



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**

“Papel diferencial del motivo de unión a PDZ en la remodelación del citoesqueleto de actina inducida por el receptor Latrofilina-2 y su variante A278P asociada con cáncer ovárico”

TESIS

Que presenta:

Q.B.P. Brenda Rodríguez Hernández

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA
CELULAR**

Director de la Tesis: Dr. Antony Boucard Jr.

Ciudad de México

Julio, 2020

Este proyecto fue realizado en el laboratorio 54 del departamento de Biología Celular en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), bajo la dirección del Dr. Antony Boucard Jr.

Se extiende un agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca con número de apoyo **723817** a través del identificador de becario: CVU **925036**. Así como a las fuentes de financiamiento: Convocatoria Ciencia Básica SEP-CONACyT #221568, Atención a Problemas Nacionales #4687, Programa de Apoyo para actividades científicas, tecnológicas y de innovación- Apoyo para adquisición de Infraestructura en instituciones y laboratorios de investigación especializada 2019 #302758. Dartmouth College: Premio Munck-Pferfferkorn, que me permitieron el cumplimiento de la Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Celular.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a todas y cada una de las personas que directa o indirectamente me apoyaron en el desarrollo de este trabajo.

A mis asesores el **Dr. Saúl Villa Treviño** y **Dr. Enrique Othón Hernández González**, por las observaciones realizadas y sus aportaciones en mi formación académica no solo como asesores de este proyecto, también como grandes profesores en clases.

A mi director de tesis el **Dr. Antony Boucard Jr.** por haberme aceptado en su grupo de trabajo y estar siempre dispuesto a resolver dudas. Además, por su ayuda constante en nuestra formación académica a través de asesorías, ensayos y seminarios, pero sobre todo gracias por crear un ambiente de trabajo ameno.

Gracias a mis compañeros de laboratorio: **Dianita, Monse, José Carlos, Fany, Sofía** y tía **Kerlys**, siempre me ayudaron a resolver mis dudas, me hicieron sentir en un ambiente de trabajo agradable y sobre todo divertido. Los admiro a todos y no solo por su capacidad académica, también por los talentos que poseen al bailar, cantar y demás habilidades que me han sorprendido. Debo hacer una mención especial a mis mamás académicas **Sheila** y **Judith**, por todo el tiempo, el esfuerzo que dedicaron a enseñarme desde cero y por compartir conmigo todos lo que han aprendido de sus experiencias, son muy buenas mentoras.

Por supuesto debo mencionar a mis compañeros de generación, un grupo pequeño pero unido: **Erick** por todas las bromas y chistes entre clases, **Caro** por los refrigerios deliciosos, **Daniela** por compartirnos de tu cafetera que fue vital para mantenernos despiertos, **Daniel** por formar parte del equipo de básquetbol y salvarnos de no quedar al final de la tabla y **Vianney** por el apoyo en el laboratorio donde nos tocó estar juntas, eres una gran persona. Además, a mi equipo irresponsable **Andy** y **Romel**, no solo por formar un gran equipo en clases, también por su amistad, por las salidas y alguna que otra locura.

De manera personal a mis amigos que aun en la distancia siempre me dieron un pequeño mensaje de aliento, **Juan, Margarita** y **Sandy**, gracias por preocuparse, por los consejos y sobre todo por la amistad.

A **Felipe** por escucharme, darme ánimos, ayudarme a practicar mis exposiciones y sobre todo estar ahí cuando siento que todo es demasiado difícil, simplemente gracias.

A **mis padres**, quienes siempre han sido mi mayor motivación, gracias por el apoyo, la confianza y el amor que me han dado. También a mi hermana **Gloria** y mi sobrino **Kevin**, por lo mensajes y videos que siempre me alientan, los quiero mucho.

BRENDA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

DEDICATORIA

A mis padres **Cleotilde Hernández y Hermenegildo Rodríguez.**

Ustedes me han enseñado el valor del esfuerzo, de la valentía y del amor. Me siento sumamente orgullosa de ser su hija y siempre serán mi ejemplo de vida.

Al maestro **José de Guadalupe Mejía “Lupito”**

Jamás olvidare cada uno de los chistes en clase, de las enseñanzas y de la dedicación que tenía con cada uno de sus alumnos, me adentro en el mundo de la ciencia y siempre estaré agradecida por ello. ¡Hasta siempre!

BRENDA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

Lista de figuras

Figura 1. Estructura general de los aGPCR.....	4
Figura 2. Estructura general de las latrofilinas.....	6
Figura 3. Células HEK293T transfectadas con Lphn2.....	11
Figura 4. Motivo de unión a PDZ de Lphn2.	13
Figura 5. Interacción de Shank con el citoesqueleto de actina..	15
Figura 6 . Estructura molecular de proteínas que interactúan con el motivo de unión a PDZ de Latrofilina.	16
Figura 7. Especificaciones de reactivos y programación de PCR.....	23
Figura 8. Producto de PCR de pCAGGS-Lphn2vA278P sin el motivo de unión a PDZ.32	
Figura 9. Comprobación por cortes enzimáticos de ANDp de pCAGGS-Lphn2vA278PΔPBM.....	33
Figura 10. Construcción de pCAGGS-Lphn2vΔPBM.....	34
Figura 11. Expresión proteica de Lphn2vΔPBM y Lphn2vA278PΔPBM detectados con anti-Flag. a).....	36
Figura 12. Expresión proteica de Lphn2vΔPBM y Lphn2vA278PΔPBM detectados con anti-GFP.....	37
Figura 13. Efecto del PBM sobre la expresión del receptor en superficie celular.	38
Figura 14. Cambio en la morfología de células HEK293T en ausencia del motivo de unión a PDZ.....	39
Figura 15. Cambios poblacionales de las estructuras de actina inducidos por el motivo de unión a PDZ.	40
Figura 16. Cambios en las estructuras de actina por el motivo de unión a PDZ.....	43
Figura 17. Efecto de Lphn2vΔPBM y Lphn2vA278PΔPBM sobre perímetro.	45
Figura 18. Efecto de ΔPBM sobre el área.....	47
Figura 19. Secuenciación de Lphn2vA278PΔPBM en el NTF.	55
Figura 20. Secuenciación de Lphn2vA278PΔPBM en el CTF.	56
Figura 21. Secuenciación del NTF de Lphn2vΔPBM.....	57
Figura 22. Secuenciación del CTF de Lphn2vΔPBM.....	57
Figura 23. Expresión de RNA de las isoformas de Shank, MAGI y PSD-95.....	58

Lista de tablas

Tabla 1. Características de la preparación de reactivos utilizados en materiales y métodos.....	20
Tabla 2. Anticuerpos utilizados en los ensayos de Western Blot.....	22
Tabla 3. Diseño de oligonucleótidos.....	23
Tabla 4. Especificaciones de reactivos para la digestión con endonucleasas.....	24
Tabla 5. Reactivos para ligación.....	25
Tabla 6. Complejo de transfección	28
Tabla 7. Características de lectura en microscopio confocal.....	31

CONTENIDO

I. RESUMEN.....	1
1.1 Abstract.....	2
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).....	3
2.1.2 GPCRs de adhesión (aGPCR).....	3
2.2 Latrofilinas.....	5
2.2.1 Ligandos de latrofilinas.....	6
2.2.2 Funciones asociadas a latrofilinas.....	8
2.3 Latrofilina 2.....	9
2.3.1 Latrofilina 2 y su participación en cáncer.....	10
2.4 Remodelación del citoesqueleto de actina.....	11
2.5 Dominios PDZ.....	12
2.5.1 Proteínas con dominios PDZ / guanilato quinasas y su interacción con latrofilinas.....	14
III. JUSTIFICACIÓN.....	17
IV. HIPÓTESIS.....	18
V. OBJETIVOS.....	18
General.....	18
Específicos.....	18
VI. DIAGRAMA DE TRABAJO.....	19
VII. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	20
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	23
<i>Digestión enzimática</i>	24
<i>Purificación de DNA en gel de agarosa</i>	24
<i>Ligación</i>	25
<i>Transformación de bacterias competentes</i>	25
<i>Extracción de ADN plasmídico a partir de miniprep</i>	26
<i>Midiprep</i>	26
<i>Purificación de ADNp por PEG</i>	27
<i>Secuenciación</i>	27
<i>Preparación de cubreobjetos</i>	28

<i>Transfección de células HEK293T</i>	28
<i>Extracción de proteínas totales</i>	29
<i>Western Blot</i>	29
<i>Detección de la expresión del receptor en la superficie celular (DECS)</i>	29
<i>Preparación de muestras para microscopia confocal</i>	30
<i>Análisis estadístico</i>	31
IX. RESULTADOS	32
Construcciones pCAGGS-Lphn2vA278PΔPBM y pCAGGS-Lphn2vΔPBM	32
Expresión de pCAGGS-Lphn2vΔPBM y pCAGGS-Lphn2vA278PΔPBM en células HEK293T: proteínas totales	34
Expresión de pCAGGS-Lphn2vΔPBM y pCAGGS-Lphn2vA278PΔPBM sobre la membrana celular	38
Efecto de ΔPBM sobre la morfología de células HEK293T	39
Efecto del motivo de unión a PDZ sobre parámetros celulares	44
X. DISCUSIÓN	48
XI. CONCLUSIONES	54
XII. PERSPECTIVAS	54
XIII. ANEXOS	55
Anexo 1. Secuenciación de Lphn2vA278PΔPBM	55
Anexo 2. Secuenciación de Lphn2vΔPBM	57
Anexo 3. Niveles de expresión de Shank, MAGI y PSD-95 en células HEK293	58
XIV. BIBLIOGRAFÍA	59

I. RESUMEN

Las latrofilinas son una subfamilia de los receptores de adhesión acoplados a proteínas G, caracterizados por una fracción N-terminal (NTF) muy larga que contiene múltiples dominios de adhesión celular y el sitio de autoproteólisis. Actualmente, se tienen reportadas tres isoformas latrofilina en mamíferos (Lphn1-3) entre las que destaca Lphn2, resultando ser esencial para el desarrollo embrionario. En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que la sobreexpresión de este receptor en células HEK293T induce un redondeamiento celular y la pérdida de estructuras de actina como lamelipodios y filopodios. Además, la expresión aberrante de Lphn2, así como la presencia de mutaciones en su secuencia se ha relacionado con el desarrollo de patologías como cáncer, donde se identificó a la variante A278P, una mutación que afecta la función de adhesión de Lphn2. A pesar de reproducir algunas de las características morfológicas de Lphn2, la variante induce cambios notables sobre la formación de blebs, resultando curioso el cambio que desempeña las mutaciones en el NTF sobre la señalización intracelular. Por lo cual se abren dos brechas importantes, el mecanismo molecular que subyace entre el receptor y los cambios morfológicos, así como las afectaciones que induce la presencia de mutaciones en este mecanismo. El motivo de unión a PDZ representa un sitio de andamiaje para proteínas asociadas a actina, importante componente del citoesqueleto y determinante en la morfología celular. Por lo anterior, este trabajo se enfocó en evaluar el papel del motivo de unión a PDZ (PBM) de Latrofilina 2 y de su variante A278P sobre la morfología celular. Para cumplir con nuestro objetivo, utilizamos ensayos de PCR y cortes enzimáticos con KpnI para deletar el PBM de la variante A278P y Lphn2, obteniendo así Lphn2vA278P Δ PBM y Lphn2vP Δ PBM. En los resultados se puede observar que la delección del PBM de Lphn2 no afecta la expresión de proteína total, sin ocurrir de la misma forma para la variante A278P, donde induce un aumento sobre la proteólisis del receptor, lo cual se reflejó en disminución significativa del 63% de la proporción NTF/Receptor no cortado (RNC). Por otra parte, la evaluación de la morfología celular indica que el Δ PBM en Lphn2 previene la pérdida de filopodios y lamelipodios, siendo en este último de forma individual y poblacional, no obstante, de forma diferencial solo se previene la pérdida de filopodios por célula para la variante A278P. En concordancia con la anterior, los valores promedio del área celular, área del citosol y perímetro celular son mayores para Lphn2vP Δ PBM en comparación con Lphn2v WT, en contraste en Lphn2vA278P Δ PBM no se observan cambios al ser comparados con Lphn2vA278P. En sumatoria, los resultados indican que el PBM contribuye activamente en el remodelado del citoesqueleto de actina, función que se pierde parcialmente con la variante A278P, lo que sugiere que una alteración en el patrón de señalización de Lphn2 por presencia de mutaciones somáticas, lo cual podría definir uno de los factores determinantes involucrados en el desarrollo del cáncer.

1.1 Abstract

Latrophillins are a subfamily of the adhesion G protein-coupled receptors, which characterized by a very long N-terminal fraction (NTF) containing multiple cell adhesion domains and the site of autoproteolysis. Currently, there are three reported latrophillin isoforms in mammals (Lphn1-3), among which Lphn2 stands out, proving to be essential for embryonic development. In our working group, we show that overexpression of this receptor in HEK293T cells induces cell rounding and the loss of actin structures such as lamellipodia and filopodia. Furthermore, the aberrant expression of Lphn2, as well as the presence of mutations in its sequence, have been related to the development of pathologies such as cancer, where the variant A278P was identified, a mutation that affects the adhesion function of Lphn2. Despite reproducing some of the morphological characteristics of Lphn2, the variant induces notable changes in the formation of blebs, the change that NTF mutations play in intracellular signaling is curious. Therefore, two important questions arise, the molecular mechanism that underlies the receptor and morphological changes, as well as the effects induced by the presence of mutations in this mechanism. The PDZ-binding motif represents a scaffolding site for actin-associated proteins, an important component of the cytoskeleton and a determinant in cell morphology. For the above, this work focused on evaluating the role of the PDZ-binding motif (PBM) of Lphn2 and its variant A278P on cell morphology. To achieve our goal, we used PCR assays and enzyme cleavages with KpnI for deletion of the PDZ-binding motif of the variant A278P and Lphn2, thus obtaining Lphn2vA278P Δ PBM and Lphn2vP Δ PBM. The results show that the deletion of the PBM of Lphn2 does not affect the expression of total protein, without occurring in the same way for the A278P variant, where it induces an increase in receptor proteolysis, which is reflected in a significant decrease of 63% of the NTF/Uncut Receptor (RNC) ratio. On the other hand, the evaluation of cell morphology indicates that the Δ PBM in Lphn2 prevents the loss of filopodia and lamellipodia, the last one being individually and population, differentially, only the loss of filopodia per cell is prevented for the A278P variant. According with the last, the average values of the cell area, cytosol area and cell perimeter are higher for Lphn2vP Δ PBM compared to Lphn2v WT, in contrast, in Lphn2vA278P Δ PBM we do not observed changes when compared to Lphn2vA278P. In conclusion, the results indicate that PBM actively contributes to the remodeling of the actin cytoskeleton, a function that is partially lost with the A278P variant, suggesting that an alteration in the Lphn2 signaling pattern due to the presence of somatic mutations, which could define one of the determining factors involved in the development of cancer.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)

En el ser humano existen al menos 200 diferentes tipos de células que varían en su forma, función y tamaño, pero todas actúan de forma coordinada gracias a las redes de señalización que establecen entre ellas. La capacidad de las células de responder a estas señales está dada en gran medida por la presencia de receptores en su membrana, los cuales le permiten modular la recepción de estímulos y la emisión de respuestas (Cooper & Hausman , 2017).

Una de las familias de receptores de membrana más estudiados son los GPCRs (por sus siglas en inglés G protein-coupled receptors), los cuales son capaces de responder a una gran variedad de estímulos desde odorantes, aminas, neurotransmisores, luz, hormonas, etc. Estructuralmente se caracterizan por la presencia de siete segmentos alfa-hélices transmembranales, que a su vez están conectados por 3 asas intracelulares y 3 extracelulares, además de la presencia de un amino y carboxilo terminal (Rosenbaum, et al., 2009). A través del análisis filogenético, los GPCRs en organismos vertebrados se han clasificado en 5 subfamilias: receptores tipo rodopsina, secretina, glutamato, *frizzled* y receptores de adhesión (Fredriksson, et al., 2003).

2.1.2 GPCRs de adhesión (aGPCR)

La característica principal de los aGPCRs está dada por la presencia de un N-terminal muy largo, al cual se le atribuye la funcionalidad de adhesión, siendo este el lugar de acoplamiento para la interacción entre célula-célula y célula-matriz extracelular, seguido de una región de autoproteólisis llamada GAIN (GPCR-Autoproteolysis Inducing), que de manera conjunta forman parte del ectodominio. También existen dos regiones del receptor que están determinados por el sitio de autoproteólisis (GPS), denominados NTF y CTF (Figura 1) (de Graaf, et al., 2016).

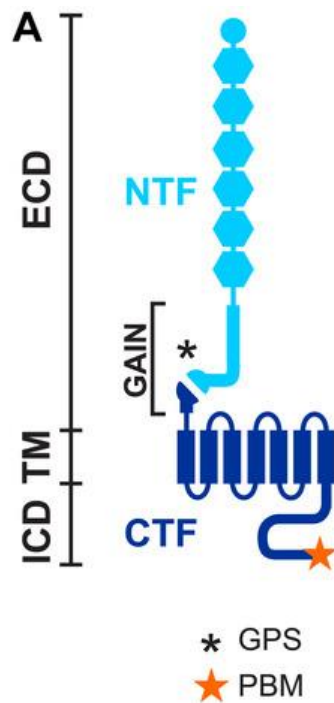


Figura 1. Estructura general de los aGPCRs. ICD: dominio intracelular, TM: transmembranal, ECD: dominio extracelular, CTF: fragmento C-terminal, NTF: fragmento N-terminal, GPS: sitio proteolítico GPCR, PBM: motivo de unión a PDZ. Tomada y modificada (Knapp, et al., 2019).

De manera general, los aGPCRs tienen funciones descritas en adhesión, activación del sistema inmune, embriogénesis, migración y angiogénesis, actividades que resultan fundamentales para el desarrollo de tejidos y órganos (Hsiao, et al., 2018; Preu, et al., 2017). Por lo anterior, la desregulación de la actividad y expresión de estos receptores también se ha involucrado en procesos patológicos, entre ellos el cáncer.

El papel de los GPCRs de adhesión en cáncer se ha relacionado con su capacidad integradora de señales extracelulares e intracelulares, esto gracias a sus fracciones NTF y CTF. En etapas iniciales, las células epiteliales con polaridad apico-basal adquieren características aberrantes que le permiten replicarse sin control, el NTF es capaz de mediar la adhesión del microambiente tumorigénico inicial, producto de la agregación de células cancerígenas y matriz extracelular (MEC), dando paso a la interacción célula-célula y célula-MEC (Cooper & Hausman, 2017; Scholz, 2018).

Mientras tanto, el CTF activa cascadas de señalización a través de su acople a proteínas G hacia pequeñas GTPasas como Rho/Rac/Cdc42 y de forma directa se une con arrestinas, cinasas y proteínas con motivos PDZ (Knapp & Wolfrum, 2016). En conjunto, las vías activadas dirigen sus efectos hacia componentes del citoesqueleto, alterando las propiedades viscoelásticas que permitan la progresión del tumor primario hacia la lámina basal, entre estas propiedades están el aumento de la capacidad proliferativa, migración e invasión, comenzando de esta forma la transición epitelio-mesénquima (Chiang, et al., 2017; Peeters, et al., 2015; Cooper & Hausman, 2017). Otro proceso adyacente al CTF son los mecanismos de transactivación de otras vías como la de Wnt o la activación de factores de transcripción como NF- κ B que aumentan la expresión de genes involucrados en procesos angiogénicos, facilitando que las células cancerígenas que han invadido la lámina logren llegar a los vasos sanguíneos para iniciar la diseminación sistémica conocida como metástasis (Knapp & Wolfrum, 2016; Peeters, et al., 2015).

Aunque existen mecanismos moleculares descritos para algunos aGPCR y como estos participan en la progresión del cáncer, otros receptores de adhesión como las Latrofilinas solo se tienen reportes en relación a su expresión.

2.2 Latrofilinas

Existen 3 isoformas de estos receptores en mamíferos, Lphn1,2 y 3, cada uno expresado de forma diferencial en tejidos, Lph1 y 3 se expresan mayoritariamente sobre el sistema nervioso central, mientras Lphn2 tiene una expresión ubicua (Boucard, Maxeiner & Südhof, 2014). Como miembros de los aGPCR cuentan con una fracción extracelular en la cual se encuentran los dominios que modulan la unión a ligando: el dominio de tipo lectina, dominio similar a olfactomedina, seguido de repetidos de Serina-Treonina, dominio de unión a hormona y GAIN, este último tiene presente el sitio GPS (Figura 2) (Arac, et al., 2016). Estos dominios son capaces de mediar la interacción con diferentes ligandos ya sea de forma individual o de forma combinada, esto para aumentar la afinidad de unión.

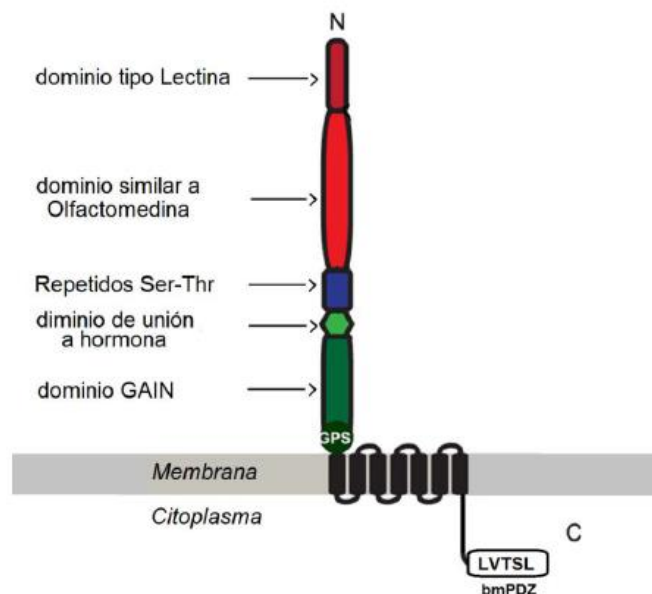


Figura 2. Estructura general de las latrofilinas. El N-terminal del receptor con los dominios de unión a ligando, seguidos de los 7 segmentos transmembranales y el C-terminal con el motivo de unión de PDZ (Boucard, et al., 2014).

El nombre de estos receptores deriva de su primer ligando exógeno reportado, α -latrotoxina (LTX) componente del veneno de la araña viuda negra *Lactrodectus mactans*, el cual al ser reconocido por el receptor provoca la liberación masiva de neurotransmisores (Rosenthal , et al., 1990). No fue hasta el 2011 cuando Silva y colaboradores reportaron el primer ligando endógeno para estos receptores: **Teneurina** (Ten).

2.2.1 Ligandos de latrofilinas

La interacción **Ten**-Lphn esta mediada por su C-terminal extracelular y los dominios lectina-olfactomedina de latrofilina, formando así un complejo trans-sináptico relacionado con migración neuronal y sinaptogénesis (del Toro, et al., 2020). Además, se plantea su participación en la liberación de neurotransmisores a través de la modulación en los niveles de Ca^{2+} (Silva, et al., 2011). Al momento, se han reportado 4 teneurinas homologas en vertebrados (*Ten-m1,2,3 y 4*), teniendo una expresión predominante en el sistema nervioso central, sobre todo en etapas tempranas del desarrollo embrionario. Los cambios en su expresión se han relacionado con procesos patológicos, sobre todo en su papel sobre la

desdiferenciación celular, marcando una pauta importante para el aumento de la proliferación celular y facilitar el crecimiento tumoral (Graumann, et al., 2017).

Otro ligando descrito para latrofilinas son las proteínas transmembrales de un solo paso conocidas como **neurexinas** (NRXN) (Boucard, et al., 2012). En organismos vertebrados, estas proteínas son codificadas por tres genes (*NRXN1,2* y *3*), donde su expresión está bajo el control de promotores independientes que dan origen a las isoformas principales: la larga α -neurexina y la isoforma corta β -neurexina. Ambas neurexinas contienen en su fracción intracelular un motivo de unión a PDZ, sin embargo, las secuencias en la fracción extracelular difieren entre isoformas, las α -neurexinas contienen seis dominios LNS (laminin-neurexin-steroid-binding hormone), seguidos de tres dominios tipo EGF, mientras las β -neurexinas contiene una secuencia corta y específica de β -neurexina, seguido de un dominio LNS (Treutlein, et al., 2014). La interacción Lphn1-NRX ocurre a través de los dominios olfactomedina y LNS respectivamente, de forma curiosa tanto latrofilina como neurexina pueden reconocer α -latrotoxina (Boucard, et al., 2012). La neurotransmisión y la diferenciación de la sinapsis, son algunas de las funciones descritas para NRXN, además, modula la actividad mitogénica de neurologina-3, proteína que al ser secretada en glioma activa la vía oncogénica PI3K-mTOR (Reissner, et al., 2013; Venkatesh, et al., 2015).

A través de ensayos de cromatografía de afinidad y espectrometría de masas, O'Sullivan en el 2012 reporto la unión trans-sináptica de Lphn con **FLRT3** (fibronectin leucine-rich repeat transmembrane), una proteína transmembranal glicosilada que tiene 10 repetidos ricos en leucina (LRR) y un dominio de fibronectina tipo 3 (FN3). FLRT está codificada por tres genes (*Flrt 1,2,3*) que se expresan de forma abundante, pero no exclusiva, en zonas del hipocampo, entre sus funciones descritas esta la regulación de la densidad de sinapsis glutamatérgicas, migración y guía axonal (O'Sullivan, et al., 2012).

Las **contactinas** son proteínas unidas a membrana que pertenecen a la superfamilia Inmunoglobulina (Ig), entre sus funciones esta la modulación de la adhesión celular en neuronas, además de facilitar su comunicación con astrocitos y oligodendrocitos, Esta familia de proteínas tiene seis miembros (*CNTN1-6*), entre

los cuales tienen una estructura conservada que consiste en seis repeticiones tipo Ig, cuatro dominios tipo fibronectina III unidos a GPI (glicosilfosfatidilinositol) que funciona como anclaje a la membrana extracelular (Chatterjee, et al., 2019; Rudenko, 2017). Zuco y colaboradores en 2016 reportaron la interacción de contactina 6-Lphn1 y con el uso de ensayos de agregación determinaron que esta unión ocurre en configuración cis. La sobreexpresión de Lphn1 provoca la disminución de ramificaciones neuronales y tamaño del soma, además, aumenta la expresión de caspasa-3, indicando por ende un proceso de apoptosis, sin embargo, la unión con Cntn6 revierte estos efectos, funcionando como un regulador de la neurotoxicidad y apoptosis.

2.2.2 Funciones asociadas a latrofilinas

Lphn1 y Lphn3 se encuentran expresados de forma casi exclusiva en el cerebro, por lo que no resulta sorprendente que las funciones descritas para ambos receptores sean relacionadas con las conexiones neuronales.

Cruz-Ortega y Boucard en 2019, mediante el uso de neuronas hipocampales transfectadas con Lphn1, observaron la disminución de protusiones neuronales, implicando la participación de este receptor en la morfogénesis neuronal, además, se ha mostrado su participación en la liberación de neurotransmisores (Matsushita, et al., 1999; Boucard, et al., 2014; Silva, et al., 2011). Por otra parte, el homólogo de Lphn en *Drosophila melanogaster* dCirl/CG8639, funciona como un regulador de la actividad eléctrica de neuronas cordotonaes que surge en respuesta a estímulos vibratorios e interactúa con elementos de la maquinaria mecanotransductora, demostrando de esta forma la actividad mecanosensora del receptor (Scholz, et al., 2015). Mientras tanto, se ha reportado que Lphn3 participa en la formación de conos de crecimiento axonal y sinapsis glutamatérgicas (Nozumi, et al., 2009; O'Sullivan, et al., 2012). Los defectos en su expresión se han asociado con algunos desórdenes neurológicos tales como déficit de atención e hiperactividad (Regan, et al., 2019).

Lphn-2 a diferencia de las otras isoformas, se expresa de forma ubicua en tejidos de pulmón, hígado y riñón, por lo cual sus funciones no se limitan al sistema nervioso central (Boucard, et al., 2014).

2.3 Latrofilina 2

Los reportes alrededor de Lphn2 señalan una versatilidad en sus funciones. Anderson y colaboradores en 2017 subrayan dos puntos importantes en relación a este receptor; el primero es que la expresión de esta isoforma es esencial para la vida y desarrollo, dado que su depleción total en tejidos no neurales causa letalidad embrionaria en ratones. En segundo lugar, destacan su papel en el reconocimiento y ensamblaje de la sinapsis en el hipocampo.

El corazón es uno de los órganos no neurales en los que se ha reportado la expresión de Lphn2, su funcionalidad se direcciona en el desarrollo cardiaco en etapas embrionarias. Se ha demostrado que los niveles de expresión de este receptor influyen sobre procesos de transición epitelio mesénquima (TEM), evento que resulta necesario para el desarrollo normal del canal atrioventricular (AV). Se ha evidenciado que los cambios en los niveles de calcio están involucrados en la señalización TEM, en línea con ello, Lphn2 funciona como un regulador transcripcional de proteínas clave en la modulación del calcio presente en el canal AV tales como SERCA2 y la subunidad alfa1C de los canales de calcio de tipo L (Doyle, et al., 2006). Adicionalmente, Lee y colaboradores en el 2019, revelaron la importancia de Lphn2 sobre la diferenciación del tejido cardiaco, donde depleción total del receptor en ratones provoca que no exista la expresión de factores de transcripción como Gata4, Nkx2.5 y Tbx5, importantes en el desarrollo cardiaco.

Además, se relacionó la participación de las latrofilinas con la liberación de insulina, a pesar de que Lphn2 no participa en este proceso se determinó que su acople a proteínas G es a través de subunidad Gαq/11 (Röthe , et al., 2019).

Por otra parte, Lphn2, se ha relacionado con procesos patológicos como la microcefalia, donde la variante de novo c.3785T>A (Leu1262His) se asocia con menor sulcación cerebral, densidad neuronal y defectos sobre el vermis cerebeloso, este último es un fenotipo característico de la romboencefalosinapsis (RES), por lo cual este receptor parece ser el vínculo entre ambos padecimientos. De forma interesante, la variante disminuye los índices de liberación de Ca²⁺ intracelular en comparación con el receptor WT, lo que conlleva a un aumento sobre la capacidad

adhesiva, pero disminución de capacidad migratoria, siendo el posible el origen de los defectos observados en microcefalia-RES (Vezain, et al., 2018).

Las alteraciones en la señalización o defectos en la expresión originados por mutaciones son unos de los puntos más estudiados alrededor de los receptores, siendo el posible origen de múltiples padecimientos como se muestra en la microcefalia, por lo cual resulta interesante abordar esta problemática alrededor del cáncer, enfermedad que precisamente se caracteriza por la presencia de mutaciones

2.3.1 Latrofilina 2 y su participación en cáncer

La metilación es uno de los principales mecanismos epigenéticos que contribuyen a la inestabilidad génica, esto a través del silenciamiento de genes entre ellos factores de transcripción, supresores de tumor, reparadores del ADN y antiapoptóticos, por lo cual se considera como un factor epigenómico de la etiología del cáncer (Gonzalo, et al., 2008). En línea con lo anterior, se ha reportado que la expresión de Lphn2 está silenciada en seis líneas celulares de cáncer gástrico y 13 colorrectales, esto a causa del estado hipermetilado de la isla CpG localizada en su promotor. De forma funcional, el estado de metilación de Lphn2 influye sobre la quimiosensibilidad de las células cancerígenas, mostrando que el aumento de su expresión disminuye la sensibilidad al tratamiento con cisplatino (Jeon, et al., 2016).

En otro estudio donde caracterizaron mutaciones somáticas presentes en diferentes tipos de cáncer, se reportó la presencia de la variante 278 A>P de Lphn2 en cáncer de ovario. Este cambio de base ocurre en el N-terminal específicamente en el dominio olfactomedina, lo cual podría inducir a cambios en cuanto a la afinidad con sus ligandos e incluso reducir la afinidad entre el NTF y CTF (Kan, et al., 2010). En este mismo contexto, se ha comprobado que ciertas mutaciones afectan la señalización del receptor, por ejemplo, el cambio de leucina por alanina en la posición 1262, induce cambios en la organización del citoesqueleto, aspecto que ha sido ampliamente estudiado debido a los posibles procesos en los que puede influir tales como migración y adhesión celular (Vezain, et al., 2018).

2.4 Remodelación del citoesqueleto de actina

En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que la sobreexpresión de Lphn2, induce cambios morfológicos en células HEK293T, como podemos observar en la figura 3, la célula transfectada solo con GFP muestra una morfología epitelial aplanada, con presencia de estructuras de actina (lamelipodios y filopodios), en caso contrario, la expresión de Lphn2 provoca redondeamiento de la célula y la aparición de blebs, lo cual se ve reflejado en la disminución de parámetros como área y perímetro celular, cabe mencionar que estos efectos se conservan para Lphn1 y 3 (Cruz-Ortega & Boucard, 2019).

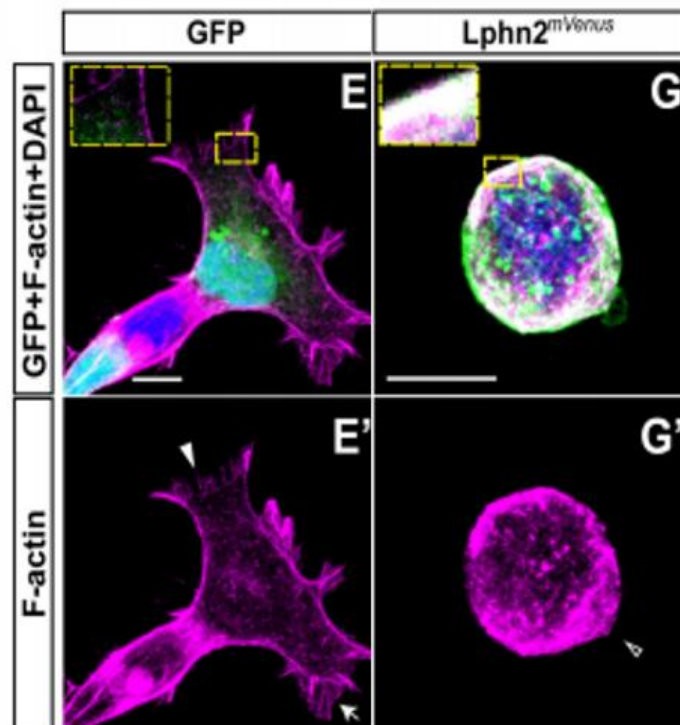


Figura 3. Células HEK293T transfectadas con Lphn2. Imágenes obtenidas por microscopía confocal, en verde se muestra la expresión de Lphn2^{mVenus}, los núcleos en azul (DAPI) y en magenta la F-actina (Rodamina-Faloidina). ↑ Lamelipodios, Δ Filopodios, ▲ Blebs. Tomado y modificado (Cruz-Ortega & Boucard, 2019).

De igual manera, la variante A278P, presenta efectos parecidos a Lphn2, provocando que la célula se vuelva redonda, sin embargo, se conservan algunos filopodios y se induce la formación de blebs. En relación a los parámetros celulares permanecieron igual a Lphn2 con excepción del perímetro celular (Ojeda Muñiz, 2019). Mientras tanto, la expresión de este receptor en células HeLa también induce cambios en la distribución de actina cortical, efecto que se ve potenciado con la presencia de mutaciones en el fragmento citoplasmático (CTF), sitio donde se encuentra el motivo de unión a PDZ (PBM, PDZ Binding Motif) (Vezain, et al., 2018).

2.5 Dominios PDZ

Los dominios PDZ, llamados así por su identificación en las proteínas **PSD-95**, **DLG** y **ZO-1**, comprenden de 80-100 residuos de aminoácidos organizados en dos α -hélices y seis cadenas β -plegadas, estas estructuras a su vez forman una hendidura hidrofóbica con el motivo GLGF, crucial para la coordinación de las interacciones entre dominio y motivo de reconocimiento (Manjunath , et al., 2018).

La clasificación de los dominios PDZ está dada por la secuencia de reconocimiento: la clase I se unen a residuos peptídicos en el C-terminal con una secuencia de Ser/Thr-X- Φ -COOH, mientras que la clase II reconocen Φ -X- Φ -COOH y finalmente la clase III se une a Asp/Glu-X- Φ -COOH (Φ residuo hidrofóbico, X cualquier aminoácido) (Lee & Zheng, 2010). Los motivos de unión a PDZ de las Latrofilinas pertenecen a la clase I y se encuentran en regiones con alta homología, por lo cual estos son conservados entre las isoformas del receptor (LVTSL) (Figura 4) (Knapp & Wolfrum, 2016; Meza-Aguilar & Boucard, 2014).

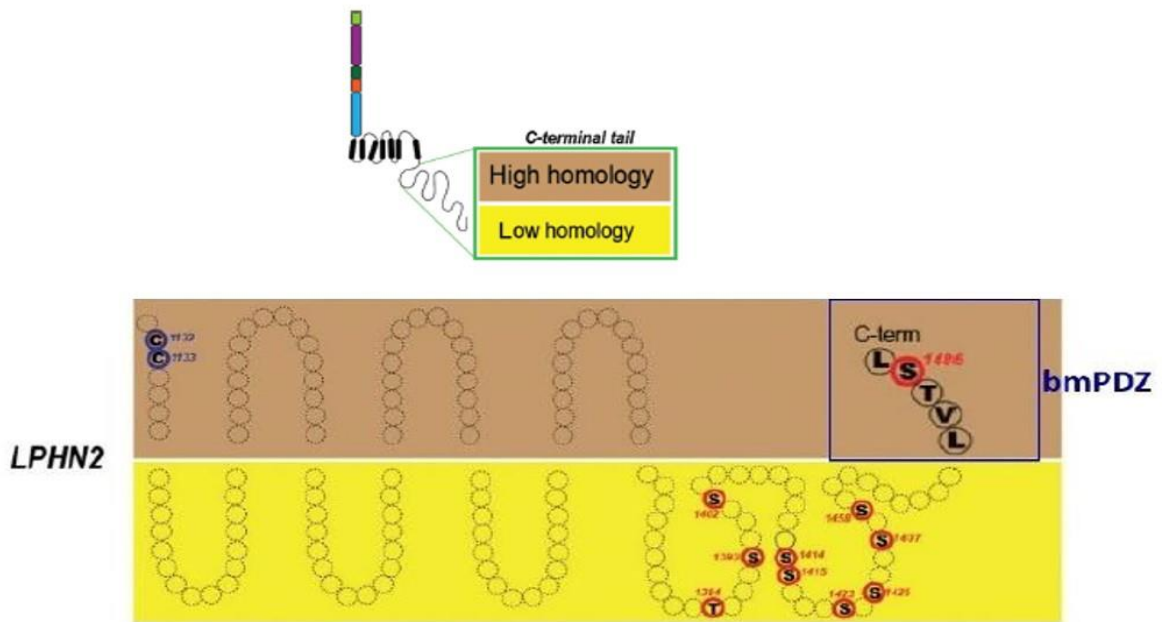


Figura 4. Motivo de unión a PDZ de Lphn2. Secuencia del motivo de unión a PDZ (LVTSL), también se indican sitios importantes de fosforilación y palmitoilación (círculos rojos). Tomado y modificado (Meza-Aguilar & Boucard, 2014).

En relación al papel del motivo de unión a PDZ de las Latrofilinas, sobre los cambios morfológicos que provoca su expresión en células HEK293T, se ha comprobado que la falta de este motivo en Lphn1 y 3 no tiene efecto sobre la remodelación de la actina, conservando células esféricas, sin lamelipodios o filopodios (Rendón Nava, 2018). Por lo anterior, se ha señalado que parte de estos cambios, al menos para Lphn1, están influenciados por el N-terminal u otras vías de activación del receptor, recordando que tanto Lphn1 y Lphn3 están restringidos a cerebro por lo que las redes de señalización que establecen pueden ser diferentes a las de Lphn2 (Cruz-Ortega & Boucard, 2019).

En caso contrario, en células nerviosas de densidad post-sinápticas (PSD), se ha demostrado que el PBM de las latrofilinas juegan un papel importante en su unión con proteínas de andamiaje con motivos PDZ, entre ellas Shank y guanilato quinasas asociadas a la membrana (MAGUK), tomando un papel central sobre la localización de canales iónicos, moléculas de señalización y moléculas de adhesión a las sinapsis (Tobaben, et al., 2000).

2.5.1 Proteínas con dominios PDZ / guanilato quinasas y su interacción con latrofilinas

A través de ensayos de doble-híbrido, Tobaben y colaboradores en el 2000, realizaron un sondeo de proteínas que tenían la capacidad de unirse al motivo de unión a PDZ de Lphn1 (CL1/CIRL), entre ellas destaco Shank, PSD-95 y MAGI.

La familia de proteínas con dominios SH3 y repetición de anquirina (Shank) esta codificada por tres genes: Shank1, Shank2 y Shank3. Esta familia de proteínas comparte una estructura basada en múltiples dominios de repetición de anquirina, un dominio SH3, un dominio PDZ y un motivo alfa estéril, gracias a ello funciona como un puente de unión indirecta con el citoesqueleto de actina. La cortactina, es una de las proteínas que vinculan a proteínas Shank con la actina, siendo esta unión crítica en la dinámica de la sinapsis debido a que mantienen la estabilidad de los filamentos de actina en las espinas dendríticas (Figura 5) (Kreienkamp, et al., 2002; MacGillavry, et al., 2016).

Proteína de la densidad postsináptica de 95 kDa (PSD-95) o también conocida como DLG4, tiene tres dominios PDZ, un dominio de tipo guanilato quinasa (GK) y un dominio de homología SRC 3 (SH3), estos sitios le permiten unirse a diferentes receptores, entre ellos los AMPAR (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico), NMDA (N-metil-d-aspartato) y múltiples GPCR (Figura 6). La unión PSD-95/receptor le permite modular múltiples funciones, desde su mantenimiento en la membrana sináptica, trafico intracelular y su activación. Muchas de las proteínas de densidad postsináptica tienen funciones redundantes e incluso forman redes entre ellas, por ejemplo, el dominio GK de PSD-95 le permite unirse Shank y por lo tanto a homer y cortactina, teniendo como consecuencia un

efecto sobre la F-actina (Figura 5) (Dunn & Ferguson, 2015). No obstante, también es capaz de unirse a la α -actinina, formando una red de acoplamiento de α -actinina / PSD-95 / AMPAR/ F-actina, formando parte de la red regulatoria del tamaño de las espinas dendríticas (Matt, et al., 2018).

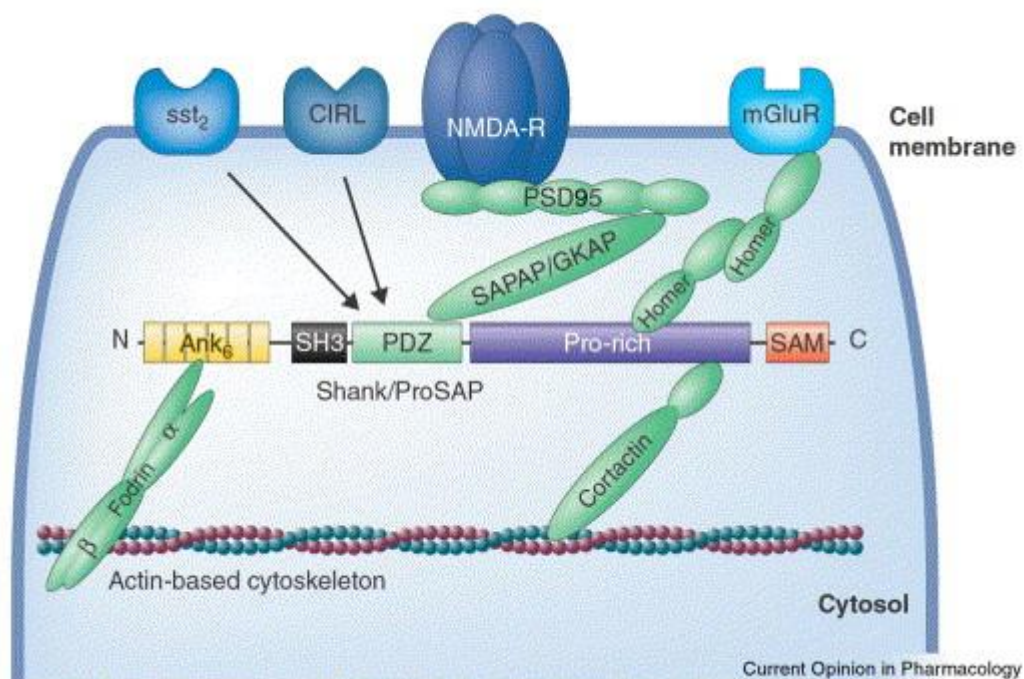


Figura 5. Interacción de Shank con el citoesqueleto de actina. Lphn/C1RL interactúa con Shank a través del dominio PDZ, proteína que a vez se une a cortactina, un importante regulador de la nucleación de actina. Tomado y modificado (Kreienkamp, et al., 2002).

La estructura de las **proteínas guanilato cinasa asociadas a membrana invertida (MAGIs)** consiste en un dominio PDZ en el amino terminal, seguido de un dominio GK, tres de triptófano-triptófano (WW) y otros cinco dominios PDZ (Figura 6). MAGI participa activamente en tráfico de receptores a través del reclutamiento de β -arrestinas, así como la regulación de las vías de señalización adjuntas, que incluyen la vía de ERK, RhoA y PLC, sin embargo, el efecto puede ser bidireccional, ya se promoviendo la activación o suprimiéndola, este dependerá del receptor al que esta proteína se acople (Hammad, et al., 2018).

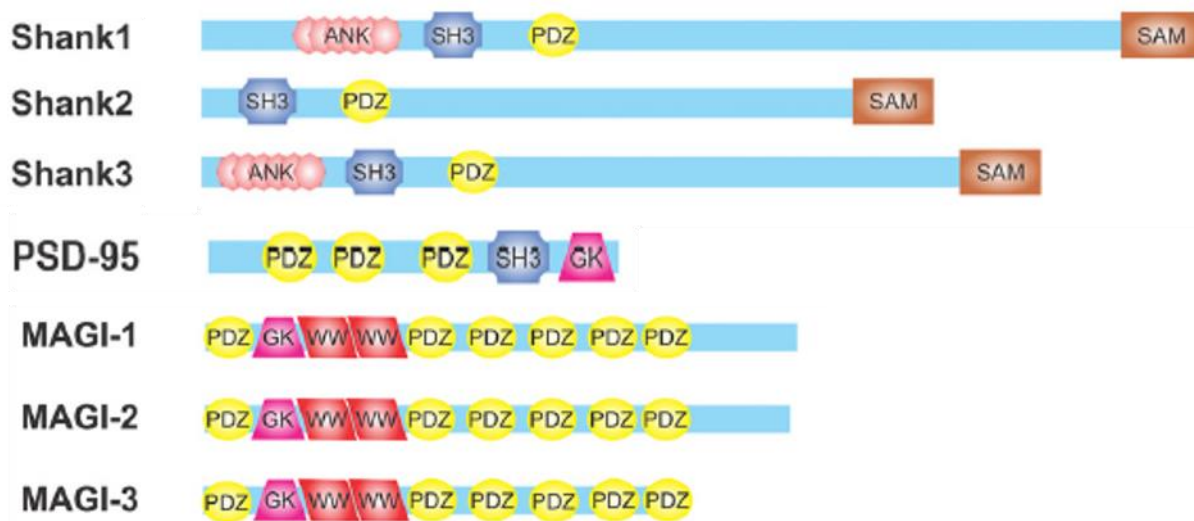


Figura 6 . Estructura molecular de proteínas que interactúan con el motivo de unión a PDZ de Latrofilina. La estructura de las proteínas incluye múltiples dominios de interacción además del dominio (circulo amarillo) PDZ: dominios de repetición de anquirina (ANK), dominio SH3, motivo alfa estéril (SAM), dominio de tipo guanilato quinasa (GK), dominio triptófano-triptófano (WW). Tomado y modificado (Dunn & Ferguson, 2015).

III. JUSTIFICACIÓN

Es evidente la relación entre la expresión de Latrofilina 2 y la remodelación del citoesqueleto de actina, por lo que surgen dos cuestiones importantes alrededor de este tema, la primera de ellas es, qué parte del receptor participa en esta interacción, siendo el motivo de unión a PDZ una de las estructuras candidato, debido a su participación en diversos procesos biológicos como la formación de uniones celulares, regulación de la polaridad celular y de manera interesante en el transporte y organización de proteínas que sirven de transductor de señales, por lo que este motivo de unión podría funcionar de andamiaje para proteínas asociadas al citoesqueleto. Si bien, el motivo de unión a PDZ de Lphn1 y Lphn3 parece no estar involucrado en estos cambios, Lphn2 al tener funciones y patrones de expresión diferentes, podría desencadenar redes de interacción que no tienen las otras isoformas.

El segundo aspecto relevante de este proceso, es el efecto funcional que conlleva esta interacción, sobre todo en procesos patológicos como cáncer, donde se ha demostrado que ciertos cambios en el citoesqueleto, y la aparición de mutaciones, favorecen la progresión de esta enfermedad al facilitar procesos de migración e invasividad, por lo que resulta importante el estudio de la variante A278P y su efecto sobre la señalización del receptor.

IV. HIPÓTESIS

La sobreexpresión de Latrofilina 2 y de su variante A278P en células HEK293T induce alteraciones sobre la morfología celular. A nivel intracelular el receptor cuenta con un motivo de unión a PDZ, el cual funciona como sitio de anclaje para proteínas asociadas actina, entre ellas Shank, MAGI y PDS-95. Por lo cual se piensa que esta secuencia participa en la remodelación del citoesqueleto de actina inducida por Lphn2 y su variante A278P.

V. OBJETIVOS

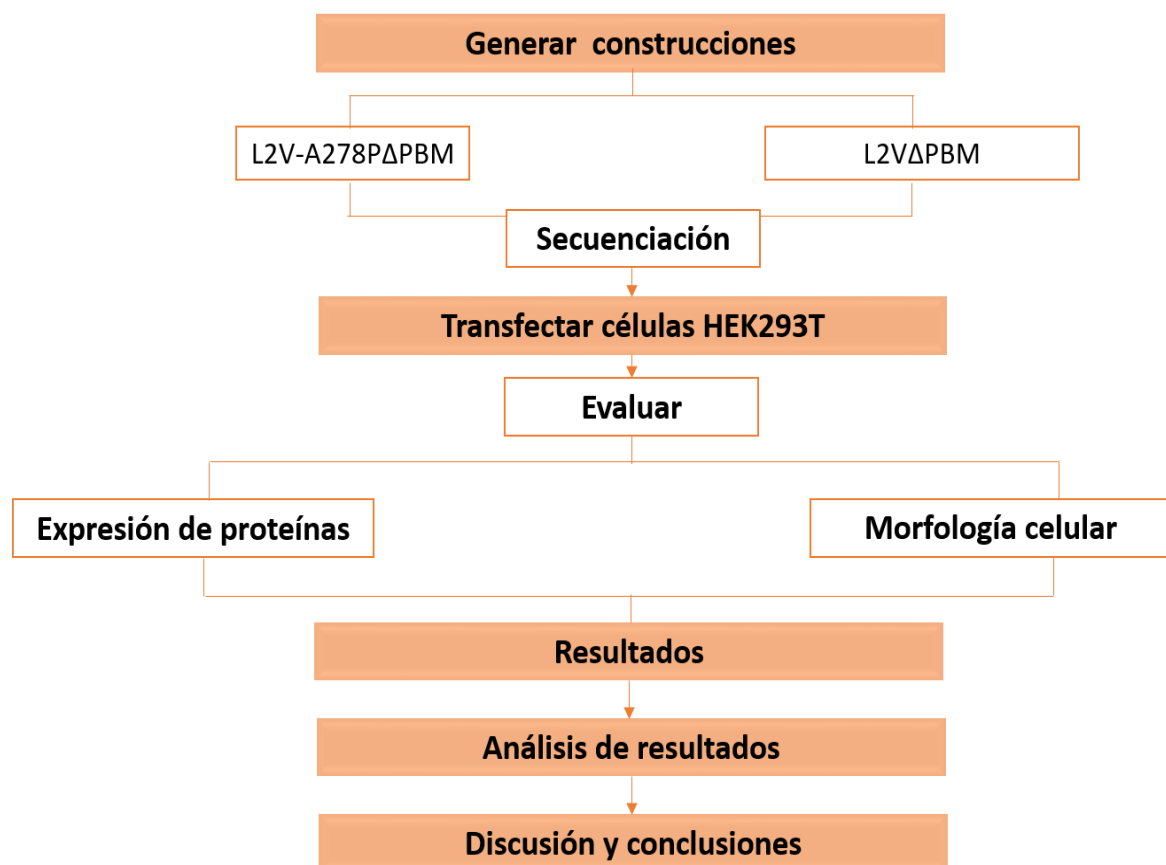
General

Evaluar el papel del motivo de unión a PDZ de Latrofilina 2 y la variante A278P sobre la remodelación del citoesqueleto de actina.

Específicos

- Generar construcciones de Lphn2v y A278P sin el motivo de unión a PDZ (Δ PBM)
- Evaluar la expresión proteica total de Lphn2v Δ PBM y Lphn2vA278P Δ PBM.
- Determinar el efecto del motivo de unión a PDZ sobre la expresión en membrana de Lphn2v y de su variante Lphn2vA278P
- Determinar cambios en la organización del citoesqueleto de actina en células HEK293T transfectadas con las construcciones de Lphn2v Δ PBM y de la variante Lphn2vA278P Δ PBM.

VI. DIAGRAMA DE TRABAJO



VII. DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio: experimental

Sistema de estudio: se utilizará un modelo *in vitro* basado en la línea celular HEK293T derivada del riñón embrionario humano y que contienen el antígeno T SV40. Las células se mantendrán a temperatura estable de 37°C con una atmosfera de 5% de CO₂, cultivadas con medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado al 10% de suero fetal bovino (SFB) más 2 mM de GlutaMax y 1% de penicilina y estreptomocina (penicilina 10,000 U/ml; estreptomocina 10,000 µg/ml).

Vector de clonación: pCAGGS es un vector de expresión en mamíferos que está bajo el control del promotor AG y el enhacer CMV-IE además cuenta con una secuencia de resistencia a ampicilina. La secuencia del promotor AG consiste en el promotor β-actina de pollo (el primer exón y parte del primer intrón) que a su vez está unido a un fragmento de β-globina de conejo (segmento 3' del segundo intron y parte 5' tercer exón). El tamaño del vector es de 4790 pb

Cepa bacteriana para transformación: *Escherichia coli* DH5α con un genotipo F-80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 y A1hsdR17 (rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1.

Soluciones: Se enlistan los reactivos utilizadas a lo largo de los procedimientos experimentales en las tablas a continuación.

Tabla 1. Características de la preparación de reactivos utilizados en materiales y métodos.

Procedimiento	Reactivos	Características
Cultivo celular	Albúmina de suero bovino (BSA)	Albúmina (Sigma Aldrich # Catálogo: A-4503)
	Medio DMEM	13. 48 gr de GK, 3.7 gr de bicarbonato de sodio, 1Lt de agua miliQ. Ajustar pH a 7.2 y esterilizar por filtrado

	Medio DMEM al 10% de SFB (50 mL)	5 mL de suero fetal bovino (SFB), 500 μ L de glutamina (2 mM) y 50 μ L Penicilina+Estreptomocina (1%)
	PBS 1X	CORNING # Catálogo: 55-031-PCR
Transformación y aislamiento de bacterias	Agar LB (1 Litro)	10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl y 10 g de agar. Ajustar pH a 7.0
	Medio LB (1 Litro)	10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl. Ajustar pH a 7.0
Purificación de ADN en gel	Buffer TE	10 Mm de Tris pH 8.0, 1 mM de EDTA pH 8.0, agua miliQ
	Buffer TAE 1X	40 mM de Tris-acetato, 1mM de EDTA, agua miliQ
	SYBR Safe LIFE	SYBR Safe (Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific #Catálogo: S33102) al 0.2 % en agua miliQ
	Marcador para ADN (0.5-10kb)	Jena Bioscience, #Catálogo M-204S
	Buffer de carga 6X para ADN	0.25% azul de bromofenol, 0.25% xileno cianol, 30% glicerol, agua miliQ
	Solución I	50 Mm de glucosa, 25 mM de Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM de EDTA
	Solución II	0.2 N de NaOH, 1 % de SDS
	Solución III	5 M de CH ₃ CO ₂ K, 11.5 % de ácido acético glacial
	Solución de lisozima	Lisozima 10 mg/ml en Tris HCl pH 8.0
Western Blot	Buffer de carga 5X (50 mL)	12.5 mL de Tris-HCl pH 6.8, 50% Glicerol (25 mL), 3.86 gr de DTT 500 mM, 0.25% de Azul de bromofenol (0.125 gr), 10% de SDS (5 gr), 12.5 mL de agua miliQ
	Buffer de corrida 5X (1 Litro)	15.1 g de TRIS-base, 94 g de glicina, 50 mL de SDS al 10 %, aforar con agua miliQ
	Buffer de transferencia 1X (1 L)	3.03 g de Tris base, 14.4 g de glicina, 200 mL de metanol, 25 mL de SDS, agua destilada
	Acrilamida al 30% (250 mL)	72.5 gr de acrilamida (Bio Rad #Catálogo: 161-0107), 2.5 gr de N, N'-metilenbisacrilamida, agua miliQ, filtrar solución y ajustar pH a 7.0
	Tris-HCl pH 6.8	Acetato de Amonio Acetato de amonio 10M
	Tris-HCl pH 8.8	1 M de Tris, ajustar pH con HCl

	TBS-Tween al 0.05% (500 mL)	5 mL de Tris pH 8.0, 4.38 gr de NaCl, 250 µL de Tween 20
	Membrana de nitrocelulosa	Membrana Immobilon NC Transfer (Merk Millipore #Catálogo: HATF00010)

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en los ensayos de Western Blot.

Anticuerpo	Descripción
Anti-FLAG	Policlonal hecho en conejo clase IgG. Novusbio #Catálogo: NB600-308
Anti-GFP	Policlonal hecho en conejo clase IgG. Novusbio #Catálogo: NB600-308
Anti-Conejo fluorescente	IRDye 680D policlonal hecho en cabra clase IgG. LI-COR #Catálogo: 926-68071 Longitud de onda de excitación: 676 Longitud de onda de emisión: 694
Anti-Ratón fluorescente	IRDye 800CW policlonal hecho en burro clase IgG. LI-COR #Catálogo: 926-32212 Longitud de onda de excitación: 778 Longitud de onda de emisión: 795

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La estrategia experimental para obtener las construcciones de pCAGGS-Lphn2^{Flag,mVenus} (pCAGGS-Lphn2v) y pCAGGS-Lphn2-A278P^{Flag,mVenus} (pCAGGS-Lphn2vA278P) sin el motivo de unión a PDZ, se realizaron en dos etapas. Primero se diseñaron oligonucleótidos sentido y antisentido que permitieron amplificar pCAGGS-Lphn2vA278P sin el motivo de unión a PDZ e insertar dos sitios de corte (Tabla 3), esto por medio de PCR bajo las condiciones especificadas en la Figura 7.

Tabla 3. Diseño de oligonucleótidos

Oligo	Secuencia 5'- 3'	T _m (°C)	Enzima
BR19001 (sentido)	CTTAC CTTAAG GCCATTGTGGAC	68.6	AflII
BR19002 (antisentido)	TATGCGGCCGCTT ACTGCATCTG	73.5	NotI

Reactivos	1rx (μL)
Agua mili Q estéril	14.55
Buffer	5
DNA (5ng/μL)	1
dNTPs	2
Oligo sentido (10 μM)	0.5
Oligo antisentido (10 μM)	0.5
DMSO	1.25
Polimerasa	0.2
Volumen total	25 μL

Programa de PCR	
Desnaturalización inicial	98°C por 3 min
	98°C por 10 seg
Alineamiento	58°C por 6 seg
Elongación*	68°C por 3.34 min
Elongación final	68°C por 7 min
Terminación	4°C ∞

Figura 7. Especificaciones de reactivos y programación de PCR. El asterisco denota el tiempo está determinado por las pares de bases del fragmento que se va a amplificar.

Digestión enzimática

El producto de amplificación por PCR (amplicón) y el vector de expresión pCAGGS-Lphn2^{Flag, mVenus} (pCAGGS-Lphn2v) se sometieron a corte enzimático con endonucleasas por 3 horas a 37°C (Tabla 2). Las enzimas se adicionaron de forma gradual, 1uL cada hora para el producto de PCR, mientras que el vector tuvo una etapa adicional de inactivación de enzimas a 65°C por 20 minutos, posteriormente se trató con fosfatasa alcalina durante 2 horas a 37°C en una concentración 1/100 de la enzima (0.5 µL de enzima en 50uL de Buffer 1X) y 2.4 µL de Buffer 10X.

Tabla 4. Especificaciones de reactivos para la digestión con endonucleasas.

Reactivos (1 rx)	Amplicón de PCR (µl)		pCAGGS-Lphn2v (µl)	
Agua mili Q estéril	10.86		12	
DNA	48		2	
BSA	1		2	
Buffer D (10X)	7.14		2	
Enzimas (1 µl por cada hora)	NotI 2	AflI 2	NotI 1	AflII 1
Volumen total	71		20	

Purificación de DNA en gel de agarosa

El ADN amplificado en la PCR y el vector de expresión se corrieron en geles de agarosa al 0.8% con 1 µl de SYBR safe, durante 45 minutos a 80 voltios. Las bandas resultantes se cortaron y purificaron con el kit QIAEX (#catalogo: 200021) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Al finalizar el protocolo se cuantifico la concentración de las muestras en el nanodrop 2000 de Thermo SCIENTIFIC.

Ligación

La reacción de ligación para el amplicón de PCR y el vector, se realizó a 16°C por 16 horas de acuerdo a las especificaciones mostradas en la tabla 3. La cantidad de ADN (++) utilizada se calculó en función de la siguiente fórmula:

$$ng \text{ de inserto} = \frac{(ng \text{ de vector})(pb \text{ del inserto})}{pb \text{ del vector}}$$

Mientras que el volumen para el vector se calcula en función de su concentración con la fórmula:

- Donde c representa la concentración del ADN obtenido de la purificación

$$V = \frac{c}{50}$$

Tabla 5. Reactivos para ligación

Ligación de fragmentos		
	CN (μl)	1:1 (μl)
Agua	4.13	Completar a 10
Vector (50 ng)	//	//
Fragmento de ADN	-----	++
Buffer Ligasa	1	1
Ligasa T4	1	1
Volumen final	10	10

Transformación de bacterias competentes.

Los productos de la ligación se incubaron con 200 μl de bacterias competentes (*E.coli* DH5α) por 30 minutos en hielo. Posteriormente se generó un choque térmico, incubando a 42°C por 45 segundos y cambiando a hielo rápidamente. A continuación, se agregaron 800 μl de medio LB sin antibiótico y se pusieron en agitación a 220 rpm por 1 hora a 37°C. Al terminar, se sembraron 200 μl de las bacterias en placas de medio LB con ampicilina (100 ug/mL), teniendo una incubación final a 37°C por 16 horas.

Las unidades formadoras de colonias (UFC) fueron contabilizadas y seleccionadas. Las colonias se picaron con una punta estéril que se depositó en tubos con 2 ml de medio LB con ampicilina (100 ug/mL) y se incubaron a 37°C por 16 horas en agitación (220 rpm).

Extracción de ADN plasmídico a partir de miniprep

Las bacterias transformadas se depositaron en tubos eppendorf que fueron centrifugados a 12,000 rpm durante 2 min a 4°C, se descanto el sobrenadante, teniendo cuidado de retener la pastilla en el fondo, la cual se resuspendió en 100 µl de solución de lisis 1 fría (4°C), posteriormente se le agregó 200 µl de solución II a TA, asegurando su homogenización por inmersión. A continuación, se añadió 200 µl de cloroformo y 150 µl de solución 3 fría (4°C), se mezcló por inversión por 10 segundos y se dejó en hielo por 3 min, para luego hacer una centrifugación a 12,000 rpm por 5 min a 4°C, el sobrenadante obtenido se pasó a un tubo nuevo, donde el ADN se precipito con 2 volúmenes de etanol al 100% a TA.

Se realizó una última centrifugación a 12,000 rpm a 4°C por 5 min y el sobrenadante se aspiró. La pastilla en el fondo se lavó con etanol al 70% a 4°C, removiéndolo rápidamente y se dejó secar el pellet, como último paso se resuspendió 50 µl de buffer TE.

Midiprep

A partir del ADN de la miniprep, se realizó una segunda transformación de bacterias competentes y de las UFC que crecieron se sembraron en 2 mL de medio LB y se incubaron 8 horas a 37°C con agitación de 220 rpm. Posteriormente, se tomaron 100 µl de la suspensión bacteriana y se colocaron en 500 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/µL), dejando en incubación por 16 horas a 37°C en agitación constante de 220 rpm.

- ***Extracción de ADN por lisis alcalina***

Las suspensiones bacterianas procedentes de la midiprep se pasaron a tubos Falcón para ser centrifugadas a 7500 rpm por 15 min a 4°C y así lograr la sedimentación de bacterias. Posteriormente, la pastilla obtenida fue resuspendida

en 3 mL de solución de lisis 1 fría (4°C), 450 µl de solución de lisozima (4°C) y 6 mL de solución 2 a TA, realizando una homogenización por inversión. En seguida, se adiciono 6 ml de cloroformo y 3 ml de solución 3 fría (4°C), repitiendo una centrifugación a 5000 rpm por 12 min a 4°C.

El sobrenadante se pasó a tubos nuevos añadiéndoles 0.6 veces su volumen equivalente en isopropanol, mezcla que también fue centrifugada por 12 minutos a 5000 rpm 4°C y la pastilla resultante se lavó con etanol al 70% (4°C) y se disolvió en 500 µl de buffer TE.

Purificación de ADNp por PEG

A las muestras de ADNp (500µl) se les adicionó un volumen equivalente de LiCl 5M, seguido de una centrifugación a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C, donde se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo con un volumen igual de isopropanol, dejando incubar a temperatura ambiente (TA) por 10 min. Una vez terminada la incubación se centrifugo a 13,000 rpm por 10 min en 4°C. y la pastilla resultante se lavó con etanol al 70% y se disolvió en 500 µl de Buffer TE con RNasa (20 µG/ µL).

La pastilla disuelta se incubo a 22°C por 30 min, a continuación, se agregaron 500 µl de polietilenglicol (PEG) al 13% y se realizó una segunda incubación durante 20 min a -20°C. Al término de la incubación, los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 min a 4°C y la pastilla resultante se resuspendió en 500 µl de Buffer TE, donde se adiciono 500 µl de una solución de fenol/cloroformo, realizando una posterior centrifugación de esta mezcla a 13,000 rpm por 5 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo con 120 µl de acetato de amonio (10M) y 2 volúmenes de etanol absoluto, mezclando por inversión e incubando a TA por 10 min. Finalmente, se vuelve a centrifugar a 13,000 rpm por 12 min a 4°C y la pastilla resultante se lavó con etanol al 70% y se disolvió en 200 µl de TE.

Secuenciación

La delección del motivo de unión a PDZ de Lphn2v y Lphn2vA278P se comprobó por secuenciación, utilizando el Servicio de Secuenciación del Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPYCIT).

Preparación de cubreobjetos

Cubreobjetos de 1mm grosor se lavaron de forma consecutiva con etanol al 70% y absoluto, una vez secos se esterilizaron en luz UV por 20 min. Se colocaron en el fondo de las placas de cultivo celular de 12 pozos y en su superficie se les añadió 700 µl de medio condicionado. Estos se dejaron incubando por 24 horas a 37 °C en una incubadora con una atmosfera de 5% de CO₂, para posteriormente ser retirados y realizar lavados con agua y PBS 1X a TA.

Transfección de células HEK293T

Llegada a una confluencia del 90% las células HEK293T fueron sembraron en placas de 6 pozos (recomendado para extracción de proteínas) y en placa de 12 pozos (microscopía confocal). La preparación del complejo DMEM basal, DNA y polietilenimina lineal (PEI 25K) se hicieron en tubos eppendorf de acuerdo a la Tabla 6.

Tabla 6. Complejo de transfección

Complejo 1:3	Placas de 6 pozos (µl)	Placas de 12 (µl)
DMEM basal	484	210
DNA (ug/µl)	4	1.33
Polietilenimina	12	4
Volumen final por pozo	2 ml	1 ml

La mezcla fue agitada en vortex por 30 segundos e incubada por 30 min a TA. Una vez terminada la incubación, las células sembradas se lavaron con PBS 1X a TA y se les agrego 500 µl DMEM basal para placas de 6 pozos o 286 µl para placas de 12 pozos, después se adicionó cuidadosamente el complejo de transfección gota a gota sobre las células, dejando una incubación de 30 min a 37 °C. Para finalizar se completó el volumen de cada pozo con DMEM al 20% de suero fetal bovino (SFB), 1 ml para placas de 6 y 286µl para placas de 12 y se dejaron incubando por 16 horas para extracción de proteínas o 19 horas en el caso de microscopia confocal

a 37 °C con una atmosfera de 5% de CO₂. Al finalizar la incubación se realizó un lavado con PBS 1X a TA para retirar el complejo y se añadió DMEM suplementado con SFB al 10%. Las placas se dejarán incubando hasta que cumplan 48 horas en las mismas condiciones.

Extracción de proteínas totales

Las células HEK293T que completaron 48 horas transfectadas por el método de PEI, se lavaron con PBS 1X a TA y se incubaron por 30 min a -80°C. Con la finalidad de generar un choque térmico se colocó la placa a 37°C por 30 segundos y se cambió rápidamente a hielo. A cada pozo se le adiciono 200 µl de Buffer de carga a 1X y las células se levantaron con espátulas de plástico para ser colocadas en tubos eppendorf. Para homogenizar las muestras de proteína se realizaron pasajes por jeringas de insulina y finalmente se incubaron por 30 min a 37°C. Se guardan a -20°C hasta su uso.

Western Blot

Las muestras de proteínas totales se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% por 120 min a 80 voltios y posteriormente se realizó una transferencia de proteínas a membranas PVDF por 3 horas a 250 mA a 4°C, seguido de un bloqueo de dos horas con BSA al 3% en TBS-Tween durante dos horas a TA.

La membrana se incubo a 4°C por 16 horas con el anticuerpo primario para detectar FLAG (anti-FLAG 1/1000), GFP (anti-GFP 1/2000) y α -tubulina (1/1000). Al finalizar, se realizó una serie de lavados consecutivos con TBS-Tween y TBS por 10 min y se puso el anticuerpo secundario anti-conejo para FLAG/GFP y anti-ratón para α -tubulina, ambos a una concentración 1/10,000 en TBS por 1 hora a TA. Se repitieron la serie de lavados y se revelo la fluorescencia en Li-Cor Odyssey Blot Imager. Se utilizó el canal rojo (700) para Anti-Conejo fluorescente (676/694 nm) y el canal verde de 800 para Anti-Ratón fluorescente (778/795 nm).

Detección de la expresión del receptor en la superficie celular (DECS)

Células HEK293T que cumplieron 16 horas de transfección fueron lavadas con PBS 1X a TA y agregaron 250 µl de tripsina 1X por 3 min. Posteriormente se les añadió

750 μ l de DMEM suplementado con SFB al 10% y se resuspendieron cuidadosamente. De esta mezcla, se tomaron 400 μ l y se diluyeron en 600 μ l de DMEM suplementado con SFB al 10%, se resuspendieron y se sembraron 120 μ l de células en una placa de 96 pozos que fue previamente tratada con poli-L-lisina al 1% (5 réplicas por muestra).

48 horas post-transfección, las células se lavaron con PBS 1X a TA y se fijaron con paraformaldehído 4% a 4°C (PFA) por 10 minutos. Las células fijadas se incubaron en solución de bloqueo (BSA 3% y azida al 0.1% en PBS 1X) por 1 hora, al finalizar, se procedió a colocar el anticuerpo anti-FLAG (1/1,000) por una hora y después el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano en una dilución 1/7,000, todas las incubaciones fueron a TA, pero con los reactivos conservados durante el procedimiento a 4°C (se realizan lavados entre anticuerpos).

Para la reacción colorimétrica se agregaron 100 μ l de sustrato de peroxidasa de rábano y se realizaron lecturas de absorbancia a 650 nm por 30 minutos con agitación constante.

Preparación de muestras para microscopía confocal

Células HEK293T que cumplieron 48 horas transfectadas fueron lavadas con PBS 1X a TA y fijadas con PFA al 4% por 15 min a 4°C. A continuación, se permeabilizaron las células con Triton X-100 al 0.1% por 7 min a TA y se repitieron los lavados de PBS 1X a 4°C. Se procedió a colocar la rodamina-faloidina (1/100) dejando reposar 1 hora en oscuridad a TA y posteriormente se realizaron lavados con PBS1X a 4°C y se agregó 50 μ l de DAPI (300nM) por 5 min, repitiendo un último lavado con PBS 1X y para finalizar se montó la muestra sobre cubreobjetos con 10 μ l de gelvatol.

La lectura de las muestras se realizó en el microscopio de escaneo laser confocal Leica TCS SP8 con el objetivo de inmersión 100X (tabla 5) y los resultados se analizaron en el software LAS-AF Lite de Leica versión 3.3.10134.0.

Tabla 7. Características de lectura en microscopio confocal

Laser de diodo marca Lasos	Fluoróforo	Ventana de excitación/emisión (nm)
Azul	DAPI	430 /476
Verde	mVenus	495/545
Rojo	Rodamina-faloidina	560/610

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron con \pm error estándar. Para el análisis estadístico se utilizó el análisis unidireccional de varianza (ANOVA) seguido de una comparación múltiple con el método de Sidak y prueba t-Student, utilizando el programa GraphPad 6.01 Se tomará un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

El código utilizado para determinar la significancia estadística es el siguiente.

<i>Símbolo</i>	<i>Significado</i>
*/+	$P \leq 0.05$
**	$P \leq 0.01$
***	$P \leq 0.001$
****	$P \leq 0.0001$

IX. RESULTADOS

Construcciones pCAGGS-Lphn2vA278P Δ PBM y pCAGGS-Lphn2v Δ PBM

Con la finalidad de obtener el plásmido de la variante A278P sin el motivo de unión a PDZ (Δ PBM), se diseñaron oligos sentido y antisentido que excluyeran la secuencia del motivo e incluyera los sitios de corte con las enzimas AflI y NotI, obteniendo así por PCR convencional, la secuencia amplificada de Lphn2vA278P Δ PBM con tamaño de 3372 pb (Figura 8).

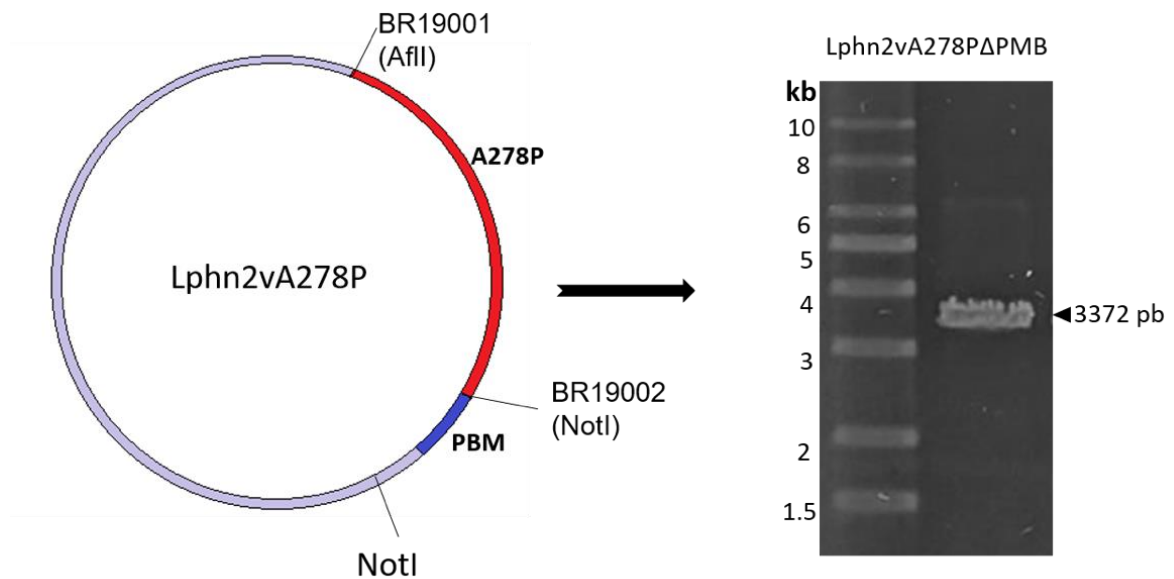


Figura 8. Producto de PCR de pCAGGS-Lphn2vA278P sin el motivo de unión a PDZ. Los oligos sentido (BR19001) y antisentido (BR19002) se utilizaron para amplificar la secuencia de Lphn2vA28P (rojo) sin la secuencia del PBM (azul) dando lugar a un amplicón de PCR de 3372 pb, que fue revelado en gel de agarosa con bromuro de etidio.

El amplicón obtenido de la PCR y el vector (pCAGGS-Lphn2vA278P) se sometieron a cortes con endonucleasas AflI y NotI, obteniendo fragmentos de 3,356 pb y 6756 pb respectivamente, los cuales fueron purificados para posteriormente hacer la reacción de ligación.

La construcción obtenida de la ligación pCAGGS-Lphn2vA278PΔPBM se utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH5α, las cuales fueron sembradas en placas de agar LB con ampicilina. Las unidades formadoras de colonias obtenidas se seleccionaron para extraer el ADNp y comprobar el tamaño del constructo de 10,112 pb con el patrón de bandas obtenidos del corte enzimático con EcoRI (5330, 2872 y 1911 pb) (Figura 9). Resultados que fueron corroborados con la secuenciación, donde se muestra la presencia de la mutación A278P (oligo EY180005) y la delección del motivo de unión a PDZ (oligo EY18009) (Anexo 1).

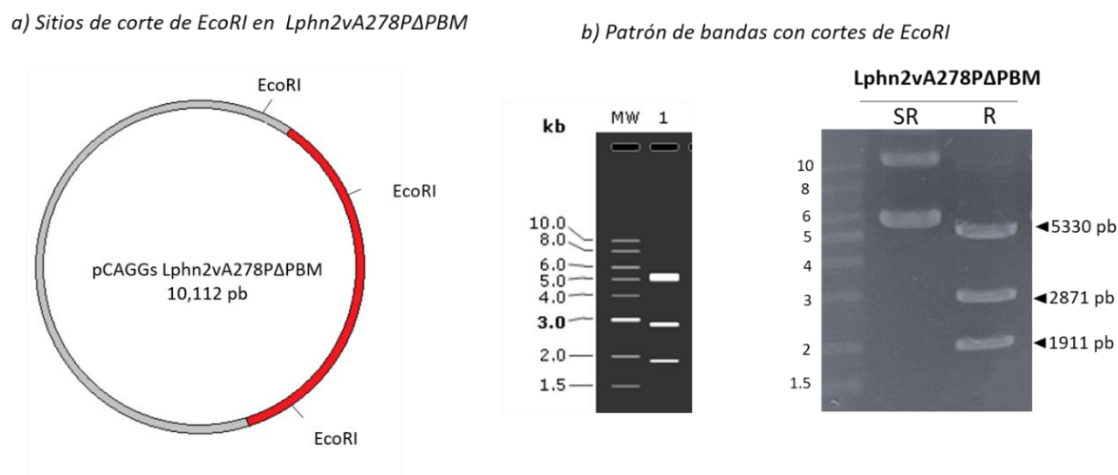


Figura 9. Comprobación por cortes enzimáticos de ANDp de pCAGGS-Lphn2vA278PΔPBM. a) Mapa de la construcción A278P sin el motivo de unión a PDZ con un tamaño de 10, 112 pb, donde muestra tres sitios de corte con EcoRI, b) Las bandas obtenidas fueron similares al patrón que muestra la digestión in silico. ADNp sin restringir (SR) y restringido con EcoRI (R).

En una segunda etapa, se procedió a obtener la construcción pCAGGS-Lphn2vΔPBM, esto por medio de digestión enzimática de Lphn2vA278PΔPBM con KpnI, la cual reconoce sitios adyacentes a la variante A278P, donde será reemplazado por la secuencia WT de Lphn2 (Figura 10). Los fragmentos de 2,890 pb de la secuencia WT y 7221 pb de Lphn2vA278PΔPBM fueron purificados y sometidos a ligación, para posteriormente transformar bacterias competentes *E. coli* DH5α y obtener colonias que integraron el plásmido, esto se comprobó con digestión enzimática de XbaI (7982 y 2129 pb) y su posterior secuenciación (anexo 2).

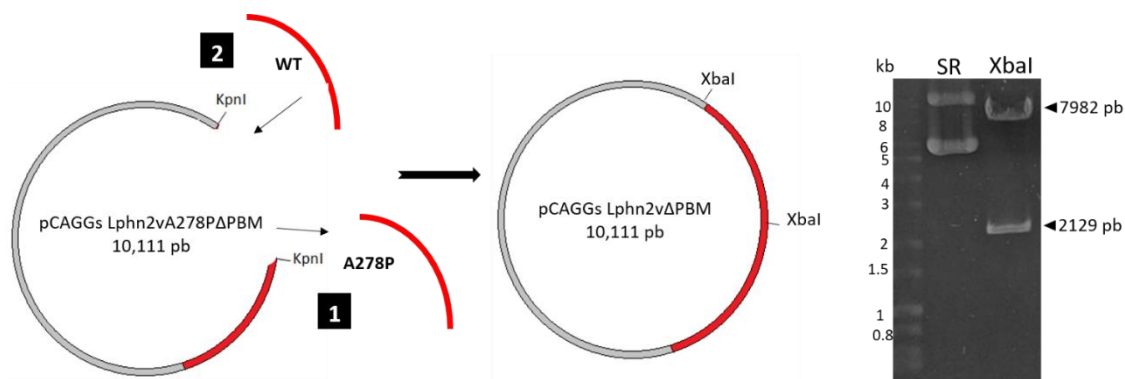


Figura 10. Construcción de pCAGGS-Lphn2vΔPBM. Lphn2v WT y Lphn2vA278PΔPBM se sometieron a digestión con la endonucleasa KpnI, esto con la finalidad de excluir el fragmento con la variante (1) y reemplazarla con la secuencia WT (2), obteniendo así un plásmido de 10,111 pb, tamaño que fue comprobado con la enzima XbaI.

Expresión de pCAGGS-Lphn2vΔPBM y pCAGGS-Lphn2vA278PΔPBM en células HEK293T: proteínas totales

Células HEK293T con una confluencia del 85% fueron sembradas en placas de 6 pozos y posteriormente transfectadas con pCAGGS-Lphn2vΔPBM y pCAGGS-Lphn2vA278PΔPBM por el método de PEI (polietilenimina). Al cumplir 48 post-transfección se realizó la extracción de proteínas totales, esto con la finalidad de evaluar la expresión de las construcciones a través de ensayos de Western Blot.

Cabe mencionar que el receptor Lphn cuenta con un sitio de autoproteólisis en el dominio GAIN, generando dos fragmentos del receptor denominados NTF (fragmento N-terminal) y CTF (fragmento C-terminal). Ambas construcciones tienen etiquetas que permiten detectar el receptor completo (RNC) y fraccionado en NTF y CTF, siendo las marcas de FLAG y mVenus respectivamente.

Con base en lo anterior, se realizó la detección del receptor completo (RNC) y el NTF con el anticuerpo anti-Flag, como se puede ver en la Figura 11 a-b, las bandas

con un peso aproximado ~207 kDa corresponden al RNC, mientras que para el NTF se observan dos bandas de distinto peso, pero se mantienen en el rango esperado de ~120 kDa, también se realizó la detención de α -tubulina ~55 kDa como control de carga. Los datos cuantitativos de la intensidad de fluorescencia de tres experimentos independientes se pueden observar en la figura 11 **c-h**, donde Lphn2v (WT) y Lphn2vA278P representan el 100% de expresión. Los datos cuantitativos para Lphn2v Δ PBM en RNC ($120\% \pm 11$), NTF ($106\% \pm 7$) y proporción NTF/RNC ($89\% \pm 9$) no son estadísticamente significativos al ser comparados con Lphn2v (WT) (Figura 11 c-e). En relación a Lphn2vA278P Δ PBM en comparación con Lphn2vA278P (Figura 11 f-h), las gráficas no indican diferencias de expresión en el RNC ($83\% \pm 17$) y el NTF ($53.9\% \pm 18$), siendo que en esta última muestra una disminución que no resulta significativa, sin embargo, se refleja en los resultados de ratio NTF/RNC donde disminuye hasta el hasta 63% para Lphn2vA278P Δ PBM ($p < 0.05$).

Por otra parte, en la fracción del CTF del receptor se encuentra la etiqueta mVenus, que puede ser detectada con el anticuerpo anti-GFP. Como podemos ver en la Figura 12 en el panel **a** y **b**, las bandas detectadas en ~207 kDa corresponden al receptor no cortado y las que se encuentran en ~87 kDa son del CTF. EL análisis de la intensidad de fluorescencia para Lphn2v Δ PBM en los paneles **c-e** de la Figura 12, muestran la expresión de RNC en $99\% (\pm 43)$, CTF $121\% (\pm 45)$ y la proporción CTF/RNC $181\% (\pm 53)$, resultados que al ser comparados con Lphn2v (100%) no resultan ser estadísticamente significativos. En línea con lo anterior, en las gráficas para Lphn2vA278P Δ PBM en comparación con Lphn2vA278P (100%) tampoco se observan diferencias en los niveles de expresión para RNC ($128\% \pm 25$), CTF ($120\%, \pm 27$) y la proporción CTF/RNC ($95\% \pm 17$) (Figura 12 f-h)

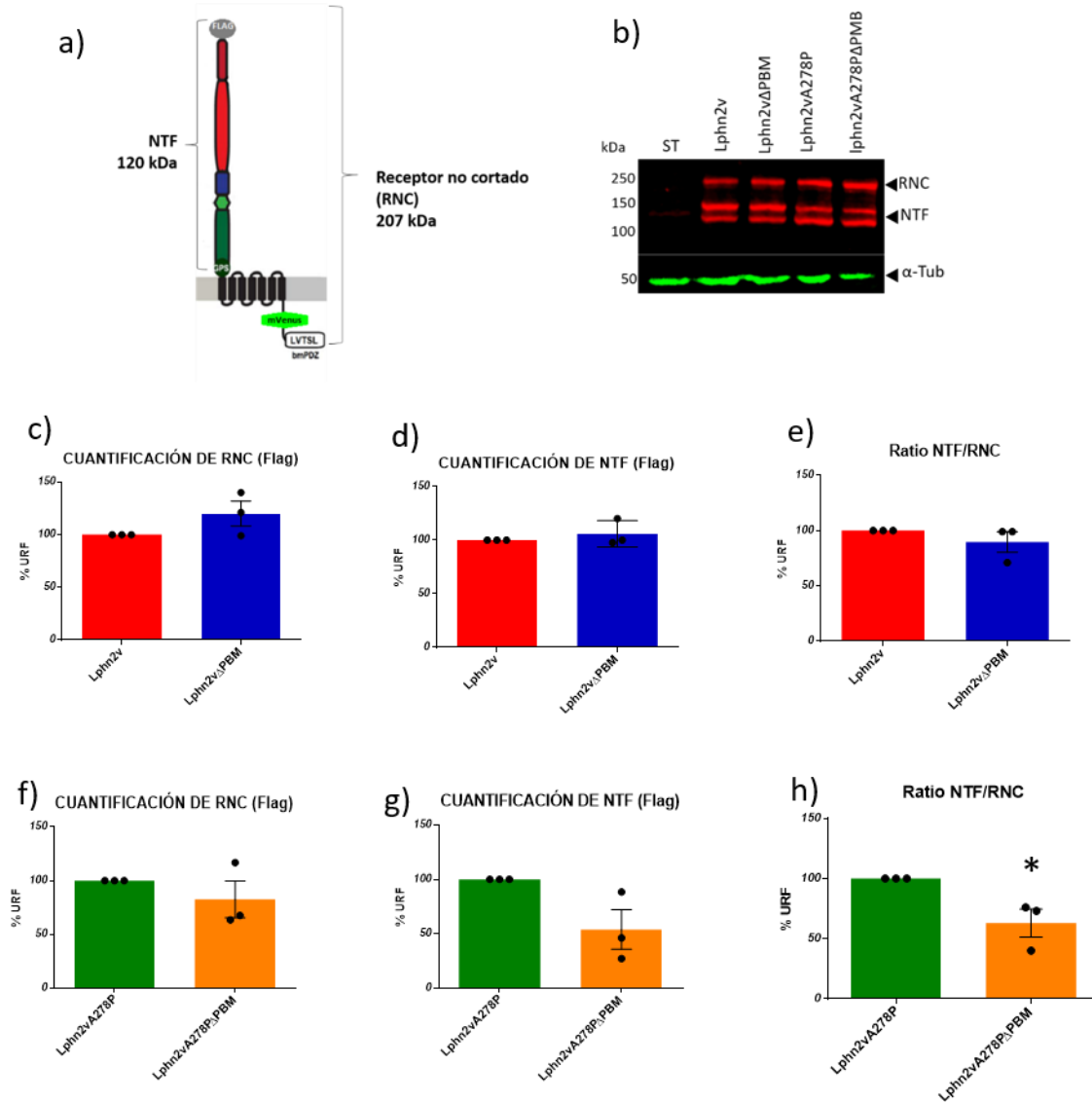


Figura 11. Expresión proteica de Lphn2vΔPBM y Lphn2vA278PΔPBM detectados con anti-Flag. a) Representación esquemática del receptor y sus fracciones detectadas a partir del corte autoproteolítico con el anticuerpo anti-FLAG, b) imagen representativa de los 3 ensayos independientes de Western Blot, de proteínas totales de células sin transfectar (ST) y células transfectadas con **Lphn2v**, **Lphn2vΔPBM**, **Lphn2vA278P** y **Lphn2vA278PΔPBM**: c) cuantificación del RNC, d) NTF y e) Ratio NTF/RNC de **Lphn2vΔPBM** en comparación con **Lphn2v** f) cuantificación del RNC, g) NTF y h) Ratio NTF/RNC de **Lphn2vA278PΔPBM** comparado con **Lphn2vA278P**. URF: Unidades relativas de fluorescencia. Análisis estadístico con la Prueba t-Student (* p < 0.05) ± error estándar.

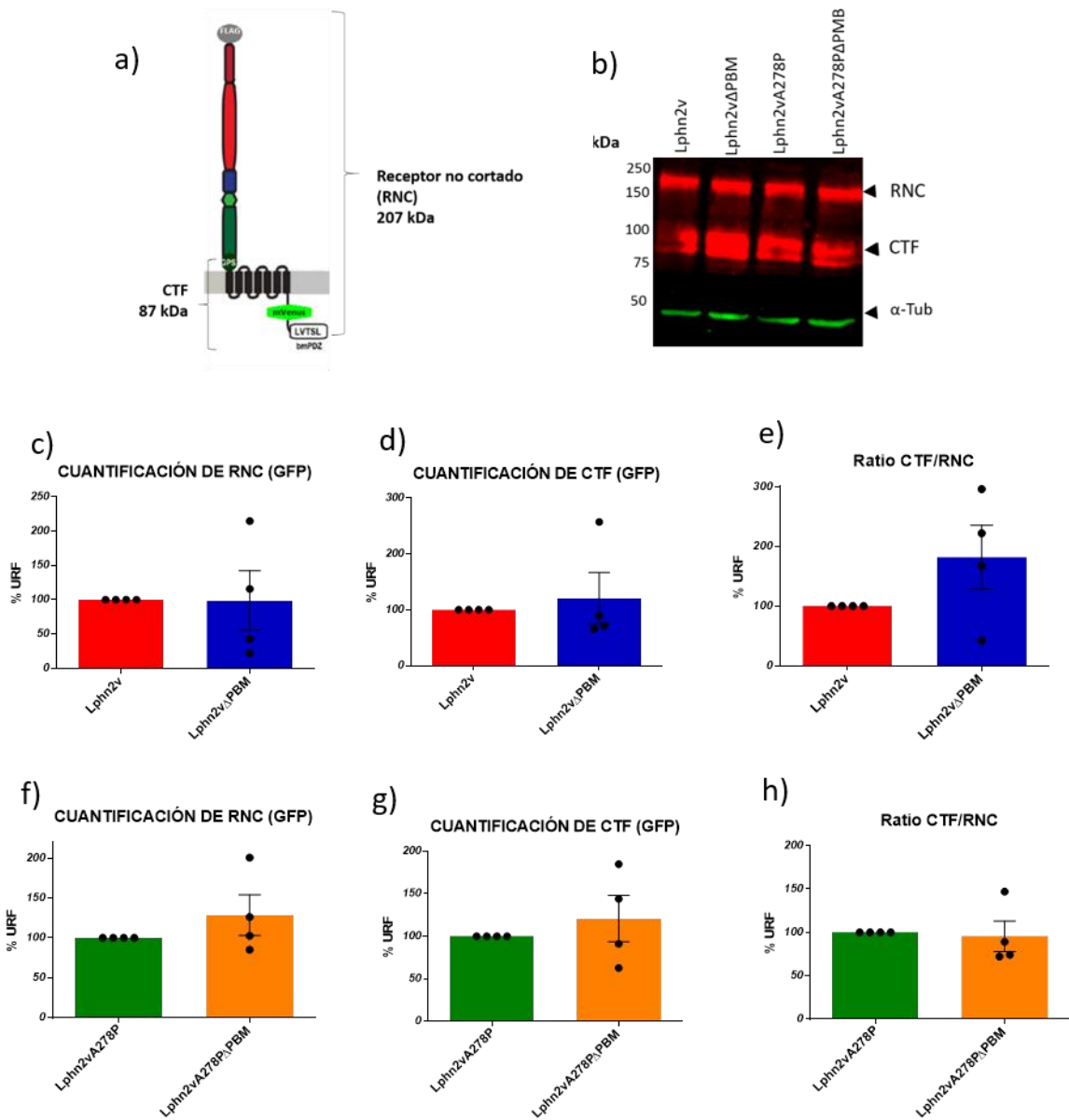


Figura 12. Expresión proteica de *Lphn2vΔPBM* y *Lphn2vA278PΔPBM* detectados con anti-GFP. a) Representación esquemática del receptor y sus fracciones detectadas a partir del corte autoproteolítico con el anticuerpo anti-GFP, b) imagen representativa de los 3 ensayos independientes de Western Blot, de proteínas totales de células sin transfectar (ST) y células transfectadas con *Lphn2v*, *Lphn2vΔPBM*, *Lphn2vA278P* y *Lphn2vA278PΔPBM*: c) cuantificación del RNC, d) NTF y e) Ratio NTF/RNC de *Lphn2vΔPBM* en comparación con *Lphn2v* f) cuantificación del RNC, g) NTF y h) Ratio NTF/RNC de *Lphn2vA278PΔPBM* comparado con *Lphn2vA278P*. URF: Unidades relativas de fluorescencia. Análisis estadístico con la Prueba t-Student con \pm error estándar.

Expresión de pCAGGS-Lphn2v Δ PBM y pCAGGS-Lphn2vA278P Δ PBM sobre la membrana celular

Con el objetivo de determinar el efecto del motivo de unión a PDZ sobre la expresión en membrana del receptor, se transfectaron células HEK293T con las construcciones Δ PBM por 48 horas y posteriormente fueron fijadas sin permeabilizar para permitir la detección del NTF extracelular con anti-FLAG (Figura 13). El vector pCMV fue utilizado como control (100%), con base en ello el porcentaje de expresión en membrana de Lphn2v es 372%, valor que disminuye significativamente al deletar el motivo de unión a PDZ en Lphn2v Δ PBM (300%), mientras que Lphn2vA278P logra un nivel de expresión en membrana del 199%.

De forma general, todas las construcciones analizadas tienen un aumento de su expresión en membrana en relación al control (pCMV).

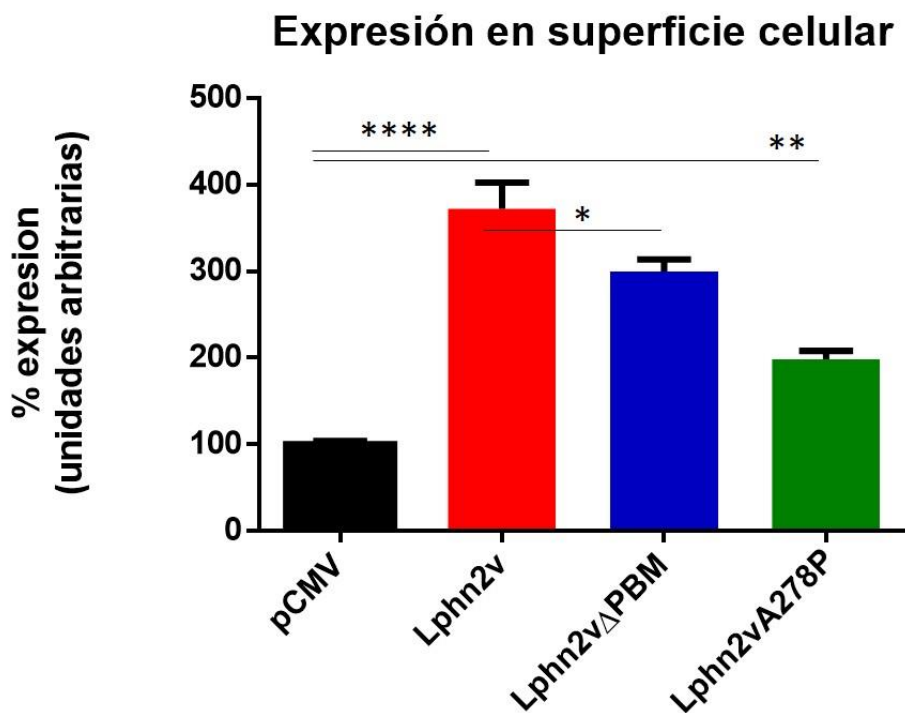


Figura 13. Efecto del PBM sobre la expresión del receptor en superficie celular. Se realizó la detección del NTF expuesto en membrana celular de **pCMV**, **Lphn2v**, **Lphn2v Δ PBM** y **Lphn2vA278P** en células HEK293T fijadas con PFA al 4%. La reacción colorimétrica se cuantificó en una densidad óptica de 650 nm. Análisis comparativo con Sidak's, \pm error estándar. N=1 con 5 réplicas por muestra. * ($p \leq 0.05$) ** ($p \leq 0.01$) **** ($p \leq 0.0001$).

Efecto de Δ PBM sobre la morfología de células HEK293T

Con el propósito de determinar el efecto del motivo de unión a PDZ sobre la morfología celular, se realizaron transfecciones de pCAGGS-Lphn2v Δ PBM y pCAGGS-Lphn2vA278P Δ PBM en células HEK293T, las cuales posteriormente fueron teñidas y analizadas por microscopía confocal.

En la figura 14 podemos observar la morfología de las células HEK293T con cada uno de las construcciones transfectadas, los cuales fueron detectados por la señal mVenus que se encuentra acoplado en el CTF (verde). Las células que expresan Lphn2v muestran de manera general, una forma redondeada y denotan la ausencia de estructuras de actina, efecto que es similar para Lphn2vA278P. Por el contrario, las células con los receptores que tienen ausente el motivo de unión a PDZ, Lphn2v Δ PBM y Lphn2vA278P Δ PBM, se muestran más extendidas e incluso tienen estructuras de actina tales como filopodios y lamelipodios.

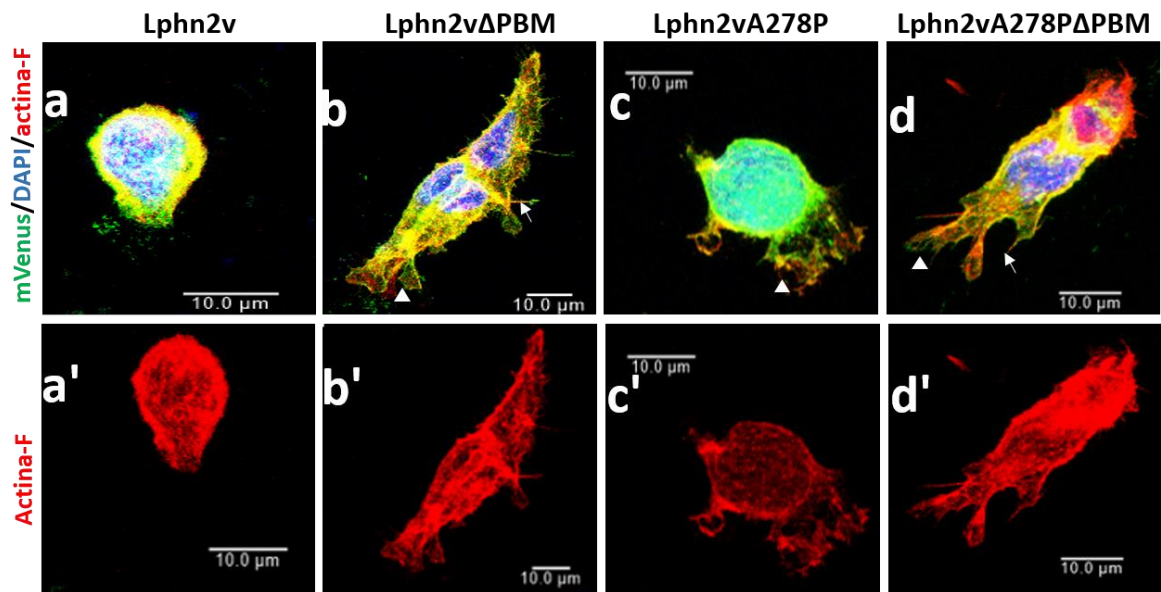


Figura 14. Cambio en la morfología de células HEK293T en ausencia del motivo de unión a PDZ. Imágenes obtenidas con microscopio de escaneo laser confocal Leica TCS SP8 de células HEK293T transfectadas con **Lphn2v(a-a')**, **Lphn2v Δ PBM(b-b')**, **Lphn2vA278P(c-c')** y **Lphn2vA278P Δ PBM (d-d')** (100X). En verde se muestra la señal de mVenus acoplado en el CTF del receptor, en rojo el citoesqueleto de actina teñido con rodamida-faloidina y en azul el núcleo celular (DAPI). Flecha blanca-Filopodios, punta de flecha-lamelipodios. Imágenes

representativas de 4 experimentos independientes, Lphn2v (N=51), Lphn2v Δ PBM (N=55), Lphn2vA278P (53) y Lphn2vA278P Δ PBM (N=49). Escala de 10 μ m.

En referencia a la morfología celular observada en microscopia confocal, se realizó la cuantificación de población celular con estructuras de actina (Figura 15). En los resultados se observa que un 48% (\pm 15.2) de las células transfectadas con Lphn2v tienen filopodios, mientras que Lphn2v Δ PBM tiene un 84 % (\pm 6.3), el análisis comparativo entre ambos grupos no muestra diferencia significativa. De forma similar, el análisis comparativo de la población celular con filopodios de Lphn2vA278P (79% \pm 6.5) y Lphn2vA278P Δ PBM (85% \pm 6.6) no tienen cambios significativos (Figura 15-a).

De forma notable, Lphn2v Δ PBM tiene un aumento significativo del 85% (\pm 5) de células con lamelipodios, más del doble de las que tiene Lphn2v con 40% (\pm 9), de forma contraria, no se observan cambios entre Lphn2vA278P (64.25 \pm 9.6) y Lphn2vA278P Δ PBM (83.25 \pm 5) (Figura 15-b). Finalmente, en los resultados obtenidos en relación a los blebs, Lphn2v tiene un 29 % (\pm 10) de población con blebs y Lphn2v Δ PBM un 7% (\pm 2.6) sin mostrar cambios significativos, resultados similares se obtienen para Lphn2vA278P (30 \pm 3.7) y Lphn2vA278P Δ PBM (12 \pm 2.4) (Figura 15-c).

En general, los resultados indican que no existe un efecto del motivo de unión a PDZ sobre la formación de filopodios y blebs, aunque en este último hay una tendencia a la disminución en la población celular. Sin embargo, se observó un aumento significativo en la población que contiene lamelipodios cuando se deleta el motivo de unión a PDZ en Lphn2v, pero no en Lphn2vA278P.

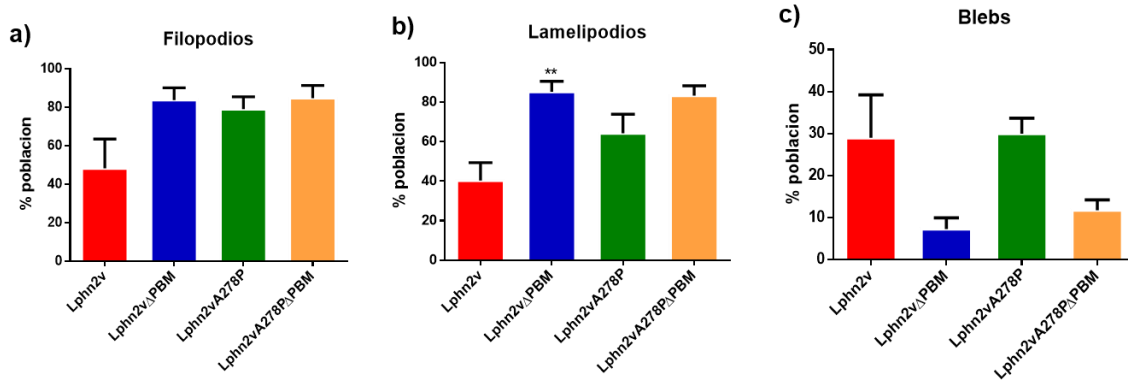


Figura 15. Cambios poblacionales de las estructuras de actina inducidos por el motivo de unión a PDZ. A partir de las imágenes obtenidas por microscopía confocal de células HEK293T transfectadas con **Lphn2v**, **Lphn2vΔPBM**, **Lphn2vA278P** y **Lphn2vA278PΔPBM** por el método de PEI, se realizaron las cuantificaciones porcentuales de las estructuras de actina de forma poblacional: a) filopodios, b) lamelipodios y c) blebs, valores que fueron expresados en %. Imágenes representativas de 4 experimentos independientes, Lphn2v (N=51), Lphn2vΔPBM (N=55), Lphn2vA278P (53) y Lphn2vA278PΔPBM (N=49). Análisis comparativo con Sidak's, ** (Lphn2v vs Lphn2vΔPBM, $p \leq 0.01$) \pm error estándar.

Para caracterizar el efecto del PBM sobre las estructuras de actina se realizó un conteo por célula de filopodios, lamelipodios y blebs (Figura 16). Como se puede observar en las gráficas de la figura 16-a, Lphn2v WT tiene en promedio 3 filopodios por célula, mientras que el efecto de deletar el motivo de unión a PDZ resulta en un aumento significativo de hasta tres veces este valor, con 9 filopodios por célula en Lphn2vΔPBM ($p < 0.005$). De manera similar ocurre en el análisis comparativo entre Lphn2vA278P y Lphn2vA278PΔPBM, donde el primero tiene un promedio de 4 filopodios por célula mientras el segundo tiene un aumento significativo de 6 filopodios.

Por otra parte, en el análisis de frecuencias de la figura 16-b, Lphn2v concentra casi el 60% de su población celular con 0 filopodios, distribuyendo el restante en rangos de 2 a 10 filopodios por célula, sin embargo, Lphn2vΔPBM, tiene un rango de distribución más amplio (0-20) donde las frecuencias más altas del 20% se concentra en dos rangos 0 y 6 filopodios, a diferencia de Lphn2v los valores restantes no tienen una disminución gradual en rangos más altos, más bien se

distribuye heterogéneamente. Lphn2vA278P muestra el 30% de su población con 2 filopodios y el restante se distribuye gradualmente en rangos más altos, siendo la máxima de 12 filopodios por célula, sin embargo, Lphn2vA278PΔPBM, tiene un rango de distribución de 0-20, donde la frecuencia más alta, casi el 30 % se concentra en 4 filopodios, destacando que solo las construcciones ΔPBM alcanzaron el valor máximo de 20 filopodios.

En la cuantificación de lamelipodios por célula se puede observar que Lphn2v tiene 1.5 de valor promedio, valor que resulta duplicado para Lphn2vΔPBM con 3 lamelipodios ($p < 0.005$). En referencia a Lphn2vA278P, los valores se mantienen equiparables a Lphn2vA278PΔPBM, teniendo un promedio cercano a 2 lamelipodios por célula (Figura 16-c). En el análisis de frecuencias, Lphn2v concentra al 60% de su población celular con 0 lamelipodios, las frecuencias restantes se distribuyen en un rango de 1-5, en tanto Lphn2vΔPBM tiene un rango de distribución más amplio de 0-9 lamelipodios, donde las frecuencias no se concentran en un solo rango. Para Lphn2vA278P se observa el pico máximo de frecuencias (casi 40%) en 0 lamelipodios, mientras el restante disminuye gradualmente llegando al máximo de 7 lamelipodios, en cambio Lphn2vA278PΔPBM tiene un máximo de 8 lamelipodios por célula, obteniendo un patrón de distribución a análogo al de Lphn2vA278P (Figura 16-d).

La última estructura de actina analizada fueron los blebs por célula, donde no se observan cambios significativos para Lphn2vΔPBM en comparación de Lphn2v, ambos receptores tienen un promedio de 2 blebs por célula. Igualmente, el análisis comparativo de Lphn2vA278P y Lphn2vA278PΔPBM no arroja diferencias, conservando un promedio de 1 bleb por célula (Figura 16-e). En la figura 16-f, se observa que Lphn2v y Lphn2vA278P concentran al 70% de su población celular con 0 lamelipodios, alcanzando valores máximos de distribución en 6 blebs, a diferencia de ello Lphn2vΔPBM y Lphn2vA278PΔPBM tienen más del 90% de su población con blebs con 0 blebs, donde el rango máximo de distribución fue de 4 y 3 blebs respectivamente.

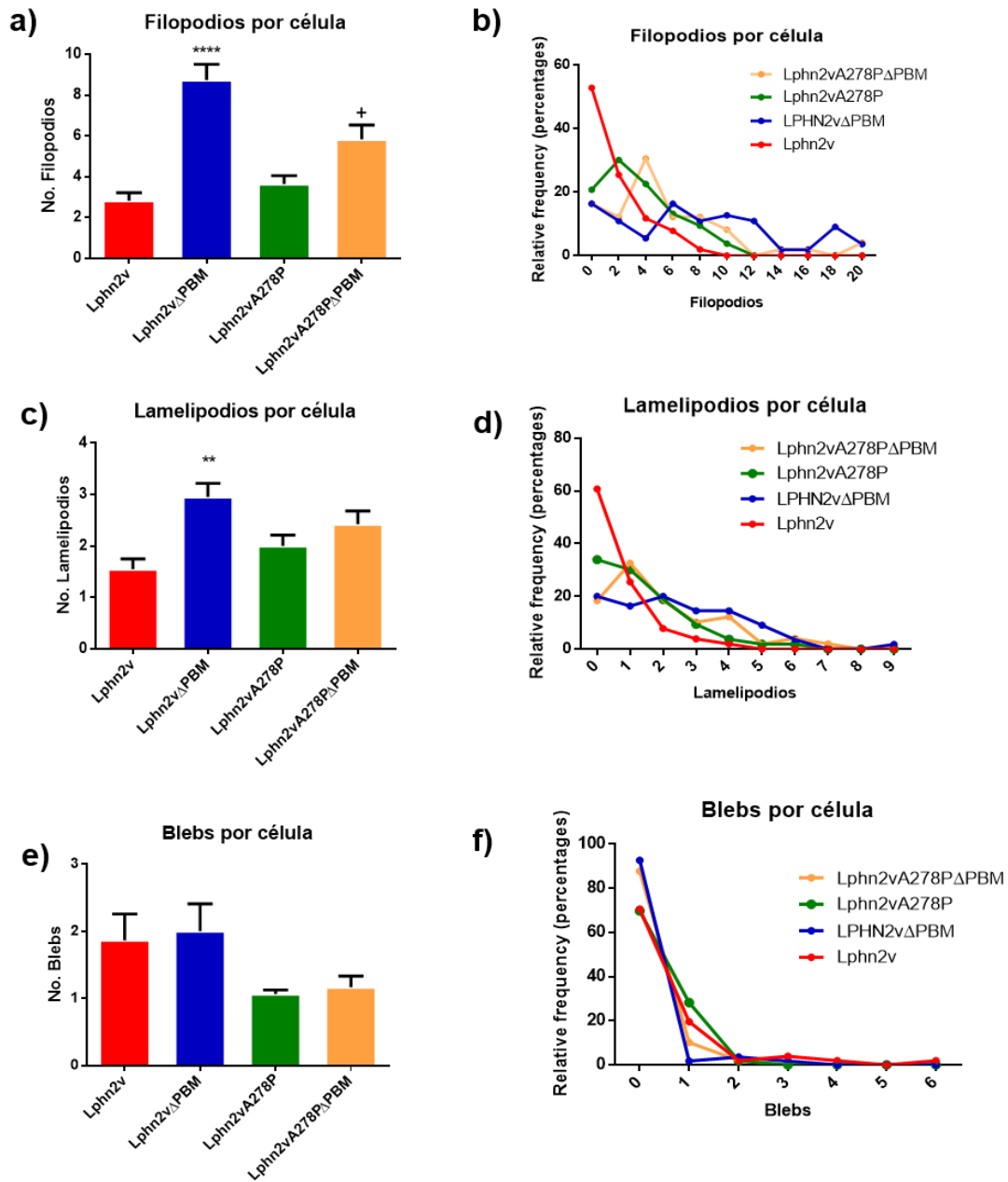


Figura 16. Cambios en las estructuras de actina por el motivo de unión a PDZ. A partir de las imágenes obtenidas por microscopia confocal de 4 experimentos independientes, se realizaron las cuantificaciones de las estructuras de actina por célula y se graficaron la distribución de frecuencias: **a-b)** filopodios, **c-d)** lamelipodios y **e-f)** blebs. **Lphn2v** (N=51), **Lphn2vΔPBM** (N=55), **Lphn2vA278P** (53) y **Lphn2vA278PΔPBM** (N=49). *(Lphn2v vs Lphn2vΔPBM), +(Lphn2vA278P vs Lphn2vA278PΔPBM). Análisis comparativo con Sidak's, ± error estándar. **($p < 0.01$), ****($p < 0.0001$), +($p < 0.05$).

Efecto del motivo de unión a PDZ sobre parámetros celulares

Para denotar cuantitativamente los cambios morfológicos observados en las células HEK293T, se realizó la medición de parámetros celulares a partir de las imágenes obtenidas por microscopia confocal. Lphn2v y Lphn2vA278P fueron utilizados como controles comparativos para Lphn2v Δ PBM y Lphn2vA278P Δ PBM, respectivamente.

Como se puede observar en las gráficas de la figura 17-a, las células que expresan Lphn2v tienen un perímetro promedio de 54 μ m, valor que aumenta significativamente en Lphn2v Δ PBM con 87 μ m. En los datos para Lphn2vA278P no se observan cambios al ser comparados con Lphn2vA278P Δ PBM, teniendo perímetros de 73 μ m y 83 μ m respectivamente.

Al analizar la distribución de frecuencias se observa que el 55% de células que expresan Lphn2v tienen un perímetro de 50 μ m, mientras que el 20% tiene 70 μ m y en menor proporción se registran células con perímetros de 90-130 μ m (25%), en tanto a Lphn2v Δ PBM tienen una distribución más homogénea y rangos más amplios de 50-230 μ m, con su pico máximo de distribución entre 50-70 μ m (40%). En relación a Lphn2vA278P tiene un patrón distribución similar al de Lphn2v, con su pico máximo de distribución (50%) en 50 μ m, pero con un rango de 50-210 μ m. De forma diferente, Lphn2vA278P Δ PBM tiene casi el 40% de su población con 70 μ m de perímetro, con un rango de distribución de 50- 210 μ m (Figura 17-b).

Los valores para el perímetro nuclear se mantienen en un promedio similar para Lphn2v (33 μ m) y Lphn2v Δ PBM (34 μ m), valores que incluso son cercanos para Lphn2vA278P (34 μ m) y Lphn2vA278P Δ PBM (36 μ m). No obstante, el patrón de distribución de frecuencias para Lphn2v muestra el pico máximo de su población (50%) con un perímetro de 28 μ m y el resto de la población celular se distribuye en menor proporción cuando el perímetro nuclear es mayor con un valor máximo de 60 μ m, sin embargo, para Lphn2v Δ PBM el 50% de células tiene un perímetro de 36 μ m. En cuanto a Lphn2vA278P tiene un patrón de distribución similar al de Lphn2v Δ PBM, donde el 50% de la población celular tiene un perímetro nuclear de 36 μ m, otra gran parte de la población (40%) tiene un valor de 28 μ m, mientras

Lphn2vA278PΔPBM se distribuye de forma concentrada entre 28 y 44 μm, teniendo al 40% y 30 % de población celular respectivamente (Figura 17 c-d).

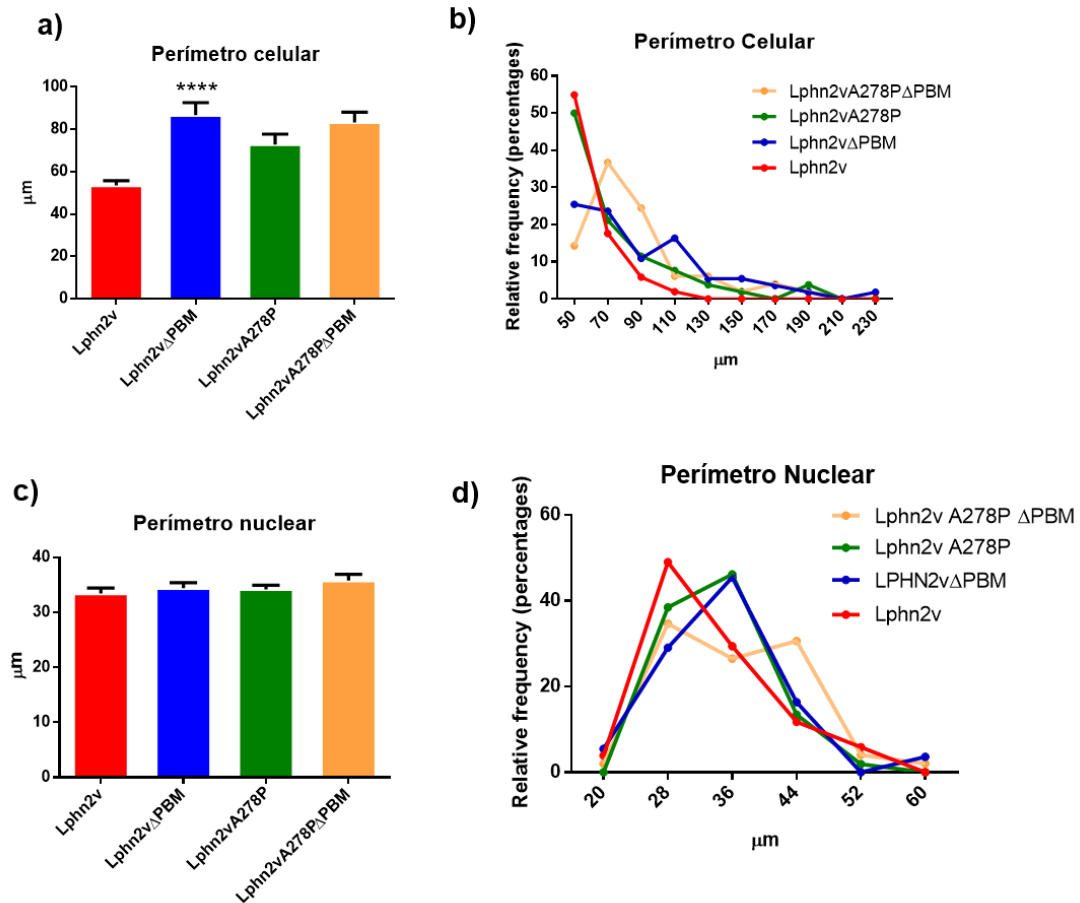


Figura 17. Efecto de Lphn2vΔPBM y Lphn2vA278PΔPBM sobre perímetro. La medición de perímetros se realizó a partir de las imágenes obtenidas por microscopía confocal de células HEK293T tranfectadas con **Lphn2v**, **Lphn2vΔPBM**, **Lphn2vA278P** y **Lphn2vA278PΔPBM**: a-b) perímetro celular y distribuciones de frecuencias c-d) perímetro nuclear y distribución de frecuencias. * Lphn2v vs Lphn2vΔPBM, + Lphn2v vs Lphn2vA278PΔPBM. Análisis comparativo con Sidak's, ****(p<0.0001) ± error estándar. Cuatro experimentos independientes, Lphn2v (N=51), Lphn2vΔPBM (N=55), Lphn2vA278P (53) y Lphn2vA278PΔPBM (N=49).

De forma continua con el análisis, se tomaron en cuenta las mediciones del área celular, nuclear y de citosol (Figura 18). En la figura 18 panel **a**), se puede observar que las células que expresan el receptor Lphn2v tiene un área celular promedio de 133 μm², mientras Lphn2vΔPBM tiene un aumento significativo de tamaño con 202 μm². Sin embargo, para Lphn2vA278P (169 μm²) en comparación con

Lphn2vA278P Δ PBM (204 μm^2) no tienen cambios significativos. En panel b (figura 18) se observa la distribución de frecuencias, donde el área celular de Lphn2v se distribuye en un rango de 100-400 μm^2 teniendo a casi el 80% de su población en 100 μm^2 , a diferencia de los resultados anteriores, Lphn2v Δ PBM tiene mayor frecuencia de células en valores de 100 y 200 μm^2 , pero con un rango máximo de 700 μm^2 de área celular. Lphn2vA278P tiene una frecuencia del 50% en 100 μm^2 de área celular y el 40% en 200 μm^2 , las frecuencias restantes se distribuyen minoritariamente entre 300 y 400 μm^2 , en relación a con Lphn2vA278P Δ PBM en los resultados se observa la distribución de frecuencias similar al patrón de Lphn2v Δ PBM, teniendo la más alta frecuencia (50%) en 200 μm^2 , con rango de área celular de 100-500 μm^2 .

En el área nuclear, no se observan diferencias entre Lphn2v y Lphn2v Δ PBM, obteniendo un valor similar de 71 μm^2 , conservando este valor incluso en las células que expresan Lphn2vA278P, resultados que al ser comparado con Lphn2vA278P Δ PBM (82 μm^2) no revelan diferencias. En concordancia con lo anterior, los cuatro receptores muestran una distribución de frecuencias equivalente, teniendo al mayor porcentaje celular en un área nuclear de 60 μm^2 (Figura 18 c-d).

El último parámetro celular cuantificado fue el área del citosol (figura 18 e-f). Las células que expresan Lphn2v tienen un área citosólica en promedio de 63 μm^2 , importantemente Lphn2v Δ PBM tiene un aumento significativo en comparación el resultado anterior con 131 μm^2 . El análisis comparativo entre Lphn2vA278P y Lphn2vA278P Δ PBM, no arrojan diferencias en el área citosólica de ambos receptores, teniendo valores de 98 μm^2 y 122 μm^2 respectivamente. Entre las distribuciones de frecuencias analizadas, el área de citosol denota patrones muy heterogéneos entre receptores, Lphn2v tiene al 60% de su población con un área del citosol de 60 μm^2 y en menor medida en rangos de 20 μm^2 y 100 μm^2 . Para Lphn2v Δ PBM la distribución es heterogénea en el rango de 20 y 220 μm^2 , donde 60 μm^2 y 140 μm^2 tienen la misma frecuencia del 30%. Las células que expresan Lphn2vA278P tienen una frecuencia mayoritaria entre 60-100 μm^2 y en menor medida en 140-220 μm^2 en área de citosol, mientras que Lphn2vA278P Δ PBM, tiene

una población concentrada en el rango de 100-140 μm^2 de área citosólica, en menor medida se distribuyen en 60, 180 y 220 μm^2 .

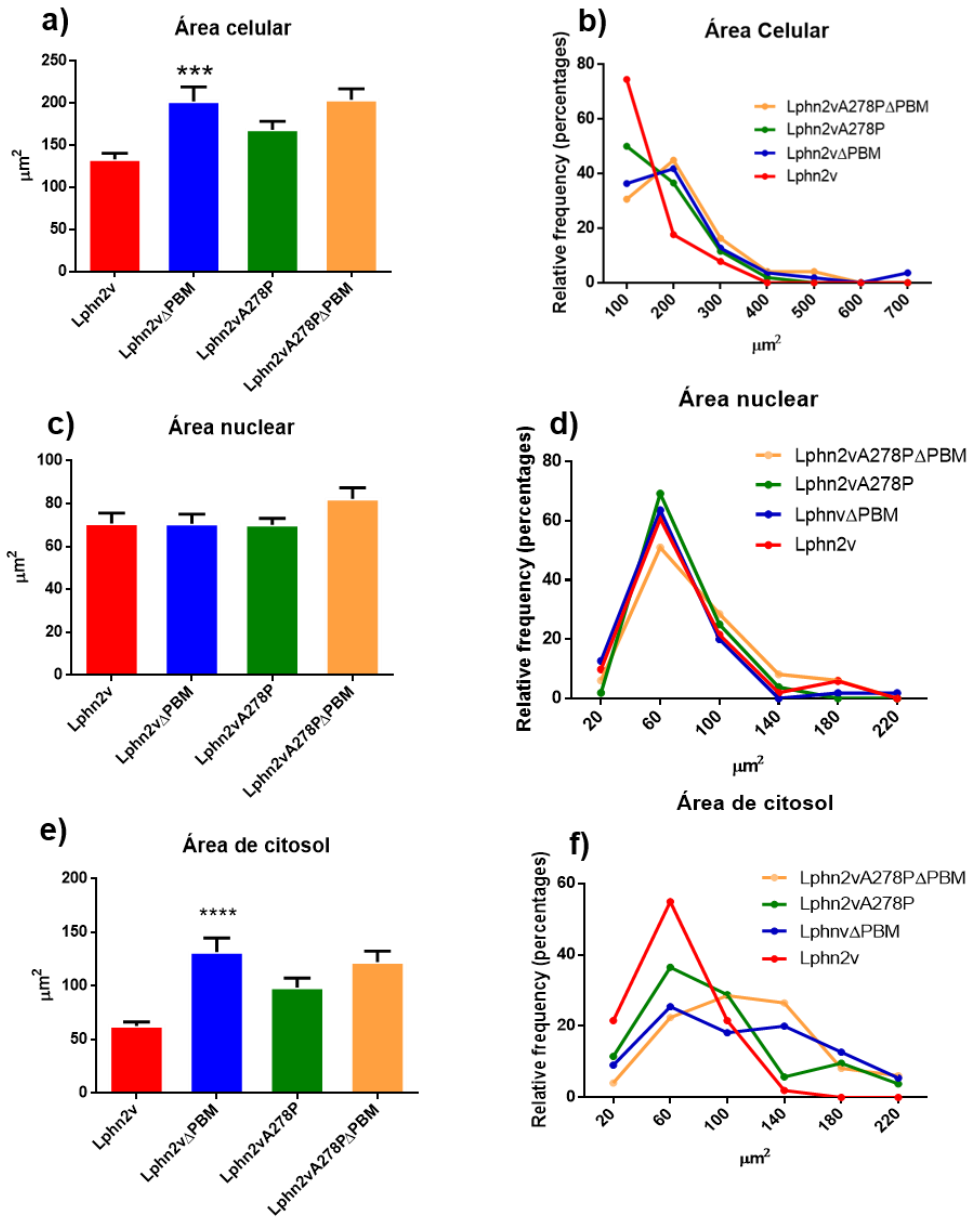


Figura 18. Efecto de Δ PBM sobre el área. La medición de áreas se realizó a partir de las imágenes obtenidas por microscopía confocal de 4 experimentos independientes con células HEK93T trasfectadas: a-b) área celular y distribuciones de frecuencias c-d) área nuclear y distribución de frecuencias, e-f) área de citosol y la distribución de sus frecuencias. * **Lphn2v** vs **Lphn2v Δ PBM**, - **Lphn2v** vs **Lphn2vA278P Δ PBM**. Análisis comparativo con Sidak's, ***($p < 0.001$), ****($p < 0.0001$). Lphn2v (N=51), Lphn2v Δ PBM (N=55), Lphn2vA278P (53) y Lphn2vA278P Δ PBM (N=49).

X. DISCUSIÓN

Las propiedades de adhesión, así como las vías de señalización, son dos de las vertientes más estudiadas en las Latrofilinas. Esta subfamilia de los GPCRs de adhesión cuenta con tres miembros, Lphn1, Lphn2 y Lphn3, los cuales se expresan de forma diferencial, las isoformas 1 y 3 se concentran mayoritariamente en cerebro, mientras que Latrofilina 2 es de expresión ubicua, por lo que resulta interesante explorar sus funciones en otros tejidos (Boucard, et al., 2014).

Dentro de nuestro grupo de trabajo, se ha demostrado que la sobreexpresión de Lphn2 en células HEK293T induce cambios en el citoesqueleto de actina, los cuales se manifiestan en la morfología celular, donde de ser células extendidas, aplanadas, con la presencia de lamelipodios y filopodios, pasan a mostrar un redondeamiento celular, acompañado de la pérdida de las estructuras de actina y dando paso a la formación de blebs (Cruz-Ortega & Boucard, 2019). En este contexto, Lphn2 cuenta con un motivo de unión a PDZ (PBM) en la parte intracelular, esta secuencia sirve como sitio de reconocimiento para múltiples proteínas asociadas a actina, formando de esta forma un posible eje de interacción molecular entre receptor-citoesqueleto, por lo cual este trabajo se enfocó en evaluar el papel del PBM de Latrofilina 2 sobre la morfología celular. Por otra parte, la presencia de mutaciones puede conducir a cambios en la señalización e incluso alterar el patrón de autoproteólisis, resultando un punto importante por abordar sobre todo cuando estos se presentan en algunas patologías como cáncer (Yu, et al., 2000). Por lo cual, se incluyó la evaluación de Lphn2 y de la variante A278P.

Para evaluar la funcionalidad del PBM en la morfología celular se generaron las construcciones, pCAGGS-Lphn2vA278P Δ PBM (Lphn2vA278P Δ PBM) y pCAGGS-Lphn2v Δ PBM (Lphn2v Δ PBM). En estas construcciones se excluyeron los últimos 5 aminoácidos (LVTSL) que conforman el PBM y de forma diferencial en el NTF de Lphn2vA278P Δ PBM tiene el codón CCC que codifican para prolina en la posición 278 (Figura 8 y 9). Mientras que la zona secuenciada del NTF de Lphn2v Δ PBM está el codón GCC que codifica para alanina en la posición 278, mostrando de esta forma la secuencia WT (Figura 10).

Una vez obtenidas las construcciones Δ PBM fueron transfectadas por el método de PEI en células HEK293T, esto con la finalidad de comprobar su expresión a través de ensayos Western Blot, para ello se utilizaron anticuerpos anti-Flag para detectar la bandera FLAG en el NTF y anti-GFP que reconoce las etiqueta mVenus acoplada en el CTF.

La expresión de proteínas totales detectadas con anti-FLAG, muestran tres bandas con diferente patrón migratorio pero que son consistentes en todas las muestras analizadas, una de ellas tiene un peso aparente de ~207 kDa que corresponde al valor reportado para el receptor no cortado (RNC) y las dos bandas inferiores rondan entre los marcadores de peso de 100 y 150 kDa, representando un valor cercano al peso teórico del NTF que surge por el corte autoproteolítico (~120 kDa) (Arac, et al., 2012). Las diferencias entre las bandas que representan al NTF pueden deberse a modificaciones postraduccionales como glicosilaciones o fosforilaciones. No se reportan diferencias en los datos cuantitativos del RNC y NTF para Lphn2v y Lphn2v Δ PBM, demostrando que el motivo de unión a PDZ no ejerce un efecto sobre la expresión total del receptor, resultado que se ve reflejado en la proporción NTF/RNC. En el análisis comparativo entre Lphn2vA278P Δ PBM y Lphn2vA278P, no se observan diferencias en los niveles de expresión del RNC y NTF, sin embargo, se observa una disminución significativa en la proporción NTF/RNC (Figura 11).

Por otra parte, los resultados obtenidos con el anticuerpo anti-GFP muestran la detección de dos bandas de diferente peso, que resultan estar en todas las muestras. La banda superior corresponde al RNC de ~207 kDa, mientras que la banda inferior representa al CTF de ~87 kDa (Figura 12-a). Los datos cuantitativos, indican que no existe diferencia de expresión entre Lphn2v y Lphn2v Δ PBM, observando los mismos porcentajes promedio de expresión sobre el RNC, CTF y ratio CTF/RNC. De forma similar, Lphn2vA278P Δ PBM muestra niveles de expresión equiparables con Lphn2vA278P, sin tener cambios en las cuantificaciones del RNC, CTF y ratio CTF/RNC (Figura 12).

Curiosamente, los resultados de expresión sobre superficie celular no ocurren de la misma manera que los de proteínas totales, dado que en una primera exploración se observa que el Δ PBM induce una disminución del NTF detectado para Lphn2v,

apuntando hacia una de las funcionalidades descritas para secuencias PDZ, servir como puente de interacción entre complejos moleculares para dar estabilidad al receptor en la membrana celular (Dunn & Ferguson, 2015).

En línea con lo anterior, se ha reportado que la eliminación del motivo de unión a PDZ de aGPCRs no altera el índice de autoproteólisis, por lo cual la integración de los resultados podrían indicar un aumento en la internalización del receptor debido a la falta de estabilidad dada por Δ PBM, por lo cual no se observan cambios en la expresión total detectados con anti-FLAG y anti-GFP, pero sí de forma localizada en la detección del NTF de superficie celular, aunque no se debería descartarse la posibilidad del aumento del índice de autoproteólisis, si bien no se observan diferencias en la proporción NTF/RNC podrían deberse a la capacidad del NTF de re-asociarse a la membrana celular e incluso modificar algunas de sus propiedades bioquímicas como la ganancia de modificaciones postraduccionales como glicosilaciones, siendo la posible razón por la cual se observan diferencias entre los patrones migratorios del NTF detectado con anti-FLAG (Hilbig, et al., 2018; Huang, et al., 2018).

Por otra parte, en un primer ensayo para Lphn2vA278P, se observa una disminución del NTF detectado en superficie celular en comparación con Lphn2v, lo cual resulta interesante para Lphn2vA278P Δ PBM, donde se reporta una ligera disminución del NTF, cambio que no es significativo, pero si resulta importante en la proporción NTF/RNC. Resultados previos en nuestro grupo de trabajo han demostrado que la variante induce un incremento en el índice de autoproteólisis sobre fracción membranal, pero no se refleja en los niveles de proteína total, por lo cual los resultados en la proporción NTF/RNC pueden derivarse de un efecto sumatorio entre la variante y Δ PBM, efectos que de manera individual no logran tener. (Ojeda Muñiz, 2019). Por un lado, la variante podría estar induciendo la disociación entre NTF y CTF en membrana, mientras que la inestabilidad dada por el Δ PBM conlleve a la internalización del receptor solo con el CTF, lo cual explicaría porque no existen cambios en su detección con anti-GFP, pero si con la detección del NTF con anti-FLAG.

Las células HEK293T poseen una morfología tipo epitelial, siendo alargadas y aplanadas, además de poseer prolongaciones como lamelipodios y filopodios. Sin embargo, la transfección de estas células con Lphn2v provoca un redondeamiento celular y pérdida de estructuras de actina. Por lo cual el siguiente paso en el análisis del motivo de unión a PDZ de Lphn2 fue determinar su papel en los cambios observados en la morfología celular, para lo cual se tomaron imágenes de células HEK293T que expresaban Lphn2v Δ PBM y Lphn2vA278P Δ PBM, esto con la ayuda del con el microscopio confocal

De acuerdo a los resultados observados, las células transfectadas con Lphn2v Δ PBM muestran una morfología aplanada, con la presencia de lamelipodios y filopodios, mostrando una gran diferencia al fenotipo marcado con Lphn2v. Por otra parte, Lphn2vA278P provoca que las células sean esféricas, pero logrando conservar algunas estructuras de actina, en caso contrario, Lphn2vA278P Δ PBM exhibe células alargadas con prolongaciones de actina (Figura 14). Con la finalidad de definir lo cambios observados en microscopia confocal, se realizó la cuantificación de estructuras de actina a nivel poblacional e individual: lamelipodios, filopodios y blebs (Figura 15 y 16). La delección del PBM de Lphn2v, promueve un aumento en el número de filopodios por célula y lamelipodios, en este último ocurre de forma individual y poblacional, además, no ejerce un efecto variable sobre la formación de blebs, aunque se observa una tendencia poblacional a disminuir. Las diferencias detectadas en las estructuras de actina indican una magnitud variable del Δ PBM en Lphn2v, lo cual es reforzado por los resultados en la distribución de frecuencias, observando células con valores máximos de 20 filopodios, pero también en una magnitud intermedia de 6 y 14 filopodios e incluso de forma contrastante con un efecto nulo es decir con cero filopodios, lo cual resulta equiparable en los lamelipodios.

Los resultados obtenidos están relacionados con las funciones descritas para el motivo de unión a PDZ de aGPCRs, entre ellas es servir como sitio de anclaje con el citoesqueleto de actina, para ello se asocia con diferentes proteínas con motivos PDZ que le permiten tener un efecto directo sobre la nucleación de actina o de manera indirecta activando redes de señalización. Entre las proteínas candidato que podrían modular tales efectos están las de la familia MAGI y PSD-95. Aunque

Shank tiene reporte de interacción con Latrofilina, su expresión en células HEK293 es prácticamente nula (The Human Protein Atlas, consulta 2020, anexo 3). Entre las vías de señalización reportadas para MAGI está la activación de Ras/MEK/ERK, la cual le permite inducir la formación de neuritas. Además, la interacción con proteína NET1 le permite activar a RhoA, estimulando procesos contráctiles basados en el remodelamiento del citoesqueleto de actina (Ito, et al., 2013; Dobrosotskaya, 2001). Por otra parte, el dominio de anquirina de PSD-95 funciona como sitio de unión con la proteína EB3, importante nucleador de componentes del citoesqueleto, principalmente de tubulina, sin embargo, también puede activar al complejo Arp2/3, proteínas encargadas de la ramificación de actina (Fregozo & Pérez Vega, 2012).

Conjuntamente, algunas estructuras de actina como invadopodios o fibras retráctiles que resultan de la activación de aGPCRs, se deben en gran medida a secuencias PDZ, las cuales activan vías de señalización dirigidas a la fosforilación de cofilina, teniendo como consecuencia el remodelado de actina e incluso cambios sobre propiedades viscoelásticas (Semprucci, et al., 2015; Hilbig, et al., 2018).

Curiosamente Lphn2vA278P Δ PBM no tiene diferencias sobre lamelipodios y blebs en comparación con Lphn2vA278P, pero si sobre el número de filopodios por célula, pareciendo que el efecto del Δ PBM está siendo contrarrestado por la variante A278P, lo que sugiere un papel diferencial del motivo de unión a PDZ, información que es reforzada con los resultados de la Figura 16 (b,d y f), donde la distribución de frecuencias demuestra patrones muy similares para ambas construcciones, aunque con una diferencia interesante para las células con Lphn2vA278P Δ PBM, las cuales alcanzan los valores máximos de filopodios y lamelipodios, pero sin concentrar una gran población celular, rangos que Lphn2vA278P no logra alcanzar. Además, se ha demostrado que la actividad que ejercen los motivos de unión a PDZ son independientes de las proteínas G, siendo que Lphn2 tiene acople a proteínas G α , sugiere la posibilidad de que la variante active estas proteínas logrando la señalización localizada hacia el citoesqueleto de actina, reteniendo de esta forma el remodelado de las células aun en ausencia del PBM (Röthe, et al., 2019; Hilbig, et al., 2018).

La variante A278P fue identificada en muestras de cáncer de ovario, sin embargo, no se ha descrito el papel que ejerce en el desarrollo de esta enfermedad, pero en nuestro grupo de trabajo se ha evidenciado que esta mutación cambia las propiedades adhesivas del receptor, disminuyendo la capacidad de agregación con su ligando FLRT3, además, la retención del fenotipo celular en ausencia del PMB y la posibilidad de la activación de proteínas G α , podrían facilitar el desprendimiento de las células tumorales e iniciar vías de señalización que faciliten la migración celular y procesos invasivos (Kan, et al., 2010; Ojeda Muñiz, 2019).

Finalmente, se analizaron parámetros celulares como: perímetro y área. De forma concordante con los resultados anteriores, las células que expresan Lphn2v Δ PBM tienen un aumento en el área y perímetro celular, incluso en el área del citosol se observa un aumento de prácticamente el triple de μm^2 , resultados que reflejan los cambios en las estructuras de actina, a mayor número de filopodios/lamelipodios, mas perímetro y área celular, efectos que no influyen en el núcleo celular. En la misma línea, Lphn2vA278P Δ PBM no tiene diferencias sobre las estructuras de actina en relación a Lphn2vA278P, por lo cual resulta lógico que los parámetros celulares permanezcan sin cambios.

Resultados previos han evidenciado que la eliminación del PBM de las isoformas 1 y 3 no ejercen un efecto sobre el citoesqueleto de actina, por el contrario, la integración de los resultados de este trabajo nos indica que el motivo de unión a PDZ de Lphn2v parece tener un papel directo sobre la actina y su remodelado, lo cual podría señalar que los efectos ejercidos por el PBM son exclusivos de cada isoforma, a pesar de ser una secuencia conservada entre estos receptores (Rendón Nava, 2018; Meza-Aguilar & Boucard, 2014). Reforzando lo anterior, Lphn2v tiene la ventaja de expresarse sobre otros tejidos no neurales, por lo cual las vías de señalización podrían ser diferentes y exclusivas de cada tejido, abriendo la posibilidad de acceder a una amplia gama de proteínas con dominios PDZ con diferente funcionalidad y promiscuidad de unión como lo demuestran los escaneos de interacción proteómica en las bases de datos de IntAct (<http://www.ebi.ac.uk/intact/>), BioGRID (<http://thebiogrid.org/>), y MINT (<http://mint.bio.uniroma2.it>) (Knapp & Wolfrum, 2016)

XI. CONCLUSIONES

- La delección de motivo de unión a PDZ no cambia los patrones de expresión de proteínas totales de Lphn2v, no siendo así para la variante A278P donde induce una disminución en la proporción NTF/RNC.
- Δ PBM afecta la morfología celular dada por Lphn2v, mostrando un aumento en el número de lamelipodios y filopodios, mientras que el efecto en Lphn2vA278P solo ocurre de forma limitada en el número de filopodios por célula.
- Los cambios en las estructuras de actina observados en Lphn2v Δ PBM no ocurren en la misma magnitud para Lphn2vA278P Δ PBM, donde la variante parece enmascarar los efectos del motivo de unión a PDZ.
- El Δ PBM tiene un efecto diferencial sobre los parámetros celulares, promoviendo el aumento en el tamaño del perímetro, área celular y del citosol en Lphn2v, mientras que para Lphn2vA278P los parámetros celulares permanecen sin cambios.

XII. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto del PBM y la variante A278P de Latrofilina 2 en expresión de superficie celular por ensayos DESC.
- Realizar ensayos de agregación para caracterizar el papel del motivo de unión a PDZ sobre la adhesión celular de Lphn2v y sus ligandos.
- Analizar de forma poblacional las células tranfectadas con Δ PBM y la variante A278P, por ensayos de citometría de flujo.
- Determinar las moléculas intermediarias entre el PBM y el citoesqueleto de actina, así como las vías de señalización involucradas en el remodelado de la morfología celular.
- Caracterizar efectos del PBM y la variante A278P sobre la migración celular en líneas de cáncer de ovario.

XIII. ANEXOS

Anexo 1. Secuenciación de Lphn2vA278PΔPBM

Los resultados obtenidos de la secuenciación de Lphn2vA278PΔPBM fueron alineados con Lphn2v, con la finalidad de observar la presencia de la mutación A278P en el amino terminal (Figura 19). De igual forma, se alinearon ambas secuencias en la zona del carboxilo terminal donde se puede observar en Lphn2v WT la secuencia LVTSL correspondiente al motivo de unión a PDZ, mientras que está ausente en Lphn2vA278PΔPBM (Figura 20).

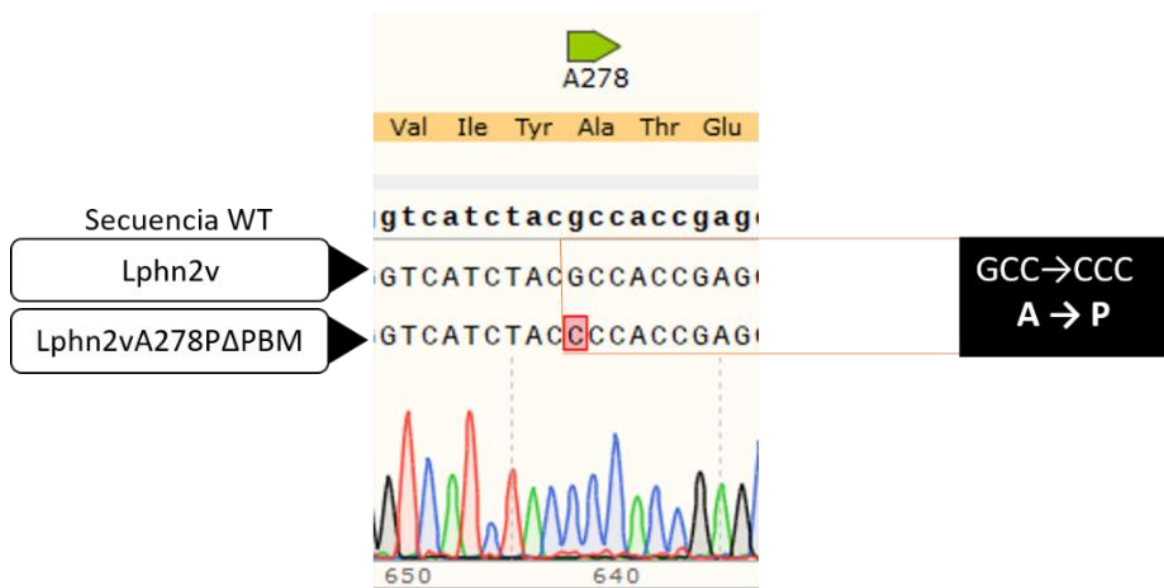


Figura 19. Secuenciación de Lphn2vA278PΔPBM en el NTF. Los resultados de la secuenciación muestran el cambio de alanina (GCC) por prolina (CCC) en la posición 278.

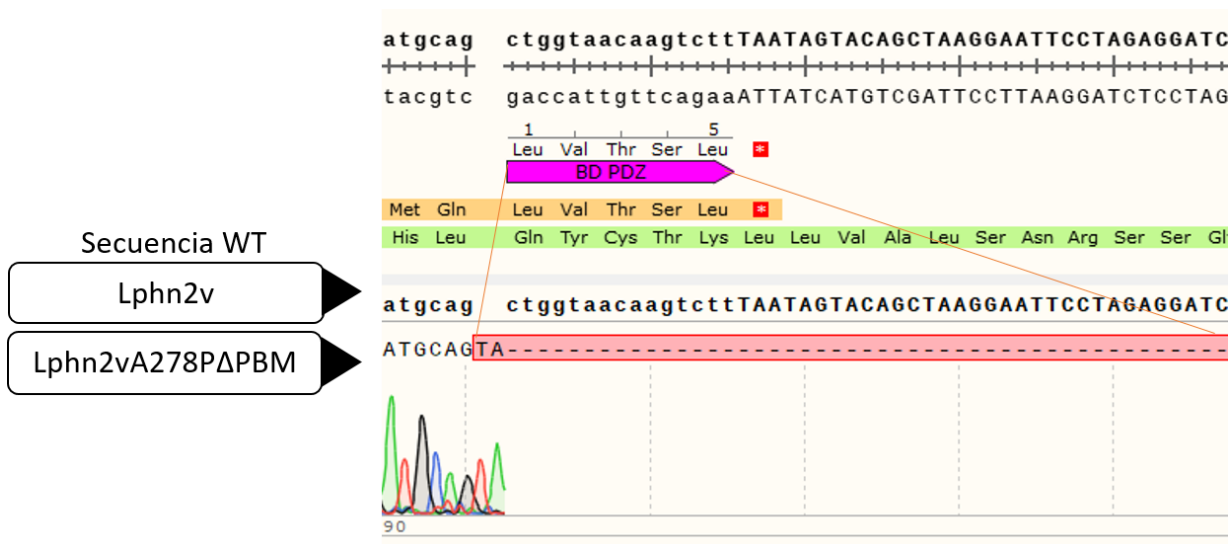


Figura 20. Secuenciación de Lphn2vA278PΔPBM en el CTF. La secuencia WT de Lphn2v muestra la secuencia correspondiente al motivo de unión a PDZ (LVTSL), al ser alineado la construcción no cuenta con esta secuencia, eliminando de esta forma el motivo

Anexo 3. Niveles de expresión de Shank, MAGI y PSD-95 en células HEK293.

Se realizó una consulta de la expresión de RNA de Shank, MAGI y PSD-95 en células HEK293T, esto con la ayuda de The Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org) (Figura 23).

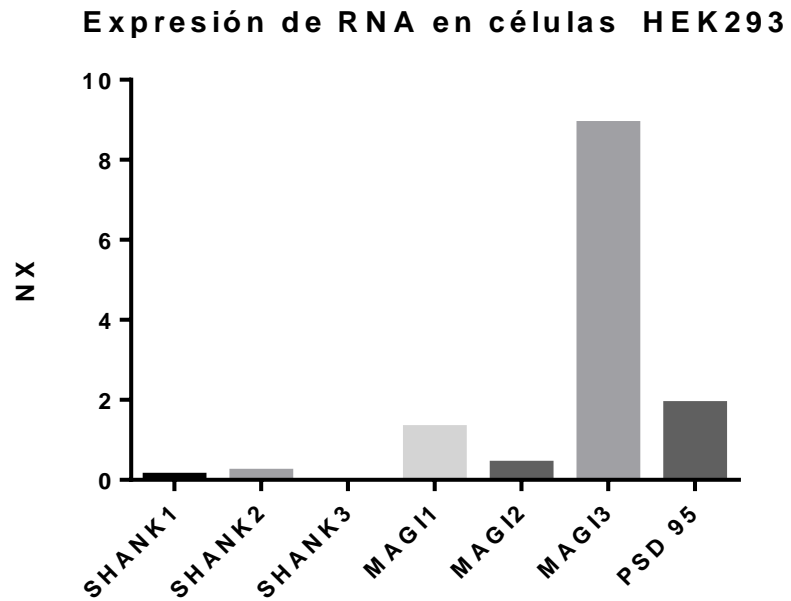


Figura 23. Expresión de RNA de las isoformas de Shank, MAGI y PSD-95. A través de la consulta en la dirección web de de The Human Protein Atlas, se extrajeron los datos del patrón de expresión reportados para cada isoforma. NX (valor arbitrario).

XIV. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, G. R., Maxeiner, S., Sando, R., Tsetsenis, T., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (2017). Postsynaptic adhesion GPCR latrophilin-2 mediates target recognition in entorhinal-hippocampal synapse assembly. *The Journal of Cell Biology*, 216(11), 3831-3846.
- Arac, D., Boucard, A., Bolliger, M., Nguyen, J., Soltis, S., Südhof, T., & Brunger, A. (2012). A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoprolysis. *EMBO J*, 31, 1364-78.
- Arac, D., Strater, N., & Seiradake, E. (2016). Understanding the Structural Basis of Adhesion GPCR Functions. *Handbook of experimental pharmacology*, 67-82.
- Boucard, A., Ko, J., & Südhof, T. (2012). High Affinity Neurexin Binding to Cell Adhesion G-protein-coupled Receptor C1RL1/Latrophilin-1 Produces an Intercellular Adhesion Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 9399–9413.
- Boucard, A., Maxeiner, S., & Südhof, T. (2014). Latrophilins Function as Heterophilic Cell-adhesion Molecules by Binding to Teneurins. *Journal Biological Chemistry*, 289(1), 387–402.
- Chatterjee, M., Schild, D., & Teunissen, C. (2019). Contactins in the central nervous system: role in health and disease. *Neural Regeneration Research*, 14(2), 206–216.
- Chiang, N., Peng, Y., Juang, H., Chen, T., & Pan, H. (2017). GPR56/ADGRG1 Activation Promotes Melanoma Cell Migration via NTF Dissociation and CTF-Mediated Gα12/13/RhoA Signaling. *The Journal of Investigative Dermatology*, 137(3), 727-736.
- Cooper, M., & Hausman, R. E. (2017). *La Célula*. España: Marbán.
- Cruz-Ortega, J., & Boucard, A. (2019). Actin cytoskeleton remodeling defines a distinct cellular function for adhesion G protein-coupled receptors ADGRL/latrophilins 1, 2 and 3. *Biology Open*, 8(4), 1-11.
- de Graaf, C., Nijmeijer, S., Wolf, S., & Ernst, O. P. (2016). 7TM Domain Structure of Adhesion GPCRs. *Handbook of Experimental Pharmacology Experimental Pharmacology*, 43-66.
- del Toro, D., Carrasquero-Ordaz, M., Chu, A., Ruff, T., Shahin, M., Jackson, V., . . . Seiradake, E. (2020). Structural Basis of Teneurin-Latrophilin Interaction in Repulsive Guidance of Migrating Neurons. *Cell*, 180(2), 323-339.

- Dobrosotskaya, I. (2001). Identification of mNET1 as a Candidate Ligand for the First PDZ Domain of MAGI-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 283(4), 969-975.
- Doyle, S., Scholz, M., Greer, K., Hubbard, A., Darnell, D., Antin, P., . . . Runyan, R. (2006). Latrophilin-2 is a novel component of the epithelial-mesenchymal transition within the atrioventricular canal of the embryonic chicken heart. *Developmental Dynamics*, 235(12), 3213–3221.
- Dunn, H., & Ferguson, S. (2015). PDZ Protein Regulation of G Protein–Coupled Receptor Trafficking and Signaling Pathways. *Molecular pharmacology*, 88(4), 624-639.
- Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G., & Schiöth, H. B. (2003). The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Molecular Pharmacology*, 1256-1272.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M., Lundin, L., & Schioth, H. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular Pharmacology*, 1256-1272.
- Fregozo, C., & Pérez Vega, M. (2012). Actin-binding proteins and signalling pathways associated with the formation and maintenance of dendritic spines. *Neurología*, 27(7), 421-431.
- Gonzalo, V., Castellví-Bel, S., Balaguer, F., Pellisé, M., Ocaña, T., & Castells, A. (2008). Epigenética del cáncer. *Gastroenterología y Hepatología*, 31(1), 37-45.
- Graumann, R., Di Capua, G., Oyarzún, J., Vásquez, M., Liao, C., Brañes, J., . . . Ziegler, A. (2017). Expression of teneurins is associated with tumor differentiation and patient survival in ovarian cancer. *Plos One*, 12(5).
- Hammad, M., Dunn, H., & Ferguson, S. (2018). MAGI proteins can differentially regulate the signaling pathways of 5-HT2AR by enhancing receptor trafficking and PLC recruitment. *Cellular Signalling*, 47, 109-121.
- Hilbig, D., Sittig, D., Hoffmann, F., Rothemund, S., Warnt, E., Quaas, M., . . . Aust, G. (2018). Mechano-Dependent Phosphorylation of the PDZ-Binding Motif of CD97/ADGRE5 Modulates Cellular Detachment. *Cell Reports*, 24(8), 1986-1995.
- Hsiao, C.-C., Chu, T.-Y., Wu, C.-J., van den Biggelaar, M., Pabst, C., Hébert, J., . . . Lin, H.-H. (2018). The Adhesion G Protein-Coupled Receptor GPR97/ADGRG3 Is Expressed in Human Granulocytes and Triggers Antimicrobial Effector Functions. *Frontiers in immunology*, 9:2830.

- Huang, Y.-S., Chiang, N.-Y., Chang, G.-W., & Lin, H.-H. (2018). Membrane-association of EMR2/ADGRE2-NTF is regulated by sitespecific N-glycosylation. *Scientific reports*, 8, 4532.
- Ito, H., Morishita, R., Iwamoto, I., Mizuno, M., & Nagata, K.-i. (2013). MAGI-1 acts as a scaffolding molecule for NGF receptor-mediated signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(10), 2302-2310.
- Jeon, M.-S., Song, S.-H., Yun, J., Kang, J.-Y., Kim, H.-P., Han, S.-W., & Kim, T.-Y. (2016). Aberrant Epigenetic Modifications of LPHN2 Function as a Potential Cisplatin-Specific Biomarker for Human Gastrointestinal Cancer. *Cancer research and treatment*, 48(2), 676-686.
- Kan, Z., Jaiswal, B., Stinson, J., Janakiraman, V., Bhatt, D., Stern, H., . . . Seshagiri, S. (2010). Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature*, 466, pages869–873.
- Knapp, B., & Wolfrum, U. (2016). Adhesion GPCR-Related Protein Networks. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 234, 147-178.
- Knapp, B., Roedig, J., Boldt, K., Krzysko, J., Horn, N., Ueffing, M., & Wolfrum, U. (2019). Affinity proteomics identifies novel functional modules related to adhesion GPCRs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1-11.
- Kreienkamp, H.-J., Soltau, M., Richter, D., & Bockerst, T. (2002). Interaction of G-protein-coupled receptors with synaptic scaffolding proteins. *Biochemical Society Transactions*, 30(4).
- Lee, H.-J., & Zheng, J. (2010). PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Communication and Signaling*, 8(8).
- Lee, C., Cho, H. J., Lee, J., Lee, J., Kwon, Y., Son, T., . . . Kim, H. (2019). Identification of Latrophilin-2 as a Novel Cell-Surface Marker for the Cardiomyogenic Lineage and Its Functional Significance in Heart Development. *Circulation*, 139(25), 2910-2912.
- MacGillavry, H., Kerr, J., Kassner, J., Frost, N., & Blanpied, T. (2016). Shank–cortactin interactions control actin dynamics to maintain flexibility of neuronal spines and synapses. *The European Journal of Neuroscience*, 179–193.
- Manjunath, G., Ramanujam, P., & Galande, S. (2018). Structure function relations in PDZ-domain-containing proteins: Implications for protein networks in cellular signalling. *Journal of biosciences*, 43(1), 155-171.
- Matsushita, H., Lelianova, V., & Ushkaryov, Y. (1999). The latrophilin family: multiply spliced G protein-coupled receptors with differential tissue distribution. *FEBS*, 443(3), 348-352.
- Matt, L., Kim, K., Hergarden, A., Patriarchi, T., Malik, Z., Park, D., . . . Hell, J. (2018). α -Actinin Anchors PSD-95 at Postsynaptic Sites. *Neuron*, 97(5), 1094-1109.

- Meza-Aguilar , D., & Boucard, A. (2014). Latrophilins updated. *Biomolecular concepts*, 5(6), 457-78.
- Moreno-Salinas, A., Avila-Zozaya, M., Ugalde-Silva, P., Hernández-Guzmán, D., Missirlis, F., & Boucard, A. (2019). Latrophilins: A Neuro-Centric View of an Evolutionary Conserved Adhesion G Protein-Coupled Receptor Subfamily. *Frontiers in Neuroscience*, 13(700).
- Nozumi, M., Togano, T., Takahashi-Niki, K., Lu, J., Honda, A., Taoka, M., . . . Igarashi, M. (2009). Identification of functional marker proteins in the mammalian growth cone. *PNAS*, 40(106), 17211-17216.
- Ojeda Muñiz, E. (2019). Evaluación de la variante de cáncer A278P del receptor Lphn2 en la remodelación del citoesqueleto de actina. CINVESTAV.
- O'Sullivan , M., de Wit , J., Savas , J., Comoletti , D., Otto-Hitt , S., Yates , J., & Ghosh , A. (2012). FLRT proteins are endogenous latrophilin ligands and regulate excitatory synapse development. *Neuron*, 73(5), 903-910.
- O'Sullivan, M., de Wit, J., Savas, J., Comoletti, D., Otto-Hitt, S., Yates III, J., & Ghosh, A. (2012). Postsynaptic FLRT proteins are endogenous ligands for the black widow spider venom receptor Latrophilin and regulate excitatory synapse development. *Neuron*, 73(5), 903–910.
- Peeters , M., Fokkelman , M., Boogaard , B., & Egerod , K. (2015). The adhesion G protein-coupled receptor G2 (ADGRG2/GPR64) constitutively activates SRE and NFκB and is involved in cell adhesion and migration. *Cellular signalling*, 27(12), 2579-2588.
- Peeters, M., Fokkelman, M., Boogaard, B., Egerod, K., Bob , v., IJzermanb, A., & Schwartz, T. (2015). The adhesion G protein-coupled receptor G2 (ADGRG2/GPR64) constitutively activates SRE and NFκB and is involved in cell adhesion and migration. *Cellular Signalling*, 27(12), 2579-2588.
- Preu, J., Tiefenauer, L., & Gutberlet, T. (2017). Adhesion ability of angiotensin II with model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 195-200.
- Protein, A. T. (s.f.). *Atlas The Human Protein*. Recuperado el 09 de Junio de 2020, de <http://www.proteinatlas.org>
- Regan, S., Hufgard, J., Pitzer, E., Sugimoto, C., Hu, Y.-C., Williams, M., & Vorhees, C. (2019). Knockout of latrophilin-3 in Sprague-Dawley rats causes hyperactivity, hyper-reactivity, under-response to amphetamine, and disrupted dopamine markers. *Neurobiology of Disease*, 130.
- Reissner, C., Runk, F., & Missler, M. (2013). Neurexins. *Genome Biology*, 14(9), 213.

- Rendón Nava, L. (2018). Papel del dominio de unión a PDZ de Latrofilina 1 y 3 sobre la remodelación del citoesqueleto de actina en células HEK293T. *CINVESTAV*.
- Rosenbaum, D., Rasmussen, S., & Kobika, B. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 356-363.
- Rosenthal, L., Zacchetti, D., Madeddu, L., & Meldolesi, J. (1990). Mode of action of alpha-latrotoxin: role of divalent cations in Ca²⁺(+)-dependent and Ca²⁺(+)-independent effects mediated by the toxin. *Molecular Pharmacology*, 38(6), 917-23.
- Röthe, J., Thor, D., Winkler, J., Rothemund, S., Schöneberg, T., & Prömel, S. (2019). Involvement of the Adhesion GPCRs Latrophilins in the Regulation of Insulin Release. *Cell Reports*, 26, 1573-1584.
- Rudenko, G. (2017). Dynamic Control of Synaptic Adhesion and Organizing Molecules in Synaptic Plasticity. *Neural Plasticity*, 2017.
- Sando, R., Jiang, X., & Südhof, T. (2019). Latrophilin GPCRs direct synapse specificity by coincident binding of FLRTs and teneurins. *Science*, 139-148.
- Scholz, N. (2018). Cancer Cell Mechanics: Adhesion G Protein-coupled Receptors in Action? *Frontiers in oncology*, 8-59.
- Scholz, N., Gehring, J., Guan, C., Ljaschenko, D., Fischer, R., Lakshmanan, V., . . . Langenhan, T. (2015). The Adhesion GPCR latrophilin/CIRL Shapes Mechanosensation. *Cell Reports*, 11(6), 866-874.
- Semprucci, E., Tocci, P., Cianfrocca, R., Sestito, R., Caprara, R., Vegliione, M., . . . Rosano, L. (2015). Endothelin A receptor drives invadopodia function and cell motility through the B-arrestin/PDZ-RhoGEF pathway in ovarian carcinoma. *Oncogene*, 1-11.
- Silva, J.-P., Lelianova, V., Ermolyuk, Y., Vysokov, N., Hitchen, P., Berninghausen, O., . . . Ushkaryov, Y. (2011). Latrophilin 1 and its endogenous ligand Lasso/teneurin-2 form a high-affinity transsynaptic receptor pair with signaling capabilities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 12113-12118.
- Tobaben, S., Südhof, T., & Stahl, B. (2000). The G Protein-coupled Receptor CL1 Interacts Directly with Proteins of the Shank Family. *Journal of biological chemistry*, 275(46), 36204-36210.
- Treutlein, B., Gokce, O., Quake, S., & Südhof, T. (2014). Cartography of neuroligin alternative splicing mapped by single-molecule long-read mRNA sequencing. *PNAS*, 111(13), E1291-E1299.
- Venkatesh, H., Johung, T., Caretti, V., Noll, A., Tang, Y., Nagaraja, S., . . . Monje, M. (2015). Neuronal Activity Promotes Glioma Growth through Neuroligin-3 Secretion. *Cell*, 161(4), 803–816.

- Vezain, M., Lecuyer, M., Rubio, M., Dupé, V., Ratié, L., David, V., . . . Saugier-veber, P. (2018). A de novo variant in ADGRL2 suggests a novel mechanism underlying the previously undescribed association of extreme microcephaly with severely reduced sulcation and rhombencephalosynapsis. *Acta Neuropathologica communications*, 6(109).
- Yona, S., Lin, H.-H., Siu, W. O., Gordon, S., & Stacey, M. (2008). Adhesion-GPCRs: emerging roles for novel receptors. *Trends in Biochemical Sciences*, 491-500.
- Yu, G., Chen, F., Nishimura, M., Steiner, H., Tandon, A., Kawarai, T., . . . St George-Hyslop, P. (2000). Mutation of conserved aspartates affect maturation of presenilin 1 and presenilin 2 complexes. *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum*, 176, 6-11.
- Zuko, A., Oguro-Ando, A., Post, H., Taggenbrock, R., van Dijk, R., Altelaar, A., . . . Burbach, J. (2016). Association of Cell Adhesion Molecules Contactin-6 and Latrophilin-1 Regulates Neuronal Apoptosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9, 143.