



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

MEMORIA DEL TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

---

**Diseño y desarrollo de una estrategia para la obtención de un dominio específico de la proteína E3 ubiquitina-ligasa HAKAI.**

**Deseño e desenvolvemento dunha estratexia para a obtención dun dominio específico da proteína E3 ubiquitina-ligasa HAKAI.**

**Design and development of a strategy to obtain a specific domain of the E3 ubiquitin-ligase protein HAKAI.**

---

Alumna: Lía Jove Filgueiras

Directora: Dr. Angélica Figueroa Conde-Valvís

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética

Curso: 2021-2022.



# ÍNDICE

---

ABREVIATURAS .....	1
RESUMEN .....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 PLASTICIDAD EPITELIAL Y METÁSTASIS.....	5
1.1.1. Importancia de la metástasis.....	5
1.1.2. Transición epitelio-mesénquima.....	5
1.2. LA E3 UBIQUITINA-LIGASA HAKAI COMO DIANA FARMACOLÓGICA.....	7
1.2.1 Ubiquitinización.....	7
1.2.2 E3 ubiquitina-ligasas.....	8
1.2.3 HAKAI y el dominio HYB.....	8
2. ANTECEDENTES .....	11
3. OBJETIVOS.....	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	13
4.1.1. Plásmidos.....	13
4.1.2. Cepas bacterianas.....	13
4.1.3. Medios de cultivo.....	13
4.2. TÉCNICAS Y MÉTODOS.....	13
4.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	13
4.2.2. Cuantificación y evaluación de la pureza de ácidos nucleicos.....	15
4.2.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	15
4.2.4. Digestión con enzimas de restricción y ligamiento.....	15
4.2.5. Transformación de bacterias por choque térmico.....	16
4.2.6. Aislamiento y purificación de ADN de lisados bacterianos.....	16
4.2.7. Purificación de ADN a partir de un gel de agarosa.....	18
4.2.8. Secuenciación de ADN.....	18

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	19
5.1. DISEÑO DE UNA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA LA OBTENCIÓN DEL DOMINIO HYB DE HAKAI.....	19
5.2. OBTENCIÓN DEL INSERTO CORRESPONDIENTE A HAKAI (106AA-206AA) .....	21
5.3. OBTENCIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN P-GEX-6P-1-HYB. ....	24
CONCLUSIONES.....	30
BIBLIOGRAFÍA .....	31

## ABREVIATURAS

---

aa	aminoácido
Cbl	del inglés, Casitas B-lineage lymphoma
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTP	deoxinucleósido trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
GST	glutación S-transferasa
HYB	del inglés, HAKAI phosphotyrosine-binding
IPTG	isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Luria-Bertani
M	molar
pb	pares de bases
PEM	plasticidad epitelio-mesénquima
PTB	del inglés, phosphotyrosine-binding
TEM	transición epitelio-mesénquima
TME	transición mesénquima-epitelio
PCR	del inglés, polymerase chain reaction
pTyr	fosfotirosina
SDS	dodecilsulfato sódico
UBLs	del inglés, ubiquitin-like proteins
UV	ultravioleta

## RESUMEN

---

La proteína E3 ubiquitina-ligasa HAKAI fue el primer regulador post-traducciona descrito para la estabilidad de la E-cadherina. La E-cadherina es una proteína transmembrana con un papel destacado en funciones de especial relevancia como el mantenimiento de la morfología, polaridad y diferenciación celular, por lo que su pérdida en los contactos celulares conduce a un aumento en la capacidad migratoria e invasiva de las células. Tanto es así, que la expresión disminuida de E-cadherina es un marcador que se asocia a la transición de adenomas (tumores benignos) a carcinomas (tumores malignos). Mecánicamente, HAKAI media la ubiquitinización de la E-cadherina que conduce a su internalización y posterior degradación y, en consecuencia, induce la invasión y la metástasis en algunos tipos de cáncer. HAKAI reconoce la E-cadherina fosforilada en tirosina y lo hace a través de un dominio de unión atípico, denominado HYB. El dominio HYB forma un homodímero coordinado en zinc, que ha sido propuesto como una diana terapéutica prometedora dado su papel en cáncer.

El presente trabajo se planteó con el objetivo de diseñar una estrategia para la obtención del dominio HYB de HAKAI. Para ello, primero se describe el diseño experimental basado en el clonaje de la secuencia codificante para el dominio de interés, HAKAI (106aa-206aa), en un vector de expresión que incluye la proteína GST como etiqueta. Esta etiqueta nos permitirá posteriormente proceder a la purificación de la proteína de fusión por cromatografía de afinidad e, incluso, alcanzar un grado de purificación aún mayor si hace un uso combinado con cromatografía de exclusión molecular. En resumen, estos resultados permitirán explorar más a fondo el potencial del dominio HYB como diana terapéutica en el cáncer al proporcionar un modelo para probar la interacción con sustratos específicos de HAKAI.

**Palabras clave:** HAKAI, dominio HYB, E3 ubiquitina-ligasa, Cbl-1, cáncer, transición epitelio-mesénquima.

## RESUMO

---

A proteína E3 ubiquitina-ligasa HAKAI foi o primeiro regulador post-traducional descrito para a estabilidade da E-cadherina. A E-cadherina é una proteína transmembrana cun papel destacado en función de especial relevancia como o mantemento da morfoloxía, polaridade e diferenciación celular, polo que a súa perda nos contactos celulares conduce a un aumento da capacidade migratoria e invasiva das células. Tanto é así, que a expresión diminuída de E-cadherina é un marcador que se asocia coa transición de adenomas (tumores benignos) a carcinomas (tumores malignos). Mecanicamente, HAKAI media a ubiquitinización da E-cadherina que conduce á súa internalización e posterior degradación e, en consecuencia, induce a invasión e a metástases nalgúns tipos de cancro. HAKAI reconece a E-cadherina fosforilada en tirosina e faino a través dun dominio de unión atípico, denominado HYB. O dominio HYB forma un homodímero coordinado en zinc, que foi proposto como unha diana terapéutica prometedora dado o seu papel en cancro.

O presente traballo planeouse cón obxectivo de deseñar unha estratexia para a obtención do dominio HYB de HAKAI. Para elo, primeiro descríbese o deseño experimental baseado na clonaxe da secuencia codificante para o dominio de interese, HAKAI (106aa-206aa), nun vector de expresión que inclúe a proteína GST como etiqueta. Esta etiqueta permitirá posteriormente proceder á purificación da proteína de fusión por cromatografía de afinidade e, incluso, alcanzar un grado de purificación aínda maior se se fai un uso combinado con cromatografía de exclusión molecular. En resumo, estes resultados permitirán explorar máis a fondo o potencial do dominio HYB como diana terapéutica en cancro ao proporcionar un modelo para probar a interacción con sustratos específicos de HAKAI.

**Palabras chave:** HAKAI, dominio HYB, E3 ubiquitina-ligasa, Cbl1-1, cancro, transición epitelio-mesénquima.

## ABSTRACT

---

E3 ubiquitin-ligase HAKAI was the first described post-translational regulator of E-cadherin stability. E-cadherin is a transmembrane protein with a prominent role in highly relevant functions such as maintenance of morphology, polarity, and cellular differentiation. For this reason, its loss at cell contacts leads to an increase in the migratory and invasive capacity of cells. Indeed, that a decreased expression of E-cadherin is a marker associated to the transition of adenomas (benign tumors) to carcinomas (malignant tumors). Regarding the molecular mechanism, HAKAI is responsible of the ubiquitination of E-cadherin leading to its internalization and subsequent degradation. This in turn leads to invasion and metastasis in some kind of cancer. HAKAI recognizes tyrosine-phosphorylated E-cadherin through an atypical binding domain, named HYB. The HYB domain forms a zinc-coordinated homodimer, proposed as a promising therapeutic target due to its involvement in cancer.

The present work has been proposed with the objective of designing a strategy to obtain HAKAI's HYB domain. For that purpose, the experimental design is first described with the cloning of the coding sequence for the aforementioned domain, HAKAI (106aa-206aa) in an expression vector that includes the GST protein tag. This tag will allow us to subsequently purify the fusion protein through affinity chromatography and even reach a higher degree of purification if combined with molecular exclusion chromatography. To summarize, these results will allow us to further explore the potential of the HYB domain as a therapeutic target in cancer by providing a model to test the interaction of HAKAI with specific substrates.

**Keywords:** HAKAI, HYB domain, E3 ubiquitin-ligase, Cbl-1, cancer, epithelial-mesenchymal transition.



# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 Plasticidad epitelial y metástasis.

### 1.1.1. Importancia de la metástasis.

La metástasis se considera la principal causa de muerte asociada al cáncer, siendo responsable de alrededor del 90% de los fallecimientos provocados por esta patología. Por esta razón, su prevención y tratamiento se presentan como unos de los retos más importantes para la innovación e investigación oncológica<sup>1,2</sup>.

La metástasis se entiende como la diseminación de las células cancerosas desde el punto en el que se formaron originalmente (tumor primario) a otras partes del cuerpo donde son capaces de asentarse y proliferar, dando lugar a tumores secundarios. La mayoría de tumores malignos surgen de la transformación de células epiteliales, razón por la cual el carcinoma es el tipo de cáncer más frecuente y representa hoy en día el 90% de los casos diagnosticados<sup>3</sup>.

### 1.1.2. Transición epitelio-mesénquima.

El tejido epitelial es un tejido que presenta una elevada tasa de renovación celular, lo que favorece la aparición de mutaciones que, en algunos casos, pueden dar lugar a la formación de tumores. Las células epiteliales tienen la capacidad de iniciar un proceso reversible conocido como transición epitelio-mesénquima (TEM) en el que pierden la polaridad apico-basal y las uniones célula-célula que las caracterizan, dando lugar a un fenotipo mesenquimal con una mayor capacidad migratoria e invasiva (Figura 1)<sup>4</sup>. Este proceso se encuentra altamente conservado y está implicado en funciones básicas como el desarrollo embrionario, la reparación tisular o la cicatrización de heridas. Sin embargo, su aparición también se asocia con diferentes tipos de patologías como la fibrosis o el cáncer, estando en este último relacionada con procesos como la progresión tumoral, la metástasis y la resistencia a fármacos. Hechos que ponen en evidencia la relevancia clínica de este proceso<sup>5-7</sup>.

Durante la progresión del carcinoma las células epiteliales adquieren un alto grado de plasticidad. Cuando se inicia la TEM las células se vuelven más invasivas y son capaces de extravasarse y metastatizar desde el tumor primario, pero una vez alcanzan órganos distales secundarios y establecen metástasis, son capaces de recuperar su fenotipo epitelial, iniciando el proceso inverso de transición mesénquima-epitelio (TME). En la actualidad se utiliza el término de plasticidad epitelial (PEM) para hacer referencia a la capacidad de las células epiteliales de cambiar reversiblemente su fenotipo y adoptar características intermedias (Figura 1)<sup>3,5</sup>.

Posiblemente el marcador más establecido y mejor descrito del proceso de TEM es la pérdida de E-cadherina en los contactos celulares, que viene acompañada de la adquisición de marcadores mesenquimales, como la N-cadherina o la Vimentina. La E-cadherina es una proteína transmembrana con un papel destacado en el mantenimiento de la morfología, polaridad celular y diferenciación celular, por lo que su pérdida en los contactos celulares conduce a un aumento de la capacidad migratoria e invasiva. Cambios que también se asocian con la transición de un adenoma (tumor benigno) a un carcinoma (tumor maligno) y que ponen en evidencia el importante papel de la E-cadherina como supresor tumoral<sup>8,9</sup>.

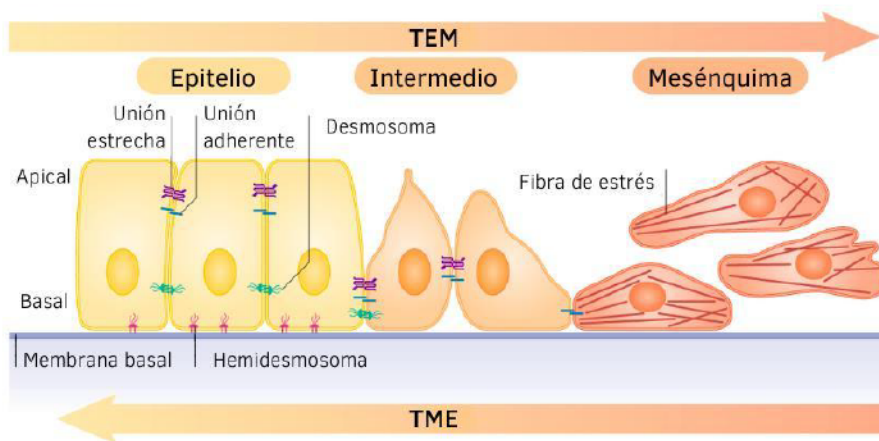


Figura 1. Cambios moleculares y fenotípicos que sufren las células epiteliales durante la transición epitelio-mesénquima. Se produce una pérdida de la polaridad apico-basal y de las uniones célula-célula, junto con una reorganización del citoesqueleto de actina que conllevan a la adquisición de características mesenquimales. Imagen adaptada de Dongre & Weinberg, 2019.

## **1.2. La E3 ubiquitina-ligasa HAKAI como diana farmacológica.**

La E3 ubiquitina-ligasa HAKAI (también conocida como Cbl-like-1 o Cbl1-1) fue el primer regulador postraduccional descrito para la estabilidad de la proteína E-cadherina en un trabajo llevado a cabo por Yasayuki Fujita y sus colaboradores en 2002, y su importancia durante la progresión tumoral ha sido reconocida en diferentes estudios a lo largo de los últimos años<sup>10,11</sup>. HAKAI (que en japonés significa destrucción) reconoce a la E-cadherina fosforilada en un residuo de tirosina para mediar su internalización por endocitosis y su posterior degradación ubiquitina-dependiente o reciclaje a la membrana plasmática (modelo propuesto por Pece y Gutkind en el año 2002)<sup>11,12</sup>.

### 1.2.1 Ubiquitinización.

La ubiquitinación de proteínas es una modificación postraduccional con una gran relevancia biológica que implica la unión covalente de ubiquitina o UBLs (del inglés, ubiquitin-like proteins) a proteínas dianas. La conjugación de ubiquitina puede afectar a diferentes propiedades entre las que se incluye: la vida media de las proteínas, la actividad enzimática, la localización celular o la interacción con otras proteínas. Por tanto, se considera un mecanismo regulador celular predominante implicado en el control de la división celular, la transducción de señales, el desarrollo embrionario, el tráfico endocítico y la respuesta inmunitaria, entre otros<sup>13</sup>.

La conjugación de ubiquitina a un sustrato involucra una cascada de al menos tres reacciones enzimáticas diferentes. En primer lugar, una E1, enzima activadora de ubiquitina, forma un enlace tioéster de alta energía a través de una cisteína activa que reacciona con la glicina C-terminal de la ubiquitina. A continuación, la ubiquitina es transferida de forma transitoria a una E2, la enzima conjugadora de ubiquitina, y, finalmente, es conjugada con su sustrato específico a través de una reacción mediada por una E3 ubiquitina-ligasa<sup>14</sup>.

La gran ventaja terapéutica que presentan las E3 ubiquitina-ligasas, como HAKAI, frente a otros miembros de la vía ubiquitina-proteasoma es su elevada especificidad de sustrato, de forma que actuar sobre ellas reduce en gran medida la posible aparición de efectos secundarios<sup>15,16</sup>.

### 1.2.2 E3 ubiquitina-ligasas.

Las E3 ubiquitina-ligasas muestran características estructurales distintivas que determinan tanto su especificidad de unión a sustrato como su capacidad para reconocer y acoplarse a las proteínas de conjugación de ubiquitina<sup>15</sup>. Esta última función puede establecerse a través de tres dominios diferentes que definen las tres clases de E3 ubiquitina-ligasas que se conocen; el dominio HECT, el dominio RING y el dominio U-box. HAKAI pertenece al segundo grupo por presentar un dominio RING (del inglés, really interesting new gene) que lo relaciona con la superfamilia proteica c-Cbl, con la que también comparte la presencia de un dominio mínimo de unión a fosfotirosina (pTyr) y una región rica en prolina en el extremo C-terminal (Figura 2). Es por estas semejanzas que a HAKAI también se la conoce como Cbl-1 (del inglés, Cbl-like-1). Sin embargo, a pesar del leve grado de homología que muestran los tres dominios de HAKAI con los de la familia c-Cbl (~20% para el dominio RING, menos de un 8% para el dominio mínimo de unión pTyr y ~14% para la región rica en prolina), están ordenados de forma distinta como se refleja en la Figura 2<sup>17</sup>. De hecho, algunos autores ya proponen que HAKAI y otras E3 ubiquitina-ligasas con dominio HYB, se consideren una nueva familia dentro de las RING-finger, independientes de la familia c-Cbl<sup>18</sup>.

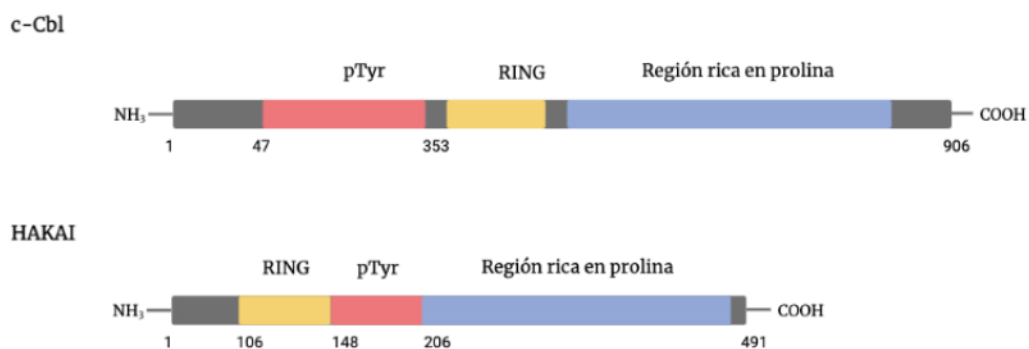


Figura 2. Diagrama comparativo de los dominios presentes en HAKAI y la familia c-Cbl. A pesar de tener un leve grado de homología de secuencia el orden en el que aparecen los dominios difiere.

### 1.2.3 HAKAI y el dominio HYB.

Estructuralmente, HAKAI forma un homodímero en el que cada uno de los monómeros, constituido por 491 aminoácidos, se disponen espacialmente de forma antiparalela. Como se adelantaba en el apartado anterior, cada monómero de HAKAI

cuenta con tres dominios diferentes: un dominio RING, una secuencia de reconocimiento de pTyr corta con respecto a la familia c-Cbl, y un dominio rico en prolina<sup>11</sup>.

Sin embargo, el reconocimiento y la unión a la E-cadherina fosforilada tiene lugar a través de un dominio de unión a pTyr atípico, que aparece como resultado de la homodimerización, y que difiere estructuralmente con otros dominios de unión a fosfotirosina conocidos, como el dominio SH2 o el dominio PTB. Es por esto que HAKAI, y específicamente su dominio HYB (del inglés, HAKAI pTyr-binding domain), se considera una diana terapéutica prometedora de cara al desarrollo de nuevas estrategias contra el cáncer<sup>19</sup>.

El dominio HYB se describió por primera vez en la E3 ubiquitina-ligasa HAKAI, como parte del homodímero coordinado por zinc<sup>20</sup>. Cada monómero presenta dos dominios con dedos de Zn: un dominio RING del extremo N-terminal (106aa-148aa), común a otras proteínas, y un dominio mínimo de unión a pTyr (148aa-206aa) atípico, que aporta un nuevo motivo de coordinación de Zn con un papel clave en la dimerización (Figura 3A). De esta forma, cada monómero proporciona los residuos necesarios para coordinar tres iones  $Zn^{2+}$  a través de tres sitios de unión diferentes. Dos iones a través del dominio RING N-terminal y un ion adicional gracias a la disposición espacial adoptada por el dominio mínimo de unión a pTyr, que da lugar a un motivo de dedo de Zn constituido por dos residuos de histidina y un residuo de cisteína (H185, H190 y C172) de un monómero, y un segundo residuo de cisteína (C166) perteneciente al segundo de los monómeros (Figura 3B)<sup>19</sup>.

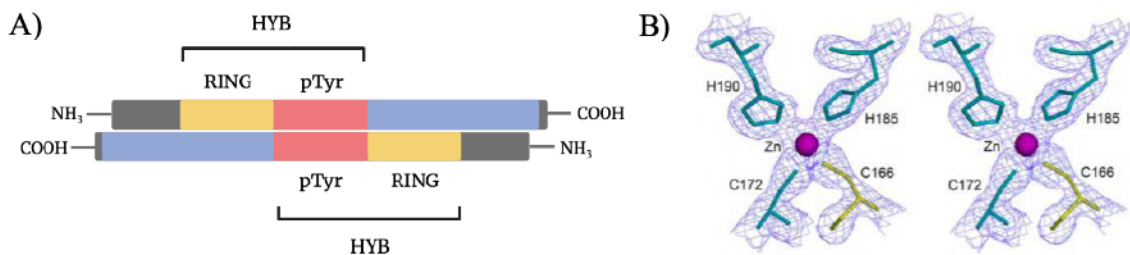


Figura 3. A) Representación esquemática del dominio HYB como parte del homodímero antiparalelo coordinado por zinc comprendido por los dos dominios RING (uno aportado por cada monómero) y el dominio mínimo de unión a pTyr que aporta un nuevo dominio de unión a Zn con un papel clave en la dimerización. B) Representación de la disposición espacial adoptada por los dos residuos de histidina (H185 y H190) y el residuo de cisteína (C172) de uno de los monómeros (azul) y el segundo residuo de cisteína que conforma el dominio de unión a Zn aportado por el otro de los monómeros del homodímero (amarillo), imagen tomada de Mukherjee et al., 2012.



Por tanto, se trata de la disposición espacial  $C_2H_2$  clásica de los dedos de Zn, pero que aparece como resultado del plegamiento generado en la homodimerización. De esta forma, el dominio HYB en su conjunto (106aa-206aa) está compuesto por cuatro motivos de unión a zinc, capaces de coordinar un total de seis iones, y que se unen de forma específica a residuos de pTyr rodeados de aminoácidos ácidos. Por último, cabe mencionar que con el trabajo de caracterización estructural desarrollado por el Dr. Mukherjee y sus colaboradores, publicado en el año 2012, se pudo dilucidar la estructura cristalina del dominio HYB. Con ella se observó que los dos monómeros se entrelazan durante la dimerización en un tramo de residuos comprendido entre los residuos F164 y Y176, dando como resultado la formación de 3 láminas- $\beta$  mantenidas a través de 12 enlaces de hidrógeno (Figura 4). Tanto los dos motivos de coordinación de Zn atípicos como esta configuración entrelazada son características distintivas de la estructura homodimérica atípica<sup>19</sup>.

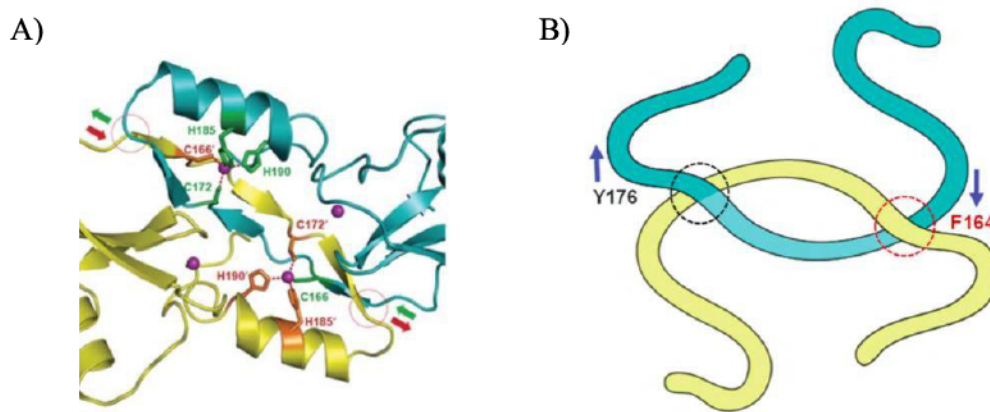


Figura 4. A) Representación de la disposición espacial de los dos monómeros del homodímero establecido a través de la coordinación de dos iones  $Zn^{2+}$  por el dominio mínimo de unión a pTyr, así como las 3 láminas- $\beta$  que se forman en el tramo de entrelazamiento (las láminas- $\beta$  se representan como flechas y las hélices- $\alpha$  como bucles), imagen tomada de Mukherjee et al., 2012. B) Representación esquemática del tramo en el que tiene lugar el entrelazamiento de los dos monómeros, imagen tomada de Mukherjee et al., 2012.

## 2. ANTECEDENTES

---

El presente Trabajo de Fin de Máster se desarrolló en el grupo de Plasticidad Epitelial y Metástasis (EpMet) adscrito al Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) que dirige la Doctora Angélica Figueroa Conde-Valvis.

Una de sus líneas de investigación se centra en el desarrollo de una estrategia efectiva que bloquee de forma eficiente la metástasis en cáncer colorrectal a través de inhibidores de molécula pequeña diseñados específicamente contra el dominio HYB de HAKAI. Con su trabajo han demostrado que el inhibidor de HAKAI (Hakin-1) no solo reduce la ubiquitinización de E-cadherina, sino que muestra un efecto antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo por tanto un prometedor agente terapéutico para el tratamiento del cáncer mediante la inhibición de la TEM<sup>21</sup>.

Siguiendo esta línea, este trabajo se planteó con el fin último de diseñar una estrategia para la obtención del dominio HYB de la proteína E3 ubiquitina-ligasa HAKAI y poder, de esta forma, utilizar el homodímero puro para estudiar su comportamiento *in vitro*.

### 3. OBJETIVOS

---

Este Trabajo de Fin de Máster se propuso con el fin de diseñar y desarrollar una estrategia experimental que permita la obtención del dominio HYB de la E3 ubiquitina-ligasa HAKAI como un homodímero puro. No obstante, aunque se incluye un apartado donde se describe el diseño experimental completo, para ajustarse al tiempo limitado del que se dispone, se estableció como objetivo general el clonaje de la secuencia codificante para el dominio HYB en un vector de expresión que incluya a la proteína GST como etiqueta para la posterior purificación por cromatografía de afinidad. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1- Diseñar una estrategia experimental general para la obtención del dominio HYB de HAKAI.
- 2- Amplificar la secuencia que codifica para el dominio HYB con unos cebadores que incluyan las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción adecuadas.
- 3- Digerir y ligar el fragmento amplificado y el vector de expresión seleccionado para obtener una construcción que permita la expresión heteróloga de la proteína de fusión con la etiqueta GST.
- 4- Amplificar la construcción generada mediante la transformación de bacterias competentes y analizar si la inserción del fragmento tuvo lugar correctamente.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 4.1. Material biológico.

#### 4.1.1. Plásmidos.

El inserto correspondiente a la secuencia codificante del dominio HYB (106aa a 206aa) se tomó del plásmido pcDNA-FLAG-HAKAI cedido por Yasuyuki Fujita (Hokkaido University, Japan) y el vector plasmídico utilizado para generar la construcción de expresión fue el p-GEX-6P-1 (GE Healthcare, Reino Unido) [amp<sup>r</sup> ori tac promoter GST-Nterm PreScission protease site].

#### 4.1.2. Cepas bacterianas.

Para la propagación de la construcción de expresión se empleó la cepa de *Escherichia coli* químicamente competente OneShot™ MaxEfficiency™ DH5 $\alpha$ -T1<sup>R</sup> (Invitrogen, EE. UU.) [genotipo: F-  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*( $\text{rk}^- \text{mk}^+$ ) *phoA supE44*  $\lambda$ - *thi-1 gyrA96 relA1 tonA*].

#### 4.1.3. Medios de cultivo.

Las bacterias se cultivaron en el medio Luria-Bertani (LB; 1% bacto triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.5% NaCl) suplementado con ampicilina (Sigma-Aldrich, EE. UU.) a una concentración final de 100  $\mu$ g/mL. Para el cultivo en placa el medio sólido se suplemento con Bacto Agar (BD, EE. UU.) al 1.5%.

### 4.2. Técnicas y Métodos.

#### 4.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción de PCR fue optimizada para la amplificación de la secuencia codificante del dominio HYB (106aa-206aa) utilizando dos ADN polimerasas diferentes; la *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs, EE. UU.) y la polimerasa de alta fidelidad con actividad exonucleasa 3'-5' Phusion™ Plus DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific, EE. UU.).

La mezcla de reacción estándar utilizada para las amplificaciones con la polimerasa *Taq* DNA Polymerase fue: ThermoPol Reaction Buffer (1X), mezcla de dNTPs (200 $\mu$ M), cebadores (1 $\mu$ M), ADN molde ( $\sim$ 1 $\mu$ g) y *Taq* DNA Polimerasa (0.025U/ $\mu$ L). Para la Phusion<sup>TM</sup> Plus DNA Polymerase la mezcla consistió en: Phusion<sup>TM</sup> Plus Buffer (1X; 1.7 mM MgCl<sub>2</sub>), mezcla de dNTPs (200 $\mu$ M), cebadores (1 $\mu$ M), ADN molde ( $\sim$ 1 $\mu$ g) y Phusion<sup>TM</sup> Plus DNA Polymerase (0.1 $\mu$ L/ $\mu$ L de mezcla de reacción).

El programa de temperaturas estándar utilizado para la *Taq* pol fue el siguiente: (1) una etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 1min; (2) 35 ciclos que comprenden una fase de desnaturalización de 15s a 95°C, una fase de hibridación de 1min en la que se evaluó un gradiente de temperaturas de 58°C a 75°C, una fase de extensión a 68°C de 30s; (3) una etapa de elongación final a 68°C durante 5min. En el caso de la Phusion<sup>TM</sup> Plus DNA Polymerase el programa estándar de temperaturas consistió en: (1) una etapa de desnaturalización inicial a 98°C durante 1min; (2) 35 ciclos que comprenden una fase de desnaturalización de 10s a 98°C, una fase de hibridación de 10s en la que se evaluó un gradiente de temperaturas de 50°C a 72°C, una fase de extensión a 72°C de 15s; (3) una etapa de elongación final a 72°C durante 5min.

Los cebadores utilizados para la amplificación del fragmento (HYB-Fw y HYB-Rv) flanquean la secuencia del dominio HYB e incluyen unas secuencias adaptadoras con secuencias diana de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I, así como cuatro nucleótidos adicionales que permiten que las enzimas escindan la secuencia (Tabla 1). Los cebadores externos utilizados para evaluar la presencia del inserto en el vector de expresión hibridan con secuencias situadas a ambos lados del sitio de clonaje múltiple del vector p-GEX-6P-1 y amplifican un fragmento de 188pb en el vector vacío (Tabla 1).

Tabla 1. Cebadores empleados en las reacciones de PCR. Los símbolos (+) y (-) hacen referencia a la hebra paralela y antiparalela, respectivamente.

Nombre	Secuencia	Hebra
<b>HYB-Fw</b>	5´ TTTTG*GATCCATTTCTGTGACAAGTGTGGATTGCCTAT 3´	+
<b>HYB-Rv</b>	5´ ATATG*TCGACTCAATGAACATTTTCAAGTGAAGCACGGG 3´	-
<b>pGEX-Fw</b>	5´ GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG 3´	+
<b>pGEX-Rv</b>	5´ CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG 3´	-

#### 4.2.2. Cuantificación y evaluación de la pureza de ácidos nucleicos.

Las muestras de ADN se cuantificaron a través de medidas de absorbancia a 260nm empleando el espectrofotómetro Nanodrop ND1000 (ThermoFisher Scientific, EE. UU.). Para evaluar la pureza se consideraron los parámetros A260/A280 y A260/A230 que miden la contaminación con proteínas (máximo de absorbancia a 280nm) y sales caotrópicas (máximo de absorbancia a 230nm), en relación con el máximo de absorbancia de los ácidos nucleicos que aparece a 260nm.

#### 4.2.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

El análisis de muestras de ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% preparado en tampón TAE (Tris 40mM, EDTA 1mM, acetato sódico 20mM, ácido acético 30mM). El tampón de carga empleado fue el Gel Loading Dye (New England Biolabs, EE. UU.) y para la visualización del ADN se utilizó el fluoróforo intercalante SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, EE.UU.). Los marcadores de peso molecular utilizados como referencia fueron DirectLoad™ PCR 100bp Low Ladder (Sigma-Aldrich, EE. UU.) y 1kb DNA Ladder (Promega, EE. UU.). El revelado se realizó exponiendo los geles a luz UV en una cámara de revelado Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Reino Unido).

#### 4.2.4. Digestión con enzimas de restricción y ligamiento

Para la digestión del fragmento correspondiente con el dominio HYB de HAKAI amplificado por PCR y el vector p-GEX-6P-1 se emplearon las endonucleasas de restricción *SaII* y *BamHI* de las casas comerciales New England Biolabs, EE. UU. y ThermoFisher Scientific, EE.UU.

Con las enzimas de la casa comercial New England Biolabs la reacción de doble digestión se llevó a cabo en el tampón universal para enzimas de restricción NEBuffer™ 3.1 (1X), utilizando 1.5µg de producto de PCR no purificado y 0.5µg del vector comercial respectivamente junto con 10U de cada enzima para un volumen final de reacción de 25µL (New England Biolabs, EE. UU.). Las condiciones de la digestión fueron una incubación a 37°C durante 1h seguida de una inactivación térmica a 65°C durante 20min.

En el caso de las enzimas de restricción de la casa comercial ThermoFisher Scientific se utilizó el tampón FastDigest Green 1X, que incluye un reactivo de densidad y dos colorantes de seguimiento para la carga directa, 10U de cada enzima para 20 $\mu$ L de volumen final de reacción y 10 $\mu$ L de producto de PCR no purificado o 1 $\mu$ g del vector comercial. Las condiciones de la digestión fueron una incubación con *Sa*II a 37°C durante 1h y otros 5min a esta temperatura tras la adición de *Bam*HI, seguidos de una inactivación térmica a 80°C durante 10min.

Para la reacción de ligamiento se empleó la ADN ligasa T4 (New England Biolabs, EE. UU.) y se probaron diferentes proporciones de inserto/vector (3:1, 5:1, 10:1). La mezcla de reacción para un volumen final de 20 $\mu$ L consistió en: 1 $\mu$ L de la ADN ligasa T4, 2 $\mu$ L de NEBuffer 10X y el volumen correspondiente de los productos de digestión para cada una de las proporciones inserto/vector. Las condiciones establecidas para el ligamiento fueron 10min a temperatura ambiente y una inactivación de la enzima por choque térmico a 65°C durante 10min.

#### 4.2.5. Transformación de bacterias por choque térmico.

La mezcla de ligamiento se usó directamente para transformar *Escherichia coli* químicamente competente OneShot™ MaxEfficiency™ DH5 $\alpha$ -T1<sup>R</sup> (Invitrogen, EE. UU.) Para la transformación, las células se descongelaron en hielo y se incubaron con 1 $\mu$ L de la mezcla de ligamiento durante 30 minutos en hielo. El choque térmico se realizó a 42°C durante 30 segundos e inmediatamente después, el tubo se colocó de nuevo en hielo durante 2 minutos. Tras ello, se permitió que las células se recuperaran incubándolas con agitación a 37°C en medio SOC (Invitrogen, EE. UU.) durante 1 hora. Finalmente, las células recuperadas se sembraron en placas de medio LB suplementado con ampicilina y se incubaron hasta el día siguiente a 37°C.

#### 4.2.6. Aislamiento y purificación de ADN de lisados bacterianos.

Se probaron dos métodos diferentes para la extracción de ADN plasmídico de bacterias transformadas. En ambos casos se estableció un cultivo fresco a partir de una sola colonia de las placas de transformación, usando medio LB suplementado con ampicilina y se recuperó el precipitado bacteriano por centrifugación. Por un lado, se utilizó un método basado en extracción por fenol-cloroformo que ofrece un mayor

rendimiento en el aislamiento, pero en el que se utilizan sales que reducen la pureza del ADN extraído y pueden interferir en las reacciones de PCR o de secuenciación. Por otro, se empleó el kit comercial GeneJet Plasmid Miniprep (ThermoFisher Scientific, EE. UU.) que compensa la menor recuperación de ADN plasmídico con un mayor grado de pureza.

Con el método basado en fenol-cloroformo el precipitado bacteriano se resuspendió en un tampón de resuspensión en frío (Tris-HCl 25mM, glucosa 50mM y EDTA 10mM). A continuación, se añadió una solución de desnaturalización (NaOH 0.2N, y SDS al 1%) y se incubó en hielo durante 5min. Transcurrido ese tiempo, se añadió una solución de acetato potásico que permite la renaturalización (acetato potásico 3M y ácido acético glacial al 11.5%) y se mezcló por inversión hasta observar la formación de un precipitado blanco que contiene proteínas bacterianas y el ADN genómico. Se incubó en hielo durante 5min y se centrifugó durante 5min a 12.000g. Se recuperó el sobrenadante con el ADN plasmídico separado de los cromosomas bacterianos y se llevó a cabo una extracción líquido-líquido con fenol-cloroformo con la que se eliminan los restos proteicos (fase fenólica). Tras recuperar la fase acuosa, se precipitó el ADN plasmídico adicionando 2 volúmenes de etanol puro y 1/10 parte del volumen recuperado de acetato de sodio 3M (pH 4.8). Por último, tras una incubación de 30min a -80°C para favorecer la precipitación del ADN, se centrifugó durante 30min a máxima potencia y 4°C, y se lavó el precipitado obtenido con etanol al 70% para eliminar el exceso de sales antes de su resuspensión en agua libre de DNAsas.

Con el kit comercial el precipitado bacteriano se resuspendió utilizando la solución de resuspensión suplementada con RNasa A, y se sometió a una lisis SDS/alcalina para liberar el ADN plasmídico. El lisado resultante se neutralizó para generar las condiciones apropiadas para la adhesión del ADN a la membrana de sílica de la columna. A continuación, los restos celulares y el precipitado de SDS se separaron por centrifugación a unas revoluciones de al menos 12000g, y el sobrenadante con el ADN plasmídico se transfirió a la columna. Finalmente, se lavó el ADN adsorbido para eliminar los contaminantes con una solución de lavado y se eluyó con un pequeño volumen (50µL) de agua libre de DNAsas.

#### 4.2.7. Purificación de ADN a partir de un gel de agarosa.

Para recuperar el ADN de una banda separada por electroforesis en gel de agarosa se utilizó un el Kit comercial GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Cytiva, EE. UU.). Siguiendo las instrucciones del fabricante se tomó la banda del gel con ayuda de un transiluminador UV a una longitud de onda de 365nm y reduciendo al máximo el tiempo de exposición para evitar daños en el ADN. Se añadió el tampón de captura (tampón tipo 3, azul), que contiene un indicador de pH para evaluar si la muestra se encuentra en las condiciones adecuadas para la adsorción a la columna, y se incubó durante 15-30min a 60°C hasta que la agarosa se disolvió por completo. Una vez disuelta la agarosa y comprobado que la solución presenta un color entre amarillo y naranja claro, se transfirió el volumen a una columna GFX MicroSpin y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto para permitir la adsorción del ADN plasmídico a la membrana. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó a 16000g durante 30s y se descartó el volumen eluido en el tubo colector. Finalmente, se llevaron a cabo dos lavados con la solución de lavado (tampón tipo 1, amarillo) para eliminar las sales y otros contaminantes de la membrana y se eluyó el ADN plasmídico purificado con un pequeño volumen (20µL) de agua libre de nucleasas (tampón tipo 6, rosa).

#### 4.2.8. Secuenciación de ADN.

La comprobación de la secuencia correspondiente con el dominio HYB de HAKAI del producto de PCR se externalizó a la plataforma de genómica del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC). La técnica de secuenciación empleada fue la electroforesis capilar (dideoxi-terminal) con el equipo automático ABI 3130XL (Applied Biosystems, EE. UU.), y utilizando los mismos cebadores HYB-Fw y HYB-Rv con los que se amplificó el fragmento por PCR.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 5.1. Diseño de una estrategia experimental para la obtención del dominio HYB de HAKAI.

La expresión heteróloga de proteínas es una técnica que permite la producción de cantidades significativas de proteínas puras, solubles y biológicamente activas de una forma sencilla, rápida y barata. Para la obtención de una proteína por vía recombinante el primer punto es la selección de un sistema de expresión, esto es, un organismo hospedador adecuado y un vector de expresión que contenga los elementos génicos necesarios para que pueda tener lugar la transcripción y traducción del gen de interés en el mismo<sup>22</sup>.

Pese a la gran variedad de organismos hospedadores disponibles en la actualidad, la bacteria *Escherichia coli* sigue siendo la más utilizada a nivel de laboratorio debido al amplio conocimiento sobre su fisiología y genética, su alta velocidad de crecimiento y rendimiento celular en medios de cultivo poco costosos y su capacidad para expresar elevados niveles de proteínas heterólogas<sup>22</sup>. Por ello, en este trabajo se seleccionó como organismo hospedador la cepa de *E.coli* manipulada genéticamente BL21(DE3), una cepa diseñada para maximizar la expresión de proteínas de fusión de longitud completa. Esta cepa deriva de la BL21 por lo que es deficiente en las proteasas Ion y OmpT y carece de la ARN polimerasa T7 de *E.coli*, si bien como característica distintiva contiene el profago  $\lambda$ DE3 portador del gen de la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor *lacUV5* inducible por isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Esto permite mantener una actividad mínima del promotor hasta alcanzar una alta densidad de crecimiento celular, e inducir en ese momento la expresión del promotor *lacUV5* con la adición del sustrato sintético análogo a la lactosa IPTG, que se une al represor *lacI* liberando el operón.

En cuanto a los vectores de expresión, para sistemas procarióticos suelen utilizarse vectores plasmídicos obtenidos por manipulación genética que presentan como componentes esenciales un origen de replicación, un promotor que regula la transcripción del gen de interés, un sitio de unión al ribosoma, la secuencia codificante para el gen de interés, terminadores de la transcripción, un sitio de clonación múltiple y marcadores de resistencia a antibióticos que facilitan la selección de los recombinantes y garantizan la

estabilidad del plásmido<sup>22</sup>. El vector seleccionado para llevar a cabo el clonaje fue el pGEX-6P-1 (Figura 5) que se caracteriza por presentar: el promotor *tac*, un promotor híbrido generado mediante la combinación de los promotores de los operones *trp* y *lac* UV5, que permiten conseguir unos niveles de expresión muy altos pero controlados gracias a la capacidad de inducción de la expresión por IPTG, el gen *lacI* que codifica para una proteína represora que se une al operón del promotor *tac*, un gen de resistencia a ampicilina como sistema de selección y una etiqueta GST N-terminal seguida de un sitio de corte reconocido por proteasas de PreScission.

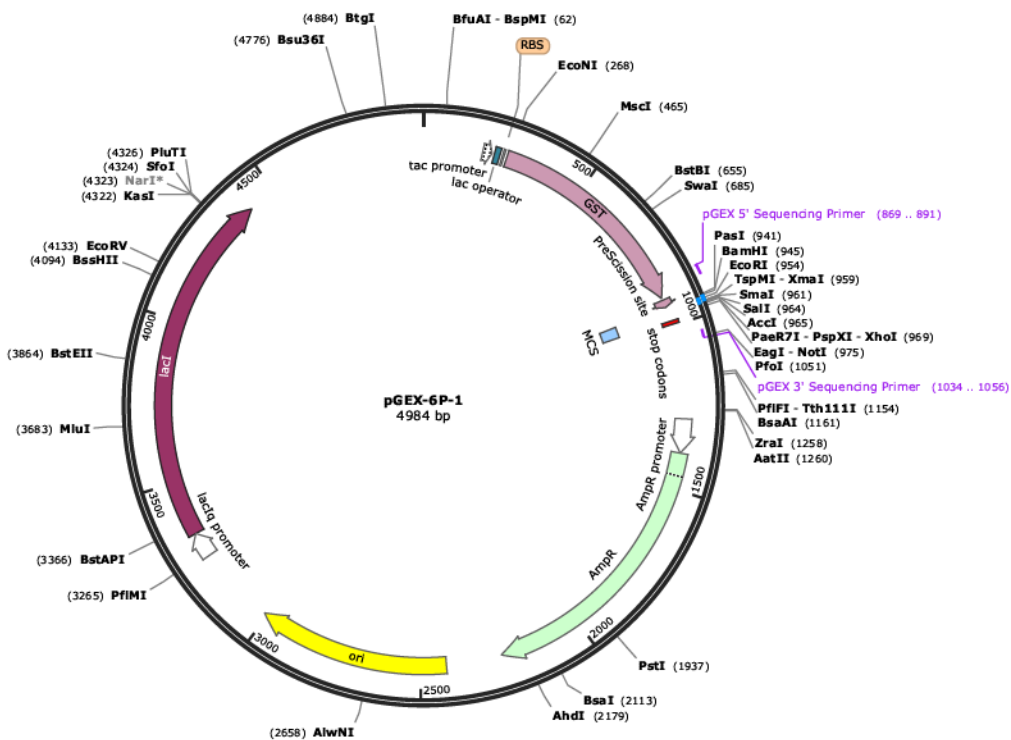


Figura 5. Mapa de la secuencia del plásmido pGEX-6P-1 en la que se indican sus componentes principales así como las dianas de restricción reconocidas por diferentes endonucleasas de restricción, imagen generada con SnapGene.

El sistema de fusión de genes de glutatión S-transferasa (GST) se basa en la expresión de genes o fragmentos de genes como fusiones con la secuencia codificante de la GST de *Schistosoma japonicum*. Las proteínas de fusión generadas conservan la actividad GST lo que permite su purificación a partir de lisados bacterianos por cromatografía de afinidad con glutatión inmovilizado. Además, su presencia aumenta la



solubilidad de las proteínas de interés al tiempo que facilitan su detección mediante métodos colorimétricos o inmunológicos<sup>23</sup>.

La elución de la proteína de fusión puede llevarse a cabo en condiciones suaves y no desnaturalizantes que conservan la funcionalidad de la misma por adición de glutatión reducido. No obstante, una alternativa que evita el paso adicional de escindir la etiqueta después de la elución, consiste en digerir la proteína de fusión con una proteasa de PreScission de forma que la fracción GST permanezca unida a la columna mientras que la proteína clonada es eluida con tampón de lavado. La proteasa de PreScission es una proteína de fusión de GST y la proteasa 3C del rinovirus humano que reconoce específicamente la secuencia de aminoácidos Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro, dividiéndola entre los residuos Gln y Gly. La fusión con GST permite eliminarla de forma sencilla de las reacciones de escisión utilizando glutatión sefarosa<sup>23</sup>.

Finalmente, en función de la pureza alcanzada con el diseño experimental descrito, puede ser conveniente introducir una segunda etapa de purificación por cromatografía de exclusión molecular. La cromatografía de exclusión molecular permite separar los componentes de una mezcla en función de su radio hidrodinámico (determinado por su forma y tamaño) mediante su exclusión o inclusión diferencial en una matriz porosa empaquetada en una columna<sup>24</sup>.

## **5.2. Obtención del inserto correspondiente a HAKAI (106aa-206aa).**

La amplificación del fragmento correspondiente con la secuencia codificante del dominio HYB de HAKAI, comprendida entre el aminoácido 106 y el aminoácido 206 de la proteína de longitud completa (491aa), se llevó a cabo mediante PCR utilizando como molde el plásmido pcDNA-Flag-HAKAI cedido por Yasuyuki Fujita. Las condiciones óptimas de la reacción se determinaron modificando los diferentes parámetros que se indican a continuación, y los resultados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa tal y como se describe en el apartado de material y métodos.

En primer lugar, la PCR se preparó empleando la *Taq* polimerasa y se evaluaron dos concentraciones de cebadores diferentes (1 $\mu$ M y 0.1 $\mu$ M), la adición de DMSO (1.5%)

a la mezcla de reacción, y un gradiente de temperaturas de 58°C a 75°C en la etapa de hibridación.

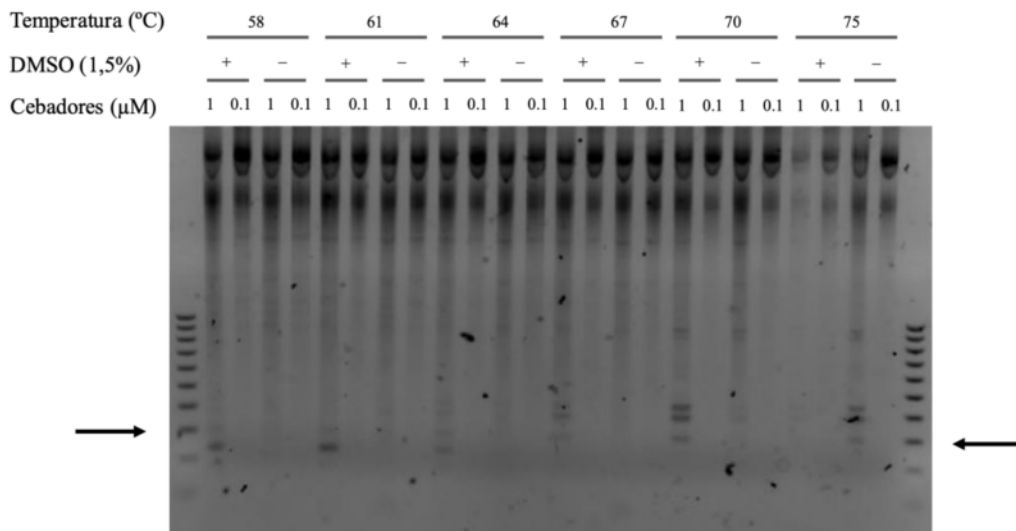


Figura 6. Resultados derivados de la primera prueba de amplificación de la secuencia codificante para el dominio HYB. En la imagen se presenta el gel de agarosa al 1.5% en el que se cargaron los productos de PCR de cada una de las condiciones evaluadas siguiendo el esquema de carga que se muestra en la parte superior. Las flechas negras indican la posición de la banda del marcador que se asocia a un tamaño de 300pb, aproximadamente el tamaño esperado para el fragmento de interés (323pb).

Los resultados obtenidos, que se reflejan en la Figura 6, evidenciaron la presencia de bandas inespecíficas y un exceso de ADN molde en todas las condiciones. Asimismo, la banda correspondiente con el tamaño esperado para el fragmento de interés (~300pb) solo pudo observarse a muy baja intensidad con una concentración de cebadores de 1 µM, un 1.5% de DMSO y a las temperaturas de 67°C y 70°C.

Teniendo esto en cuenta, se decidió repetir la prueba con la *Taq* polimerasa reduciendo la concentración de ADN molde a la mitad y con una temperatura de hibridación de 60°C para tratar de evitar una posible inhibición de la reacción a causa del exceso de ADN molde observado. Al mismo tiempo, se comprobó si los resultados mejoraban con la ADN polimerasa Phusion de alta fidelidad, utilizando nuevamente un gradiente de temperaturas para la etapa de hibridación, pero esta vez de 50°C a 72°C. Los resultados, que se reflejan en la Figura 7, indicaron que la amplificación mejoró de forma significativa con la polimerasa Phusion, observándose la banda correspondiente al tamaño de fragmento esperado en todas las condiciones de temperatura evaluadas excepto a 72°C.

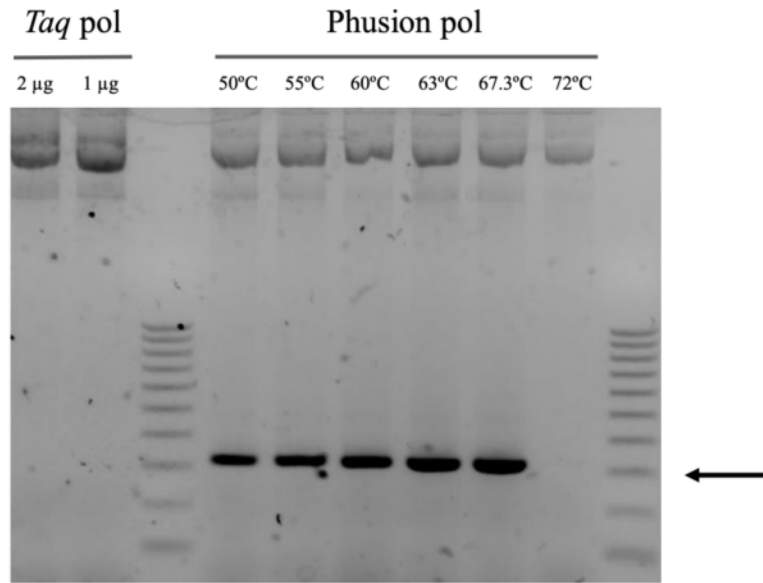


Figura 7. Resultados derivados de la segunda prueba de amplificación de la secuencia codificante para el dominio HYB. En la imagen se presenta el gel de agarosa al 1.5% en el que se cargaron los productos de PCR de cada una de las condiciones evaluadas siguiendo el esquema de carga que se muestra en la parte superior de la imagen. La flecha indica la banda del marcador que se asocia con un tamaño de 300pb, aproximadamente el tamaño esperado para el fragmento de interés (323pb).

Finalmente, se seleccionó el producto de PCR amplificado con una temperatura de hibridación de 60°C para llevar a cabo un rescate de la banda del gel y, mediante secuenciación, se comprobó su identidad de secuencia con el dominio HYB de HAKAI (Figura 8).

**Homo sapiens Cbl proto-oncogene like 1 (CBLL1), transcript variant 1, mRNA**

Sequence ID: [NM\\_024814.4](#) Length: 3987 Number of Matches: 1

Range 1: 362 to 610 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
460 bits(249)	3e-125	249/249(100%)	0/249(0%)	Plus/Minus
Query 2	AGGTTTCCAGCTCTCATATGGCGATGGTTGATATGAGCCTGTAAGTCTCTCTGAGACAA	61		
Sbjct 610	AGGTTTCCAGCTCTCATATGGCGATGGTTGATATGAGCCTGTAAGTCTCTCTGAGACAA	551		
Query 62	ATATGTTCTCTTGACCCCTTGAACAATGCTACACATGAAGAGAGAACCTCGGTACTACTG	121		
Sbjct 550	ATATGTTCTCTTGACCCCTTGAACAATGCTACACATGAAGAGAGAACCTCGGTACTACTG	491		
Query 122	CTCAATTCGCTGCACAGGATCACTACAGCCTGGACACATCTTATCTCCCTTTTTTTCATG	181		
Sbjct 490	CTCAATTCGCTGCACAGGATCACTACAGCCTGGACACATCTTATCTCCCTTTTTTTCATG	431		
Query 182	TAAAATAGCACAGTCATAGCAAAAAACATGCTTGCATGGAATCATTTCTCCCATAGATTTT	241		
Sbjct 430	TAAAATAGCACAGTCATAGCAAAAAACATGCTTGCATGGAATCATTTCTCCCATAGATTTT	371		
Query 242	AATAGGCAA	250		
Sbjct 370	AATAGGCAA	362		

Figura 8. Alineamiento del resultado de la secuenciación del producto de PCR con la secuencia de ARNm transcrita del gen CBLL1 humano, imagen tomada de NCBI BLAST.

### 5.3. Obtención de la construcción p-Gex-6p-1-HYB.

Una vez obtenido el fragmento correspondiente con el dominio de interés, el siguiente paso consistió en la digestión del producto de PCR y el vector de expresión con las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Sal*I de la casa comercial New England Biolabs. Ambas enzimas reconocen una secuencia palindrómica de ADN específica y generan extremos cohesivos no compatibles, lo que facilita el ligamiento al tiempo que reduce la probabilidad de recircularización del vector.

A continuación, con los productos de digestión generados se llevó a cabo una reacción de ligamiento mediada por la ADN ligasa T4 en la que se probaron diferentes proporciones de inserto/vector (3:1, 5:1 y 10:1). Tras ello, se transformaron bacterias competentes de la cepa de *E.coli* One Shot™ por choque térmico, siendo la proporción de inserto/vector 5:1 la que dio lugar un mayor número de colonias transformantes. Sin embargo, dado que el sistema de expresión empleado solo presenta como método de selección el gen de resistencia a ampicilina, el crecimiento de un mayor número de colonias en el medio selectivo es indicativo de que el plásmido ha sido incorporado, pero no es posible discriminar la presencia del inserto de forma directa. Por esta razón, para evaluar la presencia del inserto se extrajo el ADN plasmídico de 6 cepas candidatas de cada una de las condiciones y se utilizó como ADN molde en una reacción de PCR en la que se emplearon los cebadores que hibridan con el dominio HYB y las condiciones optimizadas para la polimerasa Phusion (temperatura de hibridación de 60°C). Desgraciadamente, no se obtuvo producto de amplificación para ninguno de los candidatos evaluados.

Tras repetir las reacciones de digestión y ligamiento y analizar la presencia del inserto en 7 nuevos candidatos derivados de una proporción de ligamiento 5:1 y otros 7 de una 10:1, y obtener de nuevo un resultado negativo, se decidió modificar las condiciones de digestión para tratar de optimizar esta etapa.

Las nuevas condiciones evaluadas fueron una doble digestión durante 16h a 16°C y una digestión secuencial que se llevó a cabo de la siguiente forma; una incubación inicial con *Sal*I a 37°C durante 1h seguida de una inactivación térmica a 65°C durante 20min y una segunda incubación tras la adición de *Bam*HI durante 1h a 37°C seguida de una nueva

inactivación térmica a 80°C durante 20min. Las condiciones de ligamiento no se variaron y se utilizó una proporción inserto/vector 5:1. Tras la transformación, solo se observó crecimiento en la digestión secuencial y se analizó la presencia del inserto por PCR en 12 candidatos. En este caso, se utilizaron los cebadores externos p-Gex que hibridan con secuencias flanqueantes al sitio de clonaje múltiple donde debería haberse insertado el fragmento. De esta forma es posible confirmar que la PCR transcurre correctamente pues independientemente de que el vector esté o no vacío se obtiene un producto de amplificación, diferenciándose la presencia o ausencia del inserto en función del tamaño de la banda obtenido (473pb y 188pb respectivamente). Sin embargo, como se observa en la Figura 9, los productos de PCR obtenidos presentan un tamaño de aproximadamente 200pb que se corresponden con la secuencia sin inserto que amplifican los cebadores externos y se confirma así que todos los candidatos derivan de una transformación con un plásmido vacío.

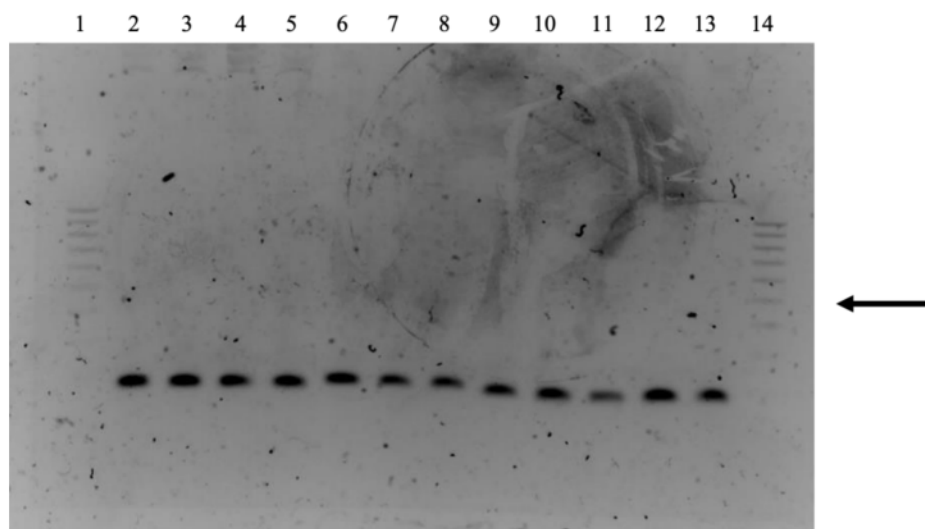


Figura 9. Resultados derivados de la amplificación por PCR de la secuencia codificante para el dominio HYB a partir del ADN plasmídico extraído de los 12 candidatos evaluados (carriles 2 a 13). En la imagen se muestra el gel de agarosa al 1.5% en el que se cargaron los productos de PCR amplificados con los cebadores externos. La flecha indica la banda del marcador (carriles 1 y 14) que se asocia con un tamaño de 500pb, aproximadamente el tamaño esperado para el fragmento de interés (473pb).

Teniendo en cuenta que la probabilidad de recircularización del vector al ser digerido por dos enzimas que generan extremos no compatibles debería ser baja, y que el número de colonias crecidas tras la transformación fue relativamente alto, se sospechó que alguna de las enzimas utilizadas no estaba teniendo la actividad esperada. Esto

explicaría la elevada frecuencia de recircularización observada, pues los extremos cohesivos generados en la digestión del vector con una única enzima no solo son compatibles, sino que tienen una elevada tendencia a rehibridar debido a su proximidad al formar parte de la misma molécula.

Para comprobarlo, se realizó una prueba de digestión del vector circular con cada una de las enzimas por separado y los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% utilizando el vector sin digerir como referencia. Con este ensayo se espera que, si las enzimas de restricción reconocen su diana y cortan el ADN plasmídico, se genere un fragmento lineal del mismo tamaño molecular que el vector circular pero con diferente forma, que ocupa un volumen efectivo distinto y avanza a mayor velocidad en el gel. El resultado obtenido, que se refleja en la Figura 10A, muestra como la actividad de *SalI* da lugar al producto linealizado esperado que migra más rápido en el gel y como, sin embargo, no ocurre lo mismo con *BamHI*, donde se observa el mismo patrón de bandas que con el vector circular, lo que indica que esta enzima no es capaz de reconocer y digerir su diana de restricción.

Con el fin de solventar este problema se decidió repetir la prueba con una pareja de enzimas de la casa comercial ThermoFisher y, en esta ocasión, sí se obtuvo el resultado esperado que permitió confirmar que tanto *BamHI* como *SalI* reconocen su diana de restricción y digieren el ADN de forma específica en un único punto (Figura 10B).

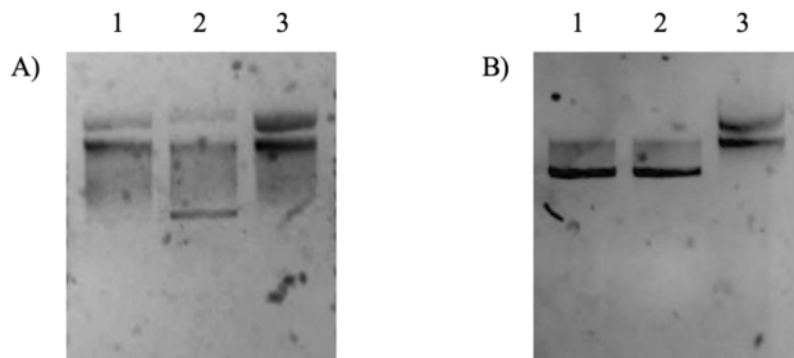


Figura 10. Prueba de digestión del vector circular con las parejas de enzimas de cada casa comercial. A) En la imagen se muestra el gel de agarosa al 1.5% en el que se cargaron los productos de la digestión con *BamHI* (carril 1) y *SalI* (carril 2) de la casa comercial New England Biolabs, así como el vector circular utilizado como referencia para evaluar transcurso de la reacción de digestión (carril 3). B) En la imagen se muestra el gel de agarosa al 1.5% en el que se cargaron los productos de la digestión con *BamHI* (carril 1) y *SalI* (carril 2) de la casa comercial ThermoFisher, así como el vector circular utilizado como referencia para evaluar transcurso de la reacción de digestión (carril 3).

Una vez confirmada la actividad de la pareja de endonucleasas de restricción se repitió la digestión del fragmento y del vector con las condiciones indicadas en el apartado de material y métodos y, seguidamente, se llevó a cabo la reacción de ligamiento con unas proporciones inserto/vector 3:1 y 5:1. El número de colonias crecidas tras la transformación fue mucho menor y se seleccionaron 5 candidatos de cada condición para analizar la presencia del inserto por PCR. Desafortunadamente, como se observa en la Figura 11, todos los productos de amplificación se asocian con un tamaño de banda mucho menor al esperado para el fragmento de interés.

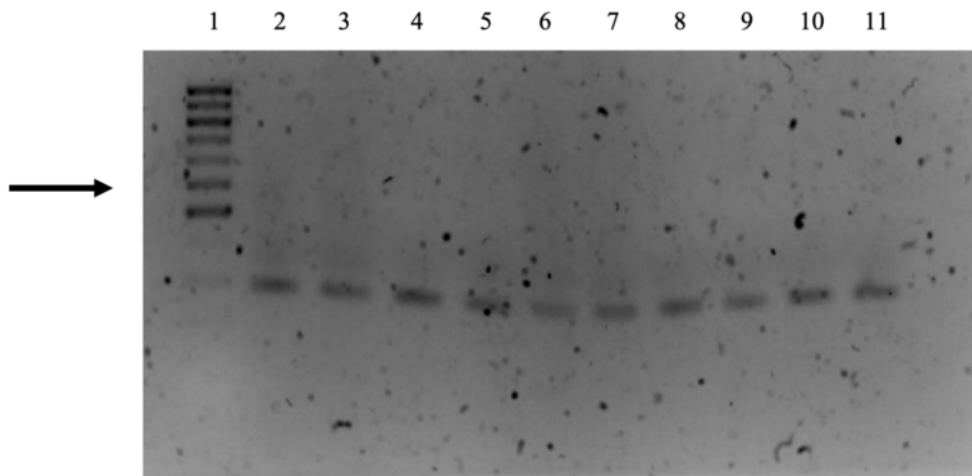


Figura 11. Resultados derivados de la amplificación por PCR de la secuencia codificante para el dominio HYB a partir del ADN plasmídico extraído de los 10 candidatos evaluados tras la nueva reacción de ligamiento (carriles 2 a 11). En la imagen se muestra el gel de agarosa al 1.5% en el que se cargaron los productos de PCR amplificados con los cebadores externos. La flecha indica la banda del marcador (carril 1) que se asocia con un tamaño de 500pb, aproximadamente el tamaño esperado para el fragmento de interés (473pb).

Llegados a este punto y dada la duración limitada de este Trabajo de Fin de Máster, no se pudo continuar la puesta a punto del método para la obtención del dominio HYB de la E3 Ubiquitina-ligasa HAKAI. No obstante, se presentan las siguientes propuestas como posibles estrategias de cara al futuro.

En primer lugar, a pesar de haber confirmado que la pareja de enzimas de la casa comercial ThermoFisher corta de forma específica y eficiente el vector de expresión, es posible que el reconocimiento de las dianas de restricción en el fragmento amplificado por PCR no esté teniendo lugar. Aunque los cebadores diseñados para la amplificación de la secuencia correspondiente al dominio HYB incluyen tanto la diana de restricción

para cada una de las endonucleasas, como 4 nucleótidos adicionales, puede que sea necesario aumentar el número de nucleótidos hasta 6 o incluso 8 para facilitar el reconocimiento. Por tanto, la primera propuesta de cara a la continuidad del proyecto sería rediseñar los cebadores y probar de nuevo el clonaje siguiendo el procedimiento planteado hasta el momento.

No obstante, otra opción que se puede tener en cuenta pasa por variar la técnica de clonaje y probar un método basado en el uso de recombinasas en lugar de enzimas de restricción como la tecnología Gateway. La tecnología Gateway® es un método de clonaje universal que utiliza la recombinación específica de sitio del bacteriófago lambda para facilitar la transferencia de secuencias de ADN heterólogas entre múltiples vectores<sup>25</sup>. Con este método, el vector de expresión se consigue gracias a dos reacciones de recombinación secuenciales que se basan en el reconocimiento de secuencias att (sitio de reconocimiento específico del bacteriófago lambda) modificadas que se describen brevemente a continuación.

La reacción **BP** (Figura 12) facilita la recombinación de un sustrato attB flanqueado por sitios attB, como puede ser un producto de PCR con las secuencias adaptadoras adecuadas, con un sustrato attP (vector donante) para crear un vector de entrada que contiene las secuencias attL. En esta reacción el gen letal ccdB del vector donante se sustituye por gen de interés evitando así la aparición de falsos positivos.

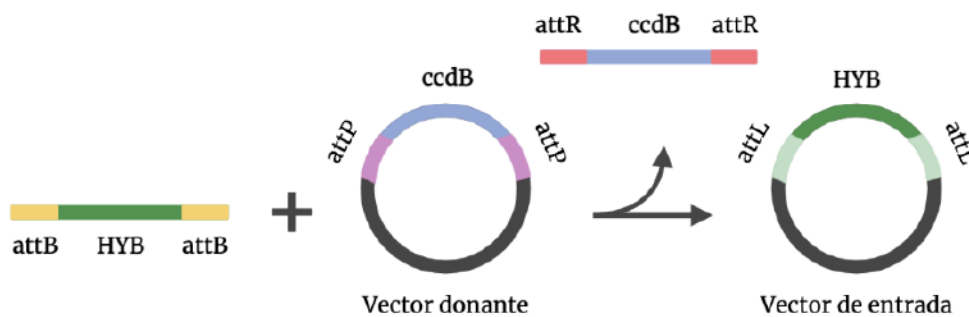


Figura 12. Esquema de la reacción BP mediante la que se obtiene el vector de entrada.



La reacción **LR** (Figura 13) facilita la recombinación del sustrato attL (vector de entrada) con un sustrato attR (vector de destino) para generar un vector de expresión que contiene las secuencias attB. Nuevamente, el gen ccdB que codifica para un subproducto tóxico presente en el vector de destino es sustituido en esta reacción por el gen de interés evitando así la aparición de falsos positivos.

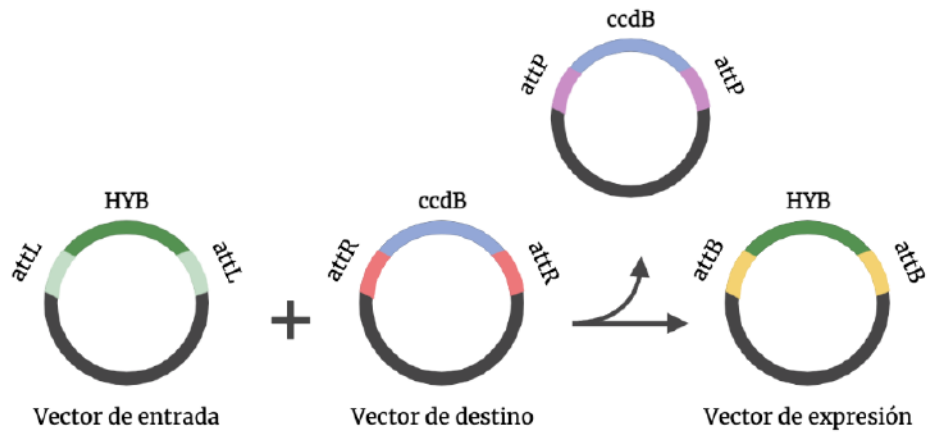


Figura 13. Esquema de la reacción LR mediante la que se obtiene el vector de expresión.

## CONCLUSIONES

---

En vista de los resultados obtenidos y atendiendo a los objetivos propuestos, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- Se avanzó en la puesta a punto del clonaje llegando a obtener la secuencia codificante del dominio HYB de HAKAI (106aa-206aa) con las dianas de restricción adecuadas para llevar a cabo la digestión y el ligamiento con el vector de expresión p-GEX-6P-1, portador de la etiqueta GST que permite su posterior purificación por cromatografía de afinidad.
- No fue posible obtener la construcción p-GEX-6P-1-HYB de ninguna de las colonias transformantes candidatas analizadas por PCR a pesar de probar la digestión con enzimas de restricción de diferentes casas comerciales y el ligamiento con distintas proporciones de fragmento/vector.

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell Death Dis.* 2017;168(4):670-691. doi:10.1016/j.cell.2016.11.037
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
3. Aparicio LA, Blanco M, Castosa R, et al. Clinical implications of epithelial cell plasticity in cancer progression. *Cancer Lett.* 2015;366(1):1-10. doi:10.1016/j.canlet.2015.06.007
4. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell Death and Disease.* 2016;166(1):21-45. doi:10.1016/j.cell.2016.06.028
5. Yang J, Antin P, Berx G, et al. Author Correction: Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22(12):834. doi:10.1038/s41580-021-00428-9
6. Quiroga M, Rodríguez-Alonso A, Alfonsín G, et al. Protein Degradation by E3 Ubiquitin Ligases in Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel).* 2022;14(4):990. doi:10.3390/cancers14040990
7. De Las Rivas J, Brozovic A, Sivan I, Casas-Pais A, Witz IP, Figueroa A. Cancer drug resistance induced by EMT: novel therapeutic strategies. *Arch Toxicol.* 2021;95:2279-2297. doi:10.1007/s00204-021-03063-7
8. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell Death Dis.* 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
9. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Developmental Cell.* 2008;14(6):818-829. doi:10.1016/j.devcel.2008.05.009

10. Aparicio LA, Valladares M, Blanco M, Alonso G, Figueroa A. Biological influence of Hakai in cancer: a 10-year review. *Cancer Metastasis Rev.* 2012;31(1-2):375-386. doi:10.1007/s10555-012-9348-x
11. Fujita Y, Krause G, Scheffner M, et al. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol.* 2002;4(3):222-231. doi:doi:10.1038/ncb758
12. Pece S, Gutkind JS. E-cadherin and Hakai: signalling, remodeling or destruction? *Nat Cell Biol.* 2002;4(4):E72-E74. doi:10.1038/ncb0402-e72
13. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:503-533. doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.503
14. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:425-479. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.425
15. Deshaies RJ, Joazeiro CAP. RING Domain E3 Ubiquitin Ligases. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:399-434. doi:10.1146/annurev.biochem.78.101807.093809
16. Rodríguez-Alonso A, Casas-Pais A, Roca-Lema D, Graña B, Romay G, Figueroa A. Regulation of Epithelial-Mesenchymal Plasticity by the E3 Ubiquitin-Ligases in Cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(11):3093. doi:10.3390/cancers12113093
17. Ardley HC, Robinson PA. E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem.* 2005;41:15-30. doi:10.1042/EB0410015
18. Cooper JA, Kaneko T, Li SSC. Cell Regulation by Phosphotyrosine-Targeted Ubiquitin Ligases. *Mol Cell Biol.* 2015;35(11):1886-1897. doi:10.1128/MCB.00098-15
19. Mukherjee M, Chow SY, Yusoff P, et al. Structure of a novel phosphotyrosine-binding domain in Hakai that targets E-cadherin. *EMBO J.* 2012;31(5):1308-1319. doi:10.1038/emboj.2011.496
20. Kaneko T, Joshi R, Feller SM, Li SSC. Phosphotyrosine recognition domains: the typical, the atypical and the versatile. *Cell Commun Signal.* 2012;10(1):32. doi:10.1186/1478-811X-10-32

21. Martínez-Iglesias O, Casas-Pais A, Castosa R, et al. Hakin-1, a New Specific Small-Molecule Inhibitor for the E3 Ubiquitin-Ligase Hakai, Inhibits Carcinoma Growth and Progression. *Cancers (Basel)*. 2020;12(5):1340. doi:10.3390/cancers12051340
22. González A, Fillat MF. Aspectos Metodológicos de la Expresión de Proteínas Recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista de Educación Bioquímica*. 2018;37(1):14-27.
23. Cytiva. *GST Gene Fusion System*.; 2021. Recuperado el 5 de septiembre del 2022 de <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-11873-pdf>
24. Amersham Bioscience. *Gel Filtration. Principles and Methods*.; 2002. Recuperado el 5 de septiembre del 2022 de <http://josephgroup.ucsd.edu/Protocols/AKTA/Gel%20Filtration.pdf>
25. Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination. *Genome Res*. 2000;10(11):1788-1795. doi:10.1101/gr.143000

FIGUEROA  
CONDE-VALVIS  
ANGELICA -  
52988974X

Firmado digitalmente  
por FIGUEROA CONDE-  
VALVIS ANGELICA -  
52988974X  
Fecha: 2022.09.06  
10:28:18 +02'00'