



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Posible interacción entre el canal de sodio Nav1.2 con el factor de transcripción CtBP1

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA

BIÓLOGO. ROMERO MACÍAS ERIK ALAN

TUTOR

DRA. ANA VICTORIA VEGA SALCEDO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

MIEMBROS DE COMITÉ TUTOR

DR. JUAN MANUEL ARIAS MONTAÑO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA (UNAM)

DR. ATAULFO MARTÍNEZ TORRES
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA (UNAM)

DRA. LINDA GARCÉS RAMÍREZ
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS (IPN)

DR. JAIME AURELIO BARRAL CABALLERO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA (UNAM)

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO. AGOSTO DEL 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT) por apoyarme con la beca para poder completar la maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por la oportunidad de formarme como un profesionista en el área de las ciencias biológicas y las neurociencias.

Agradezco a la doctora Ana Victoria Vega Salcedo por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo y poder cumplir un objetivo más en mi vida profesional, así como todos los consejos recibidos de su parte y el conocimiento compartido. Muchas gracias doctora.

A mi madre y mis hermanos por acompañarme siempre en este camino y apoyarme de manera emocional. Muchas gracias por todo.

A Gabriela por todos los años que ha estado apoyándome desde la universidad. Gracias por todos los consejos y palabras de aliento.

Para mis compañeros de laboratorio: Luis, Julio y Alexandra, gracias por sus consejos y su ayuda en este proceso.

Y a todas las personas que directa o indirectamente me acompañaron en este camino: compañeros del posgrado, familiares, amigos. A todos muchas gracias.

Al doctor Juan Manuel Arias Montaña por su apoyo como sinodal y revisor de la tesis por sus consejos y correcciones

A la doctora Linda Garcés Ramírez por ser parte del comité revisor para poder completar este trabajo

Al doctor Ataulfo Martínez Torres por sus observaciones las cuales permitieron poder realizar un trabajo de mayor calidad

Y al doctor Jaime Aurelio Barral Caballero por apoyarme en la corrección de este trabajo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CANALES DE SODIO. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN	1
FUNCIONES NO CANÓNICAS DE LOS CANALES DE SODIO.	6
PROTEÍNA DE UNIÓN AL EXTREMO C-TERMINAL (CtBP1)	9
CtBP1 PARTICIPA EN LA FUSIÓN MEMBRANAL EN EL APARATO DE GOLGI..	12
ANTECEDENTE	14
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
METODOLOGÍA	19
ANIMALES.....	20
1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE CEREBRO DE RATÓN	20
2. INMUNOPRECIPITACIÓN	20
3. SDS-PAGE y WB	21
RESULTADOS.....	23
DISCUSIÓN.....	28
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	31
REFERENCIAS	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de los canales de sodio Nav	3
Figura 2. Porcentaje de similitud y relación filogenética de los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav) (Catterall, 2013)	5
Figura 3. Estructura de CtBP1-L. La isoforma L, a diferencia de la isoforma S, cuenta con 13 aminoácidos extras en la región amino-terminal.	11
Figura 4. Interacción entre el extremo C-terminal de Nav1.2 y Nav1.6.	15
Figura 5. Señal de localización nuclear bipartita de Nav1.2.	17
Figura 6. Estrategia metodológica propuesta.	19
Figura 7. Patrón de inmunorreactividad de anticuerpos anti-Nav1.2	25
Figura 8. Inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales anti-Nav1.2.	26
Figura 9. Coinmunoprecipitación de Nav1.2 y CtBP1.	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Isoformas de los canales de sodio dependientes de voltaje, distribución predominante en el sistema nervioso, sensibilidad a TTX y genes que los codifican _5

Tabla 2. Canales de sodio expresados en distintos tipos de cáncer y su posible papel funcional. _____ 8

RESUMEN.

Se sabe que los canales de sodio dependientes de voltaje son proteínas transmembranales encargadas de propagar los potenciales de acción en células excitables las cuales se distribuyen tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico, aunque de forma sorprendente la presencia de estas proteínas no se limita a las neuronas. Se ha correlacionado la expresión de canales de sodio con procesos como proliferación, invasividad y metástasis en diferentes tipos de cáncer. La otra proteína de nuestro interés, el factor de correpresión CtBP1, participa en la correpresión de la expresión de diversas proteínas con actividad proapoptótica, y aunque su actividad como correpresor de la transcripción nos invita a pensar que se encuentra en un ambiente nuclear, diversos reportes señalan que esta proteína participa en procesos de suma importancia en un contexto citosólico. Estudios previos de nuestro laboratorio indican que el CtBP1 puede interactuar con el extremo carboxilo terminal de los canales de sodio dependientes de voltaje de las isoformas 1.2 y 1.6 (Nav1.2 y Nav1.6). Es por eso que en este trabajo buscamos probar la interacción entre el extremo C-terminal del canal de sodio Nav1.2 y el factor de transcripción CtBP1 en un contexto fisiológico. Mediante ensayos de inmunoprecipitación en células de cerebro de ratón se encontraron que existe una coimmunoprecipitación de un fragmento < 63 kDa del canal de sodio Nav1.2 con el factor de transcripción CtBP1, este resultado sugiere que los canales de sodio no sólo se limitan a propagar señales eléctricas, sino que pueden estar interactuando con otras proteínas, aunque la función de esta interacción se desconoce aún.

INTRODUCCIÓN

Se sabe que los canales de sodio dependientes de voltaje son proteínas transmembranales encargadas de propagar los potenciales de acción en células excitables las cuales se distribuyen tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico, aunque la presencia de estas proteínas no se limita a las neuronas (Black & Waxman, 2013). Diversos estudios han reportado la presencia de los canales de sodio en células como la microglía y más interesante aún se ha reportado su expresión anómala en padecimientos como el cáncer (Angus, 2019). Más aún, se ha correlacionado la expresión de canales de sodio con procesos como proliferación, invasividad y metástasis en diferentes tipos de cáncer (Angus, 2019). La otra proteína de nuestro interés, el factor de corrección CtBP1, participa en la corrección de la expresión de diversas proteínas con actividad proapoptótica, y aunque su actividad como correccionista de la transcripción nos invita a pensar que se encuentra en un ambiente nuclear diversos reportes señalan que esta proteína participa en procesos de suma importancia en un contexto citosólico como es el caso de la fisión del aparato de Golgi así como el tráfico de vesículas (Valente et al., 2013). Estudios previos de nuestro laboratorio indican que el CtBP1 puede interactuar con el extremo carboxilo terminal de los canales de sodio dependientes de voltaje de las isoformas 1.2 y 1.6 (Nav1.2 y Nav1.6) Es por eso que en este trabajo buscamos probar la interacción entre el extremo C-terminal del canal de sodio Nav1.2 y el factor de transcripción CtBP1 en un contexto fisiológico. En los siguientes apartados expondré detalles sobre la estructura y función tanto de los canales de sodio como del CtBP1 y los antecedentes que nos llevaron a proponer la posible interacción entre estas dos proteínas.

CANALES DE SODIO. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Los canales de sodio dependientes de voltaje son los responsables de iniciar los potenciales de acción en neuronas y en otras células excitables y se encuentran involucradas en la propagación del potencial de acción a lo largo de las fibras

nerviosas y musculares (Catterall, 2013). Los canales de sodio de organismos eucariotas están altamente especializados en su papel de conductores de la corriente iónica que inician la fase de ascenso de los potenciales de acción. Las características distintivas de los canales de sodio incluyen: una activación rápida dependiente de voltaje, una selectividad a los iones de sodio y un mecanismo de inactivación rápida y otro de inactivación lenta.

Específicamente en el cerebro de mamíferos son estructuras complejas, se componen de una subunidad alfa (Nav1.1-1.9) cuya masa molar oscila 200 y 260 kDa, que se encuentra asociada con una o dos subunidades beta auxiliares (1-4) de 33-36 kDa de peso. Para formar la estructura primaria, la subunidad alfa del canal de sodio se pliega en 4 dominios internos repetidos (I-IV), cada uno de estos cuenta con seis segmentos transmembranales con una estructura de hélice alfa (S1-S6). En cada dominio, el segmento S1-S4 funcionan como un módulo que se encarga de detectar el voltaje gracias a los aminoácidos con carga positiva (arginina o lisina) que posee por cada tres o cuatro residuos, que suman un total entre cuatro y ocho cargas positivas en estos canales. Los segmentos de S5, S6 y el asa P, que se encuentra entre estos segmentos y que se pliega en la región transmembranal del canal, funciona como un módulo formador de poro. Tres asas intracelulares largas, que unen a los cuatro dominios homólogos, y los extremos N-terminal y C-terminal también contribuyen sustancialmente a la masa de la cara interna del canal de sodio (Catterall, 2013). El asa intracelular que conecta DIVS6 y DIVS1 funciona como una compuerta de inactivación, cerrando el poro del canal durante la inactivación rápida (de Lera, 2015) (Figura 1).

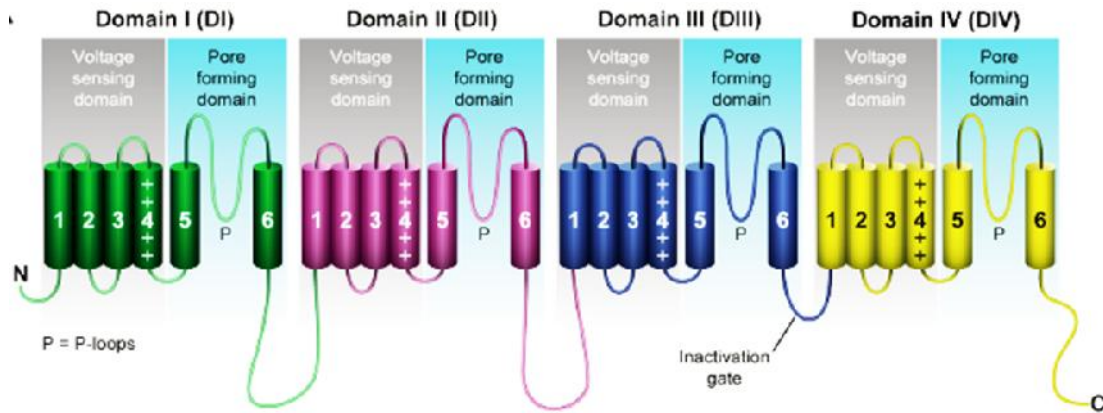


Figura 1 Estructura general de los canales de sodio Nav

Estos se componen de 4 dominios homólogos, cada uno de estos dominios está constituido por 6 segmentos transmembranales. El segmento 4 de cada dominio se encarga de detectar el voltaje gracias a los aminoácidos cargados positivamente. El segmento 5 y 6 son los encargados de formar el poro y, por último, el asa intracelular que une el segmento 6 del dominio 3 y el segmento 1 del dominio 4 funciona como puerta de inactivación. Tomado de Ruíz, 2014.

Los genes que codifican a los canales de sodio dependientes de voltaje están presentes en una amplia variedad de metazoos, tales como la mosca, medusa y el calamar e incluso bacterias, aunque de todos los organismos donde se han encontrado estos genes y proteínas, el humano, la rata y el ratón son los mejores estudiados hasta la fecha. Son diez los genes codificantes para canales de sodio que se han encontrado en vertebrados, nueve de ellos corresponden a las 9 isoformas de los canales de sodio dependientes de voltaje la isoforma 10 (Nav_x) está presente en niveles elevados en corazón, músculo esquelético y útero, a niveles bajos en el cerebro, riñón y bazo, y en absoluto en el hígado o músculo liso. Esta isoforma también se ha detectado en astrocitos, lo que sugiere que puede representar un canal glial específico (Goldin, 2001). Los genes que codifican para canales de sodio de las isoformas Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3; y Nav1.7 se encuentran localizados en el cromosoma 2 de humano y ratón, estos canales comparten similitudes en características biofísicas, en sus secuencias y en su sensibilidad a la toxina tetrodotoxina (TTX), molécula aislada del pez globo de la familia de los tetrodóntidos la cual puede inactivar a estos canales en concentraciones nanomolares.

Un segundo grupo de genes ubicado en el cromosoma 3p21-24 en el humano y en

el cromosoma 3 en el ratón codifican para las isoformas Nav1.5, Nav1.8 y Nav1.9. Estos genes presentan una homología en sus secuencias mayor al 75% con respecto a las isoformas encontradas en el cromosoma 2 anteriormente descritas. La sustitución de ciertos aminoácidos en el motivo hidrofóbico la cual es una secuencia de 3 aminoácidos: Interleucina, Fenilalanina y Metionina (IFM) entre el dominio III y IV encargado de la rápida inactivación les confiere a estas isoformas (1.5-1.9) una mayor resistencia a la TTX. En la isoforma Nav1.5 el cambio de un aminoácido en el dominio I del poro del canal (fenilalanina por cisteína) es el responsable de un incremento al menos 200 veces en la resistencia a la TTX (Catterall, 2013).

Las distintas isoformas de los canales de sodio dependientes de voltaje se expresan de manera diferencial a lo largo del sistema nervioso, presentando una distribución preferencial sobre ciertos tejidos. Las isoformas Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 y Nav1.6 se encuentran predominantemente en el sistema nervioso central (SNC); mientras que, las isoformas Nav1.7, Nav1.8 y Nav1.9 se presentan principalmente en el sistema nervioso simpático del sistema nervioso autónomo y el sistema nociceptivo perteneciente al sistema nervioso periférico (SNP). Por su parte, la isoforma Nav1.4 se localiza predominantemente en el músculo esquelético y finalmente la isoforma Nav1.5 está presente en el músculo cardíaco (Figura 2 y Tabla 1). No obstante, la expresión de estas isoformas no es exclusiva de los tejidos mencionados. Por ejemplo, Nav1.5 es la isoforma predominante en el músculo cardíaco, sin embargo, también se ha observado una baja expresión de esta isoforma en regiones no relacionadas con el tejido cardíaco (Roger et al., 2015).

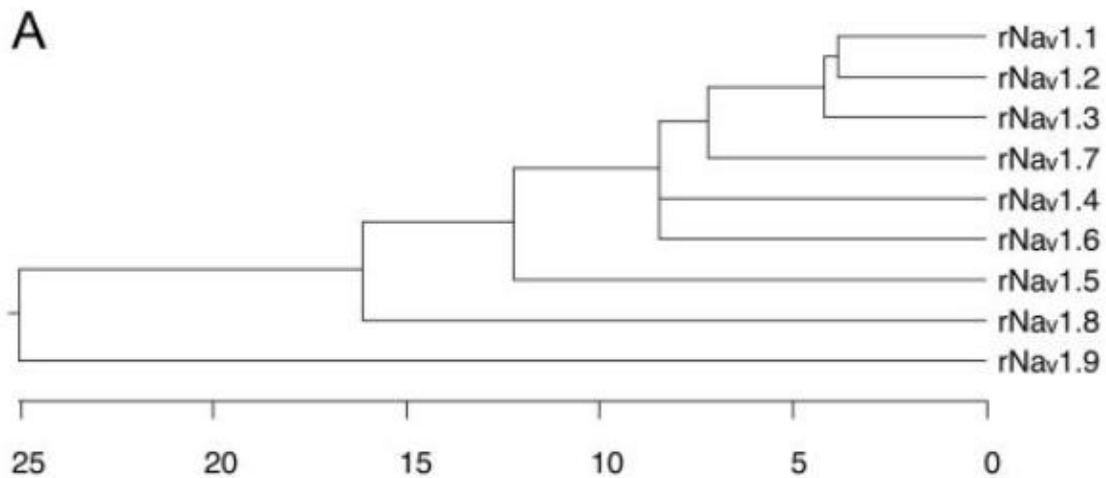


Figura 2. Porcentaje de similitud y relación filogenética de los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav) (Catterall, 2013)

Tabla 1. Isoformas de los canales de sodio dependientes de voltaje, distribución predominante en el sistema nervioso, sensibilidad a TTX y genes que los codifican

Isoforma	Distribución	Bloqueo con TTX K_b o IC_{50}	Nombre del gen (<i>Mus musculus</i>)
$Nav_{1.1}$	SNC	Nanomolar (8)	<i>SCN1A</i>
$Nav_{1.2}$	SNC	Nanomolar (8)	<i>SCN2A</i>
$Nav_{1.3}$	SNC	Nanomolar (8.4)	<i>SCN3A</i>
$Nav_{1.4}$	Músculo esquelético	Nanomolar (8.3)	<i>SCN4A</i>
$Nav_{1.5}$	Músculo cardiaco	Micromolar (5.8)	<i>SCN5A</i>
$Nav_{1.6}$	SNC	Nanomolar (9)	<i>SCN8A</i>
$Nav_{1.7}$	SNP	Nanomolar (8.4)	<i>SCN9A</i>
$Nav_{1.8}$	SNP	Micromolar (4.2)	<i>SCN10A</i>
$Nav_{1.9}$	SNP	Micromolar (4.4)	<i>SCN11A</i>

FUNCIONES NO CANÓNICAS DE LOS CANALES DE SODIO.

Se sabe que la presencia de los canales iónicos no se limita a células eléctricamente excitables, incluyendo a los canales de sodio dependientes de voltaje, los cuales se han descrito, por ejemplo, en astrocitos de la médula espinal (Black & Waxman, 2013).

Existen evidencias que muestran que los canales de sodio regulan la función de células no excitables (revisado por Black & Waxman, 2013). Por ejemplo, se ha visto que el bloqueo de los canales de sodio en cultivos de microglía atenúan la fagocitosis en un 40%; este estudio también mostró que la inhibición de los canales de sodio por medio de la TTX atenúan la liberación de citocinas proinflamatorias como la interleucina 1- ($IL-1$), $IL-1\beta$ y el factor de necrosis tumoral α ($TNF-\alpha$) en células de microglía, mientras que tuvo efectos mínimos en la liberación de $IL-2$, $IL-4$, $IL-6$, $IL-10$, en la proteína quimiotáctica del monocito 1 ($MCP-1$) y en el factor de crecimiento transformante α ($TGF-\alpha$). También la TTX reduce significativamente la migración de la microglía inducida por ATP. (Black et al., 2009). Aunado a esto, los canales de sodio no limitan su localización y función en la membrana plasmática, sino que se ha visto que se encuentran en membranas intracelulares rodeando organelos específicos, contribuyendo a procesos diversos tales como: motilidad, fagocitosis, la liberación de moléculas de inflamación y la regulación de la bomba Na/K -ATPasa en células no excitables (Black & Waxman, 2013).

Por otro lado, aunque los canales de sodio se expresan de manera normal en células eléctricamente excitables, existen evidencias de que estas proteínas también se encuentran expresadas de forma anómala en células cancerosas. El primer reporte de la presencia de canales de sodio en células cancerosas fue publicado por Grimes y colaboradores en 1995, esto en células de cáncer de próstata espontáneo en ratones. Desde entonces, la presencia de diversas isoformas de los canales de sodio en células cancerosas ha sido ampliamente documentada (Tabla 2). Estudios posteriores han sugerido que la expresión

anómala de los canales de sodio dependientes de voltaje Nav parecen influenciar en la aparición de características invasivas en los carcinomas (Roger et al., 2015). Por ejemplo, la isoforma $Nav1.7$ se ha identificado en células de cáncer de mama y cáncer de próstata, donde se ha visto que promueve la proliferación y la migración de las células tumorales, lo cual produce un incremento de su letalidad (Uysal-Onganer & Djamgoz, 2007). En otro ejemplo, House y colaboradores en el 2010 documentaron la contribución de los canales de sodio $Nav1.5$ funcionales en la invasividad del cáncer de colon por medio del ensayo en matrigel, en presencia del inhibidor de canales de sodio (TTX) observando, que en presencia de este inhibidor la migración celular disminuye.

Tabla 2. Canales de sodio expresados en distintos tipos de cáncer y su posible papel funcional.

Cáncer	Canal Nav (Subunidad)	Actividad en cáncer	Referencia
Mama	Nav 1.5, Nav1.7	Invasión, migración, adhesión, proliferación endocitosis	Fraser et al., 2005, Brackenbury et al., 2007 Pan & Djamgoz, 2008
Próstata	Nav1.2, Nav1.6, Nav1.7	Invasión, migración, proliferación, adhesión, endocitosis	Grimes et al., 1995 Smith et al., 1998 Nakajima et al., 2009
Cervicouterino	Nav1.4, Nav1.6	Invasión	Hernandez-Plata et al., 2012
Ovario	Nav1.1, Nav1.5	Migración, Invasión	Gao et al., 2010
Colon	Nav1.5	Invasión	House et al., 2010 Guzel et al., 2019
Pulmón células no pequeñas	Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7	Invasión	Roger et al., 2007 Campbell et al., 2013
Pulmón células pequeñas	Nav1.3, Nav1.5, Nav1.6	Endocitosis	Blandino et al., 1995
Melanoma	Nav1.6	Invasión, formación de podosomas	Allen & Cahalan, 1997 Carrithers et al., 2009
Leucemia	Nav1.5, Nav1.6	Invasión, formación de podosomas	Carrithers et al., 2009 Yamashita et al., 1987
Astrocitoma	Nav1.5	Migración, invasión, proliferación, evasión de la apoptosis	Xing et al., 2014
Neuroblastoma	Nav1.1 Nav1.2 Nav1.3 Nav1.4 Nav1.5 Nav1.6 Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9	-	Vetter et al., 2012 Benzinger, 1999
Mesotelioma	Nav1.2, Nav1.6, Nav1.7	Migración	Fulgenzi et al., 2006
Gástrico	Nav1.7	Invasión, proliferación	Xia et al., 2016

Sorprendentemente, la manera en que los canales influyen en la aparición de características invasivas parece ser independiente de la generación de los potenciales de acción. Una teoría es que el sodio actúa como un control en algunas vías de señalización implicadas en la invasión mesenquimal a través de la regulación de proteínas tales como: Intercambiadores sodio/protón (Na^+/H^+) y sodio/calcio ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) lo cual sugiere que los canales se encuentran relacionados con otras actividades celulares además de mantener los potenciales eléctricos de la membrana (Roger et al., 2015).

De manera sorprendente, evidencias de otros investigadores indican que los canales de sodio están presentes en tejidos cancerígenos y estos canales podrían influenciar la expresión génica. Por ejemplo, House y colaboradores en el 2010 reportaron la presencia de canales de sodio dependientes de voltaje, específicamente Nav1.5 en la línea celular de cáncer de colon (HT29) y mediante análisis de microarreglos encontraron que cuando se inhibe la expresión de este gen hay una disminución significativa en los genes relacionados con la invasividad y la proliferación celular. Esto indica que los canales forman parte de una red de efectores que promueven la invasión y la proliferación celular en cáncer de colon, este estudio es importante para este trabajo ya que no sólo se comprobó la presencia de los canales de sodio en células cancerosas, sino que se observó que los canales de sodio participan en la regulación de la expresión de genes que facilitan la invasión de otros tejidos tales como: ADAM21 (*a disintegrin and metalloprotease domain*), CCR9 (*C-C Motif Chemokine Receptor 9*) y CD53 (House et al., 2010).

PROTEÍNA DE UNIÓN AL EXTREMO C-TERMINAL (CtBP1)

El factor de transcripción CtBP1 fue descrito por primera vez en 1991 como una proteína con una alta homología entre distintos organismos la cual fue descrita como una proteína de la matriz extracelular y posteriormente y gracias a su capacidad para interactuar con el extremo C-terminal de la proteína adenoviral E1A fue llamada así (Belgrader, 1991; Schaeper, 1995). Los miembros de la familia CtBP, CtBP1 y CtBP2,

funcionan predominantemente como correpresores de la transcripción, en asociación con las proteínas de unión al DNA que promueven la represión transcripcional (Chinnadurai, 2007). Sin embargo, reportes de varios grupos han ido revelando que el CtBP podría tener un papel significativo en otros espacios subcelulares, como la membrana y el aparato de Golgi.

La familia CtBP se encuentra altamente conservada entre los vertebrados e invertebrados al igual que su función como correpresor de la transcripción. Esta familia reprime la transcripción de genes uniendo deacetilasas de histonas. A su vez, la desacetilación de las histonas causa condensación de la cromatina restringiendo el acceso de los factores de transcripción al DNA (Chinnadurai, 2002). La estructura cristalizada de CtBP ha ayudado a dilucidar su función. Una de las características mejor descritas y más distintivas de esta familia de proteínas es la presencia de una hendidura hidrofóbica que contiene un sitio de unión a proteínas con motivos PxDLS, o bolsillo PxDLS, que abarca los aminoácidos 27 al 121.

Esta región se complementa con algunos aminoácidos ubicados más cerca del lado carboxilo (hojas plegadas 327-352) para formar un dominio funcional de unión al sustrato, es decir de unión a proteínas del complejo represor. El bolsillo PxDLS es crucial para su función como reclutador de la maquinaria de represión ya que se ha reportado que a través de este sitio CtBP interactúa con represores de la transcripción y con proteínas remodeladoras de la cromatina, como deacetilasas y metiltransferasas de histonas. Las mutaciones en este sitio inhiben la interacción con otras proteínas (Chinnadurai, 2007) (Figura 3). Inmediatamente después del bolsillo PXLDS, CtBP posee otra región de unión a proteínas, denominada bolsillo RRT, que también es capaz de reclutar y unir otros miembros del complejo represor con motivos RRTGXPPLX o motivo RRT (Quinlan et al., 2006, Kuppaswamy et al., 2007). Este bolsillo RRT, se encuentra en el dominio de unión a DNA (NBD), por lo que cumple una triple función, ya que dentro del bolsillo RRT hay un sitio de unión para NAD/NADH. De hecho, otra de las características sobresalientes del CtBP1 es que la región central de la proteína, incluyendo los bolsillos PxDLS y RRT, muestra homología con la familia de las deshidrogenasas D2-hidroxiácidas. La unión de NAD o NADH promueve la dimerización

del CtBP1 y se ha reportado que dicha unión es crucial para su función como correpresor de la transcripción (Kumar et al., 2002). Sin embargo, aunque existe evidencia de que posee actividad deshidrogenasa no se ha establecido si dicha actividad afecta su actividad como represor (Balasubramanian, 2003). Hacia el extremo carboxilo de la proteína, CtBP se dimeriza a través de una gran interfaz de dimerización predominantemente hidrófoba dentro del NBD. Como resultado, CtBP dimerizado podría reclutar dos proteínas correpresoras con motivos PXDLS simultáneamente. Un modelo predominante de cómo CtBP cumple sus funciones de correpresor sugiere que una molécula de CtBP dentro del dímero es reclutada a regiones promotoras específicas a través de su interacción con el PXDLS (Blevins et al., 2017).

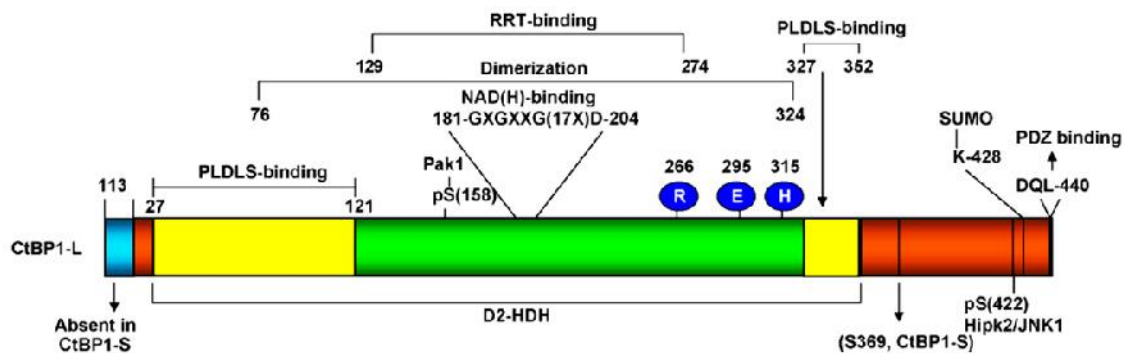


Figura 3. Estructura de CtBP1-L. La isoforma L, a diferencia de la isoforma S, cuenta con 13 aminoácidos extras en la región amino-terminal.

Los vertebrados poseen dos genes distintos que codifican dos proteínas altamente relacionadas: CtBP1 y CtBP2, mientras que los invertebrados poseen un solo gen que codifica una única proteína CtBP. El gen de CtBP1 se encuentra localizado en el cromosoma 5 en ratones y en el cromosoma 4 en humanos (Chinnadurai, 2007). CtBP1 posee al menos dos isoformas, una corta (CtBP1-S) y una larga (CtBP1-L), la diferencia entre estas dos isoformas radica en la ausencia de 13 aminoácidos en la región amino-terminal de la isoforma CtBP1-S y esta fue descrita por primera vez en

1999 por Spanò como CtBP/BARS3, esto debido a que CtBP1-S podía sufrir ADP-ribosilación por un metabolito fúngico llamado Brefeldin A (*Brefeldin A-ADP-ribosylated substrate of BARS*, por sus siglas en inglés) el cual promueve el desensamble del aparato de Golgi en redes tubulares. CtBP1-S parece inhibir el desensamble del aparato de Golgi (Spanò et al., 1999).

Distribución subcelular. CtBP1 se distribuye principalmente en el citoplasma, específicamente en el citosol, complejo de Golgi, en la membrana plasmática y finalmente en el núcleo, lo cuales consistente con su actividad dual como regulador de la transcripción y su participación en procesos como fisión de la membrana y el tráfico vesicular. El cambio de distribución entre el citoplasma y el núcleo se debe a la interacción con diversas proteínas que modifican estas dinámicas como son la interacción con las distintas isoformas de CtBP1, modificaciones postraduccionales e incluso fosforilación por cinasas de proteína (Verger et al., 2006).

Distribución de CtBP1 en el cerebro. Se ha descrito la distribución de CtBP a lo largo y ancho del cerebro, en un estudio publicado en el 2012 por Hubler y colaboradores se mostró que CtBP1 se encuentra distribuido de manera ubicua y homogénea en el cerebro de ratón y CtBP2 posee de igual manera una distribución en todo el cerebro, aunque éste se concentra más en el bulbo olfatorio y en el cerebelo. Esto se determinó mediante ensayos de western blot, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en de tejido de cerebro de ratón adulto y en cerebros de embriones de ratón (18 días); aunado a esto, se observó que CtBP está presente en zonas sinápticas, esto se observó por medio de imágenes confocales donde se observó que CtBP1 colocaliza con una proteína de andamiaje Bassoon la cual está implicada en la liberación de vesículas sinápticas en zonas activas (Hübler et al., 2012).

CtBP1 PARTICIPA EN LA FUSIÓN MEMBRANAL EN EL APARATO DE GOLGI.

Los procesos de fisión membranal en el aparato de Golgi son cruciales para el

tráfico y transporte de diversas sustancias a través de la membrana, se ha reportado que CtBP induce la fisión del aparato de Golgi, esto por medio de acetil-CoA el cuál es un importante donador de lípidos, los cuales son necesarios para este proceso de fisión (Weigert et al., 1999). Posteriormente se reportó que la isoforma encargada de este proceso es CtBP1 y que no sólo participa en procesos de fisión del aparato de Golgi, sino que también está involucrado en el tráfico de vesículas entre el Golgi y la membrana plasmática (Gallop, 2005).

Complementario con esto, CtBP1 también participa en la partición del aparato de Golgi durante la mitosis, aunque los mecanismos moleculares por los cuales esto se lleva a cabo aún no se describen completamente, se ha reportado que la ausencia de CtBP1 resulta en una falta de división del aparato de Golgi en vesículas como se observa en condiciones control, lo cual es un ejemplo de la actividad de esta proteína en procesos relacionados con la división celular en un ambiente citosólico (Corda, 2006).

ANTECEDENTE

Datos originales de nuestro grupo de trabajo muestran que CtBP1 puede interactuar con el extremo C-terminal de NaV1.2 y de NaV1.6. Estos datos preliminares muestran la posible interacción entre el factor de transcripción CtBP1 y el extremo C-terminal del canal de sodio NaV1.2 y su posible función en un contexto nuclear. Las evidencias iniciales al respecto surgieron de ensayos de doble híbrido, en el cual se exploró la interacción del carboxilo terminal de NaV1.2 y NaV1.6 contra una genoteca de cerebro de ratón, para identificar proteínas que pudieran unirse a dicha región del canal. El ensayo de doble híbrido se basa en la construcción de un plásmido que contiene la secuencia de la proteína a estudiar (cebo) unido a un dominio de unión a DNA (BD) y una segunda construcción compuesta por la librería de expresión de todas las proteínas del genoma de ratón unida a un dominio de activación (AD). La interacción entre estas dos proteínas reconstruye un factor de transcripción que regula la expresión de un gen reportero (la β -galactosidasa), la interacción de los híbridos acercará el dominio de unión a DNA al dominio de activación promoviendo la expresión del gen reportero. Estos plásmidos son incorporados a cepas de levaduras modificadas para anular su capacidad de sintetizar algunos aminoácidos y nucleótidos de forma autónoma. La β -galactosidasa al ser expresada promueve la degradación de un agente sintético inmerso en el medio, el X-gal (Figura 4). Este compuesto al ser degradado por la β -galactosidasa, genera, un color azul lo cual evidencia la presencia de la interacción entre dos proteínas. Como se puede ver en la Figura 4, este ensayo encontró que el extremo C-terminal de los canales de sodio de las isoformas NaV1.2 y NaV1.6 interactúan con el factor de transcripción Sin3B y únicamente el C-terminal de NaV1.2 interactúa con al menos 3 factores de transcripción más (BTAF1, CtBP1 y BAT3). De entre estos factores de transcripción, nuestro laboratorio ha estudiado con mayor detalle la interacción entre los canales NaV1.2 y NaV1.6 y el factor de transcripción Sin3B. El Sin3B funciona como un adaptador para múltiples factores de transcripción con actividad represiva, como la histona deacetilasa (HDAC), el cual está implicado en el silenciamiento de genes.

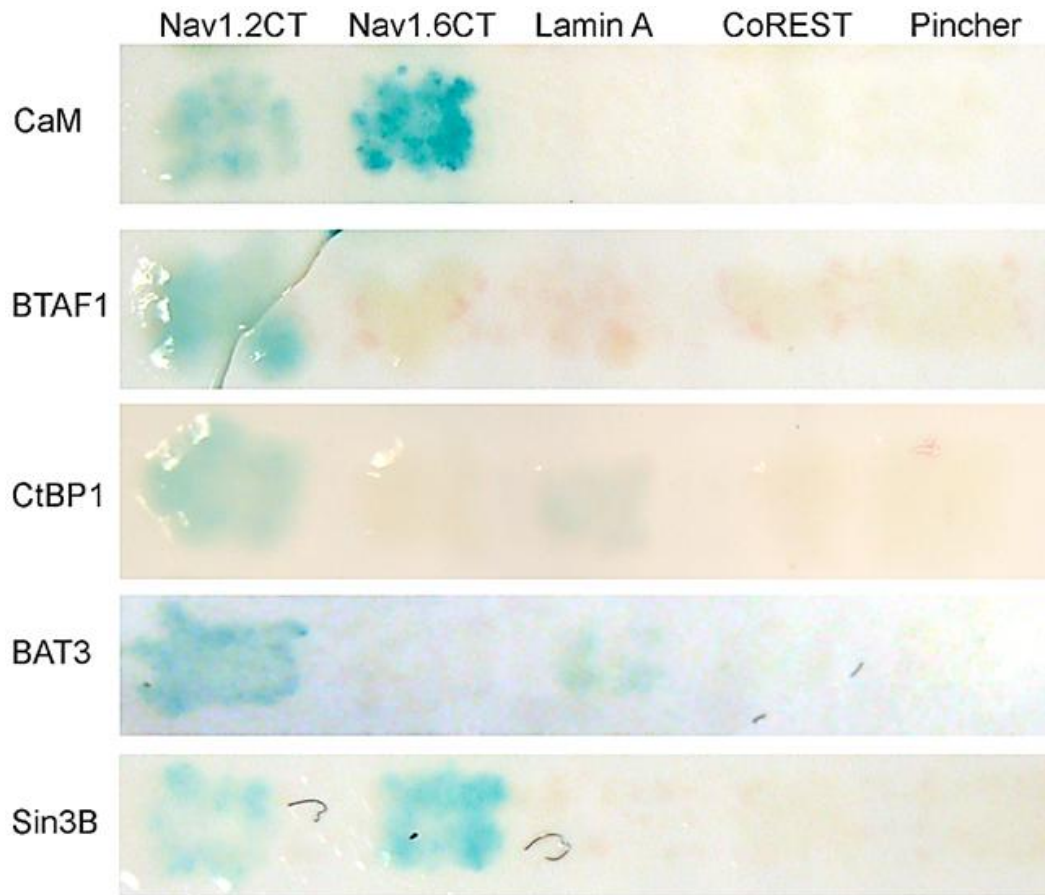


Figura 4. Interacción entre el extremo C-terminal de Nav1.2 y Nav1.6

En la imagen se observan células co-transfectadas y expuestas a X-Gal. Como puede observarse, sólo las células que expresan pares interactores promueven la degradación del sustrato X-Gal que produce un precipitado de color azul. En contraste, en las columnas con proteínas no relacionadas con canales (Lamin A, CoREST y Pincher), las cuales funcionan como control negativo, no se observa un precipitado de color azul, lo cual evidencia la falta de interacción entre el CT de Nav1.2 y Nav1.6 (Datos no publicados)

Sin embargo, el Sin3B también puede encontrarse fuera del núcleo. En este mismo estudio se realizaron inmunoprecipitaciones de fracciones membranales del extremo C-terminal de las isoformas 1.2 y 1.6 de Nav. Este método mostró que el factor de transcripción Sin3B no sólo se encuentra en un contexto nuclear, sino que también puede encontrarse en la membrana plasmática donde puede interactuar con el extremo

C-terminal de la isoforma Nav1.6 y esta interacción puede modificar las corrientes a través de estos canales sin afectar su expresión a nivel de proteína, lo cual sugiere que esta interacción modifica la translocación del canal en la membrana produciendo una menor densidad de canales a lo largo de la célula y reduciendo de esa forma la corriente entrante a la misma (Vega et al., 2013).

Como se mencionó en una sección previa, aunque el papel de CtBP1 se piensa que es predominantemente nuclear, también hay evidencias de que puede trasladarse entre la membrana plasmática y el núcleo (Gallop, 2005; Hübler et al., 2012; Verger et al., 2006; Weigert et al., 1999; Corda, 2006). Esto abre la posibilidad de que el CtBP1 interactúe con los canales de sodio en un contexto citosólico o membranal.

Por otro lado, aunque los canales iónicos son predominantemente membranales, un análisis *in silico* del extremo carboxilo terminal de las 9 isoformas (Figura 5A) nos llevó a observar que en 6 de las 9 isoformas poseen una señal de localización nuclear bipartita (NLS) la cual se basa en un agrupamiento de 2 aminoácidos cargados positivamente seguido de 10 aminoácidos cuya secuencia parece ser irrelevante y finalmente un segundo grupo de 5 aminoácidos con 3 aminoácidos positivos. Esta segunda región se encuentra incompleta para las isoformas Nav1.3, Nav1.6 y Nav1.8 (Figura 5A).

Dicha NLS de los canales de sodio es funcional. Esto se observó usando construcciones de la proteína verde fluorescente (GFP) en fusión con el CT de Nav1.2 y Nav1.6. La transfección de esta construcción en cultivo celular N1E115 de neuroblastoma mostró que la quimera GFP-Nav1.6CT se distribuyó de manera homogénea en la célula, de manera similar a la distribución de la GFP. En contraste, la quimera GFP-Nav1.2CT se distribuyó predominantemente en el núcleo (Figura 5B). La diferencia en la distribución de estas quimeras podría explicarse por la ausencia o presencia, respectivamente, de la señal nuclear bipartita. Estos resultados nos llevaron a cuestionarnos si el canal de sodio Nav1.2, o al menos un fragmento del canal, pueden interactuar con el CtBP1 en un contexto nuclear, o incluso modular la actividad transcripcional del CtBP1.

A

mNav1.2	LKRKQEEVSAIVIQRAYRR
nucleopasmin	AVKRPAATKKAGQAKKKKL
N1/N2	RKKRKTEEESPLKDKDAKK
mNav1.1	LKRK*****VI**R**RR
mNav1.3	LKRK*****AI**RN*RC
mNav1.4	LKRK****C**K**R**RR
mNav1.5	LRRKH*****T**R*FRR
mNav1.6	LKRK*****VVL*R**RG
mNav1.7	LKRK**D***TI**R**RR
mNav1.8	LRRK**DI**TI**K**RN
mNav1.9	TKRKE**EC*AV**R**RR
	: *.*: .* :*: :*

B

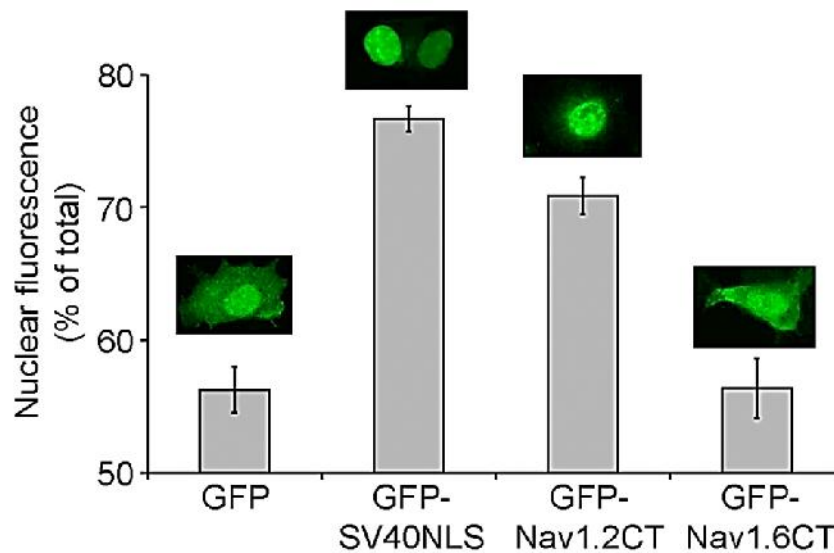


Figura 5 Señal de localización nuclear bipartita de Nav1.2.

Algunos canales de sodio poseen una señal nuclear bipartita funcional A) Alineamiento de NLS de nucleoplasmina con las 9) isoformas de canales de sodio. Nótese que la señal se encuentra incompleta en el extremo C-terminal de las isoformas Nav1.3, Nav1.6. B) Expresión heteróloga de proteínas quiméricas GFP-Nav1.2CT y GFP-Nav1.6CT. Se observa la distribución de Nav1.2CT de forma predominantemente nuclear, a diferencia de la isoforma Nav1.6CT la cual tiene una distribución homogénea al igual que el control negativo, la GFP (Datos no publicados)

La idea de que un fragmento de un canal iónico pueda funcionar como un factor de transcripción ha sido propuesta anteriormente para canales de calcio dependientes de

voltaje. Gómez-Ospina et al., (2006) identificaron que el extremo C-terminal del canal de calcio de alto umbral de la isoforma 1.2 (Cav1.2) codifica para un factor de transcripción. El canal de calcio Cav1.2 genera por medio de un corte proteolítico un fragmento en el extremo carboxilo terminal conocido como CCAT (*Calcium Channel Associated Transcriptional Regulator*) el cual puede regular la transcripción por su translocación al núcleo. Esto se demostró mediante la expresión heteróloga (en células Neuro2A) de la construcción de una proteína de fusión entre CCAT y el dominio de unión a DNA de levadura Gal4 (Cav1.2CT-Gal4). Este dominio de unión reconoce la secuencia UAS-DNA, pero para que la transcripción ocurra se requiere un dominio de activación. Para medir la intensidad de la transcripción se utilizó un gen reportero, la secuencia UAS-luciferasa, misma, permitió medir la expresión de la luciferasa por medio de su intensidad lumínica la cual aumentó 80 veces con respecto al control sin CCAT. Estos resultados demostraron que el CCAT puede funcionar como un factor de transcripción. Seguido de esto para identificar los genes diana que regula el CCAT, se realizaron transfecciones del fragmento CCAT en cultivos de células HEK293. Posteriormente se realizó un análisis de microarreglo y se observó que en las células transfectadas existía un aumento en la transcripción de 66 mensajeros, los cuales incluyen genes que codifican proteínas relacionadas con las uniones gap (Cx31.1), el factor regulador de la señal de proteínas G (RGS5), proteínas relacionadas con uniones estrechas (Claudina 19), entre otros.

En conjunto todas estas observaciones nos han llevado a proponer que la interacción de los canales de sodio con factores de transcripción podría ocurrir ya sea con la isoforma completa o con un fragmento del canal.

Aunque son varias las preguntas que surgen de las observaciones expuestas en esta sección, en el presente proyecto nos enfocamos en confirmar la interacción entre el CtBP1 y el CT de Nav1.2 mediante métodos bioquímicos.

HIPÓTESIS

- H1. Nav1.2 y CtBP1 interactúan físicamente y pueden ser co inmunoprecipitados
- H2. No existe interacción entre el canal de sodio Nav1.2 y el factor de transcripción CtBP1

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el CtBP interactúa con el extremo carboxilo terminal de canal de sodio Nav1.2 en muestras de cerebro de ratón.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Inmunoprecipitar Nav1.2 a partir de lisados de cerebro de ratón.
- Determinar si el CtBP1 está presente en el inmunoprecipitado de Nav1.2

METODOLOGÍA



Figura 6. Estrategia metodológica propuesta.

ANIMALES

Se utilizaron ratones de género indistinto de 12-15 días de nacidos de la cepa CD-1 de 30 g de peso corporal obtenidas del bioterio de la FES Iztacala UNAM. Los animales fueron manejados de acuerdo con las guías establecidas por el comité de ética de la UNAM, en acuerdo con la declaración de Helsinki y dicho procedimiento se ejecutó conforme la Norma Oficial Mexicana **NOM-062-ZOO-1999** que especifica las técnicas para la producción cuidado y uso de animales de laboratorio.

1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE CEREBRO DE RATÓN

Los cerebros extraídos de aproximadamente 100 mg de peso se lavaron con PBS 1× y posteriormente se agregó solución de lisis RIPA (140 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 % Tritón X-100, 0.1 % deoxicolato de Na, 0.1 % SDS, 20 mM NaF, 2 mM NaOV₄, 1 mM PMSF y un cóctel de inhibidores de proteasas). Los tejidos se maceraron con un homogeneizador de teflón-vidrio, posteriormente los extractos se centrifugaron a 19,000 ×g por 25 min a 4 °C, y se recuperó el sobrenadante. La concentración de las proteínas se determinó por medio de la técnica de Bradford.

2. INMUNOPRECIPITACIÓN

Para los ensayos de inmunoprecipitación las muestras concentradas (6-8 mg/mL) se diluyeron para obtener una concentración de trabajo de 1 mg/mL de proteína en el regulador de inmunoprecipitación (20 mM Tris-Cl, pH 7.4 135 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10% glicerol, 1 % Triton X-100) adicionado con inhibidores de proteasas, para evitar la degradación de las proteínas y preservar su integridad. Adicionalmente, durante todo el procedimiento la muestra se mantuvo entre 4-10 °C. La muestra se incubó en agitación por 30 min y después se centrifugó a 10,000 ×g, 20 min a 4°C, para separar la fracción no solubilizada (pastilla). La fracción solubilizada (input) se incubó con un anticuerpo contra Nav1.2 monoclonal (*Neuromab*, No. cat. K69/8) o con un anticuerpo policlonal de conejo anti-Nav1.2 obtenido de nuestro laboratorio, en agitación durante 1

h. Posteriormente, se utilizaron perlas de agarosa A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology) lavadas previamente con buffer de inmunoprecipitación, se agregaron 25 μL por cada 500 μL de reacción, éstas se dejaron en agitación por 1 h a 4 $^{\circ}\text{C}$. Se centrifugaron las perlas a 17,000 $\times g$ por un minuto y se retiró el sobrenadante con una jeringa de insulina (sobrenadante) y posteriormente se realizaron 3 lavados con regulador de inmunoprecipitación. Cada lavado consistió de un periodo de agitación por 10 min, seguido de una centrifugación a 17,000 $\times g$ por un minuto y aspiración del sobrenadante con una jeringa de insulina. Finalmente, las perlas se resuspendieron en 200 μL de *Reducing Sample Buffer* (RSB). Las proteínas A/G de sefarosa permitirán la interacción con los anticuerpos unidos a las proteínas de nuestro interés

3. SDS-PAGE y WB

Una vez realizados los ensayos de inmunoprecipitación, estos se analizaron por western blot con anticuerpos anti-Nav1.2 y anti-CtBP1. Para este experimento se hicieron geles de acrilamida de diferentes concentraciones para optimizar la separación de proteínas de diferente masa molar derivadas de los ensayos de IP previos, 48 kDa para el caso de CtBP1 y 260 kDa para el caso de la isoforma completa del canal de sodio. Para llevar a cabo la electroforesis se usó un buffer de corrida (25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM glicina y 0.1% SDS). Posteriormente, se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF (Fluoruro de polivinilideno), que es capaz de unir proteínas por medio de interacciones hidrofóbicas. Para esto se usó un buffer de transferencia (25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM glicina y 20% metanol), con una corriente constante de 300 mA.

Una vez transferidas las proteínas se bloquearon los sitios irrelevantes con leche descremada en polvo. Después se incubaron con los anticuerpos específicos para las proteínas de interés. Se reveló con anticuerpos secundarios específicos que reconocen al anticuerpo primario y conjugado con HRP (Horseradish peroxidase) en una dilución 1:10,000 la cual en presencia de luminol genera una reacción quimioluminiscente que revela la unión y presencia de la proteína de interés en el blot.

El anticuerpo monoclonal para CtBP1 se obtuvo de *Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)* (IOWA, EU) el cual está dirigido a la secuencia completa de la proteína en humano, por otro lado el anticuerpo monoclonal de Nav1.2 (K69/8) se obtuvo de Neuromab (Davis, California, EU), el cual está dirigido a una secuencia dentro del carboxilo terminal de la secuencia de Nav1.2 de rata (RFMASNPSKVS YETTTLKRKQEEVSAIVIQRAYRRYLLKQKVKKVSSIYKKDKGKEDEGTPIKEDIITDKLNENSTPEKTDVTPSTTSPPSYDSVTKPEKEKFEKDKSEKEDKGKDIR ESKK). La especificidad de este anticuerpo ha sido probada anteriormente (Vega et al., 2008). Finalmente, el anticuerpo policlonal Anti-Nav1.2 se obtuvo en nuestro laboratorio inmunizando un conejo con un péptido localizado dentro de la secuencia que se usó para el anticuerpo monoclonal (YKKDKGKEDEGTPIKE), acoplado a KLH. El esquema de inmunización consistió en tres inyecciones subcutáneas del péptido (2 mg) solubilizado en 3 ml de PBS/10% DMSO, las inyecciones se aplicaron con una separación de 1 semana. El suero se recolectó 15 días después de la última inmunización. Los anticuerpos secundarios acoplados a HRP anti-ratón y anti-conejo fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology.

RESULTADOS

Se analizaron muestras de proteínas de cerebro extraídas de ratones de 12-15 días de edad, en razón de que a esta edad ocurre la máxima expresión de Nav1.2 (Boiko et al., 2001). Para nuestro análisis, utilizamos dos anticuerpos contra Nav1.2, un anticuerpo monoclonal que ha sido utilizado anteriormente, y un anticuerpo nuevo producido en el laboratorio inmunizado un conejo con un péptido único en la secuencia del extremo carboxilo de Nav1.2. Por lo tanto, uno de nuestros primeros pasos fue verificar que las señales producidas por ambos anticuerpos fueran reproducibles. La figura 7 muestra la inmunorreactividad producida por los anticuerpos anti-Nav1.2 monoclonal y el anticuerpo de conejo anti Nav1.2 producido en nuestro laboratorio. En el panel A se puede apreciar un blot de gel de acrilamida al 5% cargado con muestras de cerebro de ratón (40 μ g), en el cual se observa que ambos anticuerpos detectan una banda cercana a los 250 kDa, la cual pertenece a la isoforma completa del canal. En el panel B podemos apreciar un western blot producto de un gel con una concentración de 7% de acrilamida en el cual se observa el patrón de inmunorreactividad producido por el anticuerpo monoclonal anti-Nav1.2, donde se observan tres bandas de < 63kDa, 75 kDa y 100 kDa (segundo carril). Sin embargo, en el mismo panel se puede observar que las bandas de 75 y 100 kDa pueden ser producto del anticuerpo secundario anti-ratón usado en las muestras de ratón. En contraste, la banda por debajo de los 63 kDa probablemente pertenece a un fragmento del canal de sodio. En el panel C podemos apreciar el blot de un gel al 10%, el cual fue expuesto al anticuerpo policlonal contra el Nav1.2 producido en conejo; nuevamente este anticuerpo detecta una banda menor a 63 kDa, similar a la observada con el anticuerpo monoclonal, pero no detecta los fragmentos de 75 y de 100 kDa, lo que es consistente con la idea de que dichas bandas son producidas por el anticuerpo secundario.

Una vez que estudiamos el patrón de bandas de ambos anticuerpos, procedimos a realizar los experimentos de inmunoprecipitación del canal para así, finalmente, verificar la coinmunoprecipitación del Nav1.2 con CtBP1.

En la figura 8 se muestra la inmunoprecipitación con el anticuerpo monoclonal anti Nav1.2 de una banda de < 63 kDa, la cual es identificada por el anticuerpo policlonal.

Cabe mencionar que muy posiblemente nuestras condiciones experimentales resultaron subóptimas para la inmunoprecipitación de la isoforma completa del canal, ya que la mayor parte de la señal de 250 kDa fue observada en el pellet obtenido tras la solubilización inicial de la muestra en el buffer de inmunoprecipitación.

En la figura 9 se observa nuevamente la inmunoprecipitación hecha con el anticuerpo monoclonal anti-Nav1.2 (equivalente a 40 µg de muestra inicial) pero incubada ahora con el anticuerpo monoclonal anti-CtBP1. En el carril del lado izquierdo se observa una muestra de cerebro de ratón (MB) en la cual se puede apreciar una banda cercana a los 48 kDa la cual corresponde a CtBP1 y una banda a la misma altura se presenta en el producto de la inmunoprecipitación en el carril número 6 (IP) esto es un fuerte indicio de que hubo una coimmunoprecipitación del canal de sodio con el factor de transcripción CtBP1. Sin embargo, dicha coimmunoprecipitación ocurre a expensas del fragmento de < 63 kDa, que es el que se observa con claridad en el western correspondiente (Figura 8).

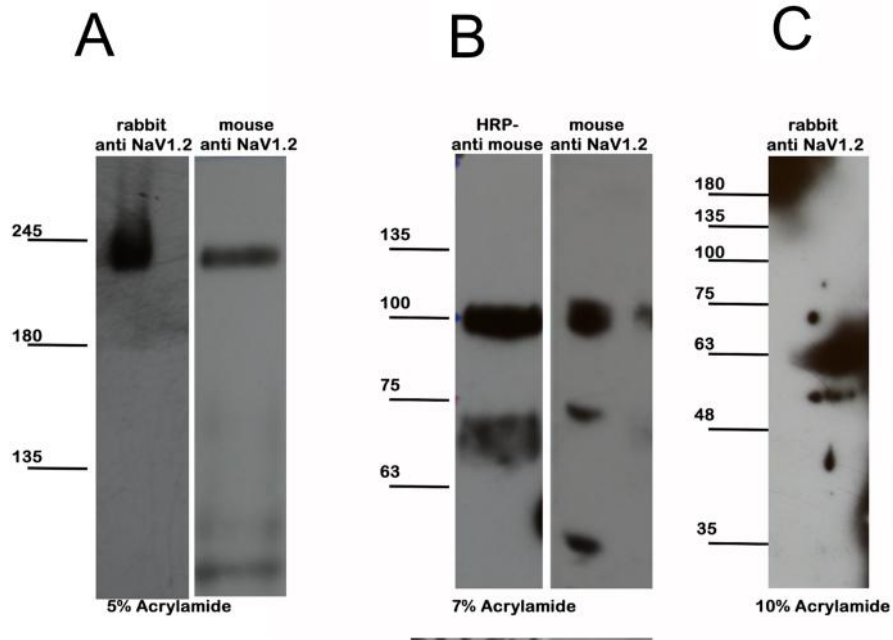


Figura 7 Patrón de inmunorreactividad de anticuerpos anti-Nav1.2

Muestras de cerebro de ratón fueron separadas por SDS-PAGE en geles de distinta concentración de acrilamida, transferidos e incubados con dos anticuerpos contra el extremo carboxilo terminal de Nav1.2. Podemos observar que los anticuerpos contra conejo reconocen una banda de 245 kDa (panel izquierdo) así como una banda inferior a los 63 kDa (panel derecho).

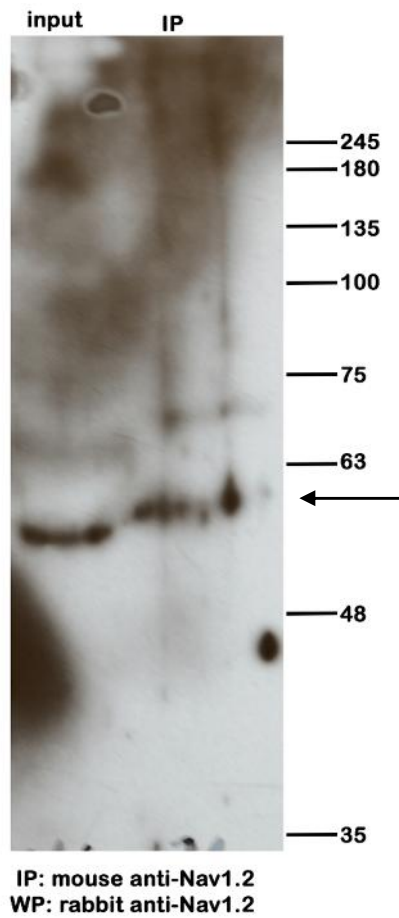


Figura 8 Inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales anti-Nav_v1.2.

En el primer carril se muestra el extracto de cerebro de ratón y en segundo carril se muestra la inmunoprecipitación producida por los anticuerpos monoclonales contra Nav_v1.2. En ambos carriles se observan bandas cercanas a los 63 kDa pertenecientes a un fragmento del canal de sodio. N=3.

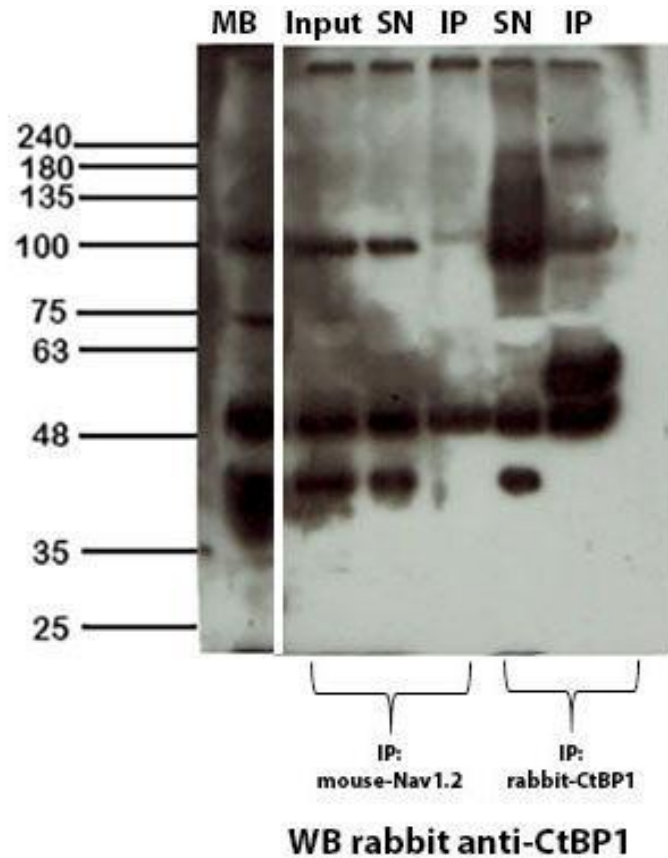


Figura 9 Coimmunoprecipitación de Nav1.2 y CtBP1.

En el primer carril del lado izquierdo se observa la muestra de cerebro de ratón seguido de la misma muestra diluida en *buffer* de lisis, mientras que en el carril central se observa el sobrenadante. Finalmente observamos la inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales anti-Nav1.2 e incubado con anticuerpos de conejo contra CtBP1 en donde se puede observar una banda por encima de los 48 kDa. Como control se cargó la muestra proveniente de la inmunoprecipitación producida con anticuerpos de conejo contra CtBP1 y podemos apreciar que esta muestra provoca un patrón de inmunoreactividad muy similar al de la inmunoprecipitación con anticuerpos de ratón anti-Nav1.2 lo cual nos sugiere que hubo una coimmunoprecipitación. N=3

DISCUSIÓN

Nuestros resultados indican que el CtBP1 puede interactuar con un fragmento de < 63 kDa que es reconocido por dos anticuerpos dirigidos contra el carboxilo terminal de Nav1.2. Ambos anticuerpos reconocen el canal completo, de cerca de 250 kDa de masa molar, y la banda de < 63 kDa. Aunque no se logró visualizar isoformas completas de los canales de sodio en las muestras de la inmunoprecipitación de extractos celulares de cerebro de ratón se obtuvieron fragmentos entre los 100 kDa y cercanos a los 63 kDa. Se ha reportado la presencia de estos fragmentos y se ha atribuido su aparición a procesos proteolíticos y de remodelamiento de los canales en la membrana plasmática (Von Reyn et al., 2009) (Cusdin, 2008). En este mismo sentido los productos de degradación observados en los geles incubados contra la región C-terminal de los canales de sodio Nav1.2 también pueden ser producto de procesos de remodelamiento de los canales. Bao en el 2015 realizó una revisión sobre la estructura de los canales de sodio dependientes de voltaje en la cual se menciona la existencia de sitios de interacción con proteínas tales como la ankirina G y espectrina las cuales permiten la ubicación de estos canales a sitios específicos de la membrana plasmática así como sitios de proteólisis presentes en la isoforma 1.2 de los canales de sodio dependientes de voltaje y una de estas regiones proteolíticas se encuentran en el extremo C-terminal, por lo cual una posibilidad para la aparición de estas bandas se explicaría como un producto de proteólisis de esta región (Von Reyn et al., 2009 y 2012).

Aunque no podemos determinar las regiones que inmunoprecipitan con la región C-terminal del canal e inmunoprecipitan con CtBP1 podemos inferir las regiones de acuerdo a los pesos de los mismos. Sato et al., (2001) reportaron los pesos respectivos de las regiones del canal de sodio Nav1.2 en la cual mencionan que la región C-terminal tiene una masa molar cercana de 29 kDa y el dominio IV posee una masa de 29 kDa (Sato et al., 2001), lo cual combinado puede dar una masa molecular cercana a la observada en nuestros experimentos.

Como se mencionó anteriormente los canales de sodio dependientes de voltaje se encuentran en diversos tejidos y su presencia no se limita al SNC. Se sabe que estos canales participan en diversos procesos no relacionados con la propagación de señales eléctricas, ya que se ha reportado la presencia de los mismos en diferentes tejidos tales como células secretoras e incluso células metastásicas en las cuales se ha relacionado con procesos tumorigénicos (Black et al., 2009; Roger et al., 2015; Uysal-Onganer; Djamgoz, 2007). La interacción de la isoforma Nav1.2 de los canales de sodio dependientes de voltaje con el factor de transcripción CtBP1 es un hallazgo novedoso de la interacción entre un factor de transcripción y un canal de sodio. Además, esto invita a preguntarse, ¿Cómo es que se está llevando a cabo esta interacción? Y más interesante aún, ¿Cuáles son las funciones o repercusiones de esta interacción? El factor correpressor de la transcripción CtBP1 es, como su nombre lo indica, un reclutador de represores de la transcripción, aunque su distribución no se limita a un ambiente nuclear, sino que también participa en diversos procesos citosólicos tales como el tráfico vesicular y la fisión del aparato de Golgi (Gallop et al., 2005; verger et al., 2006; Bonazzi et al., 2005). Por lo cual el contexto en la que se lleva a cabo la interacción entre CtBP1 y el canal de sodio Nav1.2 podría ser citoplásmico.

La forma en la cual se regula la función de los canales de sodio parece estar fuertemente determinada no sólo por su capacidad para percibir el potencial eléctrico de la membrana celular, sino que también se encuentra regulada por su interacción con diversas proteínas e incluso su presencia predominante en las terminales axónicas, a través de la interacción con el extremo carboxilo terminal de la proteína (James et al., 2015; Garrido et al. 2001). Tal es el caso del reporte hecho por Vega et al., (2013), donde se mostró la capacidad que tiene el extremo C-terminal de la isoforma Nav1.2 de los canales de sodio para interactuar con diversas proteínas que tienen función como factores de transcripción como Sin3B. El efecto de esta interacción fue un decremento de la corriente de sodio la cual se atribuyó a una disminución en la cantidad de proteína proveniente de los canales de sodio (Vega et al., 2013). Lo cual nos puede dar un indicio de cómo es que el canal de sodio es regulado por diversas proteínas con funciones diversas e incluso

se podría aventurar a enunciar que el extremo C-terminal de la isoforma Nav1.2 puede estar funcionando como un factor de la transcripción. Siguiendo esta misma idea y como se mencionó anteriormente la hipótesis sobre que el fragmento de un canal iónico pueda funcionar como un factor de transcripción ha sido propuesta también para canales de calcio dependientes de voltaje. (Gómez-Ospina et al., 2006) identificaron que el extremo C-terminal del canal de calcio de alto umbral de la isoforma 1.2 (Cav1.2) codifica para un factor de transcripción, aunque no está comprobada la función del extremo C-terminal del Nav1.2, este antecedente es un indicio que nos acerca a esta posibilidad.

Aunque no está claro cuál puede ser el efecto de la interacción entre CtBP1 y el C-terminal de Nav1.2 tanto en un contexto fisiológico, e incluso en ciertas enfermedades como el cáncer, es importante resaltar que esta interacción puede promover un perfil agresivo en diversos tipos de cánceres. Como recordaremos, los canales de sodio se han reportado en diversos tipos de carcinomas y la presencia de los mismos se ha relacionado con perfiles más agresivos así como una mayor tasa de proliferación y migración (Tabla 1), por otra parte y en este mismo sentido el correpressor CtBP1 se sabe está involucrado en diversos tipos de melanomas y carcinomas, entre los que se encuentra el de próstata (Moiola et al., 2014; Wang et al., 2012), melanomas (Deng et al., 2013), colon (Peña et al., 2006), leucemia (Senyuk et al., 2002; Xhia, 2003), ovario (Zhang et al., 2016; May et al., 2013), y cáncer de mama (Birts et al., 2010; Deng et al., 2010), entre otros. Cabe resaltar que en la mayoría de estos trabajos la función que se le atribuye a CtBP es la de arresto de la apoptosis, migración y proliferación celular y como se mencionó anteriormente parece ser que todos estos procesos son llevados a cabo mediante el reclutamiento de factores de transcripción y proteínas con actividad remodeladora de la cromatina. Esto nos lleva a pensar en la importancia de la interacción de estas dos proteínas y su participación, la cual puede ser crucial en este tipo de padecimientos.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Aunque no es claro cuál es el papel de los canales de sodio en procesos cancerígenos se ha propuesto que una de las funciones principales de estos son la formación de invadopodios los cuales promueven procesos de migración y metástasis (Angus, 2019).

Este trabajo es importante ya que es una aproximación al estudio de la interacción entre el correpressor de la transcripción CtBP1 y el extremo C-terminal de los canales de sodio Nav1.2, es importante continuar con el estudio de la asociación de estas dos proteínas ya que aún quedan muchas preguntas en el aire las cuales vale la pena ser respondidas dada la importancia que tienen en un contexto celular e incluso en procesos de importancia clínica como lo es el cáncer. Por lo cual es fundamental poder estudiar la interacción en modelos que nos permitan evaluar la función de esta interacción y así poder contribuir al estudio y quizá en algún futuro el tratamiento de las enfermedades previamente mencionadas.

REFERENCIAS

Allen, D.H., A. Lepple-Wienhues, and M.D. Cahalan, Ion channel phenotype of melanoma cell lines. *J Membr Biol*, 1997. 155(1): p. 27-34.

Angus, M., & Ruben, P. (2019). Voltage gated sodium channels in cancer and their potential mechanisms of action. *Channels (Austin, Tex.)*, 13(1), 400–409. <https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1666455>

Balasubramanian, P., Zhao, L. J., & Chinnadurai, G. (2003). Nicotinamide adenine dinucleotide stimulates oligomerization, interaction with adenovirus E1A and an intrinsic dehydrogenase activity of CtBP. *FEBS letters*, 537(1-3), 157–160. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00119-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00119-4)

Barnes, C. J., Vadlamudi, R. K., Mishra, S. K., Jacobson, R. H., Li, F., & Kumar, R. (2003). Functional inactivation of a transcriptional corepressor by a signaling kinase. *Nature Structural Biology*, 10(8), 622–628. <https://doi.org/10.1038/nsb957>.

Bao L. (2015). Trafficking regulates the subcellular distribution of voltage-gated sodium channels in primary sensory neurons. *Molecular pain*, 11, 61. <https://doi.org/10.1186/s12990-015-0065-7>.

Belgrader, P., Dey, R., & Berezney, R. (1991). Molecular cloning of matrin 3. A 125-kilodalton protein of the nuclear matrix contains an extensive acidic domain. *The Journal of biological chemistry*, 266(15), 9893–9899.

Benzinger, G. R., Tonkovich, G. S., & Hanck, D. A. (1999). Augmentation of recovery from inactivation by site-3 Na channel toxins. A single-channel and whole-cell study of persistent currents. *Journal of General Physiology*, 113(2), 333–346. <https://doi.org/10.1085/jgp.113.2.333>

Black, J. A., Liu, S., & Waxman, S. G. (2009). Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia. *Glia*, 57(10), 1072–1081. <https://doi.org/10.1002/glia.20830>

Blandino, J. K., Viglione, M. P., Bradley, W. A., Oie, H. K., & Kim, Y. I. (1995). Voltage-dependent sodium channels in human small-cell lung cancer cells: role in action potentials and inhibition by Lambert-Eaton syndrome IgG. *The Journal of membrane biology*, 143(2), 153–163.

Blevins, M. A., Huang, M., & Zhao, R. (2017). The Role of CtBP1 in Oncogenic Processes and Its Potential as a Therapeutic Target. *Molecular cancer therapeutics*, 16(6), 981–990. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0592>

Boiko, T., Van Wart, A., Caldwell, J. H., Levinson, S. R., Trimmer, J. S., & Matthews, G. (2003). Functional specialization of the axon initial segment by isoform-specific sodium channel targeting. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(6), 2306–2313. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-06-02306.2003>

Bonazzi, M., Spanò, S., Turacchio, G., Cericola, C., Valente, C., Colanzi, A., ... Luini, A. (2005). CtBP3/BARS drives membrane fission in dynamin-independent transport pathways. *Nature Cell Biology*, 7(6), 570–580. <https://doi:10.1038/ncb1260>

Brackenbury, W. J., Chioni, A. M., Diss, J. K., & Djamgoz, M. B. (2007). The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*, 101(2), 149–160. <https://doi.org/10.1007/s10549-006-9281-1>

Camacho, F., Capo, M., Toledo, R., León, J. de, Talavera, A., & Pérez, E. (2006). Transferencia de genes in vitro con polímeros catiónicos. *Vaccimonitor*, 19805, 17–21.

Campbell, T. M., Main, M. J., & Fitzgerald, E. M. (2013). Functional expression of the voltage-gated Na⁺-channel Nav1.7 is necessary for EGF-mediated invasion in human non-small cell lung cancer cells. *Journal of cell science*, 126(Pt 21), 4939–4949. <https://doi.org/10.1242/jcs.130013>

Carrithers, M. D., Chatterjee, G., Carrithers, L. M., Offoha, R., Iheagwara, U., Rahner, C., Graham, M., & Waxman, S. G. (2009). Regulation of podosome formation in macrophages by a splice variant of the sodium channel SCN8A. *The Journal of biological chemistry*, 284(12), 8114–8126. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801892200>

Catterall, W. A. (2013). Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, and Pathophysiology. In *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition* (2nd ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00208-5>

Chinnadurai, G. (2002). CtBP, an unconventional transcriptional corepressor in development and oncogenesis. *Molecular Cell*, 9(2), 213–224. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00443-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00443-4)

Chinnadurai, G. (2003). CtBP family proteins: More than transcriptional corepressors. *BioEssays*, 25(1), 9–12. <https://doi.org/10.1002/bies.10212>

Chinnadurai, G. (2007). Transcriptional regulation by C-terminal binding proteins. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(9), 1593–1607. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.01.025>

Chinnadurai, G. (2009). The Transcriptional Corepressor CtBP: A Foe of Multiple Tumor Suppressors. *Cancer RES*, 69(3), 731-734.

Cordeiro, D., Colanzi, A., & Luini, A. (2006). The multiple activities of CtBP/BARS proteins: the Golgi view. *Trends in cell biology*, 16(3), 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.01.007>

Cusdin, F. S., Clare, J. J., & Jackson, A. P. (2008). Trafficking and cellular distribution of voltage-gated sodium channels. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 9(1), 17–26. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00673.x>

Deng, H., Liu, J., Deng, Y., Han, G., Shellman, Y. G., Robinson, S. E., Tentler, J. J., Robinson, W. A., Norris, D. A., Wang, X. J., & Zhang, Q. (2013). CtBP1 is expressed in

melanoma and represses the transcription of p16INK4a and Brca1. *The Journal of investigative dermatology*, 133(5), 1294–1301. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.487>

Fraser, S. P., Diss, J. K., Chioni, A. M., Mycielska, M. E., Pan, H., Yamaci, R. F., Pani, F., Siwy, Z., Krasowska, M., Grzywna, Z., Brackenbury, W. J., Theodorou, D., Koyutürk, M., Kaya, H., Battaloglu, E., De Bella, M. T., Slade, M. J., Tolhurst, R., Palmieri, C., Jiang, J., ... Djamgoz, M. B. (2005). Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11(15), 5381–5389. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0327>

Fulgenzi, G., Graciotti, L., Faronato, M., Soldovieri, M. V., Miceli, F., Amoroso, S., Annunziato, L., Procopio, A., & Taglialatela, M. (2006). Human neoplastic mesothelial cells express voltage-gated sodium channels involved in cell motility. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(7), 1146–1159. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.12.003>

Gao, R., Shen, Y., Cai, J., Lei, M., & Wang, Z. (2010). Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer. *Oncology reports*, 23(5), 1293–1299. https://doi.org/10.3892/or_00000763

Gallop, J.L. et al. (2005) Endophilin and CtBP/BARS are not acyl transferases in endocytosis or Golgi fission. *Nature* 438, 675–678

Garrido, J.J., Fernandes, F., Giraud, P., Mouret, I., Pasqualini, E., Fache, M. P., Jullien, F. and Dargent, B. (2001), Identification of an axonal determinant in the C terminus of the sodium channel Nav1.2. *The EMBO Journal*, 20: 5950-5961. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.5950>

Gomez-Ospina, N., Tsuruta, F., Barreto-Chang, O., Hu, L., & Dolmetsch, R. (2006). The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)1.2 encodes a transcription factor. *Cell*, 127(3), 591–606. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.017>

Grimes, J. A., Fraser, S. P., Stephens, G. J., Downing, J. E. G., Laniado, M. E., Foster, C. S., Abel, P. D., & Djamgoz, M. B. A. (1995). Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Letters*, 369(2–3), 290–294. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00772-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00772-2)

Grooteclaes, M., Deveraux, Q., Hildebrand, J., Zhang, Q., Goodman, R. H., & Frisch, S. M. (2003). C-terminal-binding protein corepresses epithelial and proapoptotic gene expression programs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8), 4568–4573. <https://doi.org/10.1073/pnas.0830998100>

Guzel, R. M., Ogmen, K., Ilieva, K. M., Fraser, S. P., & Djamgoz, M. (2019). Colorectal cancer invasiveness in vitro: Predominant contribution of neonatal Nav1.5 under normoxia and hypoxia. *Journal of cellular physiology*, 234(5), 6582–6593. <https://doi.org/10.1002/jcp.27399>

Hernandez-Plata, E., Ortiz, C. S., Marquina-Castillo, B., Medina-Martinez, I., Alfaro, A., Berumen, J., Rivera, M., & Gomora, J. C. (2012). Overexpression of NaV 1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer. *International journal of cancer*, 130(9), 2013–2023. <https://doi.org/10.1002/ijc.26210>

Hille, B. (1970). Ionic channels in nerve membranes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 21(C), 1–32. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(70\)90022-2](https://doi.org/10.1016/0079-6107(70)90022-2)

House, C. D., Vaske, C. J., Schwartz, A. M., Obias, V., Frank, B., Luu, T., Sarvazyan, N., Irby, R., Strausberg, R. L., Hales, T. G., Stuart, J. M., & Lee, N. H. (2010). Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer research*, 70(17), 6957–6967. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1169>

Hübner, D., Rankovic, M., Richter, K., Lazarevic, V., Altmann, W. D., Fischer, K. D., Gundelfinger, E. D., & Fejtova, A. (2012). Differential spatial expression and subcellular localization of CtBP family members in rodent brain. *PloS one*, 7(6), e39710. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039710>

James, T. F., Nenov, M. N., Wildburger, N. C., Lichti, C. F., Luisi, J., Vergara, F., Panova-Electronova, N. I., Nilsson, C. L., Rudra, J. S., Green, T. A., Labate, D., & Laezza, F. (2015). The Nav1.2 channel is regulated by GSK3. *Biochimica et biophysica acta*, 1850(4), 832–844. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.01.011>

Kumar, V., Carlson, J. E., Ohgi, K. A., Edwards, T. A., Rose, D. W., Escalante, C. R., Rosenfeld, M. G., & Aggarwal, A. K. (2002). Transcription corepressor CtBP is an NAD(+)-regulated dehydrogenase. *Molecular cell*, 10(4), 857–869. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00650-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00650-0)

Kuppuswamy, M., Vijayalingam, S., Zhao, L. J., Zhou, Y., Subramanian, T., Ryerse, J., & Chinnadurai, G. (2008). Role of the PLDLS-binding cleft region of CtBP1 in recruitment of core and auxiliary components of the corepressor complex. *Molecular and cellular biology*, 28(1), 269–281. <https://doi.org/10.1128/MCB.01077-07>

Liberali, P., Kakkonen, E., Turacchio, G., Valente, C., Spaar, A., Perinetti, G., Böckmann, R. A., Corda, D., Colanzi, A., Marjomaki, V., & Luini, A. (2008). The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS. *EMBO Journal*, 27(7), 970–981. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.59>

Moiola CP, De Luca P, Zalazar F, Cotignola J, Rodríguez-Seguí SA, Gardner K, Meiss R, Vallecorsa P, Pignataro O, Mazza O, Vazquez ES, De Siervi A. Prostate tumor growth is impaired by CtBP1 depletion in high-fat diet-fed mice. *Clin Cancer Res*. 2014 Aug 1;20(15):4086-95. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0322. Epub 2014 May 19. PMID: 24842953; PMCID: PMC6944435.

Nakajima, T., Kubota, N., Tsutsumi, T., Oguri, A., Imuta, H., Jo, T., Oonuma, H., Soma, M., Meguro, K., Takano, H., Nagase, T., & Nagata, T. (2009). Eicosapentaenoic acid inhibits voltage-gated sodium channels and invasiveness in prostate cancer cells. *British journal of pharmacology*, 156(3), 420–431. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00059.x>

Martínez, M. 2014. Los canales iónicos: la biología y patología. Archivos de cardiología de México. 74, 205-210.

May, T., Yang, J., Shoni, M., Liu, S., He, H., Gali, R., Ng, S. K., Crum, C., Berkowitz, R. S., & Ng, S. W. (2013). BRCA1 expression is epigenetically repressed in sporadic ovarian cancer cells by overexpression of C-terminal binding protein 2. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 15(6), 600–608.

Mroz, E. A., Baird, A. H., Michaud, W. A., & Rocco, J. W. (2008). COOH-terminal binding protein regulates expression of the p16 INK4A tumor suppressor and senescence in primary human cells. *Cancer Research*, 68(15), 6049–6053. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1279>

Pan, H., & Djamgoz, M. B. (2008). Biochemical constitution of extracellular medium is critical for control of human breast cancer MDA-MB-231 cell motility. *The Journal of membrane biology*, 223(1), 27–36. <https://doi.org/10.1007/s00232-008-9110-z>

Peña, C., García, J. M., García, V., Silva, J., Domínguez, G., Rodríguez, R., Maximiano, C., García de Herreros, A., Muñoz, A., & Bonilla, F. (2006). The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the correlations between SNAIL, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas. *International journal of cancer*, 119(9), 2098–2104. <https://doi.org/10.1002/ijc.22083>

Quinlan, K. G. R., Nardini, M., Verger, A., Francescato, P., Yaswen, P., Corda, D., ... Crossley, M. (2006). Specific Recognition of ZNF217 and Other Zinc Finger Proteins at a Surface Groove of C-Terminal Binding Proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 26(21), 8159–8172. <https://doi:10.1128/mcb.00680-06>

Ray, S. K., Li, H. J., Metzger, E., Schule, R., & Leiter, A. B. (2014). CtBP and Associated LSD1 Are Required for Transcriptional Activation by NeuroD1 in Gastrointestinal Endocrine Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 34(12), 2308–2317. <https://doi.org/10.1128/mcb.01600-13>

Roger, S., Rollin, J., Barascu, A., Besson, P., Raynal, P. I., Iochmann, S., Lei, M., Bognoux, P., Gruel, Y., & Le Guennec, J. Y. (2007). Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *The*

international journal of biochemistry & cell biology, 39(4), 774–786.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.12.007>

Roger, S., Gillet, L., Yves Le Guennec-Jean, Besson, P. (2015). Voltage-gated sodium channels and cancer: is excitability their primary role? *Frontiers in Pharmacology*, 6(152), 1-22.

Ruiz, M., Kraus, R. (2015). Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J. Med. Chem.* 58(18), 7093-7118.

Sato, C., Ueno, Y., Asai, K., Takahashi, K., Sato, M., Engel, A., & Fujiyoshi, Y. (2001). The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature*, 409(6823), 1047–1051. <https://doi.org/10.1038/35059098>

Schaeper, U., Boyd, J. M., Verma, S., Uhlmann, E., Subramanian, T., & Chinnadurai, G. (1995). Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(23), 10467–10471. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.23.10467>

Senyuk, V., Chakraborty, S., Mikhail, F. M., Zhao, R., Chi, Y., & Nucifora, G. (2002). *The leukemia-associated transcription repressor AML1/MDS1/EVI1 requires CtBP to induce abnormal growth and differentiation of murine hematopoietic cells. Oncogene*, 21(20), 3232–3240. [doi:10.1038/sj.onc.1205436](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205436)

Smith, P., Rhodes, N. P., Shortland, A. P., Fraser, S. P., Djamgoz, M. B., Ke, Y., & Foster, C. S. (1998). Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells. *FEBS letters*, 423(1), 19–24. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00050-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00050-7)

Spanò, S., Silletta, M. G., Colanzi, A., Alberti, S., Fiucci, G., Valente, C., Fusella, A., Salmona, M., Mironov, A., Luini, A., & Corda, D. (1999). Molecular cloning and functional characterization of brefeldin A-ADP-ribosylated substrate. A novel protein involved in the

maintenance of the Golgi structure. *The Journal of biological chemistry*, 274(25), 17705–17710. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.25.17705>

Taleisnik, S. (2006). *Receptores celulares y la Transducción de Señales*.

Thomas, J.-L., Moncollin, V., Ravel-Chapuis, A., Valente, C., Corda, D., Méjat, A., & Schaeffer, L. (2015). PAK1 and CtBP1 Regulate the Coupling of Neuronal Activity to Muscle Chromatin and Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology*, 35(24), 4110–4120. <https://doi.org/10.1128/mcb.00354-15>

Valente, C., Luini, A., & Corda, D. (2013). Components of the CtBP1/BARS-dependent fission machinery. *Histochemistry and cell biology*, 140(4), 407–421. <https://doi.org/10.1007/s00418-013-1138-1>

Vega, A. V., Avila, G., & Matthews, G. (2013). Interaction between the transcriptional corepressor Sin3B and voltage-gated sodium channels modulates functional channel expression. *Scientific Reports*, 3, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep02809>

.

, A., Quinlan, K. G. R., Crofts, L. A., Spano, S., Corda, D., Kable, E. P. W., Braet, F., & Crossley, M. (2006). Mechanisms Directing the Nuclear Localization of the CtBP Family Proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 26(13), 4882–4894. <https://doi.org/10.1128/mcb.02402-05>

Vetter, I., Mozar, C. A., Durek, T., Wingerd, J. S., Alewood, P. F., Christie, M. J., & Lewis, R. J. (2012). Characterisation of Na(v) types endogenously expressed in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochemical pharmacology*, 83(11), 1562–1571. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.02.022>

Von Reyn, C. R., Spaethling, J. M., Mesfin, M. N., Ma, M., Neumar, R. W., Smith, D. H., ... Meaney, D. F. (2009). *Calpain Mediates Proteolysis of the Voltage-Gated Sodium Channel-Subunit*. *Journal of Neuroscience*, 29(33), 10350–10356. [doi:10.1523/jneurosci.2339-09.2009](https://doi.org/10.1523/jneurosci.2339-09.2009)

von Reyn, C. R., Mott, R. E., Siman, R., Smith, D. H., & Meaney, D. F. (2012). Mechanisms of calpain mediated proteolysis of voltage gated sodium channel α -subunits following in vitro dynamic stretch injury. *Journal of neurochemistry*, 121(5), 793–805. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07735.x>

Wang, R., Asangani, I. A., Chakravarthi, B. V., Ateeq, B., Lonigro, R. J., Cao, Q., Mani, R. S., Camacho, D. F., McGregor, N., Schumann, T. E., Jing, X., Menawat, R., Tomlins, S. A., Zheng, H., Otte, A. P., Mehra, R., Siddiqui, J., Dhanasekaran, S. M., Nyati, M. K., Pienta, K. J., ... Varambally, S. (2012). Role of transcriptional corepressor CtBP1 in prostate cancer progression. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 14(10), 905–914. <https://doi.org/10.1593/neo.121192>

Weigert, R., Silletta, M. G., Spanò, S., Turacchio, G., Cericola, C., Colanzi, A., Senatore, S., Mancini, R., Polishchuk, E. V., Salmona, M., Facchiano, F., Burger, K. N., Mironov, A., Luini, A., & Corda, D. (1999). CtBP/BARS induces fission of Golgi membranes by acylating lysophosphatidic acid. *Nature*, 402(6760), 429–433. <https://doi.org/10.1038/46587>

Xia, Z. B., Anderson, M., Diaz, M. O., & Zeleznik-Le, N. J. (2003). MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the corepressor C-terminal-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), 8342–8347. <https://doi.org/10.1073/pnas.1436338100>

Xia, J., Huang, N., Huang, H., Sun, L., Dong, S., Su, J., Zhang, J., Wang, L., Lin, L., Shi, M., Bin, J., Liao, Y., Li, N., & Liao, W. (2016). Voltage-gated sodium channel Nav 1.7 promotes gastric cancer progression through MACC1-mediated upregulation of NHE1. *International journal of cancer*, 139(11), 2553–2569. <https://doi.org/10.1002/ijc.30381>

Xing, D., Wang, J., Ou, S., Wang, Y., Qiu, B., Ding, D., Guo, F., & Gao, Q. (2014). Expression of neonatal Nav1.5 in human brain astrocytoma and its effect on proliferation, invasion and apoptosis of astrocytoma cells. *Oncology reports*, 31(6), 2692–2700. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3143>

Yamashita, N., Hamada, H., Tsuruo, T., & Ogata, E. (1987). Enhancement of voltage-gated Na⁺ channel current associated with multidrug resistance in human leukemia cells. *Cancer research*, 47(14), 3736–3741.

Zhang, Y., Kwok, J. S., Choi, P. W., Liu, M., Yang, J., Singh, M., Ng, S. K., Welch, W. R., Muto, M. G., Tsui, S. K., Sugrue, S. P., Berkowitz, R. S., & Ng, S. W. (2016). Pinin interacts with C-terminal binding proteins for RNA alternative splicing and epithelial cell identity of human ovarian cancer cells. *Oncotarget*, 7(10), 11397–11411. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7242>