



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina

Licenciatura en Investigación Biomédica Básica

Purificación de la isoforma de Bin1/ Anfifisina II: Bin1-1PC12.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Licenciado en Investigación Biomédica Básica

PRESENTA:

Luis Pablo Avila Barrientos

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Jaime Mas Oliva

MÉXICO, D. F, octubre, 2013

Facultad de Medicina





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: Dr. Alejandro Sosa Peinado

Secretario: Dr. Jaime Mas Oliva

Vocal: Dra. Romina María de la Paz Rodríguez Sanoja

Suplente: Dr. Ángel Zaráin Herzberg

Suplente: Dr. Ernesto Maldonado Olvera

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 322-N del Instituto de Fisiología Celular, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del **Dr. Jaime Mas Oliva**.

A mi padre, Q.E.P.D. y a mi madre. Los quiero.

Agradecimientos académicos:

Al Dr. Jaime Mas Oliva, por haberme admitido a su laboratorio, el laboratorio 322-N y por dirigir este proyecto.

Al Biól., c.Dr. Salvador Damián Zamacona, por el trabajo previo en el laboratorio que realizó y que permitió el desarrollo de este proyecto, así como por su tiempo y empeño en mi formación.

A los miembros del jurado, Dra, Romina Rodríguez, Dr. Alejandro Sosa Peinado, Dr. Ángel Zaráin Herzberg y Dr. Ernesto Maldonado Olvera, por el tiempo dedicado a la revisión crítica de este trabajo.

A la M. en C. Blanca Delgado Coello por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Diego González Halphen, por permitirme utilizar el sistema de cromatografía FPLC de su laboratorio.

Agradecimientos:

A México, por brindarme la oportunidad de prepararme profesionalmente en esta universidad.

A mi madre y a mi padre, por todos sus esfuerzos, sacrificios, y amor vertidos en mi, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible.

A mi hermano, Hugo, a Caty, a Santiago, y a Bruno, por su cariño, por compartir penas y alegrías, por ser un segundo hogar y un refugio.

Al Dr. Jaime Mas Oliva, por permitir integrarme a su equipo de trabajo y por el rigor con el que dirigió este proyecto.

A la Dra. Irma Villalpando Fierro y al Dr. Roberto Coria Ortega por su paciencia y tiempo dedicado durante mi estancia en sus laboratorios.

A la M. en C. Esmeralda Lira, a la Dra. Rocío Navarro y a la Dra. Laurita Kawasaki por su apoyo y paciencia dedicados a mi formación.

A los miembros del laboratorio 322-N, Alma, Blanquita, Danaí, Fory, Sra. Lupita, Pao, Nadia y Nitrosa, por aguantarme y estar ahí en muchos momentos, he aprendido mucho con ustedes y me han ayudado a conocerme. Especialmente a Salvador, Chava, por el tiempo y esfuerzo dedicados a mi formación durante este trabajo, agradezco tu paciencia, tu carácter crítico y tu locura.

A los compañeros de la LIBB, he aprendido y compartido mucho con ustedes. Especialmente a Fer, Paco, Quique, Licha, Reempe, Freyermuth y Uriel.

A los vecinos del laboratorio 324-N por su accesibilidad para facilitar reactivos y equipos y por su hospitalidad.

A Sergio Aguirre Sampieri, por enseñarme nuevas maneras de pensar.

A las nuevas amigas, Dora y Claudia, por ser ustedes y por compartir penas y alegrías.

A la Lic. Cynthia Lima, por el apoyo e interés brindados en la carrera y en este último proceso.

Abreviaturas:

AMPC	Adenilil monofosfato cíclico
BAR	Bin Anfifisina Rvs
BSA	Albúmina sérica bovina
CAP	Proteína asociada a adenilil ciclasa
DTT	Ditiotreitol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CHO-F7	Células de ovario de hámster chino
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENTH	Dominio de homología amino-terminal de Epsina
FPLC	Cromatografía de desempeño rápido
GAP	Proteína activadora de GTPasa
GTPasa	Proteína degradadora de guanilil-trifosfato
HepG2	Células de hepatocarcinoma G2
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
MBD	Dominio de unión a MYC
MOPS	Ácido 3-(n-Morfolino)-Propanosulfónico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NTID	Dominio de inserción amino-terminal
PDB	Banco de proteínas
PC12	Células de feocromocitoma de médula adrenal de rata
PI(4,5)P₂	Fosfatidil-inositol-(4,5)bifosfato
PKC	Proteína cinasa C
PVDF	Flururo de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS
SOB	Medio súper óptimo

TBS	Amortiguador Tris-salino
TFBI	Amortiguador de transformación I
TFBII	Amortiguador de transformación II
TFE	Trifluoroetanol
Tris	Tris (hidroximetil)aminometano

Resumen	1
Introducción	2
Membranas biológicas	2
Estructura membranal	4
Proteínas membranales	6
Proteínas y estructura membranal	7
Proteínas BAR	11
Subfamilia Anfifisina	13
Anfifisina I	14
Bin1/Anfifisina II	14
Antecedentes	19
Objetivos	21
Metodología	22
Preparación de bacterias competentes	22
Transformación de bacterias competentes	23
Extracción de ADN plasmídico	23
Vector de expresión en bacteria pCRT7/NT-TOPO	24
Cepa de <i>E. coli</i> Origami B	25
Electroforesis en geles de poliacrilamida	27
Pruebas de sobreexpresión	27
Sobreexpresión	29
Purificación de proteínas	29
Purificación de proteína por cromatografía de afinidad a níquel	29
Purificación de proteína por cromatografía de intercambio aniónico	31
Purificación de proteína por cromatografía de exclusión molecular	31
Inmunoensayo tipo western	32
Resultados	34
Discusión	56
Conclusiones	57
Perspectivas	58
Referencias	59

Resumen.

Bin1/Anfifisina II es una proteína originalmente descrita como supresor de tumores conservada en mamíferos y que pertenece a la súper-familia de proteínas BAR, que participan en la deformación de membranas biológicas. Sin embargo Bin1/Anfifisina II participa en múltiples procesos celulares pues cuenta con otros módulos funcionales. Los mamíferos expresan diversas isoformas y en humano existen 11 isoformas. Nuestro equipo de trabajo aisló dos isoformas de esta proteína, de la línea celular PC12, Bin1-1PC12 que cuenta con el exón 12A, normalmente encontrado en isoformas de tejido canceroso; y la isoforma Bin1-10F7, particularmente novedosa pues carece del exón 6, que codifica residuos básicos entre dos de las tres hélices del dominio BAR, con los que interacciona con lípidos de carga negativa en la membrana.

En este trabajo se propuso como objetivo la purificación de la isoforma Bin1-1PC12, isoforma con un dominio BAR de configuración exónica normal para iniciar posteriormente un trabajo de comparación de características estructurales y funcionales entre las dos isoformas y lograr entender la relevancia de la ausencia del exón 6 en el dominio BAR de Bin1/Anfifisina II. Se empleó una construcción con la isoforma Bin1-1PC12 previamente clonada en el vector de expresión pCRT7/NT-TOPO. Se buscaron las condiciones óptimas de sobreexpresión en un sistema bacteriano, posteriormente se buscó diseñar un protocolo de purificación para obtener la proteína recombinante pura. Se logró obtener la sobreexpresión de la proteína recombinante Bin1-1PC12 en la cepa Origami B de *Escherichia coli*, derivada de la cepa BL21 (DE3) a una concentración final de IPTG de 100 μ M en cultivos de 500 mL de medio SOB incubados durante 4 horas a 30 °C. La purificación de la proteína recombinante se realizó a través de cromatografía de afinidad a níquel inmovilizado seguida de cromatografía de intercambio aniónico.

La purificación de la proteína recombinante Bin1-1PC12 representa un primer paso para la dilucidación de las diferencias estructurales y funcionales entre el dominio BAR normal de esta isoforma y el dominio BAR de la novedosa isoforma Bin1-10F7.

1 Introducción.

Membranas biológicas.

Las membranas biológicas son las barreras que delimitan el espacio intracelular y permiten a las células generar y mantener diferencias en composición química y molecular entre el medio intracelular y el medio extracelular. La separación de ambientes químicos es clave para la homeostasis celular ya que permite la generación de un medio intracelular con características químicas y moleculares diferentes al medio ambiente, y resulta crucial para la formación de gradientes quimiosmóticos, importantes para la generación de energía (1). Sin embargo, las membranas celulares no son barreras herméticas o inertes, son barreras selectivas y dinámicas en las que se llevan a cabo procesos como el transporte selectivo de moléculas, señalización, secreción y endocitosis. Las membranas celulares constan de dos componentes básicos, proteínas y lípidos organizados en un arreglo descrito como mosaico fluido (2). A pesar de que en muchas células, el cociente de peso de proteína entre lípido varía entre 1.5 a 4, los lípidos son el soporte estructural de la membrana, ordenándose como bicapas en las que los grupos acilo se encuentran orientados hacia sí mismos, ocultándose del medio acuoso y los grupos hidrofílicos expuestos al medio acuoso en caras opuestas. Por su parte, las proteínas pueden asociarse a la membrana de dos maneras, como proteínas integrales de membrana, cruzando la bicapa o como proteínas periféricas adhiriéndose a una cara de la bicapa (**Fig. 1A**) (2). Este arreglo hace de las membranas biológicas barreras selectivas, permeables a moléculas hidrofóbicas e impermeables a moléculas polares o iónicas.

Los lípidos son el soporte estructural de las membranas biológicas y como tal definen muchas de las características físicas de la membrana, tales como la fluidez, la presión lateral o la curvatura, que a su vez influyen en la actividad de proteínas membranales (3). La fluidez membranal es el resultado de las interacciones no covalentes entre los grupos acilo de los lípidos (2). En la membrana fluida, el movimiento de las moléculas membranales sobre el plano de la bicapa se ha descrito como movimiento limitado por difusión o movimiento

Browniano (4). Este movimiento, sin embargo se ve restringido por diferentes factores, entre estos, la afinidad con la que interaccionan diferentes lípidos (5). La interacción diferencial entre los lípidos membranales lleva a la generación de membranas con distribuciones heterogéneas de lípidos sobre el plano de la bicapa. Esta distribución de poblaciones lipídicas se denomina asimetría lateral. La asimetría lateral se describió al proponerse el modelo del mosaico fluido, sin embargo se descartó el ordenamiento de lípidos de largo alcance, de más de 100 nm (2). La caracterización de membranas de diferentes poblaciones celulares sin embargo, ha demostrado la segregación de lípidos ordenados en rangos que alcanzan los micrómetros (6) (**Fig. 1B**). El ordenamiento de lípidos específicos en dominios es necesario para diferentes procesos celulares, entre ellos la señalización celular, un ejemplo del papel que juega este tipo de segregación es la señalización a través de dominios lipídicos enriquecidos en glucoesfingolípidos y colesterol, denominados balsas lipídicas (7).

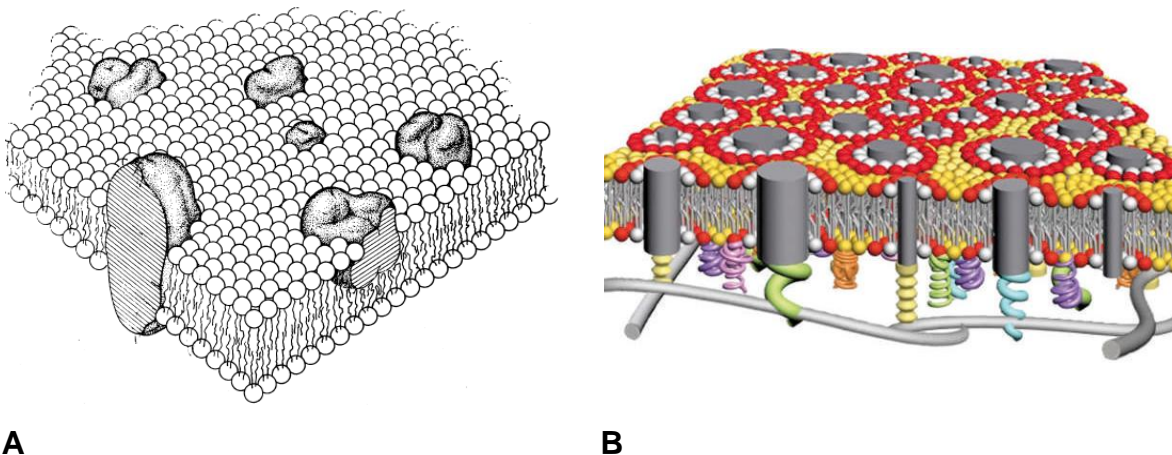


Figura 1: Modelo del mosaico fluido. **A:** *Modelo propuesto por Singer y Nicolson en 1973.* Se muestran los lípidos con sus cabezas polares y grupos acilo y las proteínas transmembranales embebidas en la bicapa lipídica (2). **B:** *Modelo actual del mosaico fluido.* Se muestran diferentes clases de lípidos representados con los colores rojo, amarillo y blanco, también se muestran las proteínas periféricas de membrana, se ilustran proteínas periféricas de membrana como espirales de colores y se muestra la red citoesquelética debajo de la bicapa (6).

El segundo tipo de asimetría lipídica presente en las membranas biológicas es conocido como asimetría transversal, y consiste en la diferencia de poblaciones

lipídicas entre las caras de las membranas biológicas. En eucariontes se encuentran lípidos de cargas negativas, como fosfatidilserina en la cara interna de la membrana y lípidos de cargas positivas como fosfatidilcolina en la cara externa de la membrana. La generación de este tipo de asimetría normalmente se le atribuye a la acción de proteínas, proceso que se discutirá posteriormente, sin embargo, también pueden generarse asimetrías lipídicas sin la intervención de proteínas. La generación de asimetrías lipídicas sin la participación de proteínas se ha observado en membranas de linfocitos cuyo volumen aumenta, de manera que sus membranas están sometidas a mayor tensión y curvatura, lo que permite el movimiento lipídico de la cara interna hacia la cara externa de fosfatidilserina (Fig. 2) (3).

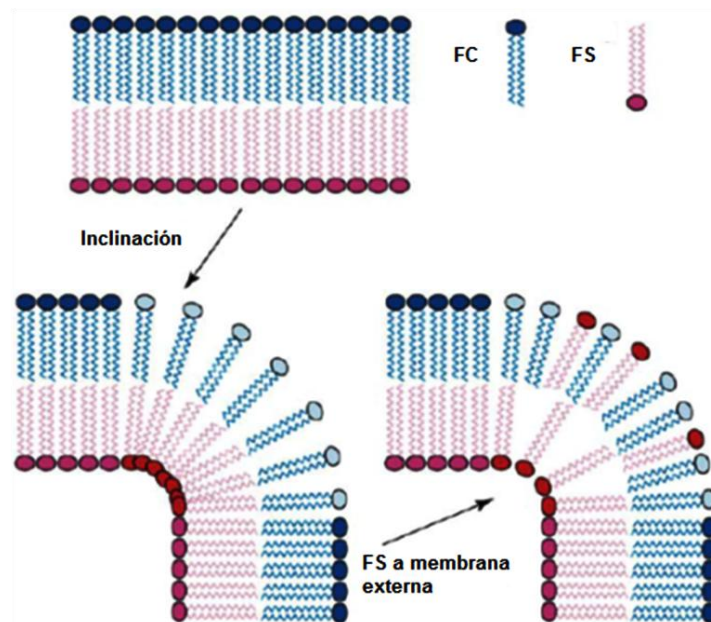


Figura 2. Movimiento de lípidos por asimetría lipídica a través de la membrana: Se muestra una membrana compuesta por fosfatidilserina **FS** y fosfatidilcolina **FC**. La membrana puede inclinarse, generando una curvatura que permite la difusión transversal de lípidos (3).

Estructura membranaral.

El modelo del mosaico fluido describe la organización de la membrana en un plano bi-dimensional, no describe cómo una bicapa adquiere su curvatura. La curvatura membranaral se describe como el inverso del radio de una vesícula (8).

Las membranas biológicas adquieren una gran variedad de morfologías con diferentes curvaturas; esto se puede observar en las membranas externas de procariontes, eucariontes y en las membranas de los organelos eucariontes en las que existen vesículas esféricas o tubulares de diferentes diámetros (8). Es posible generar bicapas planas *in vitro* utilizando lípidos específicos, como fosfatidilcolina y fosfatidilserina, sin embargo, las membranas biológicas cuentan con una gran diversidad de lípidos y la mayoría, como fosfatidilinositol, colesterol y diacilglicerol entre otros, no pueden formar bicapas planas (3). Esta propiedad se debe a la geometría de los lípidos componentes de la membrana, existen lípidos con forma de cono invertido como los lisofosfolípidos, con formas cilíndricas como fosfatidilcolina y con formas cónicas como esfingomielina (**Fig. 3**) (3). Debido a la asimetría de las membranas biológicas, la mayor presencia de lípidos de cierta forma en una cara de la membrana generará curvatura membranar favoreciendo la formación de liposomas (3,9). De manera que los componentes lipídicos de las membranas poseen una tendencia natural a organizarse en vesículas compuestas de bi-capas, conocidas como liposomas y determinar su curvatura. La composición lipídica es un importante determinante de la estructura membranar, sin embargo, existen diferentes morfologías membranales observadas en las células, que no serían posibles sin moléculas que ejercieran fuerzas sobre las membranas (8), tales como las proteínas membranales.

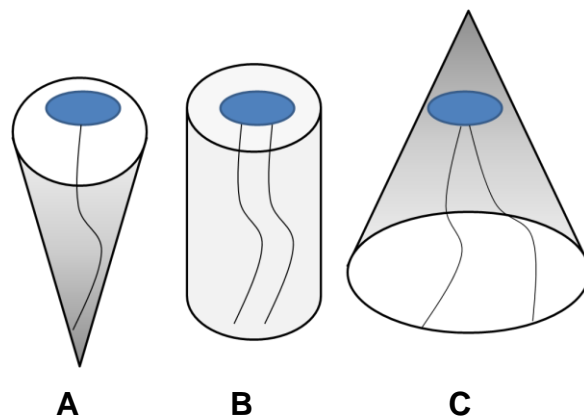


Figura 3. Geometrías de lípidos: Se muestran tres diferentes lípidos y sus geometrías. **A)** Los lisofosfolípidos tienen una geometría de cono invertido, **B)** fosfatidilcolina tiene una geometría de cilindro y **C)** esfingomielina tiene una geometría de cono.

Proteínas membranales.

Si bien los lípidos son el soporte estructural de las membranas biológicas, las proteínas son en gran parte los efectores de los procesos membranales y participan en la regulación de la estructura membranar. Las proteínas membranales se clasifican en dos grupos, proteínas integrales o transmembranales y proteínas periféricas (2). El criterio de clasificación es la facilidad de aislamiento de las proteínas de la membrana, de manera que una proteína periférica requiere tratamientos tenues como cambios en fuerza iónica para obtenerla libre de lípidos, mientras que una proteína integral requiere tratamientos más severos como lavados con detergentes o agentes desnaturizantes para su aislamiento, y en muchos casos incluye lípidos asociados (2). Esta diferencia se debe a que las proteínas integrales de membrana se encuentran embebidas en la bicapa lipídica, interaccionando con los grupos acilo a través de residuos hidrofóbicos, mientras que las proteínas periféricas de membrana se adhieren a la membrana a través de fuerzas débiles, interacciones electrostáticas con los grupos hidrofílicos de las superficies membranales (**Fig. 1**).

La mayoría de las proteínas integrales cuya estructura tridimensional ha sido resuelta, se caracteriza por poseer hélices alfa que cruzan la bicapa lipídica (**Fig. 4A**). Las proteínas transmembranales tienen una distribución de residuos de aminoácidos característica; en la región que cruza la membrana se encuentran residuos de aminoácidos predominantemente hidrofóbicos (A, I, V, L), residuos aromáticos en la interface agua-lípido (Y, W) y comunmente se encuentran residuos positivos en la porción intracelular de las hélices alfa transmembranales (10,11). A pesar de que la mayoría de las proteínas transmembranales descritas cuentan con estructuras helicoidales, también existen proteínas transmembranales estructuradas en hojas β . La conformación de estas proteínas resulta interesante, pues los grupos polares amino y carbonilo del esqueleto peptídico están expuestos a los grupos hidrofóbicos acilo de los lípidos de la

membrana; por lo que estos grupos evitan el contacto con la membrana interactuando a través de puentes de hidrógeno (**Fig. 4B**) (12)

Las proteínas periféricas de membrana no comparten homología en sus secuencias ni en sus estructuras, la mayoría interactúa con la membrana a través de parches con residuos cargados y en algunos casos a través de residuos de aminoácidos que se insertan en una cara de la bicapa y se estructuran en hélices alfa.

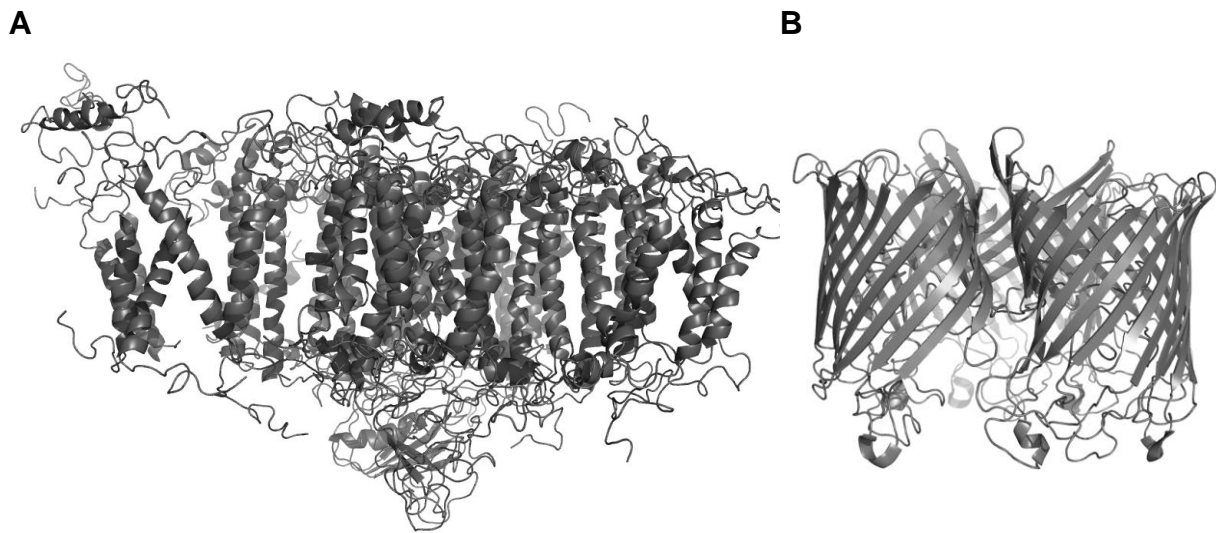


Figura 4. Proteínas integrales o transmembranales: A) Se muestra la estructura del complejo fotosintético fotosistema I (PDB: 2O01), que presenta cruces transmembranales en conformación de hélice α . **B)** Se muestra la estructura de la proteína maltoporina (PDB: 1MPQ), que presenta cruces transmembranales en conformación de hojas β .

Proteínas y estructura membranal.

En un principio no se consideró importante el papel de las proteínas en la estructura membranal (2). Sin embargo, la relación de la organización y estructura membranal con las proteínas se ha hecho cada vez más evidente, proteínas del citoesqueleto, proteínas de andamiaje, proteínas transmembranales y proteínas periféricas han sido involucradas en la regulación de la estructura membranal (3,8).

Una de las primeras evidencias de esta relación surgió de la observación que al alterar la fluidez membranal se altera la organización de proteínas del citoesqueleto (5). No solo la membrana es capaz de alterar al citoesqueleto, sino que esta red proteica también es capaz de influenciar la fluidez membranal, de manera que representa uno de los factores que contribuye a que en la membrana la difusión lateral se vea restringida y no siga un comportamiento similar a movimientos Brownianos. Se ha propuesto un modelo para explicar la restricción de la difusión en la membrana por el citoesqueleto en el que las proteínas transmembranales normalmente libres de difundir, restringen la fluidez membranal al asociarse con la red citoesquelética (**Fig. 5**) (13).

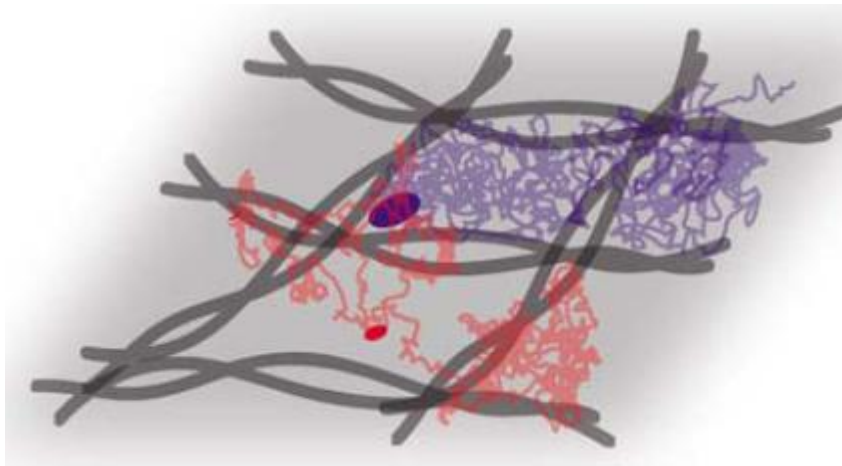


Figura 5. Restricción de fluidez membranal por el citoesqueleto: Se muestra cómo la red citoesquelética (líneas oscuras) delimita el movimiento de ciertas moléculas (líneas azules) sobre el plano de la membrana mientras que otras moléculas escapan a esta restricción (líneas rojas) *Modificada de Marguet et al. 2006 (13).*

Las proteínas transmembranales influyen la curvatura membranal imponiendo frustraciones hidrofóbicas, la diferencia en la longitud de la región hidrofóbica de una proteína transmembranal y la longitud de las cadenas acilo de los lípidos que la rodean. Las proteínas transmembranales tienen regiones hidrofóbicas de diferentes longitudes que comúnmente difieren de la longitud de los grupos acilo de las membranas en las que se encuentran embebidas, esto puede generar compresión o estiramiento de las cadenas hidrofóbicas, alterando el grosor de la bicapa y así mantener embebidos en un ambiente hidrófobo los

cruces transmembranales (3). Las proteínas transmembranales también pueden influenciar la estructura membranal de manera indirecta. Como se mencionó anteriormente, existen proteínas que activamente generan asimetrías lipídicas. Existen diferentes tipos de proteínas que transportan lípidos entre las caras de la membrana, muchas de ellas utilizan ATP como fuente de energía para el proceso. Los transportadores ABC movilizan lípidos de la cara interna de la membrana hacia la cara externa, las ATPasas tipo P movilizan lípidos de la cara externa hacia la cara interna de la membrana y la familia de proteínas conocida como “escramblasas”, no utilizan ATP, sino que son activadas por iones calcio para disipar la asimetría lipídica entre las caras de la membrana, permitiendo el movimiento de lípidos entre ambas caras (3).

A pesar de que inicialmente se consideró que únicamente las proteínas transmembranales podrían tener un papel marginal en la regulación de la estructura membranal (2), las proteínas periféricas son importantes reguladores de esta propiedad y en algunos casos son moduladas por las membranas que unen. La capacidad de deformación de membranas de las proteínas periféricas está relacionada con las propiedades de las membranas que reconocen. Las proteínas periféricas reconocen las membranas a través de diferentes mecanismos. Estas proteínas pueden reconocer específicamente lípidos que sólo se encuentran en ciertos organelos, reconocer lípidos que se producen transitoriamente y finalmente existen proteínas periféricas de membrana que reconocen propiedades físicas de la membrana, como carga o curvatura. Una vez unidas a las membranas, las proteínas periféricas pueden deformar las membranas a través de tres modelos propuestos para explicar cómo las proteínas influyen en la curvatura de las membranas biológicas. En un primer modelo, proteínas de rigidez estructural importante imponen su curvatura a la membrana, en el segundo modelo, la curvatura membranal es generada por inserciones de porciones pequeñas de proteínas a nivel de los grupos hidrofílicos de lípidos en una cara de la bicapa y en el tercer modelo, la curvatura membranal es generada por la inserción de porciones de proteínas a nivel de grupos acilo de una cara de la bi-capa (**Fig. 6**) (8).

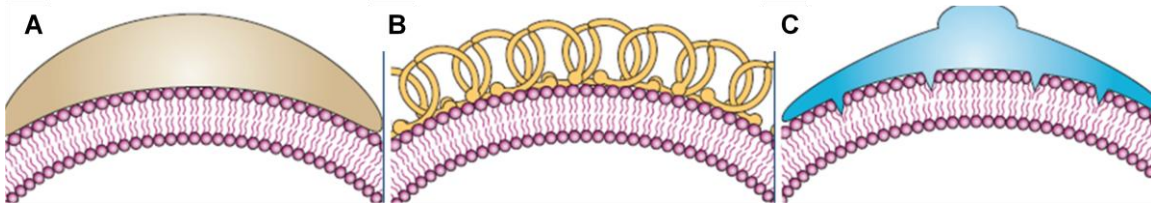


Figura 6. Generación de curvatura membranar por proteínas membranales periféricas: Se muestran los mecanismos propuestos para la generación de curvatura membranar por proteínas periféricas de membrana (8). **A:** En el mecanismo de moldeado una proteína con rigidez estructural impone su curvatura a la membrana. **B:** El mecanismo de moldeado también puede ejercerse por polímeros de proteínas con cierta curvatura. **C:** El mecanismo de curvatura espontánea local la inserción de hélices anfipáticas en una cara de la bicapa genera curvatura membranar. *Modificado de Zimmerberg et al. 2011.*

La organización del espacio intracelular en organelos es una característica que le ha permitido a las células eucariontes adquirir un gran número de funciones. El correcto funcionamiento de los organelos depende en la segregación específica de poblaciones de moléculas en el interior de estos pero también de los lípidos y proteínas en sus membranas. Un factor importante para lograr esa segregación organelo-específico es la actividad de proteínas degradadoras de GTP, GTPasas, que a su vez son reguladas por proteínas activadoras de GTPasa, GAPs, proteínas que se han descrito como periféricas de membrana. La población de fosfolípidos, factor importante en la identidad organelar, es regulada por cinasas de lípidos, la mayoría que se han descrito son proteínas periféricas de membrana (14).

Un gran número de proteínas periféricas membranales tiene afinidad a diferentes fosfatidil-inositoles-fosfatos. Estos lípidos son importantes en la señalización celular y la identidad de organelos. La mayoría de los dominios de especificidad lipídica de proteínas periféricas están compuestos por residuos básicos, que reconocen las cargas de los grupos fosfato de los fosfatidil-inositoles y junto con otros dominios o porciones de la proteína que se insertan parcialmente en una cara de la bi-capa, aumentan su especificidad. Por ejemplo; los dominios de homología amino-terminales de epsina, ENTH que tienen especificidad a fosfatidil-inositol-(4,5)bifosfato, PI(4,5)P₂ actúan con una porción que se estructura

en hélice alfa en presencia de este lípido y penetra la membrana para generar curvatura membranal. También existen dominios cuya especificidad a lípidos aumenta si estos se encuentran en membranas con cargas predominantemente negativas, tal como los dominios C1 de las Proteín-Cinasas-C, PKC, que reconocen ésteres de forbol, pero unen estos ligandos con mayor afinidad en presencia de membranas de carga negativa. A pesar de que la mayoría de estos dominios de especificidad están compuestos de residuos básicos, existen dominios con residuos ácidos que, sin embargo también reconocen lípidos de carga negativa. Este tipo de dominios no une directamente sus lípidos ligando, sino que coordina iones calcio con sus residuos ácidos y de esta manera une lípidos de carga negativa tal es el caso de los dominios C2 que unen fosfatidilserina (15)

Como se mencionó, existen dominios proteicos que reconocen propiedades físicas de la membrana. Los dominios KA1 no tienen afinidad a algún lípido en especial, reconocen promiscuamente lípidos de carga negativa. Los dominios BAR (Bin-Anfifisina-Rvs) resultan interesantes, pues no unen lípidos de manera específica, su afinidad a membranas está dictada por el tipo de curvatura que estas tienen y en vez de tener parches altamente básicos, estos dominios tienen varios parches básicos de baja afinidad (15).

Proteínas BAR.

La súper-familia de proteínas BAR está compuesta por proteínas que comparten diferentes tipos de dominios proteicos BAR. Existe poca identidad entre las secuencias de estos dominios, sin embargo, comparten la capacidad de unir membranas con lípidos de carga negativa a través de residuos básicos. Estas proteínas dimerizan a través de sus dominios BAR formando interfases curvas con parches de residuos positivos (**Fig. 7**). La capacidad de unión a membranas permite que estas proteínas puedan deformarlas imponiendo su curvatura. Las proteínas de esta súper-familia no sólo incluyen dominios tipo BAR, sino que presentan una amplia riqueza en su arquitectura genética, incluyendo otros dominios funcionales. Además de su papel en la deformación de curvatura

membranal, las proteínas de esta súper-familia se han asociado a varias funciones, incluyendo la migración celular, la endocitosis, la organización del citoesqueleto de actina, el tráfico vesicular, la formación de organelos y el control del ciclo celular. La súper-familia BAR incluye diferentes tipos de dominios que se clasifican por la curvatura de la interfase de sus dímeros que se describen a continuación.

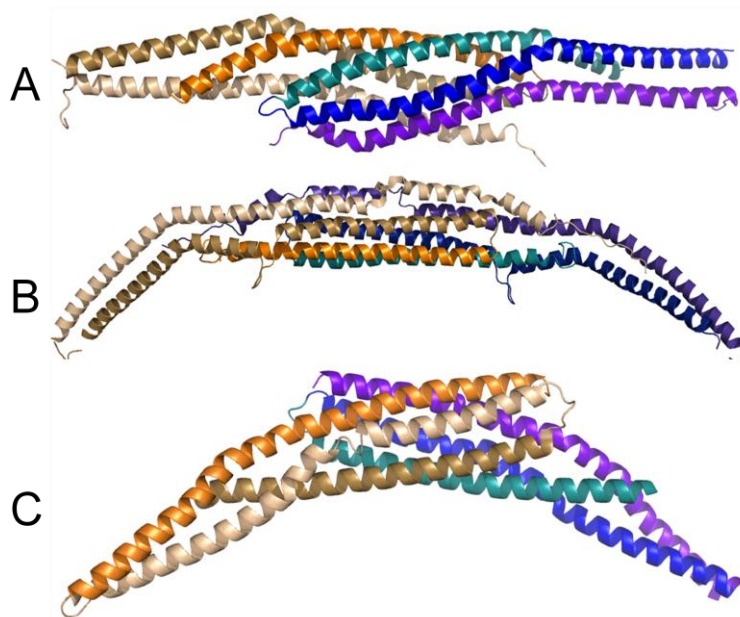


Figura 7. Dominios de la súper-familia BAR: Se muestran las estructuras cristalográficas de tres diferentes dominios BAR: **A)** El dominio I-BAR de IRSp53 (PDB: 2YKT) **B)** el dominio F-BAR de Pacsina2 (PDB: 3Q0K) y **C)** el dominio N-BAR de Anfifisinal II/Bin1 (PDB: 2FIC).

BAR

Los dímeros de proteínas de esta familia se caracterizan por tener curvaturas pronunciadas, con diámetros de curvatura entre 250 y 300 Angstroms (**Fig. 7A**). Además de las tres hélices alfa, estas proteínas poseen residuos estructuralmente desorganizados en su extremo amino-terminal, sin embargo, en presencia de lípidos negativos se estructuran en hélices alfa. Estas proteínas generan invaginaciones membranales. Dentro de esta familia de proteínas se encuentran

proteínas involucradas en la endocitosis y tráfico vesicular como SNX9, el control de la polimerización de actina como PICK1 (16).

F-BAR

Los dímeros de los dominios de esta familia producen curvaturas menos pronunciadas (**Fig. 7B**). Al igual que las proteínas con dominios BAR, estas proteínas están involucradas en procesos endocíticos. Contrario al dominio BAR, el dominio F-BAR tiene afinidad a PI(4,5)P₂ y a fosfatidilserina. Cabe resaltar que muchas de estas proteínas también incluyen dominios de interacción proteica SH3 al igual que muchas proteínas con dominios N-BAR (16)

I-BAR

Los dímeros de los dominios de esta familia producen curvaturas inversas, en vez de producir invaginaciones membranales, generan protrusiones membranales. Esto se debe a la forma de los dímeros de estas proteínas, comparados con los dímeros de dominios BAR y F-BAR, estos dímeros adquieren una forma más extendida y tienen parches de residuos positivos en la cara convexa del dímero (**Fig.7C**). Estas proteínas se localizan en protrusiones membranales como lamelipodias y filipodias, donde actúan junto con actina para deformar la membrana. Al igual que los otros miembros de la súper-familia BAR, muchas de estas proteínas también poseen dominios de interacción proteica SH3. Al igual que los dominios F-BAR, también tienen afinidad a PI(4,5)P₂ y fosfatidil-serina (16).

Subfamilia Anfifisina.

Las primeras proteínas descritas como proteínas BAR, Bin1, Anfifisina I y Rvs167 pertenecen a la subfamilia Anfifisina, están conservadas en eucariontes, tanto en la levadura de gemación *S. cerevisiae*, como en mamíferos que tienen las proteínas Anfifisina I y Bin1/Anfifisina II. En mamíferos ésta sub-familia incluye a los genes de Anfifisina I, Bin1, Bin2 y Bin3. Todos estos genes cuentan con un dominio N-BAR, a su vez Anfifisina I y Anfifisina II cuentan con un dominio SH3 en

su extremo carboxilo-terminal. Bin3 es una proteína pequeña que comprende únicamente un dominio BAR, en mamíferos se expresa en todos los tejidos excepto neuronales. Intracelularmente, tiene una localización parcialmente mitocondrial. Bin2 se encuentra como heterodímero con Bin1 en células hematopoyéticas (16).

Anfifisina I

Anfifisina I fue descrita por primera vez en ensayos de identificación de proteínas enriquecidas en la sinapsis. Es una proteína soluble, con un alto número de residuos ácidos (18). Existen tres isoformas de esta proteína, la primera se detecta en tejido neuronal, la segunda isoforma se detecta en carcinoma de tejido mamario y la tercer isoforma se detecta en retina (19). Esta proteína participa en el reciclaje de vesículas sinápticas. Se ha demostrado su asociación con la proteína dinamina I, que escinde el cuello de las vesículas endocíticas y su inhibición lleva a la acumulación de vesículas presinápticas.

Bin1/Anfifisina II.

Bin1/Anfifisina II es una proteína con un patrón de expresión ubicuo en mamíferos. Esta proteína tiene un alto nivel de homología con Anfifisina I, por lo que en un principio, se postuló que era una isoforma de esta proteína. Sin embargo, ahora se sabe que Bin1/Anfifisina II es codificada por un gen diferente al de Anfifisina I y en humanos se localiza en el cromosoma 2q14 (20). El estudio de esta proteína es relevante pues además de participar en la regulación de la estructura membranal, juega un papel importante en el control del ciclo y la diferenciación celular, su expresión es nula en un gran número de líneas celulares de carcinomas (20) y si Anfifisina II se expresa en una línea tumoral carente de ésta, tal como la línea celular de hepatocarcinoma, HepG2 se induce un tipo de muerte celular independiente de caspasas, p53, proteína de Retinoblastoma (Rb), Fas y Bcl-2, similar en morfología a la que se induce a través de Myc (17).

El gen de Bin1/Anfifisina II cuenta con 5 dominios estructurales, que sufren ediciones por el corte y empalme alternativo tejido-específico al que es sujeto este

gen (21). Los dominios estructurales de Bin1/Anfifisina II son el dominio BAR, el dominio GPA, el dominio de unión a clatrina, el dominio de unión a c-Myc y el dominio de interacción proteica SH3. La única modificación por corte y empalme alternativo que sufre el dominio BAR es la inserción de una porción del intrón 6 (22-26). El dominio GPA es exclusivo de la familia de las anfifisinas, comprende los exones 9 a 11, de los cuales el exón 10 únicamente es observado en tejido muscular (21). El dominio de unión a clatrina es codificado por el exón 12, que tiene versiones de la A a D, de estas, el exón 12A se detecta tanto en tejido neuronal como en líneas celulares tumorales y los exones 12B-12D se detectan exclusivamente en tejido neuronal. El dominio de unión a MYC, MBD (por sus siglas en inglés, MYC Binding Domain) está conformado por los exones 13 y 14, de estos, el exón 13 sufre corte y empalme alternativo aparentemente desregulado, ya que se observan en misma proporción isoformas con su presencia o ausencia. El dominio de interacción proteica SH3 está conformado por los exones 15-16 y no sufre ediciones post-transcripcionales (21). La generación de isoformas de Bin1/Anfifisina II resulta en una gama de proteínas involucradas en diferentes procesos.

Bin1/Anfifisina II incluye un dominio N-BAR el cual puede dividirse en dos módulos funcionales, el extremo amino terminal, también denominado hélice 0 y el dominio BAR. En humano la hélice 0 de Bin1/Anfifisina II comprende 34 residuos del extremo amino-terminal que presentan una estructura secundaria al azar en soluciones acuosas pero que adquieren una estructura hélice α en presencia de lípidos de carga negativa (27). Seguido de la hélice 0 se encuentra el dominio BAR de Bin1/Anfifisina II, que consta de tres hélices alfa que pueden formar dímeros de hélices α entrelazadas en forma cóncava con un diámetro de curvatura de 220 Angstroms (**Fig.7C**). En la cara cóncava del homodímero se localizan residuos de cargas positivas que interactúan con lípidos cargados negativamente en la membrana (28). Se ha propuesto que la hélice 0 deforma la curvatura de las membranas a las que se une, para facilitar la unión del resto del dominio BAR, que detecta la curvatura membranar (29). De esta manera los dos módulos cooperan

para deformar membranas a través de dos de los mecanismos propuestos para la deformación de membranas por proteínas, la inserción de una hélice a la membrana, que aumenta la afinidad del dominio BAR a la membrana y a su vez facilita la deformación de la membrana a través de la imposición de la curvatura del dominio.

Hasta ahora la única modificación transcripcional descrita del dominio BAR de Anfifisina II es la inserción de una porción del intrón 6. Esta secuencia se conoce como el dominio de inserción amino-terminal, NTID por sus siglas en inglés, y se expresa en células de tejido neuronal. En las células de tejido neuronal es importante para la localización membranar de Bin1/Anfifisina II (30). Esto resulta interesante pues esta secuencia cuenta con residuos positivos. No existen estructuras cristalográficas del dominio BAR con esta inserción, sin embargo, se modeló la estructura de esta inserción dentro del dominio BAR humano (**Fig. 8**). Se ha propuesto que esta inserción se estructura en una hélice anfipática corta con capacidad de insertarse en la membrana (28), de manera que esta porción representaría un parche de residuos positivos más, con lo que el dominio BAR puede interactuar con la membrana.

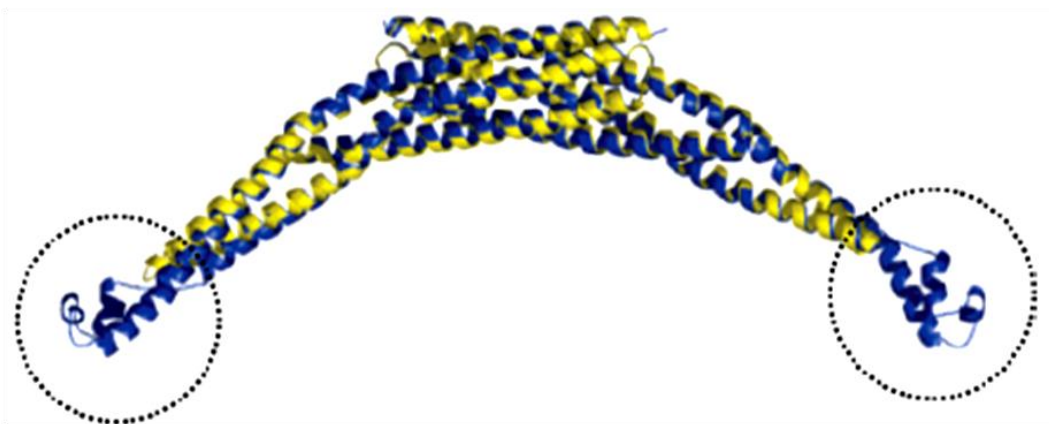


Figura 8. Simulación estructural del dominio N-BAR de Anfifisina II/Bin1 con el inserto NTID: Se muestra la estructura obtenida por simulación del dominio N-BAR en azul, en amarillo se muestra la estructura cristalográfica del dominio N-BAR y en se resalta en círculos la estructura del inserto NTID.(28)

La estructura del dominio BAR de *D. melanogaster* es similar a la del dominio carboxilo-terminal de Arfaptina (29, 31), ambos dominios cuentan con tres hélices alfa entrelazadas con capacidad de dimerizar y formar una interface cóncava con residuos positivos. Se demostró que esta similitud no sólo es estructural sino funcional, más aun, se demostró que este dominio pertenece a la familia BAR. A pesar de que este dominio es utilizado por Arfaptina para interactuar con la proteína G pequeña Rac, también le confiere la capacidad de interactuar con membranas (29). Este descubrimiento indica que además de participar en la deformación membranal, los dominios BAR también están involucrados en la señalización celular. Sin embargo, intentos *in silico* de encontrar superficies de interacción proteica en el dominio BAR de Bin1/Anfifisina II humana no lograron encontrar algún posible candidato de interacción (28). Además de estar involucrado en la interacción con membranas, el dominio BAR también participa en el control del ciclo celular. Se ha determinado que el extremo carboxilo terminal del dominio es más importante en el papel de Bin1/Anfifisina II como oncosupresor, ya que su eliminación por ingeniería genética tiene un mayor impacto en este aspecto regulatorio del gen que la escisión del dominio de unión a c-Myc. Esta porción del dominio inhibe blancos transcripcionales de c-Myc (32).

Otro módulo funcional de Bin1/Anfifisina II es el exón 10 que originalmente se describió como una secuencia de localización nuclear (21). Posteriormente se demostró que la expresión de Bin1/Anfifisina II aumenta durante la diferenciación de la línea celular C2C12 hacia miocitos, particularmente la expresión de isoformas con el exón 10 (33). Sin embargo, se demostró que este exón le confiere localización membranal a Bin1/Anfifisina II en miocitos ya que funge como un módulo de afinidad a fosfatidil inositol (4,5) bi-fosfato (34). Esta capacidad de unión a la membrana le permite tubular las membranas de miocitos para llevar a cabo la formación de túbulos T.

Anfifisina II tiene la capacidad de unir clatrina pues posee dos sitios de unión, que se codifican en los exones 12 A-D de la región central del gen. Esta región sufre varias ediciones de corte y empalme, de manera que se pueden encontrar

los dos sitios de unión a clatrina en algunas isoformas, mientras que en otras sólo se encontrará alguno de los dos sitios. Los sitios de unión a clatrina se encuentran en isoformas de tejido neuronal o de carcinomas (35). Sin embargo, la inclusión aberrante en isoformas ubicuas del exón 12A, específico de tejido neuronal, lleva a la pérdida de la capacidad de Bin1 de inhibir tumores y a una localización citosólica (36).

Como se mencionó, Bin1/Anfifisina II es un importante regulador del ciclo celular y su mal funcionamiento puede inducir procesos oncogénicos. Esta función se ha conservado en muchos miembros de la súper-familia BAR, en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* mutantes del ortólogo de Bin1/Anfifisina II, Hob1 frenan el ciclo celular de manera aberrante en respuesta al estrés por inanición de nitrógeno (37). Normalmente después de este tipo de estrés la levadura procede de la fase G2, a la G1 y finalmente a la fase G0, mientras que las mutantes de Hob1 progresan directamente de G2 a G0 y sorprendentemente, la expresión ectópica de Bin1 rescata el fenotipo y restablece el freno normal del ciclo celular (37). Bin1/Anifisina II se identificó originalmente en la búsqueda de proteínas capaces de interactuar con el proto-oncogen Myc. Este gen es un factor transcripcional que activa un gran número de genes necesarios para la división celular, suficientes para el paso a la fase S. Myc une el DNA a través de su extremo carboxilo, mientras que interactúa con otras proteínas a través de su extremo amino, en el que se encuentran dos módulos conservados de interacción proteica conocidos como las cajas MB1 y MB2 (38). La activación transcripcional de los genes blancos de Myc se realiza a través de la formación de heterodímeros con el factor transcripcional Max (39). Al identificarse Bin1, se determinó que interactúa con Myc a través la región codificada por los exones 13 y 14. La capacidad oncosupresora de Bin1 se debe a su capacidad de unión a Myc, que resulta en la inhibición de la transcripción de genes blanco de Myc (21) mediada por el dominio de unión a Myc (MBD) y las cajas MB1 y MB2 (32). Esta inhibición de la división celular es utilizada en respuesta a daño al DNA, condición que resulta en la activación de la expresión de Bin1 por el factor E2F1 (40). Esto es interesante pues algunos tipos de tejido tumoral son resistentes a tratamientos que

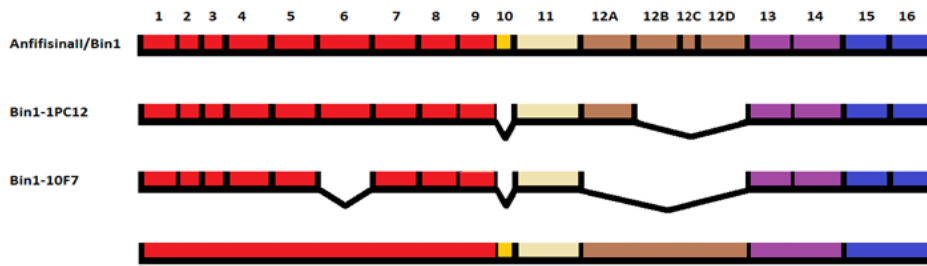
inducen daño al DNA, tal como el cis-platino. Se ha descrito que en estos tipos de tejido, la expresión de Bin1 es abatida por inhibición transcripcional de Myc (41). Esto resulta en células capaces de sobrellevar el daño al DNA pues en condiciones normales Bin1 inhibe la expresión de la polimerasa de poli-ADP-ribosa (PARP), importante para la reparación de daño al DNA (41).

El dominio SH3 es un importante módulo de interacción proteica. Se ha reportado que el dominio SH3 de Anfifisina II media la interacción con Dinamina, responsable de la escisión del cuello de vesículas endocíticas. Además de esta interacción importante para el proceso de endocitosis, este dominio también está involucrado en la capacidad de Anfifisina II/Bin1 de regular el ciclo celular. Este dominio le permite interactuar con p73 y el factor transcripcional E1A. (32,42). Sin embargo este dominio resulta particularmente interesante pues se ha reportado como un determinante crucial para la unión a c-Myc. Este dominio interacciona con una secuencia de residuos fuera de la caja de interacción proteica MB2 de Myc (43). Esta interacción es inhibida por la fosforilación de Myc y por la presencia del exón 12A en Bin1, que interactúa intramolecularmente con el dominio SH3 a través de una secuencia de poli-prolinas (43).

2 Antecedentes.

Nuestro equipo de trabajo aisló dos isoformas de Bin1/Anfifisina II, la isoforma Bin1-1PC12 fue aislada de células PC12 de feocromocitoma de rata, que como isoforma de tejido canceroso incluye la inserción aberrante del exón 12A (**Fig. 9A**) y la isoforma aislada, Bin1-10F7, se obtuvo de la línea celular de ovario de hámster chino transfectada con el receptor pepenador, CHO-F7, que resulta novedosa pues posee la configuración exónica de isoformas de expresión ubicua, pero carece del exón 6 (**Fig. 9A**) (44). El exón 6 codifica una región con alta concentración de residuos de carga positiva que une las hélices 2 y 3 del dominio BAR (**Fig. 9B**). De manera que esta región comprende uno de los parches de carga positiva con los que el dominio BAR interactúa con las cargas negativas de la membrana.

A



B

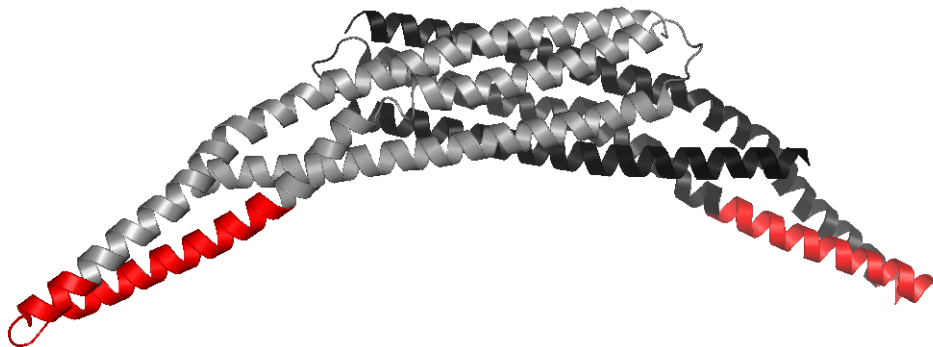


Figura 9. Isoformas de Anfifisina II/Bin1 obtenidas: **A)** Se muestran todos los exones del gen de Anfifisina II/Bin1. En rojo se indican los exones codificantes del dominio BAR, en amarillo se indica el exón 10 específico de tejido muscular, en color beige se indica el exón 11, en café se indican los exones 12, en morado se indican los exones codificantes del dominio de unión a c-Myc y en azul se muestran los exones codificantes del dominio SH3. **B)** Se muestra la estructura cristalográfica del dímero del dominio N-BAR de Anfifisina II/Bin1, en gris y negro se muestran los monómeros del dominio y en rojo se indica la porción de los monómeros codificada por el exón 6.

Hasta ahora no se han estudiado estructuralmente isoformas con la inserción aberrante del exón 12A y no se ha reportado ninguna isoforma con la eliminación del exón 6. Dado que estas isoformas comparten el dominio BAR, resulta interesante estudiar de manera comparativa las diferencias estructurales y funcionales entre los dominios de las dos isoformas para poder dilucidar la relevancia de la delección del exón 6. El presente trabajo representa el primer paso en la dilucidación de las diferencias entre las isoformas Bin1-1PC12 y Bin1-10F7 pues constituye la elaboración de un protocolo de purificación de la isoforma Bin1-

1PC12, previamente clonada en un vector de expresión bacteriana, mismo que será utilizado para la purificación de la isoforma Bin1-10F7. De esta manera se establecieron los siguientes objetivos:

3 Objetivos:

Objetivo del proyecto global:

- ❖ Comparar estructural y funcionalmente las isoformas Bin1-1PC12 y Bin1-10F7

Objetivo general del presente trabajo:

- ❖ Purificación de la isoforma Bin1-1PC12.

Objetivos particulares:

- ❖ Obtención de condiciones óptimas de sobreexpresión de la proteína Anfifisina II/Bin1
 - ❖ Escalamiento del proceso de sobreexpresión.
- ❖ Elaboración de protocolo de purificación de proteína por métodos cromatográficos.

4 Metodología:

La secuencia de Bin1-1-PC12 obtenida en cDNA por amplificación con transcriptasa reversa a partir de RNA fue previamente clonada en un vector de expresión para sistemas bacterianos. Se realizaron experimentos con esta construcción para determinar las condiciones óptimas de sobreexpresión. Posteriormente, se diseñaron protocolos de purificación de proteína utilizando cromatografía líquida, todos los que iniciaron con cromatografía de afinidad a níquel como primer paso de purificación. La proteína recombinante Bin1-1PC12 cuenta con una etiqueta de histidinas y la cromatografía de afinidad a níquel permite la concentración de las proteínas recombinantes con esta etiqueta dada su alta afinidad a los iones divalentes níquel y cobalto (45). Esto permite utilizar pasos subsecuentes de cromatografía con una muestra enriquecida en la proteína recombinante de interés.

Preparación de bacterias competentes.

Se inocularon 5 mL de medio-súper-óptimo, SOB, con suspensiones de cepas de *Escherichia coli* conservadas con glicerol al 30 % a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, se incubaron 16 h en agitación y a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. El medio SOB contiene magnesio, cuya presencia en cultivos incrementa su competencia, capacidad de las bacterias de recibir plásmidos (46). Se utilizaron 200 μL del cultivo saturado para inocular 10 mL de medio SOB, se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación hasta alcanzar una absorbancia de 0.5 a una longitud de onda de 600 nm. Los cultivos se incubaron en hielo por 10 min, y se centrifugaron a 2,300 revoluciones por minuto, rpm por 12 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las pastillas de bacterias obtenidas resuspendieron en 800 μL de amortiguador de transformación I, TFBI frío (acetato de potasio 30 mM, cloruro de rubidio 100 mM, cloruro de calcio 10 mM, cloruro de magnesio 50 mM, glicerol 15%, ajustado a pH de 6.5 y esterilizado por filtración) e incubadas en hielo por 15 min. Las bacterias se centrifugaron nuevamente a 2,300 rpm durante 12 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, las pastillas se re-suspendieron en 800 μL de amortiguador de transformación II, TFBII frío (cloruro de rubidio 10 mM, cloruro de calcio 75 mM, ácido 3(n-morfolino)-

propanosulfónico, MOPS 10 mM, glicerol 15%, ajustado a pH de 6.5 y esterilizado por filtración), y se incubaron en hielo por 15 min. Ambos amortiguadores contienen cationes divalentes importantes para obtener bacterias competentes pues se ha propuesto que los cationes interactúan con los fosfolípidos de la membrana bacteriana para permitir la entrada de ácidos nucleicos, que normalmente no podrían penetrar esta barrera natural, pues los grupos fosfato del ácido desoxirribonucleico, ADN y de los fosfolípidos se repelen (46). Finalmente, la suspensión de bacterias fue distribuida en alícuotas de 50 μ L que fueron almacenadas a - 70 °C.

Transformación de bacterias competentes.

Una vez que se prepararon bacterias competentes, se prosiguió a transformarlas con el vector pCRT7/NT-TOPO Bin1-1PC12, para producir más ADN plasmídico y así poder transformar cepas de bacterias con características idóneas para la sobreexpresión de proteínas.

Se agregaron 100 ng de ADN plasmídico a 50 μ L de bacterias competentes, se incubaron 30 min en hielo, 90 s a 42 °C y finalmente 5 min en hielo. Se inoculó 1 mL de medio SOB con las bacterias previamente sometidas a choque térmico y se incubaron a 37 °C en agitación por una hora. El medio con bacterias recuperadas se centrifugó a 13,000 rpm por 15 s y la pastilla se esparció en placas de LB+ampicilina 100 μ g/mL + cloranfenicol 34 μ g/mL que se incubaron 16 h a 37 °C.

Extracción de ADN plasmídico.

Los plásmidos utilizados se extrajeron utilizando el método de lisis alcalina (47). Este método de extracción de ácidos nucleicos se basa en la propiedad del DNA circular de doble cadena de permanecer en solución después de tratamientos alcalinos, específicamente a pH 12, seguidos de neutralización, contrario al DNA genómico o DNA circular con incisiones, los cuales precipitan en estas condiciones (47, 48).

Se inocularon 5 mL de medio SOB adicionado con antibióticos selectivos, con una colonia transformante de la cepa XL1-Blue [(endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)] de *E. coli*, y se incubaron 16 h a 37 °C en agitación. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 12,000 rpm y a 4 °C, y el sobrenadante se removió. La pastilla se resuspendió en 300 μL de solución I (Tris (hidroximetil)aminometano, Tris 50 mM a pH 8, ácido etilendiaminotetraacético, EDTA 10 mM, RNAasa 100 μg/mL) y se agregaron 300 μL de solución II (NaOH 200 mM, dodecil-sulfato de sodio, (SDS) 1 %). La mezcla se incubó 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 400 μL de solución III (CH₃COO K 1 M pH 5.0) y se incubó nuevamente 5 min a 4 °C. La mezcla se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4 °C. El sobrenadante de la mezcla centrifugada se recuperó y se agregaron 800 μL de etanol frío. La mezcla con etanol se centrifugó a 12,000 rpm por 30 min a 4 °C. Después de centrifugar la mezcla, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 50 μL de agua. La pastilla reconstituida se incubó con 400 μL de amortiguador para RNAasa y dos unidades de RNAse One (Promega ® Madison, WI, EUA), durante 30 min a 37 °C. Se agregaron 450 μL de mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (en proporción 25:24:1) y se agitaron en un mezclador de vórtice por 2 min. Se prosiguió a centrifugar la mezcla a 12,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, la fase acuosa se recuperó, y se le agregó un volumen equivalente de isopropanol frío al 70%, para después ser incubada a -80 °C durante 1 h. Después de la incubación, la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm por 30 min a 4 °C y el sobrenadante se descartó. La pastilla se resuspendió en 50 μL de agua.

Vector de expresión en bacteria pCRT7/NT-TOPO

Se utilizó el vector de expresión pCR/T7NT-TOPO (Invitrogen ® Grand Island, NY, EUA) para la sobreexpresión de Bin1-1PC12 (**Fig. 10**). Este vector es de bajo número de copias, debido a su origen de replicación pBR322 y es adecuado para la sobreexpresión de proteínas en cepas de bacterias con expresión inducible dependiente de la T7-RNA-Polimerasa ya que cuenta con un promotor para esta

polimerasa río arriba del sitio de clonación. Este vector incluye una secuencia 5' del sitio de clonación que codifica una etiqueta de histidinas. Existen otras etiquetas de afinidad utilizadas para la purificación de proteínas pero las etiquetas de histidinas son ampliamente utilizadas en la expresión de proteínas recombinantes, pues permiten la purificación de proteínas a través de la cromatografía de afinidad a níquel y la secuencia codificante en el RNA, 5' de las secuencias clonadas permite una eficiente traducción de la proteína recombinante (45).

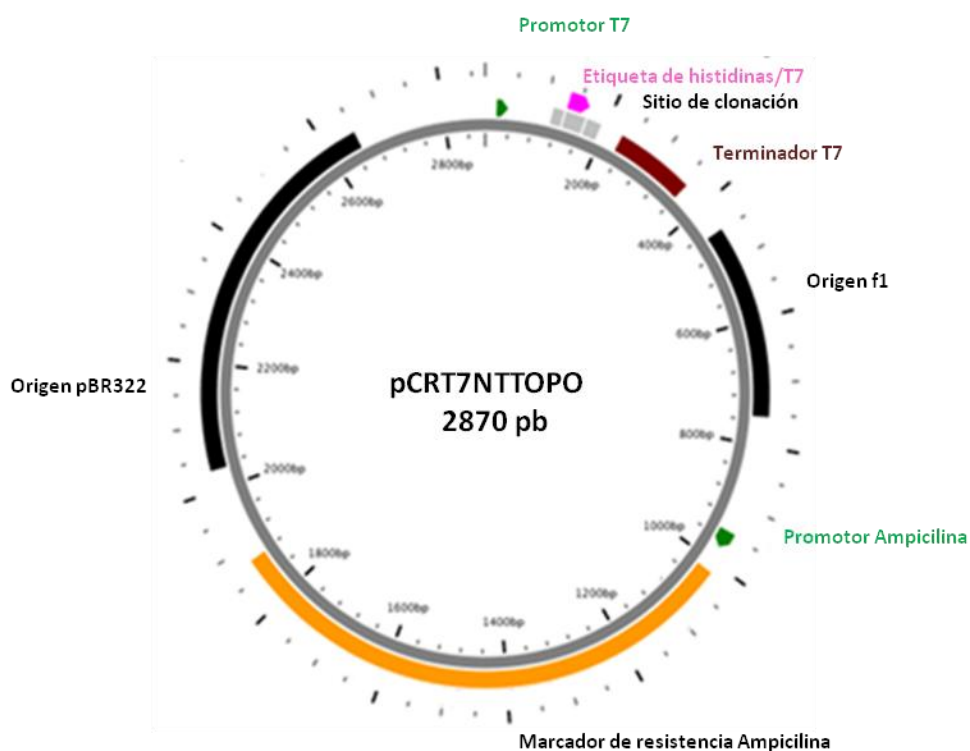


Figura 10: Plásmido pCRT7/NT-TOPO. Se indica el origen de replicación en negro, los marcadores de resistencia en amarillo, los promotores transcripcionales en verde, los terminadores transcripcionales en color guinda y las etiquetas de expresión en gris. Imagen obtenida con el programa PlasMapper (49).

Cepa de *E. coli* Origami B.

La bacteria Gram negativa *E. coli* ha sido extensamente utilizada para la sobreexpresión de proteínas por la facilidad de su manipulación genética y el diseño de nuevas cepas con características que facilitan la obtención de proteínas

recombinantes. La cepa Origami B pLysS (Merck-Millipore® Darmstadt, Alemania) fue derivada de la cepa BL21 (DE3) y tiene mutaciones en la reductasa de tioredoxina y la reductasa de glutatión para permitir la formación de puentes disulfuro en el citoplasma. La cepa BL21 (DE3) fue diseñada para la sobreexpresión de proteínas utilizando dos mecanismos para poder lograr una eficiente producción de proteínas con alta especificidad. Esta cepa cuenta con un promotor Lac mutante, insensible a la represión catabólica, esto es, por los niveles de AMPc. Este promotor tiene mutaciones en la región -10 del promotor, que generan un promotor más fuerte, y en el sitio de unión a CAP, que genera un promotor independiente de la regulación por esta proteína (50). El operador con este promotor es conocido como LacUV5 y permite la producción de proteínas bajo un solo interruptor molecular, la presencia de lactosa o análogos, como el Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (51). La sobreexpresión de proteínas necesita de una maquinaria que utilice la mayor cantidad posible de recursos del sistema. La transcripción de genes por la ARN polimerasa bacteriana representaría niveles de transcripción insuficientes, ya que esta estaría transcribiendo múltiples ARNm de la bacteria. La ARN polimerasa del fago T7 bajo control del operador LacUV5 fue clonada en el cromosoma de *E. coli* a través de la infección por el fago DE3. La T7-RNA polimerasa es altamente específica a sus promotores, de los cuales, no se encuentra ninguno en el genoma de *E. coli* (52). Además de esto, la cepa cuenta con el plásmido pLysS, que le confiere resistencia a cloranfenicol y tiene la secuencia codificante de un inhibidor natural de la ARN-polimerasa del bacteriófago T7, la lisozima del bacteriófago T7. La lisozima funge como control del nivel basal de expresión de los genes clonados bajo el promotor T7, inhibiendo la transcripción de estos por la expresión basal de la RNA-polimerasa. La lisozima inhibe la expresión de los genes clonados bajo el promotor T7 en ausencia de agentes inductores, inhibiendo la actividad de la RNA-polimerasa que llega a expresarse en estas condiciones. Al agregar un agente inductor, los niveles de expresión de la RNA polimerasa aumentan, de manera que escapan el control por la lisozima (53).

Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se analizó la expresión de proteínas mediante la electroforesis desnaturante de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Se cargaron 200 μg de proteína y se corrieron en geles de poliacrilamida SDS 10% por 2 h a 110 V. Se tiñeron los geles con solución Azul de Coomasie y se observaron los patrones de expresión.

Pruebas de sobreexpresión.

Se utilizó la cepa OrigamiB (DE3) pLysS de *E. coli* para realizar pruebas de sobreexpresión y poder determinar las condiciones ideales para la obtención de la proteína Bin1-1PC12. Se incubaron las bacterias transformadas con la construcción pCRT7/NT-TOPO-Bin1-1PC12 durante 16 h a 37 °C. Se inocularon 10 mL de medio SOB con cloranfenicol y ampicilina a concentraciones de 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, con 200 μL de los cultivos saturados, y se incubaron a 37 °C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica, DO de 0.8 a longitud de onda de 600 nm. Al alcanzar la densidad necesaria, los cultivos se indujeron con IPTG a una concentración final de 500 μM , y se incubaron a diferentes temperaturas por tiempos diferentes. Después de la incubación, los cultivos se centrifugaron a 6,000 rpm por 1 h a 4 °C. Las pastillas se resuspendieron en 200 μL de amortiguador de lisis (500 mM NaCl, 20 mM Na_2HPO_4 , 40 mM Imidazol, pH ajustado a 7.4) y se lisaron mediante cinco incubaciones de 30 s a 100 °C seguidas de incubaciones en nitrógeno líquido a -200 °C. Posteriormente, las pastillas fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 1 h a 4 °C.

Sobreexpresión.

Una vez obtenidas las condiciones necesarias para obtener un buen rendimiento de proteína recombinante, se escaló el proceso.

Las bacterias transformadas con plásmidos pCRT7/NT-TOPO fueron incubadas 16 h a 37 °C. Se utilizaron 200 µL de los cultivos saturados para inocular 500 mL de medio SOB con los antibióticos ampicilina y cloranfenicol a las concentraciones anteriormente mencionadas, en matraces de 2 L y se incubaron a 37 °C en agitación hasta alcanzar una DO de 0.8 a longitud de onda de 600 nm. Al alcanzar la densidad óptica necesaria, se agregó IPTG a los cultivos a una concentración final de 100 µM y se incubaron 5 h a 30 °C en agitación. Una vez concluida la incubación, los cultivos se centrifugaron 1 h a 6,000 rpm a 4 °C. Las pastillas obtenidas fueron resuspendidas en 15 mL de amortiguador de lisis (500 mM NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, 40mM Imidazol, pH ajustado a 7.4) y sonicadas en 5 ciclos de 1 min de sonicación intermitente (1s prendido/ 1s apagado) con una amplitud de 80 % (Sonicador vibrasonics®) en hielo. El sonicado se centrifugó a 15,000 rpm por 1 h a 4 °C y la fracción se recuperó la fracción soluble.

Purificación de proteínas

Habiendo determinado las condiciones de sobreexpresión, se diseñaron protocolos de purificación de proteína para la proteína recombinante Bin1-1PC12. Como se mencionó anteriormente, todos los protocolos utilizados iniciaron con la purificación por afinidad níquel como primer paso cromatográfico (**Tabla 1**).

Paso de purificación	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 3	Protocolo 5
1	Cromatografía de afinidad a níquel. – Elución en gradiente.	Cromatografía de afinidad a níquel. – Elución escalonada.	Cromatografía de afinidad a níquel. – Elución escalonada.	Cromatografía de afinidad a níquel. – Elución escalonada.	Cromatografía de afinidad a níquel. – Elución escalonada.
2		Cromatografía de filtración en gel.	Cromatografía de afinidad a níquel. – Elución escalonada. – Condiciones reductoras.	Cromatografía de intercambio aniónico.	Cromatografía de intercambio aniónico. – gradiente de pendiente alta.
3			Cromatografía de filtración en gel. – Condiciones reductoras.		Cromatografía de intercambio aniónico. – Gradiente de pendiente baja.

Tabla 1: Protocolos de purificación de Bin1-1PC12 utilizados. Se indican los métodos cromatográficos utilizados y el orden en que se emplearon.

Purificación de proteína cromatografía de afinidad a níquel.

Las columnas de níquel son utilizadas para purificar proteínas con etiquetas de residuos de histidinas ya sea en el extremo amino o carboxilo terminal. Los residuos de histidina tienen afinidad por iones divalentes pero en específico por el níquel. La columna HisTrap (1 mL) (General Electric ® Uppsala, Suecia) está compuesta de agarosa entrecruzada, tiene porosidades de 90 μm y puede unir hasta 15 μmol de Ni^{2+} . Entre las etiquetas de afinidad utilizadas en la purificación de proteínas recombinantes, la etiqueta de histidinas es la más utilizada pues no siempre afecta la actividad de las proteínas con las que se expresa ni la estructura

de estas, existe un gran número de proteínas cristalizadas que incluyen etiquetas de histidinas y cuya estructura ha sido resuelta y depositada en el banco de proteínas, PDB (45, 54). Este paso de purificación es normalmente utilizado como el primer método cromatográfico en la purificación de proteínas pues permite capturar proteínas recombinantes de manera específica y lograr una concentración importante de la proteína recombinante (45).

El sobrenadante sonificado fue filtrado por una membrana de 0.22 μm previo a inyectarse a la columna. La columna de afinidad a níquel HisTrapFF (1 mL) (General Electric® Uppsala, Suecia) fue lavada durante 10 min con H_2O MilliQ desgasificada previamente filtrada con una membrana de poros de 0.22 μm a un flujo de 1 mL/min. La columna fue equilibrada con solución de acoplamiento (500 mM NaCl, 20 mM Na_2HPO_4 , 40 mM imidazol, pH ajustado a 7.4) a un flujo de 1 mL/min. La columna equilibrada fue alimentada con el extracto de proteína total con una bomba peristáltica a un flujo de 1 mL/min y a 4 °C durante 16 h. Posteriormente a la incubación, la columna fue conectada al sistema de cromatografía de desempeño rápido, FPLC (Pharmacia-LKB® Uppsala, Suecia) con un flujo de 1 mL/min de solución de acoplamiento hasta que la absorbancia alcanzó un valor igual a cero, después de lo cual se inició la elución de proteínas unidas a la columna (**Tabla 2**). Así mismo, también se realizaron purificaciones por afinidad a níquel utilizando amortiguadores con agentes reductores. Se utilizó el mismo protocolo de elución, con la diferencia que el amortiguador de acoplamiento y el amortiguador de elución contenían ditioneitol, DTT 5 mM y β -mercaptoetanol 5 mM.

Volumen (mL)	Flujo (mL/min)	Concentración B (%)
0-30	0.5	0
30-40	0.1	50
40-55	0.5	50-100
55-65	0.5	100
65-75	0.5	0

Tabla 2: Programa de purificación de Bin1-1PC12 con columna HisTrap FF (1 mL). Se indica el volumen del programa, el flujo y la concentración de amortiguador de elución (Concentración B). El amortiguador B al 100 % corresponde a una concentración de 500 mM de imidazol.

Purificación de proteína por cromatografía de exclusión molecular.

La columna de exclusión molecular Superdex 200 10/300GL (General Electric® Uppsala, Suecia) se lavó con H₂O filtrada y desgasificada (0.22 µm) utilizando un flujo de 0.5 mL/min, posteriormente se equilibró con amortiguador de imidazol utilizando el mismo flujo durante 10 min. Una vez equilibrada la columna, el flujo se detuvo y la muestra se inyectó a través de la válvula de inyección al FPLC, cuando se terminó de inyectar la muestra, se reanudó el flujo. En las purificaciones realizadas por exclusión molecular se utilizaron dos amortiguadores previamente descritos, se utilizó el amortiguador de acoplamiento a columna de níquel, el amortiguador de acoplamiento a columna de níquel con agentes reductores y el amortiguador de acoplamiento a columna de intercambio aniónico.

Purificación de proteína por cromatografía de intercambio aniónico.

Las fracciones utilizadas para las purificaciones en intercambio aniónico fueron dializadas contra 1 L de amortiguador de acoplamiento (Tris 20 mM, pH 8.0) en agitación, a 4 °C durante 16 h. Previo a la inyección de las fracciones dializadas, la columna de intercambio aniónico Source15Q 10/100 fue conectada al sistema de cromatografía tipo FPLC, lavada con H₂O MilliQ filtrada (0.22 µm) y equilibrada con amortiguador de acoplamiento, a un flujo de 4 mL/min. Las fracciones dializadas fueron inyectadas a la columna a través de la válvula de inyección del sistema de cromatografía y un flujo de amortiguador de acoplamiento fue iniciado.

Una vez que la señal de absorbancia alcanzó un mínimo y permaneció estable, se iniciaron los gradientes de elución. Se utilizaron 3 diferentes gradientes de elución que se resumen en la **tabla 3**.

Volumen (mL)	Flujo (mL/min)	Concentración B (%)
Programa 1		
0-20	1	0
20-50	1	0-100
50-60	1	100
60-70	1	100-0
Programa 2		
0-20	1	0
20-55	1	0-75
55-65	1	100
65-75	1	0
Programa 3		
0-20	4	0
20-140	4	0-100
140-160	4	100
160-180	4	0

Tabla 3: Programas de purificación de Bin1-1PC12 por cromatografía de intercambio aniónico. Se indica el volumen de corrida, el flujo y la concentración de amortiguador de elución (**Concentración B**). El amortiguador B al 100 % corresponde a una concentración de 1 M de NaCl.

Inmunoensayo tipo western.

La expresión de la proteína recombinante Bin1-1PC12 se monitoreó utilizando el anticuerpo primario anti-Anfifisina II sc-13575 (Santa Cruz Biotechnology®, Dallas, Texas, EUA). Las fracciones indicadas se separaron en un gel de poliacrilamida-SDS (10 %) a 100 V durante 2 h. Las proteínas separadas en el gel de acrilamida se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno, PVDF previamente incubada en metanol durante 5 min. La transferencia de proteínas se

realizó a 4 °C a 400 mA durante 1 h en amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, glicina 250mM, metanol 20 %). La membrana con proteínas transferidas se incubó en solución de bloqueo (Amortiguador Tris-salino, TBS 1X, Tween 0.1 %, albúmina sérica bovina, BSA 5 %) a 4 °C en agitación durante 4 h. La membrana fue posteriormente incubada a 37 °C en agitación y en solución de bloqueo con el anticuerpo anti-anfifisina II sc13575 diluido 1:10,000. Posteriormente, se retiró la solución con el anticuerpo primario y la membrana se lavó seis veces incubando con solución de bloqueo 5 min a temperatura ambiente. Una vez que se lavó la membrana, se incubó 20 min a 37 °C en agitación y en solución de bloqueo con anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano, diluido 1:10,000. La membrana se lavó con amortiguador TBS 1X, Tween 1 % a temperatura ambiente en agitación 8 veces durante 15 min. Una vez que la membrana se lavó, se le agregaron 1.2 mL de solución de luminol. Se permitió que la peroxidasa llevara a cabo la reacción de oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno durante 5 min, después de lo cual, se expusieron placas autoradiográficas (Kodak ®, Rochester, Nueva York, EUA) a la membrana durante 20 s. Posteriormente, las placas se incubaron en solución reveladora durante 20 s, en agua 20 s y en solución fijadora 20s. Las placas reveladas se lavaron con agua y se dejaron secar.

5 Resultados:

Condiciones de sobreexpresión.

Se determinaron las condiciones de sobreexpresión de la proteína recombinante Bin1-1PC12 en experimentos piloto. La proteína Bin1-1PC12 de 476 residuos de aminoácidos tiene un peso molecular teórico de 52.74 kDa. Por otro lado, la proteína recombinante expresada en el vector pCRT7/NT-TOPO, con etiqueta de hexahistidinas consta de 512 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular teórico de 56.82 kDa. Los extractos de bacterias sin transformar son prácticamente idénticos en presencia o ausencia de IPTG a ambas temperaturas de incubación (**Fig. 11**). En los extractos de bacterias transformadas sin inducir es posible apreciar una banda de alrededor de 70 kDa en ambas temperaturas de incubación y en los extractos de proteína de las bacterias transformadas en presencia de IPTG, se observa un enriquecimiento de esta proteína, tanto a 20 °C como a 30 °C (**Fig. 11**). La proteína de 70 kDa es de mayor peso que el esperado para Bin1/Anfifisina II, 56.8 kDa, sin embargo, desde el aislamiento de la proteína se reportó que tiene un patrón de migración anómala, aparentemente de mayor peso molecular, esto debido a los exones 13 y 14 de unión a c-Myc (21).

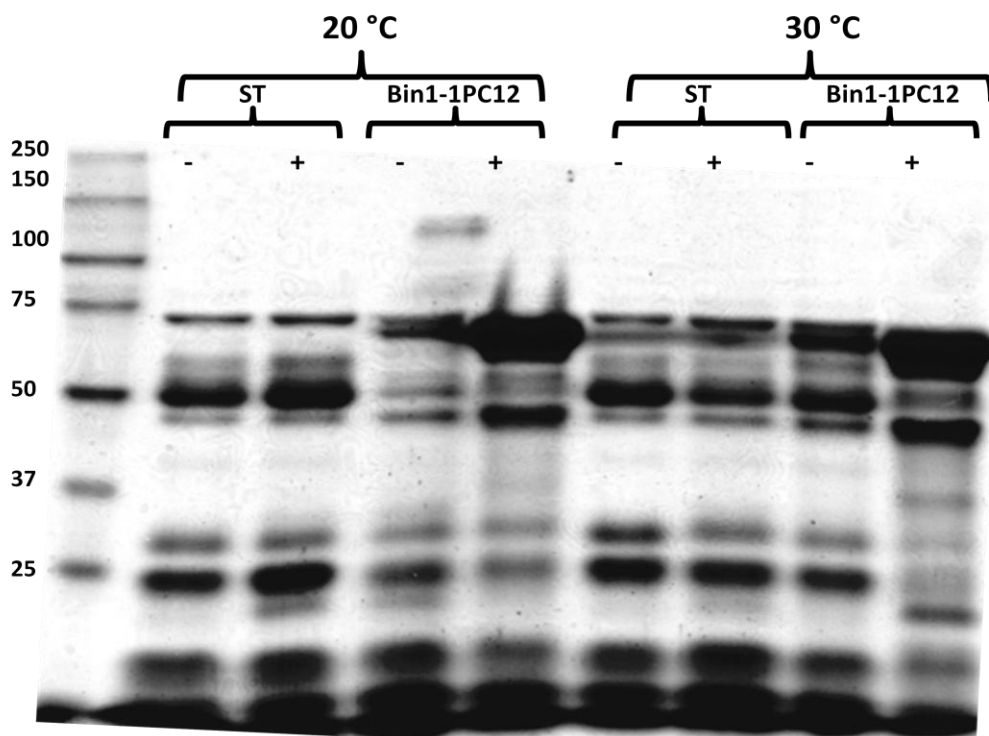


Figura 11: Condiciones piloto de sobreexpresión de la isoforma Bin1-1PC12: Tinción Coomassie de gel de poliacrilamida-SDS (10%). Se indican los extractos de proteína cargados, bacterias Sin Transformar, **ST** y bacterias transformadas, **Bin1-1PC12**; y las condiciones de sobreexpresión, temperatura y presencia o ausencia de IPTG, -, + respectivamente. Se indica el peso molecular, **PM**.

Purificación de proteína.

Purificación por cromatografía de afinidad a níquel- elución en gradiente.

Una vez obtenidas las condiciones de sobreexpresión de la proteína Bin1-1PC12 se prosiguió a purificar la proteína recombinante por cromatografía de afinidad a níquel. Se logró acoplar proteínas con afinidad a níquel, que eluyeron a una concentración relativamente baja de imidazol. El cromatograma obtenido incluye la señal de absorbancia de imidazol (**Fig. 12a**). Para obtener únicamente la señal de absorbancia contribuida por proteínas se realizó un gradiente de imidazol sin proteínas, de manera que se obtuvo la contribución de absorbancia del imidazol, la que le fue restada a la obtenida en la purificación de proteína. Habiendo obtenido la señal correspondiente a proteína, se analizaron las

fracciones obtenidas mediante electroforesis desnaturalizante, SDS-PAGE. En la fracción no acoplada a la columna se observa la presencia de proteínas de bajo peso molecular, de manera similar, en la fracción de lavado con amortiguador de acoplamiento también se obtuvieron proteínas de bajo peso molecular, pero en menor cantidad (**Fig. 12b**). Las fracciones correspondientes al pico de absorbancia consisten de la misma población de proteínas, con una mayor concentración entre las fracciones 9 y 12. La proteína de alrededor de 70 kDa observada anteriormente en pruebas de sobreexpresión (**Fig. 11**) es la proteína de mayor concentración en todas las fracciones obtenidas (**Fig. 12b**).

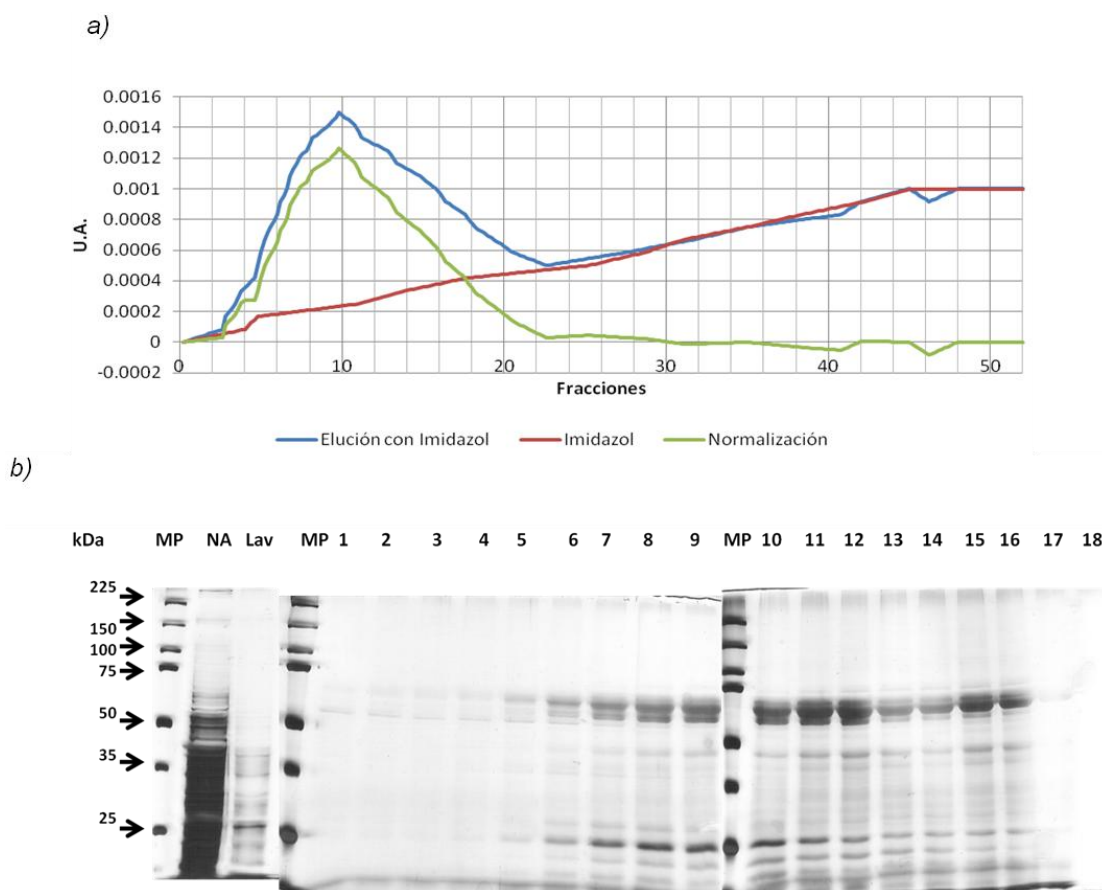


Figura 12. Purificación de Bin1-1PC12-NTHis por cromatografía de afinidad a níquel: a) Cromatograma de elución de proteínas para purificación con dos columnas HisTrapFF(1mL), se muestran los perfiles de absorbancia de un gradiente sin proteína (**Imidazol**), la elución de proteína con la absorbancia del Imidazol (**Elución con imidazol**) y la resta de estas (**Normalización**). Se indican las fracciones colectadas y las unidades de absorbancia (**U.A.**). b) Geles de poliacrilamida-SDS 10% teñidos con plata. Se indican las fracciones (**NA**:No Acoplado, **Lav**: Lavado, **MP**: Marcador de peso molecular).

Escalamiento de sobreexpresión.

Se prosiguió a escalar el proceso a volúmenes de 500 mL de medio. Se obtuvieron resultados similares a los observados en las pruebas de sobreexpresión (**Fig. 11**). Se observa una banda de alrededor de 70 kDa en el extracto de bacterias transformadas y sin IPTG, que no se observa en las bacterias no transformadas y se enriquece en presencia de IPTG (**Fig. 13**).

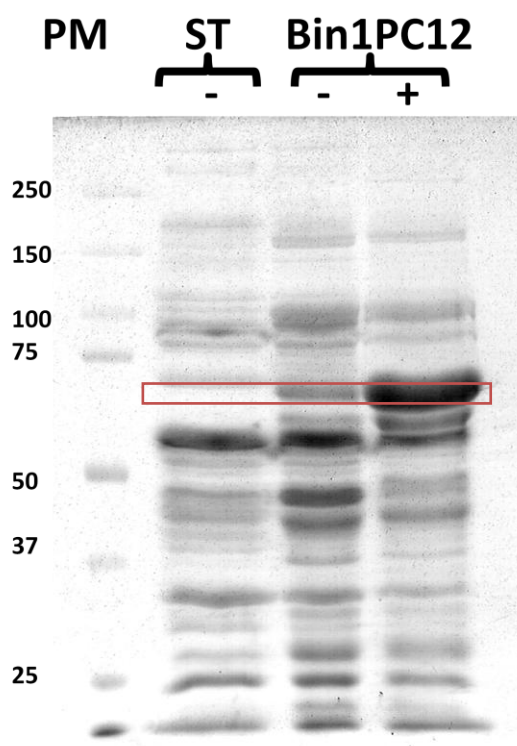


Figura 13: Condiciones de sobreexpresión de la isoforma Bin1-1PC12. Tinción Coomassie en gel de poliacrilamida-SDS (10%). Se indican los extractos de proteína cargados, bacterias sin transformar, **ST** y bacterias transformadas **Bin1PC12**; y las condiciones de sobreexpresión, sin IPTG, - y con IPTG, +. Se indican los KDa del marcador de Peso Molecular, **PM**.

Tren de purificación afinidad a níquel – exclusión de peso molecular.

Purificación por afinidad a níquel – elución escalonada.

Dado que en la purificación por afinidad a níquel obtenida anteriormente se obtuvo la misma población de proteínas en el gradiente de elución (**Fig. 12b**), se decidió realizar un gradiente escalonado de elución y así obtener esa población de

proteínas en un menor número de fracciones y por tanto en mayor concentración. El extracto de proteínas de bacterias inducidas obtenido previamente se inyectó a una columna de afinidad a níquel. Las proteínas acopladas se eluyeron en un gradiente escalonado de amortiguador con imidazol. Durante la elución se observó un pico simétrico de absorbancia que abarcó tres fracciones de 1 mL. El análisis por SDS-PAGE demostró que la purificación logró concentrar de manera importante la proteína de 70 kDa observada en el extracto de bacterias inducidas, con mayor concentración en la fracción 3 del gradiente de elución (**Fig.14**). A su vez, la purificación eliminó proteínas de mayor peso molecular, sin embargo es evidente la presencia de proteínas contaminantes de menor peso molecular.

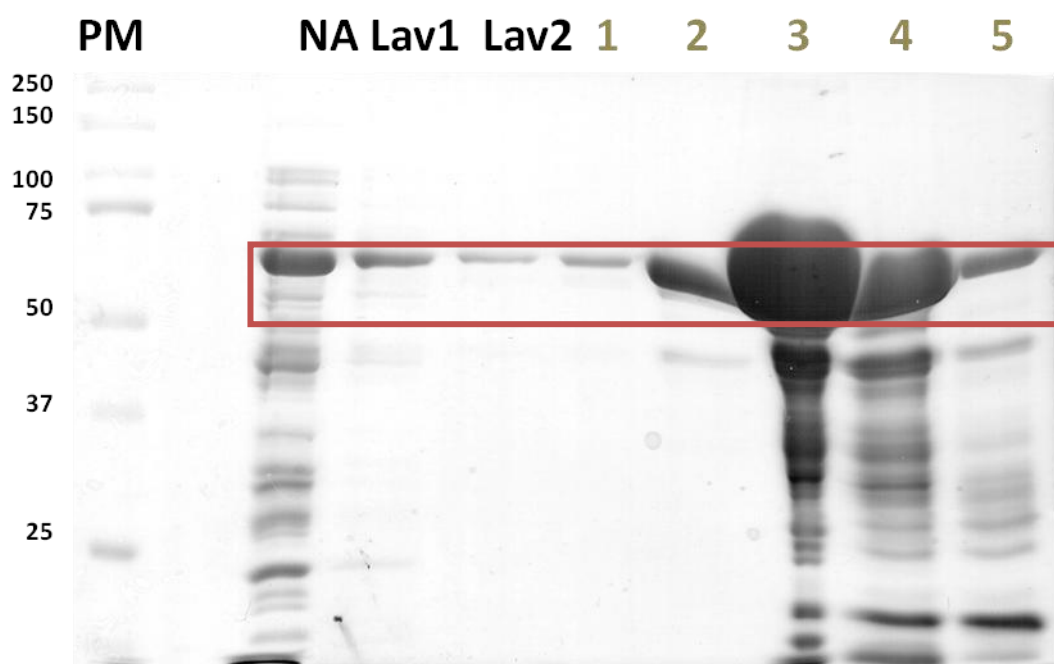


Figura 14. Purificación por afinidad a níquel: Tinción Coomasie en gel de poliacrilamida-SDS 10%. Se indican el marcador de peso molecular-PM, el extracto de proteínas de *E. coli*- EX, proteínas No Acopladas a la columna-NA, lavado1-Lav1, lavado2-Lav2 y las fracciones obtenidas por elución con Imidazol de la columna HisTrapFF(1mL).

Purificación por exclusión molecular.

La purificación por afinidad a níquel logró un importante enriquecimiento de la proteína recombinante pero con una población de proteínas de menor peso molecular. Para separar las proteínas de menor peso molecular, las fracciones previamente obtenidas en la purificación por afinidad a níquel se inyectaron a una columna de exclusión de peso molecular. En el perfil de elución es posible observar un solo pico de absorbancia (**Fig. 15**).

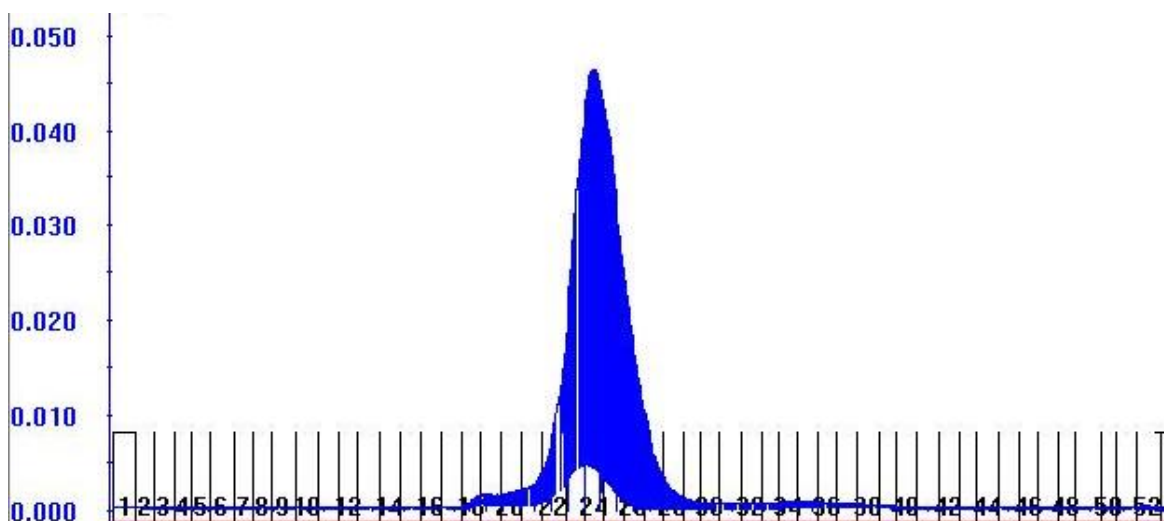


Figura 15: Purificación de Bin1-1PC12 por cromatografía de exclusión molecular. Perfil de elución de la columna Superdex 200 10/300 GL. Se indican las Unidades de Absorbancia AU, las fracciones colectadas, en azul la absorbancia de luz UV ($\lambda=280\text{nm}$).

El análisis de las fracciones obtenidas en la purificación demuestra que únicamente se diluyó la población de proteínas inyectadas a la columna (**Fig. 16**). La proteína de mayor concentración en las fracciones eluidas es la proteína de 70 kDa, sin embargo, conforme aumenta su concentración en las fracciones, también aumenta la concentración de las proteínas de menor peso molecular.

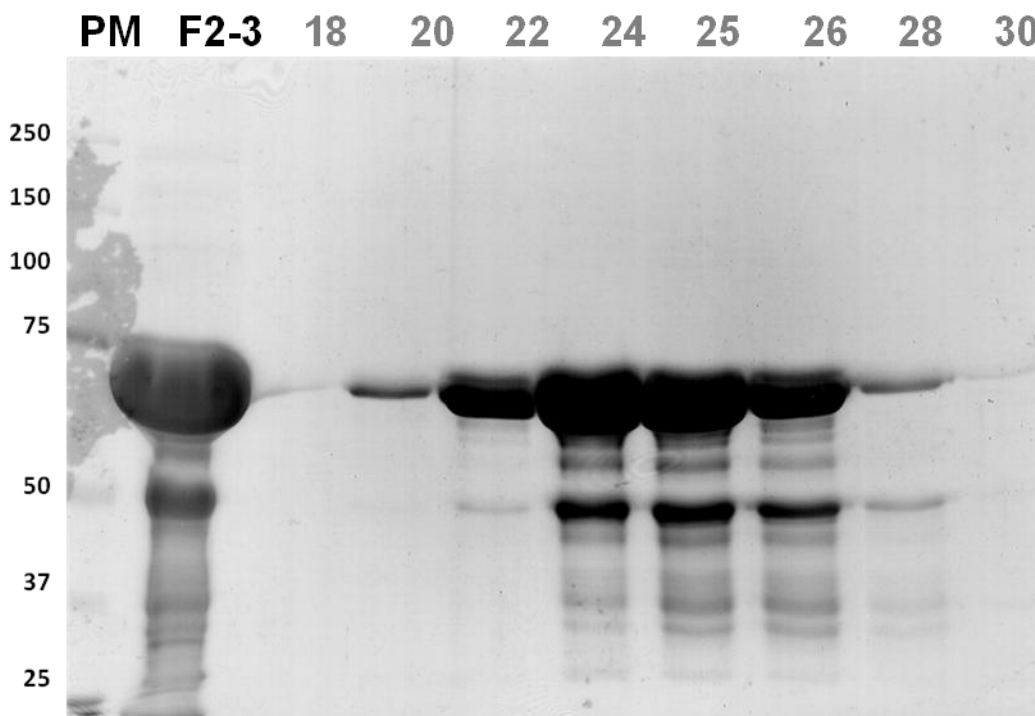


Figura 16. Purificación por exclusión de peso molecular: Tinción Coomassie en gel de poliacrilamida-SDS 10%. Se indican el marcador de peso molecular-PM, el extracto de proteínas de *E. coli*- EX y las fracciones obtenidas en la elución de la columna Superdex 200 10/300 GL.

Purificación en condiciones normales vs condiciones reductoras.

Dado que la estrategia anterior de purificación no logró separar la población de proteínas obtenidas por afinidad a níquel se utilizó otra estrategia, utilizando como primer paso de purificación la afinidad a níquel.

Purificación por afinidad a níquel.

El extracto de proteínas de bacterias transformadas e inducidas se inyectó a una columna de afinidad a níquel HisTrapFF (1 mL). Después de haber inyectado el extracto a la columna, esta se conectó al sistema de cromatografía tipo FPLC y durante el lavado con amortiguador de acoplamiento no se observó ningún aumento de absorbancia (**Fig. 17**). Al aumentar la concentración del amortiguador de elución al 50%, se observó la elución de una población de proteínas en un pico

de absorbancia aparentemente homogéneo entre las fracciones 2 y 3 (**Fig. 17**). Sin embargo, al aumentar gradualmente la concentración del amortiguador de elución hasta el 100 % no se observó un aumento de absorbancia, sólo de conductancia (**Fig. 16**).

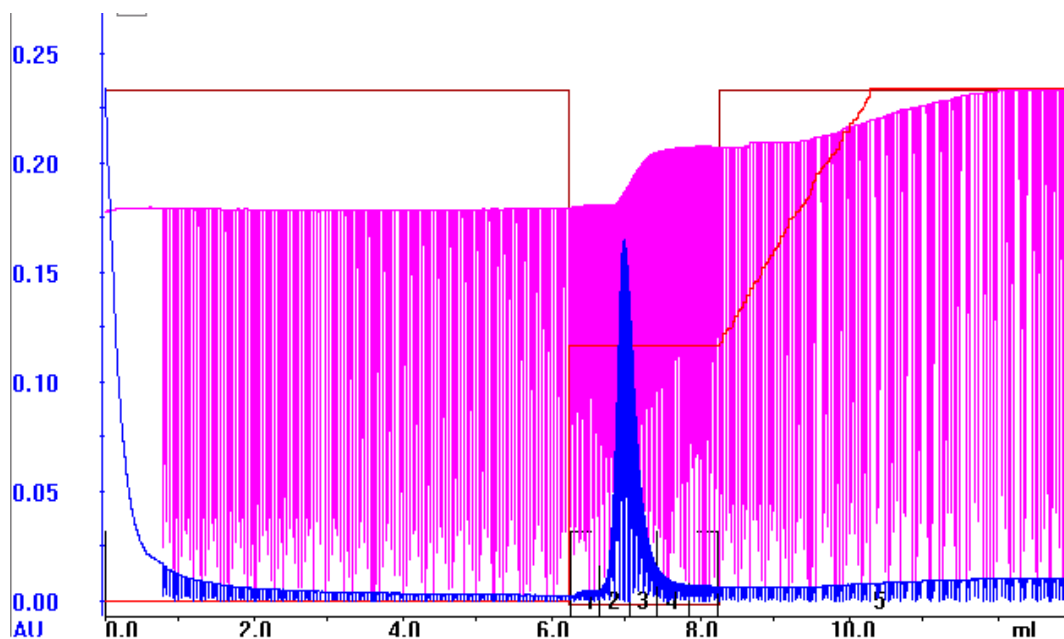


Figura 17: Purificación por afinidad a níquel de Bin1-1PC12. Cromatograma de sistema de cromatografía líquida de proteínas (FPLC). Se indican las Unidades de Absorbancia AU, las fracciones colectadas, la absorbancia de luz UV ($\lambda=280\text{nm}$) se indica en azul, la concentración de amortiguador de elución con imidazol se indica en rojo y la conductancia en rosa.

La proteína de 70 kDa que se observa en el extracto de bacterias transformadas no inducidas no se encuentra en el extracto de proteínas de bacterias sin transformar, se enriquece en el extracto de bacterias transformadas e inducidas, su presencia se ve significativamente reducida en la fracción no acoplada a la columna de níquel y se enriquece gradualmente desde la fracción 1 de elución, hasta la fracción 3, después de la cual, su presencia nuevamente disminuye hasta la fracción 5 (**Fig. 18**). Además de la proteína de 70 kDa, se observan proteínas de menor peso molecular en las fracciones de elución de la columna (**Fig. 18**).

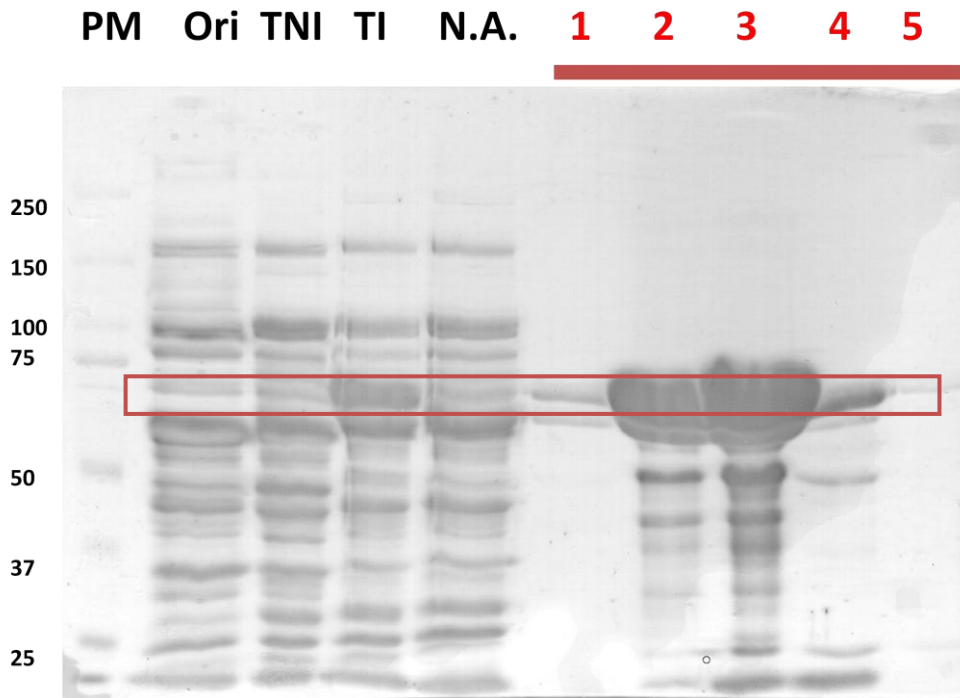


Figura 18: Purificación de Bin1-1PC12 por afinidad a níquel. Tinción Coomassie en gel de poliacrilamida-SDS (10%). Se indican los extractos de proteína cargados, bacterias sin transformar, **Ori**, bacterias transformadas no inducidas, **TNI**, bacterias transformadas e Inducidas, **TI**, fracción no acoplada a la columna, **N.A.** y el número de las fracciones eluidas de la columna.

Purificación por cromatografía de afinidad a níquel en condiciones reductoras.

Dado que anteriormente se observó la presencia de otras proteínas de menor peso molecular al eluir Bn1-1PC12 de la columna de níquel, se intentó purificar la proteína mediante cromatografía de afinidad a níquel pero en condiciones reductoras. La mitad de las fracciones 2 y 3 de la purificación anterior se dializaron contra el amortiguador con agentes reductores y se inyectaron a la columna HisTrapFF utilizando la elución escalonada descrita anteriormente. Al lavar la columna con amortiguador de acoplamiento, se obtuvo una línea basal, y al aumentar la concentración del amortiguador de elución al 50 % se observó un pico de absorbancia similar al pico de elución observado anteriormente (**Fig. 17**). Al aumentar la concentración del amortiguador de elución al 100 % no se observó un aumento en la absorbancia, únicamente en la conductancia (**Fig. 19**).

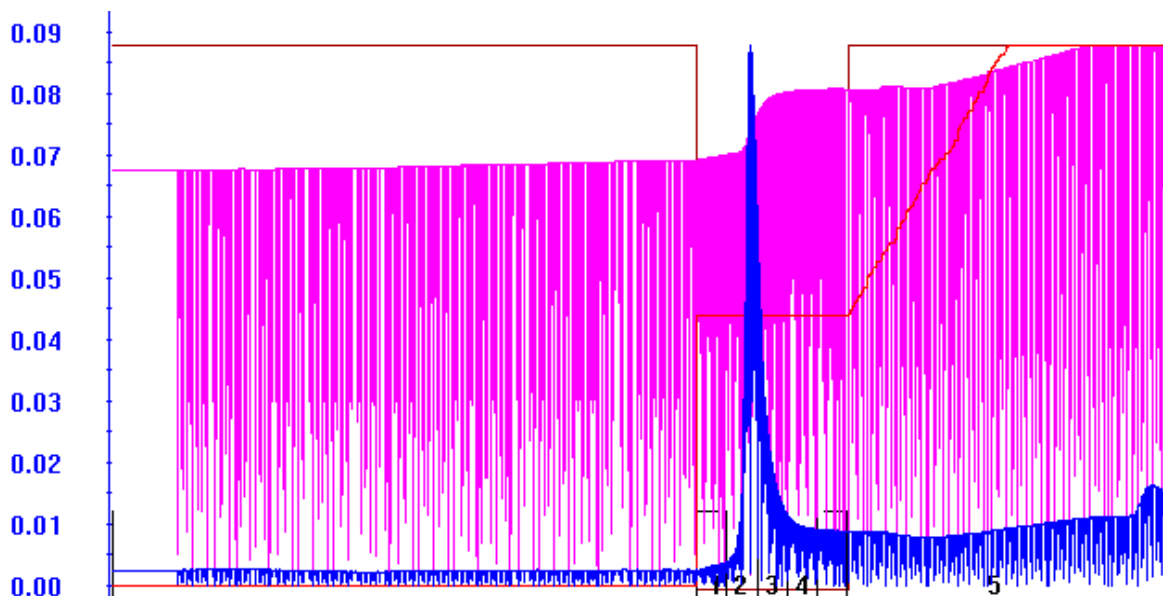


Figura 19: Purificación por afinidad a níquel de Bin1-1PC12 en condiciones reductoras. Cromatograma de sistema de cromatografía líquida de proteínas (FPLC). Se indican las Unidades de Absorbancia AU, las fracciones colectadas, la absorbancia de luz UV ($\lambda=280\text{nm}$) se indica en azul, la concentración de amortiguador de elución con imidazol se indica en rojo y la conductancia en rosa.

Es posible observar en el análisis por electroforesis desnaturizante SDS-PAGE que las fracciones eluidas de la columna de níquel consisten de la misma población de proteínas obtenidas en purificaciones sin condiciones reductoras, sin embargo, se observa la presencia de proteínas de alto pesos moleculares de más de 150 kDa (**Fig. 20**). Estas proteínas también se observan en la muestra inyectada a la columna, lo que indica que tanto el DTT como el β -mercaptoetanol a estas concentraciones favorecen la agregación de las proteínas obtenidas por cromatografía de afinidad a níquel (**Fig. 20**).

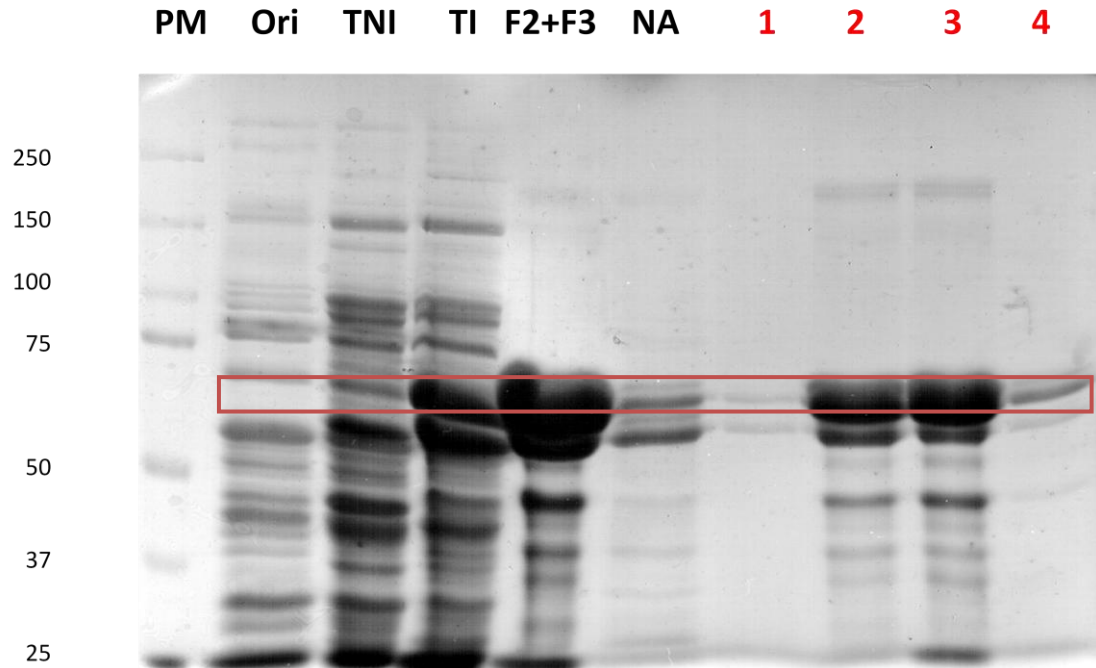


Figura 20: Purificación de Bin1-1PC12 por afinidad a níquel en condiciones reductoras. Tinción Coomassie en gel de poliacrilamida-SDS (10%). Se indican los extractos de proteína cargados, bacterias sin transformar, **Ori**, bacterias transformadas no inducidas, **TNI**, bacterias transformadas e Inducidas, **TI**, las fracciones inyectadas a la columna, **F2+F3**, la fracción no acoplada a la columna, **N.A.** y el número de las fracciones eluidas de la columna.

Purificación por exclusión de peso molecular en condiciones reductoras.

Dado que las fracciones eluidas de la columna de níquel en condiciones reductoras no sólo incluían las proteínas de menor peso molecular observadas anteriormente sino que además incluían proteínas de mayor peso molecular, se planteó la posibilidad de separar esta población de proteínas a través de una purificación por exclusión de peso molecular. Las fracciones 2 y 3 obtenidas anteriormente se inyectaron a la columna de exclusión de peso molecular Superdex 200 10/300 GL. En el perfil de elución de la columna es posible observar un pico entre las fracciones 20 y 25, con un hombro que abarca las fracciones 16 a 19. También se obtuvieron dos picos entre las fracciones 54 y 67 que no se habían observando anteriormente (**Fig. 21**).

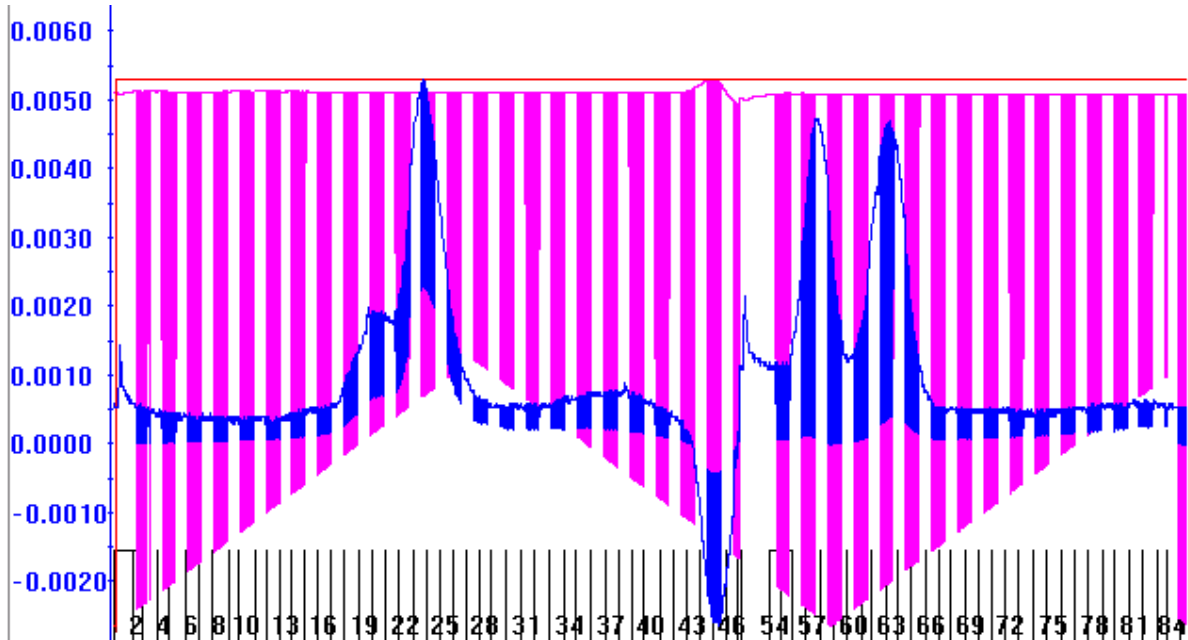


Figura 21: Purificación de Bin1-1PC12 por cromatografía de exclusión molecular. Perfil de elución FPLC. Se indican las Unidades de Absorbancia AU, las fracciones colectadas, en azul la absorbancia de luz UV ($\lambda=280$ nm).

El análisis por electroforesis desnaturizante SDS-PAGE demostró que las fracciones de los dos picos obtenidos en la purificación por exclusión de peso molecular están compuestas de la misma población de proteínas, con menor concentración de proteínas en las primeras fracciones hasta alcanzar un máximo de concentración en la fracción 23 (**Fig. 22**). Las fracciones 54 a 67, tienen muy baja concentración de proteína y no es posible observar una población definida de proteínas (**Fig. 22**).

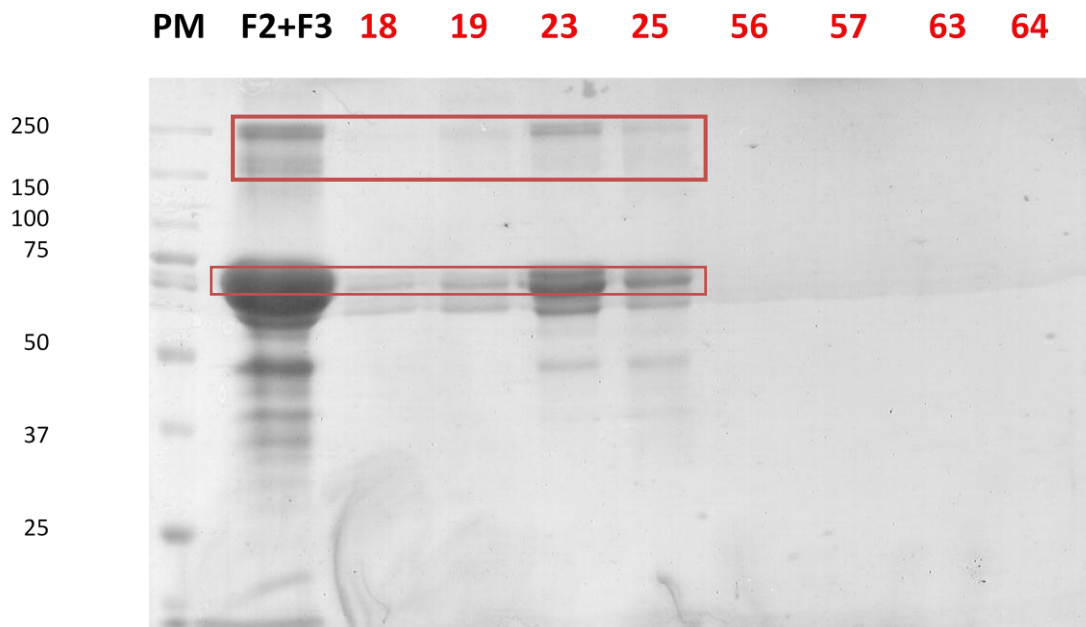


Figura 22. Purificación por exclusión de peso molecular: Tinción Coomasie gel en de poliacrilamida-SDS 10%. Se indican el marcador de peso molecular-PM, las fracciones inyectadas a la columna **F2+F3** y las fracciones obtenidas en la elución de la columna Superdex200.

Purificación por intercambio aniónico.

La otra porción de las fracciones 2 y 3 obtenidas por purificación de afinidad a níquel en condiciones no-reductoras fueron dializadas para obtener una baja concentración de sal y un pH de 8.0. Una vez que las muestras fueron dializadas, se inyectaron a una columna de intercambio aniónico, Source 15 Q 10/100 (General Electric®). Al lavar la columna con amortiguador de acoplamiento, no se observaron cambios de absorbancia, pero a la mitad del gradiente de elución, correspondiente a una concentración de 500 mM de NaCl, se observaron dos picos de absorbancia (**Fig. 23**). Al llegar a una concentración de alrededor de 1 M NaCl, se observó un pico de absorbancia en la fracción 48 de menor intensidad que los descritos anteriormente (**Fig. 23**).

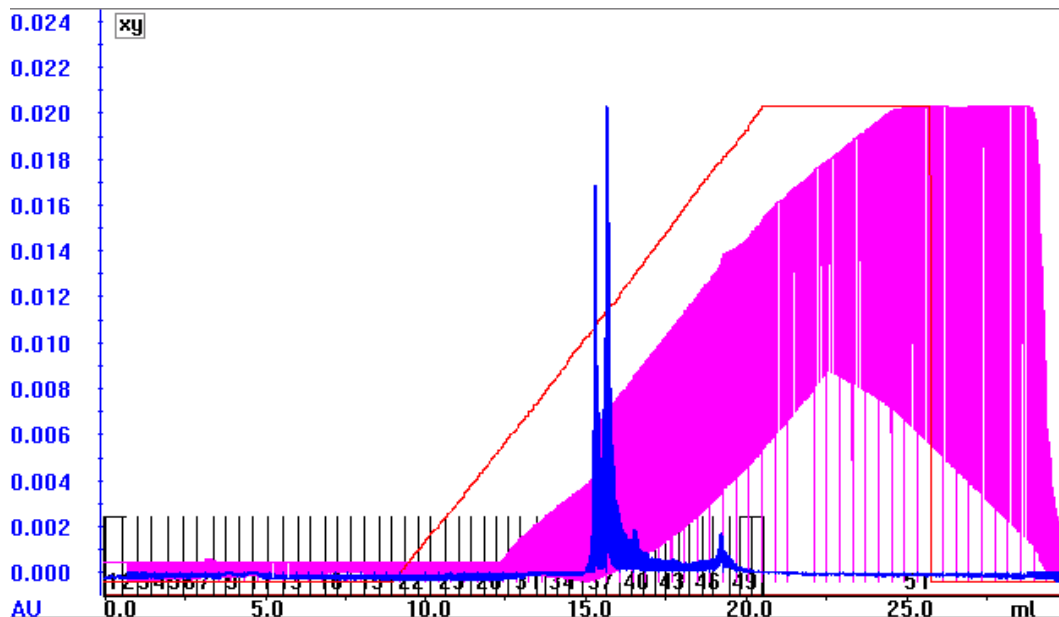


Figura 23: Purificación de Bin1-1PC12 por cromatografía de intercambio aniónico. Cromatograma de FPLC. Se indican las Unidades de Absorbancia AU, las fracciones colectadas, en azul la absorbancia de luz UV ($\lambda=280\text{nm}$), en rojo la concentración del amortiguador de elución con 1 M de NaCl y en rosa la conductancia.

El análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la purificación por intercambio aniónico demostró que las fracciones correspondientes a los dos picos de absorbancia obtenidos están enriquecidas en cuatro proteínas de pesos entre 60 y 70 kDa (**Fig. 24**). Sin embargo en la fracción 36 se observan varias proteínas de menor peso molecular, en particular una proteína de alrededor de 37 kDa, cuya concentración disminuye significativamente en la fracción 37 y deja de apreciarse en las siguientes fracciones (**Fig. 24**). En el caso de las 4 proteínas entre 70 y 60 kDa su concentración aumenta significativamente en la fracción 37 respecto a la fracción 36. Las fracciones correspondientes al final del gradiente, donde se observó un pico de absorbancia, también están compuestas de las 4 proteínas entre 60 y 70 kDa observadas a la mitad del gradiente de elución (**Fig. 23**).

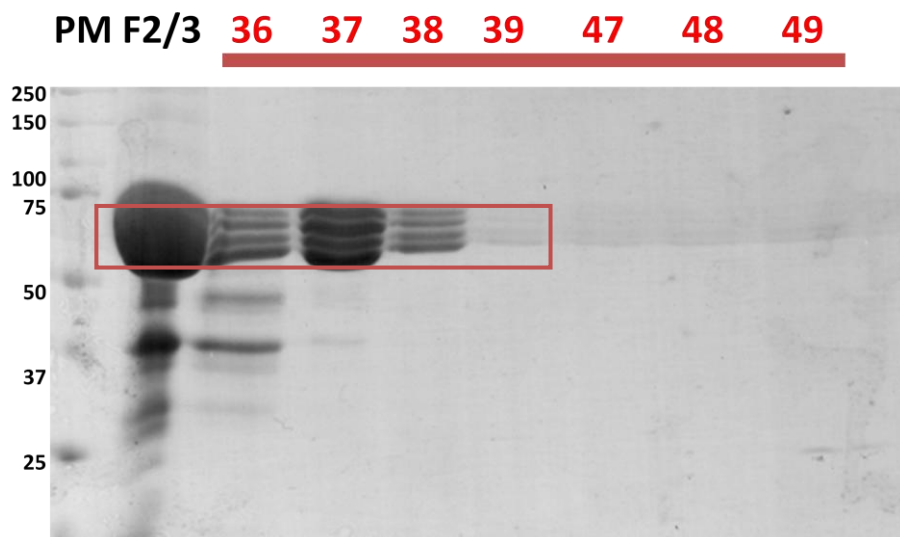


Figura 24: Purificación de Bin1-1PC12 por intercambio aniónico. Tinción Coomassie en gel de poliacrilamida-SDS (10%). Se indican los extractos de proteína cargados, F2+F3, fracciones 2 y 3 obtenidas por purificación de afinidad a níquel, y el número de las fracciones eluidas de la columna.

Protocolo final de purificación.

Purificación por afinidad a níquel.

El experimento de purificación se repitió para obtener una mayor cantidad de proteína. Se utilizaron 3 litros de cultivo para inducir la sobreexpresión de Bin1-1PC12. El extracto de proteínas de bacterias se inyectó a una columna de afinidad a níquel HisTrapFF (1 mL). Durante el lavado con amortiguador de acoplamiento no se observó ningún cambio en la señal de absorbancia. Se observó el mismo perfil de absorbancia durante la elución de proteínas de la columna que el obtenido anteriormente (**Fig. 17**), un pico de absorbancia con un máximo en la tercera fracción de elución (**Fig. 25**).

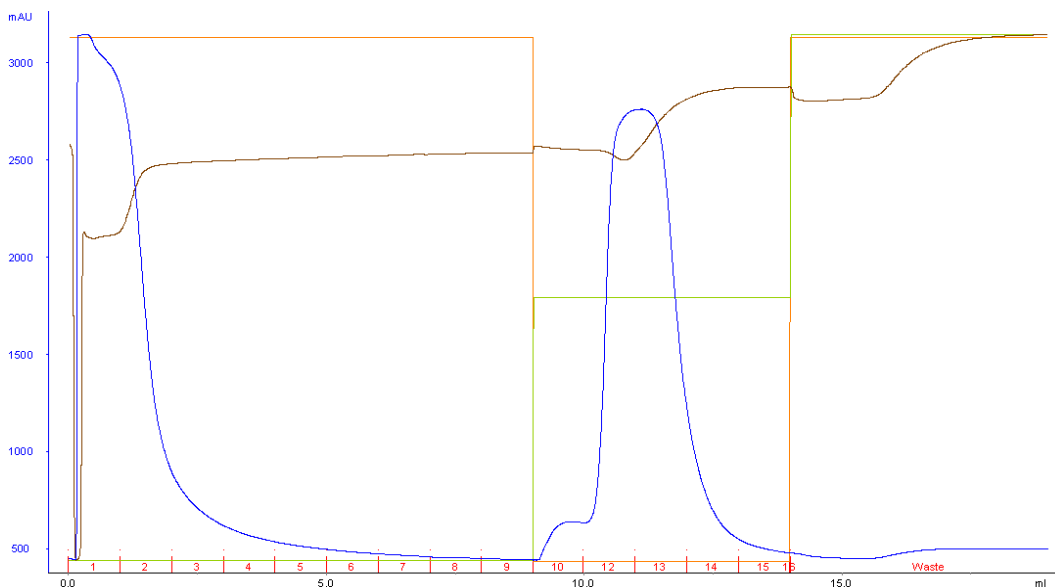


Figura 25: Purificación de Bin1-1PC12 por cromatografía de afinidad a níquel. Cromatograma de FPLC. En azul se muestra la absorbancia de luz UV ($\lambda=280\text{nm}$), en café la conductancia, en verde la concentración del amortiguador de elución con imidazol, en rojo el flujo y se indican las fracciones eluidas de la columna.

El análisis por SDS-PAGE demostró el mismo patrón de purificación obtenido anteriormente, el enriquecimiento de una proteína de 70 kDa a la mitad del gradiente de elución, pero en mayor concentración. A su vez, también es posible observar cómo disminuyó la concentración de la proteína de 70 kDa en la fracción no acoplada a la columna y el enriquecimiento de esta proteína en el extracto de proteínas de cultivos inducidos (**Fig. 26**).

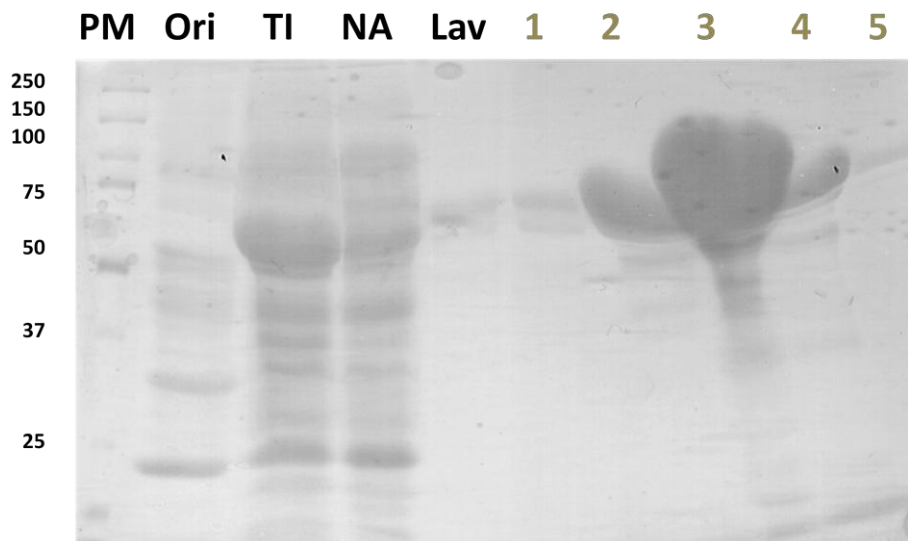


Figura 26: Purificación de Bin1-1PC12 por cromatografía de afinidad a níquel. Tinción Coomassie en gel de poliacrilamida-SDS (10%). Se indican los extractos de proteína cargados, bacterias sin transformar, **Ori**, bacterias transformadas e inducidas, **TI**, fracción no acoplada a la columna, **N.A.**, lavado de columna, **Lav**, y el número de las fracciones eluidas de la columna.

Purificación por cromatografía de intercambio aniónico.

Las fracciones 2, 3 y 4 se dializaron para obtener una baja concentración de sal y un pH de 8.0. Una vez dializadas las fracciones, se inyectaron a la columna Source 15Q. En el perfil de elución se observa la superposición de dos picos de absorbancia a la mitad del gradiente (**Fig. 27**), lo que podría significar la mezcla de dos poblaciones de proteínas. Al principio del gradiente de elución la absorbancia se mantiene estable, hasta llegar a la fracción 10, desde la cual inicia un aumento. En la fracción 16 se observa un primer pico, seguido del pico de la fracción 18, con hombros en la fracción 17 (**Fig. 27**).

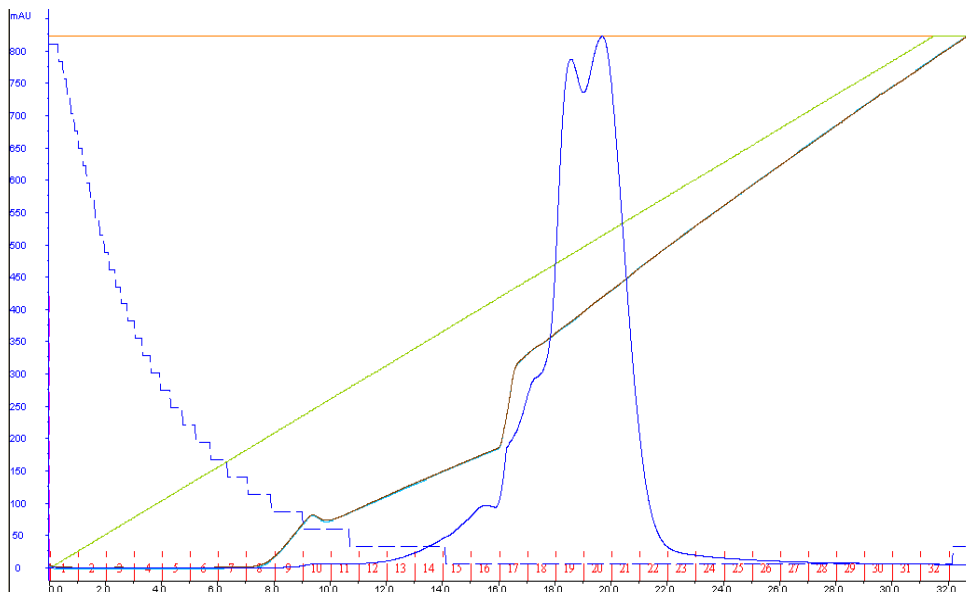


Figura 27: Purificación de Bin1-1PC12 por intercambio aniónico. Cromatograma de FPLC. En azul se muestra la absorbancia de luz UV ($\lambda=280\text{nm}$), en café la conductancia, en verde la concentración del amortiguador de elución con 1 M de NaCl, en rojo el flujo y se indican las fracciones eluidas de la columna.

El análisis por SDS-PAGE demostró que los dos picos sobrepuestos en el gradiente de elución corresponden a dos poblaciones de proteínas diferentes (**Fig. 28**). En la fracción 18 se observa la máxima concentración de una proteína de alrededor de 50 kDa, así como de proteínas de menor peso molecular. En las fracciones siguientes a la 18 se observa un decremento en la concentración de la proteína de 50 kDa y una concentración creciente de las proteínas de alrededor de 70 kDa (**Fig. 28**).

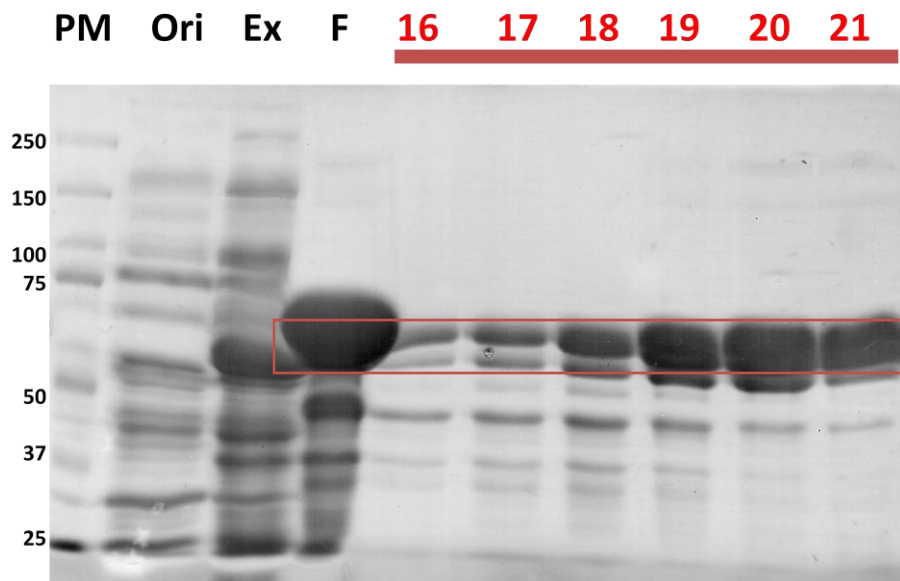


Figura 28: Purificación de Bin1-1PC12 por intercambio aniónico. Tinción Coomasie en gel de poliacrilamida-SDS (10%). Se indican los extractos de proteína cargados, bacterias sin transformar, **Ori**, extracto de bacterias transformadas e inducidas, **Ex**, fracciones obtenidas por afinidad a níquel, **F**, y el número de fracciones eluidas de la columna.

Purificación por intercambio aniónico – gradiente bajo.

Para obtener una mejor separación de las poblaciones de proteínas, se diseñó un programa de elución de intercambio aniónico con menor pendiente que los anteriores. Las fracciones obtenidas en la purificación anterior fueron diluidas de manera que se obtuviera una concentración de sales baja y un pH de 8.0. La dilución de las fracciones fue inyectada a la columna Source 15Q 10/100. En el perfil de elución se observan dos picos de absorbancia, el primer pico eluye a una menor concentración de sal, mientras que el segundo pico eluye a la mitad del gradiente de elución (**Fig. 29**). El segundo pico parece tener dos componentes, el pico simétrico que inicia en la fracción 37 y un hombro que inicia en la fracción 40 (**Fig. 29**).

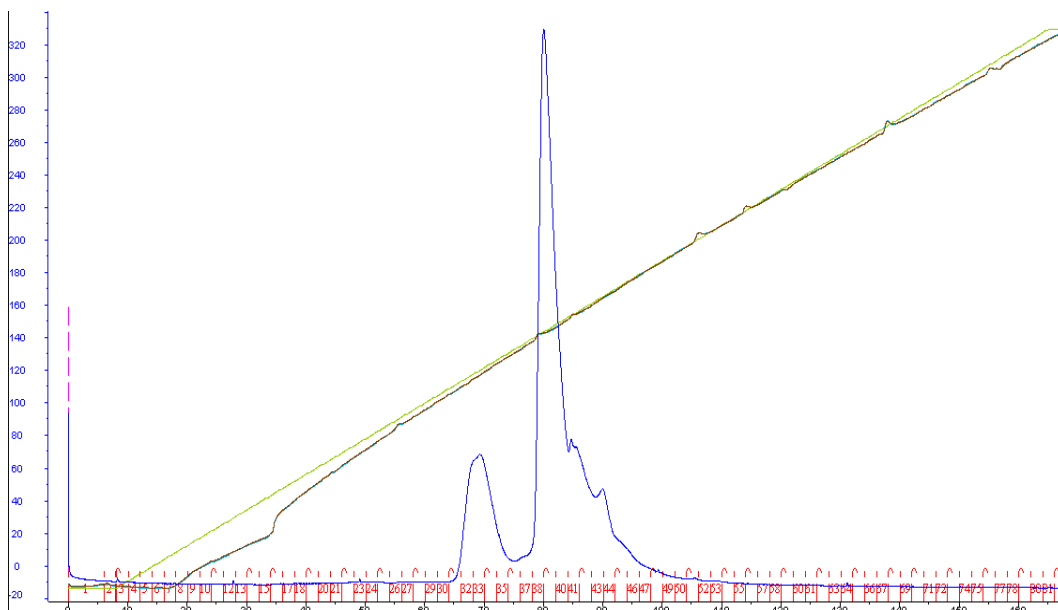


Figura 29: Purificación de Bin1-1PC12 por intercambio aniónico. Cromatograma de sistema de cromatografía líquida de proteínas (FPLC). En azul se muestra la absorbancia de luz UV ($\lambda=280\text{nm}$), en café la conductancia, en verde la concentración del amortiguador de elución con 1 M de NaCl, en rojo el flujo y se indican las fracciones eluidas de la columna.

El análisis por SDS-PAGE demostró que las proteínas de los picos sobrepuestos en la purificación anterior se lograron separar. El primer pico de absorbancia del gradiente corresponde a una proteína de 50 kDa y proteínas de menor peso molecular, mientras que el segundo pico corresponde a 3 proteínas de entre 70 y 60 kDa (**Fig. 30**). El enriquecimiento de estas proteínas es importante, pues el efecto de inducción de sobreexpresión de Bin1-1PC12 enriquece una proteína de alrededor de 70 kDa comparado con cultivos en los que no se induce la sobreexpresión (**Fig. 30**). A su vez, si se compara la fracción de purificación por afinidad a níquel, se logró eliminar las proteínas contaminantes de bajo peso molecular.

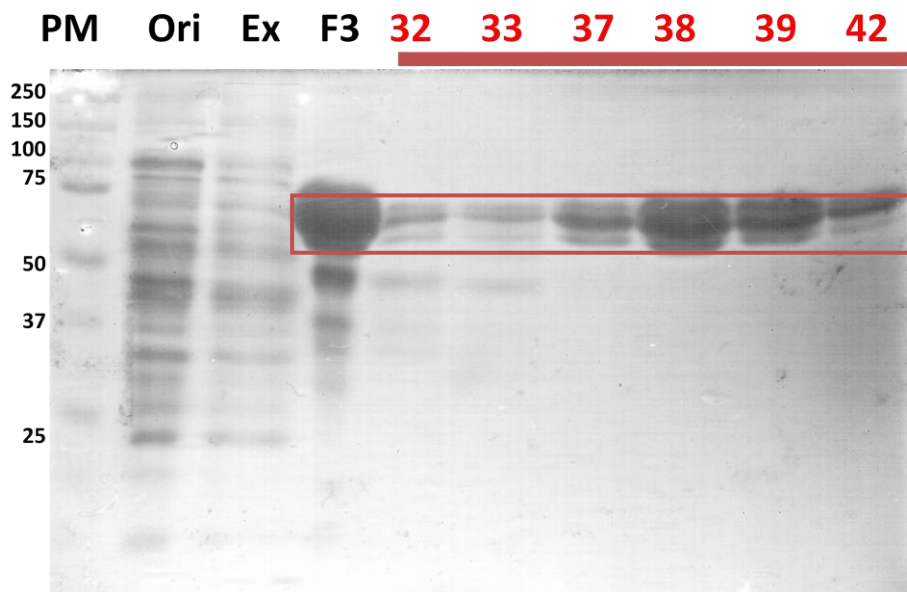


Figura 30: Purificación de Bin1-1PC12 por intercambio aniónico. Tinción Coomasie en gel de poliacrilamida-SDS (10%). Se indican los extractos de proteína cargados, bacterias sin transformar, **Ori**, extracto de bacterias transformadas e inducidas, **Ex**, fracciones obtenidas por afinidad a níquel, **F**, y el número de fracciones eluidas de la columna.

Inmunodetección de Bin1/Anfifisina II.

Para determinar si las cuatro bandas presentes en las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico correspondían a la proteína Bin1-1PC12, se realizó un inmunoensayo tipo western utilizando fracciones correspondientes a diferentes pasos de la purificación. El anticuerpo policlonal utilizado detecta como epítotope una región del exón 13 de Bin1/Anfifisina II. En el inmunoensayo es posible determinar la ausencia de la proteína Bin1-1PC12 en el extracto de bacterias sin transformar (**Fig. 31**), señales correspondientes a diferentes pesos moleculares en el extracto de bacterias transformadas con el vector pCRT7-NTTOPO-Bin1-1PC12, la eliminación de proteínas de menor tamaño en las fracciones correspondientes a la purificación por afinidad a níquel y la única presencia de cuatro bandas en las fracciones obtenidas por intercambio aniónico.

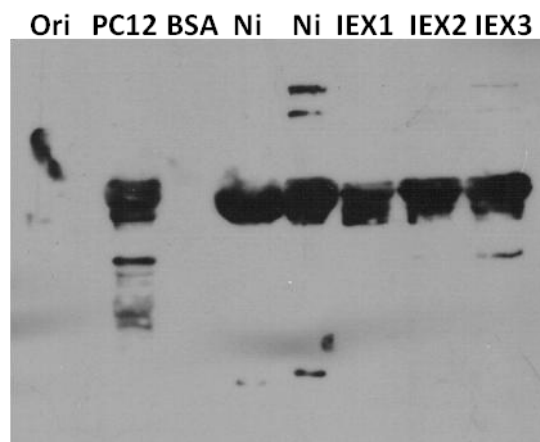


Figura 31: Inmunodetección de Anfifisina II en fracciones de purificación. Se indican los extractos de bacterias Origami B sin transformar, **Ori**, de bacterias transformadas con el vector pCRT7/NT-TOPO, **PC12**, albúmina sérica bovina, **BSA**, las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad a níquel, **Ni**, las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico, **IEX1**, **IEX2**, e **IEX3**.

6 Discusión

Nuestro protocolo de purificación de Bin1-1PC12 consistió en un primer paso cromatográfico de afinidad a níquel, seguido de una purificación por intercambio aniónico. La obtención de la proteína recombinante Bin1-1PC12 con contaminantes de menor peso molecular fue un resultado consistente en los experimentos de purificación por cromatografía de afinidad a níquel, tanto en purificaciones con eluciones de gradiente (**Fig. 12**) y en purificaciones con eluciones escalonadas (**Figs. 14, 18, 20, 27**). Éstos resultados probablemente se deban tanto a uniones inespecíficas entre la proteína recombinante Bin1-1PC12 y proteínas endógenas de *E. coli* como a uniones entre la matriz de la columna de níquel y las proteínas endógenas de *E. coli*. Al intentar aislar la proteína recombinante Bin1-1PC12 a través de cromatografía de exclusión molecular (**Fig. 16**) no fue posible separarla de las proteínas contaminantes de menor peso molecular, lo que podría indicar la presencia de interacciones entre estas poblaciones de proteínas, o bien, que la resolución de la columna de exclusión molecular Superdex 200 10/300 GL no fue adecuada. Otra estrategia utilizada para separar Bin1-1PC12 de las proteínas contaminantes fue la realización de purificaciones en condiciones reductoras. Sin embargo, ni la purificación por afinidad a níquel (**Fig. 20**), ni la purificación por exclusión de peso molecular (**Fig. 22**) lograron separar las proteínas contaminantes de Bin1-1PC12 (**Fig. 22**).

La siguiente estrategia utilizada inició con la purificación por afinidad a níquel seguida de purificación por intercambio aniónico. Esta estrategia se diseñó para primero obtener la mayor cantidad de Bin1-1PC12 en pocas fracciones, a través de la afinidad a níquel, y posteriormente separar las proteínas contaminantes a través de la disrupción de interacciones electrostáticas. El primer resultado obtenido demostró que se había logrado separar una porción de los contaminantes (**Fig. 24**), sin embargo, aún se obtuvieron fracciones de Bin1-1PC12 con contaminantes de menor peso molecular. El protocolo se reajustó y el intercambio aniónico se realizó con un gradiente de NaCl con menor pendiente y con mayor flujo. El reajuste de este protocolo logró obtener fracciones en las que

se observaban las proteínas contaminantes y en fracciones posteriores Bin1-1PC12 (**Fig. 30**). Cabe destacar que las fracciones 38 y posteriores efectivamente están enriquecidas en una proteína de alrededor de 70 kDa, sin embargo se observan 3 proteínas en total entre los 60 y 70 kDa. El análisis por inmunoensayo tipo western confirmó la presencia de la proteína Bin1-1PC12 en las fracciones obtenidas por intercambio aniónico (**Fig. 31**). Esto podría indicar que se está observando una degradación de la proteína, la cual inicia desde el extremo amino pues el anticuerpo SC-1375 reconoce el exón 13.

Hasta ahora únicamente se ha dilucidado la estructura cristalográfica del dominio BAR de Anfifisina II/Bin1 (28) y la estructura de la hélice 0 a través de resonancia magnética nuclear (29). Sin embargo, no se ha analizado estructuralmente a Anfifisina II/Bin1 completa. El análisis de dominios de proteínas permite obtener información estructural importante, sin embargo esta información es incompleta pues carece del contexto en el que normalmente se encuentra un dominio proteico. La obtención de la isoforma Bin1-1PC12 representa un primer paso en el entendimiento de la importancia del dominio BAR en la función de Anfifisina II/Bin1, en particular en una isoforma de origen canceroso. También representa un primer paso en la comparación estructural de un dominio BAR clásico y el dominio BAR de la isoforma Bin1-10F7.

7 Conclusiones:

- ❖ La sobreexpresión de la proteína Bin1-1PC12 clonada en el vector pCRT7/NT-TOPO se logró en volúmenes de 500 mL de medio SOB a una concentración de 100 μ M de IPTG.
- ❖ Se obtuvo un protocolo de purificación de la proteína recombinante Bin1-1PC12 a través de dos pasos cromatográficos: afinidad a níquel e intercambio aniónico.
- ❖ La proteína recombinante Bin1-1PC12 se podrá utilizar para subsecuentes estudios funcionales.

8 Perspectivas.

Anfifisina II/Bin1 fue originalmente descrita como una proteína supresora de tumores (21), sin embargo estudios posteriores demostraron la participación de diferentes isoformas del gen en el proceso de endocitosis. Estas isoformas normalmente son de tejido neuronal e incluyen sitios de unión a clatrina, que se encuentran en los exones 12B y 12C la presencia del exón 12A en isoformas ubicuas, resulta en la pérdida de la capacidad del gen de suprimir tumores y lleva a una localización citosólica (36). A pesar de contar con una localización citosólica las isoformas con inserción aberrante del exón 12A tienen dominios BAR, lo que significa que retienen su capacidad de unión a la membrana. Análisis estructurales de esta isoforma que puedan determinar la presencia de estructura secundaria tipo hélice alfa en presencia de liposomas de diferentes diámetros y composición, tales como el dicroísmo circular, determinarán si el exón 12A tiene algún efecto sobre la capacidad del dominio BAR de unión a la membrana. A su vez, el dicroísmo circular permitiría determinar si la ausencia del parche de residuos positivos entre las hélices 2 y 3 del dominio BAR permite su estructuración en hélices alfa y si es indispensable para la unión a membranas. Nuestro equipo de trabajo tiene amplia experiencia en el trabajo con proteínas que normalmente se encuentran en interfases entre medios acuosos y lipídicos, las apolipoproteínas y previamente se ha analizado su comportamiento en interfases entre ambientes hidrofílicos e hidrofóbicos en isothermas de Langmuir (55). Esta técnica nos permitirá analizar el comportamiento de las isoformas Bin1-10F7 y Bin1-1PC12 en interfases entre medios hidrofílicos e hidrofóbicos y comenzar a vislumbrar las diferencias entre sus capacidades de interacción con superficies hidrofóbicas, así como la membrana.

Si la ausencia del exón 6 no altera la capacidad de unión a la membrana esto significaría que la hélice 0 es más importante para este proceso que el moldeado por el dominio BAR. Esto sería interesante pues existen estudios que contradicen la teoría que afirma que el dominio BAR detecta curvatura membranal y le confieren esta capacidad a la hélice 0. A su vez esto apoyaría la propuesta que

afirma que la rigidez estructural del dominio BAR es un pre-requisito para poder deformar membranas (56), ya que los residuos codificados por el exón 6 se encuentran en una región del dominio que incluye únicamente dos hélices y la región central del dímero incluye seis hélices alfa que interactúan a través de contactos electrostáticos (28).

9. Referencias:

1. Lane N, Martin WF. The Origin of Membrane Bioenergetics. *Cell* (2012): 1406-1416.
2. Singer SJ, Nicholson GL. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* (1972): 720-730
3. Janmey PA, Kinnunen PKJ. Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends in Cell Biol* (2006) 16: 538-546.
4. Saffman PG, Delbrück M. Brownian motion in biological membranes. *PNAS* (1975) 72: 3111-3113.
5. Karnovsky MJ, Kleinfeld AM, Hoover RL, Klausner RD. The concept of lipid domains in membranes. *J Cell Biol* (1982): 94: 1-6.
6. Jacobson K, Mouritsen OG, Anderson GW. Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol* (2007) 9: 7-14
7. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* (1997) 387: 569-572.
8. Zimmerberg J, Kozlov MM. How proteins produce cellular membrane curvature.(2006) *Nat rev Mol cell biol* 7: 9-19
9. Lipowsky R. The morphology of lipid membranes. *Curr Opin in struc biol* 1995 5 531-540.
10. Ulmschneider MB, Sansom MS, Di Nola A. Properties of integral membrane protein structures: derivation of an implicit membrane potential. *Proteins* (2005) 59: 252-265.
11. von Heijne G. Membrane protein structure prediction: Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* (1992) 225: 487-494.
12. Wimley WC. The versatile β -barrel membrane protein. *Curr Opin Struct Biol* (2003) 13: 404-411.
13. Marguet D, Lenne PF, Rigneault H, He HT. Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *EMBO* (2006) 25: 3446-3457.
14. Munro S. Organelle identity and the targeting of peripheral membrane proteins. *Curr Opin Cell Biol* (2002) 14: 506-514.
15. Moravcevic K, Oxley CL, Lemmon MA. Conditional Peripheral Membrane Proteins: Facing up to Limited Specificity. *Structure* (2012) 20: 15-27.

16. Suetsugu S, Toyooka K, Senju Y. Subcellular membrane curvature mediated by the BAR domain superfamily proteins. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 21(2010) 340-349.
17. Prendergast GC, Muller AJ, Ramalingam A, Chang MY. BAR the door: Cancer suppression by amphiphysin-like genes. *Biochim Biophys Acta* (2009) 1795: 25-36.
18. Lichte B, Veh RW, Meyer HE, Kilimann MW. Amphiphysin, a novel protein associated with synaptic vesicles. *EMBO* (1992) 11: 2521-2530.
19. Ren G, Vajjhala P, Lee JS, Winsor B, Munn AL. The BAR Domain Proteins: Molding Membranes in Fission, Fusion, and Phagy. *Microbiol Mol Biol R* (2006) 70: 37-120
20. Negorev D, Riethman H, Wechsler-Reya R, Sakamuro D, Prendergast GC, Simon D. The Bin1 Gene Localizes to Human Chromosome 2q14 by PCR Analysis of Somatic Cell Hybrids and Fluorescence *in Situ* Hybridization. *Genomics* (1996) 33: 329-331.
21. Sakamuro D, Katherine JE, Wchsler-Reya R, Prendergast GC. BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nat. Genet.* 14 (1996)
22. Kadlec L, Pendergast AM, The amphiphysin-like protein 1 (ALP1) interacts functionally with the cABL tyrosine kinase and may play a role in cytoskeletal regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1997) 94: 12390-12395.
23. Butler MH, David C, Ochoa G, Freyberg Z, Daniell L, Grabs D, Cremona O, De Camilli P. AmphiphysinIII (SH3P9; BIN1), a Member of the Amphiphysin/Rvs Family, Is Concentrated in the Cortical Cytomatrix of Axon Initial Segments and Nodes of Ranvier in Brain and around T Tubules in Skeletal Muscle. *J. Cell Biol.* (1997) 137: 1335-1367.
24. Ramjaun AR, Micheva KD, Bouchelet I, McPherson PS. Identification and Characterization of a Nerve Terminal-enriched Amphiphysin Isoform. *J Biol. Chem.* (1997) 272: 16700-16706.
25. Tsutsui K, Maeda Y, Tsutsui K, Seki S, Tokunaga A. cDNA Cloning of a Novel Amphiphysin Isoform and Tissue-Specific Expression of Its Multiple Splice Variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1997) 236: 178-183.
26. Wigge P, Köhler K, Vallis Y, Doyle CA Owen D, Hunt SP, McMahon HT. Amphiphysin Heterodimers: Potential Role in Clathrin-mediated Endocytosis. *Mol. Biol. Cell* (1997) 8: 2003-2015.
27. Löw C, Weininger U, Lee H, Schweimer K, Neundorf I, Beck-Sickinger AG, Pastor RW, Balbach J. Structure and Dynamics of Helix-0 of the N-BAR Domain in Lipid Micelles and Bilayers. *Biophys J* (2008) 95: 4315-4323.
28. Casal E, Federici L, Zhang W, Fernandez-Recio J, Priego EM, Nunez-Miguel R, DuHadaway JB, Prendergast GC, Luisi BF, Laue ED. The Crystal Structure of the BAR domain from Human Bin1/Amphiphysin II and its implications for molecular recognition. *Biochemistry* (2006) 45:43 12917-12928.

29. Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJG, Evans PR, McMahon HT, BAR Domains as Sensors of Membrane Curvature: The Amphiphysin BAR Structure. *Science* 303 (2004) 495-499
30. Ramjaun AR, Philie J, de Heuvel E, McPherson PS, The N Terminus of AmphiphysinII mediates dimerization and plasma membrane targeting *JBC* 274(1999) 19785-19791
31. Tarricone C, Xiao B, Justin N, Walker PA, Rittinger K, Gamblin SJ, Smerdon SJ. The structural basis of Arfaptin-mediated cross-talk between Rac and arf signaling pathways. *Nature* (2001) 411: 215-219.
32. Elliot K, Sakamuro D, Basu A, Du W, Wunner W, Staller P, Gaubatz S, Zhang H, Prochownik E, Eilers M, Prendergast GC. Bin1 functionally interacts with Myc and inhibits cell proliferation via multiple mechanisms. *Oncogene* (1999) 18: 3564-3573.
33. Lee E, Marcucci M, Daniell L, Pypaert M, Weisz OA, Ochoa GC, Farsad K, Wenk MR, De Camilli P. Amphiphysin 2 (Bin1) and T-Tubule Biogenesis in Muscle. *Science* (2002) 297: 1193-1196.
34. Wechsler-Reya RJ, Elliott KJ, Prendergast GC. A Role for the Putative Tumor Suppressor Bin1 in Muscle Cell Differentiation. *Mol Cell Biol* (1998). 18: 566-575.
35. Ramjaun AR, McPherson P. Multiple Amphiphysin II Splice Variants Display Differential Clathrin –Binding Sites. *J Neurochem* (1998) 70:2369-2376.
36. DuHadaway J, Du W, Herlyn M, Rodeck U, Prendergast GC. Mechanism for elimination of a tumor suppressor: Aberrant splicing of a brain-specific exon causes loss of function of Bin1 in melanoma.
37. Routhier, E. L., P. S. Donover, and G. C. Prendergast. 2003. hob1, the fission yeast homolog of Bin1, is dispensable for endocytosis or actin organization, but required for the response to starvation or genotoxic stress. *Oncogene* 22:637–648
38. Patel JH, Loboda AP, Showe MK, Showe LC, McMahon SB. Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. *Nature* (2004) 4: 562-568
39. Blackwood, E. M. & Eisenman, R. N. Max: a helix-loophelix zipper protein that forms a sequence-specific DNA binding complex with Myc. *Science* 251, 1211–1217 (1991)
40. Cassimere EK, Pyndiah S, Sakamuro D. The c-Myc-interacting proapoptotic tumor suppressor BIN1 is a transcriptional target for E2F1 in response to DNA damage. *Cell death diff* (2009) 16: 1641-1653
41. Pyndiah S, Tanida S, Ahmed KM, Cassimere EK, Choe C, Sakamuro D. c-Myc Suppresses BIN1 to release Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1: A mechanism by which cancer cells acquire cisplatin resistance. *Science Sig.* (2012) 166
42. Kim KC, Kim TS, Kang KH, Choi KH. Amphiphysin IIb-1, a novel splicing variant of p115, regulates p73beta function through protein-protein interactions. *Oncogene* (2001) 46: 6689-6699.

43. Pineda-Lucena A, How CSW, Mao DY, Sheng Y, Laister RC, Muhandiram R, Lu Y, Seet BT, Katz S, Szyperski T, Penn LZ, Arrowsmith CH. A structure-based model of the c-Myc/Bin1 Protein interaction shows alternative splicing of Bin1 and c-Myc Phosphorylation are key binding determinants. *J Mol Biol* (2005) 351: 182-194
44. Damián-Zamacona S. Expresión de isoformas de Amfifisina II/Bin1 como moléculas adaptadoras en el proceso de endocitosis mediada por receptor. *FES Iztacala- UNAM* (2005)
45. Integrated Center for Structure and Function Innovation, Israel Structural Proteomics Center, Joint Center for Structural Genomics, Midwest Center for Structural Genomics, New York Structural GenomiX Research Center for Structural Genomics, Northeast Structural Genomics Consortium, Oxford Protein Production Facility, Protein Sample Production Facility, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative & SPINE2-Complexes. Protein production and purification. *Nature Methods*, 5(2). doi: 10.1038/NMETH.F.202
46. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.* 166 (1983) 557-580.
47. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* (1979) 7: 1513-1523.
48. Pouwels PH, van Rotterdam J, Cohen JA. Structure of the Replicative Form of Bacteriophage ϕ X DNA. *J Mol Biol* (1969) 40: 379-390.
49. Dong X, Stohard P, Forsythe IJ, Wishart DS. PlasMapper: a web server for drawing and autoannotating plasmid maps. *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) W660-4.
50. Silverstone AE, Arditti RR, Magasanik B. Catabolite-Insensitive Revertants of *Lac* Promoter Mutants. *PNAS* 66:3 (1970) 773-779.
51. Fuller F. A family of cloning vectors containing the *lacUV5* promoter. *Gene* 19 (1982) 43-54.
52. Studier FW, Moffat BA. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. *J. Mol. Biol.* 189 (1986) 113-130.
53. Studier FW. Use of Bacteriophage T7 Lysozyme to Improve an Inducible T7 Expression System. *J Mol Biol* (1991) 219: 37-44.
54. Carson M, Johnson DH, McDonald h, Brouillette C, DeLucas LJ. His-tag impact on structure. *Acta Crystallograph D* 63: 295-301.
55. Bolaños VM, Mas-Oliva J, Ramos S, Castillo R. Phase transitions in monolayers of Human Apolipoprotein C-I. *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 6236-6242.
56. Qualmann B, Koch D, Kessels MM. Let's go bananas: revisiting the endocytic BAR code. *EMBO* (2011) 30: 3501-1515.