



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**“Estudio de los mecanismos involucrados en la
remodelación del citoesqueleto de actina inducida por las
Latrofilinas 1,2 y 3”**

TESIS

Que presenta:

M. en C. NORMA JUDITH CRUZ ORTEGA

Para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOLOGÍA CELULAR

Director de la Tesis:
Dr. Antony Boucard Jr.

Ciudad de México

Julio, 2022

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

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 481488 brindada para la realización del Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biología Celular.

A mi familia:



Gracias por existir

CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE TABLAS	IV
RESUMEN	V
1. MARCO TEÓRICO	13
1.1 Formación y establecimiento de las sinapsis	14
1.2 Receptores acoplados a proteínas G	21
1.3 GPCRs de adhesión	24
1.4 Latrofilina	26
2. JUSTIFICACIÓN	28
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVOS	29
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos específicos	29
5. MATERIALES	30
5.1 Cepas bacterianas	30
5.2 Líneas celulares	30
5.3 Plásmidos	30
5.4 Anticuerpos y reactivos.	32
5.5 Soluciones experimentales	33

6. MÉTODOS	36
6.1 Estrategia experimental general	36
6.2 Amplificación de ADN plasmídico.	36
6.2.1 Transformación de bacterias competentes	36
6.2.2 Extracción de ADN plasmídico	37
6.2.3 Purificación de ADN plasmídico	37
6.3 Cultivo celular y Transfección por el método de Polietilenimina	38
6.4 Análisis por citometría de flujo	39
6.5 Western Blot.	39
6.6 Inmunocitoquímica	39
6.7 Microscopia confocal y análisis de las imágenes	40
6.8 Co- Inmunoprecipitación	41
6.9 Estimulación con ligandos endógenos en procesos de adhesión intercelular	42
6.10 Incubación con PTX	42
6.11 Análisis estadístico	42
7. RESULTADOS	44
7.1 Caracterización del sistema de estudio	44
7.2 Latrofilina provoca redondeamiento con disminución de las dimensiones celulares	46
7.3 Latrofilina modifica la presencia de estructuras dependientes de actina	49

7.4 Latrofilina interactúa físicamente con F-actina	50
7.5 El extremo CTF de Latrofilina es necesario para estabilizar su interacción funcional y física con el citoesqueleto de actina	52
7.6 Latrofilina activada por ligando en procesos de adhesión celular modula la remodelación en el citoesqueleto de actina	54
7.7 El factor de despolimerización de actina Cofilina participa en la señalización de Latrofilina que promueve la remodelación del citoesqueleto de actina.	55
7.8 La señalización por G α i participa en la remodelación del citoesqueleto de actina inducida por la Lphn1 y 3.	58
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	62
9. CONCLUSIONES	74
10. PERSPECTIVAS	75
11. REFERENCIAS	76
12. ANEXOS	81

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje
7TM	7 Transmembrane
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Agua mQ	Agua miliQ
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
CAMs	Cell Adhesion Molecules
CTF	C-Terminal Fragment
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético
EGF	Epidermal Growth Factor
EphB2	Ephb2 Eph receptor B2
g	Gramo
GAIN	GPCR Autoproteolysis Inducing
GPCR	G Protein Coupled Receptor
GPS	GPCR Proteolytic Site
Kb	Kilobases
kDa	Kilo Daltones
L	Litro
LB	Luria Bertani
LNS	Laminin, nectin, sex-hormone binding globulin
mEPSC	Miniature Excitatory Postsynaptic Currents

mM	Milimolar
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NCAMs	Neural Cell Adhesion Molecules
ng	nanogramos
NMDA	N-methyl-D-aspartate
Nrxn	Neurexina
NTF	N-Terminal Fragment
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PEI	Polietilenimina
pH	Potencial de Hidrógeno
PPF	Paired-pulse facilitation
SDS	Sodium dodecyl sulfat
SFB	Suero fetal bovino
SOB	Super optimal broth
TDH	Trastorno de Déficit de Atención por Hiperactividad
Ten	Teneurina
TLCN	Telencephalin
µg	Microgramo
µL	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Papiro Egipcio	13
Figura 2	Visión general de las sinapsis	14
Figura 3	Representación esquemática de la estructura básica de los GPCRs	21
Figura 4	Clasificación de la superfamilia de los GPCRs	23
Figura 5	Mecanismos de activación de los aGPCRs	25
Figura 6	Representación esquemática de los dominios de Latrofilina	26
Figura 7	Expresión de las Latrofilinas en células HEK293T	44
Figura 8	Caracterización por citometría de flujo del sistema celular transfectado	46
Figura 9	Efecto sobre la morfología celular de Latrofilina sobre expresada	47
Figura 10	La sobre expresión de Latrofilina aumenta el volumen y la complejidad celular	48
Figura 11	Reordenamiento de las estructuras dependientes de actina por la sobreexpresión de Latrofilina	49
Figura 12	Interacción física de Latrofilina con F-Actina	51
Figura 13	La interacción funcional entre latrofilina y el citoesquelto de actina se desestabiliza sin el extremo CTF de Latroflina	53
Figura 14	La interacción física latrofilina – F-actina se desestabiliza en ausencia del CTF de latrofilina	54
Figura 15	Activación de Latrofilina por Teneurina 4 y su efecto sobre el citoesqueleto de actina	56
Figura 16	Activación de cofilina por la sobreexpresión de Latrofilina	58

Figura 17	Efecto de la inhibición de Gai sobre las dimensiones celulares en presencia de Latrofilina	59
Figura 18	Efecto de la inhibición de Gai sobre la dinámica de las estructuras celulares dependientes de actina reguladas por la sobreexpresión de Latrofilina	60
Figura 19	El tallo citoplasmático del CTF de las Latrofilinas es la región con mayor variabilidad entre isoformas	63
Figura 20	Fosforilaciones del CTF de Lphn.	64
Figura 21	La sobre expresión de Lphn reduce el área y el perímetro celular	66
Figura 22	Interacción física de Lphn con actina	72
Figura 23	Mecanismos moleculares del efecto de Latrofilina sobre el citoesqueleto de actina	74
Figura 24	Fotos panorámicas del efecto de sobre expresión de Lphn sobre el citoesqueleto de actina	83
Figura 25	Evaluación de la participación de Gai en la dinámica de cofilina tras la sobre expresión de Latrofilina.	84
Figura 26	Evaluación de la participación de GTPasas pequeñas en la dinámica de cofilina tras la sobre expresión de Lphn 1	86
Figura 27	Evaluación de la participación de GTPasas pequeñas en la dinámica de cofilina tras la sobre expresión de Lphn 2	87
Figura 28	Evaluación de la participación de GTPasas pequeñas en la dinámica de cofilina tras la sobre expresión de Lphn 3	88
Figura 29	Enriquecimiento de Actina Globular y filamentosa	90
Figura 30	La sobreexpresión de otras proteínas no afecta la morfología de las células HEK293T	91

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Anticuerpos	32
Tabla 2	Reactivos	33
Tabla 3	Preparación de soluciones	33

RESUMEN

Las latrofilinas representan un subgrupo de la familia de receptores acoplados a proteína G de adhesión, mismos que se unen a proteínas de andamiaje asociadas a actina. Se expresan en varios tejidos, lo que sugiere que podrían participar en procesos biológicos ubicuos. En el presente trabajo nos centramos en la dinámica del citoesqueleto de actina para explorar el papel de las latrofilinas en las células de mamíferos. La sobreexpresión individual de cada isoforma de latrofilina aumentó comparativamente el volumen celular mientras modificaba el perfil neto de las extensiones celulares dependientes de F-actina, según lo evaluado por análisis de microscopía confocal. Los estudios con mutantes de latrofilina generados por delección de sus asas transmembranales y tallo citoplasmático, zonas que contienen dominios necesarios para el acoplamiento funcional o estructural a la maquinaria de señalización intracelular, evidenciaron que estos fragmentos son necesarios para modular las extensiones del citoesqueleto de actina estudiadas. La asociación entre latrofilinas y el citoesqueleto de actina se detectó mediante ensayos de co-inmunoprecipitación y se corroboró con análisis de inmunocitoquímica. De acuerdo con la desestabilización de las estructuras de F-actina, se identificó que las isoformas de latrofilina indujeron constitutivamente un aumento prominente en la actividad de cofilina, factor de despolimerización de actina. Los eventos de adhesión intercelular estabilizados por las interacciones trans-heterofílicas de Teneurina-4 interrumpieron la colocalización de latrofilina con F-actina y condujeron a un rescate de extensiones celulares específico de cada isoforma. Por lo tanto, encontramos que la maquinaria del citoesqueleto de actina constituye un componente importante de la señalización constitutiva e inducida por ligando para las latrofilinas.

SUMMARY

Latrophilins are a subgroup of the adhesion G protein-coupled receptor family, which bind to actin-associated scaffolding proteins, and they are expressed in various tissues, suggesting that they might participate in biological processes that are ubiquitous. In the present work we focus on the dynamics of the actin cytoskeleton to explore the role of latrophilins in mammalian cells. Individual overexpression of each latrophilin isoform comparably increased cell volume while modifying the net profile of F-actin-dependent cell extensions, as evaluated by confocal microscopy analysis. Deletion mutants of latrofilin evidenced that direct coupling to the intracellular machinery was a requirement for modulating actin depending cell structures. The physical interaction between latrophilins and the actin cytoskeleton was detected by co-immunoprecipitation assays and corroborated with immunocytochemistry analysis. Consistent with the destabilization of F-actin structures, latrophilin isoforms constitutively induced a prominent increase in the activity of actin depolymerizing factor, cofilin. Intercellular adhesion events stabilized by heterophilic Teneurin-4 trans-interactions disrupted latrophilin colocalization with F-actin and led to an isoform-specific rescue of cell extensions. Thus, we found that the actin cytoskeleton and associated cellular elements constitute important components of constitutive and ligand-induced signaling of latrophilins.

1. MARCO TEÓRICO

Desde la antigüedad, el hombre se ha preocupado por el estudio de la medicina y la anatomía, incluyendo las bases del comportamiento humano.

El primer registro conocido sobre la palabra “cerebro” data de un antiguo papiro Egipcio transcrito en 1930 por James Breasted , en el que se hace referencia a este órgano 8 veces en 6 de sus páginas y describe síntomas, diagnóstico y pronóstico de dos pacientes con fracturas de cráneo y compara la superficie del cerebro () con *"ondas que se observan en el cobre durante su fundición, con una cosa que palpita bajo tus dedos como el punto débil de la coronilla de un niño antes de que se convierta en un todo para él."* La tinta roja resalta las dolencias de los pacientes y sus pronósticos (Figura 1.) (Kandel; 1191).

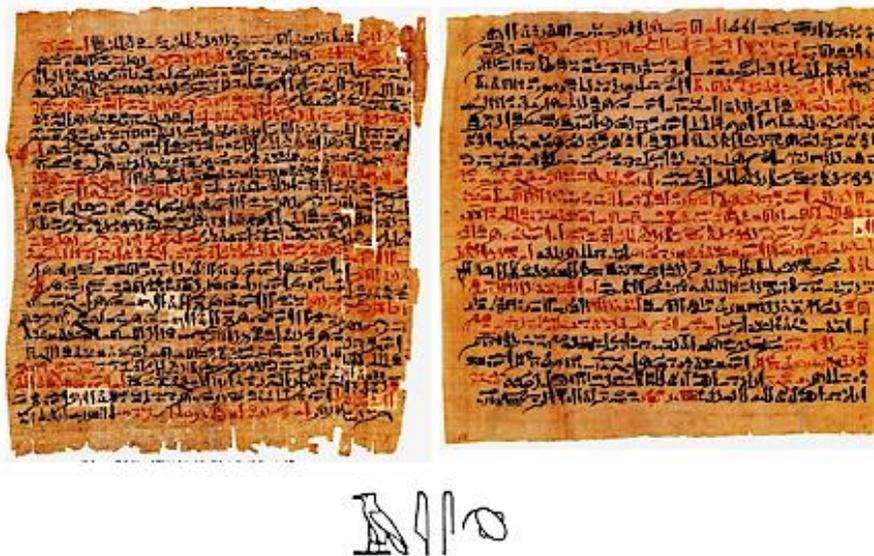


Figura 1. Papiro Egipcio. Papiro localizado en Egipto donde se refiere por primera vez la palabra “cerebro”. Fuente: Principios de neurociencia. Eric Kandel. 5ta. Edición.

Actualmente sabemos que el cerebro trabaja como una compleja red de comunicación neuronal en conjunción con otras células, a continuación, se relatan los eventos generales por lo que este proceso tiene lugar.

1.1 Formación y establecimiento de las sinapsis

El sistema nervioso funciona a través de patrones específicos de conectividad neuronal y su función depende de la precisión con la que se forman; por lo tanto, para comprender cuales redes neurales ejecutan funciones senso-motoras y finalmente producen acciones o pensamientos primero debemos observar el nivel estructural básico de la intersección neurona-neurona: *la sinapsis*.

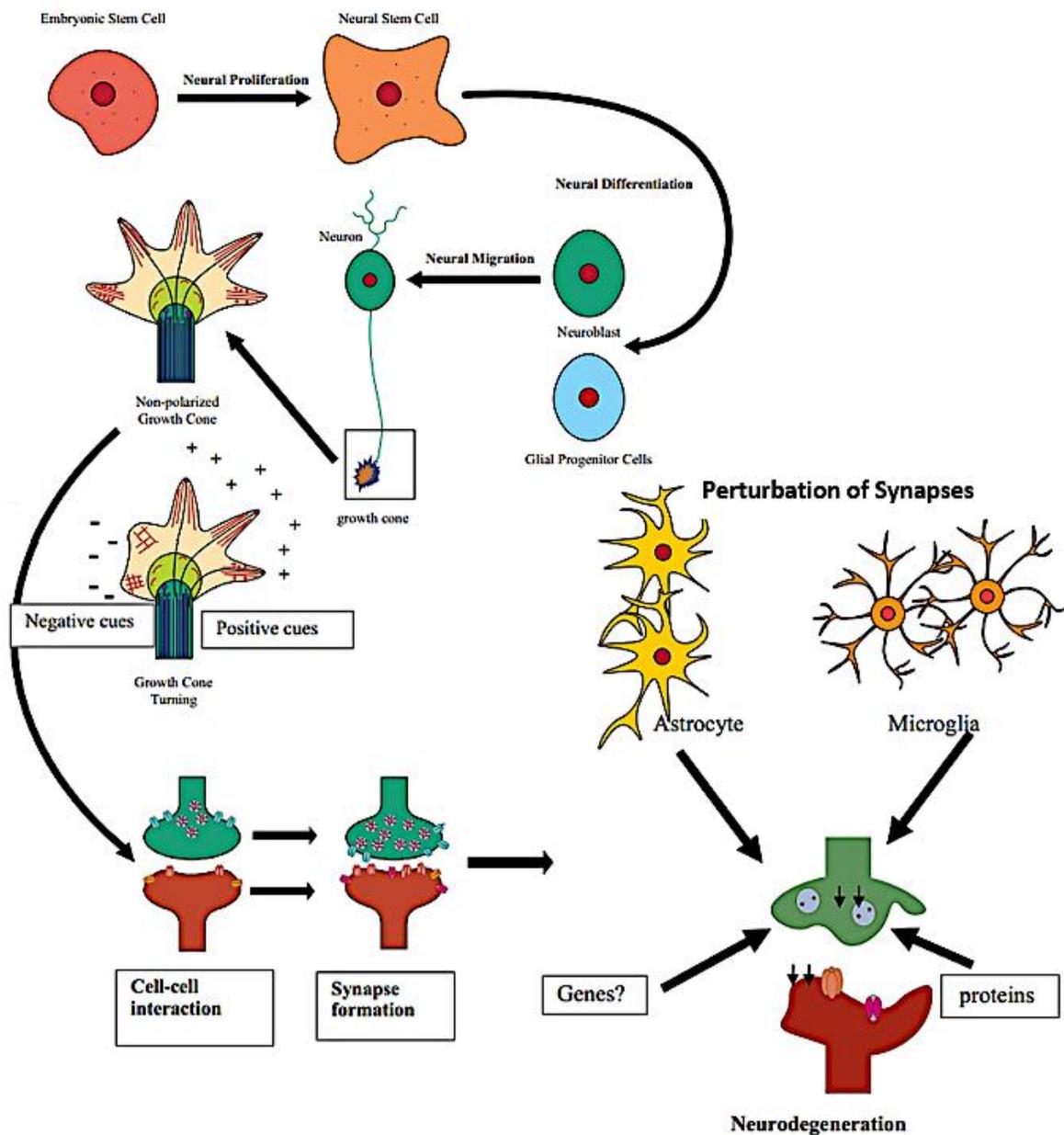


Figura 2. Visión general de las sinapsis

El término "sinapsis" denota una unidad estructural y funcional de una neurona a través de la cual todas las comunicaciones neuronales toman lugar.

El primer elemento del proceso sináptico, la zona presináptica activa, una separación física de ~ 20 μm , se compone de un conjunto de proteínas conservadas evolutivamente, incluyendo RIM, Munc13, RIM-BP, α -liprin, y ELKS. (Weinstock et al.;1983). Este complejo proteico se encarga de organizar el acoplamiento de vesículas y su liberación en la hendidura sináptica (el espacio entre las terminales presinápticas y postsinápticas), así como cumple una función muy importante en el posicionamiento adecuado de la densidad postsináptica a través de interacciones con otras proteínas presentes en la sinapsis (Ohtsuka 2015).

La zona activa presináptica es la única parte de la membrana de la zona presináptica que participa en la preparación de vesículas que liberan neurotransmisores necesarios por exocitosis en la hendidura sináptica, convirtiendo efectivamente la señal eléctrica recibida en la terminal presináptica (despolarización) en una señal química (neurotransmisores). Los neurotransmisores se liberan en la hendidura donde se difunden para unirse a sus receptores postsinápticos correspondientes. Una vez que el neurotransmisor apropiado se une a su receptor, los canales acoplados a él se abrirán y causarán una despolarización o una hiperpolarización de la membrana postsináptica, convirtiendo así la señal química de vuelta a una señal eléctrica.

Aproximadamente 10 mil millones de neuronas participan en las sinapsis en el SNC formando una compleja red (Munno and Syed 2003) que necesita ser específica y ordenadamente modelada para permitir el funcionamiento correcto de los circuitos neuronales.

La formación y mantenimiento de las sinapsis se produce a través de una estricta serie de eventos, cada uno de los cuales proporciona especificidad adicional, incluyendo la formación y eliminación de conexiones entre neuronas en cada etapa progresiva.

Todo el programa sinaptogénico comienza con la determinación del destino celular (Taverna et al. 2014), seguido de la migración axonal guiada específicamente (Kay 2016; Ulloa et al. 2018), la formación de ramificaciones axonales y de la capa dendrítica, la

formación de las sinapsis transitorias y la actividad dependiente de la maduración de los circuitos sinápticos (Fukai and Yamagata;2016).

La alta especificidad en los circuitos sinápticos se puede atribuir en gran medida a la expresión oportuna de numerosos receptores y sus respectivos ligandos durante su desarrollo (Huang and Reichardt 2001). La dirección de los procesos axonales y dendríticos está mediada por moléculas guía axonales extracelulares como netrinas, semaforinas, y moléculas de adhesión celular (CAMs), que participa en interacciones entre receptores con sus correspondientes ligandos, ambos expresados en el cono axonal en crecimiento (growth cone, GC) (Geng et al. 2016).

Tanto la distribución espacial como el tipo de receptores involucrados en el proceso sináptico cambian continuamente en varias etapas del desarrollo. Además, la respuesta de un axón debida a las interacciones entre las moléculas guía y sus receptores afines puede ser de manera positiva o negativa, es decir, ir o no ir hacia cierta dirección o participar o no en determinado proceso (Seiradake et al. 2016).

Otra característica importante con respecto a las moléculas guía es su papel multifacético. Estudios recientes han revelado que las moléculas guía participan en etapas tanto de formación de sinapsis como de consolidación de la misma (Seiradake et al. 2016).

Una de estas familias de moléculas guías es el complejo SNARE, proteínas cuya función es facilitar la fusión de vesículas transportadoras con los compartimentos celulares apropiados. Aunque se expresan en diversos tipos celulares, las proteínas del complejo SNARE más estudiadas son las presentes en neuronas, bien caracterizadas como contribuyentes importantes al tráfico de vesículas en las sinapsis maduras y también se ha demostrado que juegan un papel importante en la guía axonal (Vanderhaeghen and Cheng; 2010).

Las diversas especializaciones que se adquieren a lo largo del programa sinaptogénico conducen la formación de circuitos completamente funcionales.

Después de la proliferación, migración y diferenciación, la neurona está equipada para alcanzar su designación única con la ayuda de la extensión de sus proyecciones axonales

y dendríticas hacia objetivos remotos. El rumbo de este viaje es guiado por un conjunto especializado de estructuras situado en los extremos distales de las neuritas de alargamiento: **el cono de crecimiento** o GC por sus siglas en inglés (growth cone) (Vanderhaeghen and Cheng 2010).

Antes del contacto con su blanco potencial, estos conos de crecimiento están equipados con “paquetes” pre-ensamblados de maquinaria molecular para formar la asociación sináptica (Haydon and Drapeau;1995).

La polaridad neuronal está dada por un andamio anatómico de citoesqueleto axonal y dendrítico, que sirve como soporte para el transporte continuo de proteínas provenientes del soma y de regreso a él. Microtúbulos, microfilamentos y neurofilamentos son los principales elementos estructurales del citoesqueleto neuronal y su ensamblaje dinámico da polaridad y coherencia a un axón y una dendrita durante su desarrollo.

El alargamiento de los procesos dendríticos y axonales depende del cono de crecimiento. A partir del lamelipodio, principal componente del cuerpo de crecimiento, emergen interesantes protusiones más delgadas llamadas filopodios (Haydon and Drapeau 1995). Conforme una neurona se vuelve más diferenciada, los conos de crecimiento necesitan monitorear su comportamiento intrínsecamente, en ausencia de señalización del soma y responder rápidamente a las señales presentes en el medio extracelular. La motilidad del GC y la extensión de neuritas están gobernadas por la traducción de varias proteínas de unión a actina dependiendo del tipo específico de ramificación.

La velocidad a la que típicamente avanza el GC es de ~ 1 mm / día, perforando las regiones circundantes con sus proyecciones, sobre todo filopodios. Este fenómeno ocurre dependiendo del medio ambiente molecular en el que el CG está avanzando: si hay señales de atracción presentes en las proximidades se favorece la conducción del GC en esa dirección, mientras que, si una señal repulsiva interactúa con el cono, éste se retira de su camino. Estas funciones y respuestas del GC suceden gracias a su infraestructura citoesquelética y a la gran cantidad de receptores que se encuentran en su membrana, los cuales perciben las señales extrínsecas y monitorean el montaje y desmontaje de la maquinaria de actina interna a través de reguladores como las GTPasas Rho y Rac, entre otras.

El movimiento de un GC no es aleatorio, su viaje es gobernado por señales o moléculas provenientes de otras células que han sido secretadas al medio extracelular y que dictan su trayectoria final. Se han descrito proteínas con funciones de repulsión como las proteínas slits o Draxina, proteína guía que ha sido identificada como repelente para los axones en el desarrollo del cerebro y la médula espinal. Además, están involucradas en este proceso otras proteínas bifuncionales con efectos tanto atrayentes como repelentes por ejemplo las netrinas que en presencia del receptor DDC (siglas en inglés de Deleted Colorectal Cáncer) tienen efecto atrayente, mientras que cuando interactúan con el receptor Unc5 o con el heterodímero DDC-Unc5 el efecto es repelente (Ulloa y cols., 2018; Stoeckli, 2018).

Otro ejemplo de proteínas con función bifuncional en la guía axónica son las semaforinas que pueden ser secretadas o estar ancladas a la membrana celular, y actúan a través del receptor transmembranal denominado plexina, o a través del heterodímero formado por las proteínas transmembranales plexina-neuropilina. Las semaforinas, además de participar en la guía y regulación de las proyecciones neuronales, también están implicadas en otros eventos celulares como la migración y dirección de las interneuronas provenientes del telencéfalo en zonas de la corteza y el estriado, la apoptosis en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG), la formación de espinas y dendritas en neuronas corticales, y la transmisión sináptica en neuronas del hipocampo (Tamariz Domínguez, 2012).

Por otra parte, se encuentran las efrinas que son proteínas quimiotrópicas ancladas a la membrana celular que actúan a través de receptores transmembranales con actividad de cinasas de tirosina denominados EphA y EphB; y que participan durante el desarrollo embrionario en diversos procesos como la guía axonal, la arborización y extensión de dendritas, la segmentación y la migración de las células de la cresta neural y la angiogénesis; además de que se encuentran distribuidas en una gran cantidad de tejidos. (Tamariz Domínguez, 2012).

El GC está funcionalmente equipado con una maquinaria secretora incluso antes de que se establezca un contacto con cualquier célula objetivo determinada. Por ejemplo, los GC de las neuronas motoras embrionarias de *Xenopus* están completamente dotados de

maquinaria de liberación de acetilcolina, facilitando así la inmediata comunicación con su par de contacto.

De manera similar, la aplicación extrínseca de serotonina, neurotransmisor normalmente liberado en sinapsis químicas maduras, induce un subconjunto específico de respuestas en GC del caracol *Helisoma* demostrando que los GC están provistos de receptores funcionalmente acoplados tanto a canales iónicos como al citoesqueleto.

Sin embargo, hay excepciones a esta regla ya que algunas neuronas no albergan una maquinaria secretora preordenada, de manera que la liberación de moléculas de señalización depende estrictamente del contacto físico con pares sinápticos específicos (Fischer et al. 2000).

Aunque el GC con su maquinaria secretora preensamblada es capaz de formar sinapsis eficientes inmediatamente después del contacto con sus socios sinápticos específicos, se ha encontrado que la estabilidad de estas sinapsis estrictamente depende de la señalización del soma.

A medida que un GC guiado por una gran cantidad de moléculas de señalización alcanza su sitio de invasión destinado, retrae sus filopodios y lamellipodios y se transforma en una terminal presináptica vestigial. En ese momento se secretan moléculas como agrina y neurotransmisores como acetilcolina, glutamina y GABA, que a su vez activan a sus receptores específicos en la membrana diana postsináptica desencadenando una cascada de señalización intracelular (Nicoll; 2003).

Una crucial familia molecular involucrada en el reconocimiento de las células blanco y la iniciación, mantenimiento y estabilización de las sinapsis son las Moléculas de Adhesión Celular (CAMs), proteínas que se encuentran en la superficie celular que permiten que las células "peguen" a otras células o a la matriz extracelular (ECM) (Horstkorte and Fuss 2012).

Las CAMs son cruciales para formar y mantener la integridad y estabilidad estructural al unir varios componentes celulares. Esta familia de proteínas consta de un dominio intracelular que trabaja con el citoesqueleto, un dominio transmembranal y un dominio extracelular que interactúa con la ECM.

Las CAM se pueden dividir en grupos conocidos como superfamilias. Entre las que se encuentran las cadherinas, integrinas, inmunoglobulinas (igCAM), el Tipo C de proteínas con dominio de tipo lectina (CTLD) y las neuroliginas / neurexinas (Horstkorte and Fuss 2012).

Las CAMs son responsables de la unión de células adyacentes, por lo tanto, promueven la formación de sinapsis entre neuronas a través de varios procesos.

Descubrimientos recientes han indicado que durante el desarrollo temprano, las CAM promueven la migración celular, plasticidad de sinapsis y crecimiento axonal. Sin embargo, durante desarrollo posterior, cambian tareas y en su lugar promueven la estabilidad sináptica. Se ha pensado que este cambio en sus roles puede ser debido al exón VASE, que agrega 10 aminoácidos adicionales durante el desarrollo en las moléculas de adhesión de células neurales (N-CAM).

Al formar sinapsis, es importante tener en cuenta que, si bien las CAM juegan un papel importante, se requieren más compuestos como los neurotransmisores y semaforinas que como se ha mencionado anteriormente son fundamentales para guiar a la neurona a su sitio de destino para la diferenciación sináptica (van Kesteren y Spencer 2003).

Así, en vez de reinventar el sistema, los ligandos existentes y sus receptores se alteran sutilmente para cumplir con otras funciones.

1.2 Receptores acoplados a proteínas G

Como se ha mencionado anteriormente, en los procesos sinápticos participan un gran número de biomoléculas, entre los que destacan los Receptores Acoplados a Proteínas G (GPCRs).

Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) comprenden la superfamilia de proteínas más grande en los genomas de mamíferos y median respuestas a una variedad de señales extracelulares que van desde fotones y moléculas pequeñas hasta péptidos y proteínas (Katritch y cols.; 2013).

Los GPCRs constan de un dominio N-terminal extracelular, siete asas transmembranales formadas de 25 a 30 aminoácidos de naturaleza Hidrofóbica que se interconectan a través de tres asas extracelulares y tres asas intracelulares, y un dominio C-terminal, como se muestra en la figura 3.

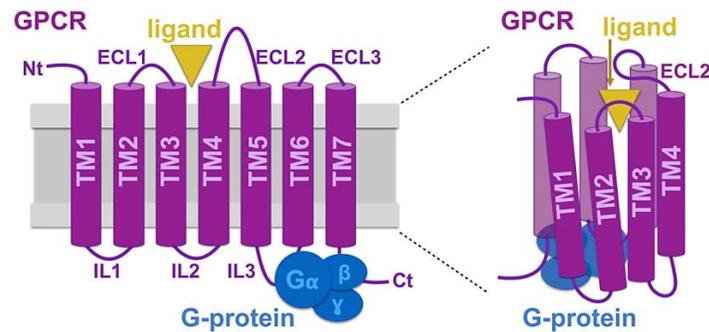


Figura 3. Representación esquemática de la estructura básica de los GPCRs.

Fuente: Shneider y cols.; 2018.

En base a su estructura, los GPCRs son susceptibles a sufrir diversas modificaciones postraduccionales para regular su localización y actividad. Por ejemplo: muchos de ellos contienen en la porción proximal de su fragmento C terminal una o más cisteínas que pueden ser palmitoiladas formando un sitio adicional de anclaje a la membrana y una nueva asa intracelular. Otros son capaces de sufrir glicosilaciones en el extremo N-terminal o en las asas extracelulares, además de que pueden sufrir fosforilaciones que regulan su estado de activación, así como ubiquitinaciones o sumoilaciones que han sido relacionadas con procesos para su degradación o reciclaje. Existe un grupo de GPCRs que se activa por proteólisis de su extremo amino terminal, dejando expuesto un péptido que funciona como agonista, que son los llamados receptores activados por proteasas (PARs por sus siglas en inglés), siendo el más conocido el receptor para trombina. Otras modificaciones postraduccionales con menor frecuencia son la nitración y la sulfatación de algunos residuos (Guzmán-Silva y García-Saénz; 2018).

Los análisis de alta resolución de sus estructuras, han mostrado a los GPCRs como máquinas alostéricas que están controladas no solo por ligandos sino también por iones, lípidos, colesterol e incluso agua (Katritch y cols.; 2013).

La diversidad de los ligandos extracelulares se refleja en la diversidad estructural de más de 800 GPCR humanos, que comparten poca identidad de secuencia y poseen diferentes dominios extracelulares N-terminal, clasificándose en cinco familias principales y numerosas subfamilias como se muestra en la figura 4.

La familia de **glutamato** comprende aquellos receptores que son sensibles a este neurotransmisor, conteniendo un dominio de reconocimiento del ligando en el extremo amino. Ejemplos representativos de esta familia son los receptores del gusto tipo1 o TAS1, el receptor para el ácido γ -aminobutírico (GABA), así como una de sus variantes de splicing: el receptor sensor de calcio (CASR) (Ferrer-Zavala y Reyes-Cruz; 2015.)

Los receptores de la familia de **rodopsina**, la más grande en vertebrados, se caracterizan por contener el motivo DRY entre el pase transmembranal TM-3 y el asa intracelular IL-2; además de que pueden sensar distintos ligandos que van desde neuropéptidos hasta moléculas más pequeñas y volátiles e incluso fotones, por lo que estos receptores son funcionales en los sentidos como la vista y el olfato (Ferrer-Zavala y Reyes-Cruz; 2015.)

Los receptores **frizzled** son receptores de las proteínas Wnt y otros ligandos, así como juegan un papel crítico en la regulación de la polaridad celular. Los genes frizzled son esenciales para el desarrollo embrionario, la polaridad celular y tisular, la formación de sinapsis neuronales y la regulación de la proliferación, entre otros procesos. Se han identificado en diversos animales, desde esponjas hasta humanos.

La familia se define por características estructurales conservadas, que incluyen siete dominios hidrófobos y un dominio de unión a ligando rico en cisteína (Huang y Klein;2004).

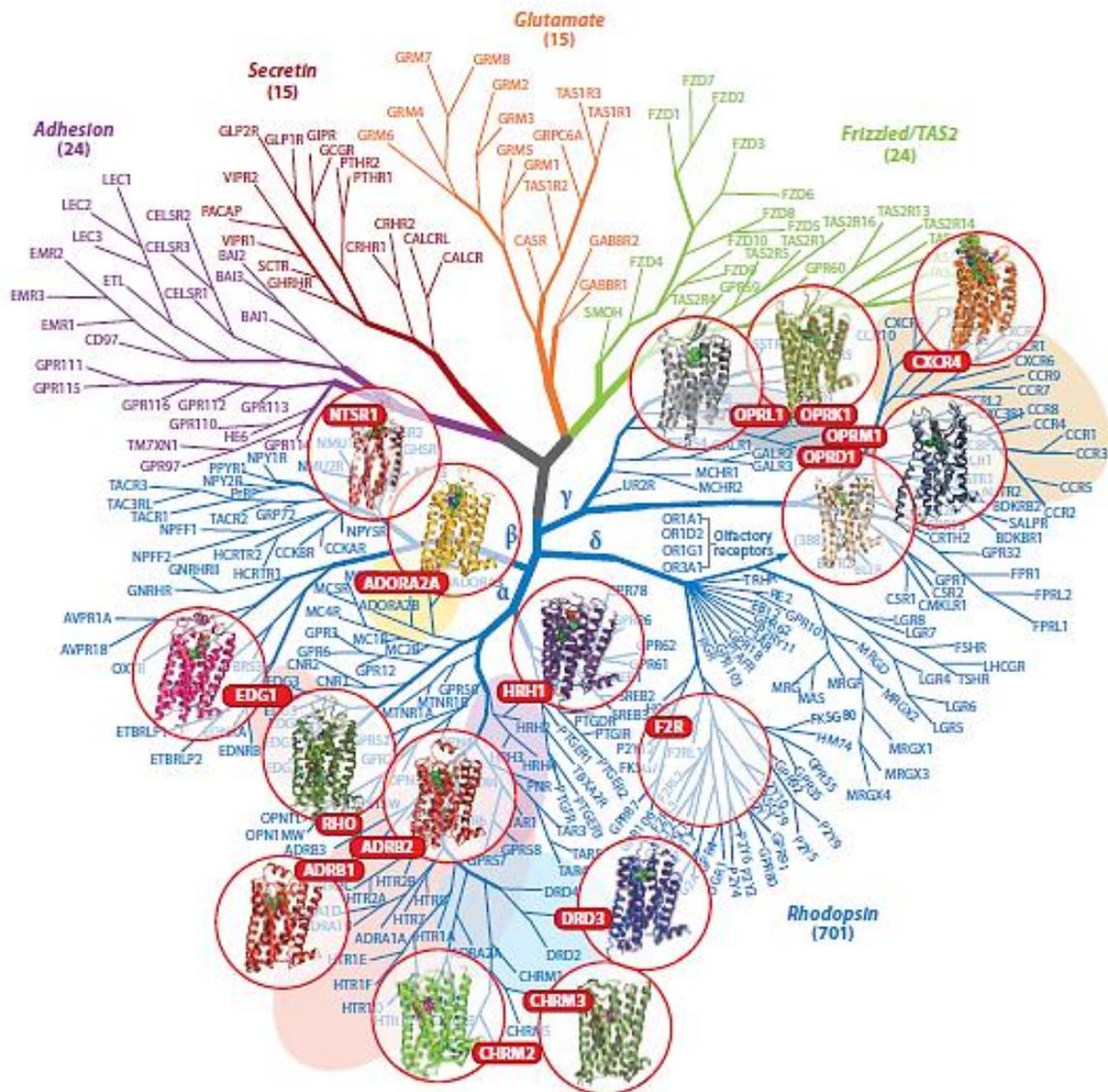


Figura 4. Clasificación de la superfamilia de los GPCRs.

Fuente: (Katritch y cols.; 2013)

Los receptores de la familia de **secretina**, también conocidas como Familia B o familia 2 de receptores acoplados a proteína G, están reguladas por hormonas peptídicas de la familia de hormonas glucagón. Esta familia incluye receptores de péptidos intestinales vasoactivos y receptores de secretina, calcitonina y péptidos relacionados con la hormona paratiroidea, además, estos receptores son capaces de activar a la adenilato ciclasa y la vía del fosfatidil-inositol-calcio. (Katritch y cols.; 2013).

La quinta familia de GPCRs, los receptores de adhesión, consiste en otro tipo de proteínas transmembranales con características estructurales muy particulares entre las que destacan un largo amino extracelular que contiene dominios capaces de interactuar con sus ligandos específicos formando adhesiones celulares y activando vías de señalización intracelulares dependiendo del estímulo extracelular recibido.

En la siguiente sección se abordarán de manera más específica algunas de las características principales de esta familia de GPCRS.

1.3 GPCRs de adhesión

Los receptores de adhesión acoplados a proteínas G (aGPCR's por sus siglas en inglés) se distinguen tanto por el gran tamaño de su región extracelular, que contiene una amplia variedad de subdominios de adhesión, como por su dominio GAIN altamente conservado que constituye un sitio de autoproteólisis del receptor dando lugar a dos fragmentos: el fragmento amino terminal extracelular (NTF) y el fragmento CTF conformado por los dominios transmembranales así como por el tallo citoplasmático del receptor.

Los 33 aGPCR's humanos se dividen en 9 subfamilias en base a la similitud de su secuencia. Poseen 7 dominios transmembranales y en muchos casos se conoce que su señalización involucra a las proteínas G heterotriméricas.

Los GPCR exhiben diferentes niveles de actividad basal que dependen de las características individuales de cada receptor. La evidencia actual apoya dos modos de regulación de los aGPCR: el agonismo ortostérico (es decir, por un péptido agonista) en el que se requiere la disociación del CTF y el NTF; y la regulación alostérica, que también se ha denominado como regulación sintonizable y no requiere la disociación de las subunidades del receptor (Figura 5).

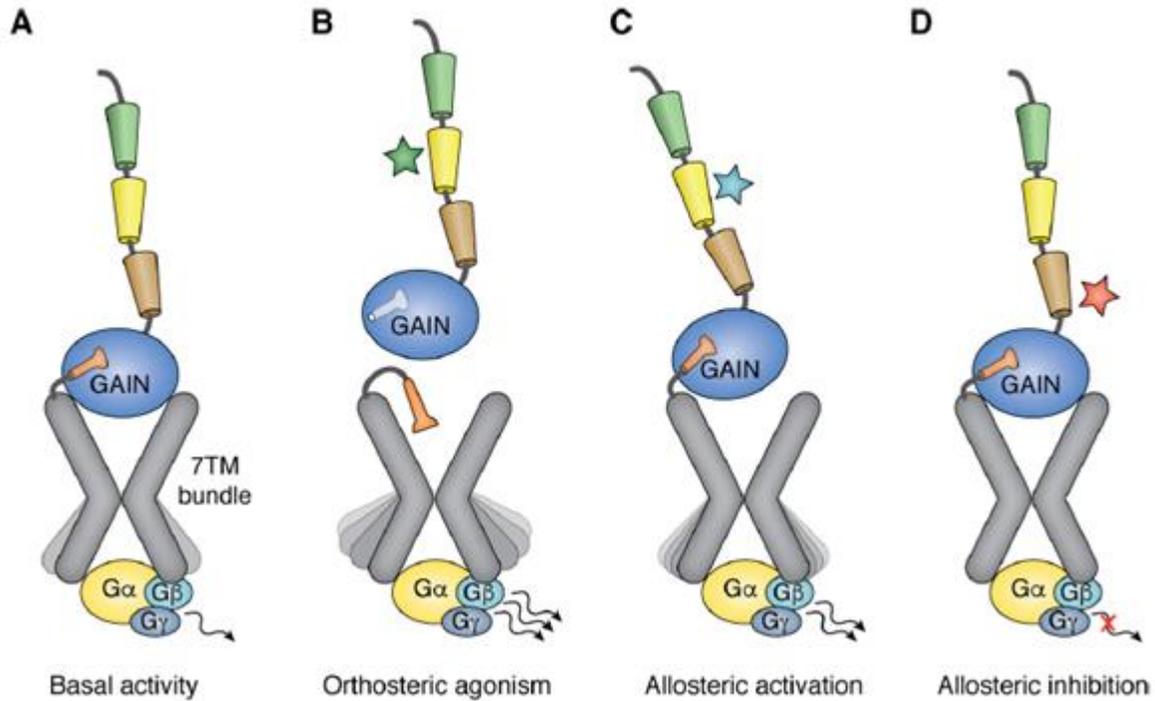


Figura 5. Mecanismos de activación de los aGPCRs. Tomado de Vizurraga y col;2020

Se admiten ambos modos de activación fundamentales a través de varias líneas de evidencia, y es probable que algunos aGPCR se pueden activar de ambas formas.

1.4 Latrofilina

Latrofilina (Lphn) es un GPCR's de adhesión el cuál debe su nombre a que fue descubierto como blanco para la α -latrotoxina de la araña *Lactrodectus mactans* mejor conocida como *viuda negra*. En mamíferos, se conocen 3 isoformas de Lphn, que aunque presentan ciertas diferencias estructurales, comparten los siguientes de manera general (Figura 6): en el Fragmento Amino Terminal (NTF) se encuentra el dominio de lectina, seguido del dominio de Olfactomedina, el Dominio de unión a hormona y el dominio GAIN con su sitio GPS de autoproteólisis; continuando con el Fragmento Carboxilo Terminal

(CTF) compuesto por los 7 dominios transmembranales y el tallo citoplasmático, terminando con el dominio de unión a motivos PDZ.

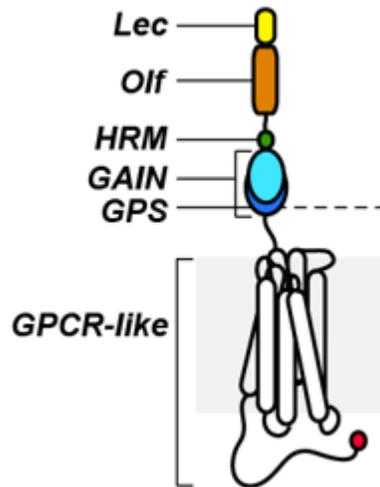


Figura 6. Representación esquemática de los dominios de Latrofilina. Tomado de Cruz Ortega y Boucard, 2019.

Los dominios del NTF le confieren a Lphn sus propiedades de especificidad por reconocimiento e interacción con sus ligandos endógenos Teneurina, FLRT, Neurexina y Contactina. Al suceder esta interacción tienen lugar diferentes procesos en los que participa Lphn como la formación de adhesiones intercelulares, adhesiones con la matriz extracelular y la activación de diferentes vías de señalización intracelulares.

Se ha estudiado el acople de Lphn a diferentes proteínas G, en diversos sistemas celulares y por diferentes autores. Muller y cols en el 2015 reportaron que el ortólogo de Lphn en *C. elegans*, Lat-1, se acopla a proteínas $G\alpha_s$. Por su parte, Scholz y cols., en ese mismo año observaron que dCIRL, ortólogo de Lphn en *Drosophila melanogaster*, provoca la disminución de los niveles de cAMP, coincidente con su acople con $G\alpha_i$. Adicionalmente, Silva y Cols. reportaron en 2015 también que Lphn1 en rata aumenta los niveles de Calcio intracelular como evidencia de su acople a proteínas $G\alpha_q$. Finalmente, Arac y colaboradores en el 2018 demostraron el acople de Lphn humana a las proteínas $G\alpha_i$ y $G\alpha_{12/13}$.

La alta expresión de Lphn en distintas zonas del cerebro apoya la teoría de ser un receptor con funciones importantes en este órgano responsable del comportamiento humano, es por ello y por la evidencia que se ha recolectado en estudios de poblaciones en específico, que se han asociado a defectos genéticos de Lphn con enfermedades tales como síndrome de déficit de atención con hiperactividad (TDAH), trastorno por uso de sustancias (TUS), trastorno del espectro autista (TEA), trastorno bipolar (BD), esquizofrenia (SCZ), epilepsia y microcefalia (MCP).

Por otra parte, se ha observado que la sobre expresión de Lphn induce cambios en la morfología celular, resultando en células más redondas y pequeñas en la línea HEK293T (Cruz-Ortega; Tesis de Maestría), así como la pérdida de proyecciones neuronales en cultivos primarios de hipocampo (Cruz-Ortega y Boucard;2019) sin que se conozcan los mecanismos moleculares involucrados.

2. JUSTIFICACIÓN

Los receptores de adhesión acoplados a proteínas G son fundamentales en numerosos procesos que sostienen la sobrevivencia y proliferación celular, tales como la estabilización de uniones intercelulares, el reconocimiento y transducción de mensajes provenientes del medio extracelular y la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina. Se ha observado previamente que la sobre expresión del GPCR de adhesión Latrofilina induce un cambio de forma en diferentes cultivos celulares, evento directamente relacionado con este citoesqueleto. En el presente trabajo se estudia por medio de un sistema celular heterólogo qué mecanismos moleculares están involucrados en el efecto de Latrofilina sobre la remodelación del citoesqueleto de actina.

3. HIPÓTESIS

Latrofilina activa mecanismos celulares relacionados con la remodelación del citoesqueleto de actina.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Identificar mecanismos de señalización intracelular involucrados en la remodelación del citoesqueleto de actina inducida por la sobre expresión de Latrofilina en células HEK293T.

4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar por microscopía confocal y citometría de flujo los cambios en las dimensiones celulares, complejidad celular y en la remodelación del citoesqueleto de actina inducidos por la sobre expresión de las tres isoformas de Lphn en células HEK293T.
2. Detectar por microscopía confocal y co-inmunoprecipitación la interacción física de las tres isoformas de Lphn con actina.
3. Identificar por microscopía confocal si el efecto de las tres isoformas de Latrofilina sobre la remodelación del citoesqueleto de actina en células HEK293T es causado directa y exclusivamente por el CTF transmembranal e intracelular del receptor o si participa también el fragmento NTF extracelular.
4. Evaluar por microscopía confocal la remodelación del citoesqueleto de actina inducida por las tres isoformas de Lphn en células HEK293T, cuando interactúan con su ligando Teneurina 4.
5. Determinar por Western Blot el estado de activación de la *cofilina*, proteína de unión a actina, tras la sobreexpresión independiente de las tres isoformas del GPCR de adhesión Latrofilina en células HEK293T.

5. MATERIALES

5.1 Cepas bacterianas

La amplificación del ADN plasmídico se realizó por la transformación de la cepa DH5 α TM de *Escehrichia coli*, con el siguiente genotipo:

F– Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK–, mK+) *phoA supE44* λ – *thi-1 gyrA96 relA1*.

5.2 Líneas celulares

Se utilizó la línea celular HEK293T cultivada bajo condiciones de esterilidad a 37°C bajo atmósfera de CO₂ al 5 %.

Las células HEK293T son células riñón embrionario humano de morfología epitelial que pueden ser transfectadas con DNA plasmídico consiguiendo una alta eficiencia. Esta línea celular deriva de la línea HEK293, pero con la adición del antígeno TSV40 largo, incrementando la eficiencia de transfección y la producción de algunos vectores virales.

5.3 Plásmidos

La construcción para la expresión de ***Lphn1^{mVenus}*** se describió previamente por Boucard y cols. en el 2012 y fue diseñada mediante la introducción de la secuencia para *mVenus* en un sitio MfeI en la construcción pCMV-Lphn1 entre Ala¹²⁹⁴ y Lys¹²⁹⁵ (numeración de aminoácidos de la señal peptídica Met1 : isoforma Lphn1 de rata carece de SSA y SSB conocido como CL1AA, número de acceso: AF081144) usando mutagénesis por PCR, agregando un Asn-Cys como enlazador en ambos lados de la secuencia *mVenus*.

La construcción de expresión de ***Lphn2^{mVenus}*** fue un generoso regalo del Dr. Thomas Südhof de la Universidad de Stanford y consistió en la inserción de *mVenus* en un sitio único C-terminal de Pml I en la construcción pCAAG-Lphn2^{Flag}, conteniendo un epítipo Flag N-terminal.

Se generó la construcción de expresión de ***Lphn3^{mVenus}*** introduciendo *mVenus* en un sitio Bgl II resultante de la mutagénesis por PCR de pCMV-Lphn3^{HA, Flag} (Araç et al., 2012)

en Arg1²⁷⁷-Ser¹²⁷⁸ y por lo tanto comprendía epítomos HA y Flag. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos para introducir el sitio BglII:

Sentido 5'- CAATCATGAAAGATCTAGTGAGCA-3'

Antisentido 5'- TGCTCACTAGATCTTTCATGATTG-3'

Para amplificar *mVenus* flanqueado por sitios Bgl II se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

Sentido 5'- TATAAGATCTATGGTGAGCAAGGGCGAG -3'

Antisentido 5'- TATAAGATCTCTTGACAGCTCGTCCATG -3'

El vector de expresión de *Lphn1^{ECD}* (pDisplayCL1) se ha descrito previamente (Boucard et al., 2012).

Los vectores que expresan *Lphn2^{ECD}* y *Lphn3^{ECD}* (pDisplay-Lphn2 y pDisplay-Lphn3) se generaron amplificando las regiones correspondientes a Gly²⁵-Lys⁸⁴⁸ y Phe²⁰-Asp⁸⁷⁴ respectivamente de *Lphn2* y *Lphn3*, fragmentos que se insertaron en los sitios SacII-Sall y XmaI-SacII del vector pDisplay respectivamente. Ambas secuencias se intercalaron entre epítomos de HA y de c-Myc.

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos para amplificar los dominios extracelulares *Lphn2* y *Lphn3*:

Lphn2:

Sentido: 5'- TCCCCGCGGATTCAGCAGAGCAGCCTTGC -3'

Antisentido: 5'-ACGCGTCGACTTTGTGGACGCCATCTTTG -3 '

Lphn3:

Sentido: 5'- TCCCCCGGGTTCAGCCGTGCCCAATTC -3

Antisentido: 5'-TCCCCGCGGATCGTGGACGGCATCGCTG -3 '

5.4 Anticuerpos y reactivos.

Tabla 1. Anticuerpos

Anticuerpo	Especie	Proveedor
HA	Ratón Monoclonal	BioLegend Clon 16B12, Cat. No. 901513
GFP	Conejo Policlonal	Novus Biologicals Cat. No. NB600-308b
Anti-Cofilina Total	Ratón Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology Cat. No. sc-376476
Anti-Cofilina Fosforilada	Conejo Policlonal	Cell Signaling Technology Cat. No. C02-3311S
Anti- Actina	Ratón Monoclonal	Regalo del Dr José Manuel Hernández (CINVESTAV-IPN).
Anti- α -tubulin	Ratón Monoclonal	Developmental Studies Hybridoma Bank. Clona 12G10
Anti- c-MYC	Ratón Monoclonal	Developmental Studies Hybridoma Bank. Clona 9E10
Alexa-Fluor 633	Anticuerpo Secundario contra ratón.	Invitrogen Cat. No. A21052

Tabla 2. Reactivos

Reactivos	Proveedor
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Thermo Fisher Scientific Cat. No. D1306
Phalloidin-Rhodamine	Thermo Fisher Scientific Cat. No. R415
Todos los demás reactivos son de Merck-Sigma-Aldrich, a menos que se especifique lo contrario en cada caso.	

5.5 Soluciones experimentales

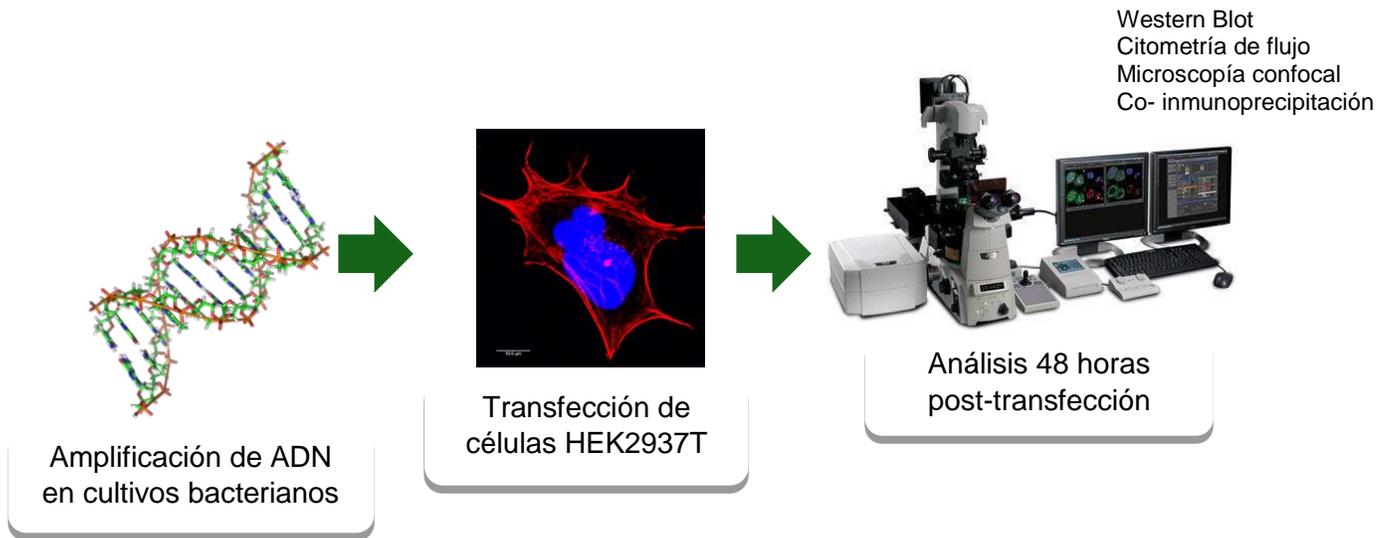
Tabla 3. Preparación de soluciones		
Solución	Contenido	Almacenamiento y Utilidad
Buffer de carga 6X para ADN	0.25% azul de bromofenol, 0.25% xileno cianol, 30% glicerol; en agua miliQ	-20 °C/ Electroforesis de ADN
Buffer de corrida para electroforesis 5X	15.1 g de TRIS-base, 94 g de glicina, 50 mL de SDS al 10 %, aforar a 1 Lt con agua miliQ.	22 °C / Electroforesis de proteínas
Buffer de transferencia	3.03 g de Tris base, 14.4 g de glicina, 200 mL de metanol, 25 mL de SDS pH 7.4. Ajustar el volumen a 1 L con agua destilada.	4 °C / Western Blot
Buffer TAE 1X	40 mM de Tris-acetato, 1mM de EDTA; en agua miliQ	22 °C / Geles de agarosa
Buffer TE	10 Mm de Tris pH 8.0, 1 mM de EDTA pH 8.0; en agua miliQ	22 °C / Diluyente de ADN

DMEM 20 % sin antibiótico	DMEM que contiene: 20% de suero fetal bovino; glutamina 2X; en DMEM.	4 °C; en esterilidad. Preparar al momento de preferencia Transfección
DMEM 10 % con antibiótico	DMEM que contiene: 10 % de suero fetal bovino; glutamina 1X; 1% de mezcla de antibióticos (penicilina 10,000 U/ml; estreptomycin 10,000 µg/ml) .	4 °C; en esterilidad / Cultivo celular
Lisozima Lysozyme from chicken egg. SIGMA. Ref:L6876	10 mg/mL de lisozima en Tris-HCl 10 mM pH 8.0	4 °C / Purificación de ADN plasmídico
Medio LB	Bacto triptona 10g, extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g. Ajustar pH a 7.0 con NaOH. Aforar a 1 L con agua miliQ. Filtrar y Esterilizar en autoclave.	4°C en esterilidad / Cultivo de bacterias
Medio SOB	20 g de Bacto triptona, 5 g de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl. Ajustar pH a 7.5 con KOH. Aforar a un 1L con agua miliQ. Filtrar y esterilizar en autoclave. Dejar enfriar y agregar 10 mL de MgSO4 estéril.	4°C en esterilidad / Cultivo de bacterias
PBS/EGTA	1mM de EGTA en PBS. Filtrar y esterilizar en autoclave.	4°C en esterilidad / Resuspensión celular en ensayos de agregación.
Polietilenglicol	13 % de polietilenglicol, 1.6 M de NaCl; en agua miliQ	4 °C ; protegido de la luz Purificación de ADN plasmídico
Polietilenimina (PEI)	Polietilenimina de cadena lineal 1 mg/mL esterilizada por filtración. Polysciences, Cat. No. 23966-1.	4 °C; en esterilidad protegido de la luz. No almacenar por más de 3 meses. Transfección

RNasa A Invitrogen™ UltraPure™ RNase A (20mg/mL), Powder Ref: 12091039	RNAasa 20 µg/mL en agua miliQ	4 °C / Purificación de ADN plasmídico
Rojo de Ponceau	1 % de ácido acético, 0.2 % de rojo de Ponceau	22 °C / Western Blot
Solución 1 de lisis	50 mM de glucosa, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0, en agua miliQ. Filtrar y esterilizar en autoclave	4 °C / Extracción de ADN plasmídico
Solución 2 de lisis	0.2 N de NaOH, 1% de SDS; en agua miliQ	22 °C / Extracción de ADN plasmídico
Solución 3 de lisis	3 M de KCH ₃ CO ₂ , 11.5 % de ácido acético; en agua miliQ. Filtrar y esterilizar en autoclave	4 °C / Extracción de ADN plasmídico
Solución de incubación 1X para ensayos de agregación	0.05 M de HEPES; 0.01 M de CaCl ₂ ; .01 M de MgCl ₂ ; 20 % suero fetal bovino; glutamina 2X.	4°C en esterilidad. Preparar al momento de preferencia. Incubación para ensayos de agregación.
Solución de siliconización	0.2% de silicona en éter de petróleo	4 °C protegida de la luz/ Siliconización de pipetas Pasteur para ensayos de agregación.
SYBR® Safe LIFE TECHNOLOGIES REF S33102	SYBR® Safe al 0.2 % en agua miliQ	22 °C Protegido de la luz Tinción de ADN en geles de agarosa
TBST	25 mL de TRIS-HCl 1 M pH 8.0, 21.95 g de NaCl, 1.25 mL de Tween20. Completar a 250 mL con agua miliQ.	22 °C / Western Blot

6. MÉTODOS

6.1 Estrategia experimental general



6.2 Amplificación de ADN plasmídico.

Se amplificó el ADN plasmídico a través de la transformación de bacterias competentes DH5 α . Se extrajo y purificó para obtener ADN de calidad transfectable como se describe a continuación.

6.2.1 Transformación de bacterias competentes

Se descongelan en hielo-agua una alícuota de bacterias de 200 μ L por cada transformación. Se incorporan 100 – 500 ng del plásmido y se incuba durante 30 min en el baño de hielo – agua. Se incuba a 42 °C durante 45 segundos y se transfiere rápidamente al baño de hielo agua generando choque térmico. Se incuba durante 2 minutos más y se agregan 800 μ L de medio LB previamente esterilizado y sin antibiótico. Se incuba a 37°C durante 1 hora con agitación de 220 rpm. Posteriormente se siembran 100 μ L de bacterias en placas de medio LB con el antibiótico correspondiente para la selección de colonias transformadas. Finalmente se incuban a 37°C durante 16 horas.

6.2.2 Extracción de ADN plasmídico

Se toma una sola colonia de bacterias transformadas y se siembra en 1 mL de medio LB con ampicilina [100µg/µL] en un tubo de ensaye estéril. Se incuba durante 8 horas a 37 °C con agitación de 220 rpm. Se transfiere a un matraz Erlenmeyer de 500 mL que contenga 100 mL de medio LB con ampicilina [100 µg/µL] o el antibiótico correspondiente y se incuba bajo condiciones estériles y agitación de 220 rpm a 37°C durante 16 horas. A continuación, se transfiere a un tubo de policarbonato de 50 mL y se centrifuga a 7500 rpm/min durante 15 minutos a 4°C para sedimentar las bacterias, se deshecha el sobrenadante y se repite el procedimiento con el resto del cultivo bacteriano que quedó en el matraz. La pastilla bacteriana se resuspende en 3 mL de Solución de lisis 1 con agitación en vórtex. Luego, se agregaron 450 µL de solución de lisozima y se agita nuevamente. Después, se agregaron 6 mL de Solución 2 de lisis, 6 mL de cloroformo y 6 mL de Solución 3 de lisis, agitando en vórtex cada vez que se agrega una solución. Se incuba en hielo durante 10 min y se centrifuga a 5000 rpm durante 12 minutos a 4 °C. Se recupera el sobrenadante y se adiciona 0.6 veces el volumen de isopropanol. Se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se centrifuga a 5000 rpm durante 12 min a 4 °C. Se deshecha el sobrenadante y se adicionan 2 mL de etanol al 70 % a la pastilla para lavarla y se disuelve en 500 µL de buffer TE a 50 °C. Se transfiere a un tubo Eppendorf de 2 mL y se purifica de acuerdo al siguiente procedimiento:

6.2.3 Purificación de ADN plasmídico

A la muestra de ADN se adiciona un volumen igual de LiCl 5M (500 µL) y se agita en el Vórtex, seguido de centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se recupera el sobrenadante y se transfiere a otro tubo de 2 mL. Se agrega un volumen igual de isopropanol (1 mL) y se incuba a 22 °C durante 10 min. Se centrifuga a 13000 rpm durante 10 min a 4 °C descartando el sobrenadante. La pastilla resultante se lava con 1 mL de etanol al 70% y se disuelve en 500 µL de buffer TE que contenga RNasa (20 µG/ µL). Se incuba a 22 °C durante 30 min. Se adicionan 500 µL de solución de polietilenglicol y se incuba a -20°C durante 20 min. Se centrifuga a 13000 rpm durante 15 min a 4°C. La pastilla resultante se suspende en 500 µL de buffer TE. Se adicionan 500 µL de una mezcla de fenol/cloroformo en relación 1:1 y se agita en vórtex. Se centrifuga durante 5

min a 13 000 rpm y 4 °C. Se recupera el sobrenadante en otro tubo. Se agregan 500 de cloroformo y se agita en vórtex. Se centrifuga durante 5 min a 13 000 rpm y 4 °C. Se recupera el sobrenadante y se transfiere a otro tubo. Se adicionan 120 µL de acetato de amonio (10M) y 2 veces el volumen de etanol absoluto (1mL). Se agita en vórtex y se incuba durante 10 min a 22 °C. Se centrifuga durante 12 min a 13 000 rpm y 4 °C. La pastilla resultante se lava con 2 mL de etanol al 70 % y se disuelve en 200 µL de buffer TE. Se cuantifica la cantidad de ADN plasmídico obtenida.

6.3 Cultivo celular y Transfección por el método de Polietilenimina

Para los experimentos de inmunocitoquímica, las células HEK293T se cultivaron en placas de 12 pozos que contenían cubreobjetos previamente recubiertos con medio condicionado de células vírgenes de la misma cepa, hasta que alcanzaron una confluencia del 50-60%. Posteriormente, las células se transfectaron utilizando 1,4 µg de cDNA de las respectivas construcciones indicadas en las figuras y 4,2 µg de polietilenimina (PEI, Polysciences, nº de cat. 23966-1) para conseguir una relación 1: 3 de ADN: PEI. Después de 16 h, el medio de transfección se reemplazó por DMEM (Corning, Cat. No. 50- 003-PCR) que contenía 10% de FBS (Biowest, Cat. No. S1810-500), 1X Glutamax (Invitrogen, Cat. No. 35050061) y 1000 U ml⁻¹ de penicilina / estreptomycin (In Vitro, Cat. No. A-02). Estas células se dejaron crecer durante otras 32 h para finalmente procesarlas en los experimentos de inmunocitoquímica.

Para los ensayos de citometría de flujo, co-inmunoprecipitación e inmunotransferencia, se cultivaron células HEK293T en placas de seis pozos hasta que alcanzaron una confluencia del 80-90%, posteriormente se transfectaron utilizando 4 µg de las respectivas construcciones de cDNA y 12 µg de PEI. El medio de transfección se retiró después de 16 horas y las células se cultivaron durante 32 horas más y se recolectaron para su análisis.

Se realizaron pruebas para la monitorización de micoplasmas de forma rutinaria cada 6 meses utilizando el kit de detección de micoplasmas MycoFluor (Invitrogen, nº de cat. M-7006).

6.4 Análisis por citometría de flujo

Se transfectaron individualmente células HEK293T con los plásmidos indicados en las figuras. Después de 48 h, las células se resuspendieron usando EGTA 1 mM en PBS y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente en presencia de yoduro de propidio como marcador de la viabilidad celular. Posteriormente se analizaron por citometría de flujo utilizando el equipo BD LSRFortessa™ (BD Biosciences).

Se muestreó un número arbitrario de 20.000 eventos ($n = 20.000$) en cada población de células transfectadas para permitir una distribución representativa. La expresión de *mVenus* se detectó a través de la fluorescencia que emite a una longitud de onda de 530 nm en el canal de fluoresceína-5-isotiocianato y el nivel de incorporación de yoduro de propidio se analizó a una longitud de onda de 710 nm en el canal PerCP.

Se seleccionaron los puntos de datos correspondientes a células individuales y el análisis se restringió a las células que se ajustaban a ambos criterios de ser transfectadas y viables

6.5 Western Blot.

Se transfectaron células HEK293T con las construcciones indicadas en las figuras. 48 h después de la transfección, las células se lavaron en PBS, se almacenaron a -70°C durante 30 min y se descongelaron a 37°C durante 30 s. Las células se solubilizaron agregando buffer de carga, se calentaron y se cargaron en geles SDS-PAGE al 8% para analizar *Lphn^{mVenus}* o al 12% para analizar cofilina/fosfofilina. Después de la electroforesis, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad Cat. No. 1620115) y se procesaron usando procedimientos estándar.

6.6 Inmunocitoquímica

Las células transfectadas con las construcciones indicadas en las figuras se lavaron una vez con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 min en hielo-agua; una vez fijadas se permeabilizaron durante 7 min con TritonX-100 al 0,1% a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con PBS frío.

Las células que se utilizaron en los ensayos de adhesión entre *Lphn^{mVenus}* y Teneurin^{4HA} se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h con una solución de BSA al 3% en PBS como solución de bloqueo y se lavaron con PBS frío tres veces. Posteriormente, las células se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo anti-HA de ratón (relación 1: 200) seguido de 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpo fluorescente Alexa Fluor 633 anti-ratón (Invitrogen, relación 1: 200).

Para todas las tinciones, se incubó a las células durante 60 min a temperatura ambiente en la oscuridad con faloidina-rodamina (relación 1: 200) diluida en una solución de BSA al 1% en PBS.

Se incubó a las células durante 5 min a temperatura ambiente con solución de DAPI 300 nM en PBS para teñir núcleos, se lavaron tres veces con PBS frío y se dejaron secar para finalmente montar en portaobjetos utilizando GELVATOL como medio de montaje.

6.7 Microscopia confocal y análisis de las imágenes

Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Leica SP8, con objetivo de inmersión de 100 X y objetivo seco de 40X, aplicando las mismas configuraciones de adquisición en todos los casos del estudio: se recolectaron al azar células completas desde la base anclada a la matriz extracelular hasta la parte más alta, en rebanadas ópticas de 0.4 μm tantas como fueran necesarias en cada condición experimental, cuidando de balancear la intensidad de la fluorescencia con que se recolectaba cada canal para asegurar la confiabilidad de los estudios de colocación por Coeficiente de Pearson.

Los análisis de parámetros dimensionales celulares y nucleares, así como la cuantificación de estructuras de actina se realizaron sobre las imágenes de proyecciones máximas manualmente utilizando la herramienta poligonal del software Leica (Leica LAS AF Lite 3.3.10134.0).

La altura celular se determinó utilizando todos los cortes recabados para cada célula con el mismo software Leica.

El coeficiente de Pearson de colocalización entre F-actina y *Lphn^{mVenus}* se realizó también sobre las imágenes de proyecciones máximas, con la excepción de las muestras de agregación celular para las que se usaron secciones individuales y así evitar distorsión causada por amalgamas de células.

Las estructuras dependientes de actina del tipo filopodios, lamelipodios y blebs fueron identificado manualmente en base a los siguientes criterios morfológicos descritos en la literatura (Hernández-Vásquez et al., 2017; Laser-Azogui et al., 2014):

- Filopodios. - protuberancias en forma de varilla que se originan en la membrana celular y llenos de F-actina cortical
- Lamelipodios. - protuberancias en forma de hoja con una base que mide más de 6 μm y que debe contener F-actina cortical en su periferia.
- Blebs. - protuberancias redondas con una base que mide menos de 2 μm y que puede contener o no F-actina cortical en su borde.

6.8 Co- Inmunoprecipitación

Las células transfectadas con las construcciones de *Lphn^{mVenus}* o *mVenus* según se indica, fueron cultivadas por 48 horas y lisadas en buffer para Inmunoprecipitación a pH de 7.4 y conteniendo 25 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% de TritonX-100 y 5% de glicerol. Los lisados celulares fueron centrifugados a 13 000 rpm durante 15 minutos para eliminar los restos celulares insolubles; posteriormente fueron incubados toda la noche a 4 °C con perlas de sefarosa unidas a proteína G previamente acopladas al anticuerpo anti-actina o al anticuerpo anti-C-MYC, respectivamente. Se realizan lavados con buffer IP para minimizar la unión no específica a las perlas. Se agrega buffer de carga de electroforesis 1X para solubilizar las proteínas unidas en las perlas y se centrifuga por spin rápido. Se recupera el sobrenadante y se carga en un gel de acrilamida al 10 % en condiciones desnaturizantes de SDS. Se realiza el procedimiento estándar para western Blot descrito anteriormente, utilizando como anticuerpos primarios anti-GFP de conejo para revelar a *Lphn^{mVenus}*, anti-C- MYC para revelar *Lphn^{ECD}* y anti-actina para revelar a la actina endógena, los dos últimos de ratón; y como anticuerpos

secundarios anti-ratón y anti-conejo de quimioluminiscencia o fluorescencia respectivamente según se indica.

6.9 Estimulación con ligandos endógenos en procesos de adhesión intercelular.

Se transfectaron células HEK293T independientemente con cada vector de expresión indicado en las figuras. A las 48 horas, fueron desprendidas de su placa de cultivo utilizando EGTA 1mM en PBS, se mezclaron dos poblaciones de interés y se incubaron a temperatura ambiente con agitación de 20 rpm en solución de DEMEM que contenía FBS 10%, 50 mM de HEPES-NaOH pH 7.4 y 10 mM MgCl₂. Transcurridos 120 min, los agregados celulares se sembraron en cubreobjetos previamente recubiertos con medio condicionado de cultivos celulares HEK293T, en los que permanecieron durante 3 horas para permitir la formación de sus adhesiones. Posteriormente, las células se lavaron con PBS a 4°C y se fijaron con PFA al 4% en PBS a 4°C durante 15 min. Se lavaron dos veces con PBS a 4°C y se procesaron para experimentos de inmunohistoquímica como se indica.

6.10 Incubación con PTX

Se transfectaron células independientemente con los plásmidos indicados en las figuras. Después de 32 horas, se retiró el medio de cultivo, se lavaron 1 vez con PBS a 37°C y se adicionó nuevo medio de cultivo conteniendo PTX 1µM. Las células se incubaron a 37°C por 16 horas más antes de procesarlas en inmunohistoquímica.

6.11 Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media y representan los resultados de al menos tres experimentos independientes. La significancia estadística fue determinada por ANOVA unidireccional con prueba de SIDAK utilizando el software GraphPad Prism 6.01 y representando los resultados de estos análisis con el siguiente código:

Símbolo	Significado
ns	$P > 0.05$
*	$P \leq 0.05$
**	$P \leq 0.01$
***	$P \leq 0.001$
****	$P \leq 0.0001$

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización del sistema de estudio

Se sobre-expresaron independientemente las tres isoformas de Latrofilina en células HEK293T por el método de Polietilenimina. Como se muestra en la Figura 7A, todas las construcciones plasmídicas tenían acoplada una bandera de *mVenus* en el fragmento carboxilo terminal (CTF); adicionalmente, *Lphn2^{mVenus}* y *Lphn3^{mVenus}* tenían una bandera flag al final del fragmento amino terminal, además de una bandera HA en la primera asa transmembranal en el caso de *Lphn3^{mVenus}*

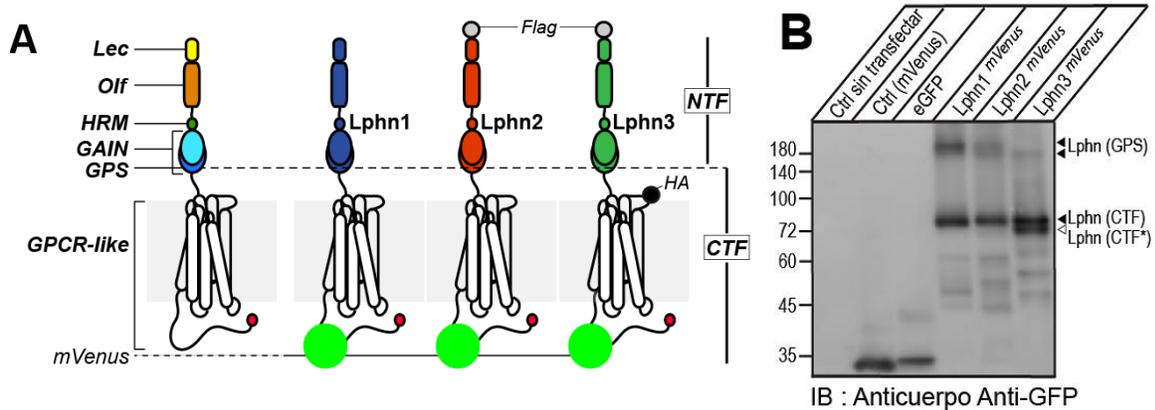


Figura 7. Expresión de las Latrofilinas en células HEK293T. Se transfectaron células HEK293T de manera independiente con las construcciones plasmídicas correspondientes a las 3 Latrofilinas cuya estructura se muestra en **A**. En la figura **B** se muestra la comprobación de expresión de las Latrofilinas por medio de Western Blot realizado a partir de los lisados celulares totales solubilizados con buffer de carga y revelando las bandas con anticuerpo Anti-GFP que es capaz de reconocer también la bandera *mVenus* que tenían acopladas las Lphn en la parte intracelular de su CTF. Modificado de Cruz Ortega y Boucard; Biology Open; 2019

Los análisis por Western blot (Figura 7B) revelado con anticuerpo Anti-GFP muestran el patrón de bandas característico correspondiente a cada una de las isoformas, que consiste en el fragmento carboxilo terminal de 80 kDa y las bandas correspondientes a los receptores completos a 180 kDa; así como una segunda banda para el CTF (CTF*)

más intensa en Lphn 3, probablemente debido a las diferentes modificaciones postraduccionales que presenta cada isoforma en dicha zona, las cuales se describen en la sección de Discusión de Resultados de este trabajo. Se observan también las bandas correspondientes a mVenus y GFP como controles.

Se realizaron análisis por citometría de flujo (Figura 8A-D) para evaluar la eficiencia de transfección, viabilidad celular e intensidad de fluorescencia de las poblaciones celulares transfectadas con las tres isoformas de Latrofilina^{mVenus} y con proteína *mVenus* como control, capturando para el estudio 20 000 eventos.

Considerando al menos 3 experimentos independientes, se obtuvo un promedio de 65% de células transfectadas con mVenus, 50% con Lphn1^{mVenus}, 22 % con Lphn2^{mVenus} y 48% con Lphn3^{mVenus}.

En la Figura 8F se observa que la intensidad de fluorescencia de las células transfectadas con *mVenus* es significativamente mayor que la encontrada en las células transfectadas con Lphn, siendo similar entre cada una de las isoformas.

Adicionalmente, se encontró que la sobre-expresión de Lphn no disminuyera significativamente la viabilidad celular con respecto al control de *mVenus* (Figura 8G), encontrándose en todos los casos más de 80% de células viables para su estudio posterior.

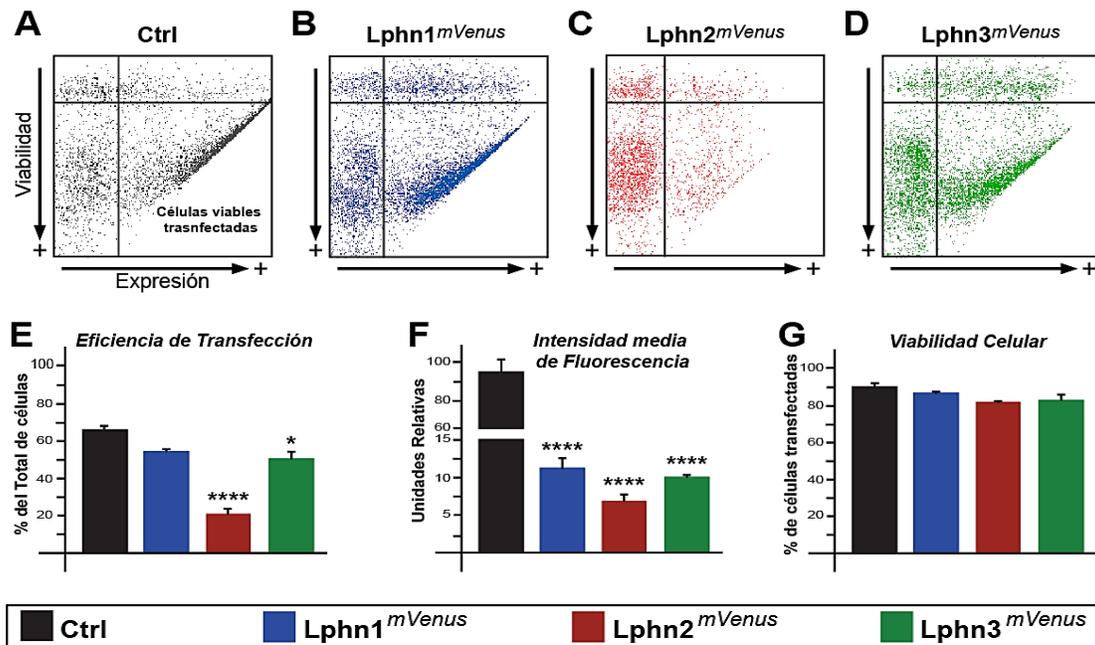


Figura 8. Caracterización por citometría de flujo del sistema celular transfectado. A-D Imágenes representativas de las poblaciones de células HEK293T transfectadas con las tres isoformas de Lphn^{mVenus} independientemente, evaluadas por citometría de flujo. Se determinaron la eficiencia de transfección (E), la intensidad media de fluorescencia (F) y la viabilidad celular (G). Las gráficas muestran el promedio de al menos 3 experimentos independientes considerando 20 000 eventos en cada caso. Las barras de error representan el error estándar de la media. La significancia estadística se determinó por medio de ANOVA de una vía con prueba de SIDAK.

7.2 Latrofilina provoca redondeamiento con disminución de las dimensiones celulares

Con la seguridad de que tanto la sobreexpresión de Latrofilina como el proceso mismo de transfección son seguros para la sobrevivencia celular en la línea HEK293T, se observaron y posteriormente se cuantificaron por microscopía confocal los cambios morfológicos derivados de este proceso considerando al menos 30 células en 3 o más experimentos independientes (Figura 9A-D); encontrando que las células con sobreexpresión de Lphn^{mVenus} presentan dimensiones celulares de área y perímetro tanto celular como nuclear significativamente menores que el control, resultando en un área

citoplasmática disminuida (Figura 9E-I). Por otra parte, la altura celular aumenta significativamente respecto al control cuando se sobre expresa *Lphn^{mVenus}* (Figura 9J), es decir que las células estarían adquiriendo forma esférica en vez de permanecer aplanadas y extendidas como la clásica morfología epitelial de esta línea celular.

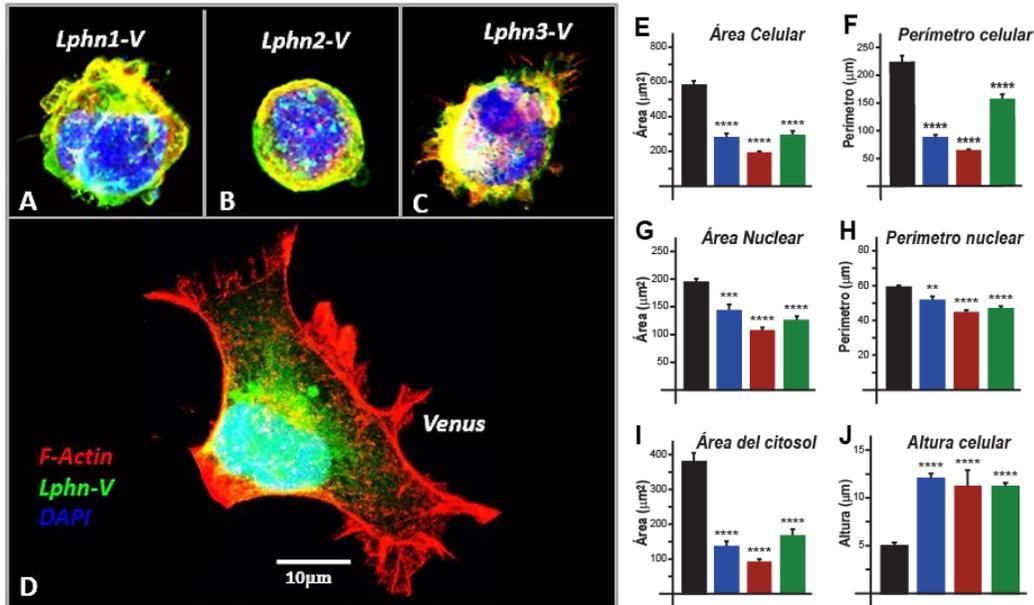


Figura 9. Efecto sobre la morfología celular de Latrofilina sobre expresada. (A-C) Observación microscópica de células HEK293T transfectadas con las tres isoformas de Latrofilina de manera independiente. En (D) se observa una célula HEK293T transfectada con *mVenus* como control. La barra blanca representa 10μm en todas las imágenes. Las gráficas (E-J) muestran los resultados de al menos 3 experimentos independientes de la medición de las dimensiones celulares y nucleares de dichas células transfectadas.

Para lograr un análisis a nivel poblacional se realizaron mediciones por citometría de flujo considerando únicamente células viables transfectadas (Figura 10 A-D) de al menos 3 experimentos independientes y capturando 20 000 eventos; considerando el parámetro FSC-A como la representación del volumen celular ya que corresponde a la medición del haz de luz en la misma dirección en la que es emitido en el citómetro y el parámetro SSC-A como la complejidad celular interna debido a que corresponde a la desviación del haz de luz al chocar con las estructuras intracelulares.

En la figura 10 se muestra que las células que sobreexpresan alguna de las 3 isoformas de *Lphn*^{mVenus} presentan volumen significativamente mayor que las células control transfectadas con *mVenus* (Figura 10 A,B , E -H), corroborando los hallazgos de microscopía confocal; además de tener mayor complejidad interna en el caso de la sobre expresión de *Lphn1*^{mVenus} y *Lphn3*^{mVenus}

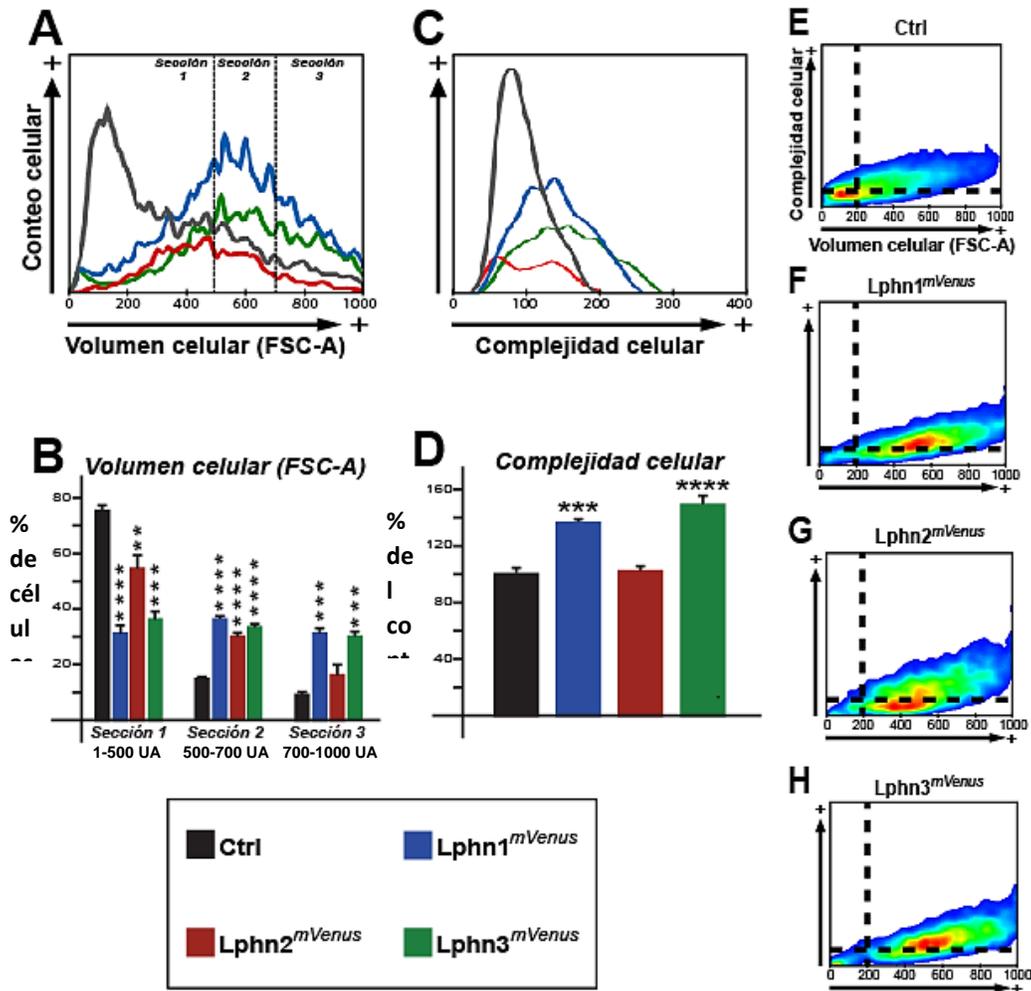


Figura 10. La sobreexpresión de Latrofilina aumenta el volumen y la complejidad celular. Se transfectaron poblaciones celulares HEK293T de manera independiente con las 3 isoformas de Latrofilina y se realizaron mediciones por citometría de flujo a las 48 horas post-transfección considerando 20 000 eventos. **A)** Histograma representativo de al menos 3 experimentos independientes del volumen celular con su respectiva cuantificación mostrada en la gráfica **B)**. Histograma y cuantificación de complejidad celular expresado como porcentaje respecto al control de *mVenus* (**C)** y (**D)**. Mapas de calor que muestran la distribución de la densidad poblacional de

las células transfectadas con $Lphn^{mVenus}$ o Venus como control (E-H). UA: Unidades arbitrarias. ANOVA de una vía con prueba de SIDAK. $P < 0.05$.

7.3 Latrofilina modifica la presencia de estructuras dependientes de actina

Se encontró por microscopía confocal que la sobre expresión de $Lphn^{mVenus}$ en células HEK293T además de modificar las dimensiones celulares, también provoca el reordenamiento del citoesqueleto de actina.

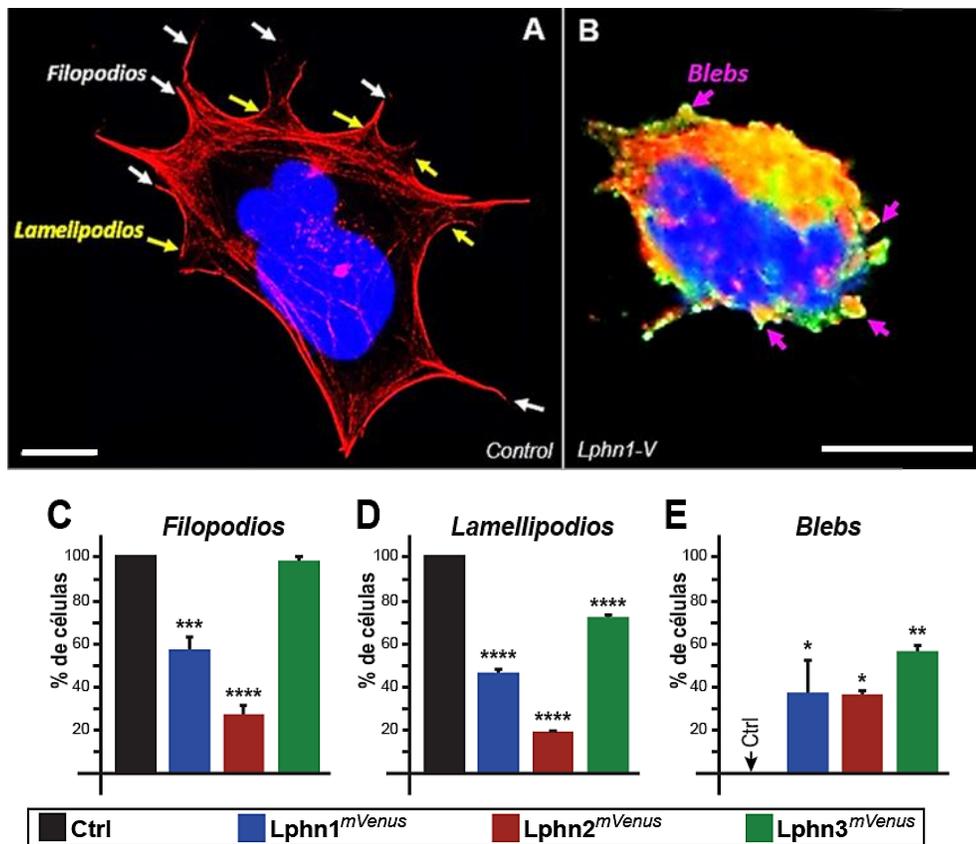


Figura 11. Reestructuración de los microfilamentos y de las estructuras dependientes de actina por la sobreexpresión de Latrofilina. Las células HEK293T se sembraron en cubreobjetos previamente incubados con medio condicionado de la misma línea celular; posteriormente se transfectaron independientemente con las 3 isoformas de $Lphn^{mVenus}$ y con el control de $mVenus$. A las 48 hrs post-transfección se fijaron con PFA y se tiñeron con faloidina rodaminada y DAPI, finalmente se tomaron las imágenes por microscopía confocal. **A)** Micrografía confocal muestra la

morfología normal y estructuras dependientes de actina de una célula HEK 293T sin transfectar. **B)** Imagen representativa de una célula HEK293T con la sobreexpresión de Latrofilina. **C) - E)** Cuantificación de las células con estructuras dependientes de actina, se muestran los resultados de al menos 3 experimentos independientes. F-Actina en rojo teñida con Faloidina Rodaminada, en verde Latrofilina *mVenus*, núcleos en azul teñidos con DAPI. La barra representa 10µm. ANOVA de una vía con prueba de SIDAK. P<005.

Las poblaciones celulares que sobre expresan al Lphn1 y 2 presentan menor porcentaje de individuos con lamelipodios, mientras las tres isoformas sobreexpresadas llevan a la disminución significativa de células con filopodios (Figura 11A-D); ambas estructuras dependientes de actina presentes de manera normal en este tipo celular. Adicionalmente, la sobreexpresión de Lphn provocó la formación de blebs, lobulaciones membranales que no se encontraron en ninguna de las células control estudiadas (Figura 11B y D).

7.4 Latrofilina interactúa físicamente con F-actina

Las imágenes de microscopía confocal mostraron sobreposición entre los colores correspondientes a F-actina (en rojo) y a *Lphn^{mVenus}* (en verde), resultando en un color amarillo intenso (Figura 11B y 12A). Los resultados positivos del análisis de colocalización de Pearson (método que permite evaluar cuantitativamente la posible cercanía entre pixeles emitidos por fluoróforos ubicados sobre diferentes proteínas), sugieren que las tres isoformas de Lphn podrían estar interactuando físicamente con F-actina tenida con rodamina-faloidina, y participar de esta manera en la remodelación del citoesqueleto de actina inducida por el receptor al ser sobre expresado (Figura 12B).

Esta hipótesis fue corroborada por estudios de co-inmunoprecipitación, encontrando que la inmunoprecipitación de actina trae consigo al receptor sobreexpresado Lphn (Figura 12C y D), es decir, que efectivamente Lphn interactúa físicamente con actina en un complejo supramolecular en las células HEK293T.

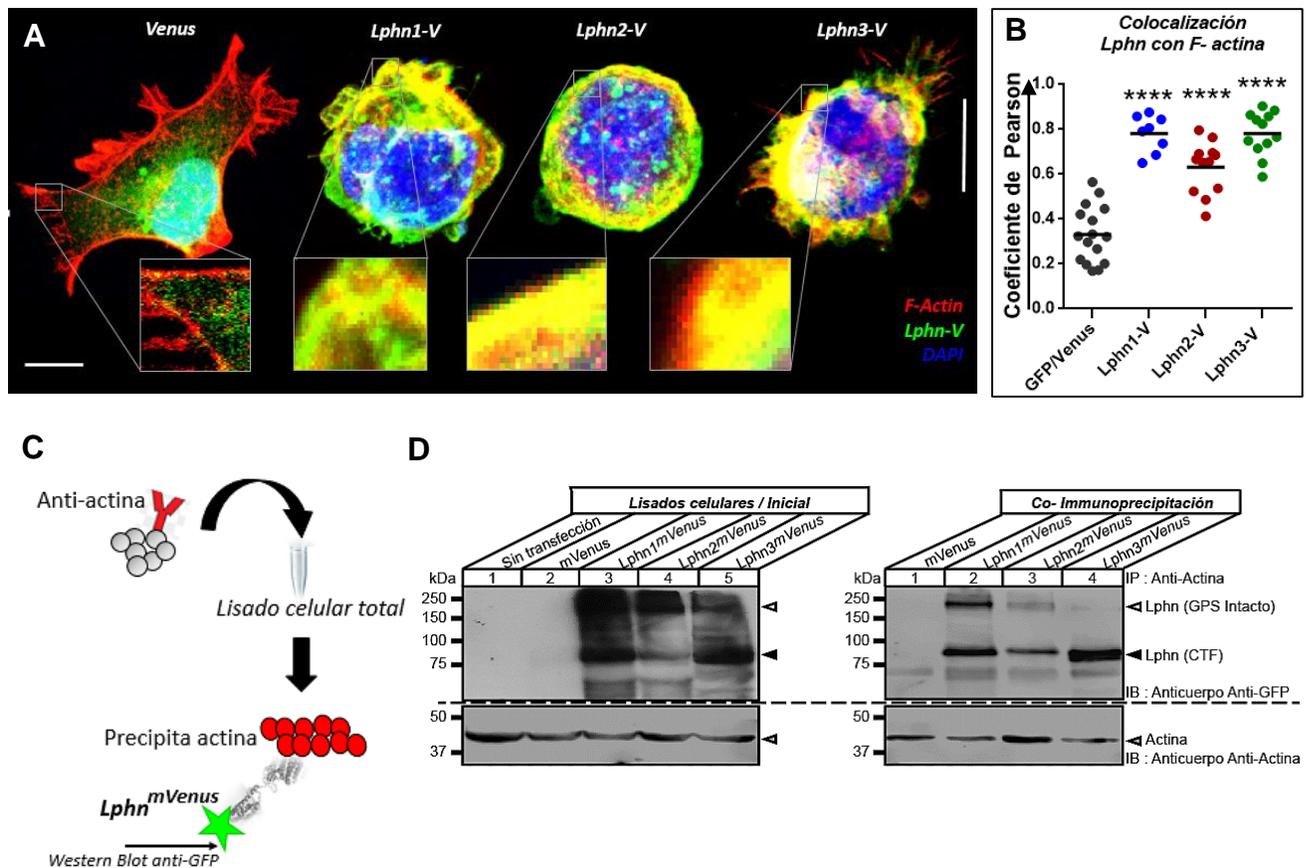


Figura 12. Interacción física de Latrofilina con F-Actina. Se sembraron células HEK293T en cubreobjetos pre-incubados con medio condicionado de su misma estirpe celular; posteriormente se transfectaron independientemente con las 3 isoformas de Lphn^{mVenus} y con el control de mVenus. A las 48 hrs post-transfección se fijaron con PFA y se tiñeron con faloidina rodaminada y DAPI, finalmente se tomaron las imágenes por microscopía confocal. Se muestra en **A)** la sobreposición de los canales rojo y verde correspondientes a F-actina y a mVenus, respectivamente; en **B)** se observa el análisis de la cercanía de los pixeles de estos canales por medio del coeficiente de colocalización de Pearson obtenido en el software Leica LAS-AF del microscopio confocal. **C) y D)** corresponden a los ensayos de co-inmunoprecipitación de actina con Lphn, en los que se lisaron a las células 48 horas post-transfección y se incubaron con anticuerpo anti-actina unido a perlas de sefarosa para precipitar actina, se realizaron lavados a estas perlas para eliminar los demás componentes celulares y se realizó western Blot revelando con anti-GFP para identificar si en el precipitado de actina se encontraba unida también Lphn. Tanto los experimentos de microscopía confocal como los de co-inmunoprecipitación indican que Lphn se encuentra físicamente unida a actina. Imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes. La barra representa 10 μ m. ANOVA de una vía con prueba de SIDAK. P < 0.05.

7.5 El extremo CTF de Latrofilina es necesario para estabilizar su interacción funcional y física con el citoesqueleto de actina

Se utilizaron mutantes de Latrofilina con delección del CTF para investigar qué fragmento es el responsable de sus efectos sobre el citoesqueleto de actina (Lphn^{ECD}) (Figura 13 A y B). Los análisis por microscopía confocal de células transfectadas fijadas revelaron que la expresión de las construcciones que carecen del CTF provocan una recuperación parcial del perímetro celular, observando en estas poblaciones celulares un promedio de 65% veces la magnitud del control contra un 30% que se observa transfectando el receptor completo en el caso de Lphn1, y un 55 % contra 25% en el caso de Lphn2, no mostrando diferencia significativa en el área celular ni en las dimensiones nucleares de Lphn1 y 2, o en alguna dimensión celular con Lphn3. Concluyendo que el CTF de Lphn es necesario para la disminución del perímetro celular (Figura 13 C-N).

Así mismo, se encontró que el CTF es fundamental para la remodelación de las estructuras dependientes de actina. Los filopodios se recuperaron totalmente al eliminar el CTF de Lphn1 y 2; adicionalmente, se observó una recuperación parcial de los lamelipodios en las tres isoformas, presentándose poblaciones celulares con 65, 70 y 95% de células con estas estructuras para Lphn1, 2 y 3 respectivamente. Además, los blebs desaparecieron por completo al sobre expresar solo el extremo NTF de los receptores Lphn1 y 3 y disminuyendo significativamente en el caso de la sobre expresión de Lphn2^{ECD}.

Para conocer si la interacción física de Lphn con actina es dependiente de su CTF, se analizó el coeficiente de colocalización de Pearson (Figura 14A) entre Lphn^{ECD} y F-actina en las imágenes de microscopía confocal, así como ensayos de co-inmunoprecipitación de Lphn^{ECD} con actina total (Figura 14B). Ambos análisis mostraron que el CTF es necesario para la formación del complejo molecular entre actina y Lphn1 y 3, ya que la colocalización de ambas isoformas con actina se pierde con las construcciones Lphn^{ECD}. En el caso de Lphn2 la colocalización se mantiene sugiriendo que aún sin su CTF el receptor es capaz de interactuar físicamente con F-actina, sin embargo, es posible que esta interacción no sea tan estable ya que ambas proteínas no precipitan juntas (Figura 14A y B).

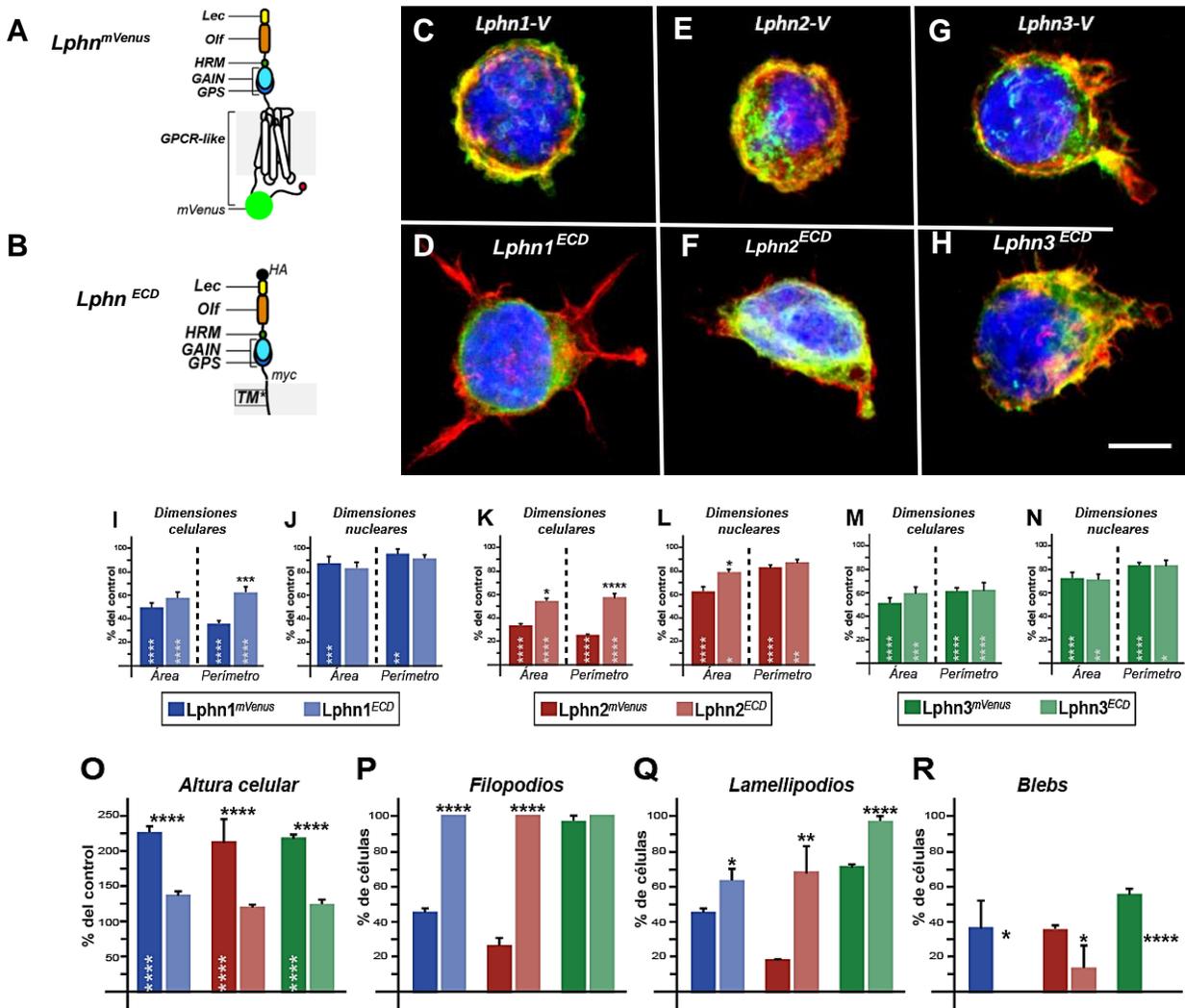


Figura 13. La interacción funcional entre latrofilina y el citoesqueleto de actina se desestabiliza sin el extremo CTF de Latrofilina. Se cultivaron células HEK293T en cubreobjetos previamente incubados con medio condicionado de la misma línea celular; se transfectaron independientemente con las 3 isoformas de *Lphn^{mVenus}* (A), con el control de mVenus y con las construcciones *Lphn^{ECD}* que carecen del CTF del receptor (B). A las 48 hrs post-transfección se fijaron con PFA y se tiñeron con faloidina rodaminada y DAPI, finalmente se tomaron las imágenes por microscopía confocal (C-H), cuantificando las dimensiones celulares y nucleares (I- N) así como las estructuras dependientes de actina (O-R). Imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes. La barra representa 10 μ m. ANOVA de una vía con prueba de SIDAK. P<005.

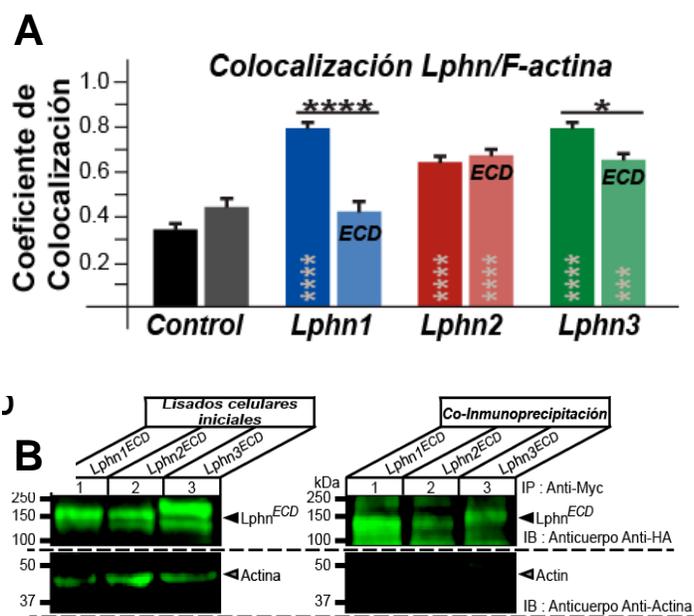


Figura 14.

La interacción física latrofilina – F-actina se desestabiliza en ausencia del CTF de latrofilina. Se transfectaron células HEK293T con las 3 isoformas completas de Lphn y por otra parte con las mutantes por delección de su CTF. Se analizó la interacción física entre Lphn y actina en las poblaciones celulares por microscopía confocal (A) y por co-inmunoprecipitación (B). Imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes. La barra representa 10µm. ANOVA de una vía con prueba de SIDAK. P<005.

7.6 Latrofilina activada por ligando en procesos de adhesión celular modula la remodelación en el citoesqueleto de actina

Una vez que se caracterizó la actividad constitutiva de la sobre expresión de Lphn en la remodelación del citoesqueleto de actina, el siguiente paso fue determinar si estos efectos prevalecen cuando el receptor es activado por ligando; para esto, se realizaron ensayos de adhesión entre células con Lphn y células que expresaban al ligando Teneurina 4 de manera transmembranal y en relación 1:1 de ligando:receptor, en el mismo sistema heterólogo de células HEK293T. A las 48 horas post-transfección, se desprendieron de su placa de cultivo y se incubaron juntas ambas poblaciones celulares a temperatura ambiente, con agitación suave y medio de cultivo adecuado para asegurar su sobrevivencia y favorecer la formación de adhesiones trans-celulares. Los agregados formados después de 120 min de incubación se sembraron en cubreobjetos previamente recubiertos con medio condicionado de la misma línea celular, donde permanecieron durante 3 horas para permitir la adhesión a la matriz extracelular; finalmente, se fijaron con PFA y se tiñeron con faloidina –rodamina para observar el citoesqueleto de actina, con DAPI para observar los núcleos y con anticuerpo anti HA para observar a Teneurina-4. Las células así preparadas se analizaron por medio de microscopía confocal como se muestra en la figura 15.

Los análisis de las dimensiones celulares evaluadas por microscopía confocal revelaron que la interacción intercelular de Lphn1-3 con Ten4 disminuye significativamente las dimensiones celulares y nucleares; como se muestra en la Figura 15 paneles E-H, el área celular disminuye de un 50% a un 30% del control en el caso de Lphn1, de un 50% a un 25% en el caso de Lphn3 y no presenta cambios estadísticamente significativos para la isoforma 2; con respecto al perímetro celular solo se presenta disminución estadísticamente significativa para la isoforma 3 siendo ésta de un 60 a un 30%; así mismo, el área nuclear disminuye del 80 al 50% en el caso de Lphn1 y del 70 al 40% para Lphn3, sin encontrarse cambios en Lphn2; mientras que el perímetro celular disminuyó en un 20% aproximadamente en las 3 isoformas.

Por otra parte, la interacción de Lphn con su ligando Ten-4, induce el rescate parcial de estructuras dependientes de actina, recuperando la proporción de la población celular que presenta filopodios en el caso de las isoformas 1 y 2 del 55 al 90% y del 20 al 85% respectivamente; lamelipodios del 15 al 70% en Lphn2, mientras que los blebs disminuyeron del 50 al 10% para la isoforma 3.

Finalmente, como se muestra en la figura 15L, el coeficiente de colocación de Pearson disminuyó significativamente en los tres casos, encontrándose de 0.75 a 0.4 en Lphn1, de 0.6 a 0.35 para Lphn2 y de 0.65 a 0.5 en el caso de Lphn3. Estos resultados indican que la cercanía intracelular entre Lphn y actina se ha perdido tras su activación con Ten4.

7.7 El factor de despolimerización de actina *Cofilina* participa en la señalización de Latrofilina que promueve la remodelación del citoesqueleto de actina.

Con el fin de identificar cuáles son los determinantes moleculares que intervienen en la dinámica del citoesqueleto de actina específicamente desde la señalización por Latrofilina, investigamos como se encuentra la activación del factor de despolimerización de actina *Cofilina*.

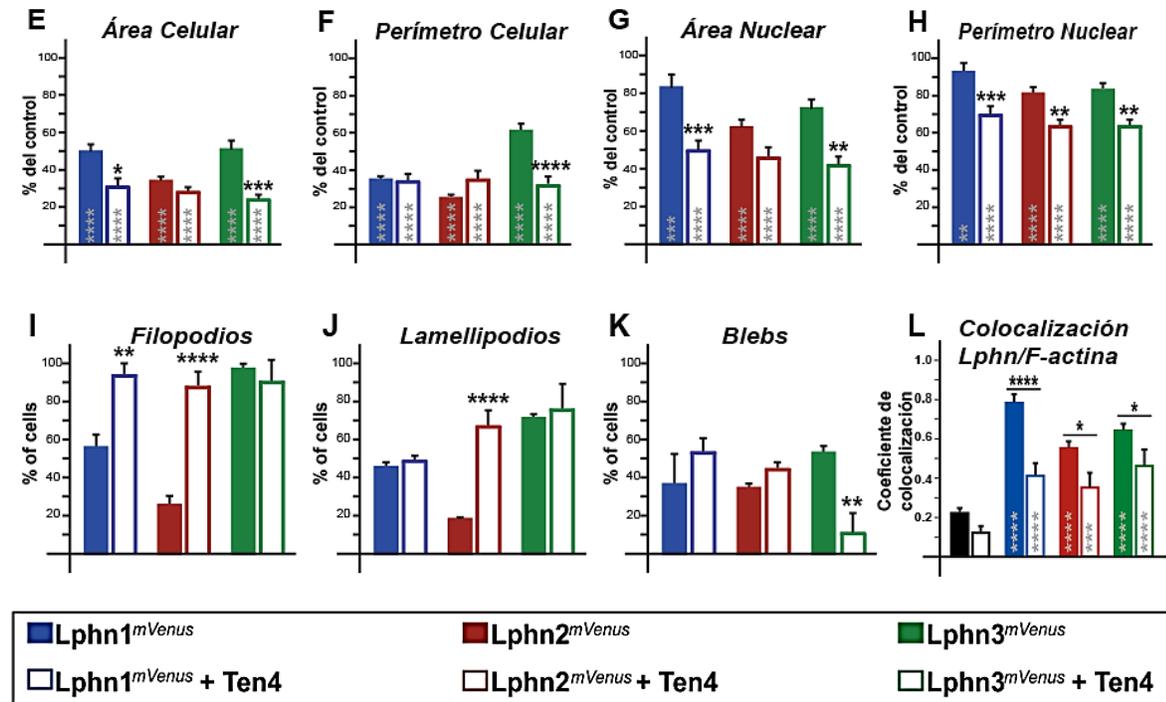
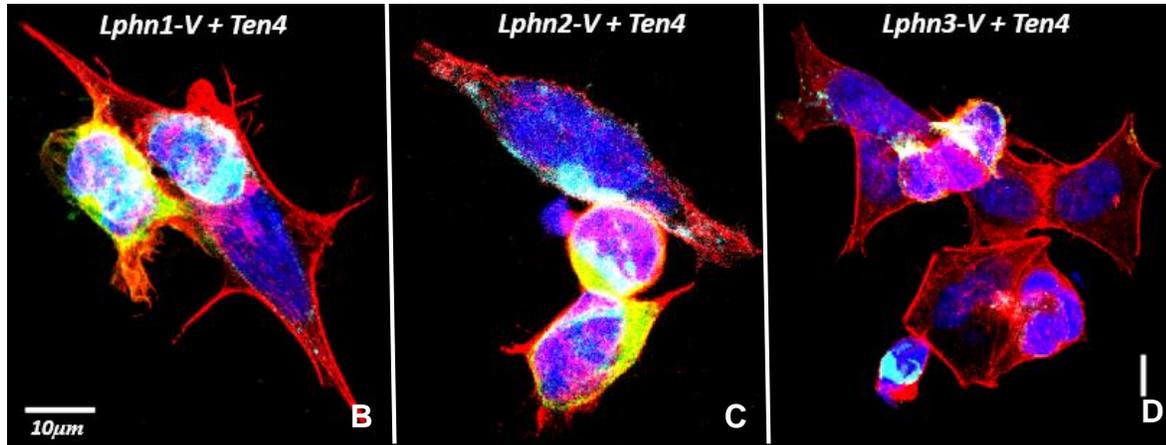
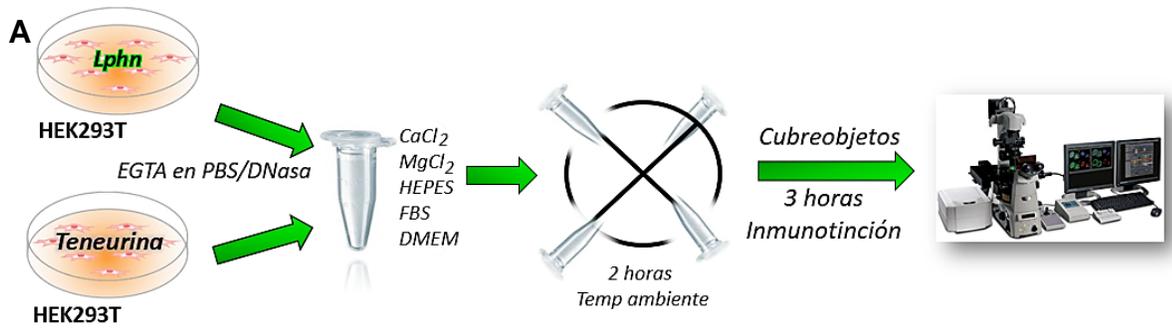


Figura 15. Activación de Latrofilina por Teneurina 4 y su efecto sobre el citoesqueleto de actina. Como se muestra en el panel A), se transfecaron independientemente células HEK293T con las tres

isoformas de Lphn y con su ligando Ten4 de expresión transmembranal; a las 48 horas post-transfección se levantaron de las placas de cultivo y se mezclaron células con la sobre expresión del receptor y células con la sobre expresión de su ligando, cada isoforma de Lphn por separado. Se incubaron a temperatura ambiente, con agitación suave y medio adecuado para favorecer la sobrevivencia celular y la formación de adhesiones transcelulares durante 120 min, se sembraron en cubreobjetos pre-incubados con medio condicionado de la misma línea celular donde permanecieron por 3 horas, se fijaron con PFA, se tiñeron con faloidina rodaminada, DAPI y anti-HA y se analizaron por microscopía confocal. **B-D** imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes, en los que se analizaron las dimensiones celulares (**E-H**), las estructuras dependientes de actina (**I, J, K**) y la colocalización de Lphn con F-actina. La barra representa 10µm. ANOVA de una vía con prueba de SIDAK. P<005.

Los análisis por Western Blot muestran que en las células que sobre expresan Lphn1 y 2 la expresión de Cofilina total tiende a incrementarse en 1.5 y 2 veces la magnitud del control respectivamente; mientras que para Lphn3 se presenta un incremento estadísticamente significativo de 3 veces magnitud de expresión del control (Figura 16 A y C).

En la figura 16 B y D se muestra que los niveles de cofilina fosforilada en serina-3, forma inactiva de esta proteína, disminuyen significativamente en las células transfectadas con Lphn, presentando valores del 0.6, 0.2 y 0.18 veces la magnitud del control para Lphn1^{mVenus}, Lphn2^{mVenus} y Lphn3^{mVenus}, respectivamente; indicando que al sobre expresar al receptor Lphn se favorece la activación de la proteína de unión a actina cofilina, como se observa en la figura 16 E.

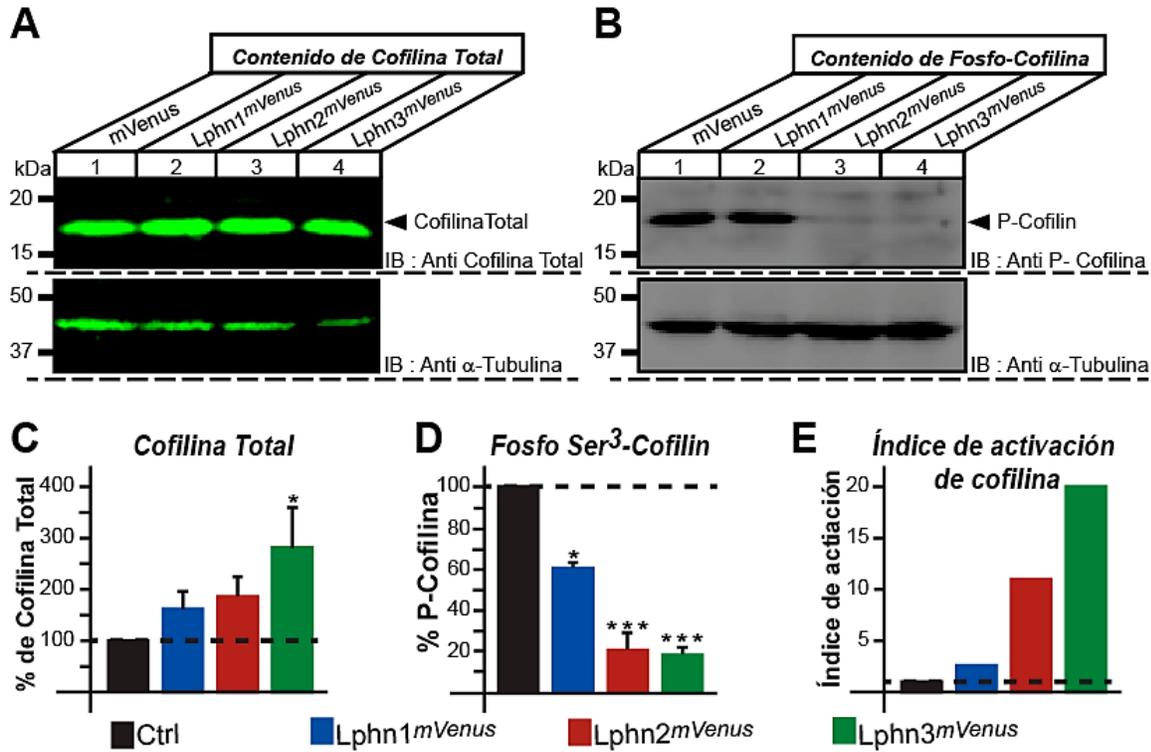


Figura 16. Activación de cofilina por la sobreexpresión de Latrofilina. Se transfectaron de manera independiente células HEK293T con las 3 isoformas de Latrofilina, a las 48 horas post-transfección se realizó la lisis celular y se analizaron por Western Blot tanto el contenido de cofilina total (**A y C**) como la cofilina inactiva fosforilada (**B y D**), ambas determinaciones a partir de los lisados celulares totales. Finalmente se calculó el índice de activación de cofilina (**E**). Se muestran imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía con prueba de SIDAK. $P < 0.05$.

7.8 La señalización por $G\alpha_i$ participa en la remodelación del citoesqueleto de actina inducida por la Lphn1 y 3.

Latrofilina forma parte de los receptores de adhesión acoplados a proteínas G, por lo tanto, la siguiente etapa en la presente investigación consiste en evaluar la posible participación de la subunidad $G\alpha_i$ o sus efectores río abajo en la señalización que modula la remodelación del citoesqueleto de actina inducida por latrofilina.

Las células HEK293T transfectadas con las 3 isoformas de Lphn^{mVenus} se incubaron durante 16 horas con Toxina Pertusis, inhibidor de $G\alpha_i$, previo al análisis a las 48 horas post-transfección.

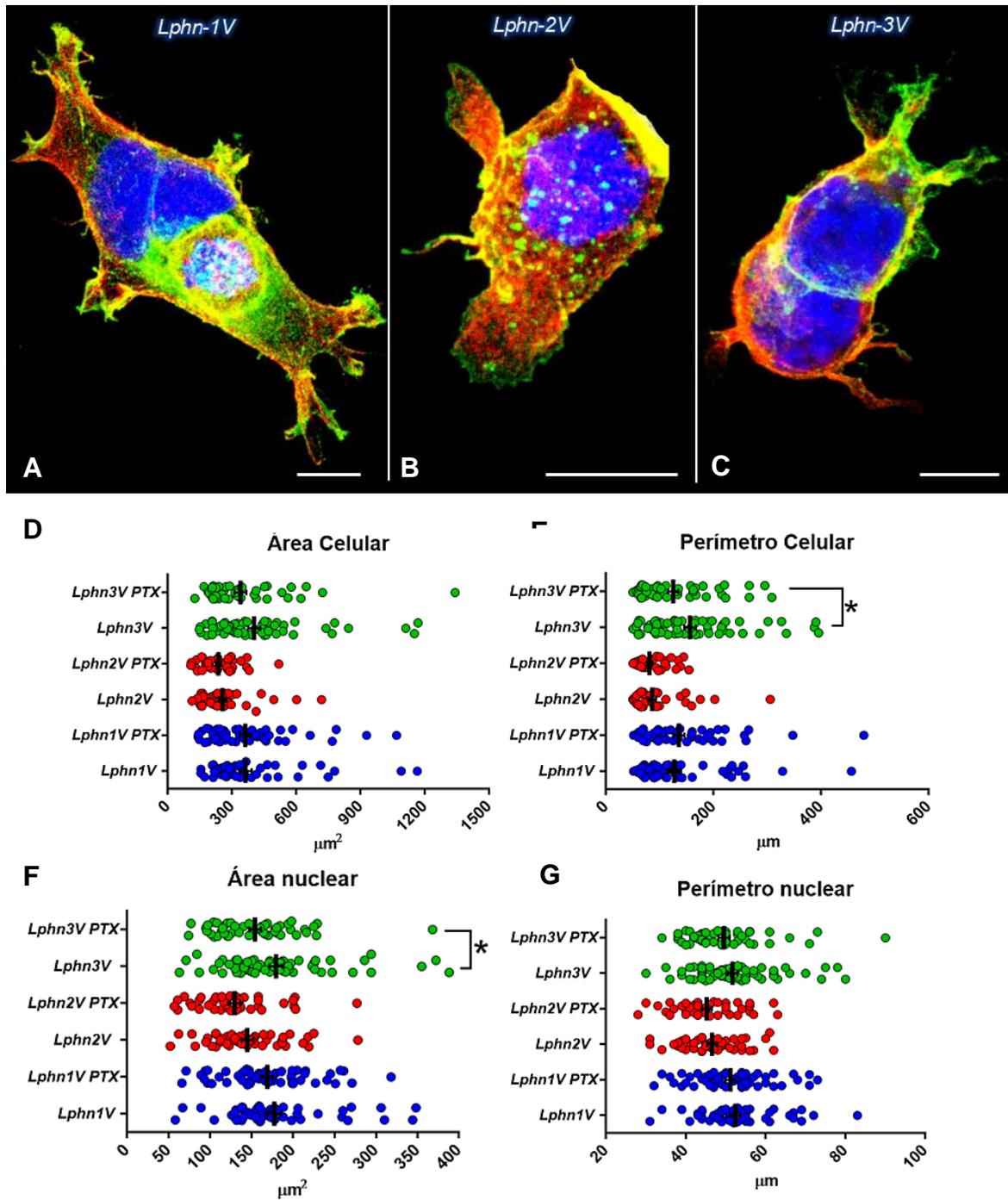


Figura 17. Efecto de la inhibición de $G_{\alpha i}$ sobre las dimensiones celulares en presencia de Latrofilina.

Se sembraron células HEK293T en cubreobjetos pre-incubados con medio condicionado de su misma estirpe celular; posteriormente se transfearon independientemente con las 3 isoformas de $Lphn^{mVenus}$ y con el control de $mVenus$. A las 32 horas post-transfección se incubaron con toxina pertusis durante 16 horas. A las 48 horas post-transfección se fijaron con PFA y se tiñeron con faloidina rodaminada para observar el citoesqueleto de actina (rojo) y DAPI (azul) para observar los núcleos celulares. Finalmente se

tomaron las imágenes por microscopía confocal. **A-C.** Imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes. **D-G** análisis de las dimensiones celulares. La barra representa 10µm. ANOVA de una vía con prueba de SIDAK. P<005.

Los análisis de las dimensiones celulares realizados por microscopía confocal muestran que la incubación con PTX en las células que sobre expresan *Lphn3^{mVenus}* promueve el incremento del perímetro celular y área nuclear significativamente con respecto a las células que no tuvieron contacto con este inhibidor de Gα_i. Por otra parte, en la sobre expresión de Lphn1 y 2 no se encontró efecto alguno sobre las dimensiones celulares tras la incubación con PTX (Figura 17).

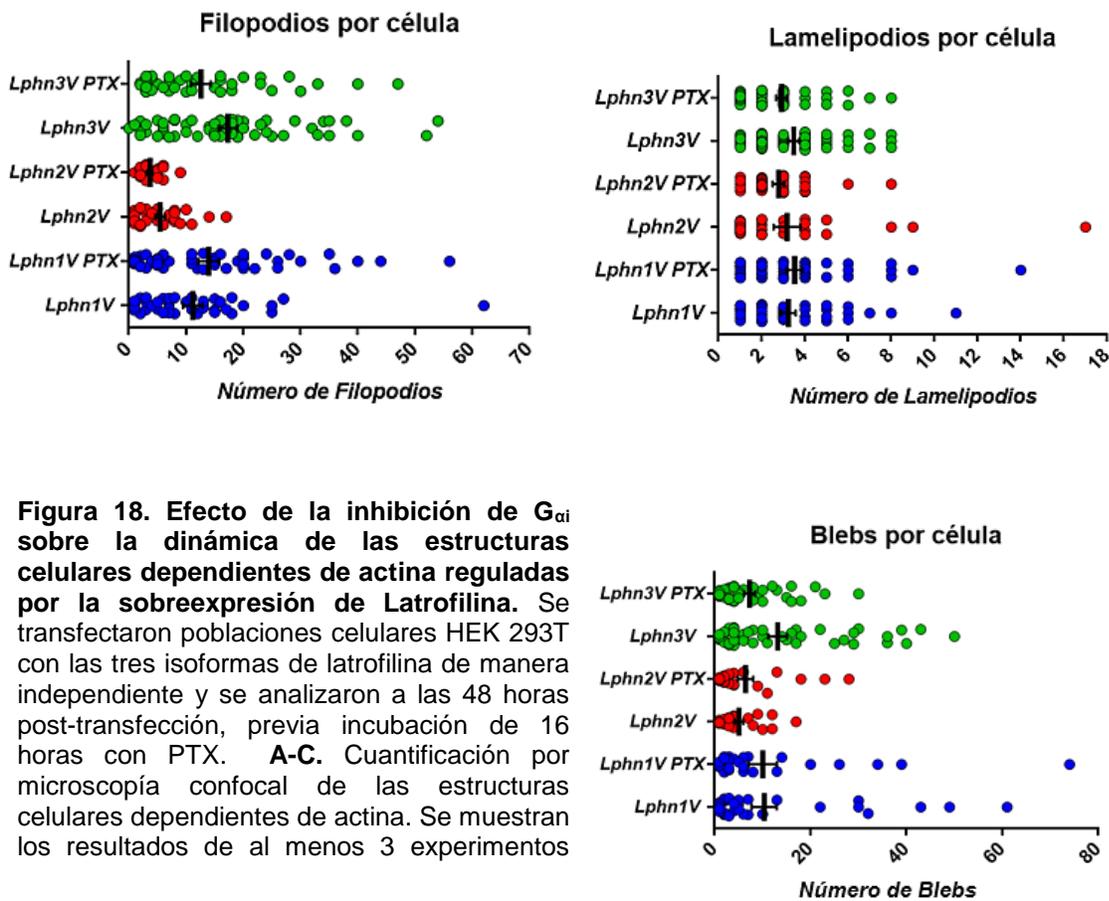


Figura 18. Efecto de la inhibición de G_{αi} sobre la dinámica de las estructuras celulares dependientes de actina reguladas por la sobreexpresión de Latrofilina. Se transfectaron poblaciones celulares HEK 293T con las tres isoformas de latrofilina de manera independiente y se analizaron a las 48 horas post-transfección, previa incubación de 16 horas con PTX. **A-C.** Cuantificación por microscopía confocal de las estructuras celulares dependientes de actina. Se muestran los resultados de al menos 3 experimentos

Las estructuras dependientes de actina presentes por célula responden diferencialmente a la incubación con toxina pertusis (Figura 18). Los filopodios y lamelipodios no muestran efecto alguno en Lphn2 y 3; por otra parte, en el caso de Lphn1, la población celular con mayor número de filopodios aumenta con la incubación de PTX, sin que se vea afectada la cantidad de lamelipodios por célula en esta isoforma. Además, la cantidad de blebs por célula disminuye a nivel poblacional cuando se incuba con PTX a las células transfectadas con Lphn1 y 3, no encontrando diferencias en esta estructura para el caso de Lphn2

Los resultados obtenidos sugieren que la señalización por $G\alpha_i$ participa en la modulación por Lphn1 de las estructuras dependientes de actina del tipo de filopodios y blebs, así como en regulación de las dimensiones celulares inducida por Lphn3 además de la generación de blebs con esta misma isoforma.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) constituyen una de las más amplias familias de proteínas que se conocen, constituyendo entre el 3-5 % del total de las proteínas que se codifican en distintas especies (García Sainz, 2011). De las 5 subfamilias de GPCR que existen, la sub familia de los receptores de adhesión (aGPCR) es la menos estudiada hasta el momento. Se ha reportado la participación de los aGPCR en distintos procesos celulares sin conocer en su totalidad los mecanismos por los cuáles se activan y realizan sus funciones específicas.

Dentro de los aGPCR´s se encuentra la familia de las Latrofilinas, proteínas de adhesión para las que se han identificado hasta el momento 4 clases de ligandos endógenos: teneurinas, neurexinas, FLRT y contactinas; así como su papel en procesos fisiológicos tales como la estabilización de las sinapsis, la liberación de insulina y función mecano receptora; además de verse involucradas en eventos patofisiológicos cuando sufren mutaciones, tales como síndrome de déficit de atención con hiperactividad, esquizofrenia, espectro autista, trastorno bipolar, entre otros, así como en el desarrollo de procesos cancerígenos (Moreno-Salinas y cols;2019). Por lo tanto, desde su identificación como uno de los blancos para la α -latrotoxina de la araña viuda negra, hasta la fecha, Latrofilina se ha convertido sin duda en una de las proteínas receptoras más importantes de nuestros tiempos; sin embargo aún no se han identificado con precisión como puede ser capaz de participar en todos estos procesos, si lo hace en forma directa o a través de la activación de vías de señalización específicas ya conocidas o algunas que quedan por descubrir, o incluso si su actividad puede darse de manera constitutiva o si es absolutamente necesaria la unión de sus ligandos.

Es por ello que en el presente trabajo se diseña, estandariza e implementa un sistema celular heterólogo en la línea HEK293T a través de la transfección de las tres isoformas de Lphn presentes en mamíferos acopladas a la proteína fluorescente *mVenus*. Dicho sistema permite estudiar el comportamiento celular en presencia de Lphn, enfocándonos aquí en la morfología celular y la relación que tiene el receptor con el citoesqueleto de actina por medio ensayos de inmunofluorescencia con observación y análisis por microscopía confocal, inmunoprecipitación, western blot y citometría de flujo, además de

identificaron 2 bandas en la zona esperada para el CTF de los receptores siendo más evidentes en *Lphn3^{mVenus}*, mismas que podrían producirse debido a modificaciones post-traduccionales que a su vez influencien en el patrón de corrimiento electroforético de los receptores debido a la carga adicional negativa de los grupos PO_4^- en el caso de las fosforilaciones o grupos OH^- en el caso de glicosilaciones, entre otras posibilidades. Efectos similares fueron observados en 2019 por el grupo de Uskaryov, reportando la presencia de más de una banda en el CTF de *Lphn1* dependiendo de los tratamientos de extracción de las muestras, comprobándose en todos los casos que las diferentes bandas corresponden a distintos estados de fosforilación en esta zona del receptor (Figura 20; Rahman y cols.; 2019). Adicionalmente, en *Lphn* encontramos un sitio de *N*-Glicosilación $^{1076}\text{NES}^{1078}$ correspondiente a la tercera asa extracelular de su fragmento C-Terminal (gpccrdb.org; uniprot.org); secuencia que no se encuentra presente en ninguna de las otras dos isoformas.

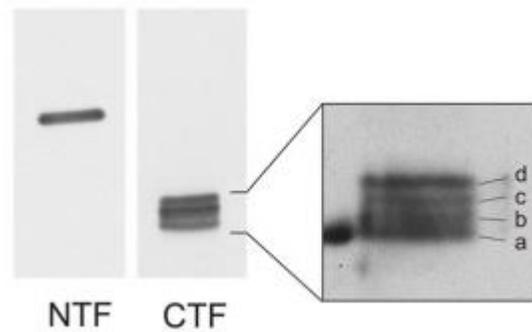


Figura 20. Fosforilaciones del CTF de *Lphn*. (Rahman y cols.; 2019)

Las construcciones plasmídicas de las 3 isoformas de *Lphn* que se utilizaron en este trabajo tenían acoplada a la proteína Venus fluorescente en el tallo carboxilo intracelular, lo cual nos permitió darle seguimiento por microscopía confocal al receptor sin necesidad de aplicar una tinción extra, así como identificarlo fácilmente en los ensayos de western blot y co-inmunoprecipitación. Para asegurar que esta estrategia molecular no interfiera con las funciones propias del receptor colocamos en todo momento un control que consistió en células que expresaban únicamente a *mVenus* con el que se

compararon todos los efectos mostrados por las Latrofilinas. Además, en 2017 el grupo de trabajo del Doctor Thomas C. Südhof demostró que la inserción de Venus a Lphn2 no afecta su localización en el sistema nervioso central ni sus funciones fisiológicas; en dicho estudio, los autores demostraron que la delección de Lphn2 resulta letal para ratones homocigotos, mientras que si se encuentra presente Lphn2^{mVenus}, un porcentaje significativo de ratones homocigotos sobrevive, y los heterocigotos mejoran también su tasa de sobrevivencia (Anderson y cols.;2017).

En los ensayos de microscopía confocal reportamos que las dimensiones celulares y nucleares de las células HEK293T que sobre expresan Lphn disminuyen significativamente respecto al control de células transfectadas solo con *mVenus*, vistas en dos dimensiones y en el plano de la matriz extracelular (Figura 9), hallazgos concordantes con los estudios de Husic y cols. en 2019 (Figura 21), en los que se muestra una clara disminución de las dimensiones celulares en la línea celular HEK293 con transfección estable de la parte transmembranal y extracelular de Lphn1, así como disminución de la expresión de F-actina y de estructuras dependientes de este citoesqueleto.

Así mismo, en el grupo de trabajo de Husic y cols; en 2019 se ha observado el rescate parcial de las dimensiones celulares y de estructuras de actina de manera general al activar a una construcción de Lphn1 que no cuenta con su porción citoplasmática, por la incubación del fragmento del tallo terminal T-CAP de Teneurina producido de manera recombinante; a diferencia del presente trabajo en que se realizaron estos ensayos de manera transcelular con poblaciones celulares transfectadas independientemente con la estructura completa tanto de las 3 isoformas de Lphn como de Teneurina-4.

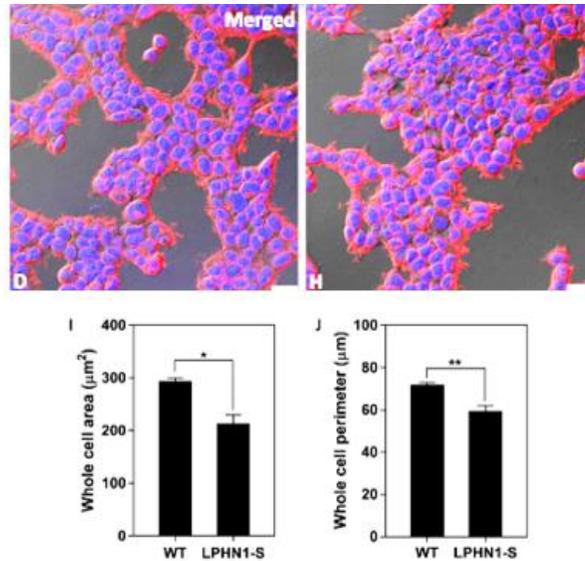


Figura 21. La sobre expresión de Lphn reduce el área y el perímetro celular.
(Husic y cols.; 2019)

Por otra parte, el aumento en la altura celular indica que las células no disminuyen su tamaño total, sino que sufren un reordenamiento de su estructura resultando en el cambio de forma con tendencia hacia la esférica, es decir, cambian desde la morfología epitelial característica de esta línea celular a una forma redondeada y esférica producto de la sobre expresión del receptor; hecho que se comprobó poblacionalmente con los ensayos de citometría de flujo en los que se observa claramente que las células positivas para *mVenus* acoplada al receptor, presentan mayor volumen que las células control (Figura 10).

Además de las diferencias morfológicas, las estructuras dependientes de actina como filopodios y lamelipodios en las células que sobre expresan Lphn disminuyen significativamente (Figura 11), sugiriendo su participación en las vías de señalización que regulan la remodelación de este citoesqueleto. Dado que Lphn pertenece a la súper familia de los GPCR, el presente estudio se enfocó en determinantes moleculares conocidos para estos receptores.

Los filopodios son protuberancias en forma de dedos ricas en actina que se han convertido en la clave para comprender cómo las células se comunican con su entorno. Varían de 60 a 200 nm de diámetro y contienen de 10 a 30 filamentos de actina (Gallop,

2019). Los lamelipodios son proyecciones membranales anchas en forma de lámina con grosor aproximado de 2-3 μm y longitud aproximada de 10 μm .

Durante el desarrollo del sistema nervioso, se inicia la protrusión de neuritas con proyecciones lamelipodiales y filopodiales, donde la actina guía las pistas de los microtúbulos para estabilizar la proyección de neuritas. El cono de crecimiento neuronal la guía axonal y su morfología se caracteriza por la proyección de filopodios, que se utilizan en respuesta señales de orientación. También proceden la arborización neuronal y la sinaptogénesis a través de los filopodios. Las sinapsis emergen de filopodios, que luego maduran en conexiones estabilizadas. Se han establecido similitudes entre las sinapsis neuronales y la señalización. Los filopodios generan gradientes de morfógenos. Durante el desarrollo temprano, filopodios especializados llamados citonemas transmiten directamente morfógenos bidireccionalmente hacia y desde los tejidos que se envían señales entre sí. Los filopodios también están involucrados durante la infección, capturando virus antes a la entrada de la célula y propagarlos entre ellas. Estructuras que se asemejan a los filopodios, llamados nanotubos tunelizados, se cruzan entre las células actuando como carreteras que transportan priones y orgánulos. Los exosomas navegan por los filopodios y entran en las células en los puntos calientes de endocitosis en la base de los filopodios, tal vez representando un mecanismo natural que es secuestrado por patógenos. Los filopodios juegan papeles mecánicos en diferentes tipos de procesos de adhesión. La acumulación de miosina-X en las puntas de los filopodios da como resultado la formación de una colección similar a un adhesoma de actina reguladora y mecanosensible en las células del cáncer de mama. Los Filopodios pueden cerrar las hojas epiteliales juntas, como en el cierre dorsal de *Drosophila*. Las cadherinas pueden localizarse en filopodios donde son responsables de la generación de la fuerza, por ejemplo, durante la compactación temprana en el embrión de ratón. Los filopodios puede actuar como 'dedos pegajosos' que ejercen fuerza a través interacciones adhesivas y actividad de miosina II. Por lo tanto, la adhesión está integrada tanto estructural como funcionalmente con los filopodios y sus papeles en el desarrollo.

Por su parte, los lamelipodios están involucrados en el movimiento de las células eucariotas en condiciones fisiológicamente normales como cicatrización de heridas,

respuesta inmune, desarrollo embrionario, entre muchas otras actividades celulares, así como en condiciones patológicas por ejemplo procesos de metástasis.

Para que sea posible formar estas estructuras dependientes de actina se requiere de la participación de un gran número de moléculas de diferente naturaleza y función biológica que interactúan entre sí regulando la participación y función del citoesqueleto de actina; estas moléculas van desde proteínas de andamiaje como la familia SHANK que favorecen la formación de complejos supramoleculares entre actina y otras proteínas, GTPasas pequeñas como RhoA, CDC42 y Rac que favorecen o desencadenan las vías de señalización necesarias con sus efectores río abajo; hasta proteínas de unión a actina que finalmente se encargan directamente de la dinámica de ensamblaje y desensamble del citoesqueleto de actina, tanto de las estructuras de formación citoplasmática como de las que interactúan con la membrana celular y con otros citoesqueletos como el de tubulina; entre las proteínas de unión a actina involucradas podemos mencionar al complejo ARP2/3, ENA, VASP, Filamina, Gelsolina, Talina o la familia de ADF/Cofilina, entre muchas otras. Adicionalmente, es importante mencionar la participación de la señalización de las proteínas G, que al activarse tras la unión de ligandos específicos confieren un mecanismo altamente regulado para la modulación del citoesqueleto de actina, efectuado a través de las vías de señalización río debajo de las diferentes subunidades como $G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_i$, $G\alpha_s$, entre otras.

La activación de la fosfoproteína de unión a actina Cofilina que se encontró tras la sobre expresión de Lphn, sus efectos coinciden con la remodelación de este citoesqueleto (Figura 16). La familia de ADF/Cofilina está integrada por Cofilina 1 de expresión ubicua, Cofilina 2 presente en las células musculares y las proteínas ADF presentes en diferentes tipos celulares; constituyendo un grupo de proteínas despolimerizantes de actina que participan en la dinámica de dicho citoesqueleto (Namme y cols; 2021). Las cofilinas son capaces de unirse al extremo (-) de los microfilamentos, desensamblan los monómeros de actina y evitan su reensamblaje, generando con esto fragmentos con más extremos (+) que pueden ser sitio de unión para otras proteínas como profilina o el complejo ARP2/3; de esta manera promueven el crecimiento de los filamentos de actina y la formación de estructuras dependientes de este citoesqueleto como lamelipodios, fibras

de estrés, filopodios, entre otras. La actividad de cofilina se encuentra altamente regulada por importantes factores y condiciones moleculares que favorecen o impiden su unión con actina, tales como el pH, la fosforilación y desfosforilación en Ser³ por sistemas enzimáticos como LINK o SSH, así como por fuerzas mecánicas presentes en el filamento de actina provenientes de la actividad de otras proteínas de unión a actina como formina o Myosina (Narita; 2020).

Son diversas las posibles intervenciones de Lphn en la señalización del citoesqueleto de actina que pudieran propiciar la activación de Cofilina, siendo un GPCR de adhesión, podría derivarse de la actividad de las proteínas G a las que se acople, tanto de las subunidades α como del dímero $\beta\gamma$. En primera instancia, ha sido reportado que $\beta\gamma$ es capaz de promover la activación de PI3K, provocando a su vez la formación de PIP₂ y PIP₃; esta reportado que los phosphoinositidos tienen la capacidad de interactuar con Cofilina regulando su activación (Gorbatyuk y cols;2006).

Por otra parte, dado que la activación de Cofilina deriva de la disminución de su forma fosforilada (Cofilina inactiva), entonces se tienen dos posibilidades: la primera es que esté disminuyendo la actividad de las cinasas de Cofilina y la segunda que la actividad de las fosfatasas haya aumentado. Con respecto a la primera posibilidad, se podría sugerir que se encuentre involucrada la dinámica de la GTPasa pequeña RhoA, si se estuviera inhibiendo a esta proteína se provocaría también la disminución de la actividad de su efector directo ROCK, el cual a su vez es activador de LIMK, la cinasa de Cofilina; es decir, que al presentarse una inhibición de RhoA con la consiguiente inhibición de ROCK, se vería disminuida también la actividad de LIMK y por lo tanto la fosforilación de Cofilina estaría disminuyendo, tal y como se encontró en este trabajo.

Adicionalmente, y retomando la segunda posibilidad respecto al aumento de la actividad de las fosfatasas, una alternativa es que provenga ahora de la actividad de la GTPasa pequeña Rac, capaz de activar a la proteína WAVE, que a su vez aumenta la concentración de PIP₂, propiciando la activación de Calmodulina en presencia de Ca²⁺, lo que lleva a la activación de Calcineurina, enzima que puede activar a SSH, siendo esta última una fosfatasa de Cofilina.

Otro de los efectos observados con la sobre expresión de Lphn en células HEK293T fue la formación de lobulaciones membranales también conocidas como blebs (Figura 11). Se ha reportado la formación de dichas estructuras en procesos tanto fisiológicos como patológicos, teniendo función principalmente mótil e invasiva en células cancerosas, aunque también pueden participar en procesos de citocinesis e incluso en la muerte celular (Ikenouchi y Aoki; 2016); sin embargo, esta última posibilidad ha sido descartada en el presente trabajo por medio de ensayos de viabilidad a nivel poblacional por medio de citometría de flujo, como se muestra en la Figura 8; no obstante, es necesario realizar estudios adicionales para excluir la posibilidad de estados apoptóticos iniciales e identificar si la función de estos blebs está relacionada con la migración celular en nuestro sistema.

Molecularmente, se ha encontrado que la formación de los blebs es regulada por las GTPasas pequeñas RhoA y Rnd3, que participan diferencialmente en las tres etapas generales de su formación: iniciación, expansión y retracción (Ikenouchi y Aoki; 2017); siendo posible la participación de Latrofilina en la dinámica de al menos una de estas proteínas, a partir de efectores río arriba como el acople a $G\alpha_{12/13}$ reportado recientemente por Arac y cols.;2018 así como por Mathiasen y cols.;2020.

El acople de Lphn con $G\alpha_i$ también ha sido reportado (Arac y cols.;2018), por lo tanto, se evaluó en este trabajo su participación en los efectos relacionados con el citoesqueleto de actina producidos por la sobre expresión del receptor. Lphn3 participa en el cambio morfológico y dimensional celular y Lphn1 y 3 en la dinámica de las estructuras celulares, sumando determinantes moleculares a la vía de señalización que involucra a $G\alpha_i$. Además coincide con el hecho que algunas proteínas de unión a actina tales como filamina y VASP (responsables de la modulación de estructuras dependientes de actina) son reguladas a través de fosforilación por PKA cuya activación es dependiente de la formación de cAMP y este es consecuencia de la activación de proteína $G\alpha_s$, pero que justo es inhibiendo por $G\alpha_i$.

La filamina es una proteína de unión a actina cuya principal función es dirigir a los filamentos de actina en arreglos ortogonales, localizándose principalmente en los puntos de intersección, en las fibras de estrés o en la actina cortical, así como tiene una

participación crucial en la formación y mantenimiento de las adhesiones focales debido a las fuerzas de torsión que se generan en estas estructuras; además, se ha demostrado que la filamina regula negativamente a las integrinas (Lamsoul y cols; 2020).

Por su parte, ENA/VASP son una familia de proteínas que se encargan de regular al citoesqueleto de actina principalmente en estructuras altamente dinámicas como filopodios y lamelipodios, por lo que son fundamentales en procesos de motilidad y adhesión celular, así como participan en la guía del cono axónico, el cierre del tubo neural durante el neurodesarrollo, la atenuación de la agregación plaquetaria, entre otros procesos celulares. Dichas proteínas se encuentran en mayor concentración en el extremo en crecimiento de los filamentos de actina en las estructuras dependientes este citoesqueleto, y son capaces de interactuar con Profilina, proteína de unión a monómeros de actina y favorecer la nucleación y crecimiento de filamentos de actina.

En los ensayos de microscopía confocal se observó la sobreposición de los canales rojo y verde, correspondientes a F-actina y *Lphn^{mVenus}*, respectivamente, resultando en color amarillo, por lo que se analizaron las imágenes a través del coeficiente de colocación de Pearson. Las tres isoformas de Lphn colocan con F-actina, lo cual sugiere que las proteínas podrían encontrarse lo bastante cerca como para interactuar físicamente, además de la relación funcional que se ha identificado en el presente estudio.

Dicha interacción física fue corroborada por ensayos de co-inmunoprecipitación para las tres isoformas, en estudios posteriores podría investigarse si la formación de un complejo macromolecular en el que participen Lphn y actina podría sostenerse por medio de la participación de otras proteínas de andamiaje como la familia SHANK, ya que ha sido reportado que Lphn1 es capaz de interactuar directamente con SHANK1 a través del dominio de unión a PDZ presente en Lphn y el dominio PDZ que se encuentra en SHANK (Tobaben y cols.; 2000). A su vez, existen proteínas de unión y regulación de actina que tienen dominios capaces de interactuar con regiones específicas de SHANK, por ejemplo, la proteína de unión a actina Abp1 que interactúa con el dominio SH3 de SHANK regulando así el crecimiento de las espinas dendríticas; además de Abi-1 que interactúa con la región rica en prolina de SHANK y regula la morfología de las espinas dendríticas y la formación de la sinapsis; así como las proteínas de unión a actina Homer y cortactina,

que interactúan también con la región rica en prolina de SHANK (Sarowar y Grabrucker; 2016), esta última también se expresa en HEK293, nuestro modelo de células (Human Protein Atlas) por lo que su interacción podría explicar el acople funcional observado en el presente estudio, como se muestra en la figura 22.

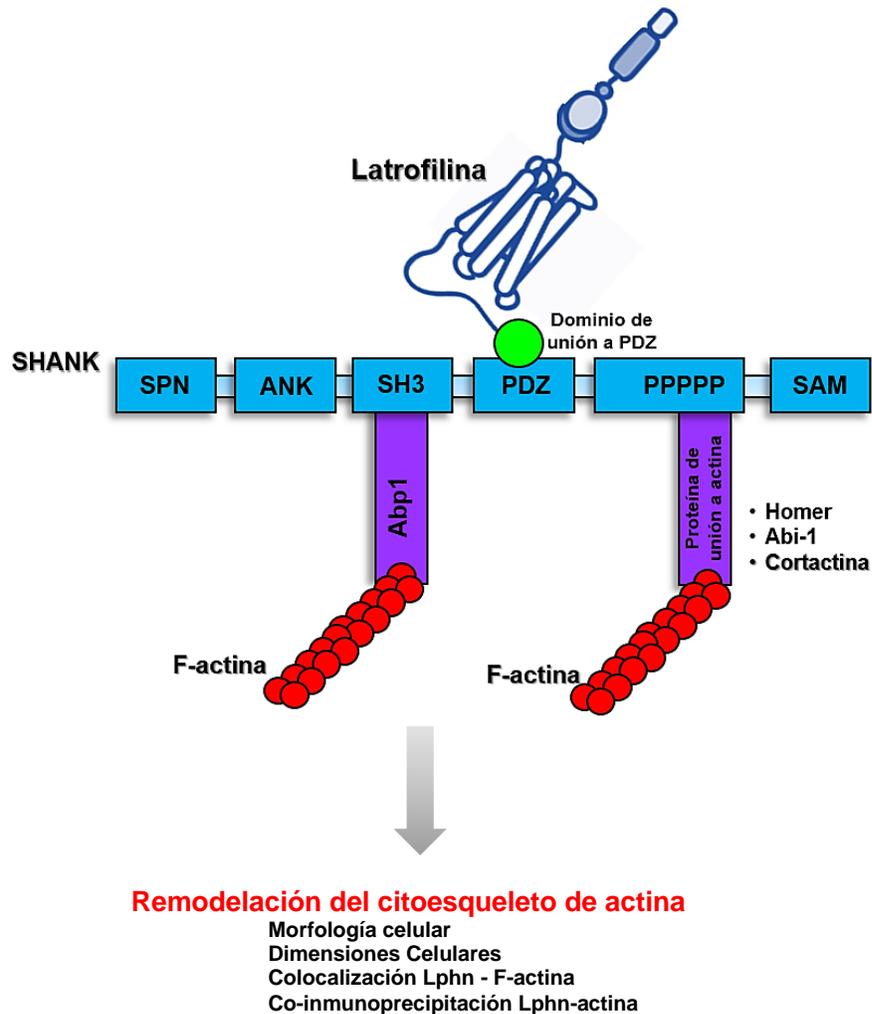


Figura 22. Interacción física de Lphn con actina. Los estudios de colocalización y co-inmunoprecipitación demuestran interacción física de Lphn con actina, misma que podría deberse al acople físico entre el motivo de unión a PDZ de Latrofilina y el dominio PDZ de la proteína de andamiaje SHANK, con la que interactúan proteínas de unión a actina como Abp1 en su dominio SH3 o las proteínas Homer, Abi-1 y Cortactina en su región rica en prolina, siendo esta última expresada en nuestro modelo de estudio, las células HEK293.

Se demostró que el fragmento C-Terminal es necesario para la estabilización de la interacción física entre actina y Latrofilina, ya que al sobre expresar únicamente el fragmento N-terminal extracelular de Lphn1 y 3, se pierde la colocalización observada en los ensayos de microscopía confocal. En el caso de Lphn2^{ECD}, la colocalización permanece, sin embargo, en ninguna de las 3 isoformas se presentó co-inmunoprecipitación contundente con actina y el fragmento extracelular del receptor, lo cual podría deberse a que la co-inmunoprecipitación es una técnica más agresiva para el sistema celular, a diferencia de la microscopía confocal.

Por otra parte, al activarse al receptor Lphn con su ligando Teneurina-4, se observó por microscopía confocal la pérdida de colocalización con F-actina y al mismo tiempo la recuperación parcial de estructuras dependientes de este citoesqueleto, abriendo un campo de posibilidades para la interacción funcional y estructural entre Lphn y actina; por ejemplo: una de las funciones constitutivas de Lphn podría ser la de regular o arrestar el citoesqueleto de actina hasta que se active en presencia de ligando, momento en el cual sea necesaria su participación para la formación y estabilización de elementos y procesos celulares tales como neuritas y uniones intercelulares, favoreciendo con esto la comunicación celular como sinapsis.

Los hallazgos de este trabajo se publicaron en la revista *Biology Open*, posicionándose como el artículo más leído del volumen y obteniendo el reconocimiento como trabajo destacado, por lo que también se publicó una entrevista virtual al primer autor en dicha revista <https://journals.biologists.com/bio/article/8/4/bio043778/1886/First-person-Judith-S-Cruz-Ortega>

9. CONCLUSIONES

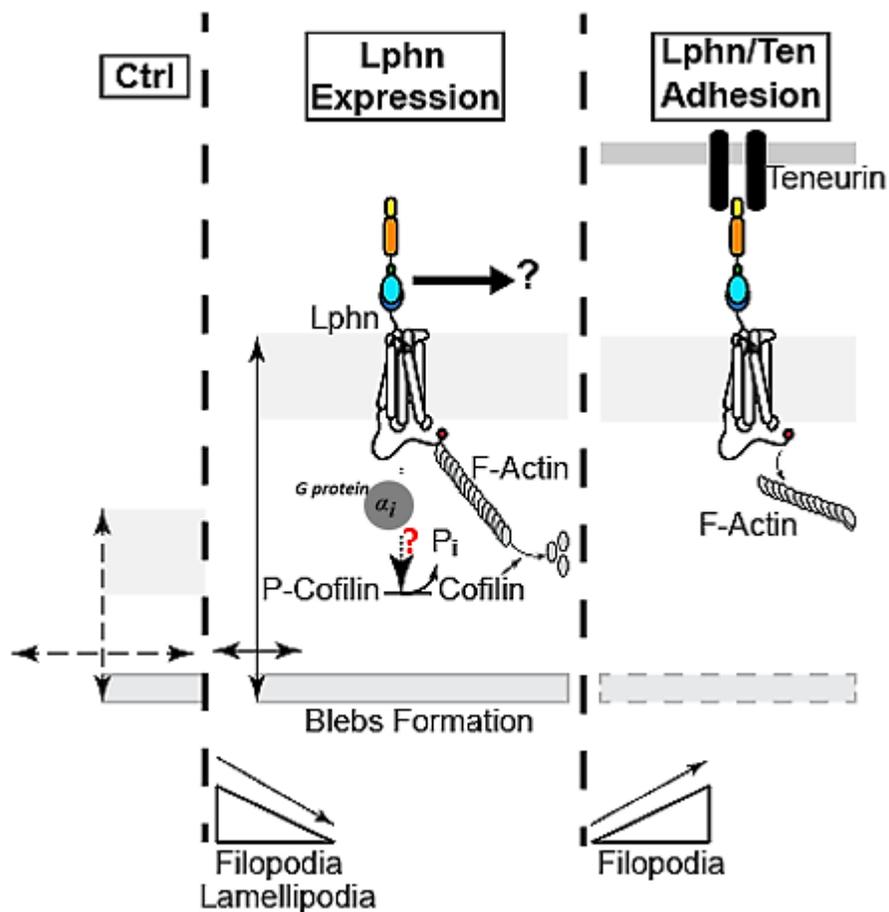


Figura 23. Mecanismos moleculares del efecto de Latrofilina sobre el citoesqueleto de actina

Latrofilina participa en la dinámica del citoesqueleto de actina por la regulación de estructuras dependientes de actina a través de una vía de señalización en la que participa cofilina y contribuye $G_{\alpha i}$, además de la interacción física entre Latrofilina y F-actina, efectos que se modifican cuando Lphn se activa por la unión con su ligando Teneurina 4. Tomado y modificado de Cruz-Ortega y Boucard, 2019.

En el presente trabajo se demostró y se reportó por primera vez la interacción física y funcional de las tres isoformas del aGPCR Latrofilina con actina (Figura 13); encontrándose como un determinante molecular clave para este proceso a la proteína de unión a actina *cofilina* con su correspondiente regulación por fosforilación, así como la participación de la señalización de las proteínas $G_{\alpha i}$; y estabilizada por el extremo CTF del receptor, así como por su estado de activación.

10. PERSPECTIVAS

- Estudiar por Western Blot y microscopia confocal los niveles de expresión, los estados de activación y el reclutamiento intracelular de otras proteínas de unión a actina tales como Gelsolina, Profilina, ARP 2/3, Filamina, Talina, ENA o VASP, así como las GTPasas pequeñas RhoA, Rac y CDC42, además de las cinasas PAK y PKA para comprender mejor el mecanismo y las vías de señalización involucradas en la remodelación del citoesqueleto de actina inducida por Latrofilina, utilizando el mismo sistema heterólogo de células HEK293T.
- Estudiar el posible efecto del dímero $\beta\gamma$ de las proteínas G sobre las vías de señalización de Lphn hacia el citoesqueleto de actina.
- Investigar si en un modelo de ratones deficientes de Lphn1 se ven afectados los niveles de expresión y activación de las diferentes proteínas identificadas como determinantes moleculares del efecto de Lphn sobre el citoesqueleto de actina en el sistema celular heterólogo HEK293T.

11. REFERENCIAS

- ❖ Adam V. Kwiatkowski, Frank B. Gertler and Joseph J. Loureiro. Function and regulation of Ena/VASP proteins. Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA. *TRENDS in Cell Biology* Vol.13 No.7 July 2003
- ❖ Akihiro Narita. ADF/cofilin regulation from a structural viewpoint. *J Muscle Res Cell Motil.* 2020 Mar;41(1):141-151. doi: 10.1007/s10974-019-09546-6. Epub 2019 Jul 25.
- ❖ Akihiro Narita. *ADF/cofilin regulation from a structural viewpoint. J Muscle Res Cell Motil.* 2020 Mar;41(1):141-151. doi: 10.1007/s10974-019-09546-6. Epub 2019 Jul 25. PMID: 31346850 DOI: 10.1007/s10974-019-09546-6
- ❖ Elisa H. Tamariz Domínguez. Mechanisms of Axonal Projection during Development, Important lessons for Neuroregeneration and Biomaterials Fields Departamento de Biomedicina Instituto de Ciencias de la Salud Universidad Veracruzana Rev Med UV, Volumen Especial 2012
- ❖ Esther T. Stoeckli. Understanding axon guidance: are we nearly there yet? © 2018. Published by The Company of Biologists Ltd | *Development* (2018) 145, dev151415. doi:10.1242/dev.151415
- ❖ Ferrer Zavala L.D. y Reyes Cruz G. Proyecto de Investigación “Modulación de la transducción de señales de receptores acoplados a proteínas G por proteínas del ESCRT. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional.2015.
- ❖ Fischer M, Kaech S, Wagner U, Brinkhaus H, Matus A. Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nat Neurosci* 3:887–894, 2000. doi:10.1038/78791.
- ❖ Fukai S, Yamagata A. [Structural basis of synaptic organizer complexes for inducing synapse formation in the central nervous system]. *Seikagaku* 88:391–396, 2016.
- ❖ García Sáinz, J Adolfo . G protein coupled receptors and their desensitization. *Revista Odontológica Mexicana.* Vol. 15, No. 4 October-December 2011
- ❖ *García Sáinz, J Adolfo, G protein coupled receptors and their desensitization. Revista Odontológica Mexicana. Vol. 15, No. 4 October-December 2011. pp 210-213*
- ❖ *Garret R. Anderson, Stephan Maxeiner, Richard Sando, Theodoros Tsetsenis, Robert C. Malenka and Thomas C. Südhof. Postsynaptic adhesion GPCR latrophilin-2 mediates target recognition in entorhinal-hippocampal synapse assembly Department of Molecular and Cellular Physiology, Howard Hughes Medical Institute and 2Department of Psychiatry and Behavioral Science, Nancy Pritzker Laboratory, Stanford University Medical School, Stanford, CA*
- ❖ Geng X, Mandai K, Maruo T, Wang S, Fujiwara T, Mizoguchi A, Takai Y, Mori M. Regulatory role of the cell adhesion molecule nectin-1 in GABAergic inhibitory

- synaptic transmission in the CA3 region of mouse hippocampus. *Genes Cells* 21: 88–98, 2016. doi:10.1111/gtc.12322.
- ❖ *GPCRdb in 2021: integrating GPCR sequence, structure and function.* Kooistra AJ, Mordalski S, Pandey-Szekeres G, Esguerra M, Mamyrbekov A, Munk C, Keseru GM, Gloriam DE *Nucleic acids research*, 2021, 49:D335-D343
 - ❖ Guzmán-Silva, Alejandro y García-Sáinz, J. Adolfo. Receptores acoplados a proteínas G y sus múltiples facetas. Memoria del 45º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM. <http://tab.facmed.unam.mx>
 - ❖ Haydon PG, Drapeau P. From contact to connection: early events during synaptogenesis. *Trends Neurosci* 18: 196–201, 1995. doi:10.1016/0166-2236(95)93901-9.
 - ❖ Horstkorte R, Fuss B. Cell adhesion molecules. *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology* (8th ed.), edited by Brady S, Siegal G, Albers RW, Price D. Amsterdam: Elsevier, 2012, p.165–179. doi:10.1016/b978-0-12-374947-5.00009-2.
 - ❖ Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677–736, 2001. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.677.
 - ❖ Hui-Chuan Huang and Peter S Klein. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol.* 2004; 5(7): 234. doi: 10.1186/gb-2004-5-7-234
 - ❖ Isabelle Lamsoul*, Loïc Dupré^{1,2} and Pierre G. Lutz^{1*} Molecular Tuning of Filamin A. Activities in the Context of Adhesion and Migration. Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, INSERM, CNRS, Université de Toulouse, UPS, Toulouse, France, Ludwig Boltzmann Institute for Rare and Undiagnosed Diseases, Vienna, Austria. MINI REVIEW published: 20 November 2020 doi: 10.3389/fcell.2020.591323
 - ❖ J.L. Gallop. Filopodia and their links with membrane traffic and cell adhesion Wellcome Trust/CRUK Gurdon Institute and Department of Biochemistry, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QN, UK
 - ❖ J.L. Gallop. *Filopodia and their links with membrane traffic and cell adhesion*
 - ❖ Jannatun Nayem Namme , Asim Kumar Bepari, Hirohide Takebayashi. *Cofilin Signaling in the CNS Physiology and Neurodegeneration.* PMID: 34639067 PMCID: PMC8509315 DOI: 10.3390/ijms221910727
 - ❖ Jannatun Nayem Namme, Asim Kumar Bepari, Hirohide Takebayashi. *Cofilin Signaling in the CNS Physiology and Neurodegeneration.* PMID: 34639067 PMCID: PMC8509315 DOI: 10.3390/ijms221910727
 - ❖ Junichi Ikenouchi & Kana Aoki (2017) Membrane bleb: A seesaw game of two small GTPases, *Small GTPases*, 8:2, 85-89, DOI: 10.1080/21541248.2016.1199266 To link to this article: <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1199266>
 - ❖ *Junichi Ikenouchi & Kana Aoki (2017) Membrane bleb: A seesaw game of two small GTPases, Small GTPases, 8:2, 85-89, DOI: 10.1080/21541248.2016.1199266*

- ❖ Kandel Eric R., Schwartz James H., Jessell Thomas M., Siegelbaum Steven A., Hudspeth J. Principles of neural science. Fifth Edition. Reproduced, with permission, from *The Sacred Disease*, in *Hippocrates*, Vol. 2, page 175, translated by W.H.S. Jones, London and New York: William Heinemann and Harvard University Press. 1923.
- ❖ Kay JN. Radial migration: retinal neurons hold on for the ride. *J Cell Biol* 215: 147–149, 2016. doi:10.1083/jcb.201609135.
- ❖ Kooistra AJ, Mordalski S, Pandy-Szekeres G, Esguerra M, Mamyrbekov A, Munk C, Keseru GM, Gloriam. GPCRDdb in 2021: integrating GPCR sequence, structure and function. *DE Nucleic acids research*, 2021, 49:D335-D343
- ❖ Moreno-Salinas A.L., Avila-Zozaya M., Ugalde-Silva P., Hernández-Guzmán D.A., Missirlis F., Boucard A. A. Latrophilins: A Neuro-Centric View of an Evolutionary Conserved Adhesion G Protein-Coupled Receptor Subfamily. *Front Neuroscience*. 2019 Jul 9;13:700. doi: 10.3389/fnins.2019.00700.
- ❖ Munno DW, Syed NI. Synaptogenesis in the CNS: an odyssey from wiring together to firing together. *J Physiol* 552: 1–11, 2003. doi:10.1113/jphysiol.2003.045062.
- ❖ Nicoll RA. Expression mechanisms underlying long-term potentiation: a postsynaptic view. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358: 721–726, 2003. doi:10.1098/rstb.2002.1228.
- ❖ Ohtsuka T. Network of protein-protein interactions at the presynaptic active zone. In: *Presynaptic Terminals*, edited by Mochida S. Tokyo: Springer, 2015, p. 69–83. doi:10.1007/978-4-431-55166-9_3.
- ❖ R. Anderson,^{1,2*} Stephan Maxeiner,^{1*} Richard Sando,¹ Theodoros Tsetsenis,¹ Robert C. Malenka,² and Thomas C. Südhof¹. Postsynaptic adhesion GPCR latrophilin-2 mediates target recognition in entorhinal-hippocampal synapse assembly *Garret* ¹Department of Molecular and Cellular Physiology, Howard Hughes Medical Institute and ²Department of Psychiatry and Behavioral Science, Nancy Pritzker Laboratory, Stanford University Medical School, Stanford, CA
- ❖ Rahman M Atiqur, Manser Catherine, Benlaouer Ouafa , Suckling Jason , Blackburn Jennifer K , John-Paul Silva , Ushkaryov Yuri A . C-terminal phosphorylation of latrophilin-1/ADGRL1 affects the interaction between its fragments. *Ann N Y Acad Sci* . 2019 Nov;1456(1):122-143. doi: 10.1111/nyas.14242. Epub 2019 Sep 25.
- ❖ *Rahman M Atiqur, Manser Catherine, Benlaouer Ouafa , Suckling Jason , Blackburn Jennifer K , John-Paul Silva , Ushkaryov Yuri A . C-terminal phosphorylation of latrophilin-1/ADGRL1 affects the interaction between its fragments. Ann N Y Acad Sci . 2019 Nov;1456(1):122-143. doi: 10.1111/nyas.14242. Epub 2019 Sep 25.*
- ❖ Schneider J., Korshunova K., Musiani F., Alfonso-Prieto M., Giorgetti A. and Carlon P. Predicting ligand binding poses for low-resolution membrane protein

- models: Perspectives from multiscale simulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. · February 2018. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.01.160
- ❖ Seiradake E, Jones EY, Klein R. Structural perspectives on axon guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol* 32: 577–608, 2016. doi:10.1146/annurev-cellbio-111315-125008.
 - ❖ Soñke Tobabenç, Thomas C. Südhof§, and Bernd Stahl. The G Protein-coupled Receptor CL1 Interacts Directly with Proteins of the Shank Family*. *JBC Papers in Press*, August 24, 2000, DOI 10.1074/jbc.M006448200. From the çMax Planck-Institute for Experimental Medicine, 37075 Goöttingen, Germany and the §Department of Molecular. Genetics and the Howard Hughes Medical Institute, The University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas, Texas 75235
 - ❖ Soñke Tobabenç, Thomas C. Südhof§, and Bernd Stahl. *The G Protein-coupled Receptor CL1 Interacts Directly with Proteins of the Shank Family. Published, JBC Papers in Press, August 24, 2000, DOI 10.1074/jbc.M006448200.*
 - ❖ Tasnuva Sarowar, Andreas M. Grabrucker, "Actin-Dependent Alterations of Dendritic Spine Morphology in Shankopathies", *Neural Plasticity*, vol. 2016, Article ID 8051861, 15 pages, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8051861>
 - ❖ Taverna E, Götz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30: 465–502, 2014. doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155801.
 - ❖ Ulloa F, Cotrufo T, Ricolo D, Soriano E, Araújo SJ. SNARE complex in axonal guidance and neuroregeneration. *Neural Regen Res* 13: 386–392, 2018. doi:10.4103/1673-5374.228710.
 - ❖ Ulloa F, Cotrufo T, Ricolo D, Soriano E, Araújo SJ. SNARE complex in axonal guidance and neuroregeneration. *Neural Regen Res* 13: 386–392,2018. doi:10.4103/1673-5374.228710.
 - ❖ van Kesteren RE, Spencer GE. The role of neurotransmitters in neurite outgrowth and synapse formation. *Rev Neurosci* 14: 217–231, 2003. doi:10.1515/REVNEURO.2003.14.3.217.
 - ❖ Vanderhaeghen P, Cheng H-J. Guidance molecules in axon pruning and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a001859, 2010. doi:10.1101/cshperspect.a001859.
 - ❖ Vitaliy Y Gorbatyuk 1, Neil J Nosworthy, Scott A Robson, Naresh P S Bains, Mark W Maciejewski, Cris G Dos Remedios, Glenn F King. Mapping the phosphoinositide-binding site on chick cofilin explains how PIP2 regulates the cofilin-actin interaction. *Mol Cell*. 2006 Nov 17;24(4):511-22. doi: 10.1016/j.molcel.2006.10.007
 - ❖ *Vitaliy Y Gorbatyuk 1, Neil J Nosworthy, Scott A Robson, Naresh P S Bains, Mark W Maciejewski, Cris G Dos Remedios, Glenn F King. Mapping the phosphoinositide-binding site on chick cofilin explains how PIP2 regulates the cofilin-actin interaction. Mol Cell . 2006 Nov 17;24(4):511-22. doi:*

10.1016/j.molcel.2006.10.007..
10.1016/j.molcel.2006.10.007

PMID:

17114056

DOI:

- ❖ Vsevolod Katritch, Vadim Cherezov, and Raymond C. Stevens. Structure-Function of the G Protein–Coupled Receptor Superfamily. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2013. 53:531–56.
- ❖ Weinstock GM, McEntee K, Lehman IR. Stimulation of recA protein dependent strand assimilation and DNA complex formation by singlestranded DNA binding proteins. In: *New Approaches in Eukaryotic DNA Replication*, edited by de Recondo AM. New York: Plenum, 1983, p.333–341.
- ❖ *Wellcome Trust/CRUK Gurdon Institute and Department of Biochemistry, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QN, UK*

12. ANEXOS

Anexo1.

Procedimiento para congelación y descongelación del cultivo celular

A1.1 Congelación de células.

Debe realizarse gradualmente

Medio de congelación: Medio normal DMEM con antibiótico y todo (10% FBS + glutamina 1X + PE 1X) con DMSO al 10% (reacción exotérmica preparar en frío y dejar enfriar)

Poner 1 millón de células más medio de congelación (de una caja T75 al 100 % de confluencia salen 5 viales).

Pasos caja T75:

- ✓ Dos lavados con PBS1 X
- ✓ 1 mL de tripsina
- ✓ 3 min 37°C
- ✓ 4 mL de medio de congelación
- ✓ Resuspender
- ✓ Dividir en 5 viales
- ✓ Hielo 1 hora,
- ✓ REVCO 2 días
- ✓ Nitrógeno líquido
- ✓

A1.2 Descongelación de células

Debe ser rápido

- ✓ Están en nitrógeno líquido
- ✓ Directamente al baño María a 37 ° hasta que se descongelan (3 min ±)
- ✓ Pasar a un tubo de 12 ml que tenga 4 mL de DEMEM al 10 % (con FBS, glutamina, y PE) para que se diluya el DMSO
- ✓ Resuspender suavemente

- ✓ Centrifugar (en al centrifuga clínica del laboratorio queda bien con velocidad 1.3 hasta que alcance velocidad luego bajarle a 0.63 que es la mínima y dejar 2 minutos en total o 2:30 por mucho)
- ✓ Se tienen que ver las células en el fondo, pero sin que formen botón o pastilla muy apretada
- ✓ Quitar con pipeta de vidrio el sobrenadante sin llevarse las células
- ✓ Adicionar a ese mismo tubo con las células 4 mL de Medio suplementado al 10 % (con FBS, glutamina y PE)
- ✓ Resuspender muy suavemente con pipeta de vidrio
- ✓ Pasar a una botella T25 para sembrarlas
- ✓ Incubar a 37 grados en la incubadora
- ✓ En una noche la mayoría están extendidas y adheridas en la botella.
- ✓ Transferir a botella T75 un día
- ✓ Hacer otro pase al otro día
- ✓ Las células están listas para su utilización.

Anexo 2.

Vista panorámica de la morfología celular en cultivos con sobre expresión de Latrofilina

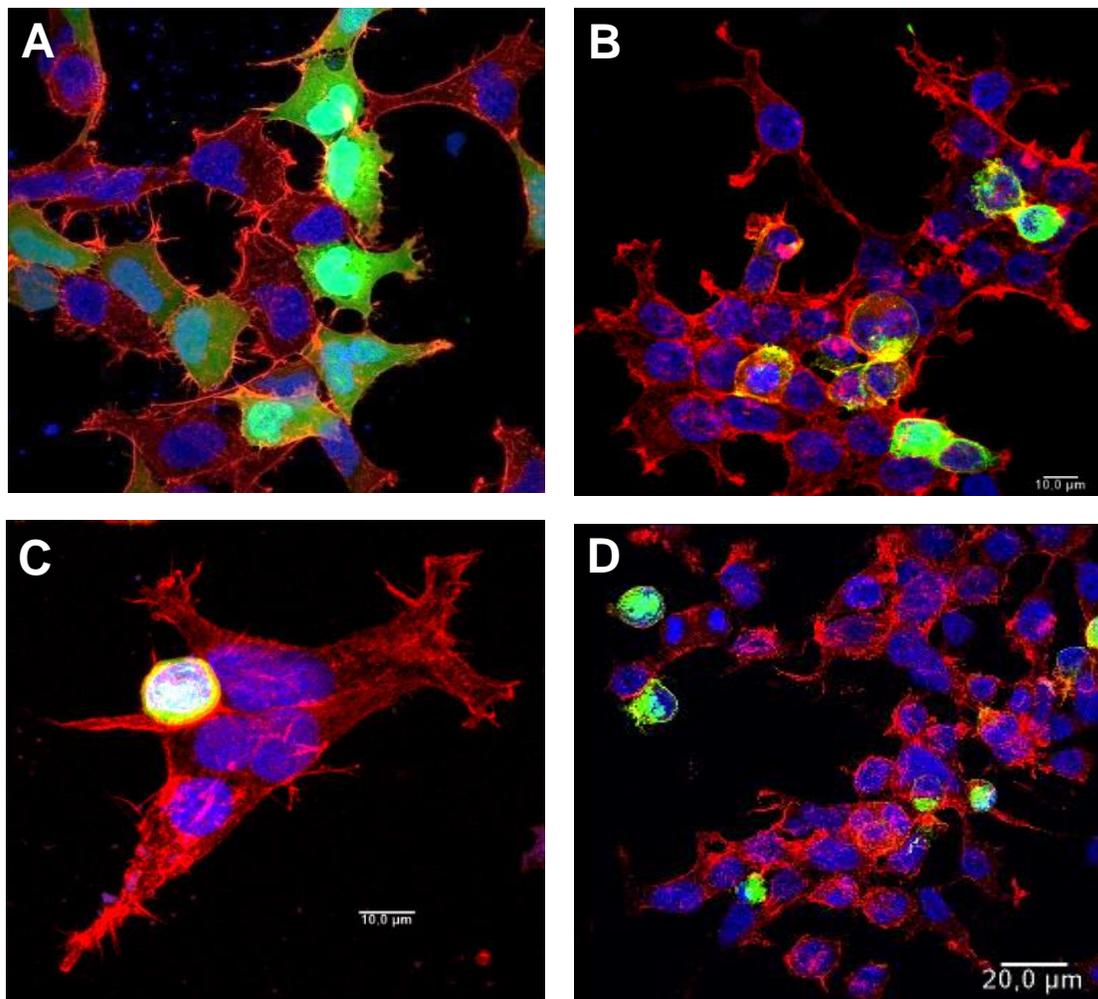
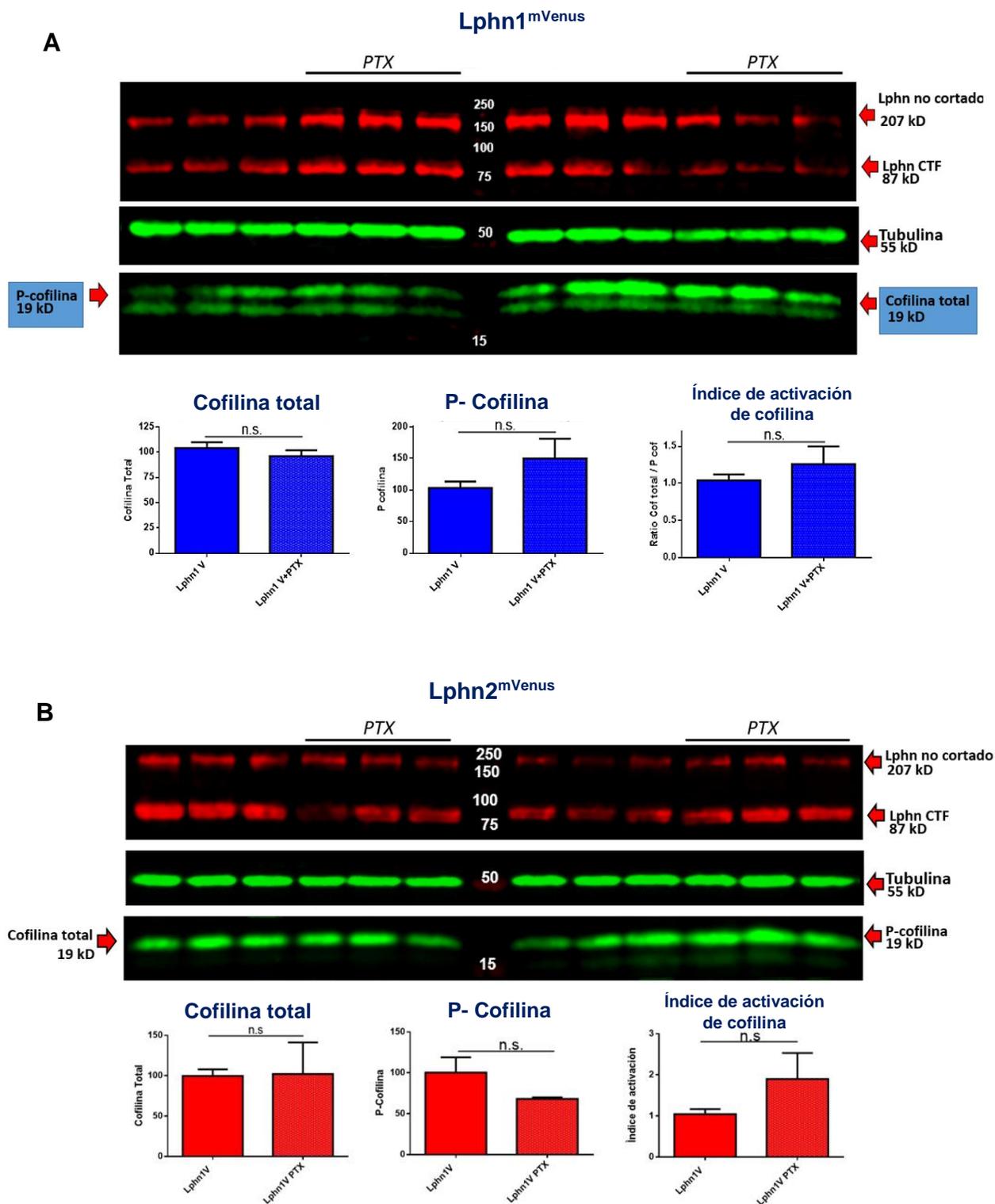


Figura 24. Fotomicrografías panorámicas de cultivos celulares transfectados con $Lphn^{mVenus}$. Las células HEK293T se sembraron en cubreobjetos previamente incubados con medio condicionado de la misma línea celular; posteriormente se transfectaron independientemente con las 3 isoformas de $Lphn^{mVenus}$ y con el control de mVenus. A las 48 hrs post-transfección se fijaron con PFA y se tiñeron con faloidina rodaminada y DAPI, finalmente se tomaron las imágenes por microscopía confocal. **A)** Micrografía confocal muestra la morfología normal y estructuras dependientes de actina de células HEK 293T transfectadas con el control de GFP en verde y células sin transfectar. **B) – D)** muestran en verde a las células transfectadas con las $Lphn^{mVenus}$ 1-3 respectivamente y a células sin transfectar que conservan su morfología normal.

Anexo 3.

Evaluación de la participación de $G\alpha_i$ en la dinámica de cofilina tras la sobre expresión de Latrofilina



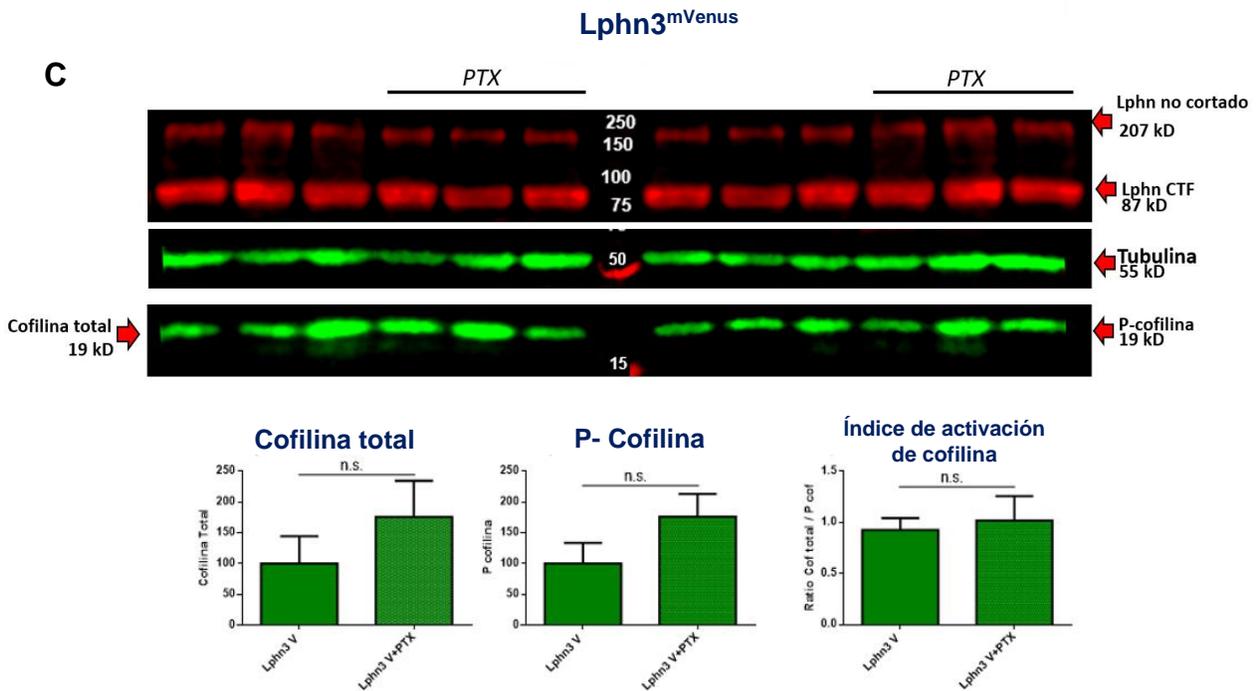


Figura 25. Evaluación de la participación de $G\alpha_i$ en la dinámica de cofilina tras la sobre expresión de Latrofilina. Se transfectaron células HEK293T independientemente con las 3 isoformas de Lphn^{mVenus}, a las 32 horas post-transfección se incubó la mitad de los pozos con Toxina Pertusis, conocido inhibidor de $G\alpha_i$; a las 48 horas post-transfección se lisaron con buffer de carga para electroforesis y se midió por Western Blot la expresión de Cofilina Total, la cofilina fosforilada (P-cofilina) y se calculó el índice de activación de cofilina como el ratio Cofilina Total / P-cofilina. Se muestran imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes. Análisis estadístico ANOVA de una vía con prueba de SIDAK; $P < 0.05$. En ningún caso se encontró diferencia estadísticamente significativa.

Anexo 4.

Evaluación de la participación de GTPasas pequeñas en la dinámica de cofilina tras la sobre expresión de Latrofilina

A4.1 Estudio en Lphn 1

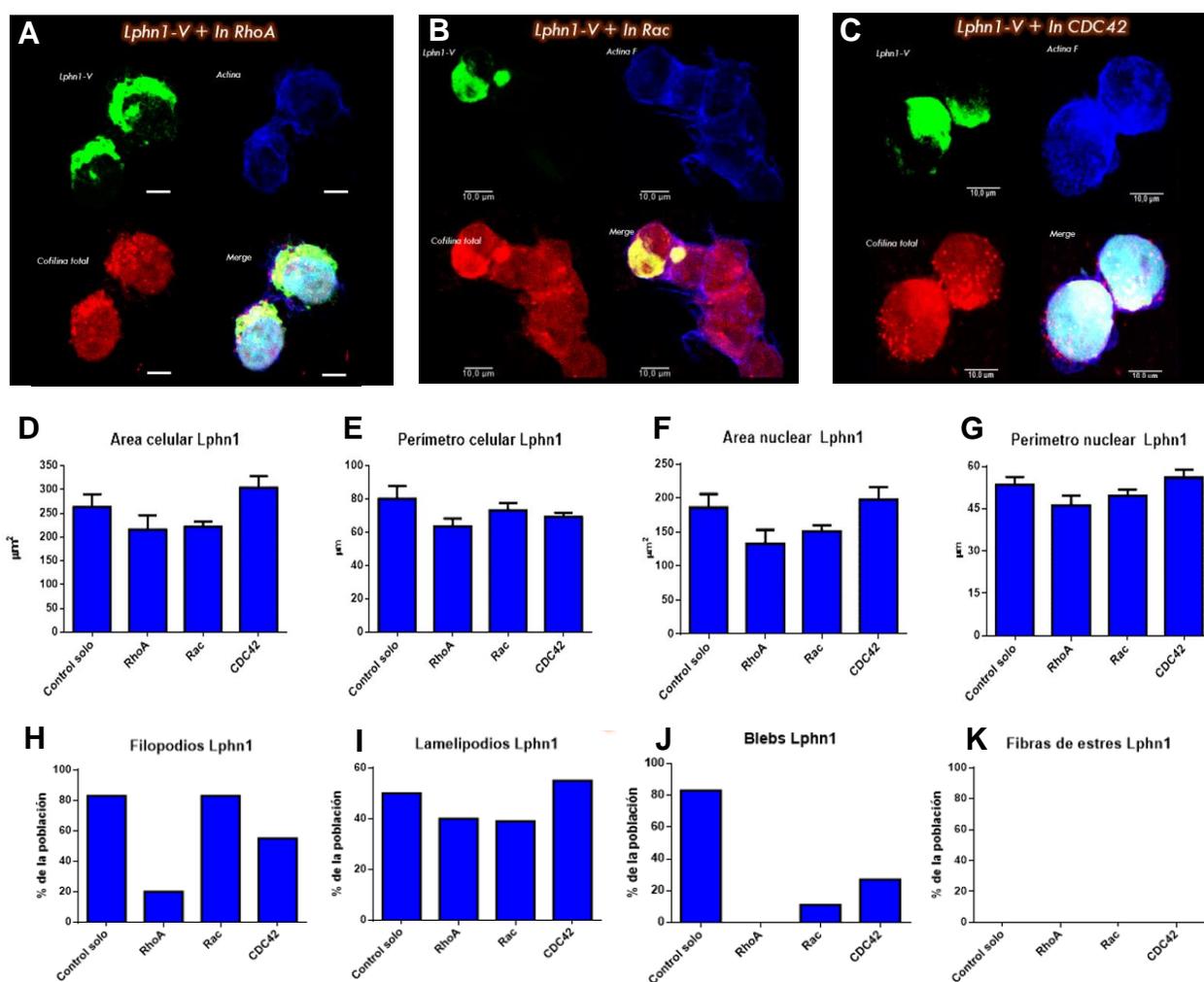


Figura 26. Evaluación de la participación de GTPasas pequeñas en la dinámica de cofilina tras la sobre expresión de Lphn 1. Las células HEK293T se sembraron en cubreobjetos previamente incubados con medio condicionado de la misma línea celular; posteriormente se transfectaron con *Lphn1*^{mVenus} y con el control de mVenus. A las 32 horas post-transfección se incubaron independientemente con los inhibidores para las GTPasas pequeñas RhoA, Rac y CDC42 según se indica en las figuras; después, a las 48 horas post-transfección se fijaron con PFA y se tiñeron con faloidina rodamina, anti-cofilina total y DAPI, finalmente se tomaron las imágenes por microscopía confocal. **A-C)** Micrografías confocales que muestran la morfología celular después del tratamiento con los inhibidores de GTPasas pequeñas. **D-G)** Medición de las dimensiones

celulares, **H-K)** Cuantificación de las células con estructuras dependientes de actina. Se muestran los resultados de 1 experimento por cada inhibidor considerando al menos 20 células por cada condición. Actina filamentosa en pseudocolor azul teñida con Faloidina Rodaminada, en verde Latrofilina *mVenus*, núcleos en cian teñidos con DAPI, cofilina total en rojo observada por inmunohistoquímica. La barra representa 10µm.

A4.2 Estudio en Lphn 2

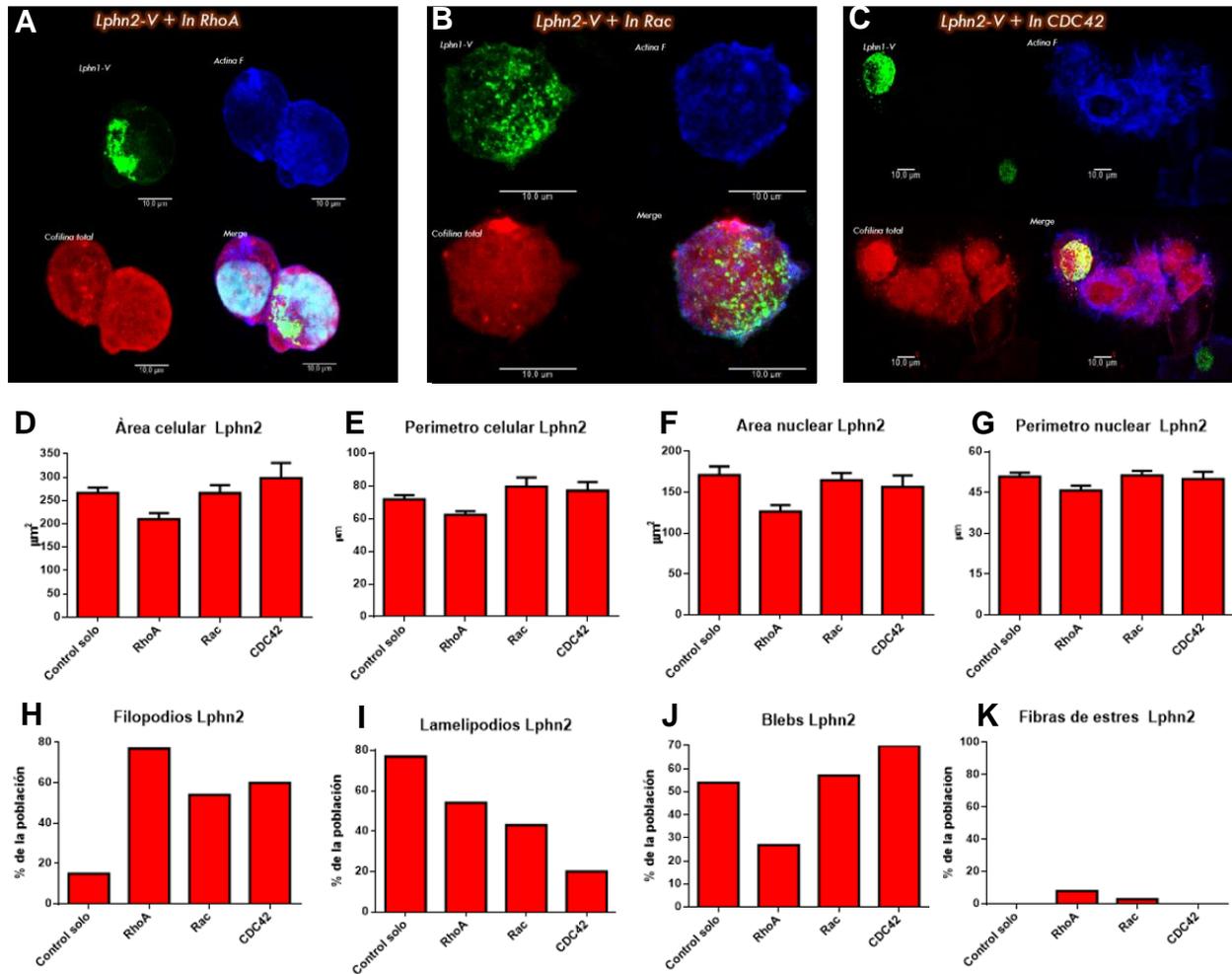


Figura 27. Evaluación de la participación de GTPasas pequeñas en la dinámica de cofilina tras la sobre expresión de Lphn 2. Las células HEK293T se sembraron en cubreobjetos previamente incubados con medio condicionado de la misma línea celular; posteriormente se transfectaron con Lphn2^{mVenus} y con el control de mVenus. A las 32 horas post-transfección se incubaron independientemente con los inhibidores para las GTPasas pequeñas RhoA, Rac y CDC42 según se indica en las figuras; después, a las 48 horas post-transfección se fijaron con PFA y se tiñeron con faloidina rodamínada, anti-cofilina total y DAPI, finalmente se tomaron las imágenes por microscopía confocal. **A-C)** Micrografías confocales que muestran la morfología celular después del tratamiento con los inhibidores de GTPAsas pequeñas. **D-G)** Medición de las

dimensiones celulares, **H-K**) Cuantificación de las células con estructuras dependientes de actina. Se muestran los resultados de 1 experimento por cada inhibidor considerando al menos 20 células por cada condición. Actina filamentososa en pseudocolor azul teñida con Faloidina Rodaminada, en verde Latrofilina ^{mVenus}, núcleos en cian teñidos con DAPI, cofilina total en rojo observada por inmunohistoquímica. La barra representa 10µm.

A4.3 Estudio en Lphn 3

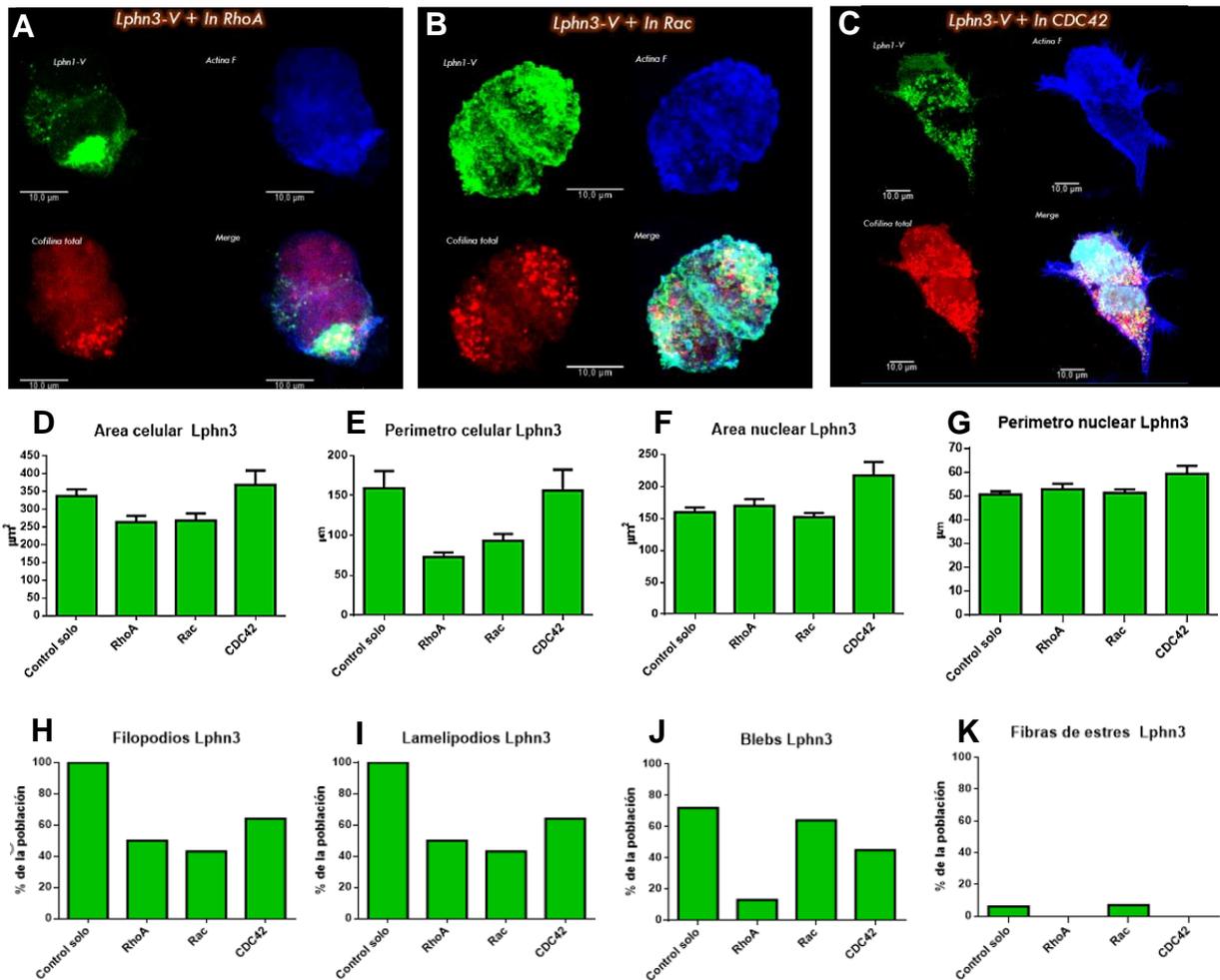


Figura 28. Evaluación de la participación de GTPasas pequeñas en la dinámica de cofilina tras la sobre expresión de Lphn 3. Las células HEK293T se sembraron en cubreobjetos previamente incubados con medio condicionado de la misma línea celular; posteriormente se transfectaron con Lphn2^{mVenus} y con el control de mVenus. A las 32 horas post-transfección se incubaron independientemente con los inhibidores para las GTPasas pequeñas RhoA, Rac y CDC42 según se indica en las figuras; después, a las 48 horas post-transfección se fijaron con PFA y se tiñeron con faloidina rodaminada, anti-cofilina total y DAPI, finalmente se tomaron las

imágenes por microscopía confocal. **A-C)** Micrografías confocales que muestran la morfología celular después del tratamiento con los inhibidores de GTPAsas pequeñas. **D-G)** Medición de las dimensiones celulares, **H-K)** Cuantificación de las células con estructuras dependientes de actina. Se muestran los resultados de 1 experimento por cada inhibidor considerando al menos 20 células por cada condición. Actina filamentosa en pseudocolor azul teñida con Faloidina Rodaminada, en verde Latrofilina ^{mVenus}, núcleos en cian teñidos con DAPI, cofilina total en rojo observada por inmunohistoquímica. La barra representa 10µm.

Anexo 5.

Enriquecimiento de Actina Globular y Filamentosa

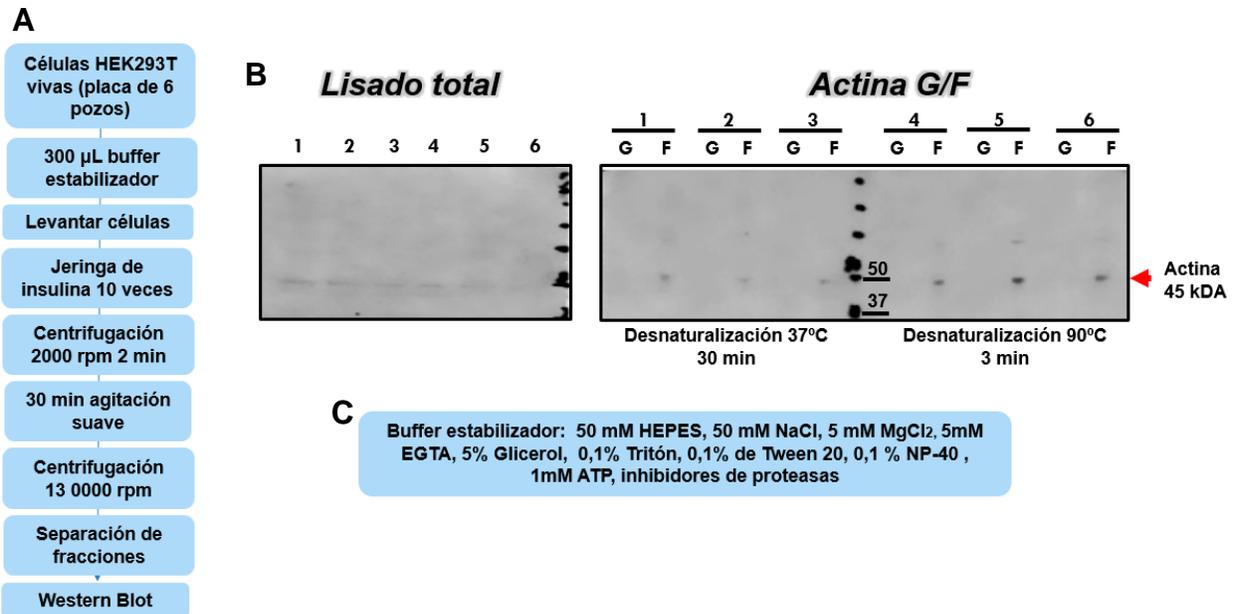


Figura 29. Enriquecimiento de Actina Globular y filamentosa. Cultivos de células HEK293T se trataron como se muestra en **A** y se analizaron por Western Blot bajo condiciones estándar, revelando con anticuerpo anti-actina total. **B)** Imagen representativa de dos experimentos independientes. **C)** Formulación de buffer estabilizador para el citoesqueleto.

Anexo 6.

La sobreexpresión de otras proteínas no afecta la morfología de las células HEK293T

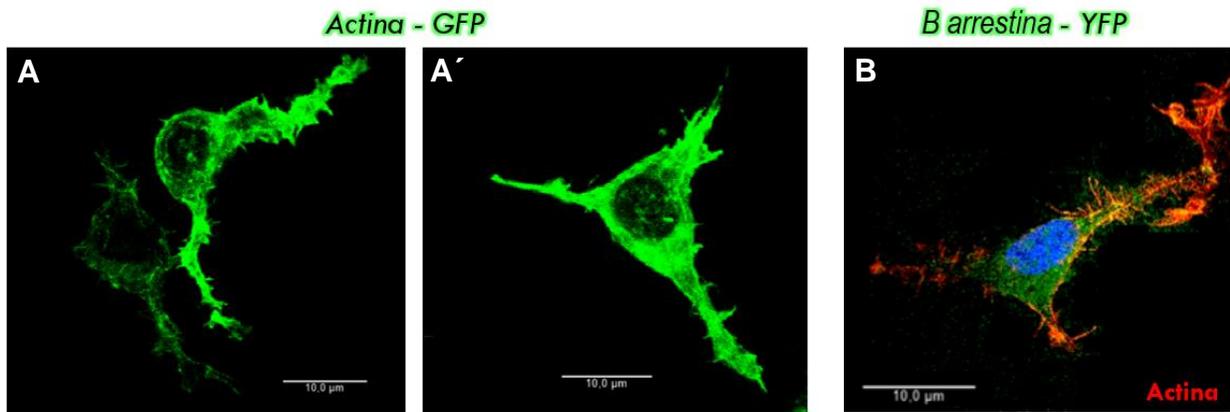


Figura 30. La sobreexpresión de otras proteínas no afecta la morfología de las células HEK293T
Las células HEK293T se sembraron en cubreobjetos previamente incubados con medio condicionado de la misma línea celular; posteriormente se transfectaron con Actina-GFP en **A)** – **A'** o β arrestina-YFP en **B)**. A las 48 horas post-transfección se fijaron con PFA, únicamente las células en **B)** se tiñeron con faloidina rodaminada y se tomaron las imágenes por microscopía confocal. La barra representa 10 μ m.