



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**

**“Papel del dominio de unión a PDZ de Latrofilina 1  
y 3 sobre la remodelación del citoesqueleto de actina  
en células HEK293T”**

**T E S I S**

Que presenta:

**Q.B.P Laura Itzel Rendón Nava**

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR**

Director de la Tesis: **Dr. Antony Boucard Jr.**

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

Agradecimiento especial al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado a través de la beca 456251 para la realización de la Maestría en Ciencias en la especialidad en Biología Celular.

## **Agradecimientos**

“Gracias a Dios por permitirme culminar está estaba en mi vida”

Le agradezco a los doctores José Manuel Hernández Hernández y Francisco García Sierra por sus aportaciones a este proyecto y por ayudar a mi formación académica durante sus clases.

Gracias a mi director de tesis, el Dr. Antony Boucard por haberme aceptado en su laboratorio y permitir que colaborará en este proyecto. Y sobre todo gracias por todo el apoyo personal durante mi estancia en el laboratorio.

A todos mis compañeros de generación por compartir esos buenos momentos y por el apoyo que cada uno me brindó cuando lo necesite. Especialmente gracias a Aleja Corzo, Kerlys, Sheila (my Dream team) las quiero niñas. También a Karem por compartir mis semanas de sufrimiento en mate jaja. A Coral, Landy, Nicté, Mario, Carlos, Mijares (Jorge) y David.

Le agradezco a Judy por su tiempo y su paciencia durante mi estancia en el laboratorio. A José Carlos, Ana y Diana por sus consejos y su apoyo. A Monse por su gran compañerismo, por compartir su conocimiento y preocuparse no solo por mí, sino por todos (eres una gran personita). A mí desarmadora de conflictos Sheila, por hacerme bullying todos los días jajaja, por escucharme, por llenar mis días de risas y apoyarme. A Kerlys por ser una gran compañera en clases y en el laboratorio, una persona tremendamente inteligente que me sorprende y que comparte lo que sabe con los demás. Y a Ricardo por su gran labor al aguantarnos y realizar un buen trabajo.

A Clarita por siempre realizar su trabajo con una sonrisa y amabilidad increíble. También al M en C Iván por su asesoría en el confocal.

GRACIAS a todos mis amigos por su apoyo en cada momento y por sus palabras de aliento: Oscar, Roger, Ferman, Angie, Xochi.

A Rubí, Ale y Alexa mis niñas, gracias por aguantarme, por ser buenas roomies, por preguntarme todos los días como me iba y por hacer mi estancia en esta ciudad mucho mejor desde el inicio.

Quiero agradecer especialmente a las tres personita que con los años se han convertido en más que mis amigos, que han estado ahí para mí siempre, en los buenos y malos momentos. Gracias por hacer esto posible de alguna manera <3 Naye, Rodri, Ale.

A toda mi familia que amo mucho, pero especialmente a mi mamá Ofe, a mis hermanos Alex y Miriam que son mi motor para seguir adelante. A mí padrino Mario y mis ti@s Rosi, Gisela, Jaime y Julián. Y a mi abuelita Susana por ser un ejemplo de fortaleza siempre. A mis primos Fani, Osvaldo y Marco.

Y finalmente al hombre que le debo el estar aquí, a mi padre, Luis.

# ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>ii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>vii</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>viii</b>
<b>I. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>1</b>
1. GPCRs de adhesión .....	1
2. Receptores latrofilina .....	2
2.1 Funciones biológicas asociadas.....	3
2.2 Enfermedades relacionadas a las Lphns.....	4
2.3 Estructura y ligandos de las Lphns.....	4
3. Dominios PDZ y sus secuencias de reconocimiento .....	6
3.1 Importancia de las proteínas con dominios PDZ y sus interacciones .....	8
3.2 Proteínas Shank y el citoesqueleto de actina .....	9
4. Sobreexpresión de latrofilina y su relación con el citoesqueleto .....	12
<b>II. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>III. HIPÓTESIS .....</b>	<b>13</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
5. Objetivo general.....	14
5.1 Objetivos específicos .....	14
<b>V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
<b>VII. RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
<b>VIII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>47</b>
<b>IX. CONCLUSIONES .....</b>	<b>54</b>
<b>X. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>55</b>
<b>XI. ANEXOS.....</b>	<b>56</b>
<b>XII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>59</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

GPCRs	Receptores Acoplados a Proteínas G
7TM	Siete dominios transmembranales
aGPCR	Receptores acoplados a Proteínas G de adhesión
GPS	Sitio de proteólisis de los GPCRs
ECD	Fracción extracelular
GAIN	Dominio de inducción para autoproteólisis de los GPCRs
ICD	Fracción intracelular
LTX	Latrotoxina
Lphn	Latrofilina
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
SPNs	Polimorfismos de un solo nucleótido
TDAH	Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad
bmPDZ	Motivo de unión a dominio PDZ
FLRT	Proteína transmembranal rica en leucina que contienen un dominio tipo fibronectina
AMP <sub>c</sub>	Adenosín monofosfato cíclico
dCIRL	Latrofilina de <i>Drosophila</i>
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
PSD	Terminal postsináptica
GKAP	Proteína asociada a las guanilato cinasas
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
NMDA	N-metil-D-aspartato
ATCC	American Type Culture Collection
LB	Luria Bertani
BSA	Albúmina de suero bovino
PFA	Paraformaldehído
PEG	Poetilenglicol
PEI	Polietilenimina

TBS	Buffer salino con Tris
PBS	Buffer de fosfato salino
GFP	Proteína verde fluorescente
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNp	ADN plasmídico
FA	Fosfatasa alcalina
Pb	Pares de bases
UFC	Unidades formadoras de colonias
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
SFB	Suero fetal bovino
HRP	Peroxidasa de rábano picante
Thr	Treonina
Ser	Serina
Val	Valina
Ala	Alanina
SR	No digerido con edonucleasas
R	Digerido con endonucleasas
CTF	Fragmento C-terminal
NTF	Fragmento N-terminal
kDa	Kilodaltones
RNC	Receptor no cortado
μL	Microlitro
μg	Microgramo
mg	Miligramo
mL	Mililitro
RPM	Revoluciones por minuto

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación de los GPCRs. ....	1
<b>Figura 2.</b> Arquitectura molecular de los aGPCRs.....	2
<b>Figura 3.</b> Estructura de las latrofilinas .....	5
<b>Figura 4.</b> Estructura de los dominios PDZ.....	6
<b>Figura 5.</b> Comparación de la secuencia en el extremo C-terminal de las Lphns .....	8
<b>Figura 6.</b> Organización proteica en la terminal post-sináptica .....	9
<b>Figura 7.</b> Interacción Shank-citoesqueleto de actina.....	10
<b>Figura 8.</b> Estructuras celulares formadas por actina .....	11
<b>Figura 9.</b> Alteraciones morfológicas causadas por la sobreexpresión de las Lphns .....	12
<b>Figura 10.</b> Programa de PCR usado por 34 ciclos .....	19
<b>Figura 11.</b> Amplicones de las mutantes de Lphn 1 y 3v .....	30
<b>Figura 12.</b> Esquema representativo del proceso de digestión y ligación de fragmentos de ADN .....	31
<b>Figura 13.</b> Crecimiento de bacterias transformadas .....	31
<b>Figura 14.</b> Digestión de plásmidos generados a partir de Lphn-1v .....	32
<b>Figura 15.</b> Digestión de plásmidos obtenidos a partir de Lphn-3v .....	33
<b>Figura 16.</b> Esquema representativo de corte autoproteolítico de las Lphns. ....	34
<b>Figura 17.</b> Expresión de las mutantes $\Delta$ PDZ y $\Delta$ F de Lphn-1v y Lphn-3v ...	35
<b>Figura 18.</b> Expresión de Lphn-3v y sus variantes .....	36
<b>Figura 19.</b> Morfología de células HEK293T sin transfectar .....	37



<b>Figura 20.</b> Transfección de células HEK293T con las mutantes de Lphn-1v .....	38
<b>Figura 21.</b> Cambios morfológicos generados por la expresión de Lphn-1v y sus mutantes del bmPDZ.....	39
<b>Figura 22.</b> Cuantificación de distintos parámetros de la morfología celular y subcelular como resultado de la transfección de células HEK293T.....	41
<b>Figura 23.</b> La delección o mutación del bmPDZ de Lphn-1 no influye en la formación de estructuras de actina .....	42
<b>Figura 24.</b> Transfección de células HEK293T con las mutantes de Lphn-3v .....	43
<b>Figura 25.</b> Cambios morfológicos generados por la expresión de Lphn-3v y sus mutantes. ....	45
<b>Figura 26.</b> La expresión de las mutantes de Lphn-3v no impide la formación de filopodios.....	46

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Soluciones experimentales y materiales .....	16
<b>Tabla 2.</b> Enzimas .....	17
<b>Tabla 3.</b> Anticuerpos .....	18
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos diseñados .....	18
<b>Tabla 5.</b> Oligonucleótidos diseñados Componentes de las PCRs .....	19
<b>Tabla 6.</b> Reacción para digerir Lphn-1v $\Delta$ PDZ y $\Delta$ F .....	20
<b>Tabla 7.</b> Reacción para digerir Lphn-3v $\Delta$ PDZ .....	21
<b>Tabla 8.</b> Reacción para digerir Lphn-3v $\Delta$ F .....	21
<b>Tabla 9.</b> Tratamiento con fosfatasa alcalina .....	21
<b>Tabla 10.</b> Digestión de ADNp de Lphn-1v $\Delta$ PDZ, $\Delta$ F y Lphn-3v $\Delta$ PDZ, $\Delta$ F .	21
<b>Tabla 11.</b> Reacciones de ligación .....	22
<b>Tabla 12.</b> Control de ligación .....	22
<b>Tabla 13.</b> Formación de complejos para transfección .....	26
<b>Tabla 14.</b> Características de los láseres para microscopía confocal .....	29

## RESUMEN

Las Lphns representan un grupo de aGPCRs que se expresan principalmente en cerebro. Las tres isoformas de Lphn presentan una alta homología estructural, compartiendo los mismos dominios extracelulares e intracelulares. Hasta el momento, la evidencia ha relacionado la función de las Lphns con procesos como la formación de sinapsis y la adhesión intercelular. Aunado a esto, nuestro grupo de trabajo reportó que la sobreexpresión de las tres isoformas de Lphn alteró la morfología de células HEK293T. Sin embargo, los mecanismos moleculares que involucran estas alteraciones permanecen sin ser explorados. A nivel celular el principal organelo encargado de la morfología es el citoesqueleto de actina, el cual parece interaccionar de manera indirecta con una gran variedad de proteínas que cuentan con dominios PDZ. Basado en lo anterior, en este trabajo decidimos evaluar si el motivo de unión a PDZ (bmPDZ) de Lphn-1 y Lphn-3 era capaz de contribuir a los cambios morfológicos inducidos por los receptores. Para cumplir con nuestro objetivo utilizamos mutagénesis dirigida mediante PCR de un paso para generar los receptores mutantes de Lphn-1 y Lphn-3 fusionados a la proteína fluorescente mVenus y que carecen del bmPDZ (Lphn-1v  $\Delta$ PDZ y Lphn-3v  $\Delta$ PDZ) o de dos de los residuos propensos a fosforilación dentro de este dominio (Lphn-1v  $\Delta$ F y Lphn-3v  $\Delta$ F). Los receptores mutantes fueron expresados en células HEK293T y sus efectos sobre la morfología celular o el citoesqueleto de actina fueron observados mediante microscopía confocal. Nuestros resultados mostraron que las células que expresaron las construcciones  $\Delta$ PDZ y  $\Delta$ F de cada isoforma de Lphn originaron fenotipos morfológicos similares a los generados por sus contrapartes de tamaño completo, tales como la formación de lobulaciones membranales, la disminución de lamelipodios, filopodios, así como una reducción del tamaño celular y nuclear. Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que la integridad del bmPDZ de Lphn-1v y Lphn-3v no contribuye a los efectos funcionales sobre el citoesqueleto de actina en células HEK293T.

## SUMMARY

Lphns represent a group of aGPCRs that are expressed mainly in brain. The three isoforms of Lphn present a high structural homology, sharing the same extracellular and intracellular domains. So far, evidence has linked the function of Lphns with processes such as synapse formation and intercellular adhesion. In addition, our working group reported that the overexpression of the three isoforms of Lphn altered the morphology of HEK293T cells. However, the molecular mechanisms that involve these alterations remain unexploited. At the cellular level, the main organelle responsible for morphology is the actin cytoskeleton, which interacts indirectly with a variety of proteins that have PDZ domains. Based on the above, in this work we decided to evaluate if the PDZ binding motif (PDZbm) of Lphn-1 and Lphn-3 was able to contribute with morphological changes induced by these receptors. To fulfill our objective, we used one-step PCR mutagenesis to generate Lphn-1 and Lphn-3 mutant receptors fused to the fluorescent protein mVenus and lacking either the bmPDZ (Lphn-1v  $\Delta$ PDZ and Lphn-3v  $\Delta$ PDZ) or two phosphorylation-prone residues within this domain (Lphn-1v  $\Delta$ F and Lphn-3v  $\Delta$ F). The mutant receptors were expressed in HEK293T cells and their effect on cell morphology or actin cytoskeleton was monitored using confocal microscopy. Our results showed that cells expressing the  $\Delta$ PDZ or  $\Delta$ F constructs of each Lphn isoform led to similar morphological phenotypes as the ones elicited by their full-length counterparts such as the formation of membrane lobulations, the decrease in lamellipodia and filopodia formation, as well as a reduction in cell and nucleus size. Therefore, these findings suggest that the integrity of the bmPDZ of Lphn-1v and Lphn-3v does not account for Lphn functional effects on the actin cytoskeleton in HEK293T cells.

## I. MARCO TEÓRICO

### 1. GPCRs de adhesión

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs; por sus siglas en inglés) comprenden una gran superfamilia de receptores con siete dominios transmembranales (7TM) que responden a una gran variedad de estímulos extracelulares y cuya señalización ha sido involucrada en múltiples funciones biológicas, a su vez los GPCRs se clasifican en cinco familias principales: los receptores de glutamato, las rodopsinas, las secretinas, los receptores Frizzled/Taste2 y los de adhesión (Figura 1) (Rosenbaum et al., 2009, Fredriksson et al., 2003).

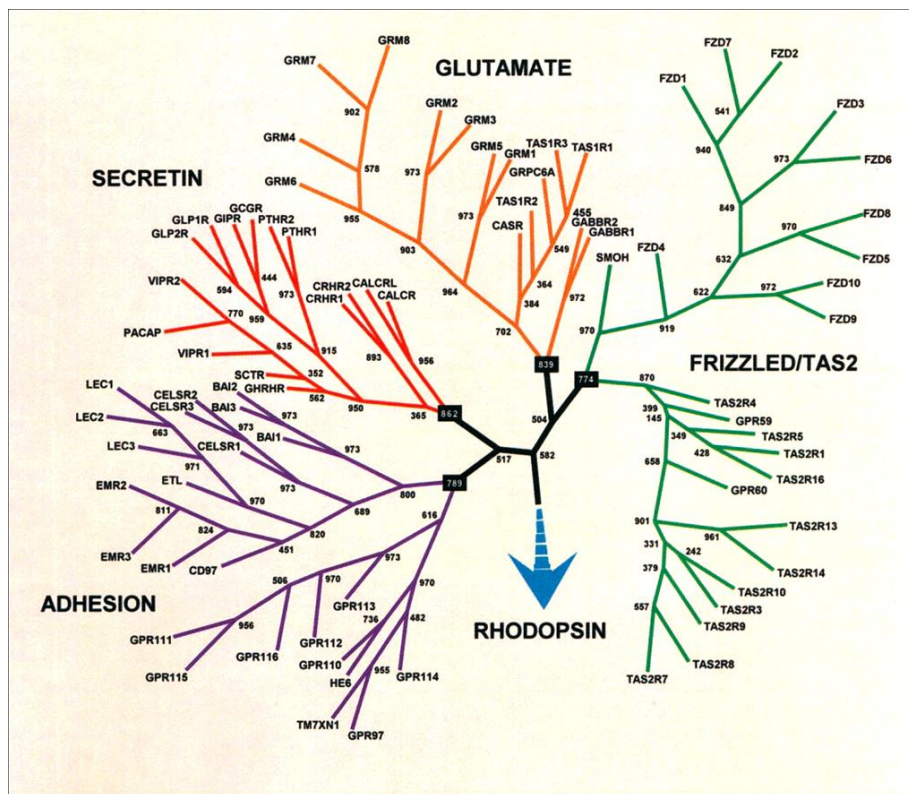
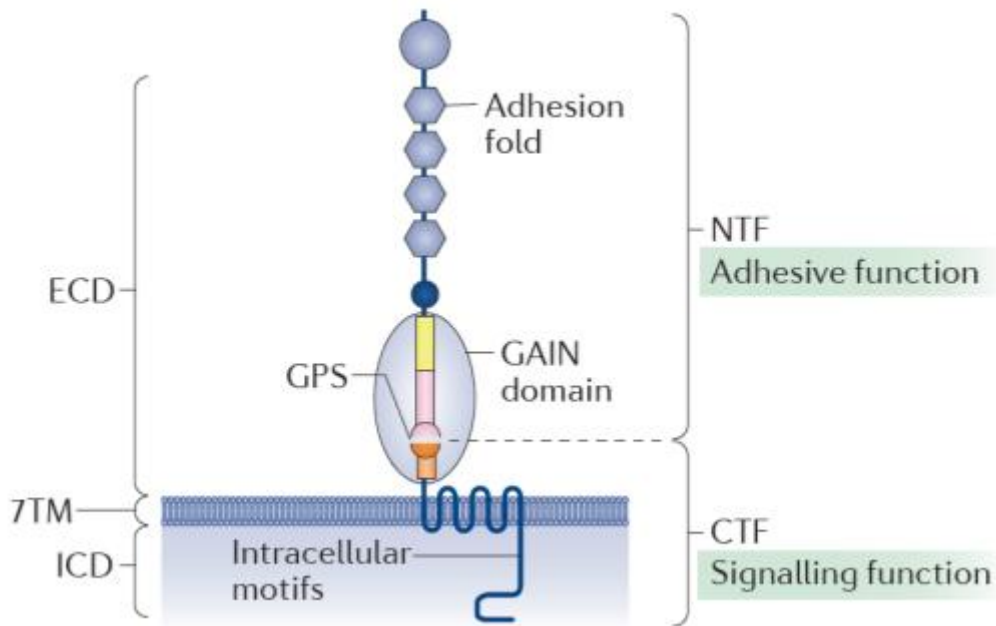


Figura 1. Clasificación de los GPCRs. Relación filogenética las cinco familias de GPCRs de acuerdo a sus 7TM (Modificado de Fredrikson et al., 2003).

Particularmente la familia de los GPCRs de adhesión (aGPCRs) posee características que los distinguen de los demás GPCRs como es su extremo N-terminal de gran longitud que le permite tener propiedades de adhesión ya

sea célula-célula o célula-matriz extracelular (Bjarnadottir et al., 2007, Yona et al., 2008, Paavola and Hall, 2012). Además, estos receptores cuentan con el sitio de proteólisis de los GPCRs (GPS), el cual se ubica de manera adyacente a la región transmembranal. Se ha descrito que varios aGPCRs sufren un corte autoproteolítico dentro del GPS, generándose dos subunidades estructurales unidas de forma no-covalente denominados NTF y CTF (Figura 2) (Bjarnadottir et al., 2007, Yona et al., 2008, Paavola and Hall, 2012).



**Figura 2. Arquitectura molecular de los aGPCRs.** En la fracción extracelular (ECD; por sus siglas en inglés) contienen dominios de adhesión y sitio GPS dentro del dominio de inducción para autoproteólisis de los GPCRs (GAIN). La fracción intracelular (ICD; por sus siglas en inglés) por su parte es la encargada de mediar procesos de señalización (Modificado de Langenhan et al., 2016).

En seres humanos se han descrito más de treinta aGPCRs, clasificándose en subfamilias, entre las cuales, la subfamilia de las latrofilinas (Lphns) ha sido una de las más estudiadas (Bjarnadottir et al., 2007, Paavola and Hall, 2012).

## 2. Receptores latrofilina

Las proteínas Lphn de mamíferos, son un grupo de aGPCRs formado por tres miembros; Lphn-1, Lphn-2 y Lphn-3, los cuales son codificados por

genes diferentes. La evidencia apoya que los genes de las Lphns han sido conservados evolutivamente, debido a que, además de expresarse en seres humanos, se han encontrado genes homólogos en organismos como *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) entre otros. Se ha demostrado que estos receptores presentan un patrón de expresión diferencial dependiendo del tipo de tejido. En este sentido, el RNAm de Lphn-1 y Lphn-3 se ha encontrado principalmente en cerebro y se ha descrito que su expresión aumenta durante el desarrollo y maduración postnatal de este órgano; sin embargo, se han reportado niveles bajos de RNAm de Lphn-2 en dicho tejido. No obstante, es posible detectarlo en corazón, pulmón, riñón y bazo (Meza-Aguilar and Boucard, 2014, Boucard et al., 2014).

## **2.1 Funciones biológicas asociadas**

Debido a que Lphn-1 fue descubierta al ser detectada como un receptor para  $\alpha$ -latrotoxina ( $\alpha$ -LTX), el cual es un componente del veneno de la araña Viuda negra, diversas investigaciones han intentado dilucidar cuál es el papel fisiológico de éste y las demás isoformas. Sin embargo, aún se tienen pocos indicios de las funciones que pueden desempeñar (Meza-Aguilar and Boucard, 2014). En *C. elegans*, Lphn-1 se ha relacionado con el proceso de embriogénesis principalmente durante la división celular (Martinez et al., 2011). Aunado a esto, estudios *in vitro* han propuesto la participación de Lphn-1 en la especialización sináptica (Silva et al., 2011).

Por otro lado, en ratones knockout para Lphn-2 la delección de este gen es letal para los animales, mientras que en neuronas hipocampales la ausencia de este receptor afecta la formación de sinapsis excitatorias (Anderson et al., 2017). Además, existe evidencia de que las tres Lphns son capaces de mediar adhesión intercelular al interactuar con otras moléculas, sugiriendo su participación durante la estabilización de la sinapsis neuronal (Silva et al., 2011, Boucard et al., 2012, Boucard et al., 2014).

## **2.2 Enfermedades relacionadas a las Lphns**

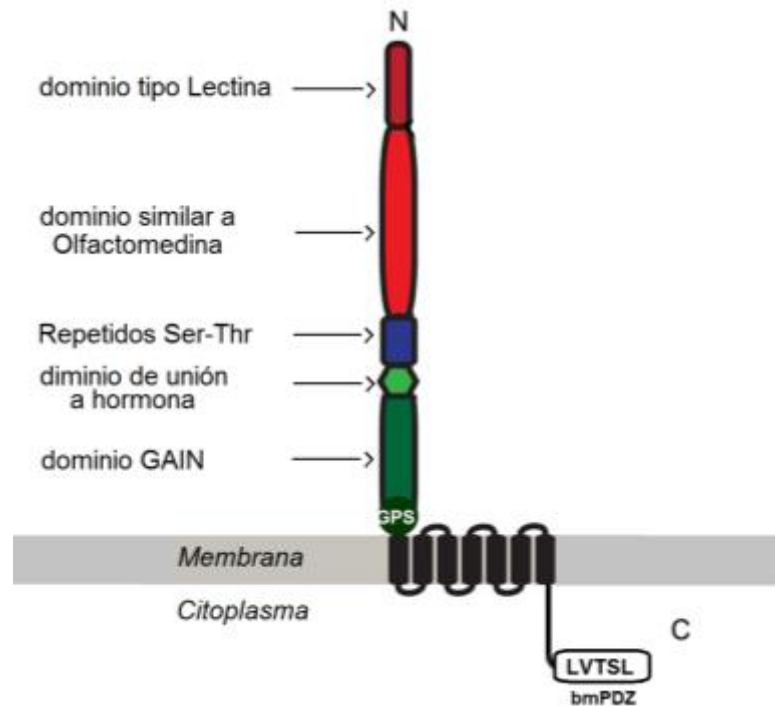
Más allá de las funciones fisiológicas que puedan tener estos aGPCRs, también se han relacionado con diferentes patologías; por ejemplo, la expresión de Lphn-1 se asocia con leucemia mieloide aguda, cáncer de pulmón y asma. Algunas mutaciones en el gen que codifica para la Lphn-2, así como la alteración en la expresión proteica se han vinculado a cáncer de mama, de vejiga, colorectal y gástrico (Sumbayev et al., 2016, Hsu et al., 2009, Faiz et al., 2017, Zhang et al., 2014, Jeon et al., 2016, Meza-Aguilar and Boucard, 2014). En el caso de Lphn-3, además de su relación con el asma y cáncer, el principal desorden neurológico con el que se ha ligado esta isoforma es el Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad (TDAH; por sus siglas en español) (Faiz et al., 2017, Kan et al., 2010, Arcos-Burgos et al., 2010). De acuerdo con los reportes, existen varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen de Lphn-3 que están presentes en pacientes con TDAH; sin embargo, se desconoce el efecto funcional de tales SNPs (Arcos-Burgos et al., 2010, Bruxel et al., 2015). Por tanto, lo anterior pondera la importancia de conocer en mayor detalle los mecanismos moleculares en los que participan las Lphns.

## **2.3 Estructura y ligandos de las Lphns**

Las tres isoformas de las Lphns presentan una estructura molecular similar. En el extremo N-terminal cuentan con un dominio tipo lectina, seguido de un dominio similar a olfactomedina. Posteriormente tienen una región rica en serinas y treoninas, un dominio de unión a hormona y, por último, como parte de la región extracelular poseen el dominio de inducción para autoproteólisis de los GPCRs (GAIN), dentro del cual se encuentra el sitio GPS. Por su parte, la región C-terminal comprende los siete dominios transmembranales, las asas intra y extracelulares que los conectan y un motivo de unión a secuencias PDZ (bmPDZ) en la cola citoplasmática. Este se forma por los últimos cinco aminoácidos: Leucina-Valina-Treonina-Serina-Leucina (Figura 3) (Meza-Aguilar and Boucard, 2014).



De la misma manera que otros receptores, las Lphns presentan modificaciones postraduccionales como son las N-glicosilaciones (características de proteínas de la membrana plasmática) y diversos sitios de fosforilación que podrían regular las interacciones con otras proteínas (Figura 5) (Davletov et al., 1996, Meza-Aguilar and Boucard, 2014, Chung et al., 2004).



**Figura 3. Estructura de las latrofilinas.** En la parte extracelular cuentan con varios dominios de adhesión, así como con el dominio GAIN. En la parte intracelular presentan un bmPDZ (Modificado de Boucard et al., 2014).

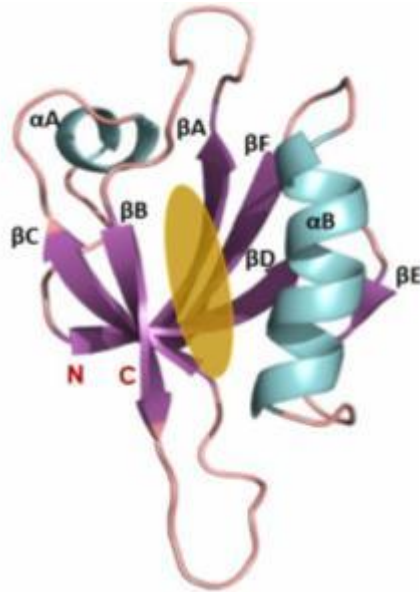
Debido a que este grupo de aGPCRs cuenta con varios dominios extracelulares, algunos investigadores se han enfocado en la búsqueda de ligandos endógenos para estos receptores. Hasta el momento, se ha descrito que las proteínas transmembranales ricas en leucina que contienen un dominio tipo fibronectina (FLRT), interaccionan con las Lphns a través del dominio olfactomedina, al igual que las neurexinas las cuales pertenecen a otra familia de ligandos. Las teneurinas por su parte, son ligandos que se unen al dominio tipo lectina de las Lphns (Arac et al., 2012, Langenhan et al., 2016). Recientemente un grupo de investigadores reportaron la interacción

de la proteína contactina-6 con Lphn-1, sugiriendo el descubrimiento de un nuevo ligando (Zuko et al., 2016).

A nivel intracelular, se ha descrito que las Lphns interaccionan con distintas proteínas como las Gαq y Gαo, desafortunadamente estas interacciones no han sido bien caracterizadas (Paavola and Hall, 2012). Sin embargo, existen reportes que muestran que la sobreexpresión de Lat-1 el homólogo de Lphn-1 en *C.elegans*, es capaz de inducir un aumento en la concentración de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) sugiriendo una señalización mediada por Gαs, a diferencia de Lphn de *Drosophila melanogaster* (dCIRL) que podría señalizar a través de Gαi, debido a que en neuronas cordotonaes causa una disminución del AMPc (Muller et al., 2015, Scholz et al., 2017). Por otro lado, el motivo de unión a dominio PDZ de las Lphns representa un sitio potencial de interacción con proteínas que cuentan con dicha secuencia. Hasta el momento se ha demostrado que las proteínas Shank, PSD-95, MAGI-1 y SAP102 pueden unirse a las Lphns mediante sus dominios PDZ (Tobaben et al., 2000, Kreienkamp et al., 2000).

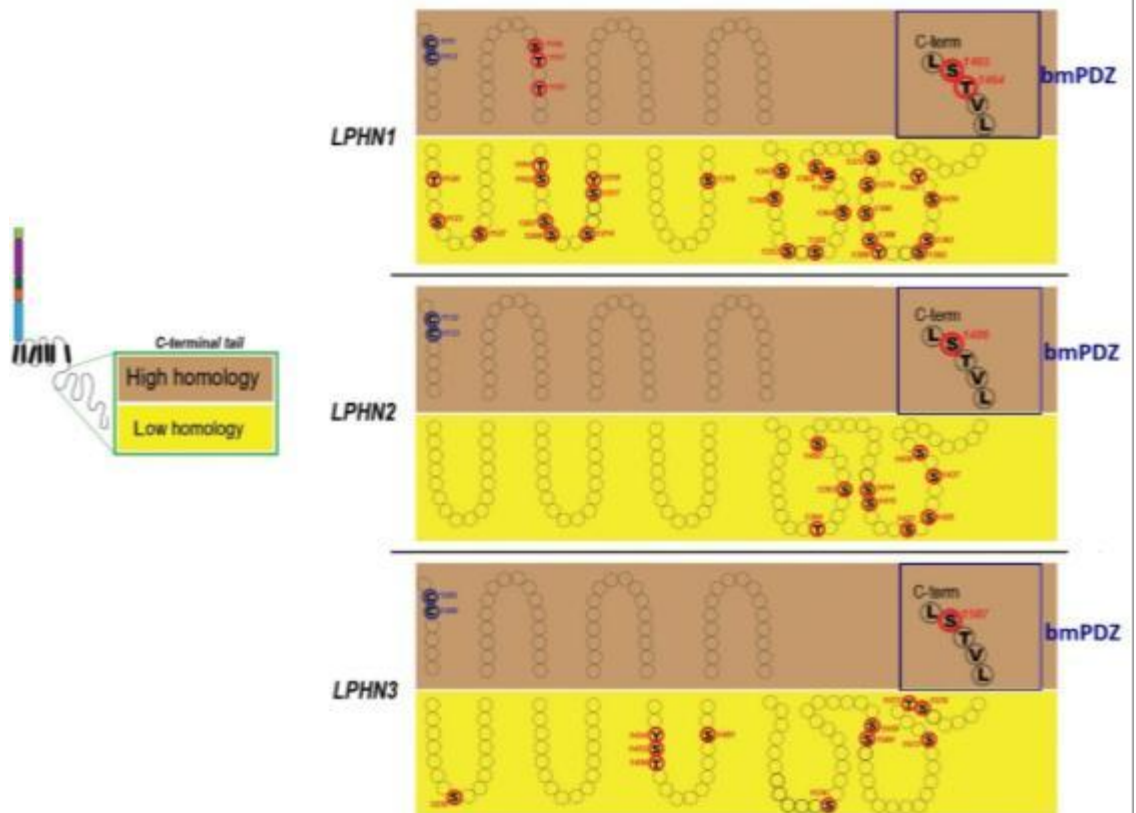
### **3. Dominios PDZ y sus secuencias de reconocimiento**

Los dominios PDZ son módulos de interacción proteína-proteína de 80-100 aminoácidos de longitud y su estructura clásica está formada por seis hojas-β plegadas y dos α-hélices (Figura 4) (Lee and Zheng, 2010).



**Figura 4. Estructura de los dominios PDZ.** El diagrama representa la estructura tridimensional del dominio PDZ de la proteína Dvl-1 con sus seis hojas- $\beta$  plegadas (A-F) y las dos  $\alpha$ -hélices (A-B), así como el sitio de unión para el bmPDZ (en amarillo ocre) presente en la hendidura formada entre la  $\alpha$ B -hélice y la hoja- $\beta$ B (Modificada de Lee and Zheng, 2010).

Los dominios PDZ se clasifican de acuerdo a los motivos (secuencias cortas de aminoácidos) que reconocen: los de clase I se unen a la secuencia Ser/Thr-X- $\Phi$ ; la clase II al motivo  $\Phi$ -X- $\Phi$  y los de clase III reconocen la secuencia Asp/Glu-X- $\Phi$ ; en donde X representa cualquier aminoácido y  $\Phi$  un aminoácido hidrofóbico (Lee and Zheng, 2010). Las tres isoformas de la Lphn cuentan con un motivo altamente conservado que reconoce dominios PDZ clase I (Figura 5) (Meza-Aguilar and Boucard, 2014). Además de las Lphns se ha reportado que otros aGPCRs como los de la familia BAI, algunos GPCRs como los Frizzled y los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) cuentan con bmPDZ; sin embargo, la secuencia de aminoácidos difiere entre ellos (Weill Medical College of Cornell University, 2004).

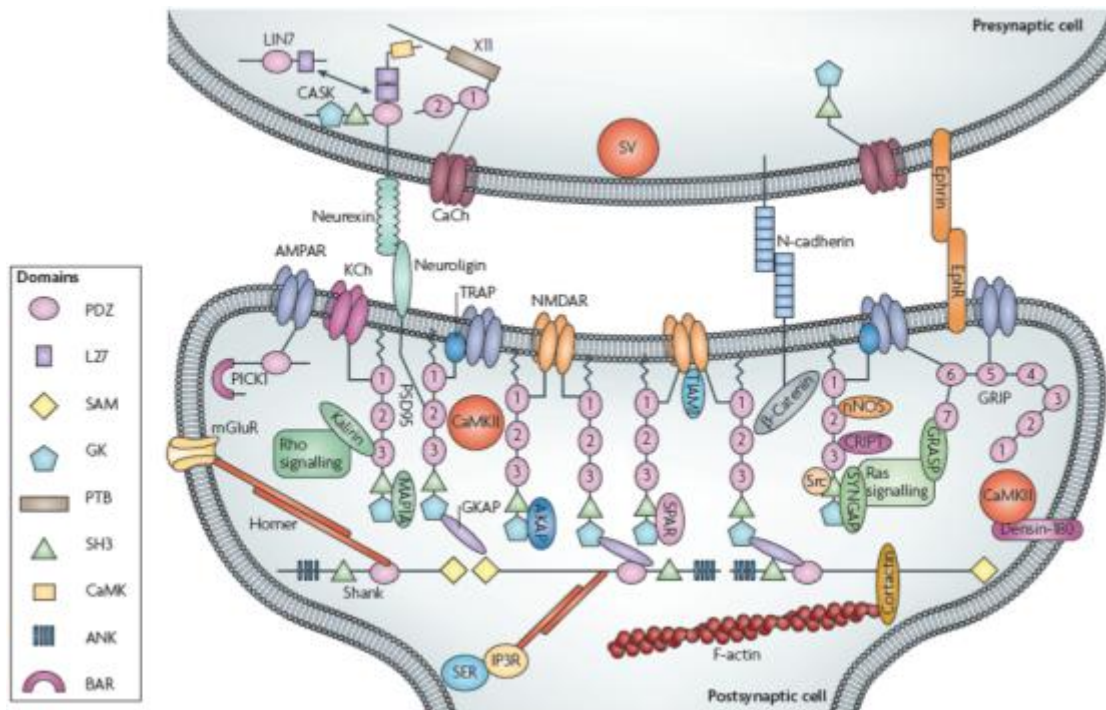


**Figura 5. Comparación de la secuencia en el extremo C-terminal de las Lphns.** Se muestran las regiones de alta y baja homología entre las Lphns, así como los probables sitios de palmitoilación (círculos azules), fosforilación (círculos rojos) y la secuencia de los bmPDZ (Modificado de Meza-Aguilar and Boucard, 2014).

### 3.1 Importancia de las proteínas con dominios PDZ y sus interacciones

Además de mediar las interacciones entre distintas proteínas, se ha reportado que, los dominios PDZ permiten la dimerización de proteínas, así como la unión a fosfolípidos de la membrana plasmática. La mayoría de las proteínas con dominios PDZ sirven de andamiaje y particularmente en el tejido nervioso estas proteínas son de gran relevancia ya que permiten organizar la red de moléculas de la terminal post-sináptica (PSD; por sus siglas en inglés) (Figura 6). La alta estructuración de la PSD es de suma importancia en el establecimiento de la morfología neuronal y por lo tanto sobre la plasticidad sináptica. La PSD comprende varias capas, en la primera de ellas se encuentran los receptores de membrana, los canales iónicos y las moléculas de adhesión transmembranales que presentan bmPDZ, como son

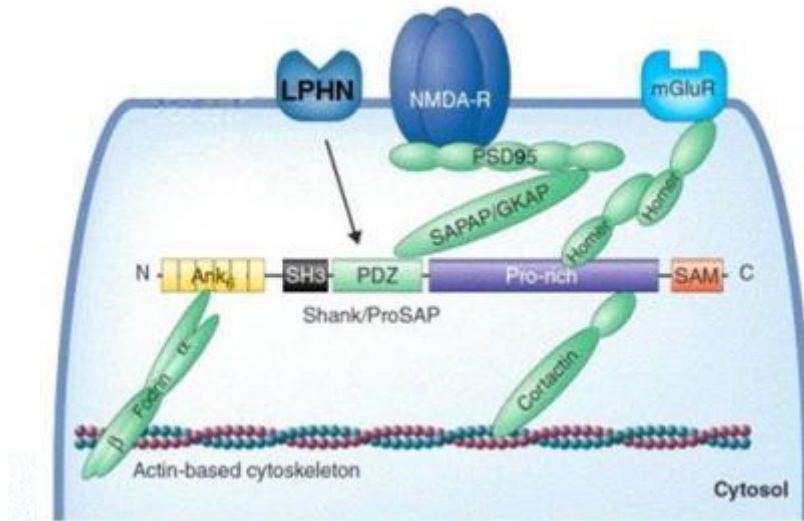
los receptores de glutamato ionotrópicos AMPA o las neuroliginas. En la segunda capa están las proteínas de andamiaje con actividad guanilato cinasa, tales como PSD-95 que interaccionan con otras proteínas de la tercera capa entre las que se encuentran las proteínas asociadas a las guanilato cinasas (GKAPs) y Shank.



**Figura 6. Organización proteica en la terminal post-sináptica.** La PSD presenta una alta complejidad debido a las múltiples interacciones moleculares, principalmente dadas entre proteínas con dominios PDZ y sus contrapartes con bmPDZ (Modificado de Feng and Zhang, 2009).

### 3.2 Proteínas Shank y el citoesqueleto de actina

De acuerdo con la literatura, las proteínas de andamiaje Shank presentan una distribución postsináptica durante la sinapsis excitatoria; es ahí donde funcionan como puentes moleculares para poder anclar receptores neuronales como el de glutamato NMDA y el mGluR al citoesqueleto de actina de manera indirecta a través de interacciones con proteínas de unión a actina (Figura 7) (Sarowar and Grabrucker, 2016).



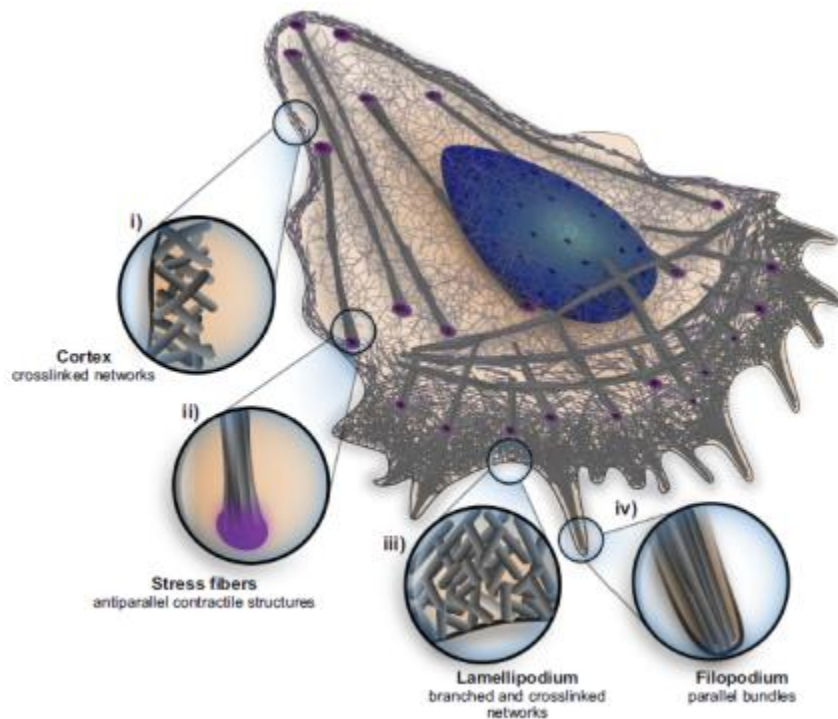
**Figura 7. Interacción Shank-citoesqueleto de actina.** Las proteínas Shank anclan a receptores de glutamato al citoesqueleto de actina a través de otras proteínas de andamiaje y proteínas que se unen a actina (Modificada de Hughes, 2012).

El citoesqueleto es un complejo multiproteico altamente regulado, el cual está formado por tres elementos principales: los microtúbulos, los filamentos intermedios y los filamentos de actina. Este organelo está involucrado en diversas funciones celulares de gran importancia tales como adhesión, crecimiento, tráfico vesicular, migración y división celular. Particularmente, el citoesqueleto de actina es el principal responsable de la morfología celular y la formación de estructuras membranales (Vazquez-Victorio et al., 2016, Sit and Manser, 2011). Existen distintas estructuras generadas a partir de la membrana plasmática que cumplen diversas funciones, en el caso de células migratorias las estructuras más caracterizadas son los lamelipodios y filopodios. Los lamelipodios son estructuras formadas por una red de filamentos de actina ensamblados en la superficie cortical de la célula que les permiten generar la fuerza de protrusión cuando se desarrolla el movimiento. Por su parte, los filopodios son proyecciones alargadas de la célula generadas a partir de filamentos de actina. De acuerdo con la literatura, estas estructuras tienen la función de sensar el microambiente y darle direccionalidad a la célula (Figura 6) (Blanchoin et al., 2014). De manera más reciente, se han descrito otras estructuras lobuladas conocidas como “blebs”, que se generan debido a la presión hidrostática intracelular, por lo tanto, en



la etapa inicial de su formación carecen de actina y a medida que la estructura va madurando la actina cortical se va ensamblando. La presencia de estas lobulaciones membranales había sido relacionada con la apoptosis, sin embargo, ahora la evidencia sugiere su participación durante la migración celular (Paluch and Raz, 2013).

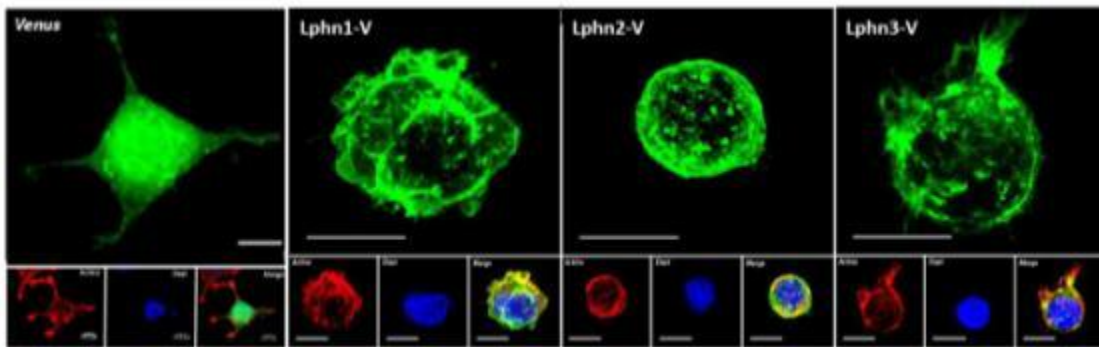
En neuronas, específicamente existen estructuras denominadas espinas dendríticas, las cuales son pequeñas protrusiones de la membrana cuya forma y estabilidad son determinadas por el citoesqueleto de actina (Calabrese et al., 2006). Se ha evidenciado que el silenciamiento de las proteínas Shank altera la cantidad y la morfología de estas estructuras, sugiriendo una clara asociación entre Shank y el citoesqueleto de actina (Sarowar and Grabrucker, 2016, Monteiro and Feng, 2017, MacGillavry et al., 2016).



**Figura 8. Estructuras celulares formadas por actina.** La polimerización de actina puede dar origen a estructuras tales como: fibras de estrés, lamelipodios y filopodios (Modificada de Blanchoin et al., 2014).

#### 4. Sobreexpresión de latrofilina y su relación con el citoesqueleto

Por otro lado, existen reportes en donde observaron que la sobreexpresión de Lphn-1 en cultivos neuronales, disminuyó el crecimiento de espinas dendríticas (Cruz-Ortega and Boucard, 2017). Además, nuestro grupo de trabajo demostró que la sobreexpresión de las tres isoformas de Lphn en células HEK293T causan un redondeamiento celular, formación de lobulaciones en la membrana plasmática, disminución del tamaño celular y de estructuras tipo filopodios y lamelipodios (Figura 9). En conjunto, estos datos y el análisis por microscopía confocal que muestra una colocalización entre los receptores Lphn y el citoesqueleto de actina, sugieren fuertemente una interacción funcional entre ellos (Cruz-Ortega and Boucard, 2017).



**Figura 9. Alteraciones morfológicas causadas por la sobreexpresión de las Lphns.** Cambios observados en la morfología en células HEK293T al sobreexpresar las tres isoformas de Lphn en comparación con células transfectadas con el control, Venus (Modificado de Cruz-Ortega and Boucard, 2017).



## **II. JUSTIFICACIÓN**

Las latrofilinas son una subfamilia de aGPCRs cuyas funciones no han sido descritas por completo; sin embargo, se ha sugerido su participación en el neurodesarrollo y en patologías como cáncer y TDAH. En este sentido, es importante conocer y entender los procesos biológicos en los que participan estos receptores.

Debido a que existen antecedentes que demuestran que la sobreexpresión de las Lphns afecta la morfología celular y además se han descrito proteínas con dominios PDZ capaces de interaccionar de forma directa o indirecta con el citoesqueleto, es de importancia conocer si el dominio de unión a PDZ de las Lphns participa en la remodelación del citoesqueleto de actina a través de las interacciones moleculares mediadas por este, lo cual contribuiría a la caracterización funcional de estos receptores.

## **III. HIPÓTESIS**

El dominio de unión a PDZ de Lphn-1 y 3 participa en la remodelación del citoesqueleto de actina en células HEK293T.

## IV. OBJETIVOS

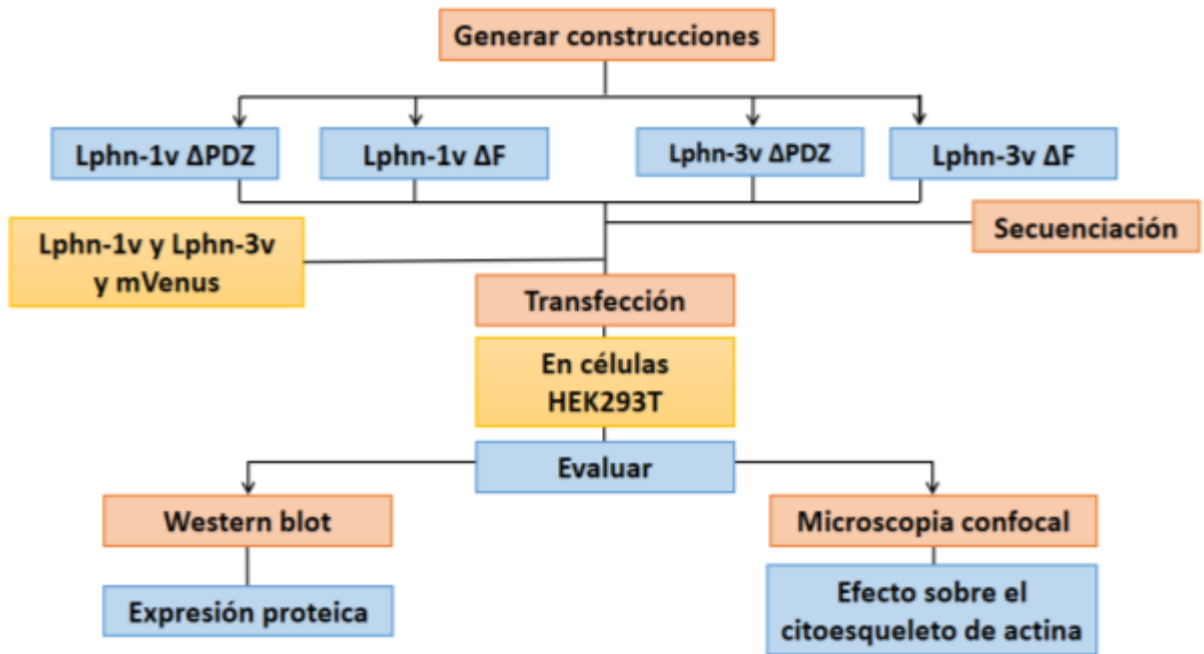
### 5. Objetivo general

Determinar el papel del dominio de unión a PDZ de Lphn-1 y 3 sobre la remodelación del citoesqueleto de actina en células HEK293T.

#### 5.1 Objetivos específicos

- ◆ Generar las construcciones plasmídicas de Lphn 1 y 3-venus que no tengan el dominio de unión a PDZ ( $\Delta$ PDZ).
- ◆ Generar los plásmidos de Lphn 1 y 3-venus que contengan las mutaciones de los sitios de fosforilación del dominio de unión a PDZ ( $\Delta$ F).
- ◆ Evaluar la expresión proteica de las construcciones Lphn 1 y 3-venus  $\Delta$ PDZ y de Lphn 1 y 3-venus  $\Delta$ F.
- ◆ Analizar el efecto funcional de la expresión de Lphn 1 y 3-venus  $\Delta$ PDZ y de Lphn 1 y 3-venus  $\Delta$ F sobre el citoesqueleto de actina en células HEK293T.

## V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL



## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### Línea celular

Las células HEK293T obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) son derivadas riñón embrionario y de origen humano. Estas células presentan morfología epitelial y contienen el antígeno T del virus SV40.

### Vector de clonación

PCMV5 fue utilizado como vector de clonación, este plásmido contiene una secuencia de resistencia a ampicilina.

### Cepa bacteriana

Para los procesos clonación y amplificación de cada construcción fueron utilizadas bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) de la cepa DH5 $\alpha$ , la cual presenta el siguiente genotipo: F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 y A1hsdR17 (rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1.

### Reactivos y soluciones

Tabla 1. Soluciones experimentales y materiales

Solución/Reactivo + Volumen final	Cantidad/Concentración/Características
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
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
Albúmina de suero bovino (BSA)	Albúmina (Sigma Aldrich # Catálogo: A-4503)
Buffer de carga para proteínas 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 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
Buffer de carga 6X para ADN	0.25% azul de bromofenol, 0.25% xileno cianol, 30% glicerol, agua miliQ
Buffer de corrida para electroforesis 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	3.03 g de Tris base, 14.4 g de glicina, 200 mL de metanol,

(1 Litro)	25 mL de SDS, agua destilada
DAPI (15 mL)	0.3 µL de DAPI (Molecular Probes/Thermo Fisher Scientific #Catálogo: D-1306) en 15 mL de PBS 1X
Faloidina	Faloidina (Sigma-Aldrich #Catálogo: P2141) dilución 1:150 en PBS con 1% de BSA.
Luminol	Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare #Catálogo: RPN2209)
Medio DMEM basal	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 µL de glutamina (2 mM) y 50 µL Penicilina+Estreptomina (1%)
Membrana de nitrocelulosa	Membrana Immobilon NC Transfer (Merk Millipore #Catálogo: HATF00010)
Paraformaldehído (PFA) al 4% (50 mL)	2 gr de PFA, 50 µL de NaOH 2N, PBS 1X
PBS 1X	9.55 gr de buffer de fosfato salino de Dulbecco sin Ca <sup>2+</sup> y Mg <sup>2+</sup> (Corning #Catálogo: 55-031-PCR)
Polietilenglicol (PEG)	13 % de polietilenglicol wt 8,000 (Sigma-Aldrich #Catálogo: P5413), 1.6M de NaCl en agua miliQ
Polietilenimina (PEI)	Polietilenimina wt 25,000 1 mg/mL en PBS 1X a pH 4.5
RNAasa A	20 µg/mL RNAasa A (Invitrogen UltraPure #Catálogo: 12091039) en buffer TE
Rojo de Ponceau	1 % de ácido acético, 0.2 % de rojo de Ponceau
Solución 1	50 mM de glucosa, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0, en agua miliQ. Filtrar y esterilizar en autoclave
Solución 2	0.2 N de NaOH, 1% de SDS; en agua miliQ
Solución 3	3 M de acetato de potasio, 11.5 % de ácido acético, agua miliQ. Filtrar y esterilizar en autoclave
SYBR Safe LIFE	SYBR Safe (Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific #Catálogo: S33102) al 0.2 % en agua miliQ
TBS-Tween al 0.05% (500 mL)	5 mL de Tris pH 8.0, 4.38 gr de NaCl, 250 µL de Tween 20

**Tabla 2. Enzimas**

Enzima	Características
<b>XbaI</b>	Secuencia de corte: 5' TCTAGA 3' (Promega #Catálogo: R6181)
<b>XhoI</b>	Secuencia de corte: 5' CTCGAG 3' (Promega #Catálogo: R6161)
<b>EcoRI</b>	Secuencia de corte: 5' GAATTC 3' (Promega #Catálogo: R6011)
<b>HindIII</b>	Secuencia de corte: 5' AAGCTT 3' (Promega #Catálogo: R6041)
<b>BamHI</b>	Secuencia de corte: 5' GGATCC 3' (Promega #Catálogo: R6001)

	R6021)
<b>Taq polimerasa</b>	PrimeSTAR HS DNA polimerasa de alta fidelidad (TaKaRa #Catálogo: R010A). Presenta alta precisión y fuerte actividad de exonucleasa, lo que resulta en una tasa de error extremadamente baja de solo 12 errores por 250 kb
<b>Ligasa</b>	T4 DNA ligasa (Promega #Catálogo: M1801)

**Tabla 3. Anticuerpos**

Anticuerpos	Características
Anti-HA	Monoclonal hecho en ratón clase IgG. BioLegend #Catálogo: 901514
Anti-GFP	Policlonal hecho en conejo clase IgG. Novusbio #Catálogo: NB600-308
Anti-Conejo acoplado a peroxidasa de rábano (HRP)	Policlonal hecho en cabra clase IgG. MP Biomedicals #Catálogo: 08670391
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

## Métodos

### Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se diseñaron los oligonucleótidos de la Tabla 4 que posteriormente fueron utilizados en los ensayos de PCR para generar las mutaciones, así como las deleciones en las secuencias de Lphn-1 y 3 venus. Las PCRs se realizaron usando los reactivos y condiciones marcadas en la Tabla 5 y Figura 10.

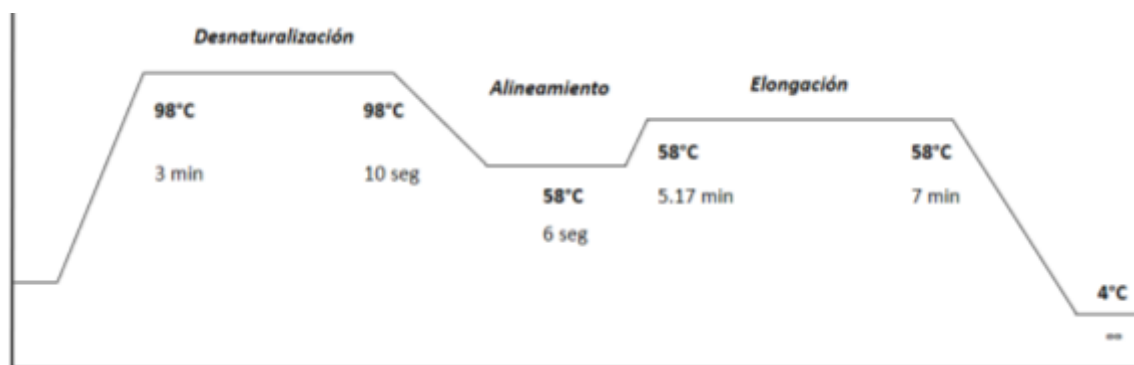
**Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados**

Nombre	Secuencia sentido 5'-3'	Tm (°C)	Secuencia de hibridación	Descripción	Tipo
LI17001	GATTCTAGATCACT GCATTTGCC	63.5	Lphn1-V	Quitar dominio de unión a PDZ	Anti sentido
LI17002	ATGGATCCTCAGTG TGCGGGG	65.2	Lphn3-V	Quitar dominio de unión a PDZ	Anti sentido

LI17003	GACGCAAATGGGC GGTAGGCG	67.2	PCMV5	Amplificar vector	Sentido
LI17004	TATCTAGATCAGAG AGCAACGACCAACT G	69	Lphn1-V	Cambiar Thr por Val y Ser por Ala en dominio de unión a PDZ	Anti sentido
LI17005	ATTCTAGATCACAG GGCTACGACCAGG T	70.1	Lphn3-V	Cambiar Thr por Val y Ser por Ala en dominio de unión a PDZ	Anti sentido
LI17006	GAAGGACACCTAGT CAGACA	53	PCMV5	Secuenciación del CTF Lphn 1 y 3 -venus	Anti sentido

**Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados Componentes de las PCRs**

Reactivos	Lphn 1v ΔPDZ	Lphn-1v ΔF	Lphn-3v ΔPDZ	Lphn-3v ΔF
	Cantidad en μL			
Agua miliQ	14.55	14.55	14.55	14.55
Buffer	2	2	2	2
dNTPs 2.5 mM	5	5	5	5
ADN molde 5 ng/μL	1	1	1	1
Oligo 10 μM (sentido)	0.5 de LI17003	0.5 de LI17003	0.5 de LI17003	0.5 de LI17003
Oligo 10 μM (anti-sentido)	0.5 de LI17001	0.5 de LI17004	0.5 de LI17002	0.5 de LI17005
DMSO	1.25	1.25	1.25	1.25
Polimerasa	0.2	0.2	0.2	0.2



**Figura 10. Programa de PCR usado por 34 ciclos.**

## Electroforesis de ADN

Las muestras de ADN se cargaron en geles de agarosa al 0.8% y se realizó la electroforesis en buffer TAE 1X durante 45 minutos a 80 voltios. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio o con una solución de SybrSafe para poder visualizar las bandas de ADN.

## Purificación de ADN en gel de agarosa

Se cortaron los geles de agarosa para obtener las bandas de ADN y se purificaron usando el kit Quiagen QIAEX II (#Catálogo: 20021) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## Digestión con endonucleasas

Los amplicones de ADN de las variantes de Lphn 1 y 3 fueron digeridos con endonucleasas al igual que el vector PCMV5 como se indica en las Tablas 6, 7 y 8. Las reacciones se mantuvieron a 37 °C y las enzimas se agregaron de manera gradual (un volumen de 0.5 µL cada 30 minutos). Posteriormente, todos los tubos con las reacciones se incubaron a 65°C por 20 minutos para inactivar las enzimas. A continuación, las reacciones que contenían el vector cortado fueron sometidas a un tratamiento con fosfatasa alcalina (FA) a una dilución de 1:100 durante 2 horas a 37°C (Tabla 9). Finalmente, se agregó a cada tubo un volumen de fenol/cloroformo (1:1) para precipitar las enzimas y los tubos fueron centrifugados a 13,000 rpm durante 5 minutos para recuperar el sobrenadante que contenía los fragmentos de ADN.

**Tabla 6. Reacción para digerir Lphn-1v  $\Delta$ PDZ y  $\Delta$ F**

Componentes	Cantidad	Componentes	Cantidad
ADN	15 µL	ADN 1 µg/µL (PCMV5)	2 µL
BSA 10X	2 µL	BSA 10X	2 µL
Buffer (E) 10X	2 µL	Buffer (E) 10X	2 µL
Xbal	1 µL (0.5 x 2)	Xbal	1 µL (0.5 x 2)
EcoRI	1 µL (0.5 x 2)	EcoRI	1 µL (0.5 x 2)
Agua	-	Agua	12 µL
Volumen total	21 µL	Volumen total	20 µL



**Tabla 7. Reacción para digerir Lphn-3v  $\Delta$ PDZ**

Componentes	Cantidad	Componentes	Cantidad
ADN (Lphn-3v $\Delta$ PDZ)	15 $\mu$ L	ADN 1 $\mu$ g/ $\mu$ L (PCMV5)	2 $\mu$ L
BSA 10X	2 $\mu$ L	BSA 10X	2 $\mu$ L
Buffer (E) 10X	2 $\mu$ L	Buffer (E) 10X	2 $\mu$ L
BamHI	1 $\mu$ L (0.5 x 2)	BamHI	1 $\mu$ L (0.5 x 2)
EcoRI	1 $\mu$ L (0.5 x 2)	EcoRI	1 $\mu$ L (0.5 x 2)
Agua	-	Agua	12 $\mu$ L
Volumen total	21 $\mu$ L	Volumen total	20 $\mu$ L

**Tabla 8. Reacción para digerir Lphn-3v  $\Delta$ F**

Componentes	Cantidad	Componentes	Cantidad
ADN (Lphn-3v $\Delta$ F)	15 $\mu$ L	ADN 1 $\mu$ g/ $\mu$ L (PCMV5)	2 $\mu$ L
BSA 10X	2 $\mu$ L	BSA 10X	2 $\mu$ L
Buffer (E) 10X	2 $\mu$ L	Buffer (E) 10X	2 $\mu$ L
XbaI	1 $\mu$ L (0.5 x 2)	XbaI	1 $\mu$ L (0.5 x 2)
EcoRI	1 $\mu$ L (0.5 x 2)	EcoRI	1 $\mu$ L (0.5 x 2)
Agua	-	Agua	12 $\mu$ L
Volumen total	21 $\mu$ L	Volumen total	20 $\mu$ L

**Tabla 9. Tratamiento con fosfatasa alcalina**

Componentes	Cantidad
Vector restringido	20 $\mu$ L
Buffer de fosfatasa alcalina 10X	2.4 $\mu$ L
Fosfatasa alcalina dilución 1:100	2 $\mu$ L (1 cada hora)

Para la digestión del ADNp de miniprep y midiprep se utilizaron los componentes de la Tabla 10 y las reacciones fueron incubadas durante 3 horas seguidas a 37°C.

**Tabla 10. Digestión de ADNp de Lphn-1v  $\Delta$ PDZ,  $\Delta$ F y Lphn-3v  $\Delta$ PDZ,  $\Delta$ F**

Componentes	Cantidad
200 ng de ADN	0.2 $\mu$ L
BSA 10X	1 $\mu$ L
Buffer (B) 10X	1 $\mu$ L
XhoI	0.5 $\mu$ L
HindIII	0.5 $\mu$ L
Agua	6.8 $\mu$ L
Volumen total	10 $\mu$ L

## Ligación

Los fragmentos de ADN de cada mutante de Lphn se incubaron en una reacción de ligación con el vector PCMV5 de acuerdo a la Tabla 11 durante 16 horas a 16°C. Así mismo, se realizó una reacción control donde se colocó el vector cortado (Tabla 12). La cantidad de ADN necesaria para cada ligación fue calculada tomando en cuenta la relación entre el tamaño del inserto y del vector, de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

**Tabla 11. Reacciones de ligación**

Componentes	Lphn-1v ΔPDZ	Lphn-1v ΔF	Lphn-3v ΔPDZ	Lphn-3v ΔF
Agua	5.86μL	5.55 μL	1.05 μL	5.729 μL
PCMV5 cortado	0.37 μL (50 ng)	0.35 μL (25 ng)	1.25 μL (25 ng)	0.241 μL (25 ng)
Fragmento de ADN	1.87 μL	11.19 μL	5.7 μL	2.03 μL
Buffer de ligasa	1 μL	2 μL	1 μL	1 μL
Ligasa T4	1 μL	0.25 μL	1 μL	1 μL
Volumen total	10 μL	20 μL	10 μL	10 μL

**Tabla 12. Control de ligación**

Componentes	Cantidad
Agua	Para completar el volumen
PCMV5 restringido	25 ng o 50 ng
Buffer de ligasa	1 μL
Ligasa T4	1 μL
Volumen total	10 μL

## Transformación de bacterias competentes

Cada producto de las reacciones de ligación y el control negativo fueron utilizados para transformar bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) competentes de la cepa DH5α. Para esto, los productos de ligación se incubaron en un tubo

eppendorf que contenía 200  $\mu$ L de bacterias competentes, el tubo fue colocado en hielo durante 30 minutos. Después, fue incubado a 42 °C por 45 segundos y transferido al hielo rápidamente para generar un choque térmico. Transcurridos 2 minutos, se agregaron 800  $\mu$ L de medio Luria Bertani (LB) estéril sin antibiótico y las bacterias se incubaron a 37 °C durante 1 hora en agitación a 220 rpm. Finalmente, se sembró un volumen de 200  $\mu$ L de bacterias en placas de agar LB que contenían 100  $\mu$ g/mL de ampicilina. La placa fue incubada a 37°C durante 16 horas.

### **Selección de colonias para miniprep**

Después de la transformación se tomaron cinco unidades formadoras de colonias (UFC) de cada placa y con una punta estéril se depositaron en tubos diferentes que contenían 5 mL de medio LB con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina. Los tubos fueron incubados a 37°C en agitación a 220 rpm durante 16 horas. Posteriormente el ADNp fue extraído.

### **Extracción de ADNp a partir de miniprep**

Las bacterias cultivadas de miniprep fueron transferidas a tubos eppendorf de 1.5 mL. Se realizaron centrifugaciones a 13,000 rpm durante 1 minuto y el sobrenadante obtenido fue descartado, mientras que la pastilla bacteriana fue resuspendida en 200  $\mu$ L de solución de lisis 1. A continuación se agregó un volumen de 400  $\mu$ L de solución 2 (los componentes se mezclaron por inversión del tubo). Posteriormente se agregaron 300  $\mu$ L de solución 3, se mezcló nuevamente y posteriormente se realizó una centrifugación de 10 minutos a 13,000 rpm. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y se adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol para precipitar el ADN. Los tubos se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y 20 minutos en hielo. Nuevamente se centrifugaron a 13, 000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue desechado y la pastilla fue lavada con 1 mL de etanol al 70% dejándola secar al aire. Posteriormente la pastilla fue disuelta en 50  $\mu$ L de buffer TE con 2  $\mu$ g/mL de RNAsa. El ADN se almacenó -20 °C.

## **Midiprep**

A partir del ADNp obtenido de miniprep se utilizaron 500 ng/ $\mu$ L para realizar transformación bacteriana y de las UFC obtenidas solamente se tomó una para su cultivo. La colonia fue inoculada en 2 mL de medio LB con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina y después de 8 horas de incubación fue sembrado un volumen de 100  $\mu$ L de bacterias en un matraz que contenía 100 mL de medio LB con ampicilina. El cultivo fue crecido a 37°C durante 16 horas a 220 rpm.

## **Extracción de ADNp por lisis alcalina a partir de midiprep**

Los cultivos bacterianos de midiprep se colocaron en tubos de 30 mL y fueron centrifugados a 7,500 rpm por 15 minutos. Las pastillas bacterianas obtenidas fueron resuspendidas en 2 mL de solución de lisis 1 con ayuda del vórtex. A continuación, se agregaron 300  $\mu$ L de solución de lisozima y después 4 mL de solución 2, los componentes fueron mezclados por inversión de los tubos y la mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 4 mL de cloroformo, 2 mL de solución 3 y después de mezclar el contenido, los tubos se dejaron en reposo durante 10 minutos en hielo. Se realizó una centrifugación a 5,000 rpm durante 12 minutos a 4 °C, el sobrenadante fue transferido a otro tubo y se le adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol. Después de mezclar bien el contenido, los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente fueron centrifugados 12 minutos a 5 000 rpm. La pastilla obtenida fue lavada con 2 mL de etanol al 70 % y fue disuelta en 500  $\mu$ L de buffer TE.

## **Purificación de ADNp**

A cada muestra de ADNp (500  $\mu$ L) se le adicionó un volumen igual de LiCl 5M para precipitar el ARN. Se realizó una centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue transferido a otro tubo y se le agregó 1 mL de isopropanol, después de mezclar los componentes, los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 10

minutos. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados por 10 minutos a 13,000 rpm. La pastilla obtenida fue lavada con 1 mL etanol al 70% y disuelta en 500  $\mu$ L de buffer TE que contenía 20  $\mu$ g/mL de RNAsa. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente fueron adicionados 500  $\mu$ L de una solución de polietilenglicol (PEG wt 8,000) y nuevamente se realizó una incubación, esta vez a -20 °C durante 20 minutos. Los tubos fueron centrifugados a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, el sobrenadante fue recuperado y se le añadieron 120  $\mu$ L de acetato de amonio 10M. Una vez mezclados los componentes se agregó 1 mL de etanol absoluto y los tubos se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizó una centrifugación final de 12 minutos a 13,000 rpm, la pastilla resultante fue lavada con 1 mL de etanol al 70% y disuelta en 200  $\mu$ L de buffer TE.

### **Cultivo celular**

Células HEK293T obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC) fueron cultivadas utilizando medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado al 10% de suero fetal bovino (SFB) más 2 mM de glutamina y 1% de penicilina y estreptomina. El cultivo fue mantenido a 37 °C en una incubadora con una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Para la obtención de proteínas las células fueron sembradas en placas de 6 pozos hasta alcanzar 80% de confluencia, mientras que, para microscopía confocal las células fueron sembradas sobre cubreobjetos en placas de 12 pozos hasta alcanzar una confluencia del 40%.

### **Preparación de cubreobjetos para cultivo**

Cubreobjetos de 1 mm de grosor fueron lavados con etanol al 70%, posteriormente con etanol absoluto y una vez secos, estos fueron irradiados durante 20 minutos con luz UV. Se colocaron dentro de placas para cultivo celular con 12 pozos y se les agregó 700  $\mu$ L de medio condicionado (MC) obtenido de HEK293T. Los cubreobjetos con MC fueron incubados durante 24 horas y después el medio fue retirado, los cubreobjetos fueron lavados 2 veces con PBS 1X y una vez con agua miliQ estéril.

### Transfección por método de PEI

Para la preparación del complejo de transfección se mezcló en un tubo eppendorf ADN, polietilenimina (PEI) y medio basal (Tabla 13). La mezcla fue agitada en vórtex durante 30 segundos y posteriormente fue incubada durante 30 minutos protegida de la luz. Por otro lado, el medio de cultivo de cada pozo fue retirado y las células fueron lavadas con PBS 1X, se agregó el medio basal necesario y el complejo de ADN/PEI fue agregado gota a gota sobre las células. Después, las células fueron incubadas durante 30 minutos y trascurrido este tiempo fue completado el volumen para cada pozo con medio DMEM al 20% de SFB más 2X de glutamina sin antibiótico. Las células fueron incubadas con el complejo durante 19 horas y posteriormente el medio fue retirado, se realizó un lavado con PBS 1X y se agregó DMEM suplementado con 10% de SFB y antibióticos hasta alcanzar 48 horas post-transfección.

Tabla 13. Formación de complejos para transfección

Complejo para placa de 6 pozos			
ADNp	PEI	DMEM	Vol. final por pozo
4 µL	12 µL	484 µL	2 mL
Complejo para placa de 12 pozos			
ADNp	PEI	DMEM	Vol. final por pozo
1.3 µL	4 µL	244.7 µL	1 mL

### Extracción de proteínas de fracción enriquecida de membrana

Para poder obtener las proteínas las células HEK293T fueron sembradas en placas de 6 pozos y tras alcanzar 80% de confluencia fueron transfectadas con el método de PEI. Después 48 horas el medio fue retirado y se realizaron 2 lavados por cada pozo con PBS 1X, las células fueron almacenadas durante 24 horas a una temperatura de -80°C. Posteriormente, a las células se les dio un choque térmico manteniendo las cajas a 37°C durante 30 segundos y enseguida se colocaron en agua con hielo. A cada pozo se le

colocó 1 mL de PBS que contenía 0.1% de BSA + inhibidores de proteasas, y después de ser despegadas mecánicamente por raspado, las células se colectaron en tubos eppendorf, mismos que fueron centrifugados a 5,000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido fue desechado y la pastilla que contenía la fracción membranal fue diluida en 200  $\mu$ L de buffer de carga 1X. Después, cada muestra se hizo pasar por jeringas de insulina de 10 a 15 veces. Las muestras fueron desnaturalizadas a 37°C durante 30 minutos y almacenadas a -20°C hasta su uso.

### **Western blot**

Se realizaron geles de poliacrilamida al 8% y se cargaron 15  $\mu$ L de proteínas contenidas en buffer de carga 1X. Los geles fueron sometidos a electroforesis durante 30 minutos a 80 volts para concentrar las muestras y para separarlas a 120 volts por 60 minutos. Posteriormente, se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa durante 16 horas a 35 volts. Después de lavar la membrana con agua destilada, esta se tiñó con rojo de Ponceau para demostrar una correcta transferencia. Posteriormente se realizó un primer lavado con agua destilada durante 5 minutos y posteriormente se repitió la maniobra dos veces con TBS-Tween al 0.05%. Enseguida, la membrana fue bloqueada durante 2 horas usando BSA al 3% o leche al 5% en TBS-Tween.

Para la detección con el anticuerpo anti-GFP, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario (dilución 1:4000) durante 2 horas a temperatura ambiente. En el caso del anticuerpo anti-HA se usó una dilución 1:1000. Para quitar el exceso de anticuerpo no unido, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS-Tween al 0.05%. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (dilución 1:1000 en TBS-Tween al 0.05%) durante 1 hora y a temperatura ambiente, o con un anti-conejo/ anti-ratón fluorescente (dilución 1:10,000) en TBS. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos para quitar el anticuerpo

secundario no unido (acoplado a HRP) y 3 lavados de 5 minutos para retirar el exceso de anticuerpo fluorescente.

Para revelar por quimioluminiscencia se colocó luminol sobre la membrana (1:1 de solución 1 y 2) y se reveló utilizando el equipo Li-Cor Oddisey Blot Imager. Para revelar por fluorescencia se seleccionó el canal de 700.

### **Tinción para microscopía confocal**

Después de 48 horas de la transfección, las células fueron lavadas con PBS 1X y fijadas con 700  $\mu$ L paraformaldehído (PFA) al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS 1X frío. Enseguida, las células fueron permeabilizadas con 700  $\mu$ L tritón al 0.1% durante 7 minutos. Nuevamente se realizaron lavados con PBS. A cada cubreobjetos se le agregó un volumen de 50  $\mu$ L de rodamina-faloidina dilución 1:150 en PBS con BSA al 1% y se incubaron 1 hora. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS y se agregaron 50  $\mu$ L de DAPI, después de 5 minutos el colorante fue retirado, realizando los lavados correspondientes con PBS y un lavado con agua miliQ. Finalmente, cada cubreobjetos fue colocado sobre portaobjetos. Se utilizaron 10  $\mu$ L de gelvatol como medio de montaje. Las muestras fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta ser analizadas.

### **Microscopía confocal**

Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de escaneo láser confocal Leica TCS SP8 con el objetivo de 40X (imágenes panorámicas) y el de 100X (células individuales). Para todas las imágenes adquiridas se configuró que el grosor de cada corte fuera de 0.4  $\mu\text{M}$ . La toma de imágenes fue secuencial para los canales, el modo de escaneo “between stacks” y las características de los láseres se muestran en la siguiente tabla:



**Tabla 14. Características de los láseres para microscopía confocal**

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

### **Secuenciación de nucleótidos**

Las muestras de ADNp fueron secuenciadas por Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del IPICYT, utilizando el método de didesoxinucleótidos marcados en el secuenciador 3130 genetic analyzer (applied biosystems).

### **Cuantificación de parámetros celulares**

La medición del área/perímetro celular y nuclear se realizó con ayuda del software LAS-AF Lite de Leica. Para lo cual se utilizaron las imágenes de proyección máxima tomadas con el microscopio confocal SP8, después se delimitó el contorno de cada célula y su núcleo, permitiendo que el software calculara los parámetros antes mencionados.

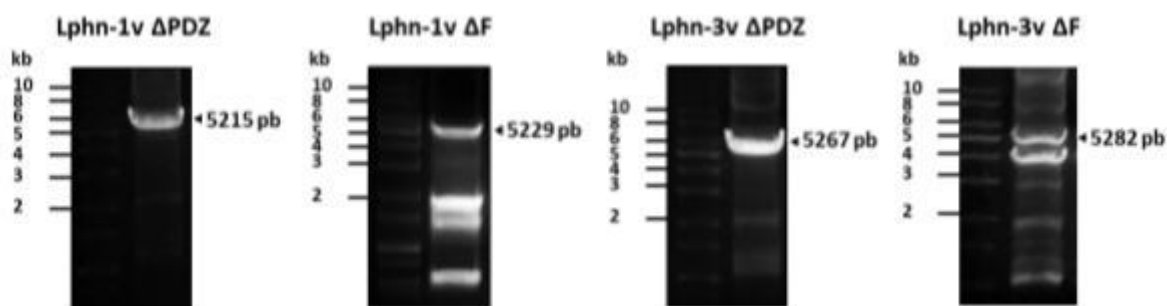
### **Análisis estadístico**

El análisis de los datos fue realizado con el software Graph Pad Prisma versión 6.01, en donde se utilizó ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Dunett.

## 6. RESULTADOS

### Generación de construcciones $\Delta$ PDZ y $\Delta$ F

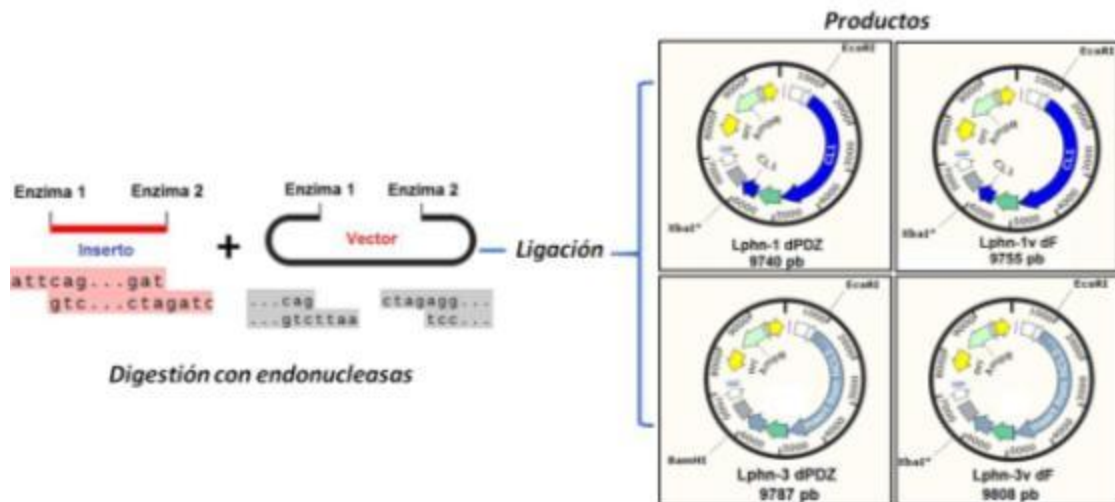
Se obtuvieron las construcciones de Lphn sin el bmPDZ y sin sitios de fosforilación, para lo cual se diseñaron varios oligonucleótidos (oligos) que permitieron obtener las secuencias codificantes de Lphn-1v y Lphn-3v con las modificaciones deseadas, esto a través de la técnica de PCR convencional. Los oligos LI17001 y LI17002 se hibridaron en el extremo 3' del ADNc de Lphn-1v y Lphn-3v respectivamente, generando un codón de paro antes de la secuencia que codificaba para el bmPDZ. Por su parte, los oligos LI17004 y LI17005 se utilizaron para realizar mutagénesis dirigida y cambiar las secuencias codificantes para los residuos de treonina (Thr) y serina (Ser) en el bmPDZ, obteniendo de esta manera los cuatro amplicones de Lphn con el tamaño esperado tal como se observa en la Figura 11. En el caso de Lphn 1 y 3 v  $\Delta$ F, al analizar los fragmentos generados se observó la presencia de otras bandas inespecíficas; sin embargo, únicamente se seleccionó y purificó el ADN de la banda que correspondía al tamaño predicho.



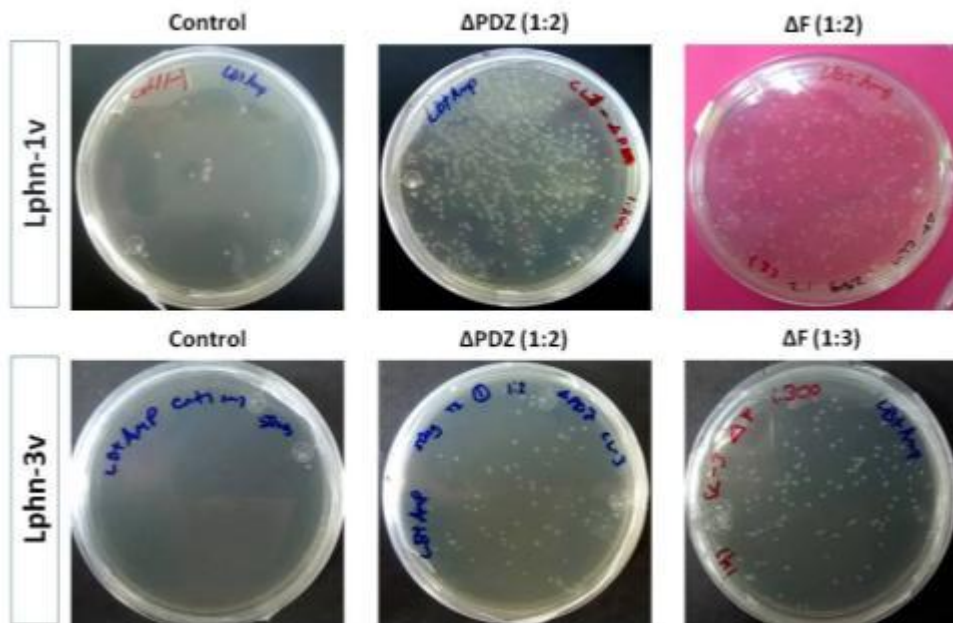
**Figura 11. Amplicones de las mutantes de Lphn 1 y 3v.** En cada gel se muestra la banda correspondiente a cada fragmento y el tamaño en pares de bases indicado por una cabeza de flecha.

Posteriormente, el ADN fue digerido con las endonucleasas indicadas en las Tablas 6, 7 y 8, al igual que el vector pCMV5 (Figura 12). A continuación se realizaron reacciones de ligación y los productos obtenidos fueron utilizados para transformar bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$ , las cuales fueron sembradas en agar LB con ampicilina. Después de 16 horas de incubación se observó el

crecimiento de pocas colonias resistentes a ampicilina en el caso de nuestro control en comparación con las demás ligaciones, sugiriendo entonces la obtención de los plásmidos correctos (Figura 13). De cada placa se seleccionaron 5 UFC que fueron cultivadas para extraer el ADNp.



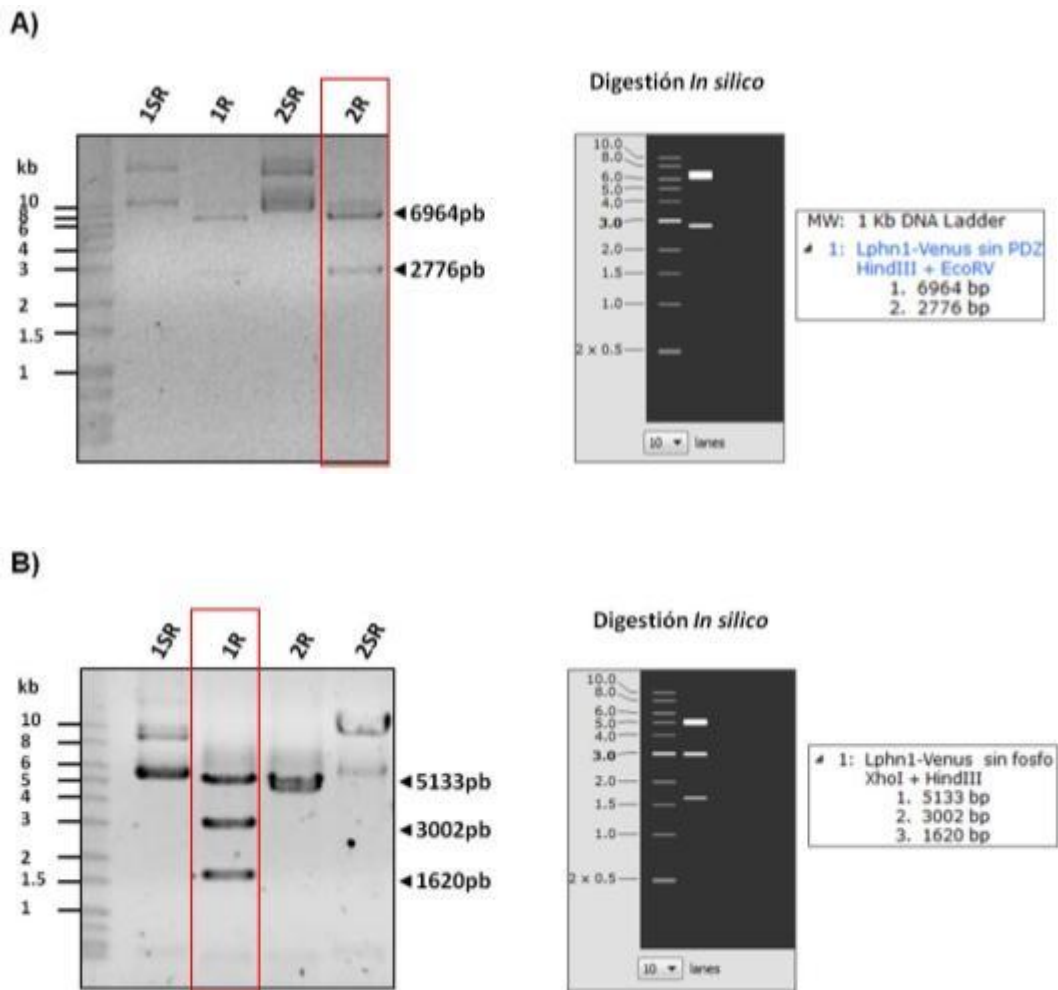
**Figura 12. Esquema representativo del proceso de digestión y ligación de fragmentos de ADN.** Los fragmentos de Lphn-1v  $\Delta$ PDZ y  $\Delta$ F, así como el de Lphn-3v  $\Delta$ F fueron digeridos con EcoRI y XbaI, mientras que para Lphn-3v  $\Delta$ PDZ se utilizaron las endonucleasas EcoRI y BamHI. Las mismas endonucleasas se utilizaron para la digestión de pCMV5. En la figura también se muestran los plásmidos productos y los tamaños esperados para cada uno.



**Figura 13. Crecimiento de bacterias transformadas.** Los productos de ligación se usaron para transformar bacterias competentes y crecidas en placas, encontrando gran cantidad de UFCs en las placas de las ligaciones problema en comparación con el control, a las 16 horas

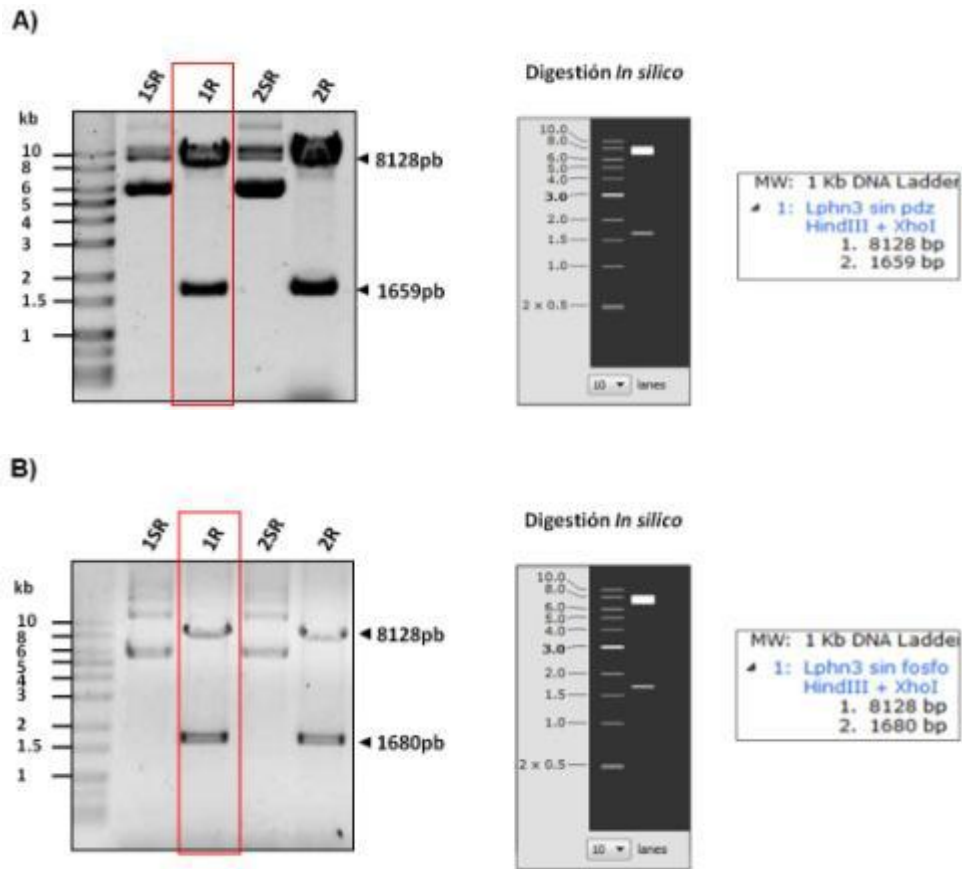
de incubación. También se muestra que para la mayoría de las reacciones de ligación, la relación vector/inserto que mejor funcionó fue 1:2 descrita entre paréntesis.

Una vez obtenido el ADN, se evaluó el tamaño de cada plásmido mediante la digestión con endonucleasas. Los plásmidos Lphn-1v  $\Delta$ F, Lphn-3v  $\Delta$ PDZ y Lphn-3v  $\Delta$ F fueron digeridos con HindIII/XhoI y Lphn-1v  $\Delta$ PDZ con HindII/EcoRV. En las Figuras 14 y 15 se muestra como el patrón de bandas obtenido coincidió con la digestión realizada *in silico* de cada construcción, además de que la suma de las bandas corresponde con el tamaño completo de cada construcción (Figura 12). A partir de estos resultados se seleccionó una muestra de ADNp para su posterior caracterización.



**Figura 14. Digestión de plásmidos generados a partir de Lphn-1v.** A) Patrón de bandas obtenidos de la digestión de Lphn-1v  $\Delta$ PDZ. B) Patrón de bandas obtenidos de la digestión

de Lphn-1v  $\Delta F$ . En la imagen se muestra el corrimiento electroforético de ADN no digerido (SR) y el obtenido después de la digestión (R). En el recuadro rojo se observa la muestra de ADNp elegida para su posterior caracterización.



**Figura 15. Digestión de plásmidos obtenidos a partir de Lphn-3v.** A) Patrón de bandas obtenidos de la digestión de Lphn-3v  $\Delta PDZ$ . B) Patrón de bandas obtenidos de la digestión de Lphn-3v  $\Delta F$ . En la imagen se muestra el corrimiento electroforético de ADN no digerido (SR) y el obtenido después de la digestión (R). Con un recuadro rojo se indica la muestra de ADNp elegida para su caracterización subsecuente.

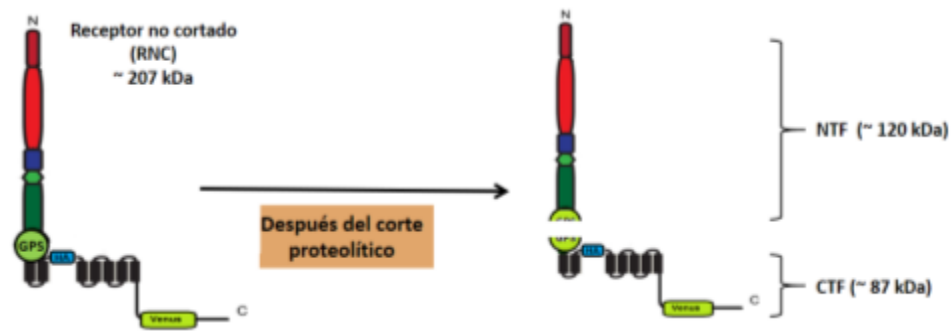
### Análisis de secuenciación de las construcciones

Las muestras de ADNp obtenidas fueron secuenciadas con ayuda del oligo antisentido LI17006 que se hibridó a pCMV5, esto permitió conocer la secuencia C-terminal de las cuatro construcciones. Los resultados de la secuenciación fueron alineados y comparados con los mapas de Lphn-1 y 3v. En las figuras del anexo 1 se muestra como se realizó de manera correcta la delección de los nucleótidos que codificaban para el bmPDZ de las isoformas de Lphn-1v y Lphn-3v. Además, se observó que en la secuencia de Lphn-1v el condón de la treonina (ACT) fue modificado para dar origen a

una valina (GTT) y el codón de serina (AGT) se cambió por el de alanina (GCT), así mismo para Lphn-3v se lograron mutar los siguientes codones: Thr (ACA)→Val (GTA) y Ser (TCC)→Ala (GCC). De esta forma se confirmó la mutagénesis de los sitios de fosforilación dentro del bmPDZ de las Lphns de interés. En las figuras también se muestra el espectro de cada nucleótido y como coinciden entre las secuencias comparadas corroborando la fidelidad de la secuencia original.

### Expresión proteica de las mutantes de Lphn-1v y Lphn-3v en células HEK293T

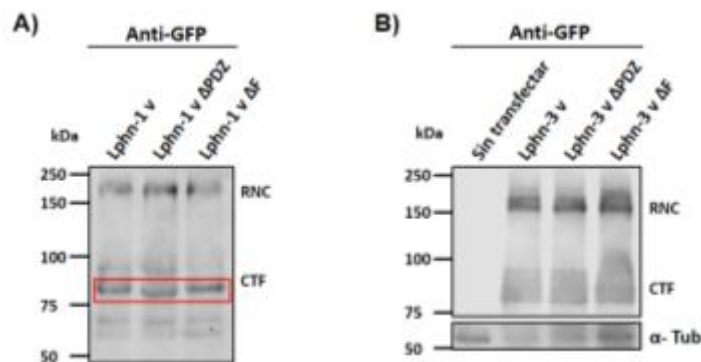
Es importante destacar que los receptores Lphn sufren un corte autoproteolítico en el sitio GPS generando dos subunidades denominadas CTF y NTF que se mantienen unidas mediante interacciones no covalentes. En la Figura 16 observamos el esquema de la estructura de Lphn-3v que además de tener fusionada a la proteína fluorescente mVenus en el C-terminal, al igual que Lphn-1v, cuenta con la etiqueta de HA.



**Figura 16. Esquema representativo de corte autoproteolítico de las Lphns.** La imagen muestra estructura de la isoforma 3 de Lphn que además de contar con mVenus insertada en el C-terminal, presenta una bandera de HA en su primera asa extracelular. También se presenta el tamaño del receptor no cortado, así como los pesos aproximados aparentes de los fragmentos generados después de la autoproteólisis.

Para evaluar la expresión de las construcciones en nuestro modelo de estudio, las células HEK293T fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia de 80% y posteriormente fueron transfectadas por el método de PEI. Después de 48 horas a partir de la transfección se extrajeron las proteínas y se realizaron ensayos de western blot. Como se observa en la

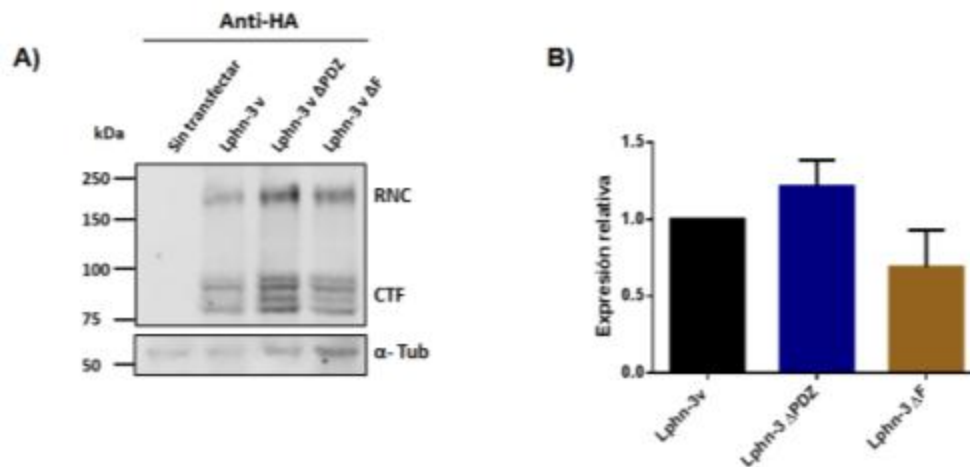
Figura 17A después de revelar con un anticuerpo anti GFP que reconoce a la proteína mVenus se detectaron bandas en los tres carriles con un peso aparente aproximado de 205 kDa, estas bandas correlacionan con el peso teórico de Lphn-1v no cortada (~ 189 kDa). Además, se logró detectar la fracción cortada de los receptores, ya que se observaron dos bandas mayoritarias que se muestran en un rango de 75 a 100 kDa. Estas bandas corresponden al CTF de las proteínas mutantes y el mismo patrón se observó para Lphn-1v. En el mismo western blot para Lphn-1 se detectaron dos bandas adicionales minoritarias con un peso aproximado de 60 y 65 kDa en los tres carriles que se muestran. Por su parte al evaluar la expresión de Lphn-3v y sus mutantes (Figura 17B) también se detectaron bandas con un peso aparente aproximado de 207 kDa que sugieren la presencia del receptor no cortado (RNC), puesto que el peso teórico de Lphn-3v es de ~192 kDa. Para esta isoforma la fracción CTF fue detectada como un conjunto de cuatro bandas que se encuentran en un rango de 75 a 100 kDa. Como control negativo en un carril se analizó la muestra de proteínas obtenidas de células HEK293T sin transfectar en donde no se observó ninguna banda.



**Figura 17. Expresión de las mutantes  $\Delta$ PDZ y  $\Delta$ F de Lphn-1v y Lphn-3v.** Western blot representativo de la expresión de las cuatro construcciones obtenidas. A) Western blot realizado para la detección de Lphn-1v en donde se observa la presencia de las formas no cortadas de los receptores (~205 kDa), así como la fracción CTF generada después de la autoproteólisis (~85 kDa) resaltada con un recuadro rojo. B) Western blot de Lphn-3v donde se muestra la fracción no cortada del receptor (~207 kDa) y la fracción CTF como bandas en un rango de 75 a 100 kDa.



Debido a que se detectaron varias bandas correspondientes al fragmento CTF en todas las muestras analizadas, decidimos realizar otros ensayos de western blot aprovechando que la isoforma 3 de Lphn cuenta con una bandera de HA. En la Figura 18A podemos observar como nuevamente se obtuvo el mismo patrón de bandas para Lphn-3v y sus mutantes que cuando se reveló con GFP. En esta ocasión también incubamos las membranas con un anticuerpo para  $\alpha$ -Tubulina (~55 kDa) como control de carga, en el panel B de esta misma figura se muestra la gráfica correspondiente al análisis densitométrico realizado de tres experimentos independientes, en donde se observa que la expresión de Lphn-3v  $\Delta$ PDZ aumentó, mientras que la de Lphn-3v  $\Delta$ F disminuyó en comparación con el control Lphn-3v, sin embargo, esta tendencia no fue estadísticamente significativa.



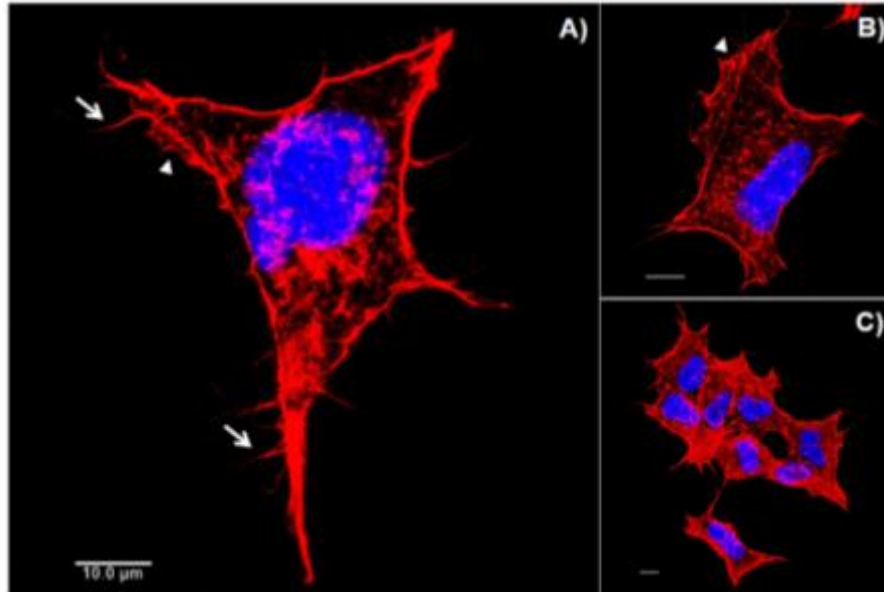
**Figura 18. Expresión de Lphn-3v y sus variantes.** A) Imagen representativa del western blot para Lphn-3 revelado contra HA. B) La gráfica representa análisis densitométrico de la suma de las bandas obtenidas mediante western blot (n=3).

### Evaluación de la morfología de las células HEK293T

Antes de analizar el efecto de las mutantes de Lphn-1v se evaluó la morfología normal de las células HEK293T mediante microscopía confocal. Las células fueron mantenidas en condiciones normales de cultivo y posteriormente fueron teñidas con rodamina-faloïdina para poder observar el citoesqueleto de actina. Así mismo se realizó una tinción con DAPI para la detección del núcleo. En la Figura 19 se observa como de manera normal las



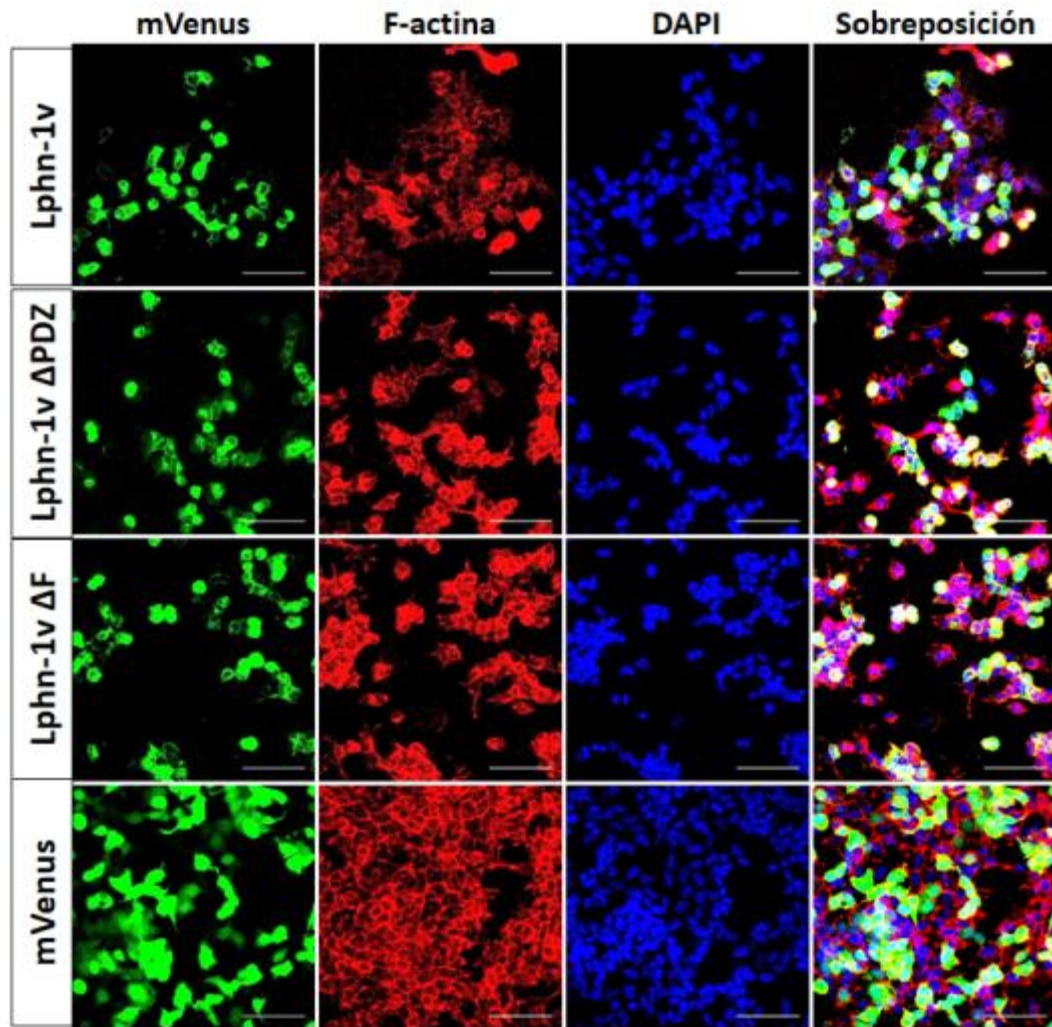
células HEK293T exhibieron una morfología aplanada y mostraron estructuras de actina como lamelipodios y filopodios. En la misma figura se observa como las células agrupadas también se mantuvieron extendidas.



**Figura 19. Morfología de células HEK293T sin transfectar.** A) y B) Muestran la morfología distinta entre células HEK293T teñidas con rodamina-faloidina (rojo) para ver citoesqueleto de actina y con DAPI (azul) para el núcleo. Se observa la presencia de estructuras tipo lamelipodios señalados con una cabeza de flecha y filopodios indicados con flechas. C) Células HEK293T agrupadas.

### **Cambios en la morfología de células HEK293T generados por la expresión de Lphn-1v y sus mutantes del bmpDZ**

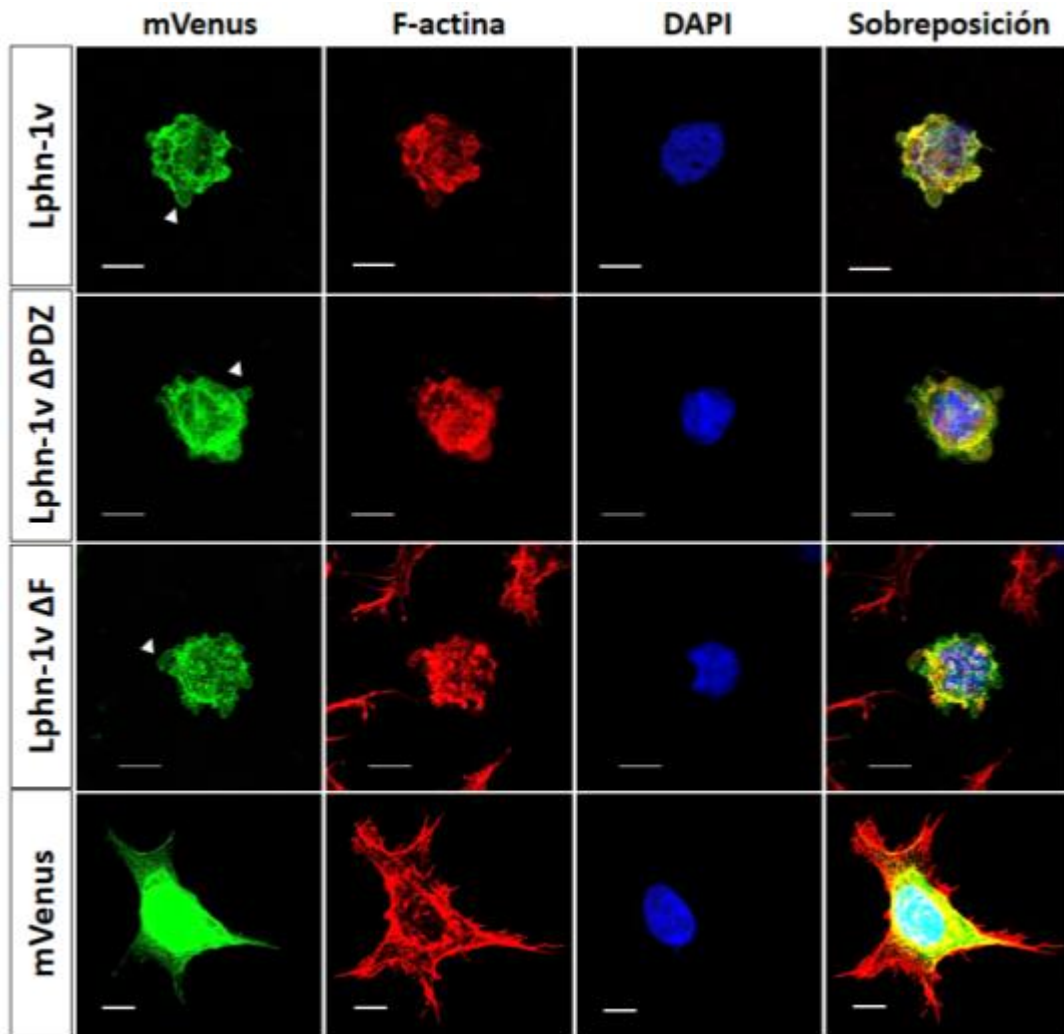
Una vez evaluada la morfología normal de nuestro modelo de estudio, las células HEK293T fueron transfectadas con las siguientes construcciones: Lphn-1v  $\Delta$ PDZ, Lphn-1v  $\Delta$ F, Lphn-1v y mVenus, siendo las dos últimas los controles de los experimentos. En la Figura 20 se muestran las imágenes panorámicas de cada transfección, así como los distintos canales y la sobreposición de ellos. De manera general en esta figura se observa que en todos los casos el método de transfección es eficiente y que la fluorescencia de la proteína mVenus acoplada a los receptores mutantes es similar a la de los controles.



**Figura 20. Transfección de células HEK293T con las mutantes de Lphn-1v.** Imágenes de microscopía confocal panorámicas de células transfectadas después de 24 horas. En verde se observa la fluorescencia mVenus, en el canal rojo se muestra F-actina (tinción con rodamina-faloídina) y en azul los núcleos (tinción con DAPI). En la figura se muestra como ninguna de las mutaciones afectó la fluorescencia. La barra de escala representa 100  $\mu$ m.

Posteriormente se analizaron los cambios morfológicos generados por cada construcción. En la Figura 21 se muestra como las células HEK293T control que expresan a la proteína mVenus mantuvieron su morfología aplanada con presencia de lamelipodios y filopodios. Por otro lado, cuando las células fueron transfectadas con Lphn-1v estas adquirieron una forma más esférica en comparación con las células control. Aunado a esto en la membrana plasmática se observó la formación de estructuras con apariencia lobulada. Por su parte, al expresar a los receptores Lphn-1v que no presentan el bmPDZ o que cuentan con las mutaciones de los residuos de Thr y Ser

dentro del mismo dominio (Lphn-1v  $\Delta F$ ) se observó nuevamente un cambio morfológico comparado con las células que expresan a mVenus; no obstante, la apariencia celular adquirida fue similar entre las poblaciones Lphn-1v, Lphn-1v  $\Delta PDZ$  y Lphn-1v  $\Delta F$ .

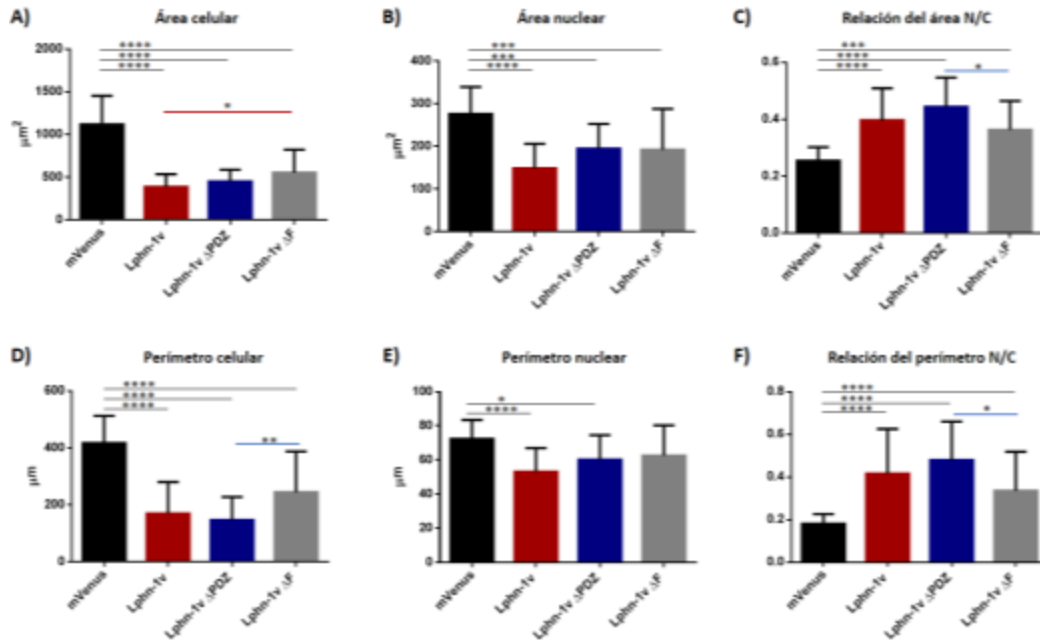


**Figura 21. Cambios morfológicos generados por la expresión de Lphn-1v y sus mutantes del bmPDZ.** Imágenes obtenidas por microscopía confocal y representativas de la proyección máxima de las células HEK293T 48 horas postransfección. En verde se muestra la expresión de mVenus y de los receptores fusionados a mVenus, mientras que en rojo se muestra el citoesqueleto de actina (F-actina) y en azul los núcleos. En las imágenes se observa que la expresión de Lphn-1v y las mutantes Lphn-1v  $\Delta PDZ$ , Lphn-1v  $\Delta F$  generan cambios morfológicos similares induciendo un redondeamiento celular, así como la aparición de blebs señalados con una cabeza de flecha. La barra de escala representa 10  $\mu m$ .

### **Efecto del bmPDZ de Lphn-1v sobre distintos parámetros celulares**

Para evaluar de manera cuantitativa los efectos de la expresión de Lphn-1v, Lphn-1v  $\Delta$ PDZ y Lphn-1v  $\Delta$ F se realizó la medición de distintos parámetros celulares. Posterior al análisis de los resultados se determinó que no existe diferencias estadísticamente significativas entre el área celular y nuclear o en la relación del área núcleo/citoplasma (N/C) de las poblaciones transfectadas con Lphn-1v y Lphn-1v  $\Delta$ PDZ. Sin embargo, se observó un pequeño incremento estadísticamente significativo en el área de las células que expresaron Lphn-1v  $\Delta$ F en comparación con las que expresan Lphn-1v. Así mismo, los resultados indican que la relación del área N/C de las células que expresaron Lphn-1v  $\Delta$ F disminuyó únicamente al compararse con la población Lphn-1v  $\Delta$ PDZ.

Por otra parte, de acuerdo con los datos obtenidos del perímetro celular y nuclear tampoco existen diferencias significativas al comparar a las células que expresan Lphn-1v y Lphn-1v  $\Delta$ PDZ. Sin embargo, el análisis demuestra diferencias estadísticamente significativas para el perímetro celular y la relación del perímetro N/C entre las mutantes Lphn-1v  $\Delta$ PDZ y Lphn-1v  $\Delta$ F. Cabe mencionar cuando se compararon los resultados de Lphn-1v y sus variantes con los del control mVenus, se observó una diferencia estadísticamente significativa para todos los parámetros excepto en el caso del perímetro nuclear cuando se comparó con la mutante Lphn-1  $\Delta$ F (Figura 22).



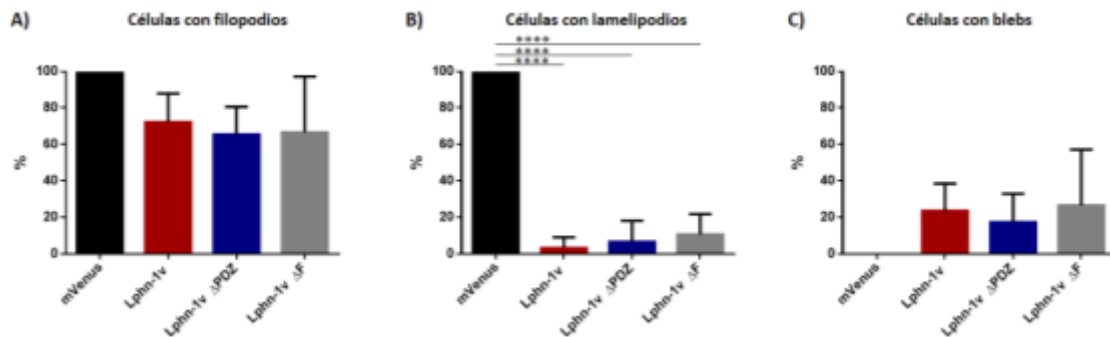
**Figura 22. Cuantificación de distintos parámetros de la morfología celular y subcelular como resultado de la transfección de células HEK293T.** A) Cuantificación del área celular en donde se observa un pequeño aumento estadísticamente significativo al comparar Lphn-1v ΔF con Lphn-1v. B) Medición del área nuclear en donde únicamente se observa diferencia significativa al comparar las poblaciones contra la de mVenus. C) Relación del área núcleo/citoplasma (representa la porción que abarca el núcleo respecto al área total de la célula). D) Determinación del perímetro celular. E) Medición del perímetro de cada núcleo. F) Relación del perímetro núcleo/citoplasma (representa la porción del perímetro celular que abarca el núcleo). Al analizar la medición de cada parámetro se determinó que, en el caso del perímetro celular, relación de área N/C y la relación del perímetro N/C existe una diferencia estadísticamente significativa al comparar las poblaciones que expresan Lphn-1v ΔPDZ y Lphn-1v ΔF. El análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía, con valores de significancia estadística de  $P \leq 0.05$  (\*),  $P \leq 0.001$  (\*\*\*) y  $P \leq 0.0001$  (\*\*\*\*). Resultados obtenidos de tres experimentos independientes con  $n=24$ .

### **Efecto del bmPDZ de Lphn-1v sobre las estructuras del citoesqueleto de actina**

Para determinar si la secuencia del bmPDZ de Lphn-1v se encuentra relacionada con la pérdida de estructuras generadas a partir de actina, se contaron las células transfectadas que presentaban o no filopodios y lamelipodios. De acuerdo con los resultados obtenidos en la Figura 23A se muestra una disminución de alrededor del 23% de las células con filopodios causada por la expresión de Lphn-1v en comparación con las células que expresaron a la proteína mVenus. Sin embargo, al transfectar las mutantes ΔPDZ y ΔF del receptor también se observó una disminución en el porcentaje

de la población que presentó lamelipodios, obteniendo valores similares al observado para Lphn-1v. De la misma forma se determinó el porcentaje de la población celular transfectada que presentó lamelipodios (Figura 23B). En este caso se observó que al transfectar a Lphn-1v, la población celular con lamelipodios disminuyó aproximadamente en un 98% al igual que con la mutante  $\Delta$ PDZ, mientras que para la mutante  $\Delta$ F la disminución fue de un 90% respecto a la población control de mVenus. Por su parte, cuando se compararon los resultados de Lphn-1v con los de la población  $\Delta$ F se observó un incremento en la población con lamelipodios, sin embargo, no fue estadísticamente significativo.

Por último, se evaluó la población que presentaba blebs, estructuras que no se forman de manera normal en células HEK293T. Después de la cuantificación se determinó que tanto el receptor Lphn-1v como los mutantes inducen la formación de lobulaciones membranales aproximadamente en un 20 a 25% de las células en comparación con la población que expresó mVenus (Figura 23C).

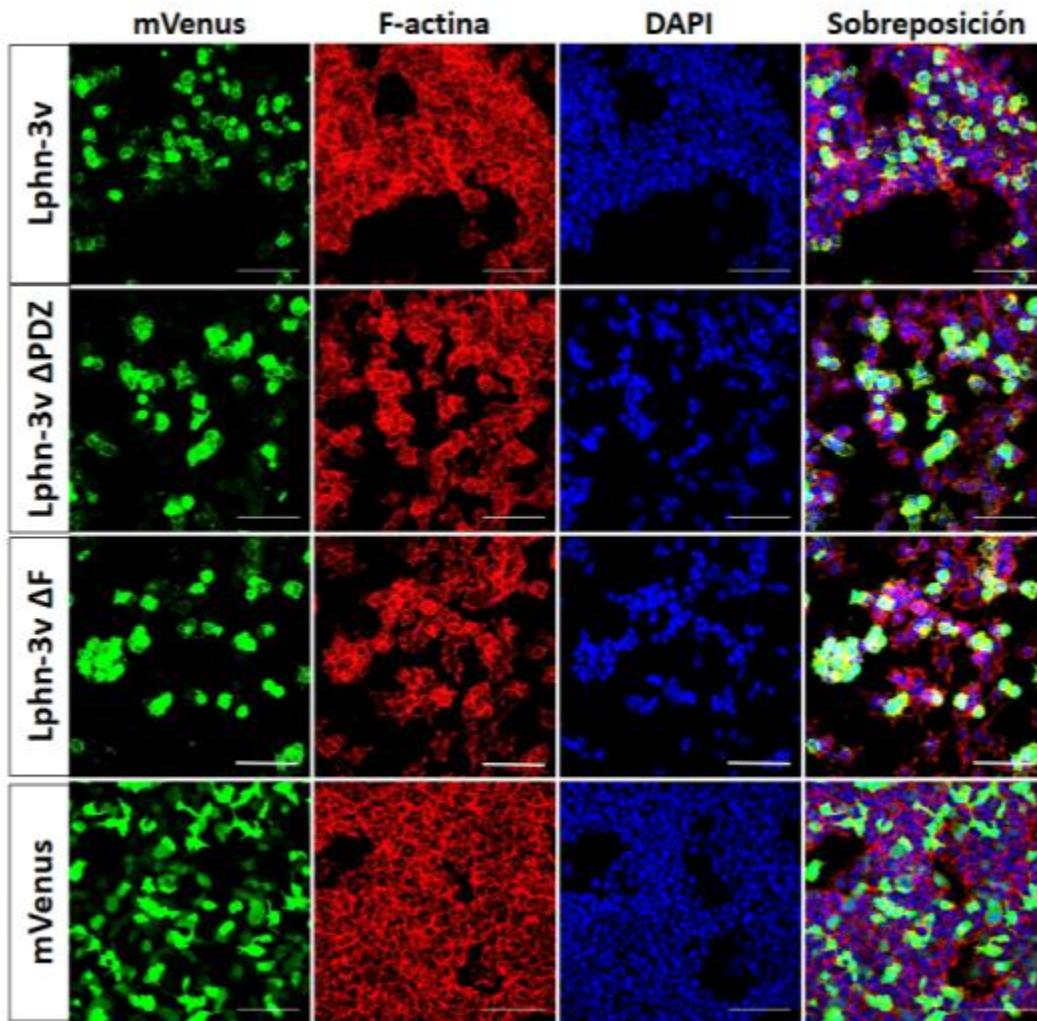


**Figura 23. La delección o mutación del bPDZ de Lphn-1 no influye en la formación de estructuras de actina.** A) Se observa que en las tres condiciones cuando se transfectó al receptor Lphn-1v la formación de filopodios disminuyó en comparación con mVenus. B) La cuantificación de la población celular con lamelipodios que expresa al receptor y sus variantes indica una disminución en comparación con las células control. C) Al evaluar la presencia de blebs, se determinó que las tres formas de Lphn-1v inducen formación de estas estructuras. En A), B) y C) se muestra como la comparación entre las poblaciones que expresan Lphn-1v, Lphn-1v  $\Delta$ PDZ y Lphn-1v  $\Delta$ F no presenta cambios estadísticamente significativos. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de una vía, con valores de significancia estadística de  $P \leq 0.0001$  (\*\*\*\*). Resultados obtenidos de tres experimentos independientes con  $n=24$ .

## **Cambios en la morfología de células HEK293T generados por la expresión de las mutantes de Lphn-3v**

Para evaluar si el bmPDZ de Lphn-3v se encuentra relacionado con la inducción de cambios morfológicos, las células HEK293T fueron transfectadas con el método de PEI y después de 48 horas de la transfección se analizaron los efectos de la expresión de las variantes de Lphn-3 mediante microscopía confocal. Para poder visualizar el citoesqueleto de actina se realizó una tinción con rodamina-faloidina para teñir F-actina, los núcleos fueron teñidos con DAPI. Después de analizar las imágenes adquiridas se observó que la cantidad de células transfectadas por el método aquí utilizado fue adecuada y que las mutaciones no interfieren con la fluorescencia intrínseca de mVenus (Figura 24).



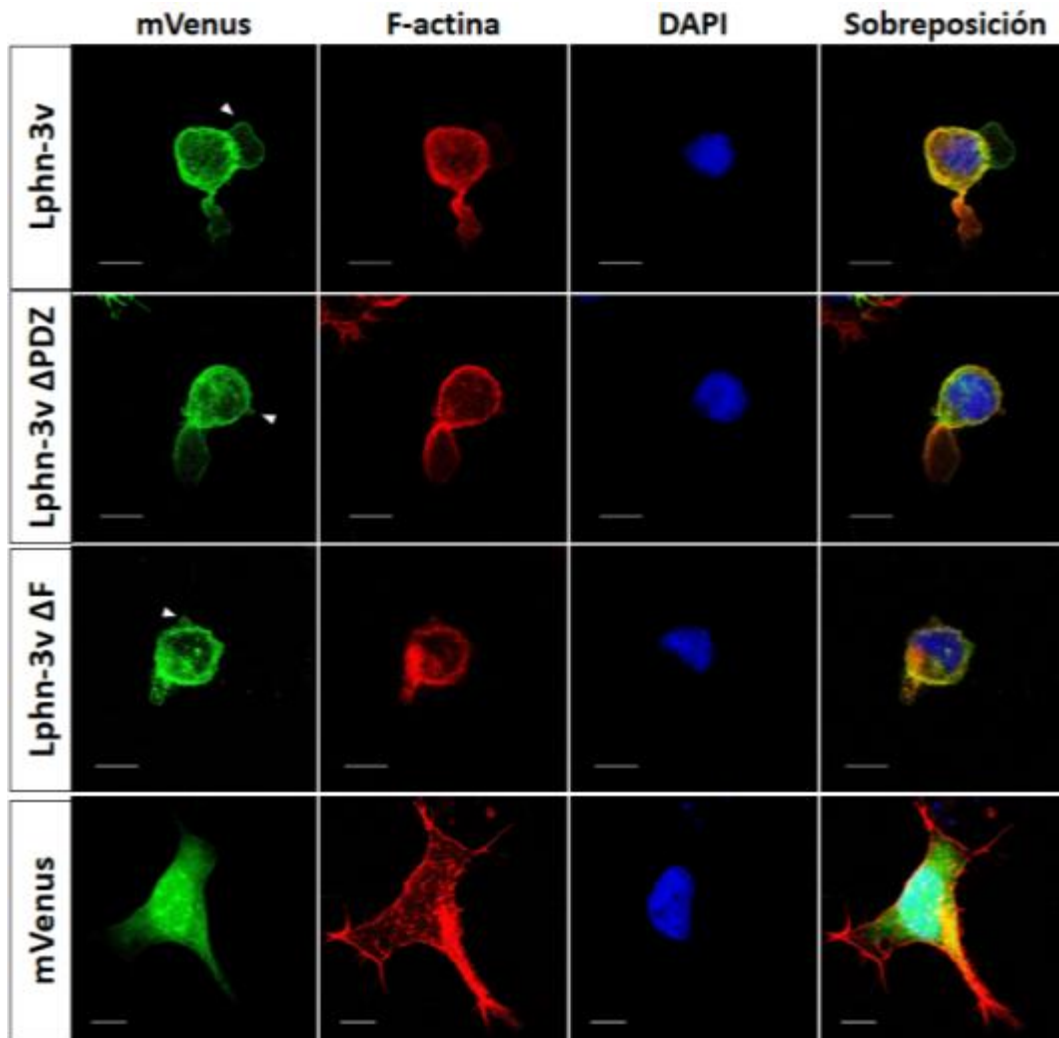


**Figura 24. Transfección de células HEK293T con las mutantes de Lphn-3v.** Imágenes de microscopía confocal panorámicas de células transfectadas después de 24 horas. En verde se observa la fluorescencia mVenus, en el canal rojo se muestra F-actina (tinción con rodamina-faloidina) y en azul los núcleos (tinción con DAPI). En la figura se muestra como ninguna de las mutaciones afectó la fluorescencia. La barra de escala representa 100  $\mu$ m.

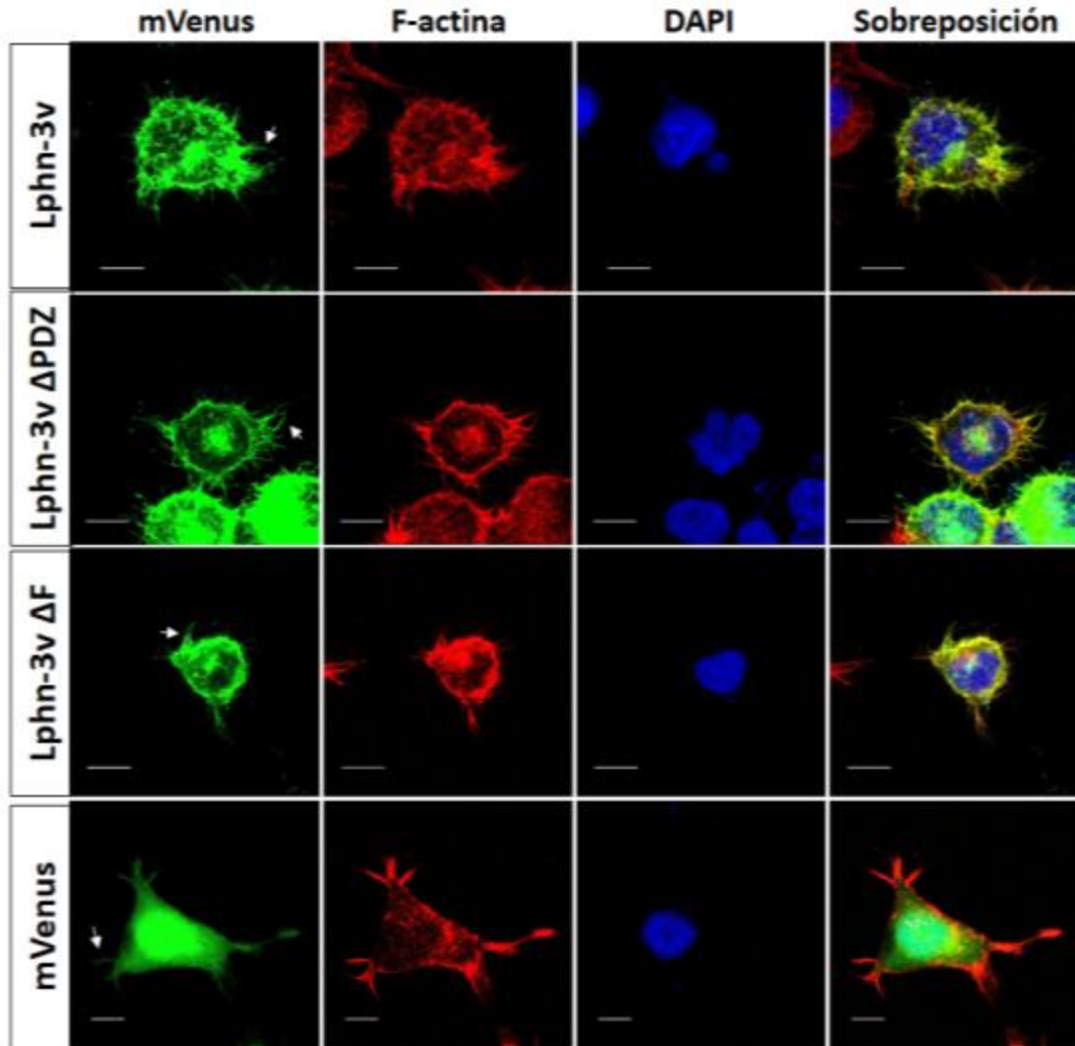
Además, como se observa en las Figuras 25 y 26 la expresión de Lphn-3v indujo una apariencia celular redondeada en comparación con la población que expresaba a mVenus. De acuerdo con los resultados, la expresión de esta isoforma generó la aparición de dos fenotipos predominantes, el primero de ellos se caracterizó por la formación de blebs en la membrana plasmática con ausencia de lamelipodios (Figura 25). En el segundo fenotipo a pesar de la apariencia esférica, la presencia de filopodios siguió siendo evidente (Figura 26). Los resultados aquí obtenidos también mostraron que la



expresión del receptor que carecía de los cinco aminoácidos de bmPDZ fue capaz de generar cambios morfológicos similares a los observados en la población con Lphn-3v. De igual manera se observó que la población celular que expresó Lphn-3v  $\Delta F$  presentó características semejantes a las de Lphn-3v y Lphn-3v  $\Delta PDZ$  (Figuras 25 y 26).



**Figura 25. Cambios morfológicos generados por la expresión de Lphn-3v y sus mutantes.** Imágenes obtenidas por microscopía confocal y representativas de la proyección máxima de las células HEK293T después de 48 horas de la transfección. En verde se muestra la fluorescencia de mVenus y de los receptores fusionados a mVenus, mientras que en rojo se muestra el citoesqueleto de actina (F-actina) y en azul los núcleos. En las imágenes se observa que la expresión de Lphn-3v y las mutantes Lphn-3v  $\Delta PDZ$ , Lphn-3v  $\Delta F$  da origen a la formación de blebs (cabeza de flecha) en la membrana plasmática. La barra de escala representa 10  $\mu m$ .



**Figura 26. La expresión de las mutantes de Lphn-3v no impide la formación de filopodios.** Imágenes obtenidas por microscopía confocal y representativas de la proyección máxima de las células HEK293T después de 48 horas de la transfección. En verde se muestra la fluorescencia de mVenus y de los receptores fusionados a mVenus, mientras que en rojo se muestra el citoesqueleto de actina (F-actina) y en azul los núcleos. En las imágenes se observa que las tres poblaciones transfectadas con los receptores Lphn-3 mantienen la presencia de filopodios (indicados con flechas). La barra de escala representa 10  $\mu$ m.

## 7. DISCUSIÓN

Posterior al descubrimiento de las Lphns, diversas investigaciones se han propuesto describir las funciones fisiológicas de estos receptores. Actualmente se ha reportado la participación de las Lphns en procesos como la formación de sinapsis y adhesión intercelular (Anderson et al., 2017, Boucard et al., 2012, Boucard et al., 2014). Por su parte, antecedentes directos obtenidos por nuestro grupo de trabajo, demostraron que la sobreexpresión de las Lphns induce cambios morfológicos en células HEK293T acompañados de la pérdida de estructuras de actina como lamelipodios y filopodios, sin embargo, aún se desconocen los mecanismos moleculares que subyacen estos efectos (Cruz-Ortega and Boucard, 2017).

Los receptores Lphn presentan una estructura altamente conservada entre ellos (Meza-Aguilar and Boucard, 2014). En su extremo C-terminal cuentan con un bmPDZ capaz de mediar interacciones con proteínas que presentan secuencias PDZ (Tobaben et al., 2000). Tomando en cuenta que existen evidencias claras de la relación entre proteínas con dominios PDZ y el citoesqueleto de actina (Banerjee and Wedegaertner, 2004, Garbett and Bretscher, 2012, MacGillavry et al., 2016), en este trabajo decidimos evaluar si la integridad del bmPDZ de las Lphns se asocia con las alteraciones morfológicas observadas previamente en células HEK293T.

En este proyecto nos enfocamos en la caracterización funcional del bmPDZ de Lphn-1v y Lphn-3v debido a que estas dos isoformas parecen tener efectos funcionales distintos sobre el citoesqueleto de actina. Por una parte, la sobreexpresión de las dos Lphns causan un redondeamiento celular, sin embargo, únicamente la isoforma 1 alteran tanto la formación de lamelipodios como la de filopodios, mientras la sobreexpresión de Lphn-3v solo afecta a los lamelipodios (Cruz-Ortega and Boucard, 2017).

Ahora bien, para determinar si los bmPDZ de Lphn-1 y 3v ejercen un efecto sobre el citoesqueleto de actina, decidimos utilizar dos estrategias

moleculares. La primera de ellas consistió en generar las construcciones de ambas isoformas que presentan la delección de los cinco aminoácidos que conforman el bmPDZ “ $\Delta$ PDZ” (Figura 11). Por otra parte, el segundo enfoque consistió en realizar la mutación de los residuos Thr $\rightarrow$ Val y Ser $\rightarrow$ Ala presentes en el bmPDZ “ $\Delta$ F” (Figura 11), estos cambios permitieron evaluar la funcionalidad del dominio de una forma menos radical que con las primeras construcciones ya que se mantuvo la longitud total de las proteínas y de esta manera se redujeron las posibilidades de causar cambios conformacionales drásticos. Cabe mencionar que estos residuos fueron elegidos ya que representan dos sitios de fosforilación conservados entre las Lphns (Meza-Aguilar and Boucard, 2014). De acuerdo con la literatura, las fosforilaciones son un tipo de modificación postraducional muy común en las proteínas y representan uno de los mecanismos más importantes para la regulación de su actividad (Cohen, 2000, Ardito et al., 2017). Aunado a esto, existen evidencias que sugieren que la fosforilación de aminoácidos presentes en el bmPDZ son capaces de inhibir las interacciones con otras proteínas (Chung et al., 2004, Walkup et al., 2016).

De acuerdo con los resultados de secuenciación obtenidos, las mutantes Lphn-1v  $\Delta$ PDZ, Lphn-1v  $\Delta$ F, Lphn-3v  $\Delta$ PDZ y Lphn-3v  $\Delta$ F fueron generadas de manera exitosa (Figuras 1, 2, 3 y 4 del anexo 1). Es importante mencionar que las construcciones se encuentran acopladas a la proteína fluorescente mVenus lo que facilitó la detección en los siguientes ensayos.

Al evaluar la expresión de las construcciones mediante western blot se detectó la forma no cortada para las dos isoformas de las Lphns, mostradas como bandas de un peso aparente superior a los 200 kDa en ambos casos. Además, la fracción CTF de las Lphn-1v y Lphn-3v también fue detectada, así como la de sus mutantes. En el caso de la Lphn-1v se observó la presencia de dos bandas detectadas en un rango de 75 a 100 kDa y dos adicionales minoritarias con pesos de ~60 y ~65 kDa (Figura 17A). Una de las bandas parece tener un peso aproximado de 85 kDa que corresponde al

peso esperado del CTF cuando el receptor sufre el corte autoproteolítico en el sitio GPS (Arac et al., 2012). Sin embargo, las demás bandas observadas con un peso por debajo de 85 kDa podrían ser producto de diferentes cortes proteolíticos llevados a cabo por otras proteínas, estos se generarían después del sitio GPS y en posiciones más cercanas al C-terminal de Lphn-1 como el corte reportado por Krasnoperov y colaboradores en 2009. Por su parte, la banda que se observó con un peso aproximado 90 kDa también podría ser producto de un corte generado por una proteína distinta a Lphn, aunque hasta el momento no existe algún reporte asociado a esto.

Desde otro punto de vista, cabe la posibilidad de que se trate del mismo fragmento generado por autoproteólisis y que el peso aparente sea producto de la adición de alguna modificación postraducciona. De acuerdo con la información reportada, Lphn-1 es blanco de varias modificaciones entre las que se encuentran fosforilaciones y ubiquitinaciones lo que soporta nuestra teoría anterior (PhosphoSite, 2018a).

En el caso de la Lphn-3v y sus variantes también se detectó al receptor no cortado con un peso aparente de ~207 kDa (Figura 17B). Para esta isoforma se encontraron cuatro bandas en un rango de peso de 75-100 kDa de las cuales una representa al fragmento esperado por el corte en el GPS y las demás, al igual que en el caso de Lphn-1, podrían ser fragmentos generados ya sea por otros cortes proteolítico o por la presencia de modificaciones postraduccionales del receptor en el CTF (PhosphoSite, 2018b, Meza-Aguilar and Boucard, 2014)

Es importante destacar que en todos los casos las mutantes  $\Delta$ PDZ y  $\Delta$ F mostraron el mismo patrón de bandas que Lphn-1v o Lphn-3v sugiriendo que las mutaciones no alteran la forma de procesamiento de los receptores. Por lo tanto, los efectos funcionales que se observen al expresar a cada variante deben ser atribuidos específicamente a las respectivas mutaciones (Figura 17).

La detección de Lphn-3v se realizó nuevamente ahora utilizando la bandera de HA presente en su primera asa extracelular. Al revelar los western blots se detectó la presencia del RNC y se observó nuevamente el patrón de cuatro bandas en un rango de peso de 75-100 kDa que representan la fracción CTF del receptor (18A). Al comparar la expresión de las variantes de Lphn-3v con la de tubulina se observó una tendencia que sugiere el aumento Lphn-3v  $\Delta$ PDZ y la disminución de Lphn-3v  $\Delta$ F en comparación con Lphn-3v (Figura 18B). Debido a que las muestras que utilizamos representan una fracción enriquecida de membrana, los resultados sugieren que las mutaciones realizadas en Lphn-3 pueden estar alterando la cantidad de la proteína presente en membrana; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Aunado a esto, los resultados deben ser tomados con precaución ya que nuestro control de carga no es el más adecuado puesto que tubulina no es una proteína de membrana, no obstante, fue posible detectarla ya que durante la obtención de proteínas se realizó una centrifugación a baja velocidad que permitió obtener la fracción que contenía las membranas y el citoesqueleto (Alberts et al., 2015).

Posteriormente, los resultados obtenidos mediante microscopía confocal confirmaron el fenotipo descrito para esta línea celular HEK293T (Figura 19). Las células mostraron una apariencia aplanada y una forma poligonal característica de las células epiteliales, además se detectó la presencia de lamelipodios y filopodios (ATCC, 2016). Posteriormente, las células fueron transfectadas con diferentes plásmidos y de acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 20, el método utilizado fue adecuado, permitiendo una buena expresión de los todos los receptores. Estos resultados también indican que el plegamiento proteico se llevó a cabo de manera correcta, puesto que las mutaciones no influyeron en la fluorescencia intrínseca de mVenus. Mientras que la Figura 21 se observó que posterior a la transfección, las células que expresaron a la proteína mVenus mantuvieron su morfología característica y conservaron las estructuras tipo lamelipodios y filopodios. Esto confirmó que ni la expresión de la proteína fluorescente, ni

que el proceso de transfección fueron capaces de alterar de manera importante nuestro sistema de estudio.

Por el contrario, los efectos de la expresión de Lphn-1v resultaron en un redondeamiento celular, una disminución de filopodios y lamelipodios, así como en la aparición de lobulaciones membranales, indicando que la presencia de este receptor conduce a la alteración del citoesqueleto de actina. Además, de manera sorprendente los resultados mostraron que la mutación de los residuos Thr/Ser y la delección del bmPDZ no fueron capaces de prevenir los efectos de la expresión de Lphn-1v en células HEK293T (Figuras 21 y 23).

Por su parte los resultados obtenidos tras cuantificar distintos parámetros celulares sugieren que la expresión de Lphn-1v condujo a la disminución del tamaño de las células y sus núcleos en comparación con las células que expresaron a mVenus, lo que coincidió con los resultados previamente obtenidos por Cruz-Ortega y Boucard en 2017. Además, el mismo efecto fue observado al comparar la población de mVenus con las de Lphn-1v  $\Delta$ PDZ y  $\Delta$ F (Figura 22). Sin embargo, cuando se compararon las poblaciones de Lphn-1v contra Lphn-1v  $\Delta$ PDZ no se observaron diferencias significativas de ningún parámetro (Figura 22), sugiriendo el que bmPDZ no es el responsable de inducir los cambios celulares causados por la expresión del receptor Lphn-1v. Resultados similares fueron obtenidos al evaluar la población que expresó Lphn-1v  $\Delta$ F para la cual únicamente se observó un ligero incremento del área celular respecto al área de las células con Lphn-1v, no obstante el incremento no fue suficiente para recuperar las dimensiones que presentó la población control (Figura 22). El hecho de que se haya observado una diferencia en algunos parámetros entre las construcciones de Lphn-1v  $\Delta$ PDZ y Lphn-1v  $\Delta$ F podría deberse a una variación intrínseca entre la población de células HEK293T. Tal y como se observó en la Figura 19 la morfología de cada célula no es exactamente igual y por ende sus dimensiones tampoco.

Por otro lado, después de evaluar la expresión de Lphn-3v se determinó que la eficiencia de transfección también fue adecuada para esta isoforma (Figura 24) y se corroboraron las observaciones previamente hechas por Cruz-Ortega y Boucard en 2017 demostrando que las células que expresaron a la proteína fluorescente mVenus mantuvieron su morfología clásica, mientras que, las poblaciones de Lphn-3v, Lphn-3v  $\Delta$ PDZ y Lphn-3v  $\Delta$ F mostraron alteraciones como la aparición de lobulaciones membranales (Figura 24). A pesar de que no podemos determinar si los resultados para esta isoforma son representativos de todas las poblaciones debido a la “n” insuficiente, si es posible mencionar que, de acuerdo a lo observado, las mutaciones del bmPDZ tampoco revierten por completo el fenotipo mostrado en las células HEK293T después de la sobreexpresión de la isoforma 3 de Lphn (Figuras 25 y 26).

Considerando que, las mutaciones de los aminoácidos Thr y Ser del bmPDZ evitan las fosforilaciones, lo cual favorece las interacciones proteicas mediadas por este dominio y que por el contrario la delección del bmPDZ impide que tales interacciones ocurran, nuestros resultados sugieren que las interacciones mediadas por el bmPDZ de Lphn-1v y Lphn-3v no influyen de manera importante sobre la remodelación del citoesqueleto de actina (Chung et al., 2004, Walkup et al., 2016, Tobaben et al., 2000).

Tomando en cuenta lo anterior, es lógico suponer que las alteraciones podrían ser consecuencia de procesos de señalización mediados por otra región del receptor. Datos publicados hasta el momento indican que las Lphns son capaces de acoplarse tanto a proteínas G $\beta$  como a G $\alpha$  y que este acoplamiento permite la activación de vías de señalización (Muller et al., 2015, Scholz et al., 2017, Li et al., 2018). Esto libera la posibilidad de que las Lphns puedan acoplarse a otras proteínas G $\alpha$  como las de la familia 12/13 involucradas con la activación de las GTPasas Rho y de esta manera inducir alteraciones sobre la morfología de células HEK293T, puesto que la actividad de estas GTPasas se encuentra relacionada con la remodelación del



citoesqueleto de actina, el redondeamiento celular y con la formación de blebs (Siehler, 2009, Sit and Manser, 2011, Lawrenson et al., 2002, Banerjee and Wedegaertner, 2004, Torres-Cruz et al., 2016, Ikenouchi and Aoki, 2017). Además se encuentra descrito que las células HEK293T expresan toda la maquinaria molecular asociada a la señalización con proteínas G (Atwood et al., 2011).

No obstante, resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo también han sugerido que la presencia del NTF de cada Lphn es suficiente para disminuir el tamaño de la célula y su núcleo, generando la posibilidad de que existan otros mecanismos que involucren a la fracción extracelular del receptor con el fenotipo inducido por la sobreexpresión de las Lphns (resultados no publicados por Cruz-Ortega, 2018). Lo anterior concuerda con el hecho que la delección del bmPDZ no revirtiera los efectos de Lphn-1v y Lphn-3v.

Finalmente, es posible que en realidad la función del bmPDZ esté más relacionada con la movilidad de las Lphns en la membrana plasmática o con la regulación de la cantidad de receptor en membrana y su tráfico, como ocurre con otros receptores (Haggie et al., 2004, Chung et al., 2004, Romero et al., 2011).

## 8. CONCLUSIONES

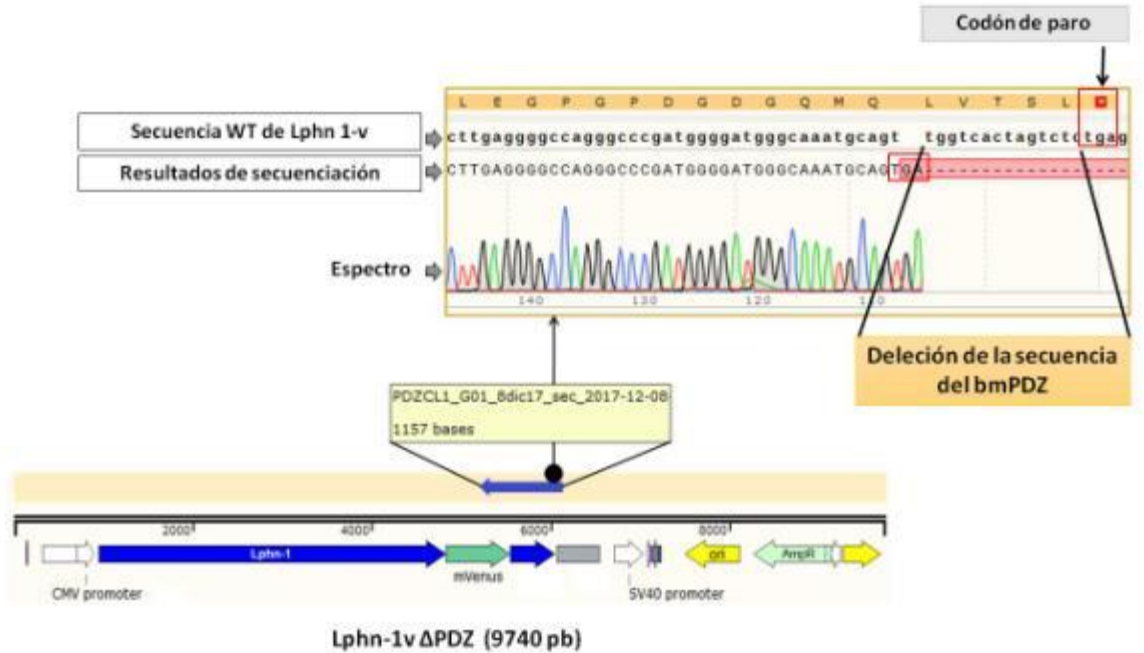
- Se logró la construcción de las mutantes  $\Delta$ PDZ y  $\Delta$ F a partir de las secuencias de Lphn-1v y Lphn-3v.
- Se determinó que la expresión y el procesamiento de Lphn-1v y Lphn-3v no se ven alterados por la delección del bmPDZ o la mutación de sus sitios de fosforilación.
- Nuestros resultados sugieren que el bmPDZ de Lphn-1v no ejerce un efecto funcional sobre la remodelación del citoesqueleto de actina en células HEK293T.
- La delección del bmPDZ y la mutación de sus residuos Thr/Ser no fueron capaces de prevenir las alteraciones morfológicas causadas por la sobreexpresión de Lphn-3v en células HEK293T.

## 9. PERSPECTIVAS

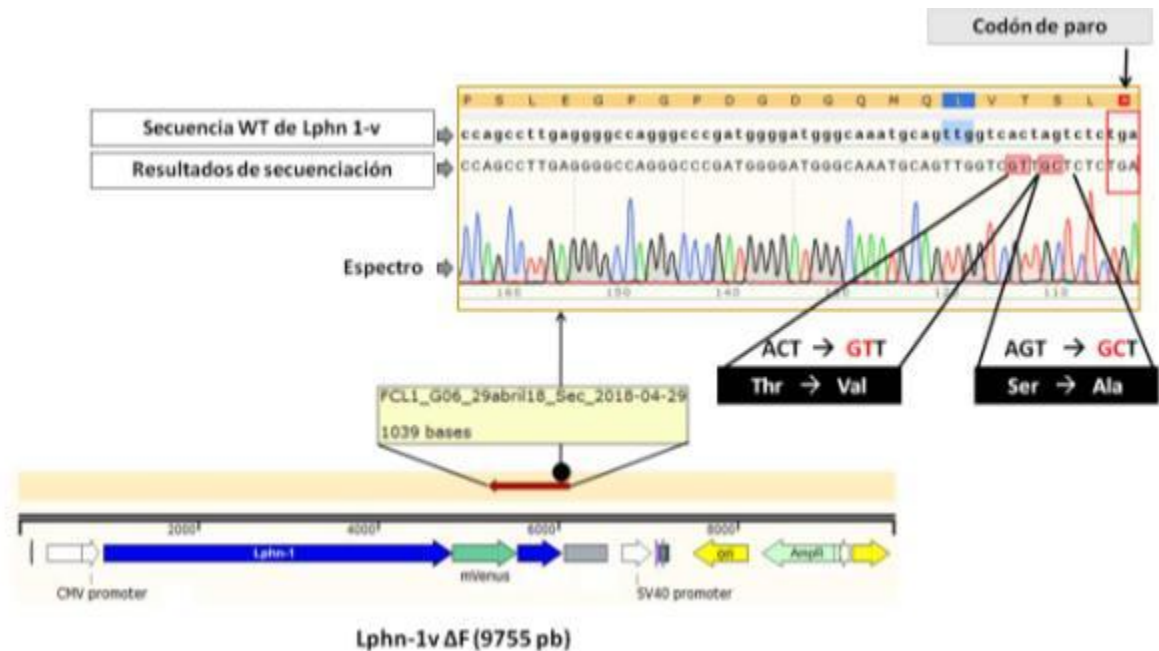
- ❖ Completar la n para evaluar de manera cuantitativa los efectos observados tras la expresión de Lphn-3v  $\Delta$ PDZ y de Lphn-3v  $\Delta$ F.
- ❖ Realizar el análisis de colocalización entre las mutantes Lphn-1v  $\Delta$ PDZ, Lphn-1v  $\Delta$ PDZ, Lphn-3v  $\Delta$ PDZ y Lphn-3v  $\Delta$ F y el citoesqueleto de actina.
- ❖ Analizar las células transfectadas con las mutantes de Lphn-1v y Lphn-3v mediante citometría de flujo para obtener resultados poblacionales.
- ❖ Medir los parámetros de remodelación de actina de las mutantes  $\Delta$ PDZ y  $\Delta$ F en un contexto de adhesión intercelular utilizando los ligandos extracelulares de Lphn.
- ❖ Evaluar la interacción entre las Lphns (o sus mutantes) y las moléculas con dominios PDZ.
- ❖ Generar las construcciones de Lphn-1v y Lphn-3v que imiten las fosforilaciones que ocurren en los residuos Thr y Ser del bmPDZ (pThr/Ser).
- ❖ Analizar el efecto de las mutantes de Lphn  $\Delta$ PDZ,  $\Delta$ F y pThr/Ser sobre la expresión en membrana de los receptores Lphn utilizando ensayos colorimétricos (tipo ELISA) o de biotinylation.
- ❖ Evaluar mediante inmunoprecipitación si actina sigue manteniendo su interacción con Lphn-1v y Lphn-3v después de la delección del bmPDZ o la mutación de sus sitios de fosforilación.
- ❖ Generar las construcciones Lphn-2v  $\Delta$ PDZ y Lphn-2v  $\Delta$ F y evaluar su efecto sobre el citoesqueleto de actina.

## 10. ANEXOS

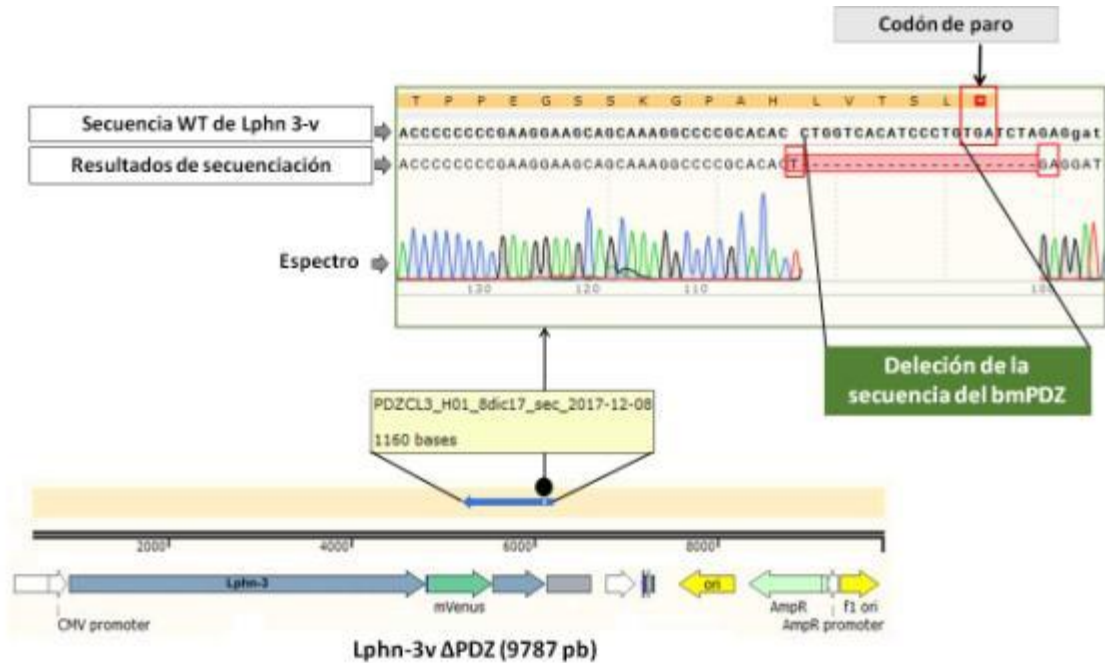
### Anexo 1. Resultados de secuenciación de las mutaciones de Lphn1v y Lphn-3v.



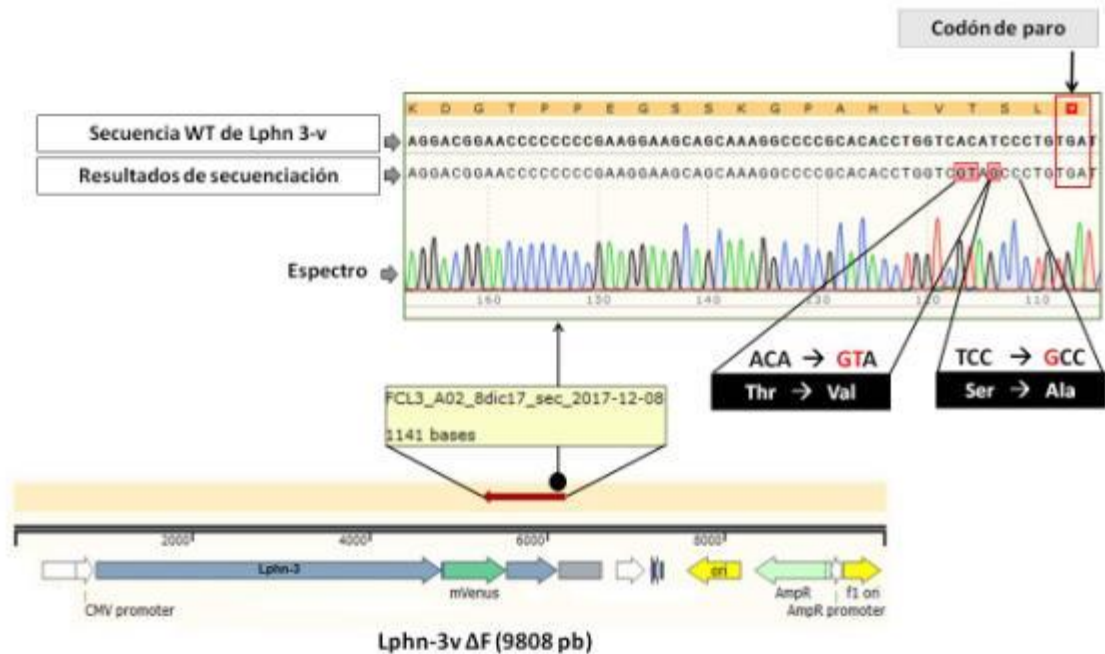
**Figura 1. Resultados de secuenciación para Lphn-1v ΔPDZ.** En la parte inferior se muestra la estructura del plásmido completo linearizado, así como los elementos que lo conforman. La región secuenciada fue de 1157 pb que comprenden las bases 5005-6162. En la parte superior de la figura se muestra la delección de la secuencia deseada y el desplazamiento del codón de paro.



**Figura 2. Resultados de secuenciación para Lphn-1v ΔF.** En la parte inferior se muestra la estructura del plásmido completo linearizado y los elementos que lo conforman. Se lograron secuenciar 1039 pb que comprenden las bases 5136-6175. En la parte superior de la figura se muestran las mutaciones generadas en la secuencia de nucleótidos dentro del bmPDZ para los sitios de fosforilación.



**Figura 3. Resultados de secuenciación para Lphn-3v ΔPDZ.** En la parte inferior se muestra la estructura del plásmido completo linearizado, así como los elementos que lo conforman. Se secuenciaron un total de 1160 pb que comprenden las bases 5048-6208. En la parte superior de la figura se observa la delección de la secuencia codificante para el bmPDZ, así como el desplazamiento del codón de paro.



**Figura 4. Resultados de secuenciación para Lphn-3v  $\Delta$ PDZ.** En la parte inferior se muestra la estructura del plásmido completo linearizado, así como los elementos que lo conforman. Un total de 1160 pb fueron secuenciadas, esta región comprende de la base 5136 a la 6175. En la parte superior de la figura se observan los cambios generados en la secuencia de nucleótidos que codificaban para Thr y Ser en el bmPDZ.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., MORGAN, D., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. 2015. *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science.
- ANDERSON, G. R., MAXEINER, S., SANDO, R., TSETSENIS, T., MALENKA, R. C. & SUDHOF, T. C. 2017. Postsynaptic adhesion GPCR latrophilin-2 mediates target recognition in entorhinal-hippocampal synapse assembly. *J Cell Biol*, 216, 3831-3846.
- ARAC, D., BOUCARD, A. A., BOLLIGER, M. F., NGUYEN, J., SOLTIS, S. M., SUDHOF, T. C. & BRUNGER, A. T. 2012. A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoprolysis. *EMBO J*, 31, 1364-78.
- ARCOS-BURGOS, M., JAIN, M., ACOSTA, M. T., SHIVELY, S., STANESCU, H., WALLIS, D., DOMENE, S., VELEZ, J. I., et al. 2010. A common variant of the latrophilin 3 gene, LPHN3, confers susceptibility to ADHD and predicts effectiveness of stimulant medication. *Mol Psychiatry*, 15, 1053-66.
- ARDITO, F., GIULIANI, M., PERRONE, D., TROIANO, G. & LO MUZIO, L. 2017. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med*, 40, 271-280.
- ATCC 2016. (HEK293T) ATCC CRL-3216™. <https://www.atcc.org/en/Products/All/CRL-3216.aspx#characteristics>.
- ATWOOD, B. K., LOPEZ, J., WAGER-MILLER, J., MACKIE, K. & STRAIKER, A. 2011. Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. *BMC Genomics*, 12, 14.
- BANERJEE, J. & WEDEGAERTNER, P. B. 2004. Identification of a novel sequence in PDZ-RhoGEF that mediates interaction with the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell*, 15, 1760-75.
- BJARNADOTTIR, T. K., FREDRIKSSON, R. & SCHIOTH, H. B. 2007. The adhesion GPCRs: a unique family of G protein-coupled receptors with important roles in both central and peripheral tissues. *Cell Mol Life Sci*, 64, 2104-19.
- BLANCHOIN, L., BOUJEMAA-PATERSKI, R., SYKES, C. & PLASTINO, J. 2014. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev*, 94, 235–263.
- BOUCARD, A. A., KO, J. & SUDHOF, T. C. 2012. High affinity neurexin binding to cell adhesion G-protein-coupled receptor C1RL1/latrophilin-1 produces an intercellular adhesion complex. *J Biol Chem*, 287, 9399-413.
- BOUCARD, A. A., MAXEINER, S. & SUDHOF, T. C. 2014. Latrophilins function as heterophilic cell-adhesion molecules by binding to teneurins: regulation by alternative splicing. *J Biol Chem*, 289, 387-402.
- BRUXEL, E. M., SALATINO-OLIVEIRA, A., AKUTAGAVA-MARTINS, G. C., TOVO-RODRIGUES, L., GENRO, J. P., ZENI, C. P., POLANCZYK, G. V., CHAZAN, R., SCHMITZ, M., ARCOS-BURGOS, M., ROHDE, L. A. & HUTZ, M. H. 2015. LPHN3 and attention-deficit/hyperactivity disorder: a susceptibility and pharmacogenetic study. *Genes Brain Behav*, 14, 419-27.
- CALABRESE, B., WILSON, M. S. & HALPAIN, S. 2006. Development and regulation of dendritic spine synapses. *Physiology (Bethesda)*, 21, 38-47.
- COHEN, P. 2000. The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. *Trends Biochem Sci*, 25, 596-601.
- CRUZ-ORTEGA, N. J. & BOUCARD, A. 2017. *Evaluación de los Cambios morfológicos y en el citoesqueleto de actina inducidos por los GPCR de adhesión Latrofilina en células HEK293T*. Maestría en ciencias con especialidad en Biología Celular, CINVESTAV, Mex.
- CHUNG, H. J., HUANG, Y. H., LAU, L. F. & HUGANIR, R. L. 2004. Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J Neurosci*, 24, 10248-59.
- DAVLETOV, B. A., SHAMOTIENKO, O. G., LELIANOVA, V. G., GRISHIN, E. V. & USHKARYOV, Y. A. 1996. Isolation and Biochemical Characterization of a Ca<sup>2+</sup>

- independent  $\alpha$ -Latrotoxin-binding Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 23239-2324.
- FAIZ, A., DONOVAN, C., NIEUWENHUIS, M. A., VAN DEN BERGE, M., POSTMA, D. S., YAO, S., PARK, C. Y., HIRSCH, R., FREDBERG, J. J., TJIN, G., HALAYKO, A. J., REMPEL, K. L., WARD, J. P., LEE, T., BOSSE, Y., NICKLE, D. C., OBEIDAT, M., VONK, J. M., BLACK, J. L., OLIVER, B. G., KRISHNAN, R., MCPARLAND, B., BOURKE, J. E. & BURGESS, J. K. 2017. Latrophilin receptors: novel bronchodilator targets in asthma. *Thorax*, 72, 74-82.
- FREDRIKSSON, R., LAGERSTROM, M. C., LUNDIN, L. & SHCIOTH, H. B. 2003. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetics Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol Pharmacol*, 63, 1256-1272.
- GARBETT, D. & BRETSCHER, A. 2012. PDZ interactions regulate rapid turnover of the scaffolding protein EBP50 in microvilli. *J Cell Biol*, 198, 195-203.
- HAGGIE, P. M., STANTON, B. A. & VERKMAN, A. S. 2004. Increased diffusional mobility of CFTR at the plasma membrane after deletion of its C-terminal PDZ binding motif. *J Biol Chem*, 279, 5494-500.
- HSU, Y. C., YUAN, S., CHEN, H. Y., YU, S. L., LIU, C. H., HSU, P. Y., WU, G., LIN, C. H., CHANG, G. C., LI, K. C. & YANG, P. C. 2009. A four-gene signature from NCI-60 cell line for survival prediction in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 15, 7309-15.
- IKENOUCI, J. & AOKI, K. 2017. Membrane bleb: A seesaw game of two small GTPases. *Small GTPases*, 8, 85-89.
- 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 Res Treat*, 48, 676-86.
- KAN, Z., JAISWAL, B. S., STINSON, J., JANAKIRAMAN, V., BHATT, D., STERN, H. M., YUE, P., et al. 2010. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature*, 466, 869-73.
- KREIENKAMP, H. J., ZITZER, H., GUNDELFINGER, E. D., RICHTER, D. & BOCKERS, T. M. 2000. The calcium-independent receptor for alpha-latrotoxin from human and rodent brains interacts with members of the ProSAP/SSTRIP/Shank family of multidomain proteins. *J Biol Chem*, 275, 32387-90.
- LANGENHAN, T., PIAO, X. & MONK, K. R. 2016. Adhesion G protein-coupled receptors in nervous system development and disease. *Nat Rev Neurosci*, 17, 550-61.
- LAWRENSON, I. D., WIMMER-KLEIKAMP, S. H., LOCK, P., SCHOENWAEELDER, S. M., DOWN, M., BOYD, A. W., ALEWOOD, P. F. & LACKMANN, M. 2002. Ephrin-A5 induces rounding, blebbing and de-adhesion of EphA3-expressing 293T and melanoma cells by CrkII and Rho-mediated signalling. *Journal of Cell Science*, 115, 1059-1072.
- LEE, H. J. & ZHENG, J. J. 2010. PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Commun Signal*, 8, 8.
- LI, J., SHALEV-BENAMI, M., SANDO, R., JIANG, X., KIBROM, A., WANG, J., LEON, K., KATANSKI, C., NAZARKO, O., LU, Y. C., SUDHOF, T. C., SKINIOTIS, G. & ARAC, D. 2018. Structural Basis for Teneurin Function in Circuit-Wiring: A Toxin Motif at the Synapse. *Cell*, 173, 735-748 e15.
- MACGILLAVRY, H. D., KERR, J. M., KASSNER, J., FROST, N. A. & BLANPIED, T. A. 2016. Shank-cortactin interactions control actin dynamics to maintain flexibility of neuronal spines and synapses. *Eur J Neurosci*, 43, 179-93.
- MARTINEZ, A. F., MUENKE, M. & ARCOS-BURGOS, M. 2011. From the black widow spider to human behavior: Latrophilins, a relatively unknown class of G protein-coupled receptors, are implicated in psychiatric disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 156B, 1-10.
- MEZA-AGUILAR, D. G. & BOUCARD, A. A. 2014. Latrophilins updated. *Biomol Concepts*, 5, 457-78.



- MONTEIRO, P. & FENG, G. 2017. SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci*, 18, 147-157.
- MULLER, A., WINKLER, J., FIEDLER, F., SASTRADIHARDJA, T., BINDER, C., SCHNABEL, R., KUNDEL, J., ROTHEMUND, S., HENNIG, C., SCHONEBERG, T. & PROMEL, S. 2015. Oriented Cell Division in the *C. elegans* Embryo Is Coordinated by G-Protein Signaling Dependent on the Adhesion GPCR LAT-1. *PLoS Genet*, 11, e1005624.
- PAAVOLA, K. J. & HALL, R. A. 2012. Adhesion G protein-coupled receptors: signaling, pharmacology, and mechanisms of activation. *Mol Pharmacol*, 82, 777-83.
- PALUCH, E. K. & RAZ, E. 2013. The role and regulation of blebs in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 25, 582-90.
- PHOSPHOSITE 2018a. Adhesion G protein-coupled receptor L1. <https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=23379&showAllSites=true>: Cell Signaling Technology.
- PHOSPHOSITE 2018b. Adhesion G protein-coupled receptor L3. <https://www.phosphosite.org/proteinAction?id=10367&showAllSites=true>: Cell Signaling Technology.
- ROMERO, G., VON ZASTROW, M. & FRIEDMAN, P. A. 2011. Role of PDZ proteins in regulating trafficking, signaling, and function of GPCRs: means, motif, and opportunity. *Adv Pharmacol*, 62, 279-314.
- ROSENBAUM, D. M., RASMUSSEN, S. G. & KOBILKA, B. K. 2009. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459, 356-63.
- SAROWAR, T. & GRABRUCKER, A. M. 2016. Actin-Dependent Alterations of Dendritic Spine Morphology in Shankopathies. *Neural Plast*, 2016, 8051861.
- SCHOLZ, N., GUAN, C., NIEBERLER, M., GROTEMEYER, A., MAIELLARO, I., GAO, S., BECK, S., PAWLAK, M., SAUER, M., ASAN, E., ROTHEMUND, S., WINKLER, J., PRÖMEL, S., NAGEL, G., LANGENHAN, T. & KITTEL, R. J. 2017. Mechano-dependent signaling by Latrophilin/CIRL quenches cAMP in proprioceptive neurons. *eLife*, 6, e28360.
- SIEHLER, S. 2009. Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *Br J Pharmacol*, 158, 41-9.
- SILVA, J. P., LELIANOVA, V. G., ERMOLYUK, Y. S., VYSOKOV, N., HITCHEN, P. G., BERNINGHAUSEN, O., RAHMAN, M. A., ZANGRANDI, A., FIDALGO, S., TONEVITSKY, A. G., DELL, A., VOLYNSKI, K. E. & USHKARYOV, Y. A. 2011. Latrophilin 1 and its endogenous ligand Lasso/teneurin-2 form a high-affinity transsynaptic receptor pair with signaling capabilities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 12113-8.
- SIT, S. T. & MANSER, E. 2011. Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, 124, 679-83.
- SUMBAYEV, V. V., GONCALVES SILVA, I., BLACKBURN, J., GIBBS, B. F., YASINSKA, I. M., GARRETT, M. D., TONEVITSKY, A. G. & USHKARYOV, Y. A. 2016. Expression of functional neuronal receptor latrophilin 1 in human acute myeloid leukaemia cells. *Oncotarget*, 7, 45575-45583.
- TOBABEN, S., SUDHOF, T. C. & STAHL, B. 2000. The G protein-coupled receptor CL1 interacts directly with proteins of the Shank family. *J Biol Chem*, 275, 36204-10.
- TORRES-CRUZ, F. M., RODRIGUEZ-CRUZ, F., ESCOBAR-HERRERA, J., BARRAGAN-ANDRADE, N., BASURTO-ISLAS, G., RIPOVA, D., AVILA, J. & GARCIA-SIERRA, F. 2016. Expression of Tau Produces Aberrant Plasma Membrane Blebbing in Glial Cells Through RhoA-ROCK-Dependent F-Actin Remodeling. *J Alzheimers Dis*, 52, 463-82.
- VAZQUEZ-VICTORIO, G., GONZALEZ-ESPINOSA, C., ESPINOSA-RIQUER, Z. P. & MACIAS-SILVA, M. 2016. GPCRs and actin-cytoskeleton dynamics. *Methods Cell Biol*, 132, 165-88.
- WALKUP, W. G., MASTRO, T. L., SCHENKER, L. T., VIELMETTER, J., HU, R., IANCU, A., REGHUNATHAN, M., BANNON, B. D. & KENNEDY, M. B. 2016. A model for regulation by SynGAP-alpha1 of binding of synaptic proteins to PDZ-domain 'Slots' in the postsynaptic density. 5.

- WEILL MEDICAL COLLEGE OF CORNELL UNIVERSITY 2004. PDZBase. n.d. ed. <https://abc.med.cornell.edu/pdzbase/allinteractions>.
- YONA, S., LIN, H. H., SIU, W. O., GORDON, S. & STACEY, M. 2008. Adhesion-GPCRs: emerging roles for novel receptors. *Trends Biochem Sci*, 33, 491-500.
- ZHANG, S., LIU, Y., LIU, Z., ZHANG, C., CAO, H., YE, Y., WANG, S., ZHANG, Y., XIAO, S., YANG, P., LI, J. & BAI, Z. 2014. Transcriptome profiling of a multiple recurrent muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder by deep sequencing. *PLoS One*, 9, e91466.
- ZUKO, A., OGURO-ANDO, A., POST, H., TAGGENBROCK, R. L., VAN DIJK, R. E., ALTELAAR, A. F., HECK, A. J., PETRENKO, A. G., VAN DER ZWAAG, B., SHIMODA, Y., PASTERKAMP, R. J. & BURBACH, J. P. 2016. Association of Cell Adhesion Molecules Contactin-6 and Latrophilin-1 Regulates Neuronal Apoptosis. *Front Mol Neurosci*, 9, 143.