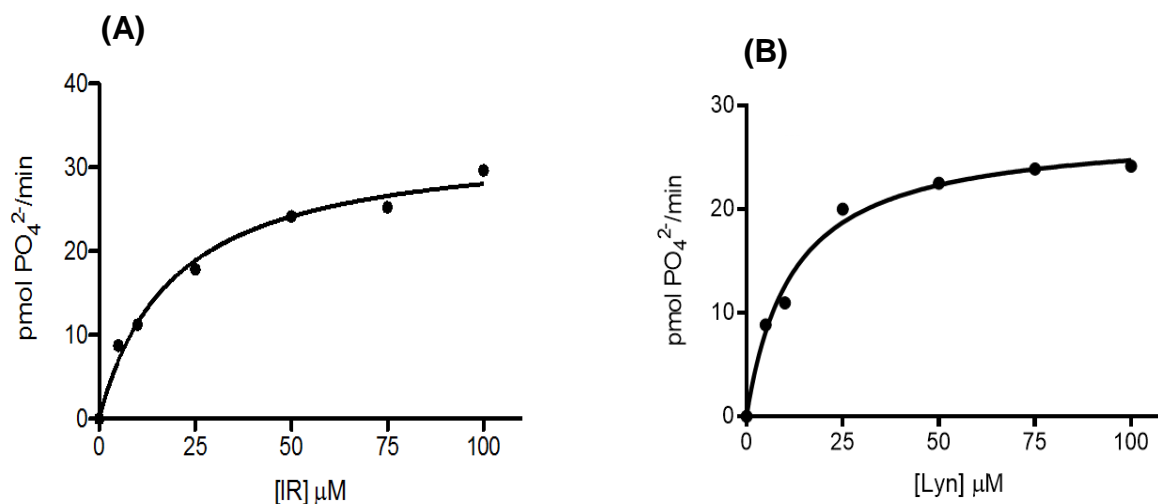


Figura 13. Ensayo de actividad enzimática de PTP1B *in Vitro*. (A) Curva estándar de Fosfatos. Normalizadas a 0,0.25,0.5,1,2,3 nMol PO₄²⁻ midiendo su densidad óptica (OD) a 620nm, empleada para obtener los nMol PO₄²⁻ liberados en B, de acuerdo a la fórmula de la pendiente Y= mx + b. (B) Curva de liberación de fosfato Lyn. Se presenta la pendiente generada al graficar los nMol PO₄²⁻ liberados de Lyn a los 0, 10, 20, 30 min.; se empleó como control positivo al Receptor de Insulina (IR). La tabla inferior, muestra los valores de OD a 620nm de Lyn y del IR a los tiempos antes mencionados. El % de actividad enzimática de PTP1B sobre Lyn es del 86.6%.

Finalmente, se obtuvieron las constantes cinéticas de Velocidad Máxima (V_{max}) y Constante de Michaelis (K_m) mediante un análisis de regresión no lineal de Michaelis-Menten (MM) variando la concentración del sustrato (Lyn), esto con dos propósitos importantes a nivel cinético-enzimático: El primero es que la Velocidad Máxima (V_{max}) nos indica la velocidad que se alcanza cuando todo PTP1B disponible se encuentra unido a péptido Lyn y segundo, la K_m indica la concentración de Lyn para la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima, por lo tanto, una menor K_m , nos refleja de manera importante la mayor afinidad de PTP1B por Lyn.

En la **Figura 14**, se muestran las curvas cinéticas enzimáticas de MM en estado estacionario del IR y del péptido Lyn (figura A y B, respectivamente), obteniendo los valores de velocidad de saturación de PTP1B (V_{max}) y de K_m como se muestra en la tabla inferior (**Figura 14C**). Estos resultados nos indican de manera relevante que existe mayor afinidad de PTP1B por el sustrato Lyn que por el IR, al tener una K_m inferior, pero que la desfosforilación del IR mediada por PTP1B ocurre más rápidamente en el RI que en Lyn.



(C)

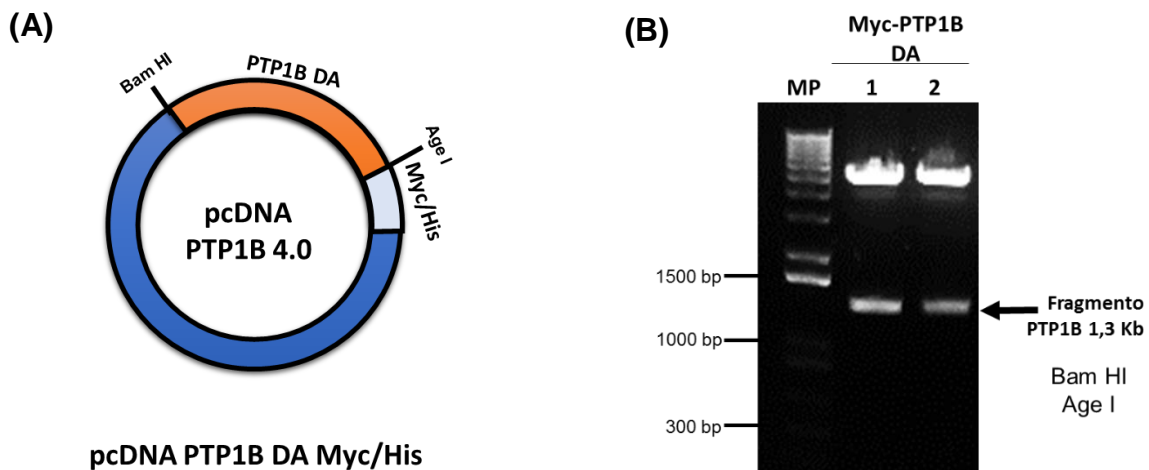
Enzima	Sustrato	K_m (μM)	V_{max} (pmol/min)
PTP1B	Receptor de Insulina	19.20	33.42
	Lyn	11.98	27.68

Figura 14. Cinética enzimática de Michaelis-Menten (MM). (A) Cinética enzimática de MM del IR (B) Cinética enzimática de MM del péptido Lyn. PTP1B tiene una mayor afinidad enzimática por el péptido Lyn, que por el IR al tener una Constante de Michaelis (Km) menor. Para todos los casos, la variación de la concentración del sustrato fue de 0, 25, 50, 75 y 100 μM . Se considera que la cinética enzimática de MM mantiene un comportamiento en estado estacionario.

8.3. Expresión en células de mamífero de la proteína Myc-PTP1B D181A

Esta proteína se obtuvo a partir del vector de expresión pcDNA4/myc-His PTP1B D181A (que codifica a la proteína PTP1B DA de ratón; Esta proteína se encuentra fusionada a una bandera de myc y una de His (6X) en su extremo C-terminal). Este vector tiene la propiedad de expresar una versión catalíticamente inactiva de PTP1B, la cual es capaz de unirse a sus sustratos, pero no de desfosforilarlos, por lo que el sustrato queda “atrapado” y formando un complejo estable con el dominio catalítico de PTP1B. Plásmido donado por el Dr. Michel Tremblay, McGill University.

Como primer paso, nosotros realizamos una digestión del vector pcDNA4/myc-His PTP1B D181A para verificar su identidad (**Figura 15B**). Una vez que se verificó la identidad del plásmido, se transfectó este vector en la línea celular HEK293T y la expresión de la proteína Myc-PTP1B D181A fue corroborada por Western Blot usando el anticuerpo anti-myc (**Figura 15C**). Como se esperaba solo cuando la línea celular se transfectó con el vector, la proteína Myc-PTP1B se expresó con un peso molecular estimado de 51 KDa.



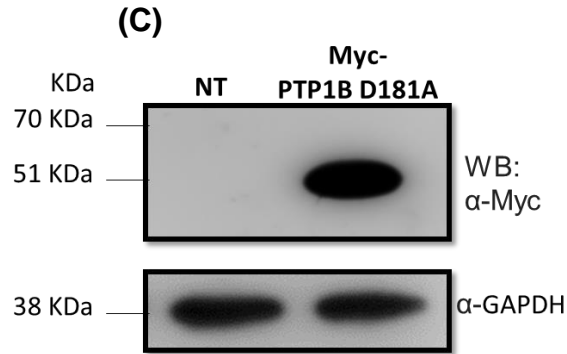


Figura 15. Expresión en células de mamífero de la proteína Myc-PTP1B D181A
(A).Representación esquemática del vector pcDNA4/myc-His PTP1B D181A.
(B).Digestión del vector pcDNA4/myc-His PTP1B con BamHI y AgeI, obteniendo un fragmento de PTP1B de 1.3Kb. **(C)** Transfección e inmunodetección de Myc-PTP1B (51KDa).

8.4. Clonación del ORF de Lyn y obtención de la proteína HA-Lyn

Otro objetivo importante para el desarrollo de este proyecto fue generar un vector de expresión eucarionte que nos permitiera expresar a la proteína Lyn fusionada a una bandera de HA. Para este propósito, empleamos la tecnología de clonación Gateway®, el cual se basa en la recombinación homóloga del fago lambda vía lítica, para ello, transferimos el gen del ORF del Lyn de un vector donador ó pEntry denominado pDONR223-Lyn (ORF de Lyn), al vector de destino pDest-HA 520 (Codificará a la proteína Lyn, fusionada una bandera de HA en su extremo C-terminal) **(Figura 16)**.

Para el experimento, se emplearon dos concentraciones de la reacción de recombinación, a concentraciones iguales de pDNOR y pDest520 HA, denominado HA1 y a doble de concentraciones de los vectores, denominado HA2. Posteriormente, se realizó la transformación en dos tipos de bacterias competentes *E.coli* DH5α y Top10. Resultando cuatro ensayos del experimento, denominados: DH5α HA1, Top HA1, DH5α HA2, Top HA2.

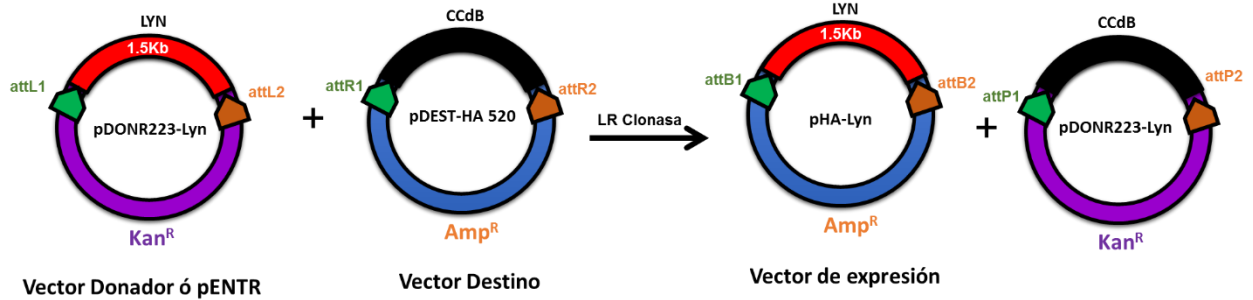


Figura 16. Clonación del ORF del cDNA Lyn. Representación esquemática de la estrategia de clonación por tecnología Gateway® del ORF de cDNA Lyn para obtener los vectores de expresión pHA-Lyn.

Las colonias que contenían el inserto se identificaron mediante PCR de colonias utilizando los oligonucleótidos diseñado de acuerdo con la secuencia publicada en NCBI / Primer-BLAST. El resultado de esta PCR se muestra en la **figura 17B**, donde se seleccionaron cuatro colonias positivas, que amplificaron un fragmento de 1500pb, correspondiente al ORF cDNA de Lyn.

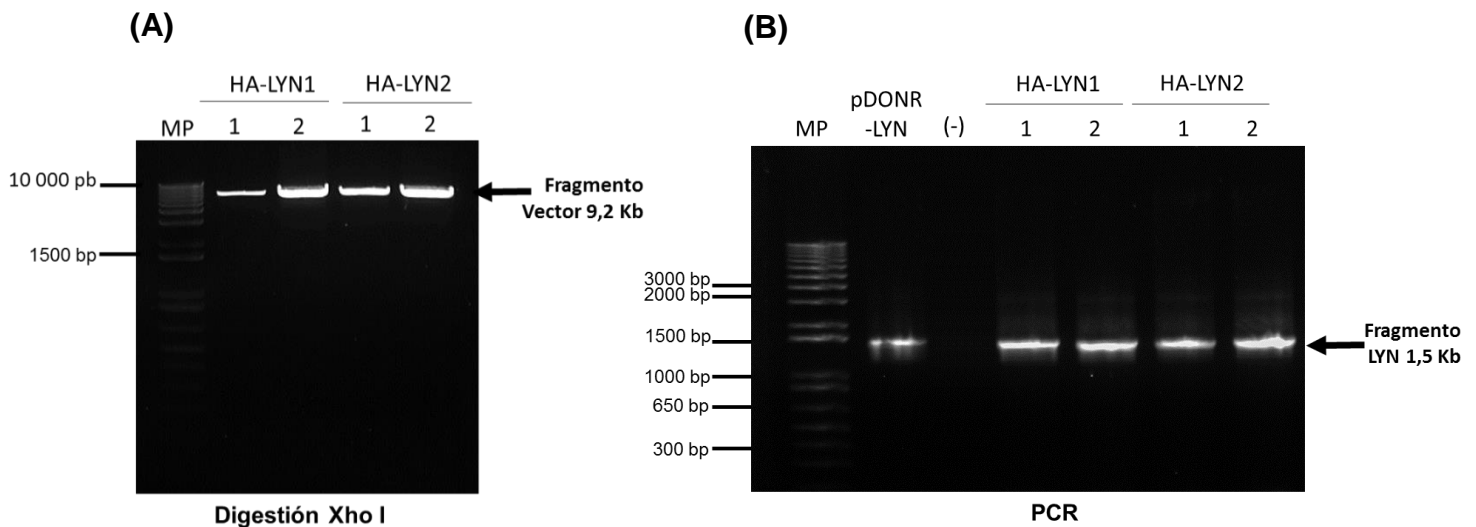


Figura 17. Identificación de colonias positivas mediante PCR. (A) Vectores pHA-Lyn linealizados, digeridos enzimáticamente con Xho I. (B) En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular (MP), en el carril 2 el pDONR-Lyn, empleado como control positivo, en el carril 3 el control negativo, que contiene todos los elementos de la PCR, a excepción del plásmido, en los carriles 4-7 se muestran los vectores pHA-Lyn seleccionados.

Este plásmido pHA-Lyn se secuenció para verificar que el ORF de Lyn estaba en marco de lectura y se mantenía la integridad del DNA plasmídico, es decir, que no hubiera mutaciones de bases. La secuenciación indicó que el marco de lectura estaba intacto y además que el inserto no había sufrido cambios en su secuencia, lo que indica que ya teníamos construido el vector de expresión eucariote pHA-Lyn **(Figura 18)**.

Una vez que se verificó la integridad del plásmido, se transfectó este vector en la línea celular HEK293T y la expresión de la proteína HA-Lyn, fué verificada por Western Blot usando el anticuerpo anti-HA **(Figura 19)**. Como se esperaba, solo cuando la línea celular se transfectó con el vector, la proteína HA-Lyn se expresó con un peso molecular estimado de 57 KDa.

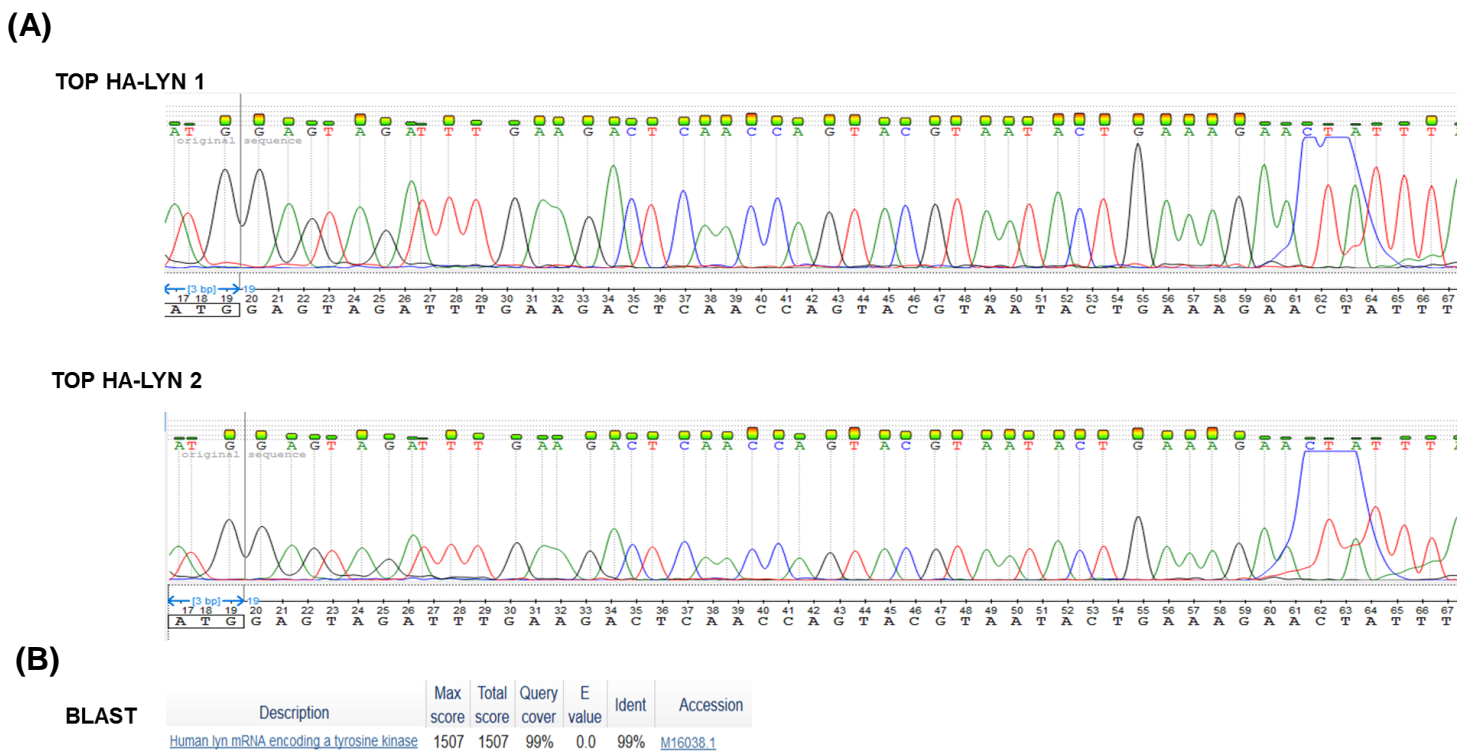


Figura 18. Electroferograma del plásmido HA-Lyn. (A) Secuenciación de los vectores HA-Lyn de las colonias 1 y 2 (HA-Lyn 1 y HA-Lyn 2) (B) Blast de la secuencia de los plásmidos en (A), compartiendo el 99% de identidad de Marco Abierto de Lectura (ORF) de Lyn.

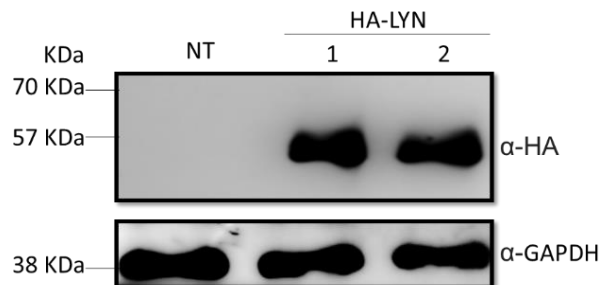


Figura 19. Expresión en células de mamífero de la proteína HA-Lyn.

Una vez obtenidos los vectores de expresión para las proteínas HA-Lyn y Myc-PTP1B DA, se hicieron ensayos de Colocalización celular y Co-inmunoprecipitación, con el propósito de determinar si ambas proteínas interactúan en un contexto celular.

8.5. PTP1B y Lyn interactúan en un contexto celular

8.5.1. Co-inmunoprecipitación de PTP1B D181A y Lyn

Para comprobar la interacción entre PTP1B y Lyn, se empleó la técnica de co-inmunoprecipitación; como primer paso, se emplearon células HEK293T, que fueron co-transfectadas con ambos vectores de expresión (pcDNA4/myc-His PTP1B D181A y pHA-Lyn) y se lisaron 48 horas post-transfección. Una parte de los lisados se almacenó para ser utilizada como "INPUT", y se dividió en dos tubos, en uno se incubaron los lisados con IgG de ratón como control negativo (control de isotipo) para comprobar que las proteínas no se unieran de manera inespecífica a otros anticuerpos. La parte restante de los lisados se incubó con el anticuerpo anti-myc con la finalidad de co-inmunoprecipitar a PTP1B y otras proteínas que estuvieran asociadas con esta fosfatasa. Los western blots se realizaron empleando anticuerpos anti-HA con el propósito de determinar si Lyn se encontraba formando complejos con PTP1B al momento de realizar la co-inmunoprecipitación.

Los resultados obtenidos confirman que Lyn se encuentra presente tanto en el “INPUT” (proteínas totales) como en las proteínas que co-immunoprecipitaron junto a PTP1B, pero no en las proteínas incubadas con el control de isotipo, lo cual confirma que Lyn forma un complejo con PTP1B en un contexto celular (**Figura 20**).

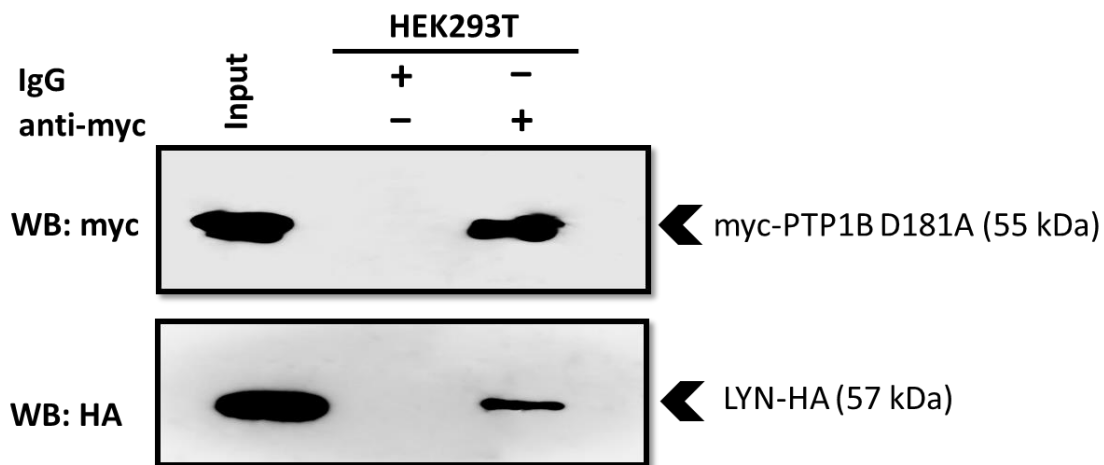


Figura 20. Co-immunoprecipitación entre PTP1B D181A y Lyn. Se demostró la interacción entre ambas proteínas formando un complejo. Se muestra el Western Blot representativo de la co-immunoprecipitación entre PTP1B y Lyn. Células HEK293T fueron co-transfectadas con vectores de expresión eucarionte para las proteínas PTP1B-Myc DA y HA-Lyn. En el panel superior se detecta la presencia de PTP1B-myc DA tanto en el lisado total “INPUT” como en la inmunoprecipitación empleando el anticuerpo anti Myc, pero está ausente cuando se usó el control de isotipo (IgG). En el panel inferior, al realizar la inmunodetección contra la bandera HA en el inmunoprecipitado (Anti-Myc) se detectó la proteína HA-Lyn.

8.5.2. Colocalización de PTP1B D181A y Lyn

En combinación las proteínas HA-Lyn y Myc-PTP1B D181A, produjeron una fluorescencia detectable sobre los niveles de fondo, generándose una colocalización en mas del 80% de las células analizadas (**Figura 21**). La distribución de PTP1B se superpuso estrechamente con la de Lyn, lo que indica su colocalización preferente en la membrana plasmática (**Figura 21, Merge**). La estimación cuantitativa de la colocalización de PTP1B y Lyn se realizó con el software LAS X® (**Ver Materiales y Métodos**). Las distribuciones de fluorescencia rojo (PTP1B) / verdes (Lyn) en un histograma de correlación revelaron una correlación positiva entre ambas señales (**Figura 21, inferior**). El coeficiente de correlación de Pearson (PCC) en más de 10 células fue >0.85 . Los coeficientes de superposición de Manders (MOC) M1 y M2 también fueron >0.87 , lo que significa que más del 87% de ambas señales se localizaron conjuntamente.

En el plano Z de colocalización, la señal de PTP1B se superpuso a la de Lyn, y se vió exclusivamente en la membrana plasmática (**Figura 21, inferior**). El tamaño celular medido osciló entre 30 y 50 μm de diámetro.

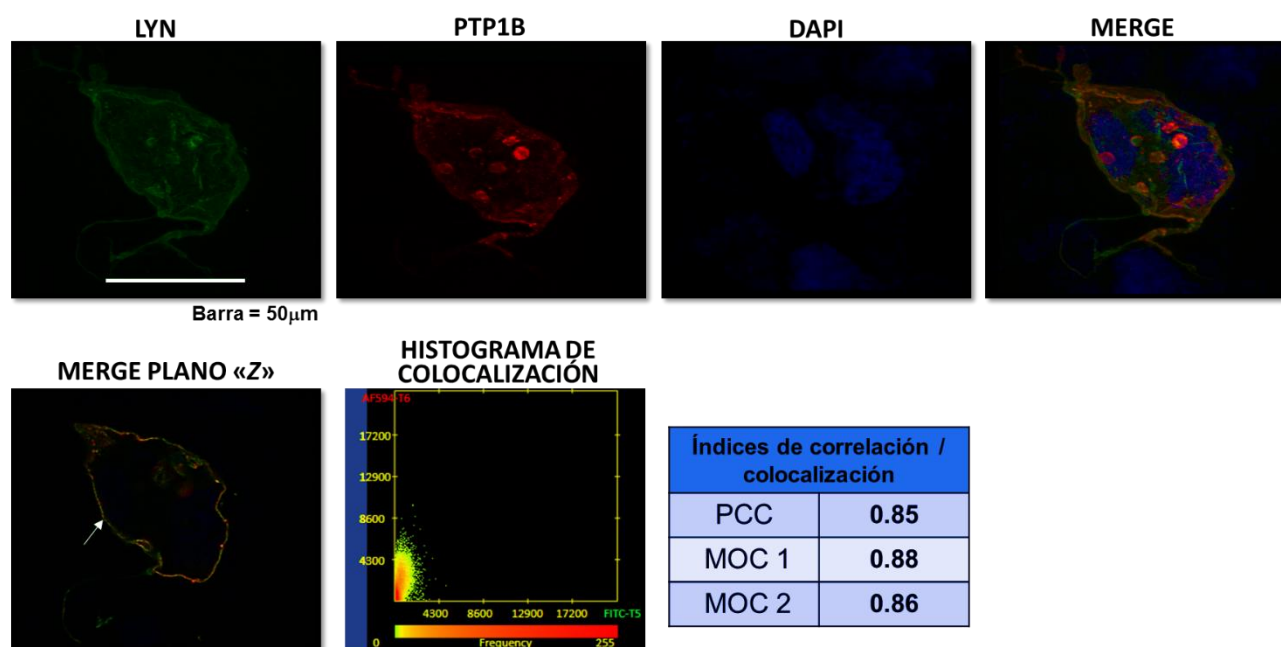


Figura 21. La oncoproteína PTP1B y Lyn colocalizan en un contexto celular. Se realizaron estudios de Inmunofluorescencia (IF) visualizados con microscopía Confocal, que demuestran que PTP1B colocaliza con la proteína Lyn en células HEK293T, preferentemente en la membrana plasmática. Se emplearon anticuerpos primarios anti-HA conejo (dilución 1:50) y anti-Myc ratón (Dilución 1:1000) y anticuerpos secundarios anti-conejo (Dilución 1:200) conjugado con Alexa Flúor 488 (verde) y anti-ratón (Dilución 1:200) conjugado con Alexa Flúor 594 (rojo). Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI (Dilución 1:1000), disuelto en medio de montaje de glicerol. Se muestra un patrón de colocalización de color naranja entre PTP1B y Lyn, señalado con flecha de color blanca (plano Z). En el histograma de Colocalización se reporta aproximadamente un 85% de colocalización entre PTP1B y Lyn, Barra de escala 50µm. Imágenes procesadas con el Software LAS X®. Aumento de microscopio Confocal 63X.

IX. DISCUSIÓN

En México, el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad debido a neoplasias malignas en mujeres mayores de 25 años [3]. En particular, entre los cánceres de mama, se sabe que aproximadamente el 25-30% de los pacientes con cáncer de mama presentan tumores que se caracterizan por la sobreexpresión de HER2 [91]. Las terapias actuales dirigidas a HER2 con el anticuerpo monoclonal Trastuzumab fueron inicialmente prometedoras, pero, como se ha visto con los agentes dirigidos, se demostró posteriormente que eran efectivas en algunas pacientes pero no en otras y algunas habían desarrollado resistencia al fármaco [92]. Está bien documentado que la señalización de HER2 promueve la estimulación de varias cascadas de proteínas cinasas incluidas las vías Ras / RAF / MEK / ERK, PI3K / Akt que se sabe que afectan el crecimiento y la migración de las células tumorales. Se ha demostrado en ensayos *in vitro* que la activación de HER2 y la sobreexpresión de una fosfatasa de tirosinas de tipo no receptora PTP1B, mantiene un fenotipo acinar multilobular de cáncer y que al silenciar o inhibir farmacológicamente a esta fosfatasa, se restaura el fenotipo acinar unilobular, característico de las células no transformadas de glándula mamaria [37]. Actualmente, también existe en fase I un fármaco inhibidor no competitivo alostérico de PTP1B llamado trodusquemina (MSI-1436C) que ha demostrado tener buenos

resultados *in vitro* y estará indicado para metástasis de cáncer de mama [93], sin embargo, la resistencia farmacológica es uno de los limitantes a corto plazo que se manifiesta en progresión del cáncer. Por estas razones, se necesita un estudio más detallado para identificar los sustratos de PTP1B más relevantes involucrados en la iniciación y/o progresión del cáncer y en la señalización PTP1B vía HER2, los cuales interaccionen con esta fosfatasa.

Los experimentos de fosfoproteómica de marcaje isotópico con aminoácidos en cultivo celular (SILAC), facilitaron la identificación de moléculas de señalización adicionales que podrían ser responsables de los efectos observados en las células donde se estaba sobreexpresado PTP1B.

Algunos de los péptidos desfosforilados identificados en estos estudios, incluyen algunos sustratos PTP1B bien caracterizados con funciones de metabolismo, supervivencia y proliferación, como EGFR, INSR, JAK2, y también algunas otras proteínas que podrían ser reguladas directa o indirectamente por PTP1B, que no se han reportado como sustratos de esta fosfatasa, incluyendo a CDK3, VAV1 y LYN, que recientemente se han asociado con la progresión del cáncer de mama [79]. En este trabajo, nos centramos en Lyn, una proteína tirosina cinasa de tipo no receptora, que se ha descrito como un activador de varias vías de señalización involucradas en la proliferación celular y la progresión del ciclo celular.

Estudios anteriores se han enfocado en gran medida en la función de Lyn en células hematopoyéticas y leucemia; así como en la activación y/o desregulación persistentes de Lyn se ha asociado con la resistencia a Imatinib en leucemia BCR-ABL+ [94]. En cáncer de mama, Lyn ha sido reportado como sobreexpresado y como potencial blanco farmacológico en cáncer de mama triple negativo (ER-/PR-/HER2-) en varios estudios [79, 80, 95-97]. Las mutaciones puntuales de Lyn en el cáncer de mama son raras (0,6%), pero se han asociado con resistencia a terapia de reemplazo hormonal en un subconjunto de tumores ER+ [83]; solo el 6%-10% de los cánceres de mama muestran amplificación de Lyn.

Sin embargo, en investigaciones recientes utilizaron el perfil fosfoproteómico SILAC para identificar una red de señalización asociada con células triple negativo

de cáncer de mama [98], que está gobernada por la familia de cinasas Src descubriendo nuevos sustratos de cinasa Lyn, el más destacado de los cuales fue la cinasa atípica SgK269 (PEAK1). En células de cáncer de mama, la expresión de SgK269 se asocia con el fenotipo triple negativo, aunque en los tumores primarios de mama, se ha detectado la sobreexpresión de SgK269 en un subconjunto de cánceres triple negativo, HER2 positivos y luminales. En las células epiteliales mamarias de MCF-10A inmortalizadas, SgK269 se ha reportado como promotor I de la transición epitelio-mesénquima como inductor de la invasión celular [99].

Si bien, estudios actuales han demostrado de manera interesante mecanismos que contribuyen a la desregulación Lyn y que a su vez conducen el comportamiento agresivo en las células del cáncer de mama (triple negativo) [100], esto no se han definido por completo, al igual que el posible papel más amplio de Lyn en el cáncer de mama. Por ejemplo, en las células de cáncer de mama ErbB2/HER2+, estos fenómenos han sido poco estudiados.

En este trabajo, demostramos que PTP1B forma un complejo estable con Lyn *in silico*, y que un péptido correspondiente a los residuos 392-402 de Lyn fosforilado en el residuo de Y397 es desfosforilado por PTP1B *in vitro*, y que ambas proteínas interactúan en un contexto celular *in vitro* mediante experimentos de co-inmunoprecipitación y co-localización.

Por lo anterior, los resultados aquí presentados sugieren fuertemente que Lyn es un nuevo sustrato de PTP1B y que sería interesante confirmar estos hallazgos en líneas celulares HER2+, así también estudiar las implicaciones celulares en modelos *in vivo*.

X. CONCLUSIONES

- Se identificó *in silico* la posible interacción entre PTP1B y el fosfopéptido Lyn.
- Se demostró experimentalmente que PTP1B es capaz de desfosforilar al fosfopéptido Lyn en ensayos *in vitro*.
- La interacción y colocalización de PTP1B y Lyn se comprobó en un contexto celular.

Perspectivas:

- Evaluar la interacción de PTP1B y Lyn endógenas de líneas celulares de cáncer de mama, y determinar el efecto de la desfosforilación mediada por PTP1B en la actividad y en procesos celulares regulados por Lyn

XI. REFERENCIAS

1. DeSantis, C.E., et al., *Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state*. CA Cancer J Clin, 2017. **67**(6): p. 439-448.
2. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2018*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(1): p. 7-30.
3. (DGIS), D.G.d.I.e.S. *Base de datos de defunciones de cáncer de Mama*. 2016 04 de Junio de 2018]; Available from: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-informacion-en-salud-dgis>.
4. INEGI, *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 Febrero)*. 2018. p. 1-13.
5. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
6. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
7. Kennecke, H., et al., *Metastatic behavior of breast cancer subtypes*. J Clin Oncol, 2010. **28**(20): p. 3271-7.
8. Guarneri, V. and P. Conte, *Metastatic breast cancer: therapeutic options according to molecular subtypes and prior adjuvant therapy*. Oncologist, 2009. **14**(7): p. 645-56.
9. Creighton, C.J., *The molecular profile of luminal B breast cancer*. Biologics, 2012. **6**: p. 289-97.

10. Ellis, M.J., et al., *Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(19): p. 1380-8.
11. Moasser, M.M., *The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis*. Oncogene, 2007. **26**(45): p. 6469-87.
12. Tsutsui, S., et al., *Prognostic significance of the coexpression of p53 protein and c-erbB2 in breast cancer*. Am J Surg, 2003. **185**(2): p. 165-7.
13. Rakha, E.A., et al., *Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(7): p. 2302-10.
14. Heitz, F., et al., *Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases*. Eur J Cancer, 2009. **45**(16): p. 2792-8.
15. Carey, L.A., et al., *Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study*. JAMA, 2006. **295**(21): p. 2492-502.
16. Yersal, O. and S. Barutca, *Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications*. World J Clin Oncol, 2014. **5**(3): p. 412-24.
17. Hunter, T., *The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1998. **353**(1368): p. 583-605.
18. Ostman, A., C. Hellberg, and F.D. Bohmer, *Protein-tyrosine phosphatases and cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(4): p. 307-20.
19. Andersen, J.N., et al., *Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(21): p. 7117-36.

20. Tonks, N.K., C.D. Diltz, and E.H. Fischer, *Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta*. J Biol Chem, 1988. **263**(14): p. 6731-7.
21. Tonks, N.K., C.D. Diltz, and E.H. Fischer, *Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta*. J Biol Chem, 1988. **263**(14): p. 6722-30.
22. Brown-Shimer, S., et al., *Molecular cloning and chromosome mapping of the human gene encoding protein phosphotyrosyl phosphatase 1B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5148-52.
23. Barford, D., A.J. Flint, and N.K. Tonks, *Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B*. Science, 1994. **263**(5152): p. 1397-404.
24. Yip, S.C., S. Saha, and J. Chernoff, *PTP1B: a double agent in metabolism and oncogenesis*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(8): p. 442-9.
25. Frangioni, J.V., et al., *The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence*. Cell, 1992. **68**(3): p. 545-60.
26. van Montfort, R.L., et al., *Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B*. Nature, 2003. **423**(6941): p. 773-7.
27. Ravichandran, L.V., et al., *Phosphorylation of PTP1B at Ser(50) by Akt impairs its ability to dephosphorylate the insulin receptor*. Mol Endocrinol, 2001. **15**(10): p. 1768-80.
28. Dadke, S., et al., *Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by sumoylation*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(1): p. 80-5.
29. Frangioni, J.V., et al., *Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets*. EMBO J, 1993. **12**(12): p. 4843-56.

30. Zabolotny, J.M., et al., *PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo*. Dev Cell, 2002. **2**(4): p. 489-95.
31. Seely, B.L., et al., *Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with the activated insulin receptor*. Diabetes, 1996. **45**(10): p. 1379-85.
32. Brown-Shimer, S., et al., *Effect of protein tyrosine phosphatase 1B expression on transformation by the human neu oncogene*. Cancer Res, 1992. **52**(2): p. 478-82.
33. Woodford-Thomas, T.A., J.D. Rhodes, and J.E. Dixon, *Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src-transformed mouse 3T3 fibroblasts*. J Cell Biol, 1992. **117**(2): p. 401-14.
34. Liu, F., M.A. Sells, and J. Chernoff, *Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates integrin signaling*. Curr Biol, 1998. **8**(3): p. 173-6.
35. Bjorge, J.D., A. Pang, and D.J. Fujita, *Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines*. J Biol Chem, 2000. **275**(52): p. 41439-46.
36. Zhu, S., J.D. Bjorge, and D.J. Fujita, *PTP1B contributes to the oncogenic properties of colon cancer cells through Src activation*. Cancer Res, 2007. **67**(21): p. 10129-37.
37. Arias-Romero, L.E., et al., *Activation of Src by protein tyrosine phosphatase 1B is required for ErbB2 transformation of human breast epithelial cells*. Cancer Res, 2009. **69**(11): p. 4582-8.
38. Tonks, N.K. and S.K. Muthuswamy, *A brake becomes an accelerator: PTP1B-a new therapeutic target for breast cancer*. Cancer Cell, 2007. **11**(3): p. 214-6.

39. Mahlamaki, E.H., et al., *Frequent amplification of 8q24, 11q, 17q, and 20q-specific genes in pancreatic cancer*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002. **35**(4): p. 353-8.
40. Yang, S.H., et al., *Gene copy number change events at chromosome 20 and their association with recurrence in gastric cancer patients*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(2 Pt 1): p. 612-20.
41. Bar-Shira, A., et al., *Multiple genes in human 20q13 chromosomal region are involved in an advanced prostate cancer xenograft*. *Cancer Res*, 2002. **62**(23): p. 6803-7.
42. Tanner, M.M., et al., *Independent amplification and frequent co-amplification of three nonsyntenic regions on the long arm of chromosome 20 in human breast cancer*. *Cancer Res*, 1996. **56**(15): p. 3441-5.
43. Wiener, J.R., et al., *Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in human breast cancer: association with p185c-erbB-2 protein expression*. *J Natl Cancer Inst*, 1994. **86**(5): p. 372-8.
44. Wiener, J.R., et al., *Overexpression of the tyrosine phosphatase PTP1B is associated with human ovarian carcinomas*. *Am J Obstet Gynecol*, 1994. **170**(4): p. 1177-83.
45. Hoekstra, E., et al., *Increased PTP1B expression and phosphatase activity in colorectal cancer results in a more invasive phenotype and worse patient outcome*. *Oncotarget*, 2016. **7**(16): p. 21922-38.
46. Liu, H., et al., *PTP1B promotes cell proliferation and metastasis through activating src and ERK1/2 in non-small cell lung cancer*. *Cancer Lett*, 2015. **359**(2): p. 218-25.
47. Bentires-Alj, M. and B.G. Neel, *Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer*. *Cancer Res*, 2007. **67**(6): p. 2420-4.

48. Julien, S.G., et al., *Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis*. Nat Genet, 2007. **39**(3): p. 338-46.
49. Soysal, S., et al., *PTP1B expression is an independent positive prognostic factor in human breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **137**(2): p. 637-44.
50. Gocek, E., A.N. Moulas, and G.P. Studzinski, *Non-receptor protein tyrosine kinases signaling pathways in normal and cancer cells*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2014. **51**(3): p. 125-37.
51. Schenk, P.W. and B.E. Snear-Jagalska, *Signal perception and transduction: the role of protein kinases*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1449**(1): p. 1-24.
52. Chang, Y.M., H.J. Kung, and C.P. Evans, *Nonreceptor tyrosine kinases in prostate cancer*. Neoplasia, 2007. **9**(2): p. 90-100.
53. Ingley, E., *Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1784**(1): p. 56-65.
54. Hibbs, M.L., et al., *Sustained activation of Lyn tyrosine kinase in vivo leads to autoimmunity*. J Exp Med, 2002. **196**(12): p. 1593-604.
55. Scapini, P., et al., *Multiple roles of Lyn kinase in myeloid cell signaling and function*. Immunol Rev, 2009. **228**(1): p. 23-40.
56. Gilfillan, A.M. and J. Rivera, *The tyrosine kinase network regulating mast cell activation*. Immunol Rev, 2009. **228**(1): p. 149-69.
57. Tilbrook, P.A., et al., *Lyn tyrosine kinase is essential for erythropoietin-induced differentiation of J2E erythroid cells*. EMBO J, 1997. **16**(7): p. 1610-9.

58. Linnekin, D., C.S. DeBerry, and S. Mou, *Lyn associates with the juxtamembrane region of c-Kit and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(43): p. 27450-5.
59. Johnson, S.A., et al., *Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases*. J Immunol, 1995. **155**(10): p. 4596-603.
60. Resh, M.D., *Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1451**(1): p. 1-16.
61. Wang, D., W.J. Esselman, and P.A. Cole, *Substrate conformational restriction and CD45-catalyzed dephosphorylation of tail tyrosine-phosphorylated Src protein*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 40428-33.
62. Futami, M., et al., *G-CSF receptor activation of the Src kinase Lyn is mediated by Gab2 recruitment of the Shp2 phosphatase*. Blood, 2011. **118**(4): p. 1077-86.
63. Xu, W., et al., *Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism*. Mol Cell, 1999. **3**(5): p. 629-38.
64. Sun, G., A.K. Sharma, and R.J. Budde, *Autophosphorylation of Src and Yes blocks their inactivation by Csk phosphorylation*. Oncogene, 1998. **17**(12): p. 1587-95.
65. Sun, G., et al., *Effect of autophosphorylation on the catalytic and regulatory properties of protein tyrosine kinase Src*. Arch Biochem Biophys, 2002. **397**(1): p. 11-7.
66. Kawabuchi, M., et al., *Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases*. Nature, 2000. **404**(6781): p. 999-1003.

67. Brdicka, T., et al., *Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation.* J Exp Med, 2000. **191**(9): p. 1591-604.
68. Somani, A.K., et al., *The SH2 domain containing tyrosine phosphatase-1 down-regulates activation of Lyn and Lyn-induced tyrosine phosphorylation of the CD19 receptor in B cells.* J Biol Chem, 2001. **276**(3): p. 1938-44.
69. Ingley, E., *Functions of the Lyn tyrosine kinase in health and disease.* Cell Commun Signal, 2012. **10**(1): p. 21.
70. Dos Santos, C., et al., *A critical role for Lyn in acute myeloid leukemia.* Blood, 2008. **111**(4): p. 2269-79.
71. Donato, N.J., et al., *BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571.* Blood, 2003. **101**(2): p. 690-8.
72. Contri, A., et al., *Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis.* J Clin Invest, 2005. **115**(2): p. 369-78.
73. Goldenberg-Furmanov, M., et al., *Lyn is a target gene for prostate cancer: sequence-based inhibition induces regression of human tumor xenografts.* Cancer Res, 2004. **64**(3): p. 1058-66.
74. Bates, R.C., et al., *A CD44 survival pathway triggers chemoresistance via lyn kinase and phosphoinositide 3-kinase/Akt in colon carcinoma cells.* Cancer Res, 2001. **61**(13): p. 5275-83.
75. Guan, H., et al., *Targeting Lyn inhibits tumor growth and metastasis in Ewing's sarcoma.* Mol Cancer Ther, 2008. **7**(7): p. 1807-16.

76. Stettner, M.R., et al., *Lyn kinase activity is the predominant cellular SRC kinase activity in glioblastoma tumor cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(13): p. 5535-43.
77. Bougeret, C., et al., *Functional analysis of Csk and CHK kinases in breast cancer cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(36): p. 33711-20.
78. Du, J., et al., *Bead-based profiling of tyrosine kinase phosphorylation identifies SRC as a potential target for glioblastoma therapy*. *Nat Biotechnol*, 2009. **27**(1): p. 77-83.
79. Choi, Y.L., et al., *LYN is a mediator of epithelial-mesenchymal transition and a target of dasatinib in breast cancer*. *Cancer Res*, 2010. **70**(6): p. 2296-306.
80. Hochgrafe, F., et al., *Tyrosine phosphorylation profiling reveals the signaling network characteristics of Basal breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2010. **70**(22): p. 9391-401.
81. Villarreal-Garza, C., et al., *Breast cancer in young women in Latin America: an unmet, growing burden*. *Oncologist*, 2013. **18 Suppl**: p. 26-34.
82. Liao, S.C., et al., *Protein tyrosine phosphatase 1B expression contributes to the development of breast cancer*. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2017. **18**(4): p. 334-342.
83. Schwarz, L.J., et al., *LYN-activating mutations mediate antiestrogen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer*. *J Clin Invest*, 2014. **124**(12): p. 5490-502.
84. Ciemny, M., et al., *Protein-peptide docking: opportunities and challenges*. *Drug Discov Today*, 2018. **23**(8): p. 1530-1537.
85. Singh, S., et al., *PEPstrMOD: structure prediction of peptides containing natural, non-natural and modified residues*. *Biol Direct*, 2015. **10**: p. 73.

86. Singh, S. *PEPstrMOD*. 2018 [cited 2019 20/02/2019]; Available from: <http://osddlinux.osdd.net/raghava/pepstrmod/>.
87. RCSB. *Protein Data Bank*. 2019 20/02/2019].
88. Ala, P.J., et al., *Structural basis for inhibition of protein-tyrosine phosphatase 1B by isothiazolidinone heterocyclic phosphonate mimetics*. J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32784-95.
89. ClusPro. *ClusPro Protein Docking*. 2019 01-03-2019; Available from: <https://cluspro.bu.edu>.
90. Kozakov, D., et al., *The ClusPro web server for protein-protein docking*. Nat Protoc, 2017. **12**(2): p. 255-278.
91. Jan, C.I., et al., *Tid1, CHIP and ErbB2 interactions and their prognostic implications for breast cancer patients*. J Pathol, 2011. **225**(3): p. 424-37.
92. Kast, K., et al., *Trastuzumab and survival of patients with metastatic breast cancer*. Arch Gynecol Obstet, 2017. **296**(2): p. 303-312.
93. Krishnan, N., et al., *Targeting the disordered C terminus of PTP1B with an allosteric inhibitor*. Nat Chem Biol, 2014. **10**(7): p. 558-66.
94. Wu, J., et al., *Association between imatinib-resistant BCR-ABL mutation-negative leukemia and persistent activation of LYN kinase*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(13): p. 926-39.
95. Molyneux, G., et al., *BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(3): p. 403-17.
96. Regan, J.L., et al., *c-Kit is required for growth and survival of the cells of origin of Brca1-mutation-associated breast cancer*. Oncogene, 2012. **31**(7): p. 869-83.

97. Smart, C.E., et al., *Analysis of Brca1-deficient mouse mammary glands reveals reciprocal regulation of Brca1 and c-kit*. *Oncogene*, 2011. **30**(13): p. 1597-607.
98. Badve, S., et al., *Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists*. *Mod Pathol*, 2011. **24**(2): p. 157-67.
99. Croucher, D.R., et al., *Involvement of Lyn and the atypical kinase Sgk269/PEAK1 in a basal breast cancer signaling pathway*. *Cancer Res*, 2013. **73**(6): p. 1969-80.
100. Tornillo, G., et al., *Dual Mechanisms of LYN Kinase Dysregulation Drive Aggressive Behavior in Breast Cancer Cells*. *Cell Rep*, 2018. **25**(13): p. 3674-3692 e10.

XII. TABLAS ANEXO

1. Tabla de concentraciones de vectores.

Vector	Concentración
pDONR-223 Lyn	72.5ng/μL
pDest 520	Dilución 1:10 (50ng/μL)

2. Tabla de cantidades empleadas en la clonación Gateway®

Reacción de recombinación (150ng de cada vector)	Reactivo	Cantidad
LR HA1	pDONR 223.Lyn	2.2μL
	pDest 520 HA	3μL
	Buffer TE-EF	5.5μL
	LR Clonasa II enzima mix	2μL
Total		10μL

Reacción de recombinación (250ng de cada vector)	Reactivo	Cantidad
LR HA2	pDONR 223.Lyn	3.6μL
	pDest 520 HA (0.5μg/μL)	0.5μL
	Buffer TE-EF	3.9μL
	LR Clonasa II enzima mix	2μL
Total		10μL

3. Tabla de Oligonucleótidos empleados para la PCR del vector pHA-Lyn

Primers ORF cDNA de Lyn (24.46nmol)
Foward (ECOR I): GGAATTCATGGGATGTATAAAAATCAAAAGGG
Reverse (BamHI): CGGGATCCCTAAGGCTGCTGCTGGTATTG

4. Tabla de Oligonucleótidos usados para la secuenciación de plásmidos.

Nombre	Plásmido para ser secuenciado	Oligonucleótido
5'-pHA-Lyn Forward	pHA-Lyn	5' GGAATTC ATGGGATGTATAAAATCAAAAGGG 3'

5. Tabla de anticuerpos empleados para Western Blot y el ensayo de colocalización.

Anticuerpos primarios	Dilución del anticuerpo primario	Anticuerpo Secundario	Dilución del anticuerpo secundario
Anti-Myc (Cell Signaling) #2276	1:1,000	Anti-Ratón	1:10,000
Anti-HA (Cell Signaling)	1,1,000	Anti-Ratón	1:10,000
Anti-HA (Santa Cruz) #805	1,1000	Anti-conejo	1:10,000
Lyn Total (Cell Signaling)	1:1,000	Anti-Ratón	1:10,000