

Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



“Fragmentos de KCTD5 como inhibidores de la proliferación y migración celular en modelo de melanoma”

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

Héctor Matías Calderón Bravo

Profesor Patrocinante:
Dr. Christian A. M. Wilson
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Director de memoria:
Dr. Óscar Cerda Arancibia
Programa de Biología Celular y
Molecular
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Santiago, Chile
2020

FINANCIAMIENTO

Esta memoria de Título fue financiada por el Proyecto Fondecyt 1160518 y realizada en el Laboratorio de Proteómica Funcional del Dr. Oscar Alejandro Cerda Arancibia, Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	VII
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Seres vivos y proteínas.....	1
1.2 Ubiquitinación y sus funciones	1
1.3 Las Cullin E3 ligasa	3
1.4 La Familia KCTD.....	4
1.5 KCTD5, un interesante miembro de la familia KCTD.....	7
1.6 Dominios de interés en KCTD5	13
1.7 Nuevos enfoques en la farmacología y aplicación de péptidos permeables	14
2. HIPÓTESIS	17
3. OBJETIVO	17
3.1 Objetivo general	17
3.2 Objetivos específicos:	17
4. METODOLOGÍA	18
4.1 Materiales	18
4.2 Clonamiento de los péptidos	19
4.3 Transfección transitoria.....	22
4.4 Electrotransferencia de proteínas a nitrocelulosa e inmunorevelado	23
4.5 Inmunofluorescencia.....	24
4.6 Ensayo Clonogénico	25

4.7	Ensayo de migración en cámara Transwell.....	25
4.8	Estadística	26
5.	RESULTADOS.....	27
5.1	Generar fragmentos de KCTD5 fusionados a EGFP y determinar la localización subcelular de los péptidos con el fin de compararlos con la localización de la proteína nativa.....	27
5.2	Expresión de los péptidos líneas Celulares	29
5.3	Localización subcelular de péptidos basados en KCTD5.....	31
5.4	Determinar los efectos funcionales de los péptidos en procesos biológicos como la proliferación y migración de células de melanoma	33
5.5	Ensayo Clonogénico	33
5.6	Ensayo Transwell	34
6.	DISCUSIÓN.....	36
6.1	Diseño de fragmentos de KCTD5	36
6.2	Fragmentos de KCTD5 y sus expresiones en las distintas líneas celulares.....	38
6.3	Localización subcelular de KCTD5 y sus fragmentos.....	40
6.4	Fragmentos de KCTD5: Influencia en proliferación de células de melanoma.....	41
6.5	Fragmentos de KCTD5: Influencia en migración de células de melanoma.....	43
6.6	Proyecciones.....	43
7.	CONCLUSIÓN.....	45
	BIBLIOGRAFÍA	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de ubiquitinación y sus funciones.....	2
Figura 2. Cullin 3, funciones y participación de la Ubiquitinación.....	3
Figura 3. Árbol filogenético de la familia KCTD.. ..	4
Figura 4. KCTD5 interacciona con Cul3.....	6
Figura 5. KCTD5: Dominios y estructura cristalográfica.	8
Figura 6. Ubicación Subcelular de KCTD5 y sus fragmentos.	9
Figura 7. KCTD5 interacciona con TRPM4 y afecta a su corriente.....	10
Figura 8. Interferentes de KCTD5 afectan al área de Adhesiones Focales	11
Figura 9. Transcritos de TRPM4 y KCTD5 son elevados en muestras clínicas de cáncer de mama.	12
Figura 10. KCTD5 aumenta la contractibilidad y migración celular.	13
Figura 11. Esquema de péptidos propuestos.	20
Figura 12. Metodología Gibson Assembly.....	21
Figura 13. Esquema de metodología Western Blott.....	24
Figura 14 Esquema de Ensayo de migración Transwell.....	26
Figura 15. Producto PCR correspondiente a los dominios de KCTD5.	28
Figura 16. Expresión de fragmentos de KCTD5 en HEK293, B16-F10 y COS7	29

Figura 17. Expresión relativa de fragmentos de KCTD5 en HEK293.	30
Figura 18. Péptidos basados en KCTD5 y su distribución celular	32
Figura 19. Péptidos Basados en KCTD5 no afectan significativamente la sobrevida de células en modelo B16-F10	34
Figura 20. Péptidos basados en KCTD5 no afectan a la migración de células B16-F10	35

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de estrategias farmacológicas.	15
Tabla 2 Partidores diseñados para el sistema comercial Gibson Assambly.	18
Tabla 3 Protocolo de PCR para obtención de fragmentos de KCTD5 y linealización de EGFP-N1 y EGFP-C1.....	22

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a cada persona que hizo posible este trabajo, a los que estuvieron y ya no están, pero por sobre todo a la gente que siempre estuvo.

A mi familia y su incondicional apoyo.

H.C.

ABREVIATURAS

ARN: Ácido Ribonucleico.

BTB: *broad-complex, tramtrack, and brick à brac*.

pb: Pares de Bases.

Cul3: Cullin 3.

DNA: Ácido desoxiribonucleico (del inglés *deoxyribonucleic acid*).

DPBS: Amortiguador Fosfato Salino de Dulbecco (del inglés *Dulbecco phosphatum buffer saline*).

EGFP: Proteína verde fluorescente mejorada (del inglés *enhanced green fluorescent protein*).

FBS: Suero Fetal Bovino (del inglés *fetal bovine serum*).

GABA: Ácido gamma-aminobutírico.

IB: Inmuno Blot.

IL-2: Interleuquina 2.

Inc: Insomniac.

KCTD: Dominio de tetramerización de Canales de Potasio (del inglés *potassium (K⁺) channel tetramerization domain*).

kDa: Kilo Dalton.

LRSAM1: proteína rica en repetidos de leucina y motivos alfa estériles (del inglés *leucine rich repeat and sterile alpha motif containing 1*).

MEF: Fibroblasto embrionario de ratón (*Mouse Embryonic Fibroblast*).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

PDPIP1: Proteína de interacción de la Polimerasa delta 1 (*Polymerase delta-interacting protein 1*).

PHLPP2: Dominio de homología de pleckstrina proteína fosfatasa rica en leucina repetida 2 (*pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase 2*).

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo en tiempo real (del inglés *quantitative real time polymerase chain reaction*).

RFP: Proteína Fluorescente Roja (*Red Fluorescent Protein*).

RING: Gen novedoso y realmente interesante (*really interesting novel gene*).

SDS: Dodecilsulfato sódico.

shRNA: Ácido Ribonucleico de horquilla corta.

TBT-T: Amortiguador Tris salino con Tween 20.

TNFAIP1: Proteína de interacción del Factor Tumoral de Necrosis 1 (*tumor necrosis factor alfa interactin protein 1*).

TRP: Receptor de Potencial Transiente (*transient potential receptor*).

V: Voltio

RESUMEN

Las proteínas son macromoléculas esenciales para el funcionamiento celular y condiciones que alteren su vida media, pueden causar diversas enfermedades. Algunos miembros de la familia KCTD (*Potassium channel tetramerization domain*) interactúan con miembros de la familia de las Cullin E3 ligasas a través de su dominio BTB (*Broad-complex, Tramtrack, Brick-a-brack*), los cuales desempeñan la función de andamio e identificador de proteínas objetivo en la ubiquitinación tipo RING (*really interesting novel gene*). KCTD5, un miembro de la familia KCTD, interactúa con la E3 ligasa Cullin3, participando en procesos de ubiquitinación como adaptador de sustratos, entregando especificidad en la ubiquitinación de las proteínas blanco.

Para determinar las funciones que podrían tener los distintos dominios de KCTD5- amino-terminal (N-Terminal), BTB y carboxilo-terminal (C-terminal) y su influencia en la migración y proliferación celular en células de melanoma, se optó por la estrategia de subclonamiento de los dominios y fusionarlos a EGFP como proteína reportera. Cada uno de estos fragmentos se expresaron en las líneas celulares HEK293, Cos7 y B16-F10 para verificar su expresión en sistemas heterólogos, su localización subcelular y la influencia de los fragmentos en procesos biológicos como migración y proliferación.

Nuestros resultados sugieren que KCTD5 presenta una localización citosólica predominantemente perinuclear. Por otra parte, los fragmentos BTB, N- y C-terminal de KCTD5 presentan una localización citoplasmática. Finalmente, observamos que ni KCTD5 como los fragmentos de KCTD5 influyen significativamente en procesos proliferativos ni migratorios. Futuros estudios serán necesarios para determinar eventuales usos de estos fragmentos en la modulación de distintas funciones celulares dependientes de KCTD5.

ABSTRACT

Fragments of KCTD5 as inhibitors of migration and proliferation in a melanoma cell model

Proteins are macromolecules essential for cell function and conditions that alter their half-life, can cause various diseases. Some members of the KCTD (Potassium channel tetramerization domain) family interact with members of the Cullin E3 ligase family through their BTB (*Broad-complex, Tramtrack, Brick-a-brack*) domain, which serve as a scaffold and identifier of target proteins in ubiquitination type RING (Really Interesting Novel Gene). KCTD5, a member of the KCTD family, interacts with Cullin3 E3 ligase, participating in ubiquitination processes as a substrate adapter, providing specificity in the ubiquitination of target proteins.

In order to determine the functions that the different domains of KCTD5-amino-terminal (N-Terminal), BTB and carboxyl-terminal (C-terminal) and their possible effects on cell migration and proliferation in melanoma cells, we subcloned these domains and fusing them to EGFP as a reporter protein. Each of these fragments were expressed in the HEK293, Cos7 and B16-F10 cell lines to verify their expression in heterologous systems, their subcellular location and the influence of the fragments on biological processes such as cell migration and proliferation.

Our results suggest that KCTD5 presents a predominantly perinuclear cytosolic localization. On the other hand, the BTB, N- and C-terminal fragments of KCTD5 present a cytoplasmic localization. Finally, we observe that neither KCTD5 as the KCTD5 fragments significantly influence proliferative or migratory processes. Future studies will be necessary to determine eventual uses of these fragments in the modulation of different KCTD5-dependent cellular functions.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Seres vivos y proteínas

El funcionamiento celular depende en gran manera del uso y degradación de las distintas macromoléculas (proteínas, hidratos de carbono, lípidos y ácidos nucleicos). Las células poseen diferentes tipos de proteínas como proteínas de membrana, incluyendo receptores de señalización y reconocimiento, transportadores y canales de iones, proteínas estructurales y enzimas (Foot y cols. 2017). Las proteínas median importantes procesos celulares como, por ejemplo: la regulación del ciclo celular, diferenciación, apoptosis y transducción de señales (Hershko y cols. 1998). Dada la importancia del rol que juegan las proteínas, alteraciones en los procesos que regulan la vida media de estas pueden conducir al desarrollo de diversas enfermedades (Eden y cols. 2011).

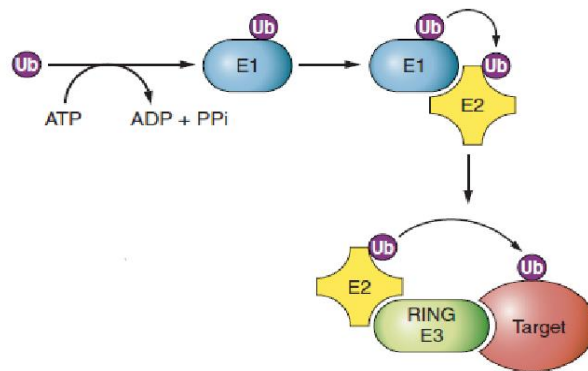
1.2 Ubiquitinación y sus funciones

La ubiquitinación es una de las modificaciones postraduccionales más comunes en proteínas (Clague y cols. 2015). La ubiquitina es una proteína conservada de aproximadamente 8 kDa (76 aminoácidos) y es expresada de manera ubicua. La ubiquitinación es un proceso dependiente de ATP dividido en tres etapas. La primera etapa consiste en la activación de la ubiquitina a través de la enzima activadora de ubiquitina (E1). Posteriormente, la ubiquitina (activada) es transferida a la enzima conjugadora de ubiquitina (E2). Finalmente, la ubiquitin ligasa (E3) facilita la transferencia de la ubiquitina desde la E2 a la proteína objetivo. Las E3 ligasas pueden agruparse en tres grandes familias dependiendo de los dominios que contienen. La familia más grande corresponde a la familia de las RING (*really interesting novel gene*) E3 ligasas, con sobre 600 miembros en el genoma humano.

En la ubiquitinación tipo RING, la E3 cumple la función de andamio para el complejo proteico de ubiquitinación y a la vez, como identificador de las proteínas objetivo. (Upadhyay y cols. 2017) (**Fig. 1A**).

Cabe mencionar, que la ubiquitinación no es una modificación postraduccional exclusiva de degradación, también juega un rol en la señalización, tráfico de proteínas, reconocimiento de señales o complejos reguladores, influyendo en la señalización celular y su homeostasis (Glickman y cols. 2002; Pickart y cols. 2004) (**Fig. 1B**).

A



B

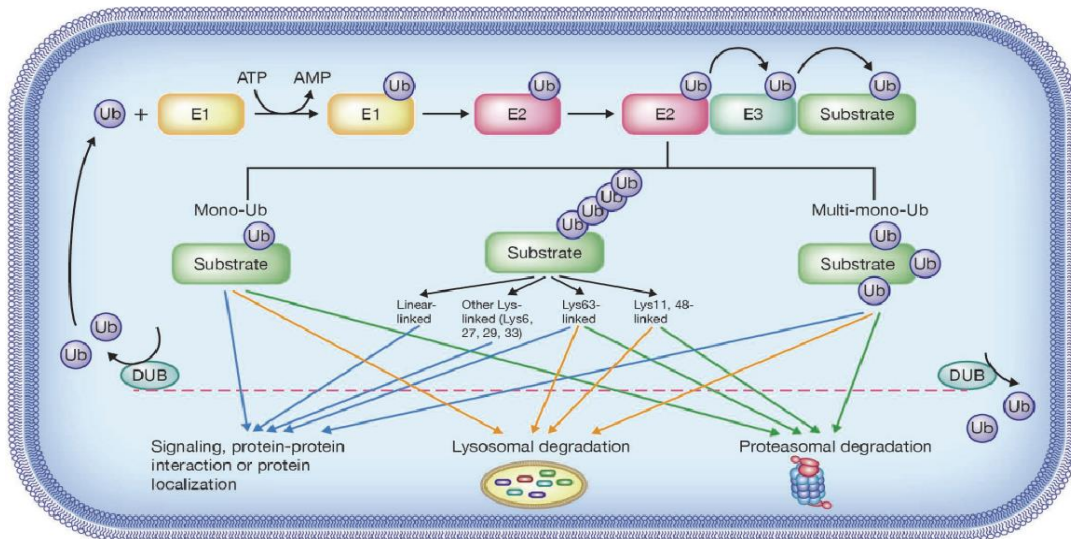


Figura 1. Mecanismos de ubiquitinación y sus funciones. (A) Mecanismo de ubiquitinación tipo RING. Adaptado de Foot y cols. 2017. (B) Figura adaptada de Li y cols. 2018. Ubiquitinación y su función como modificación post-traduccional.

1.3 Las Cullin E3 ligasa

Las Cullin E3 ligasa, son una familia de proteínas compuesta por 8 miembros y participan en la modificación por ubiquitinación (Sarikas y cols. 2011). Las cullin E3 ligasa llevan a cabo la ubiquitinación tipo RING, funcionando como andamios e identificadores de proteínas objetivo en el complejo multimérico de degradación.

Uno de los miembros de esta familia es cullin 3 (Cul3), el cual es esencial para el desarrollo embrionario y control del ciclo celular (Singer y cols. 1999), tráfico de proteínas (Huotari y cols. 2012) y respuestas a estrés (Taguchi y cols. 2011). Las Cullin E3 ligasas, como Cul3, además pueden asociarse a proteínas adaptadoras, para la identificación específica de proteínas objetivo, tales como algunos miembros de la familia KCTD.

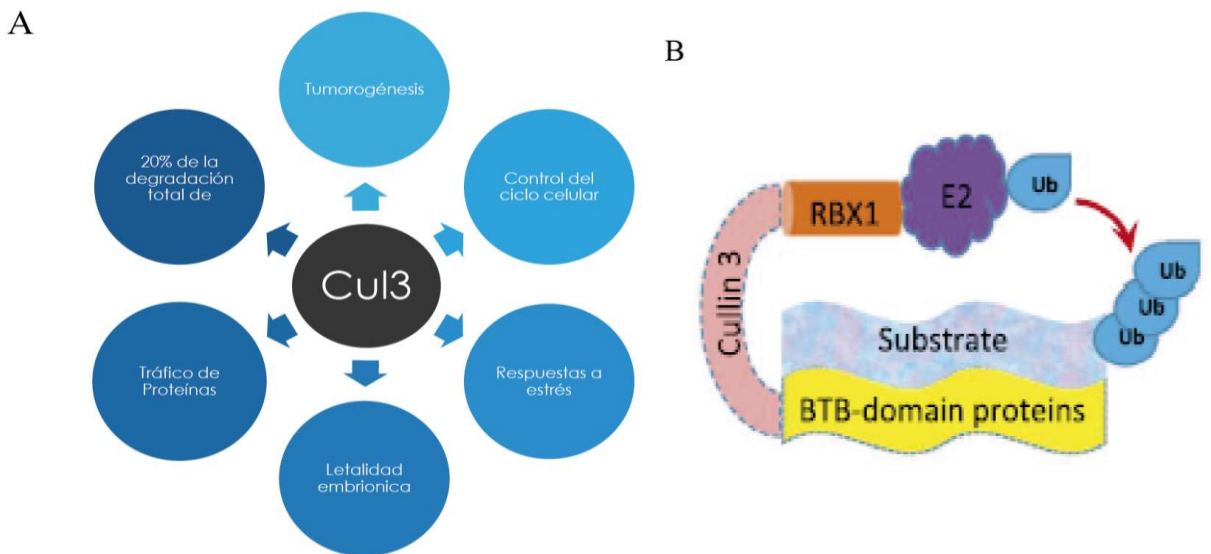


Figura 2. Cullin 3, funciones y participación de la Ubiquitinación. (A) Esquema resumen de algunas funciones de Cul3. (B) Esquema de la participación de cullin 3 en la ubiquitinación. Figura adaptada de Cheng y cols. 2018.

Actualmente, se ha descrito que la participación de Cul3 en la tumorigénesis depende del contexto celular y del adaptador al cual esté unido, pudiendo funcionar como parte del complejo degradador de proteínas clave o en la modificación post-traducciona l de éstas (Cheng y cols. 2018).

1.4 La Familia KCTD

La familia KCTD está compuesta por 26 miembros de proteínas relativamente pequeñas y solubles (Marchler-Bauer y cols. 2006; Pinkas y cols. 2017) llamadas de esta forma por la similitud secuencial que tienen sus dominios al dominio citoplasmático amino terminal (T1) de los canales de potasio (*Potassium channel tetramerization domain*) (**Fig. 3**).

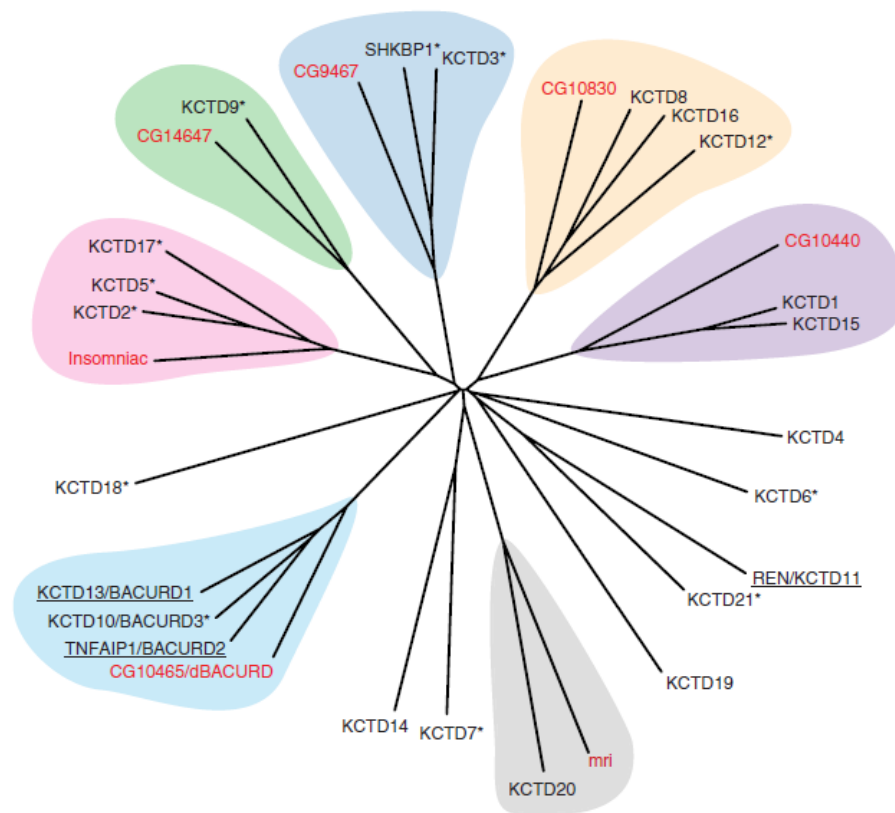


Figura 3. Árbol filogenético de la familia KCTD. Árbol filogenético de la familia KCTD, con sus ortólogos de *Drosophila* en rojo. Subrayados están los miembros de KCTD reportados como adaptadores de Cul3. Figura adaptada de Stravopoulos y Young 2011.

Dentro de la estructura conservada que poseen los miembros de esta familia, se encuentra el dominio amino-terminal y el dominio BTB (*Broad-complex, Tramtrack, Brick-a-brack*) (Liu y cols. 2013, Barone y cols. 2016) que corresponde a un dominio de aproximadamente 100 aminoácidos (Liu y cols. 2013) y se ha descrito como un módulo de interacción proteína-proteína que regula tanto la asociación entre las mismas proteínas (homo-oligomerización), como proteínas sin dicho dominio (hetero-oligomerización) (Dementieva y cols. 2009; Barone y cols.2016). El dominio carboxilo-terminal corresponde al dominio altamente variable en la familia KCTD, lo cual confiere identidades diferentes a cada miembro (Marchler-Bauer y cols. 2006).

Los distintos miembros de la familia KCTD interactúan con proteínas responsables de importantes procesos biológicos y pueden ser divididas en dos grandes grupos basados en el interactoma hasta ahora reportado. El primer grupo corresponde a las proteínas que presentan una actividad biológica independiente del proceso de degradación proteosomal y el segundo grupo corresponde a las que dependen de dicho proceso, lo cual es consecuencia de la interacción con las Cullin E3 Ligasas. Algunos ejemplos del primer grupo es KCTD10, el cual juega un rol en la replicación/reparación de DNA inducido por PCNA y enzimas relacionadas (Zhou y cols. 2005); KCTD8, KCTD12, KCTD12b y KCTD16 actúan como subunidades reguladoras de los receptores GABA y modulan fisiológicamente las respuestas inducidas por corrientes de potasio en el hipocampo (Fritzius y cols. 2017). KCTD13 es fundamental en la migración y gastrulación en *Xenopus* en complejo con Cul3 (Chen y cols. 2009). La desregulación en la expresión de KCTD2 contribuye a la neurodegeneración, función sináptica deficiente (Boada y cols. 2014) y desordenes de sueño (Li y cols. 2017). Por otro lado, aunque la sub-expresión de KCTD2 se encuentra con frecuencia en gliomas

malignos y se asocia a prognosis desfavorables (Kim y cols. 2017), en muestras de cáncer de colon se observa un aumento de su expresión, sugiriendo un posible papel oncogénico (Huang y cols. 2012). KCTD17 se ha descrito como parte del mecanismo que propicia la condición de hígado graso no alcohólico al aumentar su afinidad y ubiquitinar, en complejo con Cul3, para llevar a degradación proteosomal a PHLPP2 (*pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase 2*) fosforilado, una fosfatasa encargada de inhibir la señalización de la insulina en células hepáticas (Kim y cols. 2017).

Existen aproximadamente 400 proteínas con el dominio BTB, pero no todas tienen una función como adaptador de ubiquitin ligasas, inclusive en el caso de la familia de KCTD (Bayón y cols. 2008; Smaldone y cols. 2015). KCTD5 fue descrito por primera vez como posible adaptador de ubiquitin ligasa en el trabajo de Bayón y cols. (2008), donde demostraron la interacción entre cullin 3, una E3 ligasa y KCTD5 mediante ensayos de inmunoprecipitación y *pull down* definiendo que desde los aminoácidos 40 al 145 de KCTD5 son necesarios para dicha interacción (**Fig. 4, A**).

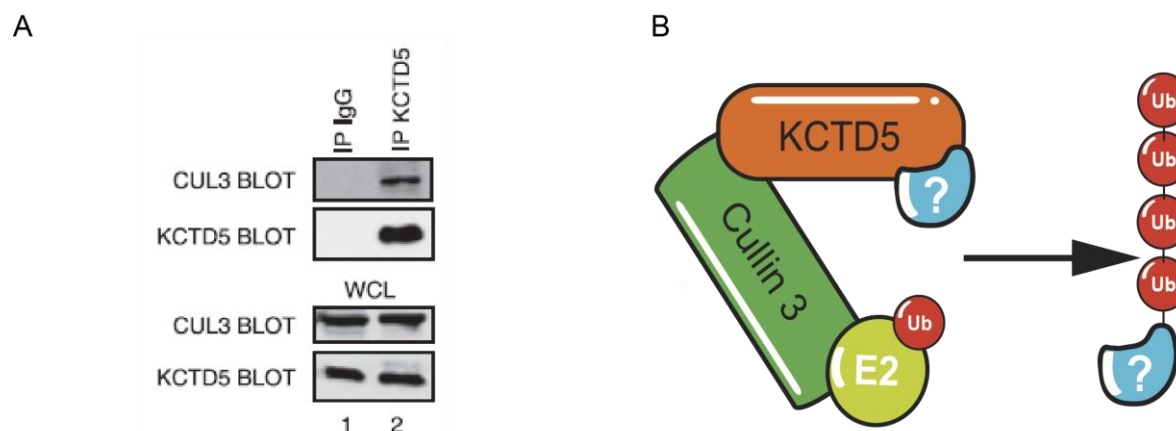
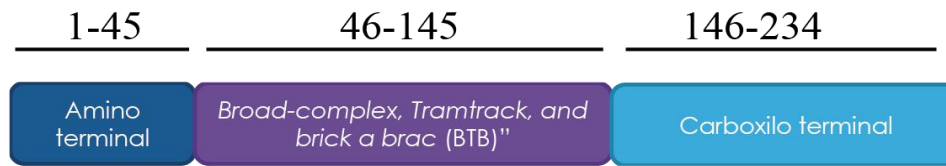


Figura 4. KCTD5 interacciona con Cul3. (A) Inmunoprecipitación, electrotransferencia de proteínas a nitrocelulosa e inmunorevelado de lisados celulares de células sanguíneas periféricas, adaptado de Bayón y cols. 2008. (B) Esquema representativo de la interacción de KCTD5 con cullin3 y su función como adaptador en el complejo.

1.5 KCTD5, un interesante miembro de la familia KCTD

Uno de los miembros más descritos a nivel estructural por cristalografía es KCTD5 (Dementieva y cols. 2009; Pinkas y cols. 2017). KCTD5 es una proteína soluble relativamente pequeña de 234 aminoácidos y un peso aproximado de 25 kDa, la cual podría describirse en 3 dominios. Desde el aminoácido 1 al 45, tenemos el extremo amino-terminal, desde el aminoácido 46 al 145 tenemos el dominio BTB, ambos dominios anteriormente mencionados son conservados a través de la familia de KCTD (Barone y cols. 2016). El extremo carboxilo-terminal consistente en 89 aminoácidos corresponde a la región variable de los KCTD y es la que le da identidad a cada miembro (Marchler-Bauer y cols. 2006). (**Fig. 5A**). KCTD5 forma pentámeros con otros KCTD5 para formar una roseta, la cual funciona de adaptador al interactuar con Cul3 (Barone y cols. 2016) (**Fig. 5B**). Estudios de cristalografía y dinámicas moleculares sugieren que el carboxilo terminal de KCTD5 estabiliza la formación del complejo con Cul3. Además, sugieren función de adaptador al exponer aminoácidos descritos como “*sticky*” en su estructura tridimensional (Dementieva y cols. 2009; Pinkas y cols. 2017; Barone y cols. 2016).

A



B

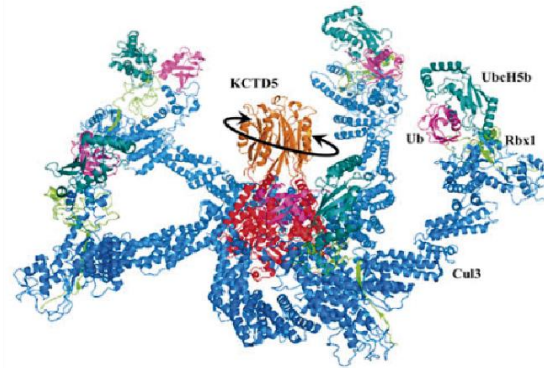


Figura 5. KCTD5: Dominios y estructura cristalográfica. (A) Esquema de KCTD5 separado por sus dominios y cantidad de aminoácidos que los componen. (B) Estructura cristalográfica del complejo KCTD5/Cul3. Adaptado de Barone y cols. 2016.

KCTD5 localiza de manera predominante en el citoplasma (**Fig. 6**) (Bayón y cols. 2008; Rutz y cols. 2015). Sin embargo, con respecto a la descripción de la localización de fragmentos de KCTD5 existen diferencias en la literatura disponible. Bayón y cols. (2008) describieron que la delección de dominios como el carboxilo terminal, el amino terminal o simplemente expresando sólo el dominio BTB presentan una ubicación subcelular similar a KCTD5(**Fig. 6A**). Por otra parte, Rutz y cols. (2015) observaron que la delección del amino terminal (47/234) presenta una ubicación citoplasmática, al igual que en los fragmentos 1/171 1/191 y 1/191 (Rutz, y cols. 2015) (**Fig. 6B**).

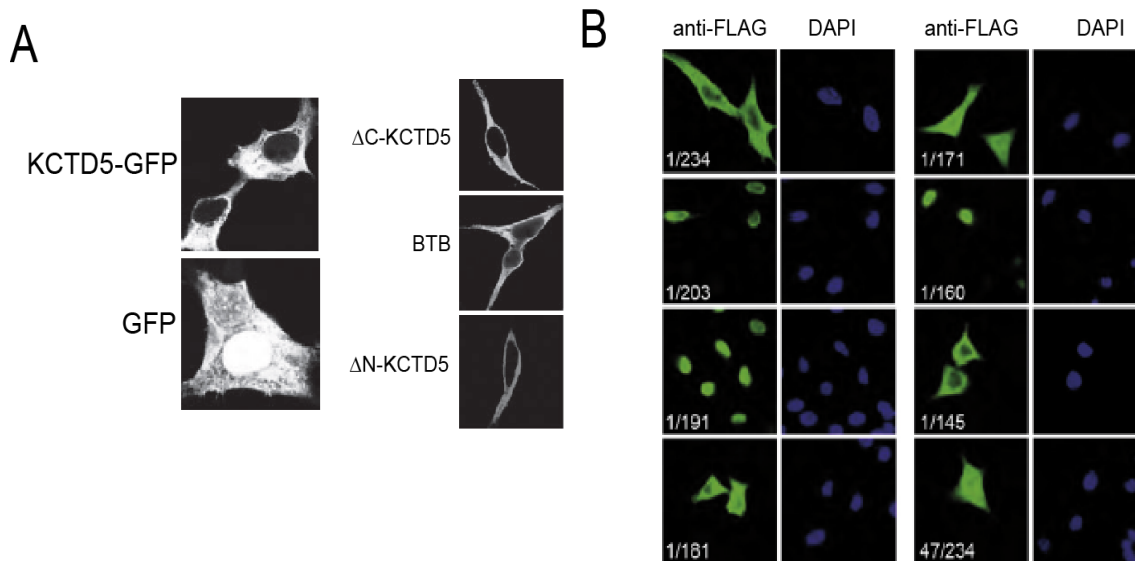


Figura 6. Ubicación Subcelular de KCTD5 y sus fragmentos. (A) Inmunofluorescencia en células HEK293 transfectadas con KCTD5, GFP y mutantes de delección de KCTD5. KCTD5 y sus fragmentos presentan una localización citosólica. (Bayón y cols. 2008). (B) Inmunofluorescencia en células HeLa transfectadas con KCTD5 (1/234, panel superior izquierdo) y fragmentos de KCTD5 marcados en verde. KCTD5 (1/234) presenta localización citosólica. Fragmentos de KCTD5 presentan ubicación subcelular citosólica y citoplasmática. (Rutz y cols. 2015).

Por otra parte, en nuestro laboratorio hemos encontrado que KCTD5 se asocia a TRPM4, un canal catiónico no selectivo perteneciente a la superfamilia de canales Transient Receptor Potential (TRP) (Rivas y cols. 2020). En nuestro laboratorio comprobamos dicha interacción mediante inmunoprecipitación y posterior análisis de *immunoblot* (Fig. 7A). En la línea celular TReX293-TRPM4 en condiciones donde se ha silenciado la expresión de KCTD5 con shRNA, muestra una disminución de la corriente de TRPM4, por lo que sugiere una sinergia positiva entre la interacción de TRPM4 y KCTD5, potenciando las funciones migratorias relacionadas a TRPM4 (Fig. 7B) (Rivas y cols. 2020).

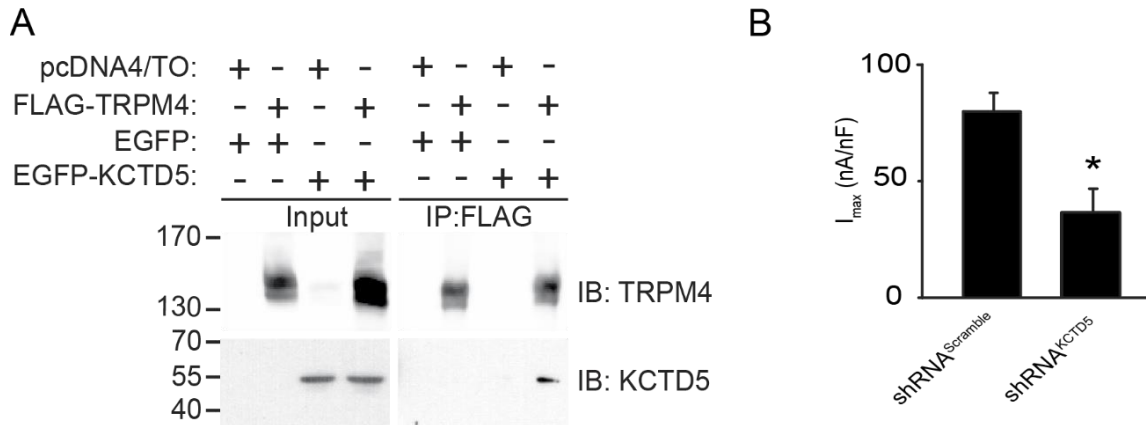


Figura 7. KCTD5 interacciona con TRPM4 y afecta a su corriente. (A) Validación de la interacción entre KCTD5 y TRPM4 mediante inmunoprecipitación y posterior análisis de electrotransferencia de proteínas a nitrocelulosa e inmunorevelado. (B) Gráfico de las densidades corrientes máximas de TRPM4 en condiciones de silenciamiento de KCTD5 y su respectivo control (Rivas y cols. 2020).

Las adhesiones focales son estructuras conformadas por complejos proteicos, fundamentales para la interacción y comunicación con el medio extracelular. Las adhesiones focales participan de la organogénesis y en la integridad de los tejidos, cuando las adhesiones focales se ven afectadas están generalmente relacionadas con patologías (Wu 2007). En condiciones de silenciamiento de KCTD5 mediante el uso de shRNA se observa una reducción del área de las adhesiones focales en células B16-F10 (**Fig. 8**). Por otra parte, al medir la tasa de ensamblaje de las adhesiones focales, se observa una tendencia a disminuir, mientras que la tasa de desensamblaje aumenta.

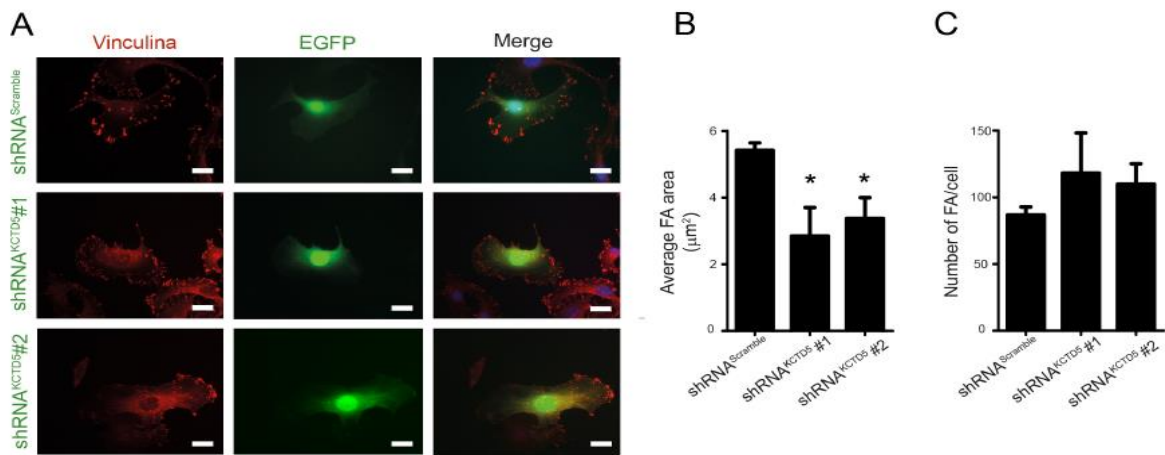


Figura 8. Interferentes de KCTD5 afectan al área de Adhesiones Focales. (A) Inmunofluorescencia de células B16-F10 transfectadas con shRNA de KCTD5 y su correspondiente control. En Rojo está marcado Vinculina, una de las principales proteínas e indicador característico de adhesiones focales. En verde el control de la transfección. Barras blancas corresponden a 25 μm. (B) Cuantificación del área promedio de adhesiones focales (n= 3). (C) Cuantificación de número de adhesiones focales por célula (n= 3). Barras corresponden a ± s.e.m, $p < 0.05^*$ comparado con el control. Datos mostrados son resultados no publicados de Jimena Canales.

Bases de datos que recopilan la expresión génica y la supervivencia de pacientes con diferentes tipos de cáncer muestran una correlación entre la disminución en la expresión de KCTD5 con una menor supervivencia en cáncer de piel, mientras que en el caso de tumores mamarios el aumento de la expresión de KCTD5 está relacionado a una menor supervivencia (Mizuno y cols. 2009). La línea celular MDA MB 231 es descrita como modelo de carcinoma basal triple negativo, uno de los tipos de cáncer de mama más agresivo (Kim y cols. 2017). En el laboratorio hemos observado que MDA MB 231, muestran una elevada abundancia en el mRNA de KCTD5 al compararla con líneas celulares como MCF10A, que corresponden a líneas celulares epiteliales mamarias normales (Rivas y cols. 2020). De manera interesante, en el caso de la evaluación de muestras clínicas de pacientes sanos y con cáncer de mama en diferentes etapas, algunos datos de nuestro laboratorio en qRT-PCR apoyan la información

proporcionada en cáncer de mama, donde se observa una elevada transcripción de KCTD5 y TRPM4 (**Fig. 9**).

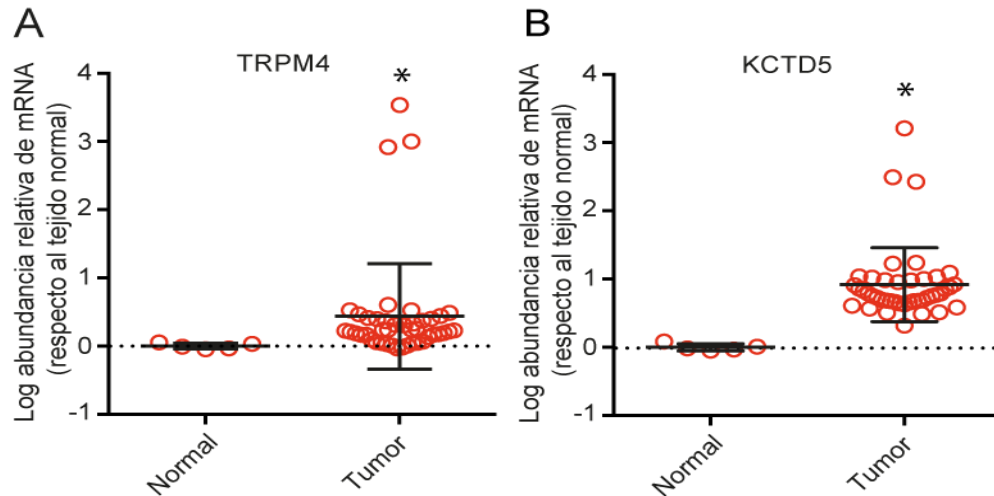


Figura 9. Transcritos de TRPM4 y KCTD5 son elevados en muestras clínicas de cáncer de mama. (A) Expresión relativa de mRNA correspondiente a TRPM4. (B) Expresión relativa de mRNA correspondiente a KCTD5. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$, $n = 48$) (Rivas y cols. 2020).

En nuestro laboratorio, hemos observado que la sobreexpresión de KCTD5 aumenta la migración (**Fig. 10A**) y contractilidad celular en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) (**Fig. 10B**), sugiriendo una participación de KCTD5 en el remodelamiento del citoesqueleto de actina. Por otro lado, ensayos *in vivo* en pez cebra, sugieren un importante rol de KCTD5 a movimientos celulares convergentes y migración de neuromastos (Rivas y cols. 2020).

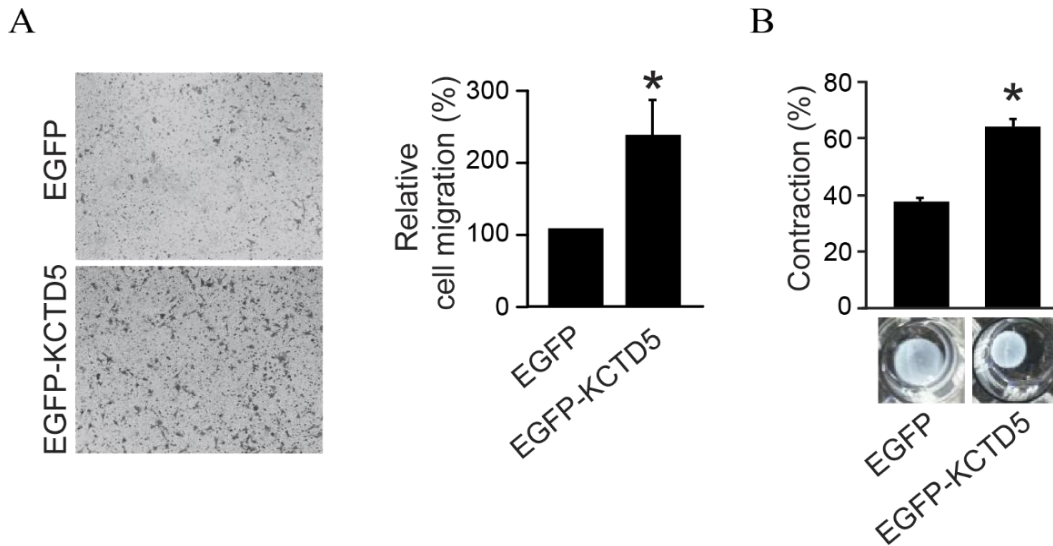


Figura 10. KCTD5 aumenta la contractibilidad y migración celular. (A) Ensayo de migración en cámara Transwells, con células MEF transfectadas con EGFP y KCTD5, el estímulo quimiotáctico corresponde a medio suplementado al 10% con suero fetal bovino por 16 h. y su respectivo gráfico (n=3; $p < 0.05$, comparado con el control). (B) Ensayo de contracción tridimensional con células MEF, transfectadas con EGFP y KCTD5 estimuladas por 48 h. con medio al 10% de suero fetal bovino para inducir la contracción (n=3; $p < 0.05$, comparado con el control) (Rivas y cols. 2020).

1.6 Dominios de interés en KCTD5

Dada la información disponible y los resultados de nuestro laboratorio, proponemos una estrategia peptídica de fragmentos de KCTD5 para evaluar su influencia en procesos biológicos como la migración y proliferación. Los dominios de KCTD5 que consideramos son:

- Dominio amino terminal (KCTD5 1-45): ya que son necesarios los aminoácidos 40 al 145 para la formación del complejo KCTD5/Cul3.
- Dominio BTB (KCTD5 46-145): siendo el principal dominio de interacción descrito para KCTD5.
- Dominio carboxilo terminal (KCTD5 146-234): Estudios de dinámicas moleculares y cristalografía muestran este dominio como fundamental para la estabilización del complejo KCTD5/Cul3.

1.7 Nuevos enfoques en la farmacología y aplicación de péptidos permeables

Estrategias como el silenciamiento de genes mediado por shRNA, puede generar efectos secundarios a nivel fisiológico como es en el caso de Cul3, que al ser silenciado resulta en inviabilidad embrionaria en ratones (Singer y cols. 1999). Pese a que se pueden diseñar de manera específica contra mRNA objetivos, sólo son necesarios 7 nucleótidos para interferir con la expresión de otro mRNA, por lo que el contexto celular que se utilice también puede interferir con la inespecificidad del shRNA propiciando la interferencia de otras proteínas (O'Keefe, 2013). Por otro lado, si bien Crispr-Casp9 es una potente herramienta de edición genética, no existen muchos medios de aplicación para los distintos posibles tratamientos. Hoy en día, el desarrollo de nuevas formas de fármacos como los péptidos permeables son un foco interesante de investigación; ya que, presentan ventajas sobre los fármacos tradicionales como una alta especificidad, baja toxicidad y una corta vida media, evitando una acumulación del fármaco; además, de un fácil escalamiento sintético a nivel industrial (Adessi y cols. 2002). Otro punto a favor de la estrategia peptídica es evitar interferir otras vías río arriba como el control de expresión génica, ya que su efecto se reduce a la interfaz de interacción proteína-proteína a diferencia de shRNA.

Tabla 1. Resumen de estrategias farmacológicas.

CRISPR-Cas9	shRNA	Péptidos
<ul style="list-style-type: none">• Posee pocos medios de entrega para los distintos sistemas aplicables	<ul style="list-style-type: none">• Posibles efectos secundarios• Sólo son necesarios 7 nucleótidos para interferir con la expresión de otros mRNA	<ul style="list-style-type: none">• Fácil escalamiento sintético• Alta especificidad• Baja toxicidad• Corta vida media

Dada la relevancia de procesos biológicos como la migración y la proliferación en enfermedades como cáncer, es de gran interés desarrollar fármacos que puedan influir directamente en dichos procesos, y el desarrollo de péptidos permeables actualmente es una estrategia que permite obtener los resultados deseados sin mayores efectos secundarios.

Con base a la información disponible de KCTD5 con la cristalografía, las sugerentes funciones biológicas que tiene además de las proteínas claves que han sido demostradas dentro de su interactoma, resulta interesante comprobar si dicha función es realizada por la proteína completa o si se asocia a sólo una parte de KCTD5 como dominio, de ser este el caso, el uso de fragmentos de KCTD5 podría ser el pie de un desarrollo farmacológico para inhibir su función en casos donde se encuentre una expresión exacerbada de KCTD5.

Finalmente, en esta memoria se propone generar péptidos dirigidos a una interferencia específica a la interfase proteína-proteína en la función de KCTD5 como adaptador de Cul3 sin afectar la función de Cul3 con otros adaptadores; ya que, se ha descrito que Cul3 está involucrado con alrededor del 20% de la degradación de todas las proteínas (Zhao y cols.2013). Además, estudios realizados en ortólogos de KCTD5 como Imsomniac (Inc) y en

parálogos como KCTD17 muestran que mutaciones en la arginina 135 y 145 respectivamente, presentan pérdida de función para Inc alterando el sueño en *Drosophila* y se han asociado a distonía mioclónica para KCTD17 (Li y cols. 2019). Estos resultados destacan la importancia del carboxilo terminal en cada caso. Estudios bioinformáticos y simulaciones estructurales moleculares predicen una estructura tridimensional del péptido carboxilo-terminal (KCTD5 145-234) idéntica a la proteína nativa, incluyendo la disposición de sus láminas beta y sus aminoácidos *sticky* (Barone y cols. 2016), sustentando que un péptido que contenga sólo el dominio carboxilo terminal, podría tener la estructura tridimensional y a su vez (si la función de KCTD5 recae en la estructura) la misma función identificadora de KCTD5 como adaptador. Dichos péptidos también pueden resultar en una herramienta útil para realizar aproximaciones proteómicas de interacción e identificar nuevas proteínas involucradas con KCTD5.

2. HIPÓTESIS

Se diseñarán fragmentos de KCTD5 fusionados a una proteína reportera (EGFP) con el objetivo de evaluar la función de los dominios de KCTD5 en procesos celulares como migración y proliferación. Por lo tanto, la hipótesis planteada es:

“Fragmentos de KCTD5 inhiben procesos de proliferación y migración en células de melanoma”

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo general

Generar fragmentos de KCTD5 fusionados a proteínas reporteras y determinar su influencia en la migración y proliferación celular en células de melanoma.

3.2 Objetivos específicos:

- 1) Generar fragmentos de KCTD5 fusionados a EGFP y determinar la localización subcelular de los péptidos con el fin de compararlos con la localización de la proteína nativa.
- 2) Determinar los efectos funcionales de los péptidos en procesos biológicos como la proliferación y migración de células de melanoma

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 Cultivo Celular

Las líneas celulares COS7 y HEK 293 fueron cultivadas, en medio DMEM alto en glucosa (Thermo Fisher Scientific) suplementado con suero fetal bovino (GE Healthcare) al 5% v/v y mantenidas a 37°C con 5% CO₂. Las células B16-F10 fueron cultivadas, en medio RPMI (Thermo Fisher Scientific) y suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (GE Healthcare) y mantenidas a 37°C con 5% CO₂. Todos los medios fueron suplementados con 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y ajustados a pH 7,4.

4.1.2 Partidores para el sistema comercial *Gibson Assambly*

Para el diseño de los fragmentos de KCTD5 se utilizaron los partidores descritos en la **tabla 2**.

Tabla 2 Partidores diseñados para el sistema comercial Gibson Assambly.

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia 5' – 3'</i>	<i>T_m</i> (°C)
<i>EGFP-C1</i> <i>Forward</i>	<i>GGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATAACC</i>	57.6
<i>EGFP-C1</i> <i>Reverse</i>	<i>CTTGATCAGCTCGTCCATG</i>	53
<i>EGFP-N1</i> <i>Forward</i>	<i>ATGGTGAGCAAGGGCGAG</i>	57.9
<i>EGFP-N1</i> <i>Reverse</i>	<i>CTTGATCAGCTCGTCCATG</i>	61.4

<i>KCTD5 1-45 Forward</i>	<i>GGGATCCACCGGTCGCCACCATGGCGGAGAATCACTGC</i>	<i>72.8</i>
<i>KCTD5 1-45 Reverse</i>	<i>TCCTCGCCCTTGCTCACCATCCACTTGGACACGCTGCC</i>	<i>72.7</i>
<i>KCTD5 45- 145 Forward</i>	<i>GGGATCCACCGGTCGCCACCATGGTCCGACTCAACGTCGGC</i>	<i>74.3</i>
<i>KCTD5 45- 145 Reverse</i>	<i>TCCTCGCCCTTGCTCACCATTGTTCTCTAATTTTGTCTT TTACAAGTTTTATTAATG</i>	<i>66.4</i>
<i>KCTD5 145- 234 Forward</i>	<i>GCATGGACGAGCTGTACAAGGACAGCAAAACATCGCAG</i>	<i>67.4</i>
<i>KCTD5 145- 234 Reverse</i>	<i>ATGATCAGTTATCTAGATCCCATCCTTGAGCCTCGTTC</i>	<i>63.3</i>

4.2 Clonamiento de los péptidos

Para el diseño de los fragmentos de KCTD5 fusionados a EGFP, se consideró la probabilidad de interacción que tiene cada dominio con otras proteínas. Los fragmentos correspondientes al dominio amino terminal y BTB llevan EGFP por el extremo carboxilo terminal y el fragmento correspondiente al carboxilo terminal será fusionado a EGFP por su amino terminal (**Fig. 11**)

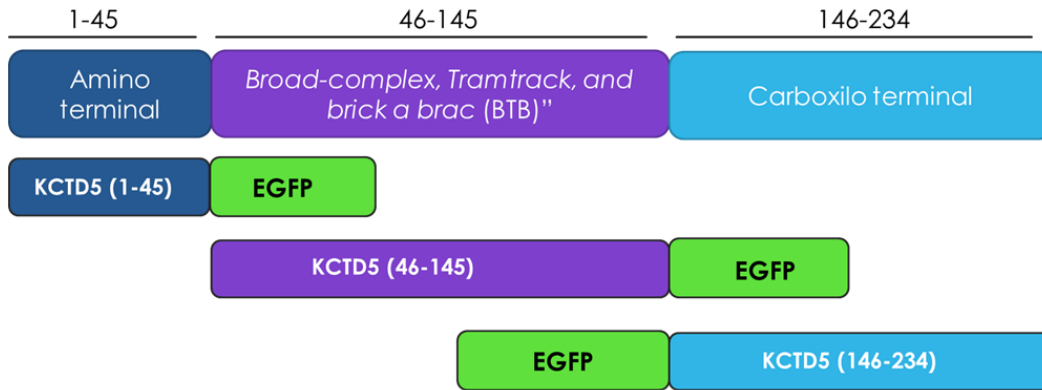
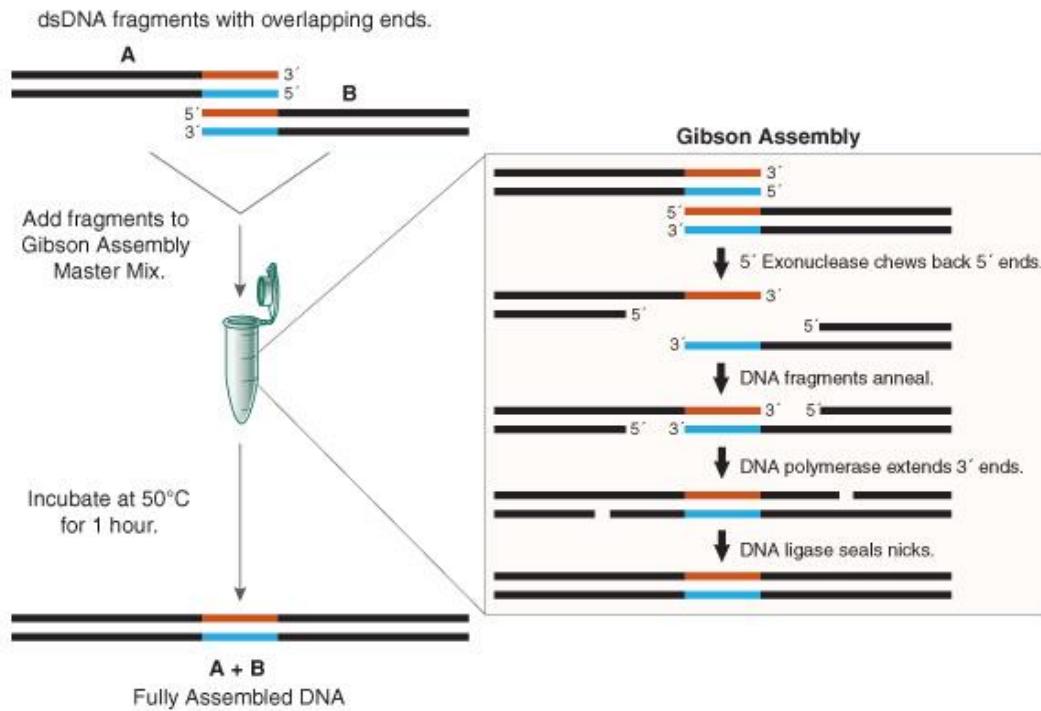


Figura 11. Esquema de péptidos propuestos. Esquema de construcción de cada péptido basado en cada uno de los dominios de KCTD5, fusionados a EGFP.

Los clonamientos de los péptidos fueron realizados con el sistema comercial *Gibson Assembly* (GIBSON ASSEMBLY® Synthetic Genomics, Inc., New England Biolabs, Gibson, D. G. 2009) según recomendaciones del fabricante. Se obtuvieron fragmentos con secuencias solapadas entre el dominio del fragmento de KCTD5 y EGFP mediante PCR con los partidores de la **Tabla 2**. Los PCR fueron realizados con el programa descrito en la **Tabla 3**. Luego, mediante una exonucleasa se elimina el extremo 5' de la doble hebra, para que, por complementariedad, las secuencias en el extremo 3' se unan. Los espacios son rellenados por una DNA polimerasa y los nicks ligados con una DNA ligasa (**Fig. 12A**).

A



B

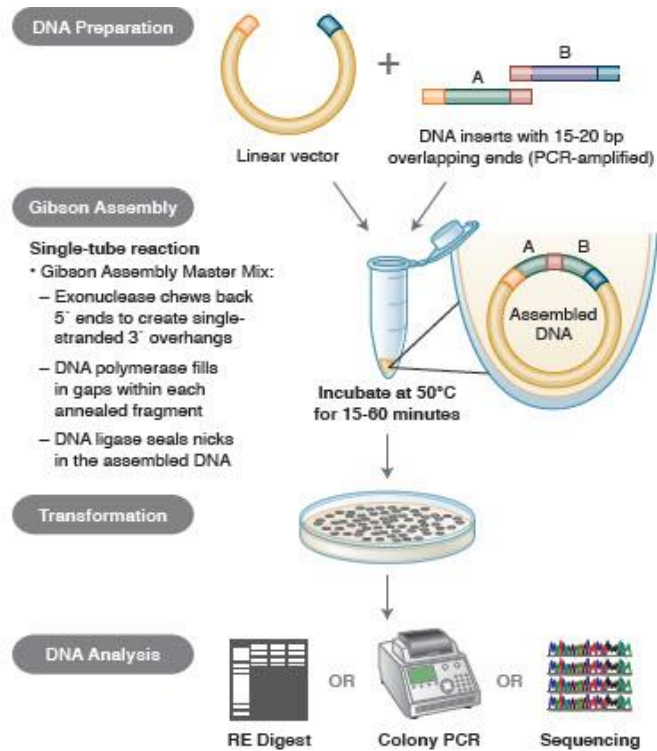


Figura 12. Metodología Gibson Assembly. (A) Esquema de la reacción *Gibson Assembly*, donde los fragmentos de PCR amplificados con las secuencias de solapamiento son unidos. (B) Esquema de metodología realizada. Adaptado de Gibson y cols. 2009.

Los productos obtenidos de la reacción del sistema comercial de Gibson Assembly fueron transformados en bacterias quimiocompetentes *E. coli* DH5 α , para luego ser seleccionadas con la resistencia del backbone, posteriormente se realizó PCR de colonia, utilizando el protocolo de PCR descrito para los fragmentos (**Fig. 12B**). Como control de la técnica se utilizó como blanco agua bidestilada. Las colonias positivas fueron cultivadas para posteriormente extraer el DNA plasmidial con el sistema comercial FavorPrepTM Plasmid Extraction Mini (Favorgen Biotech Corp, Pingtung County, Taiwan). Para verificar la correcta inserción de los plásmidos cada péptido generado fue secuenciado en el Servicio de Secuenciación de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Tabla 3 Protocolo de PCR para obtención de fragmentos de KCTD5 y linealización de EGFP-N1 y EGFP-C1.

Etapas	Fragmentos de KCTD5	Plásmidos
Desnaturación inicial	95 °C durante 5 minutos	95°C durante 5 minutos
Desnaturación	95°C durante 30 segundos	95°C durante 30 segundos
Apareamiento	55°C durante 2 minutos	55°C durante 30 segundos
Extensión	72°C durante 2 minutos	72°C durante 6 minutos
Extensión final	72°C durante 10 minutos	72°C durante 10 minutos

4.3 Transfección transitoria

Las transfecciones transitorias en células COS7 y HEK293 se llevaron a cabo utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.E.U.U) de acuerdo con las instrucciones recomendadas de uso. Las células B16-F10 fueron transfectados según

instrucciones recomendadas de uso de Lipofactamine LTX (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.E.U.U).

4.4 Electrotransferencia de proteínas a nitrocelulosa e inmunorevelado

La lisis mecánica de las células COS7, B16-F10 y HEK293 se realizó con amortiguador de lisis que contiene; 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM NaF, 0,5 % v/v NP-40, PIC (*Protein Inhibitor Cocktail, Life Science*) y Fenil Metil Sulfonil Fluoruro 1mM a 4°C. Luego, las muestras se centrifugaron a 11.000g durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se adicionó *Reducing Sample Buffer (RSB)* al sobrenadante obtenido, para después ser analizadas mediante geles de poliacrilamida al 12%, en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE) a 70 V durante 3 horas 30 minutos y transferidas a membranas de nitrocelulosa por medio de una transferencia húmeda a 30 V durante 18 horas a 4° C. La membrana se bloqueó con solución de bloqueo 4 % p/v leche libre de grasa en TBS-T (pH 7,5 y 0,1 %v/v Tween 20) por 1 hora a temperatura ambiente (25°C). Las proteínas fueron identificadas incubandose a 4°C durante toda la noche con anticuerpos primarios para EGFP (Neuromab #73-414), se utilizó α -tubulina (Sigma Aldrich #T5168) como control de carga para observar la expresión de los péptidos.

Las membranas incubadas con anticuerpo primario, se les incubó con anticuerpos secundarios fusionados a peroxidasa de rabanito para posteriormente revelar con Pierce *ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific, Rockford, IL, E.E.U.U) y esta señal quimioluminiscente se detectó utilizando el equipo Alliance Mini HD9 WL. Los datos fueron cuantificados con NIH/ImageJ software.

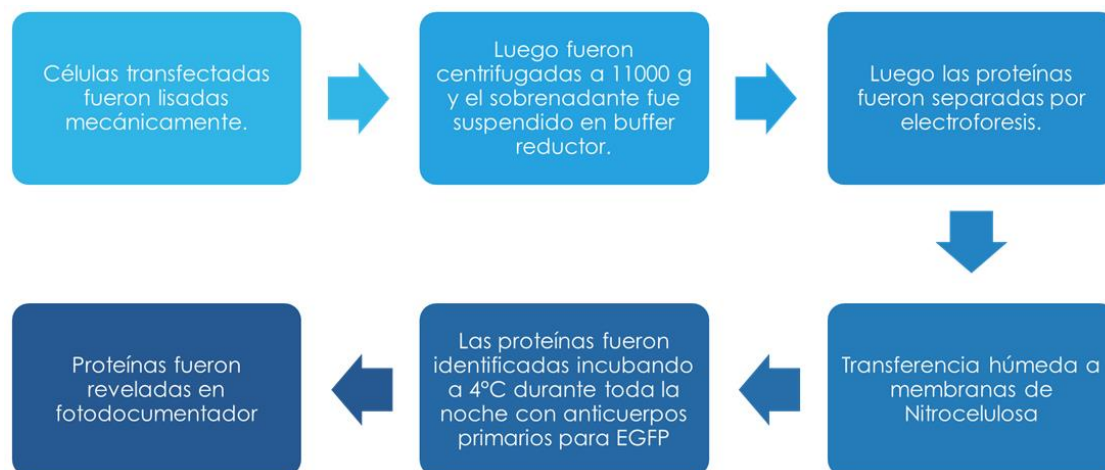


Figura 13. Esquema de metodología Western Blott.

4.5 Inmunofluorescencia

Las células previamente transfectadas con los péptidos y marcadores de compartimentos subcelulares como KDEL-RFP y mCherry-Golgina, como fue descrito anteriormente. Con 48 horas de expresión fueron fijados por 15 minutos a 4°C con 4% p/v formaldehído, 4% p/v sucrosa en DPBS y posteriormente lavadas con DPBS. Luego, se permeabilizaron y bloquearon con 0,1% v/v Triton X-100, 4% p/v leche descremada en polvo en DPBS por 1 hora a temperatura ambiente e incubado con el anticuerpo primario *monoclonal* EGFP (Neuromab #73-414). El anticuerpo primario fue detectado con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, E.E.U.U). Los núcleos fueron teñidos con Hoesch disuelto en DPBS (1:5.000) por 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente lavado dos veces con DPBS.

4.6 Ensayo Clonogénico

Consiste en la siembra aislada de células, para evaluar la capacidad proliferativa de cada una de manera individual (Rafehi y cols. 2011). Células B16-F10 transfectadas con cada fragmento de KCTD5, EGFP, KCTD5-EGFP y células sin tratamiento fueron sembradas en placas adherentes de 6 pocillos. Para cada condición fueron sembradas 500 células. El tiempo determinado para este ensayo fue de 7 días. Luego, las colonias formadas por las células individuales fueron fijadas con Cristal violeta (0.2% p/v; 10% v/v etanol) por 30 minutos a temperatura ambiente, para luego ser lavadas. Imágenes de las colonias fueron analizadas y cuantificadas en cuanto a número y área utilizando el equipo Alliance Mini HD9 WL mediante el programa Uviband Max ver. 15.07, Uvitec, Cambridge.

4.7 Ensayo de migración en cámara Transwell

Para este ensayo, 50.000 células B16-F10 transfectadas con EGFP, EGFP-KCTD5, KCTD5 1-45, KCTD5 45-145 y KCTD5 145-234 con una expresión de 24 horas son sembradas en cámaras Transwell con medio sin FBS. La migración de las células es inducida con medio al 10% v/v de FBS como quimioattractante (Cáceres y cols. 2015). El tiempo de ensayo fue determinado a 24 horas desde la siembra, posteriormente las cámaras son fijadas con cristal violeta 2% p/v con un 10% v/v de etanol, por 10 minutos. Las células sembradas en la cámara interior y el cristal violeta fueron removidas con una tórula estéril y DPBS (KCl 2,67 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, NaCl 138 mM, Na₂HPO₄-7H₂O 8,06 mM, pH 7,4).

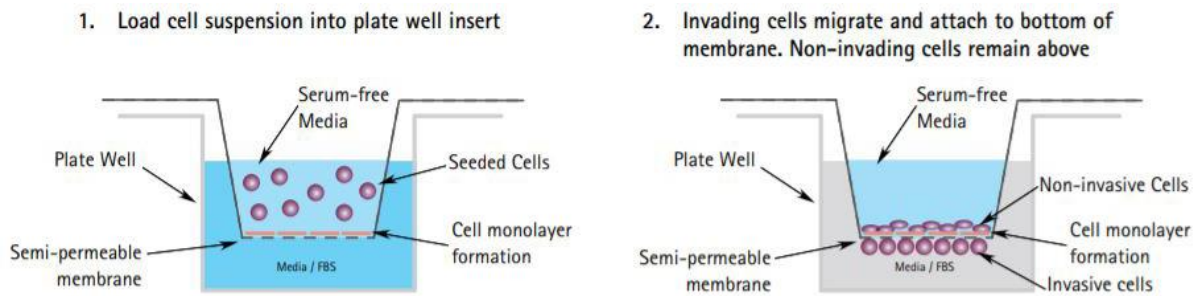


Figura 14 Esquema de Ensayo de migración Transwell. Células (círculos lila) son sembradas en la cámara superior con medio libre de suero, separada de la cámara inferior por una membrana semipermeable. Posteriormente se agrega en la cámara inferior, medio suplementado con suero fetal bovino como quimioattractante. Se evalúa la capacidad migratoria de las células contabilizando la cantidad de células capaces de atravesar la membrana y que se adhieren al fondo de la cámara (Chen, 2005).

4.8 Estadística

Los datos de ensayos clonogénicos y ensayos de migración fueron analizados por ANOVA de una vía, y comparados por test Kruskal-Wallis y test de Dunn. Todos los análisis fueron hechos con GraphPad Prism 6.

5. RESULTADOS

5.1 Generar fragmentos de KCTD5 fusionados a EGFP y determinar la localización subcelular de los péptidos con el fin de compararlos con la localización de la proteína nativa

Se ha descrito la función de KCTD5 como adaptador en el sistema de ubiquitinación tipo RING dirigido por E3 ligasas como Cul3 teniendo un rol como *switch off* en la transducción de señales en proteínas G acopladas a receptores (Brockmann y cols. 2017) o como efector positivo en la migración celular en fibroblastos de embrión de ratón (Rivas y cols. 2020). Sin embargo, en cuanto a sus dominios, solamente se ha descrito su función en relación con la interacción con Cul3 y la ubicación subcelular de estos (Bayón y cols. 2008; Rutz y cols. 2015). Con el fin de obtener información sobre las funciones biológicas de cada dominio de KCTD5 por separado, como primer objetivo se obtuvieron clones de cada dominio de KCTD5 mediante el método de ensamblaje de Gibson, que consiste en la inserción de fragmentos de DNA a través de secuencias de solapamiento en un solo paso (Gibson y cols. 2009). Para realizar la reacción de Gibson es necesario que tanto el inserto como el plásmido tenga secuencias de solapamiento (**Fig. 15**). Dichas secuencias son añadidas mediante la técnica de PCR con los partidores descritos en la metodología (**Tabla 1**). Los fragmentos de KCTD5 fueron diseñados considerando la expresión del dominio específicos de KCTD5, es decir, el dominio amino, BTB o carboxilo terminal, fusionado a EGFP. Para evitar que el péptido resulte truncado, para los péptidos KCTD5 1-45 y KCTD5 45-145 se utilizó el plásmido EGFP-N1 el cual tiene el sitio de clonamiento por el extremo

amino terminal de EGFP. En el péptido KCTD5 145-234 se utilizó el plásmido EGFP-C1 que tiene su sitio de clonamiento en el carboxilo terminal de EGFP (**Fig.15D**).

Para comprobar el correcto clonamiento de los fragmentos de KCTD5, se realizó PCR a los plasmidios obtenidos de colonias positivas luego de ser quimiotransformadas por los productos del sistema comercial *Gibson Assembly*. Los partidores utilizados corresponden a cada dominio para comprobar la presencia de la secuencia, con un control positivo correspondiente a la secuencia completa de la proteína y un control negativo correspondiente al plasmidio EGFP. Se obtuvo producto PCR en cada caso correspondiente al peso estimado de cada dominio. Para los fragmentos KCTD5 1-45, KCTD5 46-145 y KCTD5 146-234 presentaron bandas de aproximadamente 135 pb, 300 pb y 267 pb correspondientemente.

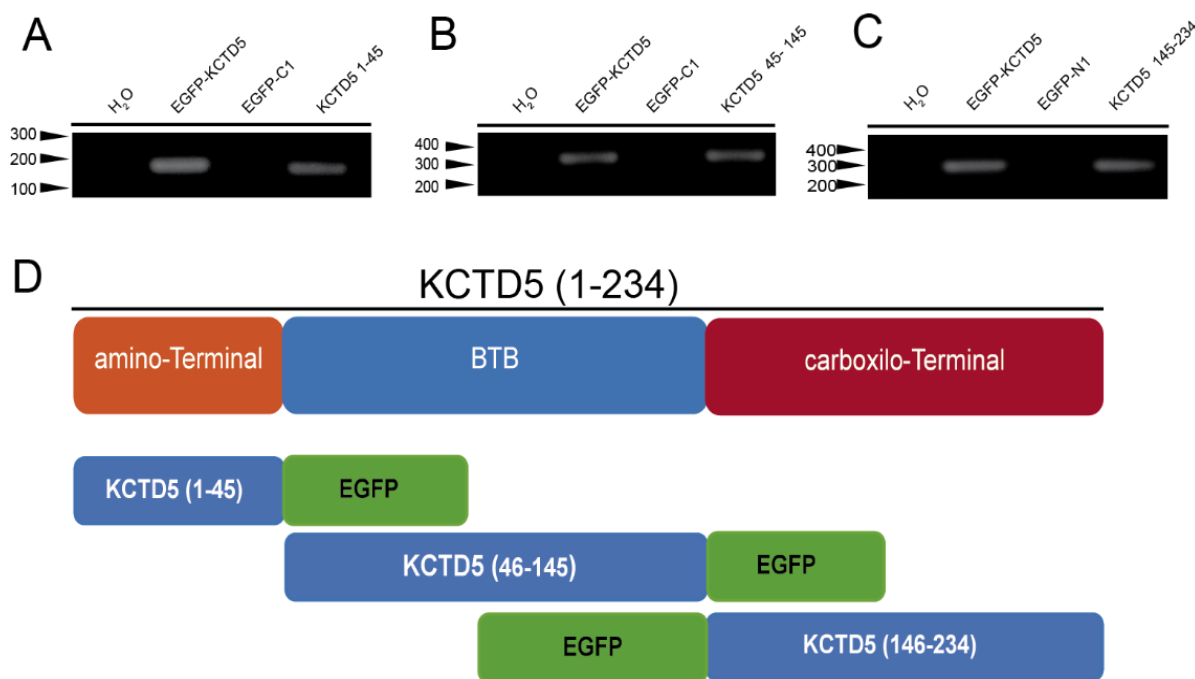


Figura 15. Producto PCR correspondiente a los dominios de KCTD5. (A) Producto PCR para el fragmento correspondiente al péptido KCTD5 1-45 de aproximadamente 135pb. (B) Producto PCR para el fragmento correspondiente al péptido KCTD5 45-145 de aproximadamente 300pb. (C) Producto PCR para el fragmento correspondiente al péptido KCTD5 145-234 de aproximadamente 267 pb. (D) Cartoon sobre el diseño de péptidos basados en KCTD5. El tamaño de los productos de PCR fue revisado por electroforesis en gel de agarosa al 2% p/v.

5.2 Expresión de los péptidos líneas Celulares

Las líneas celulares HEK293, Cos7 y B16-F10 fueron transfectadas con los constructos y se comprobó su expresión mediante electrotransferencia de proteínas a nitrocelulosa e inmunorevelado (*Western Blot*). En los *Western Blot* correspondiente a los péptidos expresados en la línea celular HEK293, Cos7 y B16-F10 se observa señales correspondientes al peso molecular esperado. El fragmento KCTD5 1-45 presentó un peso alrededor de los 32 kDa. El fragmento KCTD5 45-145 muestra una señal de aproximadamente 38 kDa. El fragmento KCTD5 145-234 presenta un peso aproximado de 36.7 kDa (**Fig. 16**). Para el caso de la expresión del péptido KCTD5 45-145, la sensibilidad del método requiere de un mayor tiempo de exposición para captar su señal (**Fig. 16, B** carril correspondiente a KCTD5 46-145).

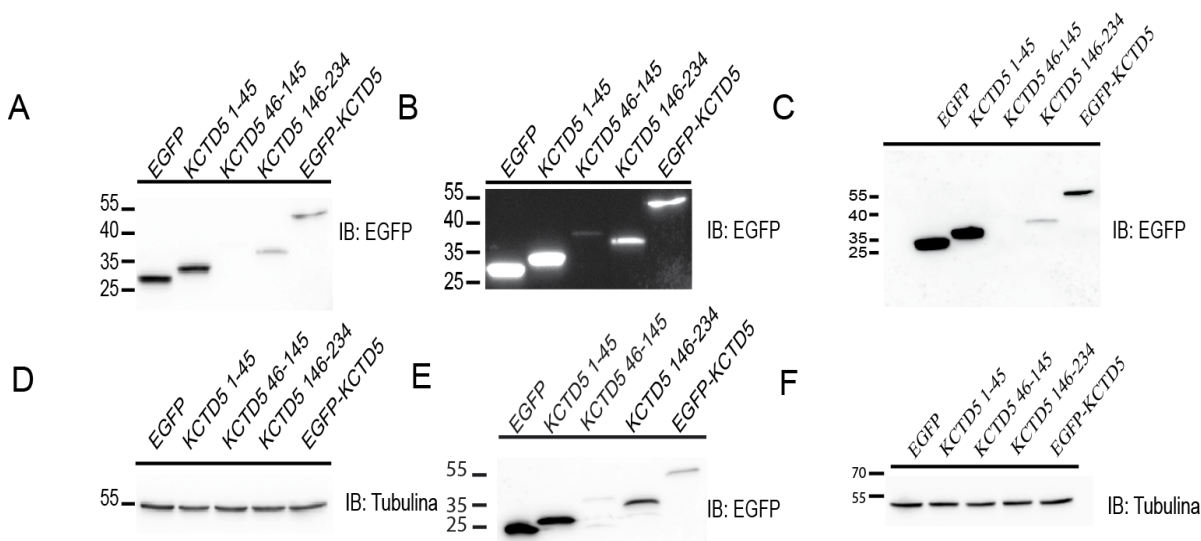


Figura 16. Expresión de fragmentos de KCTD5 en HEK293, B16-F10 y COS7. (A) *Western Blot* contra EGFP de lisados celulares de HEK293 transfectadas con los péptidos y sus correspondientes controles EGFP y KCTD5 fusionado a EGFP (2 min y 30 seg). (B) *Western Blot* contra EGFP mostrado en (A) con un mayor tiempo de exposición (5 minutos). (C) *Western Blot* contra EGFP de lisados celulares de B16-F10 transfectadas con los péptidos y sus correspondientes controles EGFP y KCTD5 fusionado a EGFP. (D) *Western Blot* contra Tubulina como control de carga de cada muestra de (A). (E) *Western Blot* contra EGFP de lisados celulares de COS7 transfectadas con los péptidos y sus respectivos controles, EGFP y KCTD5 fusionado a EGFP. (F) *Western Blot* contra Tubulina como control de carga de cada muestra de (C).

Se realizó la cuantificación densitométrica de la expresión de los fragmentos y sus correspondientes controles. Al realizar la cuantificación de los fragmentos expresados en HEK293, estos fueron normalizados con el control de carga (tubulina). Posteriormente, para la representación gráfica los datos fueron normalizados contra la expresión de EGFP. Se puede observar que el fragmento KCTD5 1-45 tiene una expresión similar a EGFP. Sin embargo, los otros dos fragmentos tuvieron una expresión relativa menor a KCTD5 completo (Fig. 17).

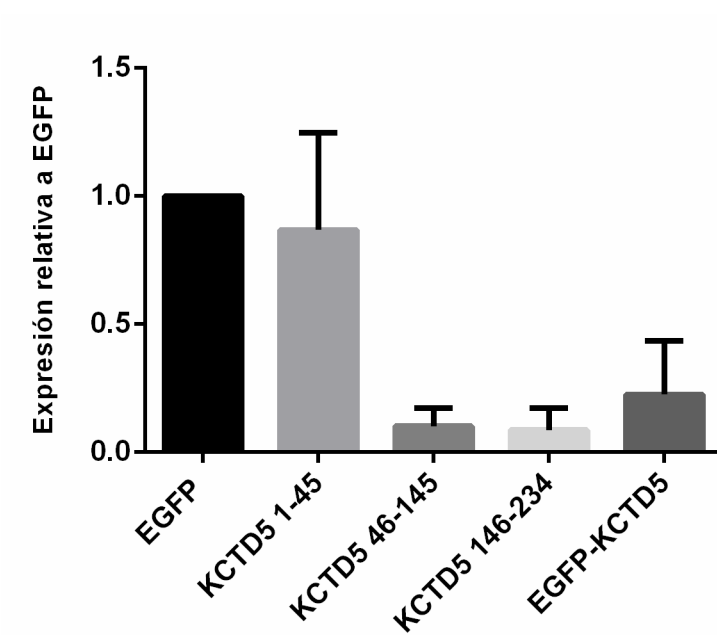


Figura 17. Expresión relativa de fragmentos de KCTD5 en HEK293. Gráfico de barras con la expresión relativa de los péptidos normalizada contra EGFP. Las barras presentan \pm D.E, n = 3.

5.3 Localización subcelular de péptidos basados en KCTD5.

Los distintos trabajos sobre KCTD5 describen su ubicación subcelular como citosólica (Bayón y cols. 2008; Rutz y cols. 2015). En cuanto a los fragmentos de KCTD5 existen diferencias, los cuales pueden tener una ubicación subcelular citoplasmática o citosólica (Bayón y cols. 2008; Rutz y cols. 2015). Buscando aportar nueva información a la localización subcelular de KCTD5, se utilizaron marcadores de compartimientos subcelulares. KDEL es una secuencia aminoacídica específica de destinación al retículo endoplásmico (Munro & Pelham 1987) y se utilizó KDEL-RFP para marcar retículo endoplásmico. Para marcar el aparato de Golgi se utilizó mCherry-Golgi-7, amablemente cedido por el Dr. Michael Davidson (plásmido Addgene # 55052), que es un plásmido de expresión de Golgina, una proteína estructural del aparato de Golgi fusionada a una proteína reportera, mCherry, que presenta a fluorescencia roja. Las células COS7 se transfectaron con cada péptido clonado y los respectivos controles EGFP y KCTD5 fusionado a EGFP, junto con un marcador de ubicación subcelular. Las células fueron observadas en el microscopio de fluorescencia a las 24 horas de expresión. Una vez confirmada la expresión tanto de los péptidos y sus controles, como los marcadores de organelos, las células fueron sembradas en cubreobjetos previamente incubados con fibronectina, con 150.000 células por condición. EGFP-KCTD5 que corresponde a la proteína completa fusionada a EGFP por el lado carboxilo-terminal presenta una localización citoplasmática. Se observa una co-localización con el marcador de retículo endoplásmico KDEL-RFP sugiriendo una localización principalmente perinuclear. Los péptidos KCTD5 1-45, KCTD5 46-145 y KCTD5 146-234, muestran una distribución similar a la presentada por EGFP, citoplasmática, sin proximidad evidente de los marcadores subcelulares (**Fig. 18**).

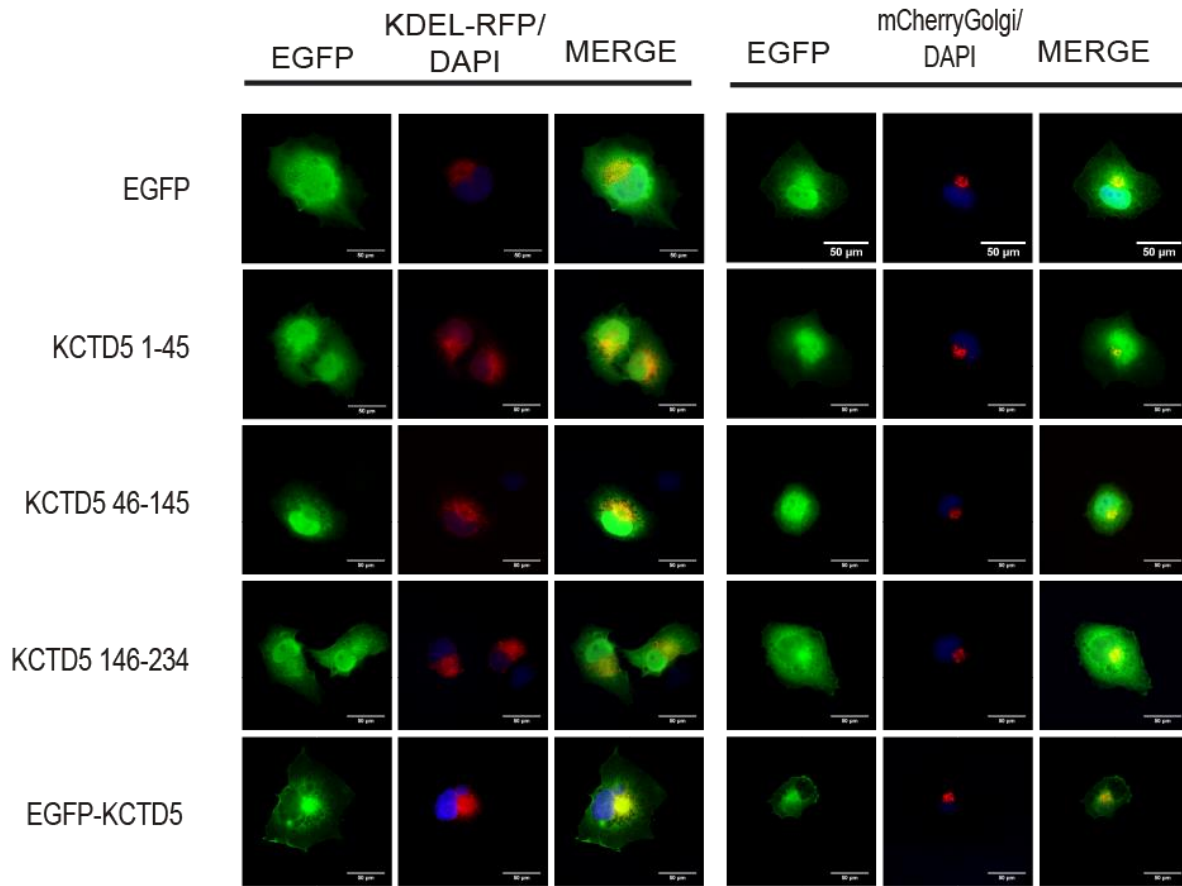


Figura 18. Péptidos basados en KCTD5 y su distribución celular. Células COS7 co-transfectadas con los péptidos, KCTD5 y EGFP como control más los marcadores de compartimentos subcelulares KDEL-RFP (rojo) y mCherry-Golgi (rojo) con 48 h de expresión marcados con anti-EGFP y conjugado con Alexa488 (verde). Los núcleos fueron teñidos con Hoesch (azul). La barra corresponde a 50 μ m.

5.4 Determinar los efectos funcionales de los péptidos en procesos biológicos como la proliferación y migración de células de melanoma

5.5 Ensayo Clonogénico

El ensayo clonogénico es un método ampliamente utilizado para evaluar la capacidad proliferativa de células individuales. Se utiliza para evaluar la formación de colonias en presencia de distintos tratamientos como radiación ionizante, compuestos químicos citotóxicos, manipulación genética, entre otros (Rafehi y cols. 2011). Para evaluar el efecto de los fragmentos de KCTD5 en procesos biológicos como la proliferación, que es un proceso altamente desregulado en enfermedades como cáncer, se utilizó la línea celular B16-F10. Esta línea es un modelo de melanoma de ratón, descrito como cáncer de alta migración (Potez y cols. 2018), donde ya se observó un efecto con los interferentes de KCTD5 en sus adhesiones focales (**Fig.8**).

Las células transfectadas con la sobreexpresión de KCTD5 no presentan un aumento significativo de la eficiencia de sembrado. Las condiciones con los péptidos KCTD5 1-45 y KCTD5 145-234 no presentaron diferencias significativas contra los controles en eficiencia de sembrado (**Fig. 19, B**). Al evaluar el área promedio de las colonias, se observa que no hay una diferencia significativa tanto para KCTD5 contra EGFP como los fragmentos de KCTD5 con sus controles. Tanto KCTD5 completo como sus fragmentos no afectan significativamente a la proliferación en células B16-F10.

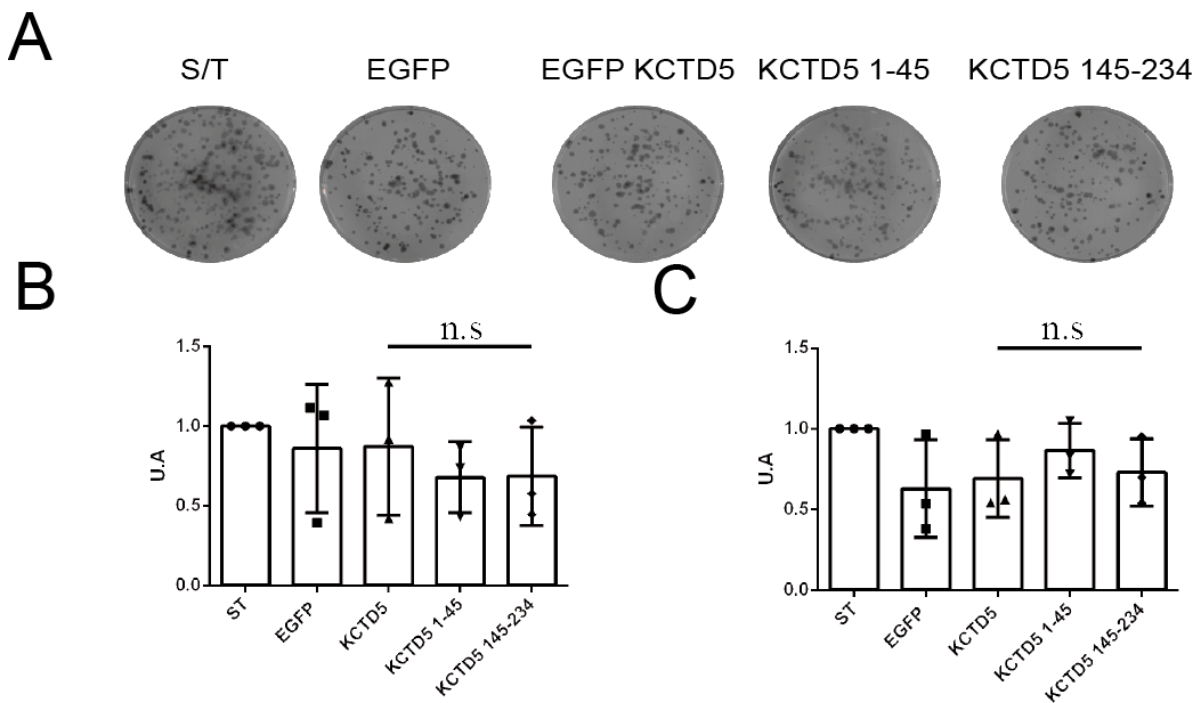


Figura 19. Péptidos Basados en KCTD5 no afectan significativamente la sobrevivencia de células en modelo B16-F10. (A) Fotos representativas de los ensayos clonogénicos en células B16-F10, con transfecciones transientes de los péptidos, EGFP, KCTD5 y sin transfectar (S/T) como control. (Placas de 35 mm) (B) Gráfico normalizado contra la condición sin transfectar de la eficiencia de sembrado con \pm D.E. ($n=3$; $p < 0.05$, comparado con EGFP y KCTD5). (C). Gráfico normalizado contra la condición sin transfectar del área promedio de las colonias formadas en cada condición con \pm D.E. ($n=3$; $p < 0.05$, comparado con EGFP y KCTD5).

5.6 Ensayo Transwell

El ensayo de migración en cámaras *transwell* es un método de evaluación de la capacidad migratoria celular que consiste en cuantificar las células que atraviesan una membrana semipermeable con poros que separa la cámara superior de la inferior. Se utilizó como estímulo quimiotáctico, para la migración de las células, medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino al 10% (Cáceres y cols. 2015). Nuevamente, para evaluar la capacidad migratoria y el efecto de los péptidos en dicho proceso celular, se utilizó la línea celular B16-F10, debido a su naturaleza migratoria. Las células B16-F10 fueron

transfectadas transitoriamente con los fragmentos de KCTD5, EGFP y KCTD5. No se observan diferencias significativas en la migración presentada por las condiciones con KCTD5 o alguno de sus fragmentos al compararlos con el control EGFP (**Fig. 20, B**).

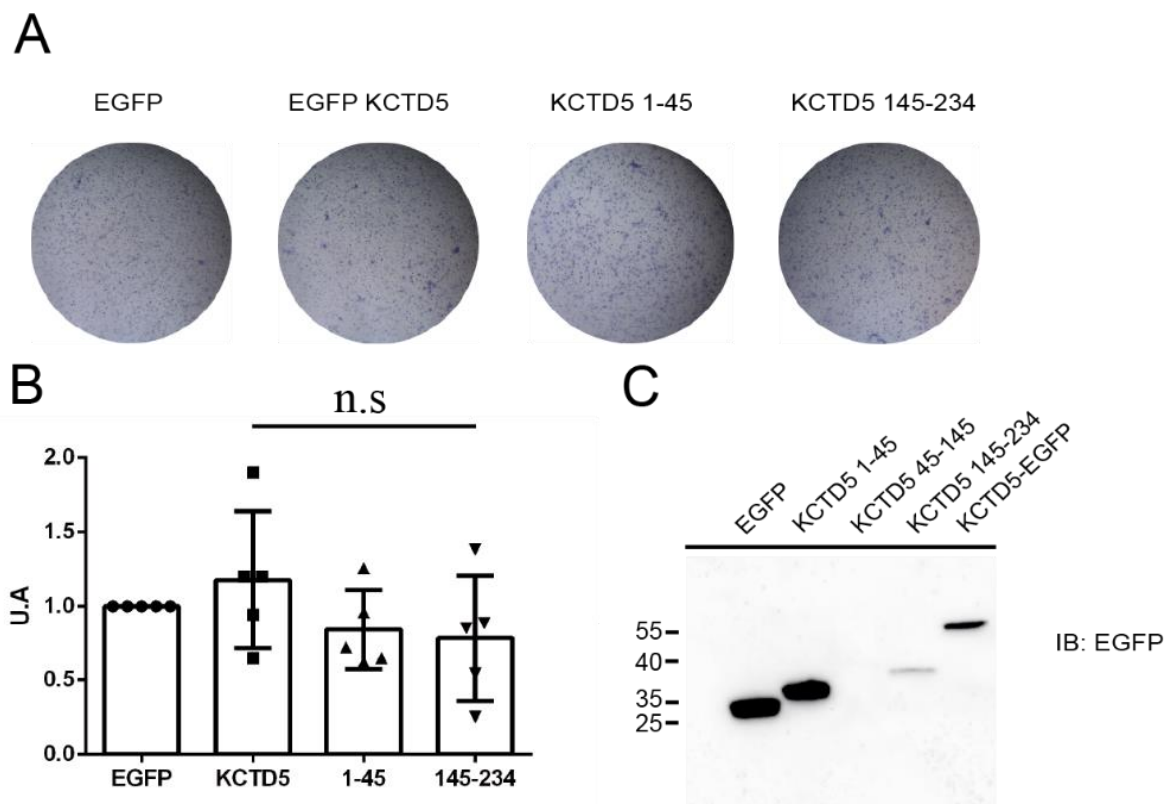


Figura 20. Péptidos basados en KCTD5 no afectan a la migración de células B16-F10. (A) Fotos representativas de la migración de células B16-F10 teñidas con cristal violeta (2% p/v; 10% v/v de etanol). (B) Gráfico normalizado contra la migración de células transfectadas con EGFP con \pm D.E. ($n=5$; $p < 0.05$, comparado con EGFP y KCTD5). (C) Inmunoblot contra EGFP de células B16-F10 transfectadas con los péptidos, EGFP y KCTD5.

6. DISCUSIÓN

La familia KCTD es una familia de proteínas que han sido objeto de múltiples estudios debido a descripciones recientes de la participación de sus miembros en importantes procesos biológicos, como lo son la transcripción (KCTD10), modulación de respuesta inducida por corrientes de potasio en el hipocampo (KCTD8, KCTD12, KCTD12b y KCTD16), ciclo celular (KCTD13), neurodegeneración (KCTD2) y condiciones fisiológicas como hígado graso (KCTD17) entre otras.

En nuestro laboratorio, mediante el estudio de la interactómica de KCTD5, se han encontrado diversas proteínas asociadas como la actina, relacionada a migración celular, adhesión celular, detección de señales mecánicas y contractibilidad (Vedula y cols. 2018), LRSAM1 (*leucine rich repeat and sterile alpha motif containing 1*) relacionado al sistema inmune innato además del procesamiento y presentación de los antígenos mediados por el complejo de histocompatibilidad de clase uno (Ng y cols. 2011) y Cullin 2, cuyo complejo con diferentes adaptadores reconocen sustratos proteicos y regulan su estabilidad mediante poliubiquitinaciones, defectos en dichos complejos llevan a la formación de células neoplásicas y otras enfermedades (Cai y Yang 2016), entre otros.

6.1 Diseño de fragmentos de KCTD5

En este trabajo, se exploró la posibilidad de que fragmentos de KCTD5, podrían apantallar la función de KCTD5 nativo al bloquear la interacción de las proteínas objetivo. Uno de los objetivos de este trabajo es evaluar el efecto de los dominios de KCTD5 por separado en los procesos migratorios y proliferativos, donde KCTD5 ha sido descrito como

un relevante participante en contextos celulares cancerosos. Sin embargo, aún no es clara su mecánica transduccional.

El dominio amino terminal fue incluido en el trabajo como control al no tener estructuras que interactúen con las proteínas objetivo, aunque está descrito que son necesarios los últimos 5 aminoácidos y el dominio BTB para la formación del complejo KCTD5/Cul3. El dominio BTB de KCTD5 fue utilizado, ya que su secuencia ha sido descrita como un dominio de interacción tanto con proteínas que poseen dicho dominio como los que no. Además, el dominio BTB se ha descrito como clave en la interacción de KCTD5 con Cul3. La evidencia bioinformática de dinámicas moleculares (Barone y cols. 2016) y cristalográficas sobre los dominios de KCTD5 (Dementieva y cols. 2009; Pinkas y cols. 2017), describe al carboxilo-terminal como el dominio más probable del reconocimiento de sustratos en la función de KCTD5 como adaptador de la ubiquitinación tipo RING. El carboxilo terminal de KCTD5 presenta la estructura tridimensional como fragmento igual a la que presenta la proteína nativa (Dementieva y cols. 2009). La estructura del carboxilo terminal de KCTD5 expone aminoácidos claves en la interacción con otras proteínas, conocidos como *sticky* (Barone y cols. 2016). En el trabajo de Brockmann y cols. (2017), describen la ubiquitinación de la subunidad beta-gama de las proteínas G, a través del complejo Cul3-KCTD5 siendo reconocido por el extremo carboxilo terminal de KCTD5. En *Insomniac* (Inc, ortólogo de KCTD5 en *Drosophila melanogaster*) la mutación de la arginina 135 por una histidina en el dominio carboxilo terminal, no interrumpe la formación de del complejo con Cul3 ni con los otros Inc, pero elimina toda funcionalidad de Inc como adaptador (Li y cols. 2019). Por lo que era altamente probable que la función biológica de

KCTD5 en cuanto al reconocimiento de sustratos recaiga exclusivamente en el carboxilo terminal.

6.2 Fragmentos de KCTD5 y sus expresiones en las distintas líneas celulares.

Los plasmidios obtenidos de cada fragmento fusionados a EGFP, fueron verificados en su integridad mediante geles de agarosa. En cuanto a contener el dominio correspondiente, fue revisado mediante PCR y secuenciación. Dichos análisis nos permiten aseverar que la construcción fue correcta. Los fragmentos de KCTD5 fusionados a EGFP fueron expresados en las distintas líneas celulares. KCTD5 completo presenta una expresión relativa menor a la de EGFP. En cuanto a la expresión relativa de los fragmentos se observaron diferencias. En el caso del péptido KCTD5 1-45; presenta una expresión relativa similar a la expresión de EGFP. La elevada expresión relativa del fragmento KCTD5 1-45 puede estar sustentada en que no se han descrito aminoácidos ubiquitinables en el dominio amino terminal de KCTD5. El péptido KCTD5 145-234 presenta una expresión relativa menor a la de EGFP y KCTD5 1-45, siendo más similar a la expresión relativa de KCTD5 completo. Datos de nuestro laboratorio muestran que KCTD5 se auto-ubiquitina en condiciones de sobre expresión heteróloga, lo que podría explicar su expresión relativa menor a la de EGFP, a pesar de tener el mismo promotor de expresión, citomegalovirus. Además, estudios *in silico* (Barone y cols. 2016) y de cristalografía (Pinkas y cols. 2017) de KCTD5 sugieren que el carboxilo terminal de KCTD5 interacciona con el carboxilo-terminal de los otros KCTD5, estabilizando la oligomerización de KCTD5. Otro antecedente importante para destacar es la frecuente regulación negativa sobre expresión de KCTD5 como adaptador al ser ubiquitinado por la actividad autocatalítica que posee Cul3 con sus adaptadores (Pintard y cols. 2003; Geyer y cols. 2003). Además, se han descrito ubiquitinaciones para aminoácidos K223 y K225, en el

dominio carboxilo terminal. Esto podría explicar que la expresión tanto del péptido KCTD5 145-234 como la de KCTD5 completo podría estar a su vez siendo regulada por KCTD5 *vía* proteosoma. En particular, el fragmento KCTD5 46-145, presentó una expresión relativa baja en comparación con los otros fragmentos, por lo que, si bien fue comprobable su expresión y su localización subcelular, no fue utilizado como condición en los experimentos. La baja expresión relativa del fragmento KCTD5 46-145 puede deberse a que el dominio BTB esté interactuando con otras proteínas, y estas interacciones generen un estado de estrés que lleve las células a apoptosis, resultando tóxico para las células. Análisis bioinformáticos muestran en la estructura del dominio BTB presenta regiones de naturaleza hidrofóbica implicados en la interacción con Cul3 en la formación del complejo (Li y cols.2019), por lo que no hay que descartar que otra opción de la toxicidad del dominio presentado pueda deberse a que sean agregados proteicos de los péptidos (Holmes y cols. 2014). Por otro lado, el dominio BTB presenta dos residuos ubiquitinables, K67 y K115, y al igual que en el fragmento KCTD5 146-234, cabe sugerir una regulación negativa mediante proteosoma. Esto explicaría también por qué la morfología celular de las COS7 que expresan el fragmento KCTD5 46-145 presenta un área citoplasmática reducida confiriéndole características de estrés y un menor volumen celular (**Fig. 18**). Es por esta razón que no son mostrados los datos con respecto a los ensayos funcionales con la condición del péptido KCTD5 45-145, ya que los resultados no podían ser comprobados por *Western Blot*. Cabe mencionar que las diferencias de expresión en los fragmentos pueden deberse al contexto celular de las líneas celulares a utilizadas.

6.3 Localización subcelular de KCTD5 y sus fragmentos.

La distribución de KCTD5 ha sido descrita con anterioridad en publicaciones de diferentes grupos, siendo citosólica (Bayón y cols. 2008; Rutz y cols.2015). En este trabajo, para KCTD5, pudimos observar la misma distribución, citosólica. Además, de acuerdo con los resultados, podemos agregar que presenta una localización perinuclear y cercano a retículo endoplásmico en un modelo de expresión heteróloga. Sin embargo, en cuanto a la localización subcelular de fragmentos de KCTD5 existen diferencias y similitudes entre lo descrito en la literatura y este trabajo. En el fragmento que comprende la delección del dominio amino terminal de KCTD5, Bayón y cols. (2008) observaron una distribución similar a KCTD5citosólica, mientras Rutz y cols. (2015), para el mismo fragmento describen una distribución similar a EGFP, ósea, citoplasmática. Por otro lado, en el caso de la delección del carboxilo terminal (KCTD5 1-145), tanto Bayón como Rutz, describen una localización citosólica. En el caso de la localización de los péptidos generados en este trabajo, todos presentan una distribución citoplasmática, a excepción del péptido KCTD5 146-234, que además presenta una población con localización citosólica similar a KCTD5 completo. Esta excepción sugiere que el fragmento carboxilo terminal podría interactuar con los otros KCTD5 perinucleares a través de su carboxilo terminal, o estar siendo reconocidos por el complejo KCTD5/Cul3 para su degradación. Otra posibilidad de la diferencia de distribución subcelular de los fragmentos mostrados en el trabajo y los estudios antes realizados puede deberse al método de *tag* utilizado en las proteínas. Las marcas proteicas como *flag* o *myc* corresponden a secuencias aminoacídicas pequeñas, mientras que EGFP tiene un peso estimado de 27 kDa, muy cercano al tamaño completo de KCTD5 (25 kDa aprox.). Es posible que la presencia de EGFP en los fragmentos de KCTD5 afecte estéricamente el

reconocimiento de secuencias de restricción celular o el acceso a aminoácidos para modificaciones postraduccionales que determinen su localización.

6.4 Fragmentos de KCTD5: Influencia en proliferación de células de melanoma.

La principal novedad de este trabajo radica en la evaluación del efecto de los fragmentos de KCTD5 en procesos celulares como la migración y la proliferación. Bayón y cols. (2008), sugieren la participación de KCTD5 en la proliferación de células periféricas de sangre, al aumentar su expresión con estímulos mitóticos. En el caso de modelos de cáncer de mama triple negativo, como el MDA MB 231 y en muestras clínicas de cáncer de mama, se observa una elevada expresión de KCTD5 (Rivas y cols., 2020), lo cual también sugiere la participación de KCTD5 en procesos como migración y proliferación.

En el ensayo clonogénico se evalúa la capacidad proliferativa que poseen células aisladas bajo condiciones como radiación y tratamientos farmacológicos, entre otros (Rafehi y cols. 2011). Los parámetros para evaluar la capacidad proliferativa de las células aisladas radican en el criterio de eficiencia de sembrado (cantidad de colonias formadas) y el área de cada una de estas. Dado que la sobreexpresión de KCTD5 se relaciona a fenotipos cancerosos, era esperable que la condición con sobreexpresión de KCTD5 completo presentara una mayor eficiencia de sembrado acompañado de un aumento en el área promedio de cada colonia. Al no observar diferencias significativas contra los controles, es posible especular la existen mecanismos de compensación en la estabilidad y vida media la proteína. El caso de la regulación de la cantidad de proteica de KCTD5 pareciera ser el más probable, teniendo en cuenta que datos del laboratorio muestran una autoubiquitinación de KCTD5 en sistemas de expresión heterólogos. En *Drosophila*, la sobreexpresión heteróloga de *insomniac* (un ortólogo de KCTD5 que interacciona con Cul3), no muestra diferencias en

cuanto a su función relacionado al comportamiento del sueño (Stravropoulos y cols. 2011; Li y cols. 2017). Además, en *Drosophila* se observa un aumento de la presencia *insomniac* al depletar Cul3, reafirmando la actividad autocatalítica de Cul3 con sus adaptadores (Li, Q. y cols. 2019).

Con respecto al análisis de resultados de este ensayo, existen dos aristas a considerar al momento de evaluar la capacidad proliferativa, los cuales son la eficiencia de sembrado (número de colonias) y el área promedio de colonias. El fragmento KCTD5 1-45 no presenta diferencias significativas en ninguno de los dos criterios. Sin embargo, en el caso del péptido KCTD5 145-234, si bien no presenta diferencias significativas en ninguno de los dos criterios, se observó una tendencia a disminuir la eficiencia de sembrado, por lo que es el resultado más sugerente de un rol en la proliferación por parte de KCTD5, en específico del dominio carboxilo terminal. Esta tendencia no significativa, puede deberse por la baja expresión del fragmento o el tiempo de vida media de los fragmentos *versus* el tiempo que lleva hacer el protocolo (7 días), por lo que el efecto podría verse diluido en el tiempo. El ensayo está diseñado para evaluar la capacidad proliferativa de cada célula individual bajo un estímulo, por lo que cambiar la estrategia a uso de MG132, un inhibidor del proteosoma, en las distintas condiciones podría alargar la vida útil de los fragmentos resultando en un aumento del efecto de estos. La incubación de las células con péptidos permeables de los fragmentos de KCTD5 aquí descritos a concentraciones constantes, podría ser una alternativa a la expresión heteróloga. Esta opción permite mantener la concentración de los fragmentos constante y podría revelar un efecto significativamente mayor que el observado.

6.5 Fragmentos de KCTD5: Influencia en migración de células de melanoma.

Para evaluar la función de los péptidos en el proceso celular de migración, se utilizó el ensayo de migración transwell, donde un estímulo quimiotáctico es separado por una membrana semipermeable con poros, por los cuales las células que migran son atraídas. Dado los antecedentes del laboratorio en células MEF, era esperable un aumento de la capacidad migratoria. Si bien no se observan diferencias significativas, si es observaron tendencias sugerentes de un aumento en la capacidad migratoria en el caso de KCTD5 completo. En el caso del fragmento KCTD5 146-234 también se observan tendencias a la disminución de la capacidad migratoria. Nuevamente entra en juego el factor de expresión relativa de los fragmentos y de KCTD5, que podría ser corregido con los péptidos permeables a concentraciones constantes o con experimentos de sincronización para la expresión.

6.6 Proyecciones.

En este trabajo, se diseñaron y construyeron fragmentos de KCTD5, con el objetivo de establecer su influencia en procesos migratorios y proliferativos. Las diferencias de expresión entre los fragmentos de KCTD5 y KCTD5 son un tópico importante que resolver.

Como proyección sugiero determinar la vida media de los fragmentos realizando ensayos con ciclohexamida y MG132. Conocer la vida media de los fragmentos podría aportar información para explicar los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación y migración.

Otro punto importante para destacar es la posible citotoxicidad del fragmento KCTD5 46-145. Esta posible característica es un factor para considerar al momento de diseñar

péptidos permeables de uso clínico, por lo que sugiero además agregar ensayos de toxicidad como el de MTT para evaluar viabilidad celular en presencia de los péptidos.

El desarrollo de péptidos permeables basados en los fragmentos aquí descritos podría revelar a magnitud real del efecto observado en los péptidos expresados. También otras ventajas que ofrece la estrategia de generar péptidos permeables es mantener la cantidad de péptidos constante.

Finalmente, este trabajo provee herramientas como el fragmento KCTD5 146-234, el cual puede ser utilizado para realizar otras aproximaciones proteómicas. Inmunoprecipitaciones y la posterior espectrometría de masas podrían revelar proteínas que interactúe exclusivamente con el carboxilo terminal de KCTD5.

7. CONCLUSIÓN

Se construyeron correctamente los péptidos de cada dominio de KCTD5 fusionados a EGFP. Se expresó cada fragmento en las líneas celulares HEK293, Cos7 y B16-F10. Los fragmentos de KCTD5 presentan diferencias de expresión relativa en las líneas celulares utilizadas.

KCTD5 presenta una localización citosólica predominantemente perinuclear y cercano al retículo endoplásmico. Los fragmentos de KCTD5 fusionados a EGFP presentan una localización subcelular citoplasmática.

La expresión de los fragmentos de KCTD5 fusionados a EGFP no influyó significativamente procesos biológicos como proliferación y migración.

BIBLIOGRAFÍA

Adessi, C., y Soto, C. (2002). Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability. *Current medicinal chemistry*, 9(9), 963-978.

Barone Daniela, Balasco Nicole y Vitagliano Luigi (2016). KCTD5 is endowed with large, functionally relevant, interdomain motions. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 34(8), 1725-1735.

Bayón, Y., Trinidad, A. G., de la Puerta, M. L., del Carmen Rodríguez, M., Bogetz, J., Rojas, A., ... y Alonso A. (2008). KCTD5, a putative substrate adaptor for cullin3 ubiquitin ligases. *The FEBS journal*, 275(15), 3900-3910.

Boada, M., Antunez, C., Ramirez-Lorca, R., DeStefano, A. L., Gonzalez-Perez, A., Gayan, J., ... y Ruiz A. (2014). ATP5H/KCTD2 locus is associated with Alzheimer's disease risk. *Molecular psychiatry*, 19(6), 682-7.

Brockmann, M., Blomen, V. A., Nieuwenhuis, J., Stickel, E., Raaben, M., Bleijerveld, O. B., ... y Brummelkamp, T. R. (2017). Genetic wiring maps of single-cell protein states reveal an off-switch for GPCR signalling. *Nature*, 546(7657), 307-311.

Cáceres, M., Ortiz, L., Recabarren, T., Romero, A., Colombo, A., Leiva-Salcedo, E., ... y Cerda O. (2015). TRPM4 is a novel component of the adhesome required for focal adhesion disassembly, migration and contractility. *PloS one*, 10(6), e0130540.

Cai, W., y Yang, H. (2016). The structure and regulation of Cullin 2 based E3 ubiquitin ligases and their biological functions. *Cell division*, 11(1), 7-17.

Chen, H. C. (2005). Boyden chamber assay. *Methods in molecular biology*, 294, 15-22.

Cheng, J., Guo, J., Wang, Z., North, B. J., Tao, K., Dai, X., y Wei, W. (2018). Functional analysis of Cullin 3 E3 ligases in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1869(1), 11-28.

Chen, Y., Yang, Z., Meng, M., Zhao, Y., Dong, N., Yan, H., ... y Shao, F. (2009). Cullin mediates degradation of RhoA through evolutionarily conserved BTB adaptors to control actin cytoskeleton structure and cell movement. *Molecular cell*, 35(6), 841-855.

Chen, Z., Sui, J., Zhang, F., y Zhang, C. (2015). Cullin family proteins and tumorigenesis: genetic association and molecular mechanisms. *Journal of Cancer*, 6(3), 233-242.

Clague, M. J., Heride, C., y Urbé, S. (2015). The demographics of the ubiquitin system. *Trends in cell biology*, 25(7), 417-426.

Di Marcotullio, L., Ferretti, E., De Smaele, E., Argenti, B., Mincione, C., Zazzeroni, F., ... y Gulino A. (2004). RENKCTD11 is a suppressor of Hedgehog signaling and is deleted in human medulloblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29), 10833-10838.

Eden, Eran, Geva-Zatorsky, Naama, Issaeva, Irina, Cohen, Ariel, Dekel, Erez, Danon, Tamar, . . . y Alon, Uri. (2011). Proteome Half-Life Dynamics in Living Human Cells. *Science*, 331(6018), 764-768.

Foot, N., Henshall, T., y Kumar, S. (2017). Ubiquitination and the regulation of membrane proteins. *Physiological reviews*, 97(1), 253-281.

Fritzius, T., Turecek, R., Seddik, R., Kobayashi, H., Tiao, J., Rem, P. D., ... y Bettler, B. (2017). KCTD hetero-oligomers confer unique kinetic properties on hippocampal GABAB receptor-induced K⁺ Currents. *Journal of Neuroscience*, 37(5), 1162-1175.

Furukawa, M., He, Y. J., Borchers, C., y Xiong, Y. (2003). Targeting of protein ubiquitination by BTB–Cullin 3–Roc1 ubiquitin ligases. *Nature cell biology*, 5(11), 1001-1007.

Geyer, R., Wee, S., Anderson, S., Yates III, J., y Wolf, D. A. (2003). BTB/POZ domain proteins are putative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases. *Molecular cell*, 12(3), 783-790.

Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison III, C. A., y Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods*, 6(5), 343-345.

Glickman, M. H., y Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews*, 82(2), 373-428.

He, H., Peng, Y., Fan, S., Chen, Y., Zheng, X., y Li, C. (2018). Cullin3/KCTD 5 induces mono-ubiquitination of Δ Np63 α and impairs its activity. *FEBS letters* 592 (13) 2334-2340.

Hershko, A., y Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry*, 67(1), 425-479.

Holmes, W. M., Klaips, C. L., y Serio, T. R. (2014). Defining the limits: Protein aggregation and toxicity in vivo. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 49(4), 294-303.

Huang, M. Y., Wang, H. M., Chang, H. J., Hsiao, C. P., Wang, J. Y., y Lin, S. R. (2012). Overexpression of S100B, TM4SF4, and OLFM4 genes is correlated with liver metastasis in Taiwanese colorectal cancer patients. *DNA and cell biology*, 31(1), 43-49.

Huotari, J., Meyer-Schaller, N., Hubner, M., Stauffer, S., Katheder, N., Horvath, P., ... y Peter, M. (2012). Cullin-3 regulates late endosome maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(3), 823-828.

Kim, E.-J., Kim, S.-H., Jin, X., Jin, X., y Kim, H. (2017). KCTD2, an adaptor of Cullin3 E3 ubiquitin ligase, suppresses gliomagenesis by destabilizing c-Myc. *Cell Death and Differentiation*, 24(4), 649–659.

Kim, K., Ryu, D., Dongiovanni, P., Ozcan, L., Nayak, S., Ueberheide, B., ... y Pajvani, U. B. (2017). Degradation of PHLPP2 by KCTD17, via a glucagon-dependent pathway, promotes hepatic steatosis. *Gastroenterology*, 153(6), 1568-1580.

Kim, S. Y., Han, B. K., Kim, E. K., Choi, W. J., Choi, Y., Kim, H. H., y Moon, W. K. (2017). Breast cancer detected at screening US: survival rates and clinical-pathologic and imaging factors associated with recurrence. *Radiology*, 284(2), 354-364.

Kousi, M., Anttila, V., Schulz, A., Calafato, S., Jakkula, E., Riesch, E., ... y Alehan, F. (2012). Novel mutations consolidate KCTD7 as a progressive myoclonus epilepsy gene. *Journal of medical genetics*, 49(6), 391-399.

Li, Q., Kellner, D. A., Hatch, H. A., Yumita, T., Sanchez, S., Machold, R. P., ... y Stavropoulos, N. (2017). Conserved properties of *Drosophila* Insomniac sleep regulation and synaptic function. *PLoS genetics*, 13(5), e1006815.

Li, Q., Lim, K. Y., y Stavropoulos, N. (2019). Structural and behavioral analysis reveals that Insomniac impacts sleep by functioning as a Cul3 adaptor. *bioRxiv*, 689471.

Li, S., Zhao, J., Shang, D., Kass, D. J., y Zhao, Y. (2018). Ubiquitination and deubiquitination emerge as players in idiopathic pulmonary fibrosis pathogenesis and treatment. *JCI Insight*, 3(10), e120362.

Liu, Z., Xiang, Y., & Sun, G. (2013). The KCTD family of proteins: structure, function, disease relevance. *Cell & bioscience*, 3(1),45-49.

Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., ... y Bryant, S. H. (2006). CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic acids research*, 35, (Database issue) D237-40.

Mizuno, H., Kitada, K., Nakai, K., y Sarai, A. (2009). PrognosScan: a new database for meta-analysis of the prognostic value of genes. *BMC medical genomics*, 2(1), 18-28.

Munro, S., y Pelham, H. R. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*, 48(5), 899-907.

Ng, A. C., Eisenberg, J. M., Heath, R. J., Huett, A., Robinson, C. M., Nau, G. J., y Xavier, R. J. (2011). Human leucine-rich repeat proteins: a genome-wide bioinformatic categorization and functional analysis in innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Suppl 1), 4631-4638.

O'Keefe, E. P. (2013). "siRNAs and shRNAs: Tools for protein knockdown by gene silencing" [<https://www.labome.com/method/siRNAs-and-shRNAs-Tools-for-Protein-Knockdown-by-Gene-Silencing.html>] [Online]. Word Lab.

Pickart, C. M., y Eddins, M. J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1695(1-3), 55-72.

Pinkas, D. M., Sanvitale, C. E., Bufton, J. C., Sorrell, F. J., Solcan, N., Chalk, R., ... y Bullock, A. N. (2017). Structural complexity in the KCTD family of Cullin3-dependent E3 ubiquitin ligases. *Biochemical Journal*, 474(22), 3747-3761.

Pintard, L., Willis, J. H., Willems, A., Johnson, J. L. F., Srayko, M., Kurz, T., ... y Peter, M. (2003). The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature*, 425(6955), 311-316.

- Potez, M., Trappetti, V., Bouchet, A., Fernandez-Palomo, C., Güç, E., Kilarski, W. W., ... y Djonov, V. (2018). Characterization of a B16-F10 melanoma model locally implanted into the ear pinnae of C57BL/6 mice. *PloS one*, *13*(11), e0206693.
- Rafehi, H., Orłowski, C., Georgiadis, G. T., Ververis, K., El-Osta, A., y Karagiannis, T. C. (2011). Clonogenic assay: adherent cells. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (49), 1-3.
- Rajalingam, K., y Dikic, I. (2016). Expanding the ubiquitin code. *Cell*, *164*(5), 1074-1074.
- Rivas, J., Díaz, N., Silva, I., Morales, D., Lavanderos, B., Álvarez, A., ... y Cerda, O. (2020). KCTD5, a novel TRPM4-regulatory protein required for cell migration as a new predictor for breast cancer prognosis. *FASEB J.*, Aceptado, doi: 10.1096/fj.201901195RRR.
- Rotin, D., y Kumar, S. (2009). Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nature reviews Molecular cell biology*, *10*(6), 398-409.
- Rutz, N., Heilbronn, R., y Weger, S. (2015). Interactions of cullin3/KCTD5 complexes with both cytoplasmic and nuclear proteins: Evidence for a role in protein stabilization. *Biochemical and biophysical research communications*, *464*(3), 922-928.
- Sarmiento, D., Montorfano, I., Cerda, O., Cáceres, M., Becerra, A., Cabello-Verrugio, C., ... y Varela, D. (2015). Increases in reactive oxygen species enhance vascular endothelial cell migration through a mechanism dependent on the transient receptor potential melastatin 4 ion channel. *Microvascular research*, *98*, 187-196.
- Sarikas, A., Hartmann, T., y Pan, Z. Q. (2011). The cullin protein family. *Genome biology*, *12*(4), 220-231.
- Singer, J. D., Gurian-West, M., Clurman, B., y Roberts, J. M. (1999). Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes & development*, *13*(18), 2375-2387.

Skoblov, M., Marakhonov, A., Marakasova, E., Guskova, A., Chandhoke, V., Bireddinc, A., y Baranova, A. (2013). Protein partners of KCTD proteins provide insights about their functional roles in cell differentiation and vertebrate development. *Bioessays*, 35(7), 586-596.

Smaele, E. D., Marcotullio, L. D., Ferretti, E., Screpanti, I., Alesse, E., y Gulino, A. (2004). Chromosome 17p deletion in human medulloblastoma: a missing checkpoint in the Hedgehog pathway. *Cell Cycle*, 3(10), 1263-1266.

Smaldone G, Pirone L, Balasco N, Di Gaetano S, Pedone EM y Vitagliano L. (2015) Cullin 3 Recognition Is Not a Universal Property among KCTD Proteins. *PLoS ONE* 10(5): e0126808.

Stavropoulos, N., y Young, M. W. (2011). insomniac and Cullin-3 regulate sleep and wakefulness in *Drosophila*. *Neuron*, 72(6), 964-976.

Taguchi, K., Motohashi, H., y Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to cells*, 16(2), 123-140.

Teng, X., Aouacheria, A., Lionnard, L., Metz, K. A., Soane, L., Kamiya, A., y Hardwick, J. M. (2019). KCTD: A new gene family involved in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 25(7), 887-902.

Upadhyay, A., Joshi, V., Amanullah, A., Mishra, R., Arora, N., Prasad, A., y Mishra, A. (2017). E3 Ubiquitin Ligases Neurobiological Mechanisms: Development to Degeneration. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, article.151, 1-21.

Van Bogaert, P., Azizieh, R., Désir, J., Aeby, A., De Meirleir, L., Laes, J. F., ... y Abramowicz, M. J. (2007). Mutation of a potassium channel–related gene in progressive myoclonic epilepsy. *Annals of neurology*, 61(6), 579-586.

Vedula, P., y Kashina, A. (2018). The makings of the ‘actin code’: regulation of actin's biological function at the amino acid and nucleotide level. *J Cell Sci*, 131(9), 1-86, jcs215509.

Wu, C. (2007). Focal adhesion: a focal point in current cell biology and molecular medicine. *Cell adhesion & migration*, 1(1), 13-18.

Xu, L., Wei, Y., Reboul, J., Vaglio, P., Shin, T. H., Vidal, M., ... y Harper, J. W. (2003). BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature*, 425(6955), 316-321.

Zhou, J., Ren, K., Liu, X., Xiong, X., Hu, X., y Zhang, J. (2005). A novel PDIP1-related protein, KCTD10, that interacts with proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase δ . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1729(3), 200-203.