



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN BIOMEDICINA Y TERAPIAS AVANZADAS



ESTUDIO DE LA FOSFATASA DE TIROSINA PTPN18 Y SU INTERACCIÓN
CON CSK.

Study of tyrosine phosphatase PTPN18 and its interaction with CSK.

Autor/a:

D^a. Aitana Merino Fernández

Tutor/es:

D^a. Yolanda Bayón Prieto

TÍTULO: Estudio de la fosfatasa de tirosina PTPN18 y su interacción con CSK.
AUTOR/A: AITANA MERINO FERNÁNDEZ
TUTOR/ES: YOLANDA BAYÓN PRIETO
ÁREA/DEPARTAMENTO: Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología (BBM)

TRIBUNAL

PRESIDENTE: D^a. Nieves Fernández García (BBM)
SECRETARIO: D. Sergio de la Fuente Pérez (BBM)
VOCAL: D^a. Yolanda Bayón Prieto (BBM)
SUPLENTE 1: D. Jaime Santo-Domingo (BBM)
SUPLENTE 2: D. Juan José Tellería Orriols (Biología Celular, Genética, Histología y Farmacología)

FECHA: 16/07/2025

CALIFICACIÓN:

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a todas las personas que han formado parte de este proceso, tanto en la realización de este trabajo como a lo largo de mi etapa universitaria.

En primer lugar, a mi tutora Yolanda, por enseñarme tanto, por su paciencia y su apoyo constante. Su ayuda ha sido fundamental.

Al resto del equipo del laboratorio, gracias por vuestra acogida y por hacer que cada día aprendiese algo nuevo. Ha sido una experiencia enriquecedora.

A mis amigas, que han sido un apoyo fundamental para mí durante toda la carrera, gracias por estar ahí cuando lo he necesitado.

A mis padres, por estar siempre a mi lado y por creer en mí incluso cuando yo tenía dudas. Gracias por todo lo que habéis hecho por mí.

RESUMEN

La fosforilación en residuos de tirosina es un tipo de modificación postraducciona en la que intervienen dos tipos de enzimas: las quinasas y las fosfatasas. Dichas proteínas actúan de manera coordinada para mantener la homeostasis celular, cuya pérdida se ha asociado con la aparición de diversas enfermedades. Dentro de las funciones reguladas mediante la fosforilación, la interacción entre proteínas es una de ellas. Este trabajo se centró en el estudio de la fosfatasa de tirosina PTPN18 y su interacción con la quinasa de tirosina CSK, dos enzimas clave en procesos de señalización celular cuyo mecanismo de interacción no es del todo conocido. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación, microscopía confocal y citometría de flujo utilizando como modelo la línea celular humana HEK293. Los hallazgos más relevantes indicaron que PTPN18 interacciona con el dominio SH2 de CSK a través del residuo de tirosina 389 fosforilado mediante la acción de quinasas como Fes o la propia CSK. Además, esta interacción tiene lugar en el citosol de la célula. Estos resultados sirven para ampliar los conocimientos acerca de una interacción poco explorada que podría ser relevante en la regulación de múltiples procesos celulares.

Palabras clave: Fosforilación de tirosina, PTPN18, CSK, interacción entre proteínas, Fes.

ABSTRACT

Phosphorylation at tyrosine residues is a type of post-translational modification involving two types of enzymes: kinases and phosphatases. These proteins act in a coordinated manner to maintain cellular homeostasis, the loss of which has been associated with the onset of various diseases. Among the functions regulated by phosphorylation, protein-protein interaction is one of them. This work focused on the study of tyrosine phosphatase PTPN18 and its interaction with tyrosine kinase CSK, two key enzymes in cell signalling processes whose interaction mechanism is not fully understood. For this purpose, immunoprecipitation, confocal microscopy and flow cytometry assays were performed using the human cell line HEK293 as a model. The most relevant findings indicated that PTPN18 interacts with the SH2 domain of CSK through the phosphorylated tyrosine residue 389 via the action of kinases such as Fes or CSK itself. Moreover, this interaction takes place in the cytosol of the cell. These results serve to expand the knowledge about an underexplored interaction that could be relevant in the regulation of multiple cellular processes.

Keywords: Tyrosine phosphorylation, PTPN18, CSK, protein-protein interaction, Fes.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Fosforilación de proteínas	1
1.2	Fosforilación en residuos de tirosina.....	2
1.3	Fosfatasas de tirosina	2
1.4	Fosfatasa de tirosina de tipo no receptor 18 (PTPN18).....	3
1.5	Quinasas de tirosina	4
1.5.1	C-terminal Src kinase (CSK)	4
1.5.2	c-Fes.....	5
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	6
3	MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1	Materiales.....	7
3.1.1	Soluciones y tampones.....	7
3.1.2	Anticuerpos	7
3.1.3	Plásmidos	8
3.2	Métodos.....	8
3.2.1	Tratamiento de cristales con poli-L-Lisina	8
3.2.2	Cultivo celular.....	8
3.2.3	Transfección de las células.....	9
3.2.4	Preparación de muestras para microscopía confocal.....	9
3.2.4.1	Fijación de las células.....	9
3.2.4.2	Tinción de los núcleos y montaje	9
3.2.5	Visualización de las muestras mediante microscopía confocal	9
3.2.6	Citometría de flujo	10
3.2.7	Complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC)	10
3.2.8	Tratamiento con pervanadato.....	11
3.2.9	Inmunoprecipitación de proteínas	11
3.2.10	Western Blot	12
4	RESULTADOS	13
4.1	Localización celular de las proteínas PTPN18, CSK, PSTPIP1 y Fes.....	13
4.2	Interacción de PTPN18 y CSK dependiente de la fosforilación de PTPN18.....	14
4.2.1	Fosforilación de PTPN18.....	14
4.2.2	Interacción de PTPN18 con CSK.....	15
5	DISCUSIÓN	18
6	CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	20
7	BIBLIOGRAFÍA	21

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos empleados en la técnica de Western Blot.	7
--	---

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del proceso de fosforilación-desfosforilación de proteínas.	1
Figura 2. Clasificación de las fosfatasa de tirosina existentes en el genoma humano.	3
Figura 3. Representación esquemática de la estructura primaria de la isoforma canónica de PTPN18.	4
Figura 4. Representación esquemática de la estructura primaria de las quinasas CSK y c-Src. ...	5
Figura 5. Mecanismo de regulación de las quinasas de la familia Src.	5
Figura 6. Representación esquemática de la estructura primaria de la quinasa c-Fes.	6
Figura 7. Representación esquemática de la estructura del vector de expresión empleado.	8
Figura 8. Ensayo de complementación de fluorescencia bimolecular. Formación del complejo fluorescente a través de la interacción entre dos proteínas.	11
Figura 9. Localización celular de diferentes proteínas.	13
Figura 10. Colocalización de las proteínas PSTPIP1 y PTPN18.	14
Figura 11. Colocalización de las proteínas CSK y PTPN18.	14
Figura 12. Estudio mediante inmunoprecipitación (IP) de proteínas de la fosforilación de PTPN18 y las quinasas involucradas en ella.	15
Figura 13. Interacción entre CSK y PTPN18.	16
Figura 14. Estudio de la interacción entre CSK y PTPN18 mediante ensayos de IP.	17
Figura 15. Estudio mediante citometría de flujo de la interacción entre PTPN18 y CSK o PSTPIP1.	18

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	DEFINICIÓN
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BDP1	Fosfatasa derivada de cerebro número 1
BiFC	Complementación de fluorescencia bimolecular
BSA	Albúmina sérica bovina
Cbp	Proteína de unión a CSK
CSK	Quinasa del extremo C-terminal de Src
CTH	Dominio de homología carboxilo terminal
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
ECL	Quimioluminiscencia mejorada
EGFP	Proteína fluorescente verde mejorada
EYFP	Proteína fluorescente amarilla mejorada
F-BAR	Dominio de homología a Fes/CIP4 – Bin/Amfifisina/Rvs
FX	Dominio de extensión F-BAR
GTP	Guanosín trifosfato
HA	Hemaglutinina
HEBS	Solución salina tamponada con HEPES
HEK293	Línea celular humana de riñón embrionario
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IP	Inmunoprecipitación
LYP	Fosfatasa de tirosina linfoide
PAPA	Artritis piogénica, pioderma gangrenoso y acné
PBS	Tampón fosfato salino
PEST	Prolina, ácido glutámico, serina y treonina

PSTPIP1	Proteína 1 que interacciona con las fosfatasaas ricas en prolina, serina y treonina
PSTPIP2	Proteína 2 que interacciona con las fosfatasaas ricas en prolina, serina y treonina
PTK	Proteína quinasa de tirosina
PTP	Proteína fosfatasa de tirosina
PTP-HSCF	Proteína fosfatasa de tirosina de la fracción de células madre hematopoyéticas
PTPN18	Proteína fosfatasa de tirosina de tipo no receptor 18
PTP-PEST	Proteína fosfatasa de tirosina con secuencia rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina
PY/pTyr	Residuo de tirosina fosforilado/fosfotirosina
SH2	Dominio de homología a Src 2
SH3	Dominio de homología a Src 3
Src	Protooncogén derivado del virus del sarcoma de Rous
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TBS-T	Tampón tris salino con Tween
TL	Lisado total
WB	Western Blot
WT	Tipo salvaje (wild-type)
YFP	Proteína fluorescente amarilla

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Fosforilación de proteínas

La fosforilación de proteínas es un tipo de modificación postraduccional común que resulta crucial en la regulación de la función proteica y celular, así como en la transducción de señales intracelulares (1). Consiste en la adición covalente reversible de un grupo fosfato cargado negativamente a residuos de aminoácidos específicos, en la que intervienen dos tipos de enzimas que presentan funciones antagónicas, las quinasas y las fosfatasas (2). Por una parte, las quinasas de proteína, también conocidas como fosfotransferasas, catalizan la transferencia del grupo fosfato en posición gamma de la molécula de ATP (o, en ocasiones, de GTP) a grupos hidroxilo de sus sustratos proteicos (3). Por otra parte, las fosfatasas de proteína se encargan de eliminar mediante hidrólisis dicho grupo fosfato a través de un mecanismo conocido como desfosforilación. Aunque la fosforilación ocurre principalmente en serina, seguido de treonina y tirosina, con una frecuencia relativa de 11.2: 2.5: 1 (1), también puede tener lugar con menor frecuencia en otros residuos como histidina o ácido aspártico (4) (Figura 1).

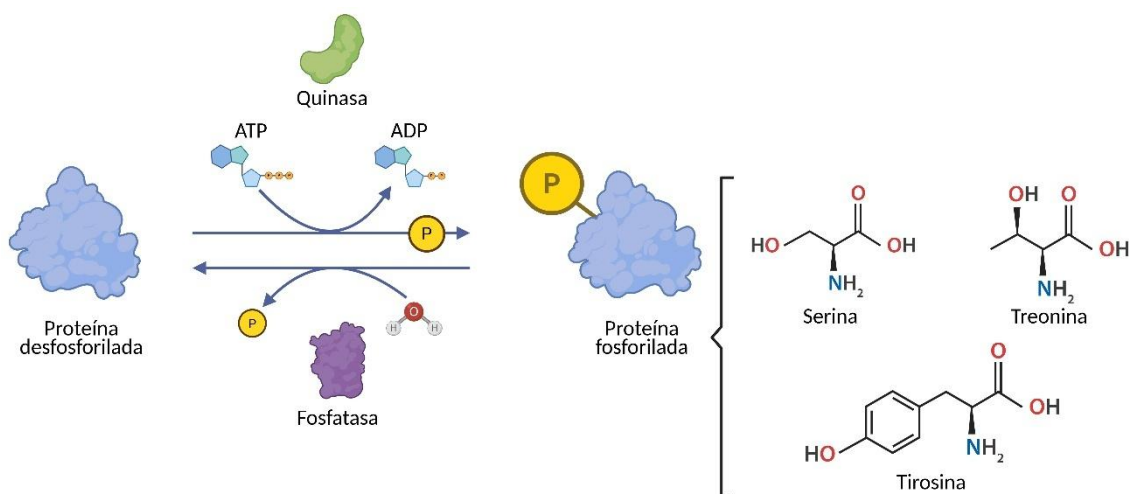


Figura 1. Representación esquemática del proceso de fosforilación-desfosforilación de proteínas. Se muestra el mecanismo de acción de las enzimas involucradas en este, así como los principales residuos proteicos en los que tiene lugar dicha modificación postraduccional. Creada con BioRender.com.

Dentro de los procesos celulares mediados por la fosforilación de proteínas destaca la transducción de señales en células eucariotas, aunque también controla otros muchos, como el metabolismo, la transcripción, la progresión del ciclo celular, la reorganización del citoesqueleto, la apoptosis, la diferenciación, la contracción muscular y la inmunidad (5,6). Esto es posible porque la presencia de dicha modificación postraduccional provoca cambios conformacionales que modifican las propiedades de las proteínas, afectando a su actividad enzimática, permitiendo que estas interaccionen de forma temporal con otras proteínas o facilitando el cambio de localización subcelular (2).

En condiciones fisiológicas, la fosforilación y la desfosforilación están reguladas de manera estrecha, asegurando el mantenimiento de la homeostasis celular. Cambios aberrantes en este mecanismo se han asociado con diversas patologías humanas, tanto hereditarias como adquiridas, incluyendo distintos tipos de cáncer, disfunciones inmunológicas y trastornos neurodegenerativos, entre otras (7–10).

1.2 Fosforilación en residuos de tirosina

A pesar de que la fosforilación en tirosina representa una pequeña fracción del fosfoproteoma (inferior a 2%) (11), resulta crucial en múltiples procesos, como la señalización de receptores de factores de crecimiento, la adhesión celular mediada por integrinas, la regulación del metabolismo a través del receptor de insulina, el control del ciclo celular mediante la inhibición de quinasas dependientes de ciclina, la activación de factores de transcripción de la familia STAT, el envejecimiento e incluso la señalización de múltiples receptores inmunológicos, como los receptores de antígenos (12–14).

Las enzimas implicadas en la fosforilación reversible de residuos de tirosina son las proteínas quinasas de tirosina (PTKs) y las proteínas fosfatasas de tirosina (PTPs). A pesar de que ambas son cruciales en procesos de señalización celular, las fosfatasas de tirosina han sido objeto de un menor número de investigaciones, fundamentalmente porque se asumía que funcionaban con una actividad basal constante y que actuaban como proteínas constitutivas carentes de especificidad de sustrato. Sin embargo, hoy en día se sabe que su función va más allá (15).

1.3 Fosfatasas de tirosina

Aunque las fosfatasas de tirosina se clasifican en diferentes familias, todas ellas comparten el mismo mecanismo catalítico basado en el ataque nucleofílico del aminoácido catalítico de la enzima al grupo fosfato del sustrato. Dependiendo de cuál sea el aminoácido catalítico que inicie el ataque, se pueden distinguir tres tipos de fosfatasas de tirosina: las dependientes de cisteína (Cys), las dependientes de ácido aspártico (Asp) y las dependientes de histidina (His); siendo las primeras las más importantes y numerosas (16) (Figura 2).

Dentro de las fosfatasas de tirosina dependientes de cisteína (Cys-fosfatasas) se encuentran las PTPs de Clase I, que a su vez se dividen en 6 subclases diferentes, siendo las PTPs clásicas (subclase I) unas de las más relevantes. Estas últimas forman un grupo homogéneo de enzimas que se caracteriza por la presencia de dominios PTP y motivos catalíticos altamente conservados (HCSxGxGR) (16). Es a esta subclase a la que pertenece la fosfatasa de tirosina de tipo no receptor 18, PTPN18, que junto con la fosfatasa de tirosina linfocítica (LYP) y la fosfatasa de tirosina PEST (PTP-PEST) dan lugar a la llamada subfamilia de fosfatasas PEST, que recibe dicho nombre debido a que las proteínas que la integran son ricas en residuos de prolina, ácido glutámico, serina y treonina (PEST) (17,18).

De las tres fosfatasa PEST descritas, PTPN18 ha sido la menos estudiada hasta la fecha, y aún se desconoce gran parte de su función biológica.

					Miembros
Cys-based CxxxxxR	Class I	Subclass I	Classic	37	PTPRC, PTP-PEST, PTPN18, LYP, etc
		Subclass II	VH1-like	63	DUSP1, PTEN, MTM1, etc
		Subclass III	SACs	6	SACM1L, SYNJ1, SYNJ2, etc
		Subclass IV	PALD1	1	PALD1
		Subclass V	INPP4s	2	INPP4A, INPP4B
		Subclass VI	TMEM55s	2	TMEM55A, TMEM55B
	Class II		LMW-PTP	1	ACP1
			SSU72	1	SSU72
	Class III		CDC25s	3	CDC25A, CDC25B, CDC25C
Asp-based	HAD		EYAs	4	EYA1, EYA2, EYA3, EYA4
His-based	PGM		UBASH3s	2	UBASH3A, UBASH3B
	Acid phosphatases		ACPs	3	ACPP, ACP2, ACPT

Figura 2. Clasificación de las fosfatasa de tirosina existentes en el genoma humano. Cada color representa a una familia de fosfatasa de tirosina agrupadas en función del aminoácido catalítico. Diferentes familias dentro de un grupo aparecen con distintos tonos del mismo color. Se indica el motivo catalítico compartido por todas las Cys-fosfatasa. Los números indican los miembros que hay dentro de cada grupo, mientras que la columna verde muestra algunos de los miembros dentro de cada clase/subclase de fosfatasa de tirosina. Imagen modificada (16).

1.4 Fosfatasa de tirosina de tipo no receptor 18 (PTPN18)

PTPN18, también conocida como PTP-HSCF (por sus siglas en inglés *Protein Tyrosine Phosphatase - Hematopoietic Stem Cell Fraction*) o BDP1 (por sus siglas en inglés *Brain-Derived Phosphatase 1*), entre otros nombres; es una fosfatasa de tirosina que se expresa mayoritariamente en células hematopoyéticas primitivas, aunque también se ha encontrado en otros tejidos como cerebro y colon (19), e incluso en varias líneas celulares tumorales (20). Dicha proteína, codificada por el gen PTPN18 localizado en el brazo largo del cromosoma 2, presenta dos isoformas: la canónica, de 460 aminoácidos; y otra más pequeña, de 353 aminoácidos; descubierta mediante análisis bioinformáticos, fruto de una delección de 4 exones de la región catalítica (21). En cuanto a su localización dentro de la célula, PTPN18 es más abundante en el citosol, si bien puede estar presente también en el núcleo (22). A nivel estructural, esta fosfatasa se caracteriza por la presencia de un dominio catalítico de tipo PTP en el extremo amino terminal, una región central con sitios de fosforilación en tirosinas, y un dominio de homología carboxilo terminal (CTH) conservado en las fosfatasa PEST y rico en prolina (19) (Figura 3). A pesar de que la actividad catalítica de PTPN18 es propia del dominio fosfatasa, las regiones no catalíticas también tienen su función, pues se encargan de establecer interacciones con otras proteínas celulares, contribuyendo a la organización y regulación de cascadas de señalización. Por ejemplo, existe evidencia que establece que el dominio CTH de

PTPN18 se une a las proteínas adaptadoras PSTPIP1 y PSTPIP2 (por sus siglas en inglés *proline, serine, threonine phosphatase interacting protein 1 or 2*), que están involucradas en la organización del citoesqueleto (23,24). Mutaciones en dichas proteínas adaptadoras se han asociado con el desarrollo de enfermedades autoinflamatorias raras (25,26). Por otra parte, algunos estudios han afirmado que dicha fosfatasa interacciona con la quinasa de tirosina CSK (por sus siglas en inglés *C-terminal Src kinase*). Esta unión es posible gracias al dominio SH2 (por sus siglas en inglés *Src homology 2*) de CSK, que se une de manera selectiva a residuos de fosfotirosina (pTyr) presentes en la región central de PTPN18 (27). A pesar de ello, hay aspectos de esta interacción que no están del todo claros. De manera similar, se han identificado interacciones entre CSK y los otros dos miembros de la familia de fosfatasas PEST, LYP y PTP-PEST. Sin embargo, en este caso la asociación se produce a través del dominio SH3 de CSK, que se une a motivos ricos en prolina presentes en estas proteínas (28–30). Los dominios de CSK se describen más adelante (Figura 4).

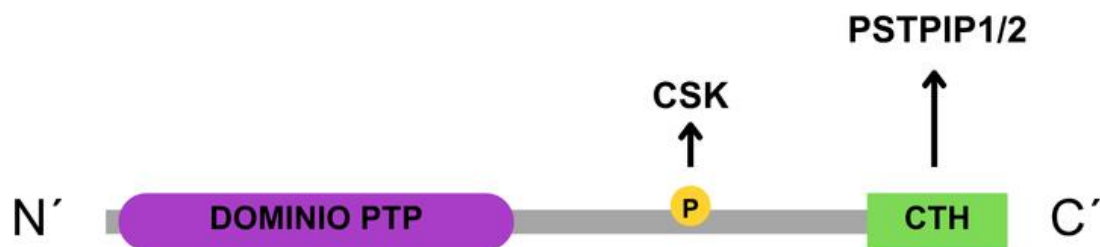


Figura 3. Representación esquemática de la estructura primaria de la isoforma canónica de PTPN18. En la imagen se muestran el dominio catalítico de tipo PTP, la región PEST y el dominio de homología del extremo carboxilo terminal (CTH). La letra P representa un residuo de tirosina fosforilado. Las flechas indican la interacción de PTPN18 con las proteínas descritas y la región en la que se produce.

1.5 Quinasas de tirosina

Por otro lado, dentro de las quinasas de tirosina clásicas se pueden distinguir dos grandes grupos: las receptoras y las no receptoras (31). Las receptoras se encuentran en la membrana celular y se activan directamente al recibir señales extracelulares, mientras que las no receptoras son citosólicas y se regulan fundamentalmente mediante fosforilación e interacciones con otras proteínas o dominios no catalíticos (32). Es a este segundo grupo al que pertenecen proteínas importantes en la señalización celular como CSK o c-Fes.

1.5.1 C-terminal Src kinase (CSK)

CSK es una quinasa de tirosina citosólica que regula negativamente múltiples vías de transducción de señales al inhibir a las quinasas de tirosina de la familia Src, que se localizan en la cara citoplasmática de la membrana celular (33). Esto lo hace a través de la fosforilación de un residuo de tirosina en la cola C-terminal de estas proteínas, lo que provoca un cambio conformacional que lleva a su inactivación (32). En cuanto a la estructura de estas enzimas, tanto CSK como las quinasas de la familia Src presentan tres dominios diferentes: un dominio SH3 de unión a secuencias ricas en prolina, un dominio SH2 que se une específicamente a

residuos de fosfotirosina y un dominio SH1 catalítico (34) (Figura 4).

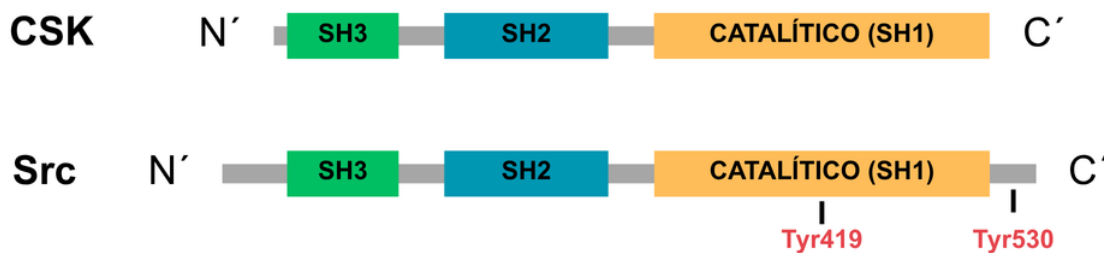


Figura 4. Representación esquemática de la estructura primaria de las quinasas CSK y c-Src. En la imagen se muestra la organización de los dominios de estas proteínas, así como dos residuos de tirosina en la quinasa Src que son críticos para la regulación de su actividad.

A pesar de su similitud estructural, su regulación es distinta. Mientras que la actividad de los miembros de la familia Src se regula mediante la fosforilación de dos residuos de tirosina (Figura 5), CSK se regula principalmente por su reclutamiento a la membrana mediante proteínas adaptadoras como Cbp (por sus siglas en inglés *CSK binding protein*), que se une a su dominio SH2 y potencia su actividad catalítica sobre las quinasas Src (34).

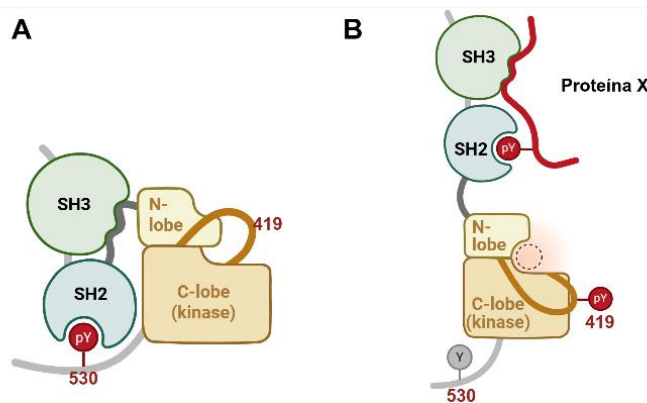


Figura 5. Mecanismo de regulación de las quinasas de la familia Src. A representa el estado inactivo y B el estado activo de estas enzimas. En condiciones basales, la quinasa CSK fosforila la tirosina en posición 530 de las quinasas Src, lo que lleva a la formación de dos interacciones intramoleculares: una entre pTyr 530 y el dominio SH2, y otra entre el linker SH2-quinasa y el dominio SH3. Esto afecta a la configuración del bolsillo catalítico, que no puede desempeñar su actividad. Por otra parte, cuando se desfosforila Tyr530, se produce un gran cambio conformacional en el que el sitio catalítico se vuelve accesible, lo que lleva a la autofosforilación en Tyr419, estabilizando la conformación activa de las enzimas. Además, algunas proteínas pueden contribuir a la activación de las quinasas Src mediante su unión a los dominios SH2 y SH3 de estas. Creada con BioRender.com.

1.5.2 c-Fes

Otra quinasa de tirosina no receptora destacada es c-Fes, un proto-oncogén que también puede actuar como supresor tumoral (35–37). Aunque su expresión es más alta en células hematopoyéticas y sus progenitoras, también está presente en células epiteliales, endoteliales y neuronales (38). A nivel estructural, c-Fes presenta un dominio F-BAR y un dominio FX en el extremo N-terminal, seguido de un dominio SH2 central y un dominio catalítico en el extremo C-terminal (38) (Figura 6). A pesar de que pocos sustratos de c-Fes han sido identificados, como la cortactina o los factores STAT (39), un estudio reciente basado en fosfoproteómica

reveló que esta quinasa es capaz de fosforilar directamente a PTPN18, facilitando el reclutamiento de CSK hacia dicho sustrato (40).



Figura 6. Representación esquemática de la estructura primaria de la quinasa c-Fes. En la imagen se muestra la organización de los dominios de esta proteína, siendo FX un dominio de extensión F-BAR.

La presente investigación se centra en el estudio de la fosfatasa PTPN18 y su interacción funcional con la quinasa CSK, dos actores importantes en el contexto de la regulación de la señalización celular mediada por fosforilación de residuos de tirosina. Sin embargo, la información existente acerca de PTPN18 y su interacción con CSK es escasa, lo que motivó la realización de experimentos que permitiesen esclarecer aspectos relevantes de dicha fosfatasa y sus interacciones, mejorando así la comprensión de las vías de señalización en las que están implicadas y su posible papel en diferentes enfermedades.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Se plantea como hipótesis que PTPN18 se asocia con el dominio SH2 de CSK a través de residuos de tirosina fosforilados. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo es estudiar la interacción entre la fosfatasa PTPN18 y la quinasa CSK. Para alcanzarlo, se establecen los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la localización celular de PTPN18 y otras proteínas relacionadas con esta, así como su colocalización.
2. Determinar la existencia de sitios de fosforilación en tirosinas en PTPN18.
3. Estudiar el mecanismo de interacción de PTPN18 con CSK y la función de la quinasa Fes en dicha interacción.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Soluciones y tampones

- Tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4: NaCl (Scharlab) 136 mM, KCl (Merk) 2,7 mM, Na₂HPO₄ (Scharlab) 8 mM y KH₂PO₄ (Merk) 1,5 mM
- Tampón de transfección (HEBS 2X) pH 7,05: HEPES (Sigma) 50 mM, NaCl (Scharlab) 140 mM y Na₂HPO₄ x 2 H₂O (Scharlab) 1,5 mM
- Tampón de lisis celular (TNE 2X): Tris-HCl (Merck) 20 mM pH 7,4, NaCl (Scharlab) 150 mM, EDTA (Sigma) 5 mM pH 8 y NP-40 (Fluka) 1%
- Laemmli Buffer 4X: Tris-HCl (Merck) 240 mM pH 6,8, SDS (Sigma) 8%, Glicerol (Fluka) 40%, β-Mercaptoetanol (Sigma) 5% y azul de bromofenol (0,008%)
- Tampón tris salino (TBS) 1X pH 7,6: Tris (Merk) 10 mM y NaCl (Scharlab) 135 mM
- TBS-Tween (TBS-T): TBS 1X pH 7,6 y Tween (Sigma) 0,05%
- Tampón de electroforesis 1X pH 8,3: Tris (Merck) 25 mM, Glicina (Scharlab) 0,2 M y SDS (Sigma) 1% (p/v)
- Tampón de transferencia 1X: Tris (Merck) 25 mM, Glicina (Scharlab) 0,2 M, Metanol (Panreac) 20% (v/v), SDS 1% (p/v)
- Pervanadato: Ortovanadato sódico (Sigma) 100 mM y H₂O₂ (Sigma) 0,34%

3.1.2 Anticuerpos

Tabla 1. Anticuerpos empleados en la técnica de Western Blot.

Anticuerpo (casa comercial)	Origen	Antígeno	Dilución	Conjugado	Bloqueo
Anti- Phosphotyrosine (Millipore)	Ratón	Tirosina fosforilada	1:1000 WB	N/A	BSA 3% en TBS-T
Anti-c-Myc (Santa Cruz)	Ratón	Myc	1:100 WB	N/A	BSA 3% + Leche 5% en TBS-T
Anti-HA (COVANCE)	Ratón	HA	1:1000 WB	N/A	Leche 5% en TBS-T
Anti-FLAG (Sigma)	Ratón	FLAG	1:1000 WB	N/A	BSA 3% + Leche 5% en TBS-T
Anti-Mouse (GE Healthcare)	Oveja	Fc de ratón	1:5000 WB	HRP	N/A

3.1.3 Plásmidos

Se empleó el vector de expresión pEF1/V5 para generar múltiples plásmidos que contienen la secuencia de las proteínas de interés. La estructura del vector consta de un sitio de clonaje múltiple (MCS) en el que se ha introducido la secuencia de la proteína de interés, un epítipo (3XMYC, HA o FLAG), una secuencia de 16 aminoácidos de glicina y serina que aporta flexibilidad a la proteína (secuencia BNBS) y la secuencia de una proteína fluorescente (EGFP o mCHERRY) o, en el caso de los ensayos de BiFC, un fragmento de la proteína fluorescente Venus (N155 o C155) (Figura 7).

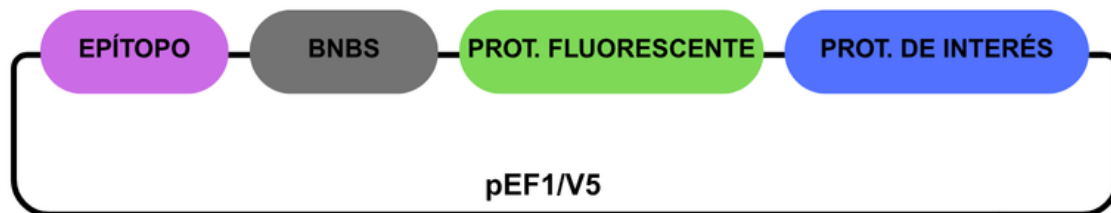


Figura 7. Representación esquemática de la estructura del vector de expresión empleado. Los plásmidos generados fueron utilizados en la transfección de células HEK293.

3.2 Métodos

3.2.1 Tratamiento de cristales con poli-L-Lisina

Se utilizaron cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro (Knittel glass, GE) como soporte para las células adherentes. Para facilitar la adherencia de las células al soporte, los cristales se recubrieron con 100 μ L de una solución de poli-L-Lisina 0,01% (Sigma-Aldrich ST. Lois, MO, USA) diluida 1:10 en agua que se dejó actuar durante 10 minutos. Pasado ese tiempo, los cristales se lavaron con 100 μ L de agua Mili-Q. Transcurridos 10 minutos, el agua fue retirada y los cristales se dejaron secar al aire. Este proceso se realizó bajo condiciones de esterilidad.

3.2.2 Cultivo celular

Como modelo de estudio se empleó la línea celular adherente procedente de células embrionarias de riñón humano conocida como HEK293, que se caracteriza por su fácil mantenimiento y su alta eficiencia de transfección. Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado (FBSi), 1% de L-Glutamina y 100 U/mL de Penicilina-Estreptomicina, en atmósfera con 5% de CO₂ y a 37°C de temperatura.

Las células se sembraron la víspera del experimento. Para los experimentos de microscopía confocal, se sembraron $2,5 \times 10^5$ células por pocillo sobre cubreobjetos tratados con poli-L-Lisina, en un volumen total de 2 mL, mientras que para los ensayos de citometría de flujo se sembraron 5×10^5 células por pocillo en el mismo volumen. Ambos se llevaron a cabo en placas de 6 pocillos, cada uno con un diámetro de 35 mm. Para los experimentos de inmunoprecipitación, que se realizaron en placas de 100 mm, se sembraron $3,5 \times 10^6$ células por placa en un volumen total de 5 mL.

3.2.3 Transfección de las células

Para introducir el ADN plasmídico purificado en las células HEK293, se empleó el método de transfección por fosfato de calcio. Esta técnica consiste en la formación de un precipitado de ADN con fosfato cálcico que es incorporado por las células principalmente mediante endocitosis, lo que permite la expresión transitoria del material genético introducido.

Con este fin, para los ensayos de inmunoprecipitación se preparó una mezcla que contenía una cantidad determinada de ADN plasmídico, 500 μL de una solución de CaCl_2 2,5 M diluido 1:10 en agua y 500 μL de una solución de HEBS 2X que se añadió gota a gota. La mezcla se burbujó y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, se agitó brevemente mediante vórtex y se repartió homogéneamente por toda la placa. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 durante 48 horas, aunque se añadieron 2 mL de medio DMEM completo a cada placa a las 24 horas. Para los ensayos de microscopía confocal y citometría de flujo se siguió el protocolo previamente descrito, con la diferencia de que se añadieron 100 μL de cada solución en lugar de 500 μL . En este caso, las células se incubaron en las mismas condiciones durante 24 horas.

3.2.4 Preparación de muestras para microscopía confocal

3.2.4.1 Fijación de las células

Transcurridas 24 horas desde la transfección, se llevó a cabo la fijación de las células. Tras aspirar el medio de las células sembradas sobre los cristales, estas se lavaron con PBS. A continuación, se añadieron 30 μL de paraformaldehído 4% (Merck, GE) sobre cada uno de los cristales, los cuales se incubaron a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad durante 10 minutos. Tras retirar el paraformaldehído, las células se volvieron a lavar con PBS.

3.2.4.2 Tinción de los núcleos y montaje

Como marcador nuclear fluorescente se utilizó el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), debido a su alta afinidad por las regiones ricas en A-T del ADN. Una vez fijadas las células a los cristales, estas se incubaron con 30 μL de DAPI 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Sigma-Aldrich ST. Lois, MO, USA) diluido 1:1000 en PBS 1X durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Seguidamente, se retiró el DAPI y se lavó con PBS. Finalmente, los cristales se montaron sobre los portaobjetos. Para ello, se añadieron 4 μL de medio de montaje (Gelvatol) al portaobjetos y, con cuidado de no formar burbujas, se depositó el cristal de modo que las células quedasen en contacto directo con la gota de montaje. Las muestras se dejaron secar y se guardaron a 4°C hasta su observación por microscopía confocal.

3.2.5 Visualización de las muestras mediante microscopía confocal

Una vez preparadas las muestras, se adquirieron imágenes de estas a través del microscopio confocal LEICA TCS SP5, equipado con los láseres WLL (White light laser) y 405 Diode. La selección de las células de interés se realizó a una resolución de 512x512 píxeles para evitar

posibles daños a la preparación, aunque las imágenes se capturaron a una resolución de 1024x1024 píxeles y con una profundidad de 8 bits por píxel, utilizando el software LAS AF Lite (Leica Microsystems, GE).

Para la captura se utilizó el objetivo de aceite de inmersión 63X y se emplearon tres filtros correspondientes a los canales cromáticos: rojo (515-560 nm), verde (450-490 nm) y azul (340-380 nm). El procesamiento posterior de las imágenes se llevó a cabo con el programa Fiji-ImageJ (versión 2.16.0/1.54p).

3.2.6 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica biofísica basada en la utilización de un láser por el que pasa una solución de células en suspensión, siendo capaz de realizar un análisis multiparamétrico que permite obtener información sobre poblaciones celulares a partir de un estudio individualizado de un gran número de células. Tiene la capacidad de analizar miles de células por segundo y proporcionar información estadística de manera instantánea.

En este estudio, la citometría de flujo sirvió para medir la intensidad de fluorescencia producida por el fluorocromo transfectado en las células en cultivo. Los fluorocromos emiten luz cuando son excitados por un láser con la correspondiente longitud de onda de excitación, de manera que se puede medir su intensidad.

Transcurridas 24 horas desde la transfección, se prepararon las muestras momentos previos al análisis. Para ello, se desechó el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS. Utilizando de nuevo PBS, se levantaron las células y se traspasaron a tubos de citometría. Las muestras así recogidas se analizaron en el citómetro de flujo Beckman Coulter Epics XL, equipado con un láser de argón que excita a 488 nm y 4 colectores de detección [FL1(525nm), FL2(575nm), FL3(620nm) y FL4(675nm)].

3.2.7 Complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC)

La técnica de complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC) es un método que permite la visualización de interacciones directas de proteínas en su entorno celular normal en células vivas. Es aplicable a la visualización de las interacciones en estado estable de complejos formados entre prácticamente cualquier combinación de proteínas en una amplia variedad de tipos de células y organismos, pudiendo detectar niveles comparables a los basales.

BiFC se basa en la formación de un complejo fluorescente cuando dos fragmentos sin fluorescencia de un fluoróforo se fusionan en el espacio por una interacción entre dos proteínas a las que se han fusionado estos fragmentos. La formación del complejo fluorescente comienza por la interacción entre las proteínas que están fusionadas a los fragmentos de la proteína fluorescente (Complejo I). La asociación entre los fragmentos fluorescentes es más lenta y produce un complejo intermedio de plegamiento (Complejo II), que tras la maduración termina

generando el fluoróforo (Complejo III) (41) (Figura 8).

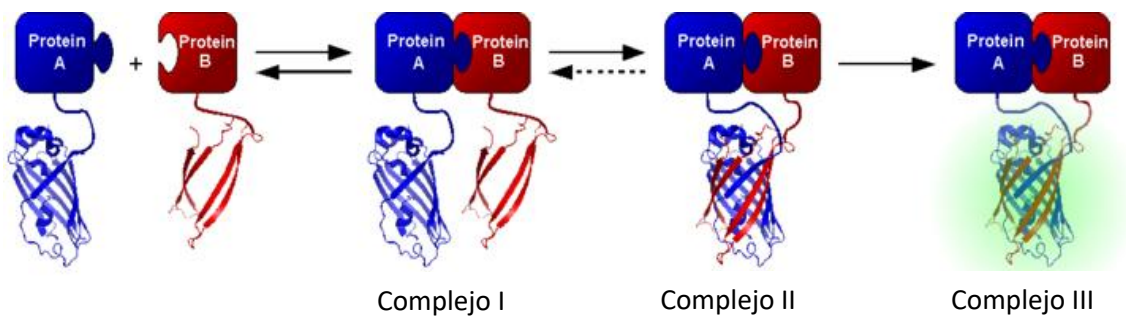


Figura 8. Ensayo de complementación de fluorescencia bimolecular. Formación del complejo fluorescente a través de la interacción entre dos proteínas.

En este ensayo se ha utilizado como proteína fluorescente Venus, una variante de la proteína fluorescente amarilla, YFP, dividida en dos fragmentos, el extremo amino N155 (aminoácidos 1-154 de Venus) y el extremo carboxilo C155 (aminoácidos 155-239 de Venus). Los plásmidos utilizados para la transfección contienen fusionados la proteína de interés y uno de los fragmentos de la proteína fluorescente. Siguiendo el protocolo descrito para la transfección celular, se introduce en las células el DNA de dos plásmidos distintos, uno que contiene la proteína A con un fragmento de la proteína fluorescente y otro que contenga la proteína B con el otro fragmento de EYFP.

3.2.8 Tratamiento con pervanadato

El pervanadato es un potente inhibidor de fosfatasa de tirosina, al oxidar residuos clave de cisteína en su sitio activo, lo que impide que lleven a cabo su actividad catalítica, produciéndose un aumento de los niveles de fosforilación en residuos de tirosina.

En este ensayo, el pervanadato se preparó 30 minutos antes de su utilización, tiempo durante el cual se incubó en oscuridad. Una vez listo, se aplicó a las células correspondientes (10 $\mu\text{L/mL}$) y estas se incubaron durante 5 minutos a 37°C. Finalmente, las células se procesaron de igual manera que las no tratadas para llevar a cabo experimentos de inmunoprecipitación.

3.2.9 Inmunoprecipitación de proteínas

En este método, las proteínas de interés que se encuentran en el lisado celular se precipitan a través de la formación de un complejo inmune entre el antígeno (proteína) y un anticuerpo primario que a su vez está unido a perlas de agarosa.

Para realizar estos ensayos, las células se lisaron con 500 $\mu\text{L/placa}$ de tampón de lisis compuesto por TNE 1X, al que añadimos en el momento 1 mM ortovanadato sódico, 5 mM NaF, 1mM PMSF y 10 $\mu\text{g/mL}$ de leupeptina y de aprotinina. A continuación, cada muestra de lisado celular obtenida mediante raspado se recogió en un tubo de microcentrífuga y se incubó durante 10 minutos en hielo. Después, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 4°C y 13000 rpm en la microcentrífuga Fisher AccuSpin Micro 17R (Thermo Fisher Scientific, Whaltman, MA) para que los restos celulares se separasen del sobrenadante, que es donde se

encuentran las proteínas. Se tomaron 45 μ L de sobrenadante (lisado total) y se mezclaron con 15 μ L de tampón de carga Laemmli Buffer 4X. El resto de sobrenadante se incubó con 20 μ L de microesferas de proteína G-Sefarosa (GE Healthcare, GE) conjugadas con el anticuerpo de interés en dilución 1:5 en PBS con 0,02% de azida sódica. Seguidamente, estos tubos se incubaron durante 1 hora en agitación a 4°C. Finalmente, se realizaron dos lavados con 750 μ L de TNE 1X para eliminar proteínas no específicas, quedando únicamente las perlas de agarosa con el anticuerpo y la proteína de interés, que se mezclaron con 45 μ L de Laemmli Buffer 1X.

3.2.10 Western Blot

Esta técnica permite detectar proteínas específicas dentro de una muestra. Para ello, las proteínas se separan en función de su tamaño a través de un gel, y luego, se transfieren a una membrana donde se detectan mediante anticuerpos diseñados para reconocerlas (42). En este caso, las muestras de lisado total e inmunoprecipitación se incubaron durante 5 minutos a 95°C para desnaturalizar las proteínas que posteriormente fueron separadas mediante electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). La electroforesis se realizó en el sistema Criterion™Cell (BioRad, Hercules, CA) conectado a la fuente de alimentación PowerPac™ (BioRad, Hercules, CA), aplicando un voltaje de entre 90 V y 120 V durante al menos 2 horas. A continuación, se llevó a cabo la transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (Healthcare life Sciences, GE) mediante el sistema semiseco Trans-Blot®Turbo™Transfer System (BioRad, Hercules, CA). Una vez finalizada la transferencia, se bloqueó la membrana durante 1 hora en una solución de TBS-Tween con 5% de leche en polvo y/o 3% de BSA según el anticuerpo que fuera a ser utilizado. Después, la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C y en agitación con el anticuerpo primario correspondiente diluido en su solución de bloqueo (Tabla 1). Al día siguiente, se realizaron cuatro lavados de 15 minutos cada uno con TBS-Tween. Seguidamente, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (Tabla 1) diluido en 5% de leche durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. A continuación, la membrana se volvió a lavar igual que antes. Por último, se llevó a cabo la detección de las proteínas utilizando el kit de revelado ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, Wilmington, UK), donde la enzima peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario, en presencia de su sustrato, cataliza una reacción química cuyo producto quimioluminiscente es detectado por la película autorradiográfica Fuji Medical X-Ray Film (Fujifilm). Tras incubar la membrana durante 1 minuto en la solución ECL, esta se colocó en un casete de revelado (Amersham, Biosciences, NJ). A continuación, en condiciones de completa oscuridad, se expusieron películas radiográficas durante un tiempo determinado, para finalmente ser reveladas mediante el sistema Curix 60, AGFA, BEL. En el caso de las membranas que tenían que ser incubadas de nuevo con otro anticuerpo, el procedimiento a seguir fue el mismo, empezando con el bloqueo de estas.

4 RESULTADOS

4.1 Localización celular de las proteínas PTPN18, CSK, PSTPIP1 y Fes

Se determinó la localización subcelular de PTPN18, así como la de otras proteínas que se han relacionado con ella, mediante microscopía confocal (Figura 9). En primer lugar, aunque PTPN18 se localizaba principalmente en el citosol, también estaba presente en el núcleo, a diferencia de CSK y Fes que solamente se localizaban en el citosol. Por otra parte, los ensayos revelaron la localización de PSTPIP1 en la membrana plasmática.

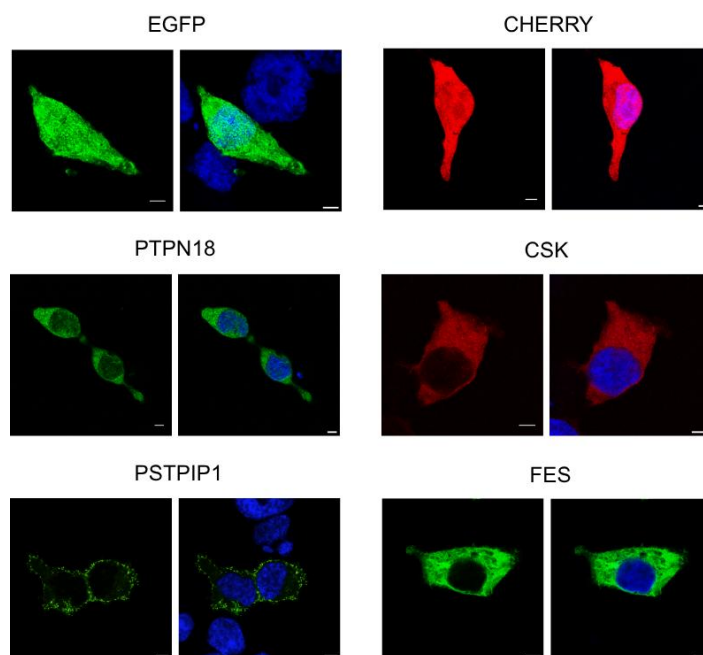


Figura 9. Localización celular de diferentes proteínas. Se transfectaron células HEK293 con los plásmidos EGFP (control verde), CHERRY (control rojo), EGFP-PTPN18, mCHERRY-CSK, PSTPIP1-EGFP-C o EGFP-FESna. La barra de escala representa 5 μ m. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal.

A continuación, se llevaron a cabo ensayos en los que las células se transfectaron con varios plásmidos de las proteínas de interés, con el fin de observar si se producían cambios en su localización celular cuando estas se expresaban a la vez.

Primero, se quiso observar lo que sucedía al coexpresar PTPN18 junto con PSTPIP1, proteína que se sabe que interacciona a través de su dominio F-BAR con el dominio CTH de PTPN18 (Figura 10). Las imágenes obtenidas mostraron que, en presencia de ambas proteínas, PSTPIP1 aparecía en el citosol, aunque su expresión seguía siendo mayor en la membrana. Por otro lado, no se observaron cambios en la distribución celular de PTPN18.

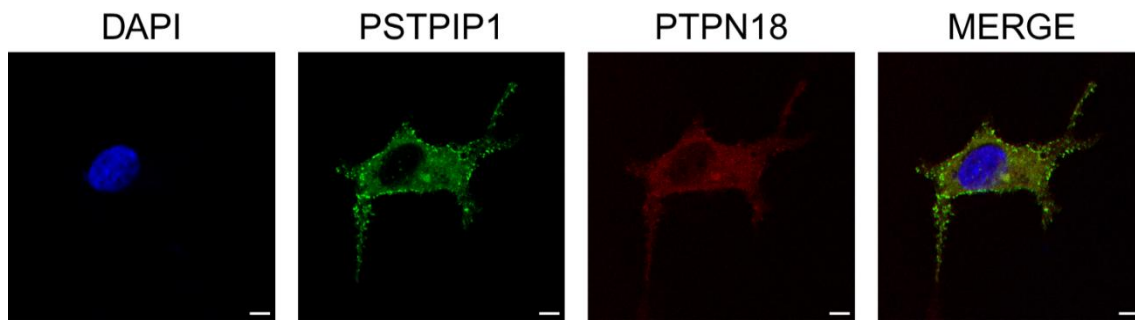


Figura 10. Colocalización de las proteínas PSTPIP1 y PTPN18. Se transfectaron células HEK293 con los plásmidos PSTPIP1-EGFP-C y mCHERRY-PTPN18. La barra de escala representa 5 μ m. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal.

Después, se hizo lo mismo con PTPN18 y CSK (Figura 11). Sin embargo, en este caso, ambas proteínas seguían teniendo una distribución similar a cuando se expresaban solas. La colocalización se producía en el citosol.

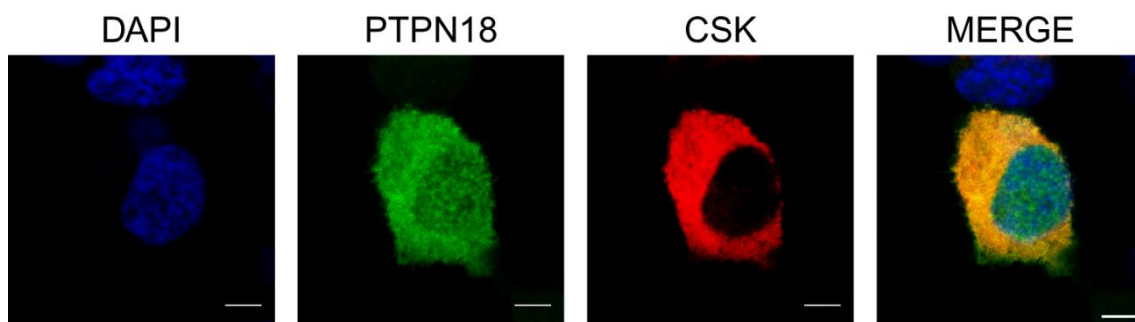


Figura 11. Colocalización de las proteínas CSK y PTPN18. Se transfectaron células HEK293 con los plásmidos EGFP-PTPN18 y mCHERRY-CSK. La barra de escala representa 5 μ m. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal.

4.2 Interacción de PTPN18 y CSK dependiente de la fosforilación de PTPN18

Aunque ya se había descrito en un estudio que PTPN18 interacciona con CSK, y que su asociación está mediada por la región SH2 de CSK y sitios de fosforilación en tirosinas de PTPN18, en dicho estudio se analizó la interacción utilizando dos líneas celulares no humanas, COS-1 y 32D. Con el fin de ampliar el conocimiento sobre PTPN18 y su interacción con CSK, en esta investigación se utilizó una línea celular distinta, de procedencia humana, conocida como HEK293.

4.2.1 Fosforilación de PTPN18

En primer lugar, se llevó a cabo un experimento de inmunoprecipitación para determinar si PTPN18 presentaba sitios de fosforilación en tirosinas (Figura 12A). Para ello, se transfectaron células HEK293 con el plásmido 3XMYC-PTPN18. En la segunda condición, las células transfectadas se trataron con pervanadato, un inhibidor de fosfatasa que se utiliza para conservar el estado fosforilado de las proteínas. Los resultados obtenidos mostraron que PTPN18 se fosforilaba en residuos de tirosina (Figura 12A, carril 2).

Posteriormente, se quiso analizar qué quinasas de tirosina eran las encargadas de dicha fosforilación (Figura 12B). Para ello, se llevó a cabo la transfección de células HEK293 para que expresasen PTPN18 junto con varias quinasas de tirosina: CSK, Fes, Hck, Syk, Itk, Jak1, Jak3, Tyk2 y Zap70. Las quinasas que fosforilaron a PTPN18 fueron principalmente Fes y CSK, aunque también se observó fosforilación mediada por Hck y Syk, dos quinasas importantes en la señalización inmunológica.

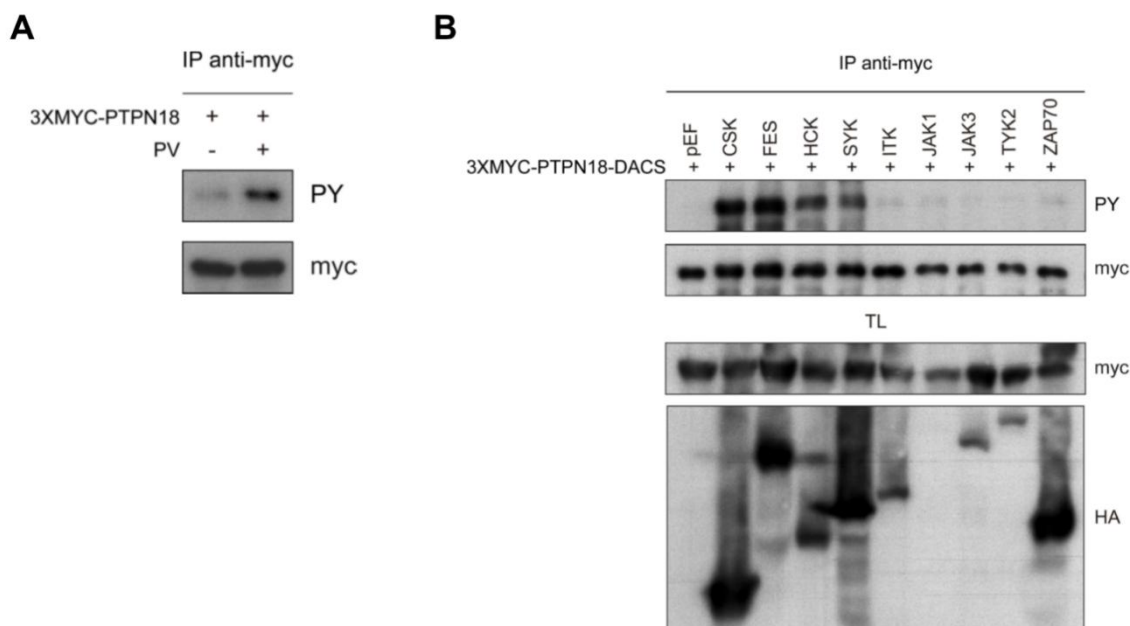


Figura 12. Estudio mediante inmunoprecipitación (IP) de proteínas de la fosforilación de PTPN18 y las quinasas involucradas en ella. (A) Células HEK293 fueron transfectadas con el plásmido 3XMYC-PTPN18. Posteriormente, unas de ellas se trataron con pervanadato (PV). La IP tuvo lugar con anticuerpos anti-myc y la fosforilación se detectó con anticuerpos anti-fosfotirosina (PY). (B) Células HEK293 fueron transfectadas con el plásmido 3XMYC-PTPN18-DACS y con otro de entre HA-CSK, HA-FES, HA-HCK, HA-SYK, HA-ITK, HA-JAK1, HA-JAK3, HA-TYK2, HA-ZAP70 o ninguno (pEF). La IP se realizó contra myc y la fosforilación de PTPN18 se detectó con anticuerpos anti-PY. TL significa lisado total.

4.2.2 Interacción de PTPN18 con CSK

Una vez observado que PTPN18 es fosforilada en residuos de tirosina a través de la acción de quinasas como Fes, se llevó a cabo un estudio de su interacción con CSK. En primer lugar, se empleó la técnica de BiFC, que permite estudiar interacciones entre proteínas. En este ensayo, las células fueron transfectadas con los plásmidos N155-CSK y C155-PTPN18 para posteriormente ser visualizadas mediante microscopía confocal (Figura 13). Las imágenes obtenidas mostraron fluorescencia verde, lo que significaba que se había producido la interacción entre ambas proteínas. Además, esta interacción ocurría en el citosol.

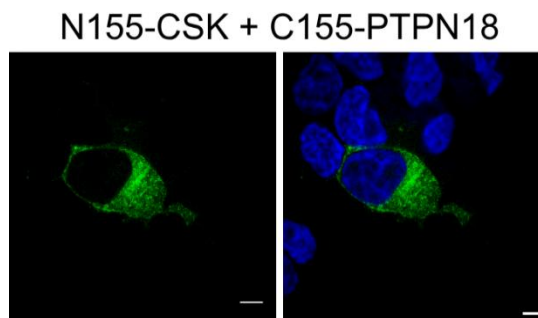


Figura 13. Interacción entre CSK y PTPN18. Se empleó la técnica de BiFC para estudiar dicha interacción. Las células HEK293 fueron transfectadas con los plásmidos N155-CSK y C155-PTPN18. La barra de escala representa 5 μ m. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal.

A continuación, para confirmar lo que se había observado en el ensayo de BiFC, se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación.

Primero, se analizó la interacción entre CSK y PTPN18 (wild-type o mutante Y389F) en ausencia o presencia de Fes (Figura 14A). Dicha mutación de tirosina a fenilalanina hace que PTPN18 no se pueda fosforilar en esa posición. Los resultados mostraron que la interacción entre CSK y PTPN18 era mucho mayor en presencia de Fes, una quinasa que tiene como sustrato a PTPN18. Esto quiere decir que la fosforilación de residuos de tirosina en PTPN18 es necesaria para su interacción con CSK, específicamente la de la tirosina en posición 389, que es la que fue analizada en este caso. Por otra parte, se observa una pequeña interacción entre CSK y PTPN18 WT en ausencia de Fes, lo que podría deberse a la fosforilación de PTPN18 por CSK.

Después, se llevó a cabo otro ensayo para ver cómo afectaban ciertas mutaciones de CSK a esta interacción (Figura 14B). Las mutaciones que se analizaron fueron tres: una que afectaba al dominio SH3 (W47A), otra en el dominio SH2 (R107M) y una última que afectaba al dominio catalítico (K222R). Se transfectaron células HEK293 con plásmidos codificantes para Fes, PTPN18 y CSK (wild-type o con una de las mutaciones descritas). Los resultados mostraron que PTPN18 interaccionaba con todas las formas de CSK a excepción de la que estaba mutada en el dominio SH2. Esto confirma la relevancia de dicho dominio de CSK en su interacción con PTPN18.

Por otro lado, se observó una disminución en la asociación entre PTPN18 y la forma de CSK mutada en el dominio catalítico, que fue menor que en el caso de CSK WT o mutada en el dominio SH3 (Figura 14B). Para evaluar por qué ocurría esto, se realizó un nuevo experimento únicamente con PTPN18 y CSK (WT o mutante K222R) (Figura 14C). Cuando el dominio quinasa de CSK estaba mutado, esta no podía fosforilar a PTPN18, y, por ende, tampoco había interacción. Sin embargo, esto sí se observaba cuando el dominio quinasa estaba intacto. Por lo tanto, podemos deducir que la interacción observada entre PTPN18 y CSK K222R en la Figura 14B se debería a la presencia de la quinasa Fes.

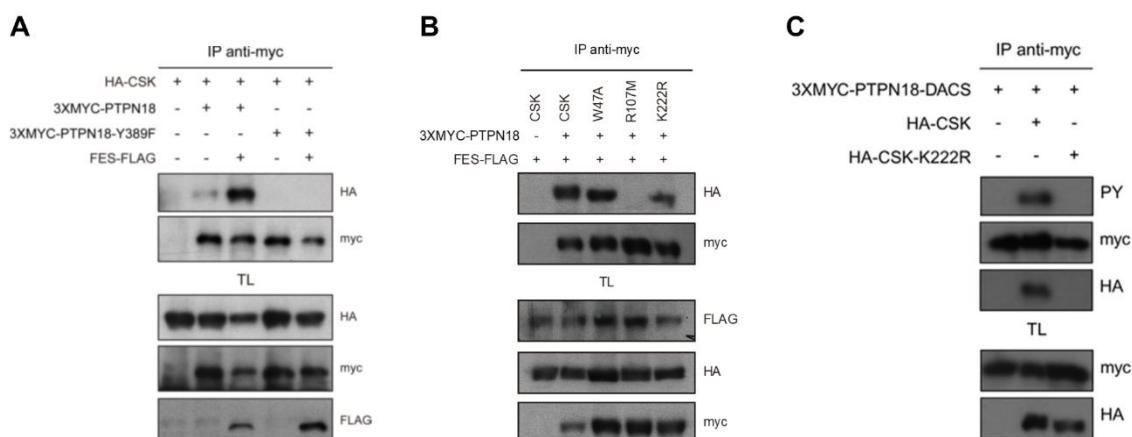


Figura 14. Estudio de la interacción entre CSK y PTPN18 mediante ensayos de IP. (A) Células HEK293 fueron transfectadas con los plásmidos HA-CSK, 3XMYC-PTPN18 (WT o Y389F) y, en algunos casos, FES-FLAG. El primer carril solo tiene CSK (control). La IP tuvo lugar con anticuerpos anti-myc y la interacción entre PTPN18 y CSK se detectó con anticuerpos anti-HA. (B) Células HEK293 fueron transfectadas con los plásmidos FES-FLAG, 3XMYC-PTPN18 y HA-CSK WT o mutante (W47A, R107M o K222R). El primer carril sirve como control. La IP se realizó contra myc y la interacción entre PTPN18 y CSK se detectó con anticuerpos anti-HA. (C) Células HEK293 fueron transfectadas con los plásmidos 3XMYC-PTPN18-DACS con o sin HA-CSK (WT o mutante K222R). La IP se realizó contra myc, la interacción entre PTPN18 y CSK se detectó con anticuerpos anti-HA y la fosforilación de PTPN18 mediante anticuerpos anti-PY.

Por último, se llevaron a cabo ensayos de BiFC en células HEK293 que posteriormente fueron analizadas mediante citometría de flujo. Las células se transfectaron con diferentes plásmidos, incluyendo mCHERRY, N155-Proteína A y C155-Proteína B. Mediante citometría de flujo, se obtuvo el porcentaje de células en las que se había producido la interacción entre las proteínas A y B respecto a las células que habían sido transfectadas (Figura 15). Es decir, se midió el porcentaje de células que tenían fluorescencia verde del total de células transfectadas. Entre todas las combinaciones analizadas, la menor interacción registrada fue la de PTPN18-Y389F con CSK. Esto se debe a que la mutación de PTPN18 descrita afecta a un sitio de fosforilación crucial para su interacción con CSK. Por otra parte, la interacción entre PTPN18 y PSTPIP1, que se utilizó como control positivo al ser una interacción bien caracterizada, fue menor que la de PTPN18 WT con CSK, lo que sugiere una gran afinidad entre estas dos proteínas. Finalmente, la adición de Fes supuso un ligero aumento en la interacción entre PTPN18 WT y CSK en comparación con la misma condición en ausencia de Fes.

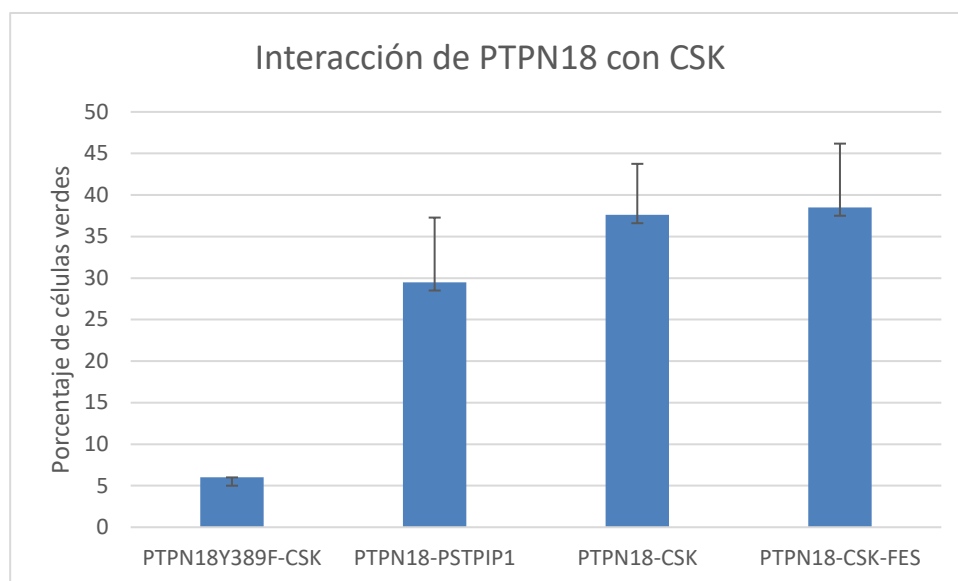


Figura 15. Estudio mediante citometría de flujo de la interacción entre PTPN18 y CSK o PSTPIP1. Células HEK293 fueron transfectadas con los plásmidos mCHERRY, N155-Proteína A y C155-Proteína B, siendo proteína A y proteína B: PTPN18 y CSK, PTPN18 y PSTPIP1 o PTPN18-Y389F y CSK. En un caso también se utilizó el plásmido FES-FLAG. Los datos presentados corresponden al porcentaje de células verdes en el total de células transfectadas.

5 DISCUSIÓN

Las fosfatasa de tirosina son enzimas clave en la regulación de múltiples funciones celulares a través de su papel en diferentes vías de señalización. A pesar de ello, el conocimiento acerca de ellas es escaso. Dentro de las enzimas que presentan actividad fosfatasa de tirosina se encuentran las fosfatasa PEST, tres fosfatasa intracelulares que tienen en común la presencia de una región rica en residuos de prolina, ácido glutámico, serina y treonina (PEST) (18). Es a este grupo al que pertenecen PTPN18, LYP y PTP-PEST (17). Por otra parte, CSK es una quinasa de tirosina que regula negativamente diferentes procesos de transducción de señales, al ser capaz de inactivar mediante fosforilación a las quinasas de la familia Src, actuando, por ejemplo, como represor de la señalización del receptor de antígenos en linfocitos T (32,43).

Estudios previos han demostrado que LYP y PTP-PEST se asocian a través de regiones ricas en prolina con el dominio SH3 de CSK, formando un complejo en el que LYP o PTP-PEST cooperan con CSK para inactivar a las quinasas de la familia Src mediante la desfosforilación de su residuo de tirosina activador (28,29). Por otra parte, aunque la interacción entre PTPN18 y CSK no es tan conocida como las anteriores, se ha demostrado en un estudio que esta no se produce mediante el dominio SH3 de CSK, sino a través del dominio SH2 (27).

Este trabajo se enfocó principalmente en el estudio de la interacción entre PTPN18 y CSK en la línea celular HEK293, previamente inexplorada. Para ello, se llevaron a cabo diferentes ensayos donde se vio que PTPN18 se fosforila en residuos de tirosina a través de quinasas como Fes, lo

que coincide con lo observado en otro ensayo en el que se identificaron diferentes sustratos de Fes, siendo PTPN18 uno de ellos (40). Además, se exploró la importancia del residuo de tirosina 389 de PTPN18 en su interacción con CSK. Dicho aminoácido resultó ser crucial, ya que cuando estaba mutado a Phe y no se podía fosforilar no se producía la interacción. Este hallazgo complementa lo observado en otro estudio, donde se encontró que los residuos Y354 y Y381 de PTPN18 (de ratón, es la Tyr equivalente a la 389 en la PTPN18 humana) también intervenían en su unión a CSK, aunque en menor medida, ya que las mutaciones en estos reducían la unión a CSK, pero no la abolían, al contrario de lo que ocurría con el residuo de tirosina estudiado en este trabajo, Y389 (27). Esto sugiere que PTPN18 se une de manera específica a CSK. Por otra parte, se comprobó que el dominio de CSK responsable de esta asociación era el SH2, ya que cuando este estaba mutado (R107M) no se producía la interacción. De manera adicional, cuando el dominio quinasa de CSK estaba mutado (K222R), no se producía la fosforilación de PTPN18 ni su interacción con CSK, a no ser que la quinasa Fes estuviese actuando. Esto indica que CSK también fosforila a PTPN18, permitiendo la interacción entre ambas proteínas, lo que difiere de lo observado en otro trabajo donde se vio que la presencia de CSK favorecía el estado fosforilado de PTPN18, pero independientemente de su actividad catalítica, actuando posiblemente como un “escudo” que impediría la desfosforilación de las tirosinas fosforiladas de PTPN18 (27).

Estos resultados contribuyen a un mejor entendimiento de la interacción entre PTPN18 y CSK, que podría ser importante en varias vías de señalización implicadas en diferentes patologías. Por ejemplo, el polimorfismo R620W de LYP, que afecta a su unión con CSK, se ha asociado con el desarrollo de algunas enfermedades autoinmunes como la diabetes tipo I o el lupus sistémico eritematoso (44,45). De manera similar, mutaciones en el dominio F-BAR de PSTPIP1, que se asocia con las fosfatasas PEST a través de su dominio CTH, se han relacionado con la aparición de patologías autoinflamatorias como el síndrome PAPA, que cursa con artritis piógena, pioderma gangrenoso y acné (25). Esto sugiere que PTPN18 y su interacción con proteínas como CSK o PSTPIP1 podrían ser clave en la regulación del sistema inmune. Por otra parte, PTPN18 también se ha asociado con el cáncer, aunque existen resultados contradictorios sobre su papel en esta enfermedad, ya que en algunos tipos parece tener un rol de supresor tumoral y en otros parece actuar como un oncogén (22,46–48). Teniendo esto en cuenta, la interacción entre PTPN18 y CSK podría ser relevante en el control de la actividad de las quinasas de la familia Src, que desempeñan un papel clave en vías de señalización relacionadas con el crecimiento, división, migración y supervivencia celular (49). Sin embargo, esta interacción no se ha explorado todavía en el cáncer.

Aunque los resultados obtenidos permiten avanzar en el conocimiento sobre la interacción entre PTPN18 y CSK, la consecuencia a nivel funcional de esta unión sigue sin conocerse. Por lo

tanto, se necesitan nuevos estudios enfocados en analizar otros aspectos de esta interacción que podrían ser cruciales en la regulación de varias vías de señalización implicadas en distintas enfermedades. De esta manera, si se demostrase su papel en la fisiopatología de alguna enfermedad podría constituir una posible diana terapéutica.

6 CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

De acuerdo con los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. PTPN18 se localiza preferentemente en el citosol, aunque también está presente en el núcleo.
2. CSK y Fes se localizan en el citosol, mientras que PSTPIP1 se localiza en la membrana plasmática.
3. La coexpresión de PTPN18 y CSK no desencadena ningún cambio en la localización celular de dichas proteínas, al contrario de lo que sucede al coexpresar PTPN18 y PSTPIP1, donde una fracción de PSTPIP1 se desplaza desde la membrana hacia el citosol.
4. La colocalización de PTPN18 y CSK se produce en el citosol.
5. PTPN18 interacciona con el dominio SH2 de CSK mediante residuos de tirosina fosforilados, como la tirosina en posición 389.
6. La fosforilación de PTPN18 por la acción de quinasas como Fes o la propia CSK, entre otras, potencia la unión entre PTPN18 y CSK.

Based on the results obtained, the following conclusions can be drawn:

1. PTPN18 is preferentially localized in the cytosol, although it is also present in the nucleus.
2. CSK and Fes localize to the cytosol, whereas PSTPIP1 localizes to the plasma membrane.
3. Coexpression of PTPN18 and CSK does not trigger any change in the cellular localization of these proteins, in contrast to co-expressing PTPN18 and PSTPIP1, where a fraction of PSTPIP1 shifts from the membrane to the cytosol.
4. Colocalization of PTPN18 and CSK occurs in the cytosol.
5. PTPN18 interacts with the SH2 domain of CSK via phosphorylated tyrosine residues, such as tyrosine at position 389.
6. Phosphorylation of PTPN18 by the action of kinases such as Fes or CSK itself, among others, enhances the binding between PTPN18 and CSK.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Billbrough T, Piemontese E, Seitz O. Dissecting the role of protein phosphorylation: a chemical biology toolbox. *Chem Soc Rev*. 4 de julio de 2022;51(13):5691-730.
2. Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T. Advances in Phos-tag-based methodologies for separation and detection of the phosphoproteome. *Biochim Biophys Acta*. junio de 2015;1854(6):601-8.
3. Castelo-Soccio L, Kim H, Gadina M, Schwartzberg PL, Laurence A, O'Shea JJ. Protein kinases: drug targets for immunological disorders. *Nat Rev Immunol*. diciembre de 2023;23(12):787-806.
4. Hardman G, Perkins S, Brownridge PJ, Clarke CJ, Byrne DP, Campbell AE, et al. Strong anion exchange-mediated phosphoproteomics reveals extensive human non-canonical phosphorylation. *EMBO J*. 4 de octubre de 2019;38(21):e100847.
5. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 6 de diciembre de 2002;298(5600):1912-34.
6. Ubersax JA, Ferrell JE. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. julio de 2007;8(7):530-41.
7. Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*. 11 de junio de 2004;117(6):699-711.
8. Brognard J, Hunter T. Protein kinase signaling networks in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. febrero de 2011;21(1):4-11.
9. Martin L, Latypova X, Terro F. Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. marzo de 2011;58(4):458-71.
10. Zarrin AA, Bao K, Lupardus P, Vucic D. Kinase inhibition in autoimmunity and inflammation. *Nat Rev Drug Discov*. enero de 2021;20(1):39-63.
11. Thirumalai Srinivasan S, Manikandan A, Manoj N, Dixit M, Vemparala S. Role of Tyrosine Phosphorylation in PTP-PEST. *J Phys Chem B*. 31 de octubre de 2024;128(43):10581-92.
12. Hunter T. Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Curr Opin Cell Biol*. abril de 2009;21(2):140-6.
13. Shah K, Al-Haidari A, Sun J, Kazi JU. T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. *Signal Transduct Target Ther*. 13 de diciembre de 2021;6(1):412.
14. Wen Y, Jing Y, Yang L, Kang D, Jiang P, Li N, et al. The regulators of BCR signaling during B cell activation. *Blood Sci*. octubre de 2019;1(2):119-29.
15. Welsh CL, Pandey P, Ahuja LG. Protein Tyrosine Phosphatases: A new paradigm in an old signaling system? *Adv Cancer Res*. 2021;152:263-303.
16. Alonso A, Pulido R. The extended human PTPome: a growing tyrosine phosphatase family. *FEBS J*. abril de 2016;283(8):1404-29.
17. Mustelin T. Are other protein tyrosine phosphatases than PTPN22 associated with autoimmunity? *Semin Immunol*. agosto de 2006;18(4):254-60.
18. Manzanita-Quintero K, Lee-Rivera I, López E, López-Colomé AM. PTP-PEST: Vías de señalización y su importancia como blanco terapéutico en cáncer. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* [Internet]. 20 de octubre de 2022 [citado 29 de mayo de 2025];25(0). Disponible en: <http://tip.zaragoza.unam.mx/index.php/tip/article/view/503>

19. Veillette A, Rhee I, Souza CM, Davidson D. PEST family phosphatases in immunity, autoimmunity, and autoinflammatory disorders. *Immunol Rev.* marzo de 2009;228(1):312-24.
20. Kim YW, Wang H, Sures I, Lammers R, Martell KJ, Ullrich A. Characterization of the PEST family protein tyrosine phosphatase BDP1. *Oncogene.* 21 de noviembre de 1996;13(10):2275-9.
21. Gandhi TKB, Chandran S, Peri S, Saravana R, Amanchy R, Prasad TSK, et al. A bioinformatics analysis of protein tyrosine phosphatases in humans. *DNA Res.* 2005;12(2):79-89.
22. Wang T, Ba X, Zhang X, Zhang N, Wang G, Bai B, et al. Nuclear import of PTPN18 inhibits breast cancer metastasis mediated by MVP and importin β 2. *Cell Death Dis.* 18 de agosto de 2022;13(8):720.
23. Spencer S, Dowbenko D, Cheng J, Li W, Brush J, Utzig S, et al. PSTPIP: a tyrosine phosphorylated cleavage furrow-associated protein that is a substrate for a PEST tyrosine phosphatase. *J Cell Biol.* 25 de agosto de 1997;138(4):845-60.
24. Côté JF, Chung PL, Thérberge JF, Hallé M, Spencer S, Lasky LA, et al. PSTPIP is a substrate of PTP-PEST and serves as a scaffold guiding PTP-PEST toward a specific dephosphorylation of WASP. *J Biol Chem.* 25 de enero de 2002;277(4):2973-86.
25. Manso JA, Marcos T, Ruiz-Martín V, Casas J, Alcón P, Sánchez Crespo M, et al. PSTPIP1-LYP phosphatase interaction: structural basis and implications for autoinflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci.* 12 de febrero de 2022;79(2):131.
26. Xu JJ, Li HD, Du XS, Li JJ, Meng XM, Huang C, et al. Role of the F-BAR Family Member PSTPIP2 in Autoinflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2021;12:585412.
27. Wang B, Lemay S, Tsai S, Veillette A. SH2 domain-mediated interaction of inhibitory protein tyrosine kinase Csk with protein tyrosine phosphatase-HSCF. *Mol Cell Biol.* febrero de 2001;21(4):1077-88.
28. Cloutier JF, Veillette A. Association of inhibitory tyrosine protein kinase p50csk with protein tyrosine phosphatase PEP in T cells and other hemopoietic cells. *EMBO J.* 16 de septiembre de 1996;15(18):4909-18.
29. Davidson D, Cloutier JF, Gregorieff A, Veillette A. Inhibitory tyrosine protein kinase p50csk is associated with protein-tyrosine phosphatase PTP-PEST in hemopoietic and non-hemopoietic cells. *J Biol Chem.* 12 de septiembre de 1997;272(37):23455-62.
30. Brian BF, Sjaastad FV, Freedman TS. SH3-domain mutations selectively disrupt Csk homodimerization or PTPN22 binding. *Sci Rep.* 7 de abril de 2022;12(1):5875.
31. Park HC, Eo HS, Kim W. A computational approach for the classification of protein tyrosine kinases. *Mol Cells.* septiembre de 2009;28(3):195-200.
32. Okada M. Regulation of the SRC family kinases by Csk. *Int J Biol Sci.* 2012;8(10):1385-97.
33. Brown MT, Cooper JA. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta.* 7 de junio de 1996;1287(2-3):121-49.
34. Sun G, Ayrapetov MK. Dissection of the catalytic and regulatory structure-function relationships of Csk protein tyrosine kinase. *Front Cell Dev Biol.* 2023;11:1148352.
35. Voisset E, Lopez S, Chaix A, Georges C, Hanssens K, Prébet T, et al. FES kinases are required for oncogenic FLT3 signaling. *Leukemia.* abril de 2010;24(4):721-8.
36. Delfino FJ, Stevenson H, Smithgall TE. A growth-suppressive function for the c-fes protein-tyrosine kinase in colorectal cancer. *J Biol Chem.* 31 de marzo de 2006;281(13):8829-35.

37. Sangrar W, Zirgibl RA, Gao Y, Muller WJ, Jia Z, Greer PA. An identity crisis for fps/fes: oncogene or tumor suppressor? *Cancer Res.* 1 de mayo de 2005;65(9):3518-22.
38. Craig AWB. FES/FER kinase signaling in hematopoietic cells and leukemias. *Front Biosci (Landmark Ed).* 1 de enero de 2012;17(3):861-75.
39. Greer P. Closing in on the biological functions of Fps/Fes and Fer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* abril de 2002;3(4):278-89.
40. Helbig AO, Kofler M, Gish G, Sriraja L, Lorenzen K, Tucholska M, et al. Decoding the functional Fes kinase signaling network topology in a lymphocyte model [Internet]. *bioRxiv*; 2020 [citado 29 de mayo de 2025]. p. 125088. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/125088v3>
41. Kerppola TK. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys.* 2008;37:465-87.
42. Universidad Europea [Internet]. 2025 [citado 4 de junio de 2025]. Western blot: qué es y para qué sirve | Blog UE. Disponible en: <https://universidadeuropea.com/blog/western-blot/>
43. Chow LM, Fournel M, Davidson D, Veillette A. Negative regulation of T-cell receptor signalling by tyrosine protein kinase p50csk. *Nature.* 9 de septiembre de 1993;365(6442):156-60.
44. Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orrú V, Zavattari P, et al. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet.* diciembre de 2005;37(12):1317-9.
45. Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, Lee A, Selby S, Carlton VEH, et al. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet.* septiembre de 2004;75(3):504-7.
46. Zhou Z, Yu W, Li H, Shi J, Meng S, Yan Y, et al. Hepatitis B Virus X Protein Represses Expression of Tumor Suppressor PTPN18 in Hepatocellular Carcinoma. *Mol Cancer Res.* 4 de septiembre de 2024;22(9):891-901.
47. Wang T, Yu Y, Ba X, Zhang X, Zhang N, Wang G, et al. PTPN18 Serves as a Potential Oncogene for Glioblastoma by Enhancing Immune Suppression. *Oxid Med Cell Longev.* 2023;2023:2994316.
48. Li C, Li SZ, Huang XC, Chen J, Liu W, Zhang XD, et al. PTPN18 promotes colorectal cancer progression by regulating the c-MYC-CDK4 axis. *Genes Dis.* noviembre de 2021;8(6):838-48.
49. Roskoski R. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res.* abril de 2015;94:9-25.