



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Generación de mutaciones puntuales en el receptor acoplado a
proteínas G Latrofilina 3, y expresión de los receptores nativo
y mutados en células HEK-293T”**

T E S I S

Que presenta

Q.F.B. Bani Arizai Clemente Pascacio

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

En la especialidad de

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Directores de la Tesis:

Dr. José Antonio Gilberto Arias Montaña

Dr. Antony Boucard Jr.

México, D.F.

Septiembre, 2015

Agradecimiento

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de estudios de maestría (CVU 371266).

A mi padre

Por tomarme de la mano y enseñarme a
ser fuerte, por ser mí ejemplo a seguir.
Su presencia será siempre indispensable

Agradecimientos.

A mi madre por todo el amor, confianza y comprensión que me ha dado.

A José Alberto quien ha sido mi motivación desde el día en que lo conocí, a quién admiro y amo.

Al Dr. José Antonio Arias Montaña a quien agradezco todo el apoyo que me ha brindado, sus enseñanzas a lo largo de este proyecto son lo más valioso para mí.

A todos los miembros del laboratorio 37 de Neurofarmacología del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias por las contribuciones a mi desarrollo académico y por los momentos agradables que hemos compartido.

Al Dr. Antony Boucard Jr. por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio así como a mis compañeros del laboratorio 54 del Departamento de Biología Celular.

Resumen

Las Latrofilinas (Lphn 1-3) son receptores acoplados a proteínas G de adhesión

(a-GPCRs), que poseen dominios de adhesión extracelular y una probable función en la transducción de señales. A nivel molecular la latrofilina 3 (Lphn3) interactúa con la proteína de adhesión Teneurina (*Ten*) y la proteína transmembranal con repetidos de leucina/fibronectina (FLRT) para formar contactos célula-célula. Estas interacciones se han relacionado con la función y estabilidad sinápticas, relevantes para la formación y el mantenimiento de redes neuronales.

El mecanismo de acción de las LPHNs aún no se conoce con claridad; sin embargo, se han identificado mutaciones puntuales en el gen que codifica el receptor Lphn3, las cuales han sido relacionadas con el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) y el cáncer de pulmón. Por lo anterior, en este proyecto se ha considerado que la expresión de mutaciones puntuales en regiones del gen de Lphn3 que codifican la región extracelular del receptor modificará su expresión y/o señalización en un sistema heterólogo. En esta tesis se abordaron objetivos primariamente metodológicos fundamentales para el análisis de la hipótesis.

El modelado molecular de Lphn3 con las mutaciones K561N, A760G, D798H, N344I y A247S, permitió identificar que se encuentran en la superficie del receptor lo que podría afectar la interacción con sus ligandos. Las mutaciones puntuales de Lphn3 relacionadas con el TDAH (A247S, R465Q y D615N) fueron generadas por mutagenesis sitio-dirigida. La caracterización de los plásmidos con las mutaciones relacionadas a cáncer (K561N, A760G, D798H, S810L y E811Q) se realizó con ensayos de restricción enzimática. Adicionalmente se generaron por PCR de punto final las formas solubles de los ligandos Ten2 y FLRT3 en proteínas de fusión con la fracción constante de IgG que permitirán realizar ensayos de interacción ligando-receptor. De manera paralela se optimizó la transfección de células HEK-293T con los

receptores Lphn3 nativo y con las mutaciones K561N, A760G, D798H, S810L y E811Q, y se analizó su expresión celular por inmunodetección.

Los resultados muestran que: 1) se generaron las mutaciones D615N, A247S y R465Q; 2) se confirmó la identidad de los plásmidos con las mutaciones K561N, A760G, D798H, S810L y E811Q; 3) se expresó de manera eficaz al receptor LPHN3; y 4) se generaron los ligandos sintéticos Teneurina 2 y FLRT3 que permitirán evaluar la interacción ligando-receptor.

Lo anterior sienta las bases para la realización de ensayos funcionales que permitan determinar la vía de señalización activada por el receptor Lphn3, así como el efecto de cada una de las mutaciones en la expresión y señalización de Lphn3 en un sistema de expresión heterólogo.

Abstract

Latrophilins (LPHN1-3) are adhesion G protein-coupled receptors (a-GPCRs) with potential signaling properties, which bear N-terminal extracellular domains of adhesion. At a molecular level, LPHN3 interacts with the adhesion molecule Teneurin (*Ten*) and the fibronectin-leucine-rich transmembrane protein (FLRT) to mediate cell-cell contacts. These interactions have been associated with synaptic function, which is relevant for the formation and maintenance of synaptic networks.

The mechanism of action of LPHNs is not yet clearly known; nevertheless, specific mutations in the gene encoding LPHN3 have been identified and linked with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) and lung cancer. Hence, this project aimed at verifying whether specific disease-linked mutations in the extracellular domain of LPHN3 might alter its expression and/or signaling properties in a heterologous expression system. The thesis tackled primarily methodological objectives for the hypothesis analysis.

The molecular modeling of LPHN3 predicted that mutations K561N, A760G, D798H, N344I and A247S could alter the protein surface which might affect ligand-receptor interactions. ADHD-related mutations (A247S, R465Q y D615N) were generated by site-directed mutagenesis while the plasmids with cancer-related mutations (K561N, A760G, D798H, S810L y E811Q) were characterized of using restriction analysis. In order to test the expression of mutated LPHN3 in a heterologous system, we optimized the transfection method by Polyethylenimine using HEK293T cells. Mutant receptors expression (K561N, A760G, D798H, S810L and E811Q) was confirmed by immunoblotting. Additionally, soluble forms of LPHN3 ligands, Ten2 and FLRT3, were generated using endpoint PCR as fusion proteins with IgG Fc, allowing for further ligand-receptor binding assays.

This project allowed for the generation of molecular tools to be used in future functional assays aiming at analyzing the effect of disease-related point mutations of LPHN3 on its expression, binding and/or signaling properties.

Índice general

Tema	Página
Resumen	V
Abstract	VII
Índice general	VIII
Lista de figuras	XII
Índice de tablas	XIV
Abreviaturas	XV
1. Introducción	1
1.1 Transmisión sináptica	1
1.2 Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)	2
1.2.1 Estructura de los GPCRs	3
1.2.2 Activación y señalización intracelular	3
1.3 GPCRs de adhesión (α -GPCRs)	5
1.3.1 Mecanismo de activación de los α -GPCRs	8
1.4 Latrofilinas (LPHNs)	9
1.4.1 Características estructurales de las LPHNs	10
1.4.2 Expresión de las LPHNs	14
1.4.3 Localización sináptica de las LPHNs	15
1.4.4 Ligandos endógenos de las LPHNs: FLRT, Teneurinas y Neurexinas	15
1.4.4.1 FLRT	16
1.4.4.2 Teneurinas	17
1.4.4.3 Neurexinas	19
1.5 Implicación de las LPHNs en procesos patológicos	20
1.5.1 Implicación de las LPHNs en procesos no neuronales	20
1.5.2 Implicación de las LPHNs en procesos neuronales	21
1.5.3 Relación entre LPHN3 y TDAH	21
1.5.3.1 TDAH	21
1.5.3.2 Relación entre la expresión de LPHN3 y TDAH	22

2. Planteamiento del problema	24
3. Hipótesis de trabajo	25
4. Objetivos	26
4.1 Objetivo general	26
4.2 Objetivos particulares	26
5. Material y métodos	27
5.1 Modelado molecular del receptor LPHN3 nativo y con las mutaciones de interés	27
5.2 Generación de las mutaciones puntuales A247S, R465Q, D615N, T783M y N344I en el gen del receptor LPHN3	28
5.2.1 Mutagénesis sitio dirigida por PCR y digestión con la endonucleasa DpnI	28
5.2.1.1 Generación de bacterias competentes <i>E. coli</i> DH5 α	30
5.2.1.2 Transformación de bacterias competentes	31
5.2.1.3 Extracción de DNA por lisis alcalina (miniprep)	31
5.2.2 Mutagénesis por PCR de extensión sobrepuesta	32
5.3 Caracterización de los plásmidos con las mutaciones K561N, A760G, D798H, S810L y E811Q en el gen de LPHN3, generados previamente	36
5.4 Generación de los ligandos sintéticos que permitan realizar ensayos de interacción ligando-receptor	36
5.4.1 Generación de Teneurina 2 soluble	37
5.4.2 Generación de FLRT3 soluble	37
5.4.3 Generación del vector pCMV-IgG y ligación con los insertos de Teneurina 2 y FLRT3	38
5.4.4 Producción de los ligandos sintéticos	39
5.4.4.1 Transfección con fosfato de calcio	39
5.4.5 Purificación de los ligandos sintéticos	40
5.4.5.1 Cuantificación de proteínas	41
5.4.5.2 <i>Western Blot</i>	42

5.5 Expresión transitoria del receptor LPHN3 en células HEK-293T.	43
5.5.1 Selección de un sistema heterólogo para la transfección del receptor LPHN3	43
5.5.2 Selección de un método de transfección del receptor LPHN3	43
5.5.2.1 Transfección con lipofectamina 2000	44
5.5.2.2 Transfección con Polietilenimina (PEI)	44
5.5.2.3 Determinación de la eficacia de transfección por citometría de flujo	45
5.5.3 Expresión transitoria del receptor LPHN3 en células HEK-293T.	46
6. Resultados	47
6.1 Modelado molecular del receptor LPHN3 nativo y con las mutaciones de interés	47
6.2 Generación de las mutaciones puntuales A247S, R465Q, D615N, T783M y N344I en el gen que codifica al receptor LPHN3 ^{Flag-HA}	49
6.3 Caracterización de los plásmidos con las mutaciones K561N, A760G, D798H, S810L y 811Q en el gen de LPHN3	53
6.4 Generación de los ligandos sintéticos	55
6.4.1 Expresión de los ligandos solubles	59
6.5 Expresión del receptor LPHN3 en células HEK-293T	60
6.5.1 Selección de un método de transfección para el receptor LPHN3	60
6.5.2 Optimización del método de transfección con PEI	62
6.5.3 Expresión transitoria del receptor LPHN3 en células HEK-293T	65
7. Discusión	67
8. Conclusiones	74

9. Perspectivas	75
10. Bibliografía	76

Lista de figuras

Figura	Título	Página
1	Estructura de los GPCRs	4
2	Activación de proteínas G por GPCRs	4
3	Estructura de los GPCRs de adhesión (α -GPCRs)	6
4	Mecanismo de autoproteólisis de los α -GPCRs	7
5	Mecanismo de activación de los α -GPCRs	8
6	Características estructurales de las LPHNs	10
7	Estructura cristalizada del receptor LPHN3	12
8	Sitios de fosforilación en las LPHNs	13
9	Bi-funcionalidad de LPHN3	17
10	Dominios de interacción LPHN3-FLRT y LPHN3-Teneurina	17
11	Interacción LPHN3-Teneurina e intervención de proteínas accesorias	19
12	Estrategia para la mutagénesis por PCR de extensión sobrepuesta	33
13	Características estructurales de los ligandos solubles IgTen2 ^{Flag-Tev} e IgFLRT3 ^{HA-Tev}	38
14	Parámetros de lectura por citometría de flujo	45
15	Estructura cristalizada del dominio GAIN y del dominio de unión a hormona de LPHN1 de <i>Rattus Norvegicus</i>	47
16	Estructura cristalizada del dominio de Lectina y del dominio de olfactomedina de LPHN3 de <i>Homo sapiens</i>	48
17	Análisis de restricción de las mutantes N344I, A247S, D615N, R465Q y T783M obtenidas por PCR y digestión con DpnI	50
18	PCR de extensión sobrepuesta	51
19	PCR de los fragmentos individuales E y F y del producto obtenido por PCR de extensión sobrepuesta EF	52

20	Secuenciación de LPHN3-D615N	53
21	Análisis por restricción de los plásmidos que codifican para LPHN3 con las mutantes D615N, A247S y R465Q	54
22	Análisis por restricción de los plásmidos que codifican para LPHN3 con las mutaciones A760G, D798H, S810L, E811Q y K561N	54
23	Plásmidos para la generación de los ligandos sintéticos	56
24	Plásmidos solubles generados: IgFLRT3 ^{HA-Tev} para FLRT3 e IgTen2 ^{Flag-Tev} para Teneurina 2	57
25	Secuencia de nucleótidos correspondiente a Teneurina 2 en el plásmido IgTen2 ^{Flag-Tev}	58
26	Secuencia de nucleótidos correspondiente a FLRT3 en el plásmido IgFLRT3 ^{HA-Tev}	58
27	Gel de poliacrilamida que muestra los ligandos solubles para IgFLRT3 ^{HA-TEV} e IgTen2 ^{Flag-Tev} .	59
28	Inmunodetección de los ligandos solubles IgFLRT3 ^{HA-Tev} e IgTen2 ^{Flag-Tev}	60
29	Citogramas obtenidos por la transfección de células HEK-293T con el plásmido pCMV-eGFP a las 24 h después de la transfección.	61
30	Citogramas para la transfección de células HEK-293T con el plásmido pCMV-eGFP después de la optimización del método de transfección.	63
31	Citogramas para la transfección de células HEK-293T con el plásmido pCMV-CL1-mV después de la optimización del método de transfección.	64
32	<i>Western blot</i> del receptor LPHN3 ^{FLAG-HA} nativo y con las mutaciones A760G, D798H, S810L, E811Q y K561N	65

Índice de tablas

Tabla	Título	Página
1	Localización de las mutaciones en el receptor LPHN3	27
2	Oligonucleótidos diseñados para la mutagénesis sitio dirigida por PCR	29
3	Componentes de la reacción de PCR para la mutagénesis sitio dirigida	29
4	Condiciones de la reacción de PCR para la mutagénesis sitio dirigida	29
5	Oligonucleótidos para la amplificación de la secuencia que codifica para LPHN3	33
6	Fragmentos individuales obtenidos por la combinación de oligonucleótidos	34
7	Contenido de la reacción de PCR para la generación de los fragmentos individuales	34
8	Condiciones de amplificación de los fragmentos individuales	34
9	Combinación de fragmentos individuales	35
10	Condiciones de amplificación del producto LPHN3	35
11	Oligonucleótidos para la amplificación de Teneurina 2 y FLRT3	39
12	Condiciones de amplificación de los ligandos solubles Teneurina 2 y FLRT3	39
13	Colonias obtenidas en la generación de mutaciones puntuales por mutagénesis sitio dirigida	49
14	Eficacia de transfección de células HEK-293T por el método de PEI	60
15	Modificaciones en la preparación de PEI	61
16	Eficacia de transfección de células HEK-293T después de la optimización del método de transfección	63

Abreviaturas

aa	Aminoácido
AC	Adenilil ciclasa
α -GPCR	Receptor acoplado a proteínas G de adhesión
AMPc	3'5'-monofosfato cíclico de adenosina
cDNA	DNA complementario
CMV	Citomegalovirus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Fc	Fracción constante
FLRT3	Proteína transmembranal con dominios ricos en leucina y fibronectina
GAIN	Dominio de inducción de autoproteólisis de GPCRs
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
GRKs	Cinasas de GPCRs
HA	Hemaglutinina
LPHNs	Latrofilinas
Olf	Olfactomedina
SNC	Sistema nervioso central
TDAH	Transtorno por déficit de atención e hiperactividad
Ten 2	Teneurina 2

1. Introducción

Durante muchos años se ha considerado a las neuronas como las células más importantes para las funciones únicas del cerebro. Son las neuronas las que perciben los cambios del entorno, comunican estos cambios a otras células neuronales y ordenan las correspondientes respuestas corporales a estas sensaciones.

A finales del siglo XIX, el neurólogo alemán Franz Nissl introdujo un método de tinción que permitió conocer la citoarquitectura de las neuronas en diferentes regiones del cerebro y distinguir entre neuronas y glía. En 1873 el histólogo italiano Camilo Golgi introdujo una nueva técnica de tinción que permitió identificar la morfología neuronal (axones y dendritas) y postuló la teoría reticular, que indicaba que las neuritas de diferentes células se fusionan para formar un retículo continuo o red. En años posteriores, Santiago Ramón y Cajal utilizó la tinción de Golgi para estudiar los circuitos de diferentes regiones cerebrales. Ramón y Cajal concluyó que las neuritas de diferentes neuronas se comunican por contacto y no por continuidad, estableciendo así la doctrina neuronal. En 1897, el fisiólogo inglés Charles Sherrington denominó sinapsis a estos sitios de contacto especializados entre neuronas. Actualmente se conoce que el Sistema Nervioso Central (SNC) se caracteriza por la formación de redes neuronales complejas, donde se lleva a cabo la transferencia de información transneuronal por un proceso llamado sinapsis.^{1,2}

1.1 Transmisión sináptica

La transmisión sináptica entre dos neuronas, o entre una neurona u otro tipo de célula (muscular o glandular) tiende a fluir en una dirección, de una neurona presináptica a su célula blanco, llamada post-sináptica. Las membranas pre-sináptica y post-sináptica están separadas por una hendidura de 20 a 50 nm de ancho. En la terminal axónica del elemento pre-sináptico se encuentran las vesículas sinápticas que contienen los

neurotransmisores necesarios para la comunicación con la neurona postsináptica, los cuales son liberados a la hendidura sináptica en las zonas activas. La hendidura está constituida por una matriz de proteínas extracelulares, y una función de esta matriz es inducir que la membrana presináptica y postsináptica se adhieran. En el lado opuesto de la hendidura sináptica, la membrana neuronal postsináptica contiene receptores a neurotransmisores, que convierten la señal química intercelular (el neurotransmisor) en una señal eléctrica (un cambio en el potencial de membrana) o química en la célula postsináptica.^{3,4}

El establecimiento de las sinapsis requiere de moléculas de adhesión que median una interacción secuencial proteína-proteína a través de la hendidura sináptica. Sin embargo, los mecanismos de adhesión involucrados en la formación sináptica no se conocen con claridad.⁴

1.2 Receptores de acoplados a proteínas G (GPCRs)

Los GPCRs constituyen la familia más numerosa de receptores de superficie. Más de 1,000 miembros de esta familia, codificados por alrededor de 1,000 genes, han sido identificados en mamíferos. Estos receptores tienen la capacidad para reclutar y regular la actividad de proteínas G heterotriméricas intracelulares.⁵

La actividad de los GPCRs implica tres pasos fundamentales: 1) La unión del neurotransmisor a la proteína receptora; 2) la activación de las proteínas G, y 3) la activación de los sistemas efectores.⁶ Actualmente se conocen una gran cantidad de ligandos (péptidos, glucoproteínas, aminoácidos, etc.) que se unen a los GPCRs, induciendo su activación.⁷ Los GPCRs tienen una estructura similar aunque cada receptor presenta aminoácidos específicos que participan de forma selectiva en la unión con su respectivo ligando.

1.2.1. Estructura de los GPCRs.

La superfamilia de GPCRs, independientemente de la naturaleza de sus ligandos, presentan características estructurales similares. Están constituidos por una cadena polipeptídica plegada en una estructura de siete hélices α (22 a 28 residuos hidrofóbicos cada una), que atraviesan la membrana celular. Las hélices están conectadas por tres asas extracelulares (E1, E2 y E3) y tres asas intracelulares (C1, C2, C3). El segmento N-terminal posee residuos de asparagina, que son sitios de N-glicosilación, y residuos de cisteína que influyen en el plegamiento de la proteína. A su vez la glicosilación influye en el tráfico intracelular de los receptores desde el retículo endoplásmico a la membrana plasmática. El segmento C-terminal intracelular contiene residuos de serina o tirosina que pueden servir como sustratos de fosforilación por cinasas y la desensibilización del receptor. Algunos GPCRs tienen residuos de cisteína en la región C-terminal que pueden servir como sitios de palmitoilación que permite la generación de una cuarta asa intracelular por la inserción de la cisteína palmitoilada a la membrana plasmática (Fig. 1). Las asas intracelulares son importantes para la interacción con proteínas señalizadoras y reguladoras así como para la interacción con otras proteínas como las arrestinas que permiten la internalización del receptor como un mecanismo de regulación en la función de los GPCRs.⁶

La mayoría de los GPCRs tienen un puente disulfuro, formado por dos residuos de cisteína localizados en las asas extracelulares E1 y E2. Estos puentes disulfuro son importantes para el adecuado plegamiento del receptor y para la formación de la región de unión a ligando.⁶

1.2.2 Activación y señalización intracelular

Después de la unión de un ligando al GPCR, éste experimenta cambios conformacionales que afectan la posición relativa de las siete hélices transmembranales en particular de las hélices 3 y 6. Este movimiento de las

hélices transmembranales genera cambios en las asas intracelulares que inducen la activación de las proteínas G (Fig. 2).

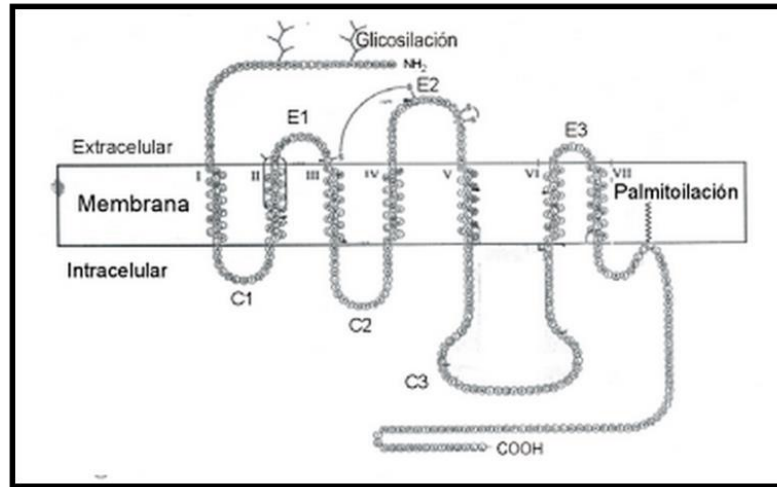


Figura 1. Estructura de los GPCRs. E1, E2, E3: asas extracelulares 1, 2 y 3. C1, C2, C3: asas intracelulares 1, 2 y 3.⁶

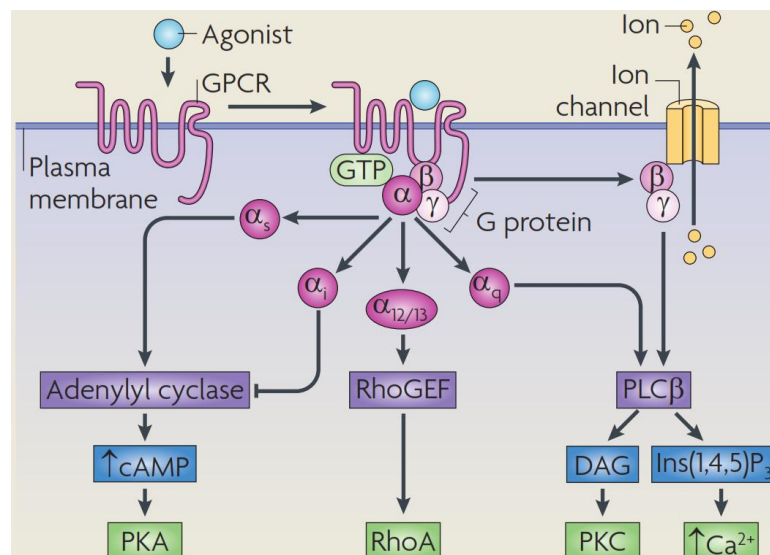


Figura 2. Activación de las proteínas G por GPCRs. DAG, diacilglicerol; PKA, cinasa A de proteínas; PKC, cinasa C de proteínas; PLC, fosfolipasa C.⁵

En su forma inactiva la proteína G existe como un trímero $\alpha\beta\gamma$ con GDP unido a la subunidad α . En presencia de un ligando, los receptores catalizan el intercambio de GDP por GTP. La unión de GTP en presencia de Mg^{2+} produce la activación del trímero $\alpha\beta\gamma$ y su disociación en el complejo $\beta\gamma$ y la subunidad α -GTP, la cual se separa del receptor y del complejo $\beta\gamma$. La subunidad α tiene actividad intrínseca de GTPasa que hidroliza al GTP y el complejo α -GDP resultante se reasocia con $\beta\gamma$ para formar al heterotr trímero inactivo (Fig. 2).

Las proteínas G heterotriméricas se clasifican de acuerdo a la identidad de su subunidad $G\alpha$ en cuatro familias: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha q/11}$ y $G_{\alpha 12/13}$. Las proteínas $G_{\alpha s}$ estimulan a las adenilil ciclasas (ACs) y por lo tanto la síntesis de AMP cíclico (AMPc). Las proteínas $G_{\alpha i/o}$ inhiben a las ACs y la clase $G_{\alpha 12/13}$ actúa activando a las proteínas Rho. Los miembros de la familia $G_{\alpha q/11}$ activan la hidrólisis de fosfoinosítidos a través de las isoformas β de la fosfolipasa C (PLC). Las subunidades $G\beta\gamma$ también pueden regular diversos efectores, como fosfolipasas, ACs y canales iónicos.⁵

1.3 GPCRs de adhesión (a-GPCRs)

Actualmente se han identificado 33 miembros de a-GPCRs en humanos; más de la mitad de estos receptores se expresan en el SNC, indicando su probable participación en el desarrollo y función de este sistema.⁸

Los a-GPCR interactúan con ligandos específicos, pero presentan características estructurales similares. Están constituidos por una secuencia extracelular amino terminal larga con dominios de adhesión, siete hélices α transmembrales que dan lugar a la formación de asas intracelulares (3) y extracelulares (3), además de un extremo carboxilo terminal intracelular.⁸ Lo anterior ha llevado a proponer que los a-GPCRs poseen una doble función, de adhesión y señalización (Fig. 3).⁹

Todos los miembros de la familia α -GPCR tienen un motivo GPS, un sitio de proteólisis constituido por una secuencia conservada de ~50 aminoácidos (aa), definido por una región consenso Histidina (His), seguido por leucina o isoleucina (Leu ó Ile) y Serina/Treonina (Ser/Thr) localizada entre dos láminas β en la región extracelular amino terminal que precede al primer segmento transmembranal (~15-30 aa de distancia).⁹ El motivo GPS forma parte de un dominio de ~320 aa, llamado dominio de inducción de autoproteólisis de GPCRs (GAIN), que resulta necesario para que se lleve a cabo la escisión.

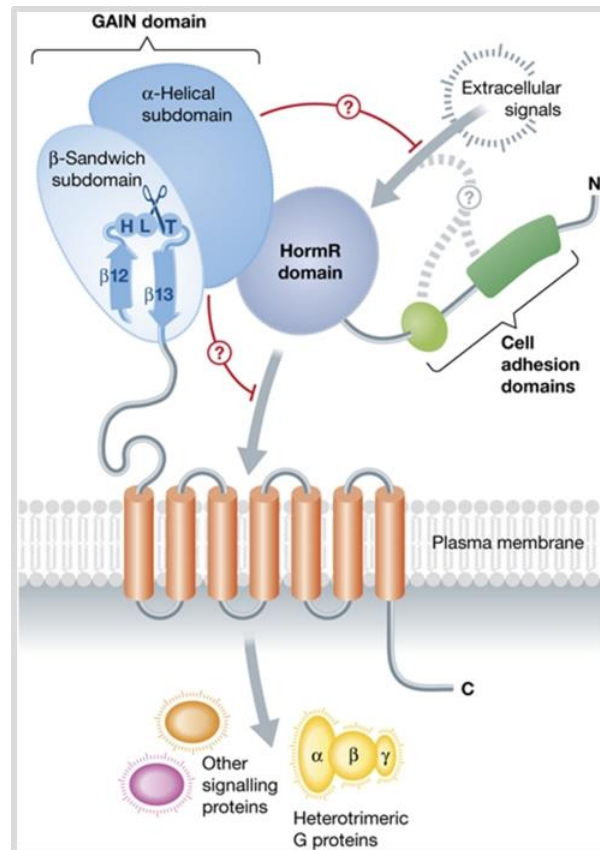


Figura 3. Estructura de los GPCRs de adhesión (α -GPCRs). GAIN, dominio de inducción de autoproteólisis de GPCRs.⁹

La autoproteólisis generada por el dominio GAIN ocurre en el retículo endoplásmico,¹⁰ dando lugar a la formación de un fragmento extracelular con una nueva región C-terminal (Leu o Ile) y una subunidad constituida por siete hélices transmembranales con la región amino terminal Ser/Treo. Sin embargo, el mecanismo por el cual se lleva a cabo la autoproteólisis aún no se conoce con claridad. Uno de los mecanismos propuestos indica que la reacción proteolítica inicia con la desprotonación del grupo hidroxilo presente en el residuo de serina por el residuo de histidina, permitiendo la formación de una estructura tetraédrica intermedia, la cual sufre un ataque nucleofílico sobre el carbono α del residuo de leucina, generándose un éster intermedio, el cual es hidrolizado, permitiendo la formación de 2 subunidades proteicas separadas (Fig. 4).¹¹ El dominio GAIN y mutaciones en esta región han sido asociados con una serie de enfermedades en humanos; sin embargo, aún se desconoce el efecto de la expresión de tales mutaciones.¹¹

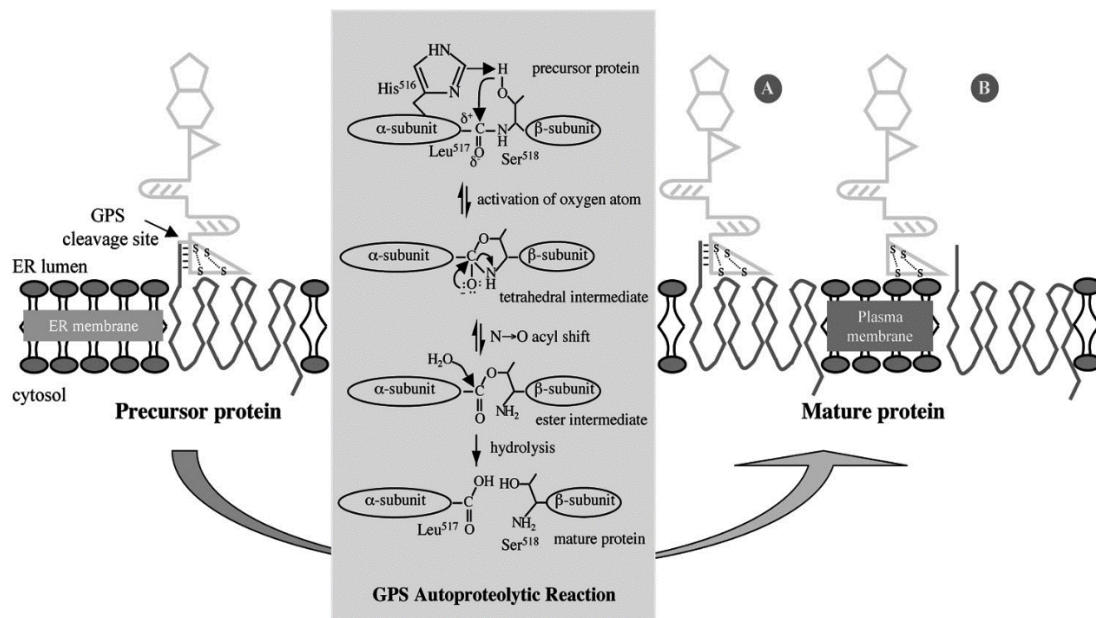


Figura 4. Mecanismo de autoproteólisis de los α -GPCRs. GPS, sitio de autoproteólisis de los α -GPCRs ER, retículo endoplásmico.⁷

1.3.1 Mecanismo de activación de los α -GPCRs

Diversos estudios indican que los α -GPCRs están acoplados a proteínas G, tal como se ha demostrado para los α -GPCRs GPR133 y GPR126 por determinación de AMPc intracelular, sugiriendo el acoplamiento de ambos receptores a proteínas G_s .^{12,13} Sin embargo, aún no se conoce con claridad como se lleva a cabo la activación de estos receptores.

Recientemente Liebscher y cols. identificaron una secuencia de péptidos (secuencia Stachel) ubicada en el motivo GPS de los α -GPCRs GPR133 y GPR126, que funciona como un agonista intramolecular de unión. Determinaron que cambios estructurales *in vivo* debidos a moléculas extracelulares que interactúan con el dominio extracelular o incluso por remoción mecánica de la región N-terminal exponen la secuencia Stachel al ectodominio, su unión a esta región promueve la activación del receptor y la consecuente activación de proteínas G iniciando mecanismos de señalización (Fig. 5).¹⁴

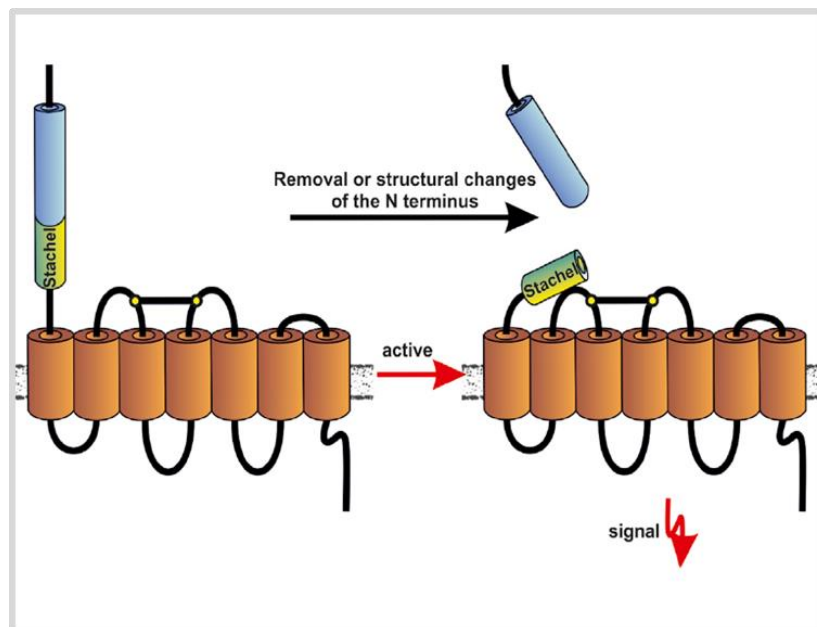


Figura 5. Mecanismo de activación de los α -GPCRs. Stachel, secuencia corta de péptidos que funciona como un agonista intramolecular.¹⁴

1.4 Latrofilinas (LPHNs)

La familia de LPHNs constituye un grupo de a-GPCRs que han sido utilizados como modelo para proponer una hipótesis de doble función de esta familia de receptores. Las LPHNs poseen motivos de adhesión en la región amino terminal, y una estructura heptahelicoidal en la región carboxilo terminal, lo que les confiere la capacidad de actuar como moléculas de adhesión y la posible función de transducción de señales. Sin embargo, los mecanismos de acción y la función de las LPHNs aún no se conocen con certeza.

LPHN1 (también llamada CIRL1/CL1, receptor para α -latrotoxina independiente de calcio) fue aislada en 1996 como una proteína con alta afinidad por la α -latrotoxina ($K_d \sim 0.5$ nM), el principal componente del veneno de la araña *Latrodectus mactans* (viuda negra).^{15,16} Posteriormente se identificaron dos proteínas que por su alta homología con LPHN1 (48-63%) fueron nombradas LPHN2 y LPHN3. La afinidad de esta familia de proteínas por la α -latrotoxina es heterogénea, considerándose alta afinidad de LPHN1, baja afinidad de LPHN2 y afinidad no significativa de Lphn3.^{17,18}

En las terminales nerviosas, la α -latrotoxina (130 KDa) actúa por unión a sus receptores de membrana citoplasmática, neurexinas y LPHNs. Esta unión genera un influjo de Ca^{2+} en la terminal presináptica, seguido de la liberación masiva de neurotransmisores.^{15,19} La toxina también puede unirse directamente a la membrana celular formando tetrámeros que permiten la generación de poros a través de los cuales ingresa el Ca^{2+} , ejerciendo su efecto a nivel intracelular. Los estudios realizados con esta toxina han sido de gran utilidad en la elucidación de los mecanismos de liberación de neurotransmisores como acetilcolina, noradrenalina, dopamina, glutamato y encefalinas.²⁰

1.4.1 Características estructurales de los receptores LPHNs

Los miembros de la familia de LPHNs comparten características estructurales comunes (Fig. 6). La secuencia N-terminal (~1,000 residuos), está conformada por un dominio de lectina en el extremo amino terminal; esta región se encuentra presente en vertebrados e invertebrados y se mantiene altamente conservada (36-40% de identidad entre nematodos, insectos y mamíferos), sugiriendo que este dominio tiene un papel relevante en la función de este receptor.²¹

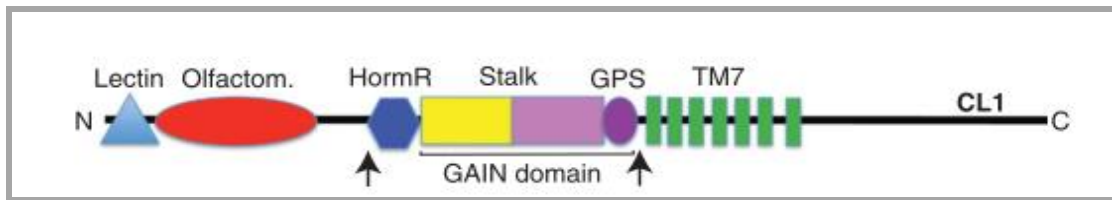


Figura 6. Características estructurales de las LPHNs. CL1, latrofilina 1; TM7, región de 7 dominios transmembranales.²²

El dominio de olfactomedina (260 aminoácidos, aa) ha sido implicado en procesos de interacción célula-célula importantes para la neurogénesis, formación de la cresta neural y la regulación del ciclo celular, mientras que mutaciones en esta región han sido involucradas en varias enfermedades neurológicas y desórdenes psiquiátricos.²¹ Recientemente se ha identificado que por medio de este dominio LPHN puede interactuar con las neurexinas, una familia de moléculas de adhesión implicadas en el establecimiento de las sinapsis, y con FLRT3 (proteína transmembranal 3 con dominios ricos en leucina y fibronectina).²³⁻²⁵

Los genes de *lphn1-3* contienen un pequeño exón entre el dominio de lectina y olfactomedina que es susceptible a corte y empalme alternativo. Esta secuencia no presenta variaciones entre LPHN1 y LPHN3, pero LPHN2

contiene dentro de esta secuencia una región adicional de corte y empalme alternativo, dando probablemente lugar a la generación de diferentes isoformas con capacidad de interactuar con ligandos específicos.²³

Posterior al dominio de olfactomedina, se encuentra una región rica en serinas y treoninas. La estructura molecular, así como la función de este dominio aún no se conocen. El análisis bioinformático de esta región indica que contiene sitios de O-glicosilación, los cuales pueden actuar como región de unión entre el dominio de olfactomedina y el dominio de unión a hormona. La principal función de este dominio parece ser estructuralmente importante para separar dos dominios globulares en la región extracelular de LPHN3. Sin embargo, ésta es la región menos conservada entre las LPHNs.²⁶

El motivo de unión a hormona (~60 residuos) es el segundo dominio observado con mayor frecuencia en los a-GPCRs (12 de 33 a-GPCR en humanos). Esta región de LPHN posee un único plegamiento, y se ha propuesto su probable interacción con polipéptidos o pequeñas moléculas, induciendo la activación del receptor.²² Sin embargo, se presume que este motivo se encuentra bloqueado por el dominio GAIN y que su activación requiere de un cambio conformacional (Fig. 7).^{22,27}

El dominio GAIN antecede a la región de unión a hormona, y está constituido por 320 residuos, distribuidos en dos subunidades, A y B. La obtención de la estructura cristalizada del dominio GAIN, permitió identificar que la subunidad A está conformada por seis hélices α , mientras que la subunidad B está constituida por 13 láminas β y dos hélices α .¹⁶ El dominio GAIN contiene un motivo GPS (~40 residuos), que constituye un sitio de autoproteólisis para las LPHNs y otros a-GPCRs (Fig. 6). Funcionalmente, el dominio GAIN es necesario y suficiente para que la autoproteólisis se lleve a cabo; sin embargo, el mecanismo por el cual ocurre aún no se conoce.

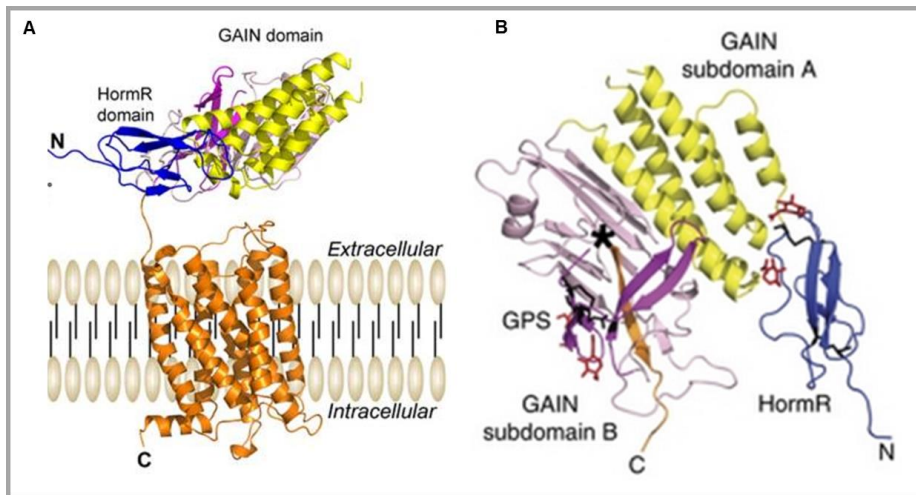


Figura 7. Estructura cristalizada del receptor de LPHN3.¹⁶ A) Receptor LPHN3 transmembranal. B) Dominio GAIN.

Se ha considerado que el dominio GAIN genera un ambiente químico favorable para que el sitio GPS genere la proteólisis del enlace peptídico, con ayuda de actividad enzimática. Se cree que estas enzimas podrían estar co-localizadas con el receptor en el compartimento intracelular, dado que la proteólisis ocurre durante la biosíntesis del receptor, durante su paso por el retículo endoplásmico.²⁸ De manera interesante se ha encontrado que mutaciones en LPHN relacionadas con el cáncer, se encuentran en este dominio.²⁷

La región carboxilo terminal comprende siete dominios transmembranales (~250 residuos) que dan lugar a la formación de asas extracelulares (3) e intracelulares (3).¹⁷ Estos dominios transmembranales presentan una alta homología entre las diferentes isoformas, lo que sugiere una función común de esta región en LPHN1, 2 y 3. A través de las asas citoplasmáticas el receptor puede interactuar con otras proteínas implicadas en la transducción de señales. De manera interesante, mediante ensayos de interacción (*pull-down*) se ha observado co-localización de LPHN con proteínas Gαq/11 y Gai/o; sin embargo, actualmente aún no se ha identificado el acople funcional de estos receptores a proteínas G.^{29,30}

Tal como se ha descrito para los GPCRs, que poseen sitios de fosforilación que permiten la desensibilización iniciada por fosforilación debida a cinasas de GPCRs (GRKs) y el reclutamiento de β -arrestinas, induciendo la internalización del receptor;³¹ se ha observado que las LPHNs poseen regiones de fosforilación, caracterizadas por la presencia de residuos de Ser/Treo/Tir en la región citoplasmática (Fig. 8).^{27,32} Lo anterior sugiere que la función de las LPHNs, su activación e internalización podrían estar reguladas por la fosforilación en la región citoplasmática.

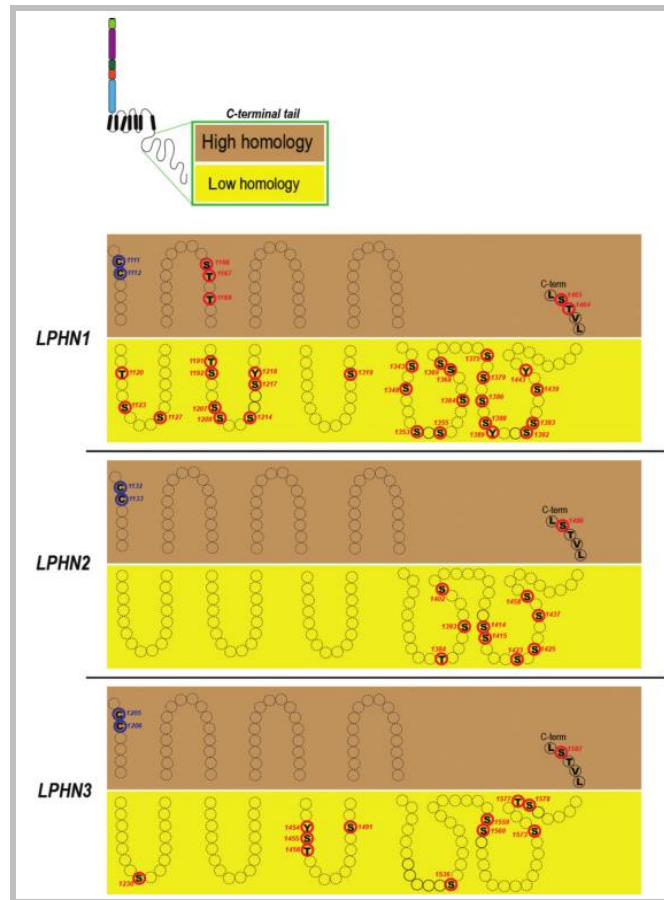


Figura 8. Sitios de fosforilación en las LPHNs.²⁷

En la región intracelular las LPHNs poseen motivos de unión a PDZ, los cuales son reconocidos por los dominios PDZ de otras proteínas, generándose interacciones proteína-proteína. Los dominios PDZ tienen un papel importante en la localización sináptica de los canales iónicos, receptores, enzimas de señalización y moléculas de adhesión celular.^{33,34}

1.4.2 Expresión de las LPHNs

Los genes que codifican los receptores de las LPHNs se denominan *lphn1*, *lphn2* y *lphn3*, y se localizan en los cromosomas 19, 1 y 4 en el humano, y 8, 3 y 5 en el ratón. Los RNAm de las diferentes LPHNs contienen diferentes sitios de corte y empalme alternativo (dos han sido identificados directamente por secuenciación del cDNA en LPHN1, cinco en LPHN2 y cuatro en LPHN3).¹⁷

El RNAm de todas las LPHNs se expresa en el cerebro del ratón, donde se ha identificado mayor expresión del RNAm de LPHN1 y de LPHN3; a su vez, ambos se expresan en menor proporción en tejidos no neuronales como el hígado, el corazón y el pulmón. En contraste, el RNAm de LPHN2 se encuentra ampliamente expresado en tejidos no neurales.²³ El patrón de expresión del RNAm de LPHN2 en tejido humano es similar al observado en roedores. Sin embargo, existen algunas diferencias en relación con el RNAm de LPHN1 y LPHN3. Aunque ambos se expresan principalmente en cerebro, su expresión en diferentes regiones cerebrales no es homogénea. Estudios por *Northern blot* mostraron una elevada expresión del RNAm de LPHN3 en la amígdala, el núcleo caudado, el cerebelo y la corteza prefrontal, baja expresión en el cuerpo caloso, el hipocampo, los lóbulos frontal y temporal, y el putamen, sin expresión aparente en el tálamo y la médula espinal.³⁵ Recientemente se ha identificado que LPHN2 y LPHN3 se encuentran altamente expresadas en las glándulas suprarrenales.³⁶

De manera interesante, se ha observado que los niveles de expresión del RNAm de LPHN1 y LPHN3 en tejido cerebral de ratones en etapa post-natal

son similares y aumentan conforme ocurre la maduración del tejido cerebral. En contraste, los niveles del RNAm de LPHN2 disminuyen durante el desarrollo post-natal.²³ Estos datos sugieren que la expresión de las diferentes isoformas de LPHNs está altamente regulada en las diferentes etapas de maduración de los tejidos y que por tanto podrían contribuir de manera diferencial a la formación de redes neuronales.

1.4.3 Localización sináptica de las LPHNs

Actualmente existen evidencias que indican que las LPHNs se localizan en los compartimentos pre- y post-sináptico; sin embargo, su localización sináptica no es del todo clara.

Estudios por microscopía electrónica indican que los receptores de LPHN1 se localiza en la región pre-sináptica.³⁷ Por otro lado, el análisis proteómico de la densidad post-sináptica ha permitido identificar que los receptores de LPHNs se encuentran en esta región.³⁸ Estos resultados coinciden con los obtenidos por hibridación *in situ*, en los que se ha observado que LPHN1 se localiza en membranas del compartimento pre-sináptico obtenidas del cerebro del ratón.³⁴ Adicionalmente Tobaben y cols. reportaron que LPHN1 se encuentra interactuando con proteínas Shank en la densidad post-sináptica, donde son altamente expresadas.³³

1.4.4 Ligandos endógenos de las LPHNs: FLRT, teneurinas y neurexinas

Al igual que la mayoría de los a-GPCRs, los miembros de la familia de LPHNs se consideraban receptores huérfanos; sin embargo, recientemente se identificaron sus ligandos endógenos (FLRT, neurexinas y teneurinas). Adicionalmente, se ha demostrado que todas las latrofilinas poseen un sitio de corte y empalme alternativo en la región N-terminal, que modula su interacción con ligandos endógenos específicos.

1.4.4.1 FLRT

Las proteínas transmembranales con repetidos de leucina y fibronectina (FLRTs) son una familia de proteínas de superficie celular, constituidas por 10 repetidos ricos en leucina, un dominio de fibronectina 3 en su región extracelular, un solo dominio transmembranal y una región citoplasmática. Se han identificado tres isoformas de FLRTs (1-3), codificadas por genes diferentes (Flrt 1-3).³⁹ Todas se expresan en diversos tejidos, incluyendo el cerebro, principalmente en el hipocampo y la corteza. Se considera que las proteínas FLRTs tienen una función importante en el crecimiento axonal, la migración celular y el establecimiento sináptico a través de su propia interacción generando una respuesta de adhesión o por su interacción con las proteínas Unc5, generando una acción de repulsión.⁴⁰ Jackson y cols. identificaron que la interacción LPHN3-FLRT3 podría generar este mismo efecto de adhesión o repulsión bajo distintas condiciones. Observaron que en células Hela transfectadas se promueve la interacción entre el dominio de olfactomedina de LPHN3 y FLRTs, pero en neuronas corticales se observó un efecto de adhesión LPHN3-FLRT3. Estos hallazgos muestran que LPHN3 puede actuar como una proteína bi-funcional con propiedades de adhesión o repulsión (Fig. 9).⁴¹

La interacción trans-sináptica LPHN3-FLRT3 es mediada por el dominio N-terminal de las LPHNs y el fragmento extracelular de FLRTs, lo que indica que la interacción entre ambas proteínas podría ser de gran relevancia en el establecimiento de los circuitos sinápticos.²⁵

En el año 2014 O'Sullivan y cols. publicaron que el dominio de olfactomedina en las LPHNs es necesario para su interacción con FLRT3, mientras que para su interacción con teneurina se requiere los dominios de lectina y olfactomedina, lo que sugiere una probable modulación en el establecimiento de los contactos por las LPHNs (Fig. 10).²⁴

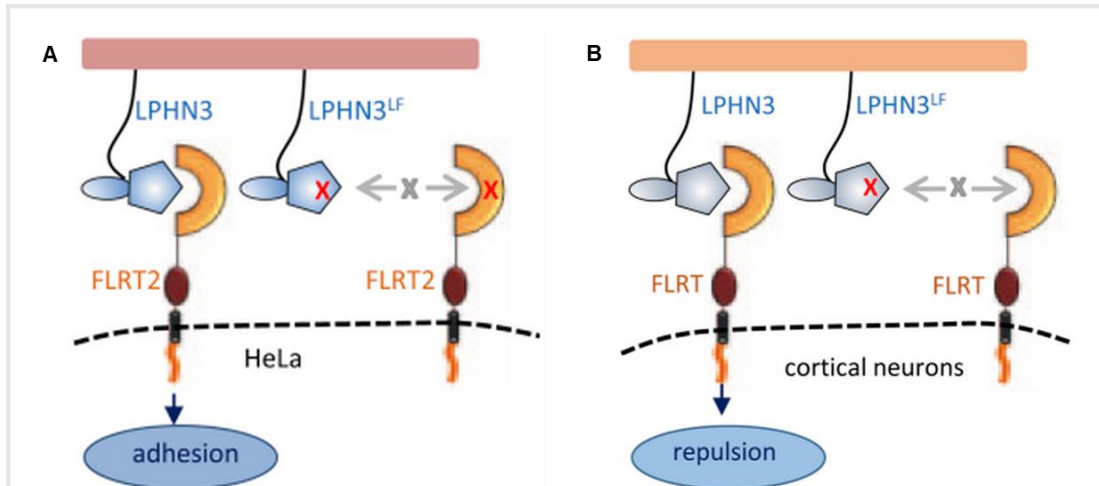


Figura 9. Bi-funcionalidad de LPHN3.⁴¹ A) En células Hela presenta características de adhesión en su interacción con FLRT (proteínas transmembranales con repetidos de leucina y fibronectina). B) Su expresión en neuronas corticales genera repulsión hacia FLRT.

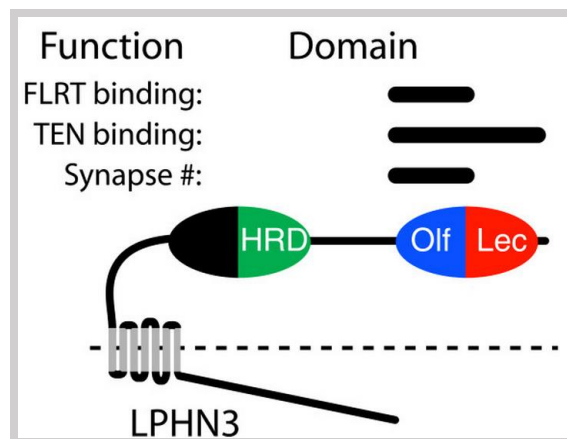


Figura 10. Dominios de interacción LPHN3-FLRT y LPHN3-Teneurina²⁵. HDR, dominio de unión a hormona; Olf, olfactomedina; Lec, lectina.

1.4.4.2 Teneurinas

Las teneurinas son glicoproteínas de un solo dominio transmembranal que se expresan en la superficie celular. Las cuatro teneurinas (1-4) identificadas en

vertebrados se localizan específicamente en el cerebro, y las teneurinas 2 y 4 se expresan en otros tejidos. Están constituidas por una secuencia amino terminal intracelular relativamente corta que contiene dos motivos de unión a calcio y dos regiones ricas en prolinas que facilitan la interacción entre la teneurina-1 y el citoesqueleto, un solo dominio transmembranal y una larga secuencia extracelular (~200 aa) que contiene múltiples repetidos EGF (factor de crecimiento epidermal), una región conservada de cisteínas y un dominio YD (múltiples repetidos de tirosina y aspartato). Adicionalmente se ha identificado que todas las teneurinas contienen una secuencia corta (~40 residuos) de péptidos asociados a la región C-terminal (TCAP).⁴² Las teneurinas tienen una función importante en el desarrollo, crecimiento de las neuritas, guía axonal, conectividad neuronal y sinaptogénesis.³⁷ Sin embargo, aún no se conoce su función con claridad.

Recientemente se identificó que LPHN (ubicada en la región pre-sináptica) puede interactuar trans-sinápticamente con Teneurina 2 localizada en la región post-sináptica, con la finalidad de regular la formación y mantenimiento sináptico.³⁷ Esta interacción puede ser modulada por las LPHNs a través de su sitio de *splicing* alternativo (sitio A) localizado entre el dominio de lectina y olfactomedina.²³ Adicionalmente, esta interacción trans-sináptica ha permitido sugerir que la región TCAP de las teneurinas así como otras proteínas accesorias (como los distroglicanos y neurexinas) son necesarias para mantener una alta afinidad de unión teneurina-LPHNs (Fig. 11).⁴³

De manera interesante, la adición del ligando soluble Teneurina 2 a neuronas del hipocampo genera un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, lo que sugiere el acople del receptor a proteínas Gαq/11.³⁷ Sin embargo, a la fecha aún no se conoce la vía de señalización implicada en la transducción de señales de los α-GPCR LPHNs.

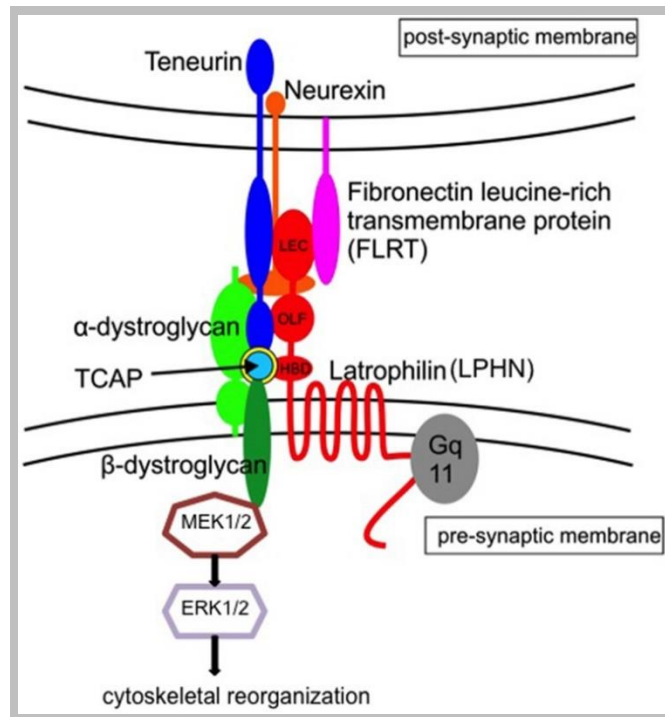


Figura 11. Interacción LPHN3-Teneurina y la intervención de proteínas accesorias.⁴³

1.4.4.3 Neurexinas

Las neurexinas son moléculas de adhesión celular, formadas por ~2,800 aa. En los vertebrados se han identificado tres genes que codifican las neurexinas α y β . Estas proteínas poseen una pequeña secuencia citoplasmática amino terminal, una región trans-membranal y una larga secuencia extracelular que contiene múltiples repetidos EGF. Las neurexinas tienen un papel importante en el establecimiento de la transmisión sináptica, mediante la interacción extracelular con ligandos pre y post-sinápticos. LPHN1 fue identificado como un ligando de alta afinidad para neurexina, siendo esta interacción específica ya que las neurexinas no se asocian a LPHN2 o LPHN3.²⁴

1.5 Implicación de las LPHNs en el establecimiento y/o desarrollo de alteraciones en la salud

1.5.1 Implicación de las LPHNs en alteraciones no neuronales

LPHN2 se caracteriza por una expresión tisular más heterogénea, a diferencia de LPHN1 y LPHN3, que se expresan principalmente en el cerebro.²³

Doyle y cols. reportan que LPHN2 está presente en el corazón de embriones de pollo y comprobaron su funcionalidad durante el desarrollo, en la transición del tejido epitelial-mesenquimal, observando que en ausencia de LPHN2 se inhibe dicha transición.⁴⁴ De manera interesante, se ha observado que la expresión aberrante de LPHN2 podría tener una implicación relevante en el desarrollo de cáncer de mama debido a la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 1p31.1.²⁶

Recientemente se ha observado que LPHN1 tiene una implicación relevante en el alineamiento de la división celular durante el desarrollo embrionario temprano de *C. elegans*, determinándose que su expresión es esencial para el desarrollo normal de este y probablemente otros organismos.⁴⁵

De manera interesante el gen que codifica LPHN3 ha sido relacionado con el cáncer. Con respecto a esto, Kant y cols. (2010) identificaron diversas mutaciones en el gen *lphn3* en pacientes con cáncer, principalmente de pulmón, así como de mama, aunque en menor proporción.⁴⁶ Adicionalmente, Kotepui y cols. (2012) determinaron un incremento en la expresión del RNAm de LPHN3 en muestras de pacientes con cáncer de mama en comparación con una población control. El análisis de regresión lineal de los resultados obtenidos en este estudio, sugiere una asociación entre el incremento del RNAm con el establecimiento de tumores agresivos.⁴⁷

1.5.2 Implicación de las LPHNs en alteraciones neuronales

La elevada expresión de LPHN1 y LPHN3 en el cerebro, sugiere una función importante de estos receptores. Esto es consistente con un estudio realizado por Bin Sun y cols. que indica que la modificación en la expresión de las LPHNs en el cerebro genera susceptibilidad a muerte neuronal inducida por isquemia.⁴⁸

Ratas carentes de LPHN1 no presentan modificaciones en su fertilidad ni en el tiempo de sobrevivencia. La única anomalía observada es la incapacidad de cuidar adecuadamente a sus crías, incrementándose la mortalidad neonatal. Esto indica que la ausencia de LPHN1 no causa alteraciones en la supervivencia, ni en la función cerebral de las ratas, pero pueden presentarse efectos en su comportamiento.⁴⁹

Recientemente se ha identificado que la eliminación genética de *dCirl* (único gen homólogo de *lphn* en *Drosophila melanogaster*) reduce la respuesta de las neuronas cordotonaes, el principal sistema mecanosensor de *Drosophila*, a estímulos mecánicos (percepción táctil, propioceptiva y estímulos auditivos).⁵⁰

En ratones que no expresan el gen *lphn3*, se ha observado un fenotipo de hiperactividad, lo que sugiere que LPHN3 desempeña un papel importante en el desarrollo y/o la regulación de la transmisión monoaminérgica, y que la implicación de LPHN3 en el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) se deba a alteraciones en esta vía.⁵¹

1.5.3 Relación entre LPHN3 y TDAH

1.5.3.1 TDAH

Este trastorno es una alteración neuropsiquiátrica con etiología multifactorial y de inicio en la infancia. Se caracteriza por la disminución de la atención, impulsividad e hiperactividad, afectando de forma significativa la adaptación

académica, familiar, social y laboral de las personas que lo padecen. El ADHD afecta a un 5-7% de los niños, se estima que dos tercios continuarán con sintomatología en la edad adulta, un 15% presentará el diagnóstico completo y un 50% lo hará en remisión parcial.⁵²

Aunque se han realizado diversos estudios genéticos sobre el trastorno, actualmente se desconocen las causas exactas, y se acepta que el TDAH es un trastorno complejo donde participan tanto factores ambientales, que explicarían el 20-30% de la variabilidad fenotípica observada, como factores genéticos de riesgo, que explicarían el 70- 80% de la variabilidad.⁵²

Recientemente se ha propuesto que el gen que codifica LPHN3 contribuye a la susceptibilidad al TDAH.⁵³ El receptor LPHN3 se expresa en regiones específicas del cerebro, relacionadas con la atención, tales como la amígdala, el núcleo caudado, el cerebelo y la corteza cerebral, y en menor proporción en el cuerpo caloso, el hipocampo, el putamen y los lóbulos occipital, frontal y temporal, afectando así circuitos neuronales implicados en el TDAH.³⁵ Sin embargo, el mecanismo por el cual las mutaciones en el gen de Lphn3 contribuyen al desarrollo de TDAH aún no se conoce.

1.5.3.2 Relación entre la expresión de LPHN3 y el TDAH

Estudios de asociación muestran una clara relación entre la susceptibilidad al TDAH y alteraciones identificadas en el cromosoma 4q13.2. La región de asociación abarca los exones 4 a 19 del gen de LPHN3 que codifican para la región de olfactomedina, el sitio de unión a hormona, el dominio GAIN incluyendo el sitio GPS y los dominios transmembranales.³⁵

En el año 2010, Domené y cols. identificaron 21 variaciones en el gen de LPHN3 mediante un estudio de cohorte realizado en 139 pacientes con TDAH; estas variaciones incluyen las mutaciones R465Q, D615N, A247S y

T783M.⁵³ Sin embargo, los mecanismos que contribuyen al establecimiento de la enfermedad apenas comienzan a comprenderse.

En el año 2012, Lange y cols. estudiaron el gen ortólogo de lphn3 de humano del pez cebra (lphn 3.1) durante su desarrollo y observaron que la pérdida de la función del gen lphn 3.1 causa una severa reducción de neuronas dopaminérgicas en el diencéfalo ventral del pez, acompañado por un fenotipo locomotor de hiperactividad e impulsividad. Adicionalmente observaron que el fenotipo conductual puede ser corregido por metilfenidato y atomoxetina,⁵⁴ utilizados en el tratamiento del TDAH. El fenotipo de hiperactividad también ha sido observado en ratones carentes de LPHN3, acompañado por un incremento en los niveles de dopamina y serotonina en el estriado dorsal de los ratones.⁵¹

2. Planteamiento del problema

El establecimiento y funcionamiento adecuado de las sinapsis es esencial para la vida, porque permite el adecuado funcionamiento del cerebro y de todas las funciones que de él derivan. Sin embargo, actualmente aún se conoce poco acerca de los mecanismos involucrados en estos procesos.

Las LPHNs son una familia de GPCRs de adhesión, que podrían desempeñar una función importante en el establecimiento de las sinapsis. Estas proteínas poseen motivos de adhesión en la región N-terminal y una estructura heptahelicoidal en la región C-terminal, lo que les confiere una doble función, actuar como moléculas de adhesión y la posible función de transducción de señales. Sin embargo, los mecanismos de acción y la función de las LPHNs aún no se conocen con claridad.

Por otra parte, estas proteínas tienen regiones críticas en su estructura que las hacen susceptibles a mutaciones. Recientemente se ha identificado que el gen de LPHN3 es un blanco de mutaciones que han sido asociadas con el cáncer y el desarrollo del TDAH.

Por lo anterior, en este proyecto se propone expresar heterológamente el gen de LPHN3 nativa y con las mutaciones puntuales A247S, R465Q, D615N, T783M, N344I, K561N, A760G, D798H, S810L y E811Q, con la finalidad de determinar la vía de señalización activada por el receptor, y establecer el efecto de las mutaciones en la expresión del receptor y sobre la vía de señalización implicada.

3. Hipótesis de trabajo

La hipótesis general del proyecto es:

La expresión de mutaciones puntuales en regiones del gen de Lphn3 que codifican la región extracelular del receptor Lphn3, modificará su expresión y señalización en un sistema heterólogo.

Para la fase del proyecto que se presenta en esta tesis se planteó el abordaje de objetivos primariamente metodológicos fundamentales para el análisis de la hipótesis. Lo anterior comprende generar varias de las mutaciones puntuales, caracterizar plásmidos con mutaciones previamente establecidas, generar ligandos sintéticos solubles y optimizar un sistema de expresión heterólogo de los receptores Lphn3^{Flag-HA} nativo y con las mutaciones.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general. El objetivo para el proyecto en su totalidad es:

Determinar el efecto de mutaciones puntuales en regiones del gen de Lphn3 que codifican la región extracelular del receptor en su expresión y/o señalización en un sistema heterólogo

4.2 Objetivos particulares. Para la totalidad del proyecto son:

1. Generar las mutaciones puntuales A247S, R465Q, D615N, T783M y N344I en el gen de LPHN3^{Flag-HA}.
2. Caracterizar los plásmidos con las mutaciones K561N, A760G, D798H, S810L y E811Q en el gen de LPHN3^{Flag-HA}, generados previamente²².
3. Generar ligandos sintéticos solubles que permitan realizar ensayos de interacción ligando-receptor.
4. Expresar de manera transitoria a los receptores Lphn3^{Flag-HA} nativo y con las mutaciones mencionadas en células HEK-293T.
5. Evaluar la interacción ligando-receptor de los receptores Lphn3^{Flag-HA} nativo y con cada una de las mutaciones generadas.
6. Evaluar la activación de proteínas Gas, Gai/o ó Gαq/11 por el receptor Lphn3^{Flag-HA} nativo y mutado en células HEK-293T.

Para esta tesis se abordaron los primeros 4 objetivos particulares.

5. Material y métodos

5.1 Modelado molecular del receptor LPHN3 nativo y con las mutaciones de interés

Como parte del desarrollo de los primeros dos objetivos particulares y tomando en consideración la relativamente reciente cristalización de los dominios estructurales GAIN²² y Lectina-Olfactomedina⁴¹ del receptor LPHN3, se realizó el modelado molecular de las mutaciones estudiadas en este proyecto, utilizando la herramienta bioinformática Swiss-Pdb Viewer versión 4.1,⁵⁵ con la finalidad de evaluar cambios estructurales en el receptor nativo y en presencia de cada una de las mutaciones. En la Tabla 1 se indican la localización de cada una de las mutaciones del receptor LPHN3 que se abordaron en este estudio, así como la alteración con la cual han sido relacionadas.

Tabla 1. Localización de las mutaciones en el receptor LPHN3

Mutación	Localización	Asociación
A247S ⁵³	Dominio de olfactomedina	TDAH
N344I ^{46,47}	Dominio de olfactomedina	Cáncer de pulmón
R465Q ⁵³	Región serinas-treoninas	TDAH
K561N ^{46,47}	Dominio GAIN	Cáncer de pulmón
D615N ⁵³	Dominio GAIN	TDAH
A760G ^{46,47}	Dominio GAIN	Cáncer de pulmón
T783M ⁵³	Dominio GAIN	TDAH
D798H ^{46,47}	Dominio GAIN	Cáncer de pulmón
S810L ^{46,47}	Dominio GAIN	Cáncer de pulmón
E811Q ^{46,47}	Dominio GAIN	Cáncer de pulmón

TDAH, trastorno por déficit de atención e hiperactividad. Los números corresponden a las referencias bibliográficas.

5.2 Generación de las mutaciones puntuales A247S, R465Q, D615N, T783M y N344I en el gen del receptor LPHN3

5.2.1 Mutagénesis sitio dirigida por PCR y digestión con la endonucleasa DpnI

Para generar las mutaciones A247S, R465Q, D615N, T783M y N344I en el receptor LPHN3 se planteó realizar mutagénesis sitio dirigida por PCR y digestión con la endonucleasa DpnI, utilizando el plásmido pCMV-hCL3^{Flag-HA} (9085 pb), diseñado previamente.²² Este plásmido contiene las banderas Flag y HA, el promotor de citomegalovirus (CMV) y un gen de resistencia a ampicilina, lo que permite la selección de las células transfectadas. Se diseñaron dos oligonucleótidos para generar cada una de las mutaciones en la secuencia molde del gen que codifica el receptor LPHN3 (hCL3), de tal forma que cada oligonucleótido se alinea a cada una de las hebras molde durante una reacción de PCR, obteniéndose el ADN de doble cadena con la mutación incorporada en la secuencia. En la Tabla 2 se indica la modificación que genera cada una de las mutaciones por el cambio de uno o dos nucleótidos en un codón, permitiendo el cambio de un solo aminoácido en la secuencia de la proteína LPHN3. Las condiciones de reacción y el programa de amplificación para cada una de las mutaciones generadas se muestran en la tabla 3 y 4.

Después de la PCR, se realizó la digestión del DNA metilado y hemimetilado usando la endonucleasa DpnI (Promega, R6231), incubando la reacción por 1 h a 37°C. El producto obtenido fue utilizado para transformar bacterias competentes *E. coli* DH5 α , las cuales fueron sembradas en placas de agar/LB/ampicilina (50 μ g/ml). Las placas se incubaron por 16 h a 37 °C y algunas de las colonias que crecieron fueron inoculadas en medio de Luria-Bertani (LB) conteniendo ampicilina (50 mg/ μ l) e incubadas por 16 h a 37°C. Se realizó la extracción del DNA plasmídico por lisis alcalina⁵⁶ y se caracterizaron los plásmidos usando las enzimas de restricción PvuI (Promega, R6321), BamHI (Promega, R6021) y EcoRI (Promega, R6011).

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para la mutagénesis sitio dirigida por PCR.

	Mutación	Cambio de aa	Cambio de codón	Secuencia
F3	A247S	IAN A NY *	GCC → TCC	CATTGCAA A CT <u>CCA</u> ATTATC
R4	A247S	IAN S NY	GGC→ GGA	GATAATT <u>GG</u> AGTTTGCAATG
F5	R465Q	RN R ST * RN Q ST	CGG → CAG	GCGCAACC <u>CA</u> GTCTACAAG
R6	R465Q		CCG→ CTG	CTTGTAGACT <u>GG</u> TTGCGC
F7	D615N	GK D S * GK N S	GAC → AAC	GGCAAGA A CA G CGC
R8	D615N		GTC→ GTT	GCGCT <u>G</u> TTCTTGCC
F9	T783M	V I TAA * V M AA	ACC → ATG	GTGATC A T <u>G</u> GCAGCCA
R10	T783M		GGT→ CAT	TGGCTG C C A TGATCAC
F11	N344I	IY N TD * IY I TD	AAT → ATT	CATCTAC A T <u>TT</u> ACTGATC
R12	N344I		ATT→ AAT	GATCAGT A A <u>T</u> GTAGATG

Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR para la mutagénesis sitio dirigida

Reactivos	Concentración	Vol (µl)
Buffer	10X	2.5
DNTPs	10 mM	0.5
Primer 1	10 mM	1
Primer 2	10 mM	1
DNA	20 ng/µl	0.25
Enzima PFU		0.2
Agua		18.3
DMSO	5 %	1.25

Tabla 4. Condiciones de la reacción de PCR para la mutagénesis sitio dirigida

Etapas de amplificación	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	50 s	18
Alineamiento	45 s	
Extensión	18 min, 17 s	

5.2.1.1 Generación de bacterias competentes *E. coli* DH5 α

Las bacterias *E. coli* cuyo genotipo es *F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17 (rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA*, fueron utilizadas para la transformación de DNA plasmídico. Su preparación consiste en inocular una colonia de bacterias (crecidas en medio SOB) en 5 ml de medio SOB (10 mM MgSO₄) e incubar a 37°C por 16 h en agitación. Posteriormente, se colocan 0.5 ml de este medio en 50 ml de medio SOB (10 mM MgSO₄) y se incubaba a 37°C con agitación hasta una D.O.₅₅₀= 0.5. El medio se pasó a tubos estériles de 50 ml y se incubaron en hielo por 10 min. A partir de este momento, las bacterias y los reactivos a usar se mantuvieron a 4°C durante todo el proceso, trabajando en condiciones de esterilidad. El medio de cultivo se centrifugó a 4,000 rpm por 12 min a 4°C, se eliminó todo el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron en 16 ml de buffer RF1 frío y se incubaron por 15 min en hielo. Posteriormente las bacterias se centrifugaron a 4,000 rpm por 12 min. Se resuspendieron suavemente en 4 ml de buffer RF2 frío y se incubaron por 15 min en hielo. Se hicieron alícuotas de 200 μ l para su transformación y se preservaron a -20°C hasta el momento de utilizarlas. La eficiencia de transformación de estas bacterias fue de 10⁷ UFC/ μ g de DNA. El contenido y la preparación de las soluciones utilizadas se indican a continuación:

- **Buffer RF1:** 30 mM KAc, 100 mM RbCl o KCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% de glicerol. Se ajustó el pH a 5.8 con 0.2 M de ácido acético, para posteriormente esterilizar por filtración.
- **Buffer RF2:** 10 mM MOPS o PIPES, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl o KCl, 5% glicerol. Se ajustó el pH a 6.5 con KOH y se esterilizó por filtración.
- **Medio de cultivo SOB (1l):** 20 g bacto-triptona, 5 g extracto de levadura, 0.5 g de NaCl. Se ajustó el pH a 7.5 con KOH y se esterilizó en autoclave por 15 min. Posteriormente se adicionó MgSO₄ (10 mM final a partir de una solución estéril de 1 M).

5.2.1.2 Transformación de bacterias competentes

Se descongelaron alícuotas de bacterias competentes preparadas previamente y se mezclaron con 10 µl de la reacción de ligación; se incubaron en hielo por 30 min y posteriormente se dio un choque térmico incubando cada una de las alícuotas a 42°C por 90 s, seguido de su incubación en hielo por 2 min. Se adicionaron 800 µl de medio SOB a cada una de las alícuotas de bacterias transformadas y se incubaron en agitación durante 1 h para la recuperación de las bacterias. Finalmente se sembraron 100 µl de bacterias en placas con agar/LB/ampicilina y se incubaron por 16 h a 37°C. El contenido y la preparación del agar LB se indica a continuación:

- **Agar LB/ampicilina (1 l):** 10 g bacto-triptona, 5 g extracto de levadura, 10 g de NaCl. Ajustar pH a 7.0 con 5 N de NaOH. Adicionar 10 g de agar y esterilizar en autoclave por 15 min. Antes de vaciar en placas se agregó una solución de ampicilina (100 µg/ml, concentración final).

5.2.1.3 Extracción de DNA por lisis alcalina (miniprep)

Se seleccionaron las bacterias transformantes que crecieron en placas de agar/LB/ampicilina y se sembraron en 5 ml de medio LB/ampicilina (100 µg/ml), se incubaron en agitación por 16 h a 37°C. Después se centrifugó la suspensión de bacterias a 4°C por 2 min a 12,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla de bacterias obtenida se disolvió en 100 µl de la solución I fría. Se adicionaron 200 µl de cloroformo, seguido de 150 µl de solución III, se mezcló por inversión y se incubó por 5 min en hielo, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4°C. Se transfirieron 400 µl del sobrenadante a un tubo limpio y se adicionaron 800 µl de etanol absoluto, mezclando por agitación e incubando por 2 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se adicionó 1 ml de etanol frío, se decantó y se mantuvo el tubo abierto por 5 min para permitir la evaporación total del etanol. Finalmente se adicionaron 50 µl de solución amortiguadora TE (pH 8.0) conteniendo RNAasa (10X). El

contenido y la preparación de las soluciones utilizadas se indican a continuación:

- **Medio de cultivo LB** (1 l): 10 g bacto-triptona, 5 g extracto de levadura, 10 g de NaCl. Ajustar pH a 7.0 con 5N de NaOH y esterilizar en autoclave por 15 min.
- **Solución I:** 50 mM de glucosa, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0). Aforar a 100 ml, esterilizar en autoclave por 15 min y almacenar a 4°C.
- **Solución II:** 0.2 N de NaOH, 1% SDS. Aforar a 100 ml con agua destilada.
- **Solución III:** 5 M de acetato de potasio y 11.5 ml de ácido acético glacial. Aforar a 100 ml con agua destilada.
- **Buffer TE:** 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, y 1 mM EDTA. Aforar a 50 ml con agua destilada.

5.2.2 Mutagénesis por PCR de extensión sobrepuesta

Debido a que los resultados por el método de mutagénesis sitio dirigida por PCR y digestión con la endonucleasa DpnI no fueron favorables, como se muestra en la sección de resultados, fue necesaria la implementación de una segunda estrategia para generar las mutaciones en el receptor LPHN3.

Para la mutagénesis por PCR de extensión sobrepuesta se utilizó el plásmido pCMV-hCL3^{Flag-HA}, así como los oligonucleótidos que se diseñaron para abordar la estrategia anterior (Tabla 2). Adicionalmente, se diseñaron otros dos oligonucleótidos para amplificar el producto completo correspondiente a LPHN3 (Tabla 5).

Tabla 5. Oligonucleótidos para la amplificación de la secuencia que codifica para LPHN3.

Nombre	Secuencia
F1	GTGAACCGTCAGAATTCATG
R2	CGGGATCCTCTAGATCAC

Esta estrategia consiste en amplificar por PCR dos fragmentos complementarios entre sí usando como molde el plásmido pCLMV-CL3^{Flag-HA}, tal como se indica en la figura 12.

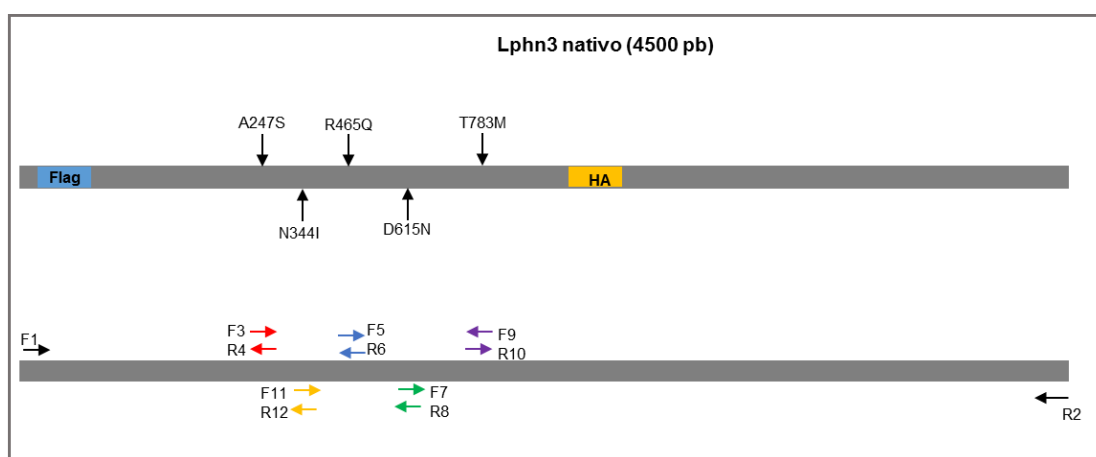


Figura 12. Estrategia para la mutagénesis por PCR de extensión sobrepuesta. La bandera HA se localiza en la región N-terminal entre Y918 y E919; la bandera Flag se encuentra en la región C-terminal en L25.

Se realizaron diez reacciones individuales de PCR con la DNA polimerasa TAKARA (R010A) usando 2 oligonucleótidos a la vez para amplificar fragmentos de tamaños distintos, dependiendo de la posición de alineamiento de los oligonucleótidos dentro de la secuencia molde (Tabla 6). Los componentes para la reacción de PCR así como las condiciones de amplificación se muestran en las Tablas 7 y 8, respectivamente.

Tabla 6. Fragmentos individuales obtenidos por la combinación de oligonucleótidos.

Fragmentos individuales			Fragmentos individuales		
	Oligonucleótidos	Amplicón		Oligonucleótidos	Amplicón
A	R2-F3	3723 pb	B	F1-R4	804 pb
C	R2-F5	3066 pb	D	F1-R6	1459 pb
E	R2-F7	2615 pb	F	F1-R8	1906 pb
G	R2-F9	2111 pb	H	F1-R10	2414 pb
I	R2-F11	2915 pb	J	F1-R12	1095 pb

Tabla 7. Contenido de la reacción de PCR para la generación de los fragmentos individuales.

Reactivos	Concentración	1X
Buffer	10X	2.5 µl
DNTPs	10 mM	0.5 µl
Primer 1	10 mM	1 µl
Primer 2	10 mM	1 µl
DNA	20 ng/µl	0.25 µl
Enzima Taq polimerasa		0.2 µl
Agua		18.3 µl
DMSO	5%	1.25 µl

Tabla 8. Condiciones de amplificación de los fragmentos individuales.

Fragmentos	Etapas de amplificación			Ciclos
	Desnaturalización (s)	Alineamiento (s)	Extensión (min)	
A	10	5	4	30
B		5	1	
C		5	4	
D		5	2	
E		10	3	
F		10	2	
G		5	3	
H		5	2	
I		10	4	
J		10	2	

Los fragmentos individuales fueron utilizados como DNA molde en una segunda reacción de PCR para amplificar el producto completo correspondiente a LPHN3^{Flag-HA} (4507 pb) con cada una de las mutaciones utilizando los oligonucleótidos F1 y R2 (Figura 12). En la Tabla 9 se indica la combinación de los fragmentos individuales para generar las mutaciones específicas. El contenido de la reacción de PCR fue el mismo indicado en la Tabla 7, y las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 10.

Tabla 9. Combinación de fragmentos individuales

Mutación	Combinación de fragmentos individuales
A247S	A – B
R465Q	C – D
D615N	E – F
T783M	G – H
N344I	I – J

Tabla 10. Condiciones de amplificación del producto LPHN3

Etapas	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	10 s	30
Alineamiento	5 s	
Extensión	5 min	

Los productos de 4507 pb se visualizaron en un gel de agarosa (0.8%), las bandas fueron escindidas y purificadas usando el *Kit Wizard Genomic DSV Gel and PCR Clean Up System* (Promega, A9281); el producto obtenido fue cuantificado y digerido con las enzimas EcoRI y BamHI. El vector pCMV-hCL3^{Flag-HA} fue digerido usando las enzimas EcoRI, BamHI y NotI (Promega, R6431). Después de la restricción, ambos productos fueron ligados usando la enzima T4 DNA Ligasa (Promega, M1801). Los plásmidos obtenidos fueron utilizados para transformar bacterias competentes *E. coli* DH5 α las

cuales fueron sembradas en placas de agar/LB/ampicilina (50 µg/ml), para incubar por 16 h a 37°C. Algunas de las colonias bacterianas fueron resembradas en medio LB/ampicilina (50 mg/ml) e incubadas por 16 h a 37°C. Se realizó la extracción del DNA plasmídico por lisis alcalina⁵⁶ y la caracterización de los plásmidos generados por digestión con las enzimas PvuI (Promega, R6321), NotI y XhoI (Promega, R6161).

Como una modificación al protocolo de la mutagénesis por PCR de extensión sobrepuesta, los fragmentos individuales fueron purificados usando el *kit Wizard Genomic DSV Gel and PCR Clean Up System* (Promega), con la finalidad de aumentar la pureza de las muestras para su posterior sobreposición por PCR (ver resultados).

5.3 Caracterización de los plásmidos con las mutaciones K561N, A760G, D798H, S810L y E811Q en el gen de LPHN3, generados previamente²²

De las diez mutaciones expresadas en el receptor LPHN3 que se abordaron en este proyecto, cinco fueron generadas y utilizadas en un estudio previo²². Los plásmidos fueron caracterizados con las enzimas de restricción XhoI, NotI y PvuI, con la finalidad de verificar su integridad. Después de caracterizarlos, se transformaron bacterias E coli DH5α con cada uno de los plásmidos y se extrajo el DNA plasmídico por lisis alcalina (apartado 5.2.1.3).⁵⁷

5.4 Generación de los ligandos sintéticos que permitan realizar ensayos de interacción ligando-receptor

El tercer objetivo planteado en este proyecto, se abordó en colaboración con el Q.F.B. José Carlos Ovando Zambrano quien desarrolló el mismo objetivo como parte de la tesis titulada “Obtención de Neurexina 1β, Teneurina 2 y FLRT3 como ligandos solubles sintéticos del receptor Latrofilina-1”. Los ligandos sintéticos necesarios para los estudios funcionales del receptor LPHN3 son Teneurina 2 y FLRT3²⁵. Estos ligandos deben tener

características específicas que permitan su identificación y su purificación (Fig. 13).

5.4.1 Generación de Teneurina 2 soluble

La construcción del ligando soluble Teneurina 2 se realizó utilizando el plásmido pcDNA3-LassoB-Flag-Myc generado y utilizado en un estudio previo por Boucard y cols.²³

Se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 11) para amplificar por PCR de punto final la región del péptido señal (PS), el epitopo Flag y la región extracelular de Teneurina 2. Adicionalmente, uno de los oligonucleótidos tiene una secuencia de corte para el reconocimiento de la enzima MluI, el oligonucleótido del extremo opuesto tiene una secuencia de reconocimiento para la proteasa Tev (ENLYFQG), que es seguida de la secuencia de reconocimiento para Sall, generándose un fragmento de 7236 pb. Finalmente el amplicón se insertó en el vector pCMV-IgG mediante una reacción de ligación utilizando la enzima T4 DNA ligasa. El contenido de la reacción de PCR se muestra en la Tabla 7 y las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 12.

5.4.2 Generación de FLRT3 soluble

El ligando FLRT3 fue generado utilizando el plásmido pDisplay FLRT3, este plásmido se generó y se utilizó en un estudio previo por Boucard y colaboradores²³. Se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 11) para amplificar la región PS y la región extracelular de la proteína. Los oligonucleótidos diseñados tienen un sitio de reconocimiento para la proteasa Tev, seguido por un sitio de corte para la enzima Sall, y el oligonucleótido del extremo opuesto tiene un sitio de reconocimiento para MluI. El fragmento de 1629 pb se unió a la secuencia que codifica para la fracción contante (Fc) de la inmunoglobulina IgG del plásmido pCMV-IgG mediante una reacción de ligación empleando la enzima T4 DNA ligasa. El contenido de la reacción de

PCR se muestra en la Tabla 7 y las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 12.

5.4.3 Generación del vector pCMV-IgG y ligación con los insertos de Teneurina 2 y FLRT3

El vector pCMV-IgG fue útil para la inserción de los amplicones correspondientes a la región extracelular de la Teneurina 2 y FLRT3. Se generó a partir del plásmido pCMV-Ig Bai-3.2 que contiene el inhibidor de la angiogénesis 3 específico de cerebro humano (Bai 3.2), la Fc de IgG y el gen de resistencia a ampicilina. El plásmido pCMV-Ig-Bai-3.2 fue restringido con las enzimas Mlu1 y Sal1 para generar los mismos sitios de cortes que los amplicones FLRT3 y Teneurina 2, y para retirar Bai 3.2, conservándose solo la secuencia de nucleótidos que codifican para la Fc de IgG. Posteriormente se realizó la ligación del vector generado, con cada uno de los fragmentos solubles (FLRT3 y Teneurina 2), utilizando la enzima T4 DNA ligasa. Bacterias competentes *E. coli* DH5 α fueron transformadas con los plásmidos IgFLR3^{HA-Tev} e IgTen2^{Flag-Tev}, y sembradas en placas de agar/LB/ampicilina (60 μ g/ml). Las placas se incubaron por 16 h a 37°C y algunas de las colonias fueron resembradas en medio LB/ampicilina (50 μ g/ml) e incubadas por 16 h a 37°C. Se realizó la extracción del DNA plasmídico por lisis alcalina.⁵⁶

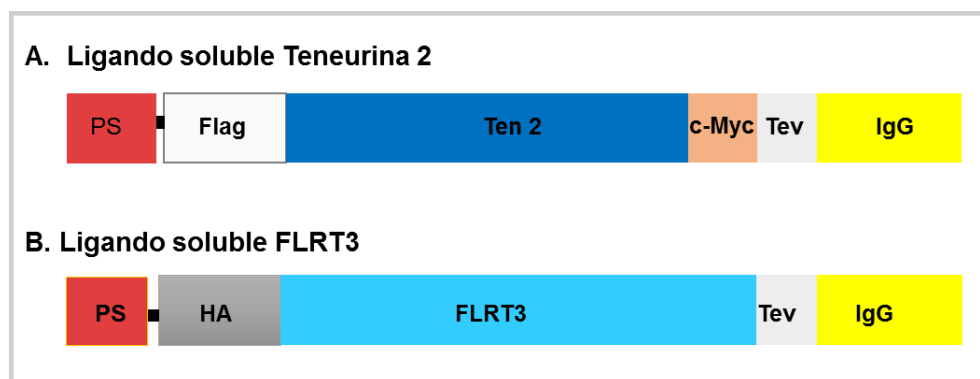


Figura 13. Características estructurales de los ligandos solubles IgTen2^{Flag-Tev} e IgFLR3^{HA,Tev}.

Tabla 11. Oligonucleótidos para la amplificación de Teneurina 2 y FLRT3.

Nombre	Dirección	Secuencia
TEN2	sentido	GATACGCGTATGGCCCGCTTG
TEN2	antisentido	ACGCGTCGACGCCCTGGAAATAAAG GTTCTCTCCCATCTCATTG
FLRT3	Sentido	GATACGCGTATGGAGACAGAC
FLRT3	antisentido	ACGCGTCGACGCCCTGGAAATAAAG GTTCTCCAAGGTAATTTGG

Tabla 12. Condiciones de amplificación de los ligandos solubles Teneurina 2 y FLRT3.

Etapas de amplificación	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	10 s	40
Alineamiento	5 s	
Extensión	1 m por kB	

5.4.4 Producción de los ligandos sintéticos

Para la producción de los ligandos generados previamente (apartado 5.4), se sembraron células HEK-293T en placas de 10 cm de diámetro con medio DMEM (GIBCO, 12100-061) suplementado con 10% de suero fetal bovino, SBF, 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina/anfotericina B) y L-Glutamina. Las células fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂, y cuando alcanzaron el 85% de confluencia fueron transfectadas con los plásmidos IgFLR3^{HA-Tev} e IgTen2^{Flag-Tev} por el método de precipitación con fosfato de calcio.

5.4.4.1 Transfección con fosfato de calcio

El medio de cultivo en el que se encontraban las células fue sustituido por 10 ml de medio DMEM con 25 µM de cloroquina 3 h antes de la transfección.

En el tubo A se mezclaron 30 µg de DNA, 408 µl de agua y 62 µl de fosfato de calcio 2 M; en el tubo B se colocaron 500 µl de solución salina

amortiguada con Hepes (HBS, 2X), pH 7.05 (composición: 8 g NaCl, 0.37 g KCl, 0.201 g Na₂HPO₄, 5 g Hepes, 1 g glucosa). Se adicionaron 500 µl del complejo del tubo A al tubo B gota a gota, manteniendo el tubo B en agitación constante. Después de mezclar, se colocó todo el contenido del tubo B sobre las células, gota a gota y se incubaron a 37°C en presencia de 5% de CO₂ durante 4 días.

5.4.5 Purificación de los ligandos sintéticos

El medio de cultivo donde se encontraban las células fue recuperado 4 días después de la transfección y se centrifugó a 10,000rpm durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se incubó en agitación por 24 h a 4°C, en presencia de inhibidores de proteasas 1X (Roche, 04693116001) y 100 µl de perlas de sefarosa unida a proteína A (Bio Visión, 6501-5), que tiene alta afinidad por la Fc de IgG. Después de la incubación, el medio se centrifugó a 5,000 rpm por 5 min para separar el complejo sefarosa-proteínas soluble. Las perlas se lavaron 3 veces a 4°C con 1 ml de PBS al que se agregó 50 mM de NaCl (pH 7.4), centrifugando en cada lavado durante 5 min a 5000 rpm. Finalmente, las perlas se resuspendieron en PBS.

La separación de los ligandos solubles de la proteína A unida a perlas de sefarosa, se realizó colocando cada una de las muestras sobre columnas de Pierce (ThermoScientific, 89868) y se resuspendieron en una solución que contiene Hepes 10 mM (pH 7.4) y MgCl₂ 4 M y se incubaron por 8 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en columnas del kit Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices con poros de 50 kDa. Para la eliminación del MgCl₂ y purificar los ligandos, se realizó diálisis (1:1'000,000) con una solución amortiguadora (50 mM Hepes-NaOH pH 7.4 y 10mM de NaCl), al final se recuperaron 50 µl del eluido, y las muestras se hirvieron por 5 min con la solución amortiguadora de carga (5X). La expresión de los ligandos se analizó por inmunodetección (*Western Blot*) y la cuantificación de proteínas se realizó por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% teñido con azul

de Coomassie. El contenido y la preparación de las soluciones utilizadas se indican a continuación:

- **Perlas de sefarosa:** Antes de utilizar las perlas se lavan para eliminar el medio de preservación en el que se encuentran. Se coloca una alícuota de 500 µl en un tubo y se lava tres veces con 1 ml de PBS frío agitando y centrifugando por 5 min a 4°C. Finalmente se mantienen en 400 µl de PBS a 4°C hasta el momento de utilizarlas.

- **Solución amortiguadora de carga:** Mezclar 0.77 g de ditioneitol (DTT), 1 g de SDS, 4 ml de Tris 1M (pH 6.8), 5 ml de glicerol y 0.05 g de azul de bromofenol. Aforar a 10 ml con agua destilada.

5.4.5.1 Cuantificación de proteínas

Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida (Biorad, 161-0101) al 8% y se corrieron en una cámara electroforética en presencia de buffer de corrida (1X), por 10 min a 70 V, seguido por 60 min a 110V. Adicionalmente se colocaron concentraciones de 0.5, 1 y 3 µg de BSA con la finalidad de comparar la cantidad obtenida de cada uno de los ligandos correspondientes. El gel se tiñó con azul de Coomassie (0.25 % de colorante azul de Coomassie, 50% de metanol y 10% de ácido acético).

- **Gel de poliacrilamida al 8%:** Se mezclaron 4.6 ml de agua, 2.7 ml de acrilamida al 30%, 1.5 M de tris (pH 8.8), 10% de SDS, 10% de persulfato de amonio (PSA), 0.006 ml de TEMED y se colocó en la cámara electroforética; después de su polimerización, se agregó sobre éste un gel concentrador que se preparó mezclando 2.7 ml de agua, 0.67 ml de acrilamida al 30%, 0.5 ml de Tris 1.5 M (pH 6.8), 0.04 ml de SDS al 10%, 0.04 ml de PSA al 10% y 0.004 ml de TEMED.

- **Solución amortiguadora de corrida 5X:** Se mezclaron 25mM de Tris-HCl, 250 mM de glicina y 50 ml de SDS al 10%, aforar a 1 L.

- **Tinción con azul de Coomassie:** El gel se colocó en un recipiente con el colorante azul de Coomassie, se calentó por 20 s en el horno de microondas y se incubó a temperatura ambiente por 40 min con agitación suave, se lavó con agua destilada y se adicionó solución I de desteñido (50% etanol y 10% de ácido acético), se calentó por 20 s en el horno de microondas y se incubó por 10 min a temperatura ambiente con agitación suave. Se retiró la solución I, se lavó con agua destilada y se agregó solución II de desteñido (10% de etanol y 5% de ácido acético) y se calentó por 20 s en el horno de microondas, se enjuago con agua de la llave.

5.4.5.2 Western Blot: Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 8% y se corrieron en una cámara electroforética en presencia de buffer de corrida (1X), por 10 min a 70 V, seguido por 60 min a 110V. Posteriormente se humedecieron en solución de transferencia, la membrana de nitrocelulosa (Biorad, 162-0115), el papel filtro y un par de cojines, los cuales se colocaron en la cámara de transferencia en orden específico (cojín/papel filtro/gel/membrana/papel filtro/cojín) en dirección al cátodo; se llenó la cámara con buffer de transferencia frío. Las muestras se transfirieron a 4°C durante toda la noche a 22 V. Después de la transferencia, se tiñó la membrana por 2 min con rojo de Ponceau (Sigma, 038K4359) para verificar que la transferencia se realizó con éxito. Se hicieron lavados con TBST para eliminar el colorante y posteriormente se bloqueó la membrana por 30 min con solución de bloqueo, se hicieron tres lavados con TBST IX. La membrana se incubó a 4°C durante toda la noche con un anticuerpo policlonal de cabra acoplado a peroxidasa de rábano (Fisher Scientific, 0855226) específico para la fracción constante de IgG humana presente en los ligandos solubles IgTen2^{Flag-Tev} e IgFLR3^{HA,Tev}. La membrana se lavó tres veces con TBST y se reveló para la visualización de las proteínas.

- **Revelado de placas:** La membrana se colocó en una placa de acetato y se le adicionó luminol en su superficie (sustrato quimioluminiscente de la peroxidasa de rábano), después de 35 s, se colocó una placa de revelado

sobre la membrana (AFGA, EVYJC). Se hicieron tres exposiciones a diferentes tiempos (1, 2 y 5 min). Las películas se colocaron en solución de revelado (AFGA, 138), se lavaron con agua de la llave, y se expusieron en un recipiente con solución fijadora (AFGA, 138) y se lavaron con agua de la llave.

- **Buffer de transferencia:** 3 g de tris-base, 14.4 g de glicina, 200 ml de metanol. Aforar a 1 L con agua destilada.
- **Rojo de Ponceau:** Contiene 5% de ácido acético y 0.1% de Ponceau.
- **Solución de bloqueo:** 5% de leche sin grasa, disuelta en buffer TBST.
- **TBST 10X:** Mezclar 12.1 g de Tris 10 mM, 58.4 g de NaCl 1M y 1% de Tween 20. Aforar a 1L

5.5 Expresión del receptor LPHN3 en células HEK-293T.

5.5.1 Selección de un sistema heterólogo para la transfección del receptor LPHN3

La expresión del receptor se realizó de manera transitoria en células eucariotas que permiten expresar al receptor de manera funcional (conservan las modificaciones post-traduccionales como la glicosilación). Se evaluaron dos líneas celulares, HEK-293 y HEK-293T.

5.5.2 Selección de un método de transfección del receptor LPHN3

Con la finalidad de seleccionar un método que permitiera la expresión eficaz del receptor LPHN3, se evaluó la eficacia obtenida utilizando lipofectamina 2000 y polietilenimina (PEI). Las células HEK-293T se transfectaron con el plásmido pCMV-PVF (proteína verde fluorescente) y el plásmido pCMV-CL1-mV, la eficacia de transfección se determinó por citometría de flujo 24 y 48 h después de la transfección.

Las células HEK-293T se cultivaron en placas de poliestireno de 6 pozos (3.38 cm²) con medio DMEM enriquecido (10% SBF y 1% de una solución de penicilina/estreptomicina) a 37°C en presencia de 5% de CO₂. Las células se prepararon 24 h antes de la transfección en condiciones de esterilidad y fueron transfectadas a una confluencia entre el 85-90%.

5.5.2.1 Transfección con Lipofectamina 2000

La transfección con Lipofectamina 2000 (Invitrogen, 11668-027) se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se preparó un complejo DNA:Lipofectamina 2000 (relación 1:3), se mezcló y se incubó por 20 min a temperatura ambiente; antes de la adición del complejo se cambió el medio en que se encontraban las células y se sustituyó por medio DMEM sin SBF y se adicionó cuidadosamente el complejo. Las células se incubaron por 4-6 h a 37°C. Posteriormente se sustituyó el medio en el que se encontraban las células por DMEM con SBF y se incubaron nuevamente a 37°C por 24 y 48 h en presencia de CO₂ al 5%.

5.5.2.2 Transfección con PEI

• Preparación de PEI

En un tubo de 50 ml se colocaron 25 mg de PEI (P.M. 25,000) de cadena lineal, se aforó a 25 ml con agua destilada y se agitó vigorosamente (vortex) hasta la disolución completa del PEI. La solución se filtró en membranas SFCA (acetato de celulosa libre de surfactante) con poros de 0.22 µm.

• Preparación del complejo

En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se mezclaron 420 µl de DMEM no suplementado, 7 µg de DNA plasmídico y 35 µl de PEI (1 mg/ml). El complejo se incubó por 30 min a 37°C, y se aforó a 1 ml con DMEM no suplementado.

- **Transfección**

Se aspiró el medio de cultivo de las células y se adicionó el complejo DMEM-DNA-PEI. Las células fueron incubadas por 30 min a 37°C en presencia de 5% de CO₂, posteriormente se agregó 1 ml de DMEM enriquecido con 20% de SBF y se incubaron a 37°C por 24 y 48 h.

5.5.2.3 Determinación de la eficacia de transfección por citometría de flujo

Las células se levantaron de las placas de cultivo utilizando 150 µl de tripsina por pozo e incubando por 2 min a 37°C. Las células se transfirieron a tubos de poliestireno estériles para analizarlas en el citómetro BD LSR Fortessa Cell Analyzer. La determinación de la fluorescencia se realizó utilizando el fluorocromo Fitc con espectro de absorción de 488 nm y espectro de emisión máxima a 530 nm. Los parámetros de lectura para cada una de las muestras fueron definidos utilizando células HEK-293T no transfectadas (Figura 14)

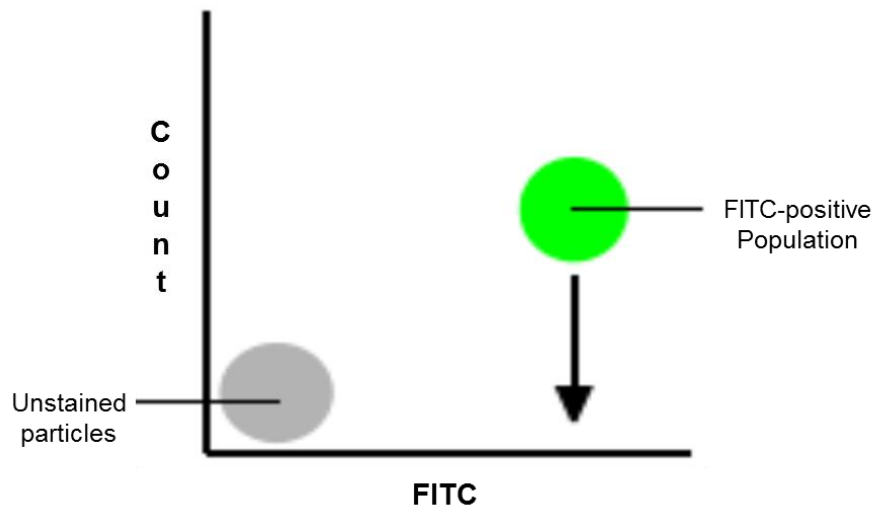


Figura 14. Parámetros de lectura por citometría de flujo. El área en color gris corresponde a células no transfectadas, y las poblaciones de células fuera de esta área corresponden a células transfectadas.

5.5.3 Expresión transitoria del receptor LPHN3 en células HEK-293T.

El plásmido pCMV-LPHN3^{Flag-HA} así como los mutantes pCMV-LPHN3^{FLAG-HA} A760G, pCMV-LPHN3^{FLAG-HA} D798H, pCMV-LPHN3^{FLAG-HA} S810L, pCMV-LPHN3^{FLAG-HA} E811Q y pCMV-LPHN3^{FLAG-HA} K561N fueron transfectados en células HEK-293T utilizando PEI (apartado 5.5.2.2).

Después de 48 h de transfección las placas se mantuvieron a -20°C por 30 min, y posteriormente se incubaron a 37°C por 30 s. Después las placas se colocaron sobre hielo y se adicionaron a cada muestra 200 µl de buffer de carga (5X) Las muestras se levantaron por raspado, se colocaron en tubos de 1.5 ml y se sonicaron por 30 s, antes de incubar a 37°C por 30 min en baño maría. Para el *Western Blot*, se cargó un volumen de 50 µl de cada una de las muestras en un gel de poliacrilamida al 8% y se corrieron en una cámara electroforética por 10 min a 70 V, seguido por 60 min a 110 V.

Se realizó la transferencia en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche a 22 V, después, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau para comprobar que la transferencia se realizó de forma adecuada. La membrana se destiñó con 3 lavados de 10 min cada uno con TBST. Posteriormente se incubó por 30 min con solución de bloqueo (5% de leche descremada en 20 ml de TBST) a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo monoclonal de conejo HA-Tag (Cell Signaling, 3724) para la detección de la bandera de hemaglutinina (HA) presente en los receptores. Al día siguiente se hicieron 3 lavados de 10 min con TBST a la membrana y se incubó por 60 min con el anticuerpo secundario (anti-conejo), se hicieron 3 lavados de 10 min cada uno con TBST 1X, finalmente se reveló la membrana para visualizar las proteínas presentes.

6. Resultados

6.1 Modelado molecular del receptor LPHN3 nativo y con las mutaciones de interés.

La reciente cristalización de los dominios estructurales GAIN²² y Lectina-Olfactomedina⁴¹ del receptor LPHN3, permitió realizar el modelado molecular de las mutaciones K561N, A760G, D798H, N344I, A247S del receptor LPHN3, utilizando la herramienta bioinformática Swiss-Pdb Viewer versión 4.1.⁵⁵ El dominio GAIN y el dominio de unión a hormona de LPHN1 de *Rattus norvegicus* fueron cristalizados por difracción de rayos X (Arac y cols., 2012).²² El número de acceso en el banco de datos de proteínas (PDB) es 4DLQ. A partir de la secuencia reportada, se identificaron los cambios generados por las mutaciones K561N, A760G y D798H (Fig. 15).

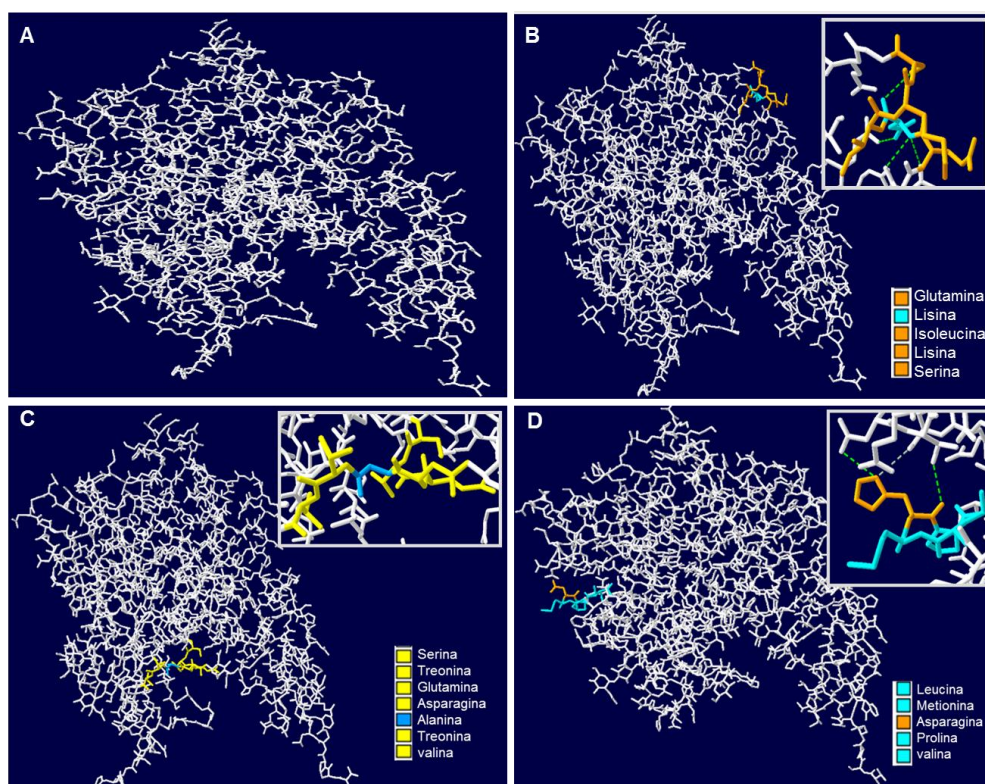


Figura 15. Estructura cristalizada del dominio GAIN y del dominio de unión a hormona de LPHN1 de *Rattus Norvegicus*. A) Estructura nativa. B) Mutación K561N. C) Mutación A760G. D) Mutación D798H.

Aunque esta secuencia no corresponde a LPHN3, fue posible la identificación antes mencionadas, debido a la alta homología entre las secuencias de LPHN1 de *Ratus norvegicus* y LPHN3 de *Homo sapiens*.

Los dominios de lectina y olfactomedina fueron cristalizados por difracción de rayos x (Jackson y cols., 2015).⁴¹ El número de acceso en el banco de datos de proteínas (PDB) es 5AFB. Los dominios cristalizados corresponden a LPHN3 de *Homo sapiens*, lo que permitió identificar las dos mutaciones localizadas en esta región, LPHN3-N344I y LPHN3-A247S (Fig. 16).

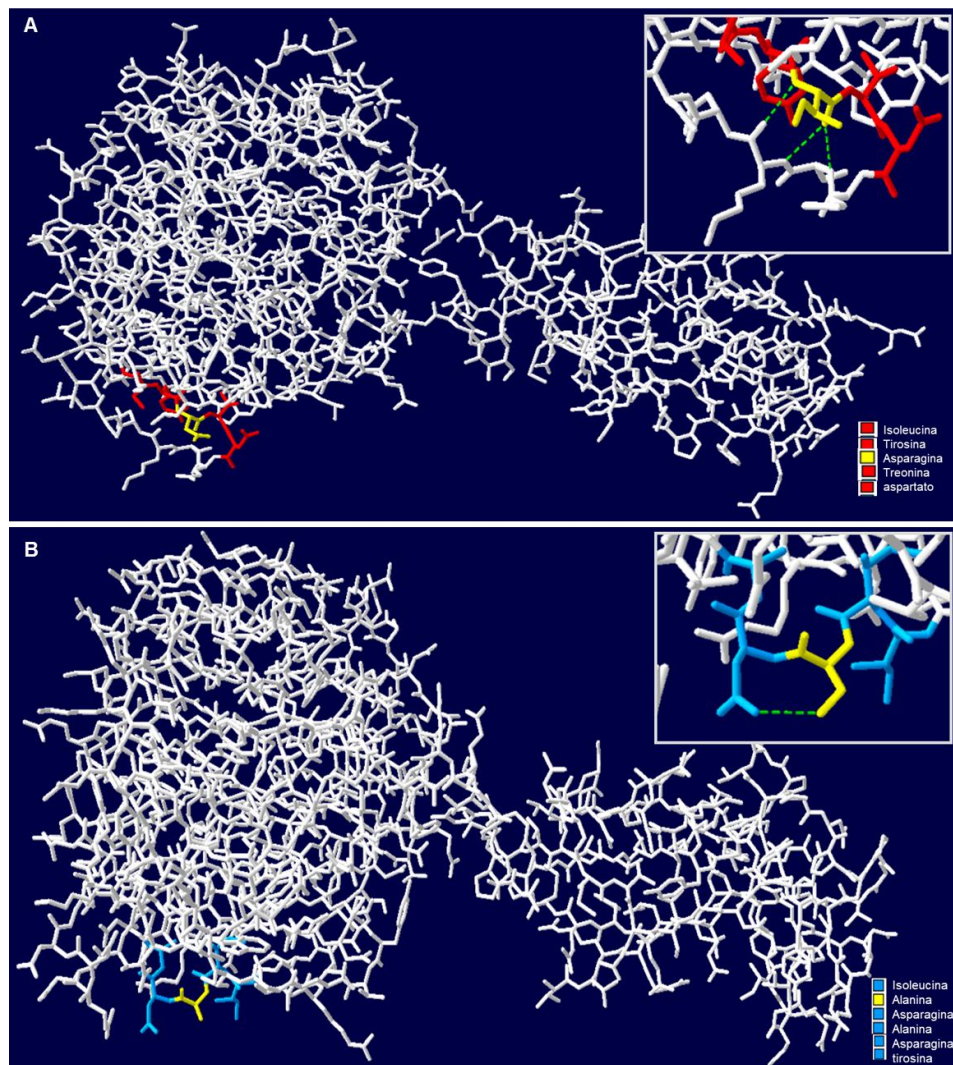


Figura 16. Estructura cristalizada del dominio lectina y del dominio de olfactomedina de LPHN3 de *Homo sapiens*. A) Mutación N344I. B) Mutación A247S.

6.2 Generación de las mutaciones puntuales A247S, R465Q, D615N, T783M y N344I en el gen que codifica al receptor LPHN3^{Flag-HA}.

Para generar las mutaciones propuestas se utilizó la estrategia de mutagénesis sitio dirigida por PCR y digestión con la endonucleasa DpnI. El diseño de nucleótidos con las mutaciones incorporadas en su secuencia permitió amplificar por una reacción de PCR al DNA plasmídico con la mutación en su secuencia, así como DNA bacteriano metilado y hemimetilado. El producto de la reacción se sometió a digestión por la endonucleasa DpnI, y se transformaron bacterias competentes *E. coli* DH5 α con el producto obtenido. En cada mutagénesis se incorporó un control positivo, así como un control negativo y en la Tabla 13 se muestra el promedio de los resultados obtenidos, después de inocular el producto obtenido de PCR en placas de agar/LB.

Tabla 13. Colonias obtenidas en la generación de mutaciones puntuales por mutagénesis sitio dirigida.

Muestra	Condición de la reacción	UFC
Tubo A	DNA + oligonucleótidos	50,000
Tubo B	DNA + oligonucleótido + DpnI	6,000
Control positivo	DNA	60,000
Control negativo	DNA + DpnI	Sin desarrollo

Se seleccionaron 10 colonias de la placa correspondiente al tubo B de cada una de las mutaciones, las cuales fueron resembradas en medio LB. Se realizó la extracción del DNA plasmídico⁵⁶ y para su caracterización se utilizaron las enzimas de restricción PvuI, BamHI y EcoRI. El análisis de restricción se realizó utilizando el programa Serial Cloner 2.6.1 y se determinó la generación de 4 fragmentos de distintos tamaños: 4488, 2658,

1058 y 881 pb. Los resultados obtenidos después de correr las muestras en un gel de agarosa al 0.8% se muestran en la fig. 17.

Estos resultados correspondían a los esperados, por lo que las muestras se secuenciaron con la finalidad de verificar la incorporación de las mutaciones correspondientes. Sin embargo, los resultados de las secuenciaciones correspondían a la secuencia de LPHN3 sin las mutaciones de interés, por lo que fue necesario implementar una segunda estrategia para generar las mutaciones.

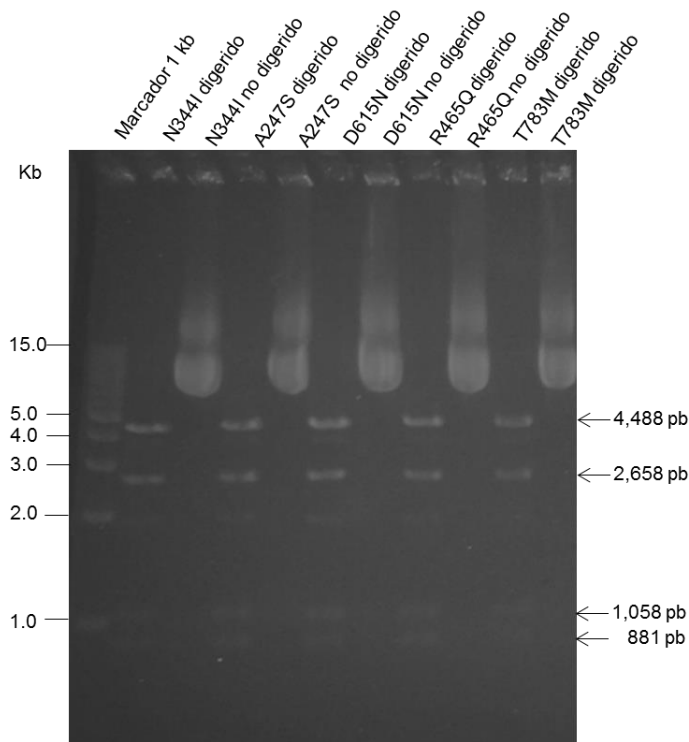


Figura 17. Análisis de restricción de las mutantes N344I, A247S, D615N, R465Q y T783M obtenidas por la estrategia de mutagénesis por PCR y digestión con DpnI. Se muestra un gel de agarosa al 0.8% después de la restricción con las enzimas PvuI, BamHI y EcoRI.

Para la mutagénesis por PCR de extensión sobrepuesta se realizó la amplificación de los fragmentos individuales en reacciones independientes debido a la diferencia de tamaños de cada uno de los fragmentos (Tabla 6). Los resultados obtenidos se muestran en la fig. 18 (A), observándose que los

fragmentos obtenidos corresponden a los esperados. Posteriormente, los fragmentos individuales obtenidos fueron utilizados en combinación con su fragmento complementario correspondiente (Tabla 9) para generar la amplificación de las mutantes A247S, R465Q, D615N, T783M y N344I de LPHN3^{Flag-HA}. La fig. 18 (B) muestra una imagen representativa de los fragmentos sobrepuestos de LPHN3 con las mutaciones que se consideraba tenían incorporado el cambio en la secuencia. Las muestras fueron secuenciadas; sin embargo, los resultados mostraron que la mutación no fue incorporada en la secuencia.

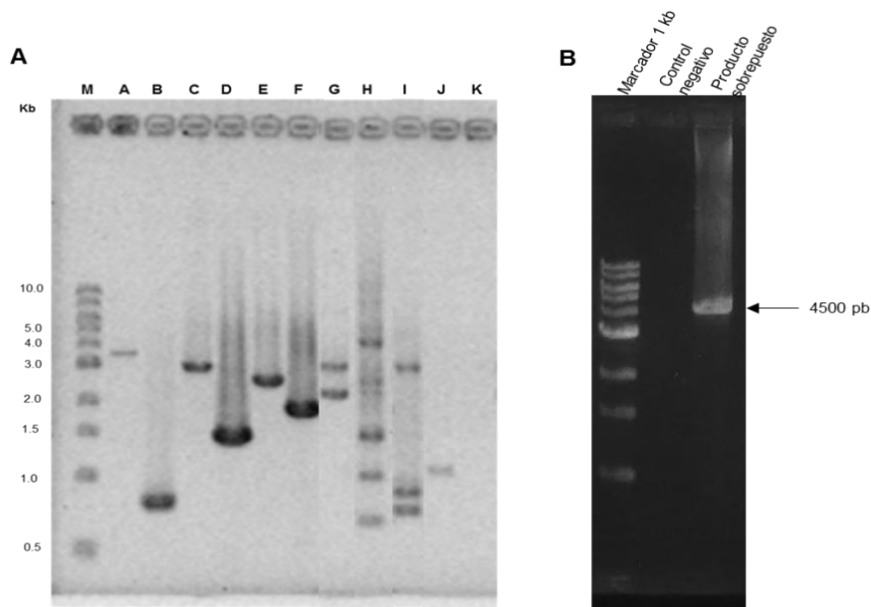


Figura 18. PCR de extensión sobrepuesta. A) Fragmentos individuales visualizados en gel de agarosa al 0.8%. B) Amplicón de LPHN3 con la mutación en su secuencia, generada por PCR de extensión sobrepuesta.

Con la finalidad de identificar porqué se obtenían las secuencias nativas de LPHN3, se realizaron cuatro reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos F1 y R2. En una reacción se utilizó el fragmento E, en otra reacción al fragmento F, otra reacción con el amplicón de 4507 pb correspondiente a LPHN3 y un control negativo. De manera interesante se observó la amplificación del fragmento de 4507 pb en las tres reacciones que

contenían DNA (Fig. 19). Estos resultados eran diferentes a los predichos ya que no se esperaba amplificación en las reacciones que contenían los fragmentos individuales. Para evitar problemas de contaminación, se consideró amplificar de nuevo los fragmentos individuales, purificar cada uno de éstos utilizando un kit (Promega) y posteriormente realizar la segunda reacción de PCR para generar el sobreposicionamiento de los fragmentos individuales purificados. Con la finalidad de evaluar su efectividad se secuenció el nuevo constructo generado para la mutación D615N y se observó el cambio incorporado en la secuencia que da lugar a esta mutante (Fig. 20). Actualmente se han generado las mutaciones D615N, A247S y R465Q empleando esta estrategia de mutagénesis (Fig 21).

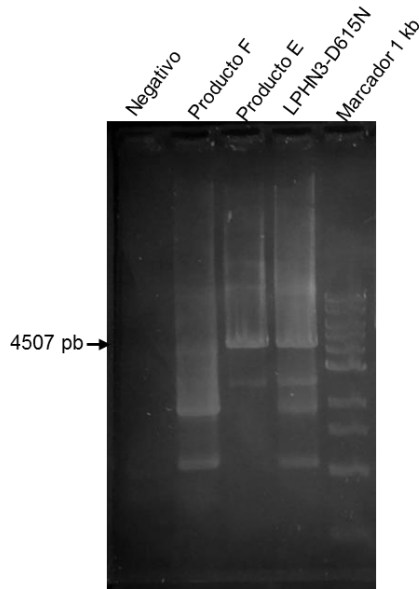


Figura 19. PCR de los fragmentos individuales E y F y del producto obtenido por PCR de extensión sobrepuesta sobrepuesto EF.

```

>D615N
TCGCTTTTAGTCTGGATGAATGACCACACACCTGCCAGTGCCTCTAGTCAGATTCTGCTCTGGAGGAATCATGCGAGG
CCGTGGAAGCTAGAGAGATCATGTGGTTTAAACCAGGCAGGGACAGATTGCAAAGCAGCCATGCCCTGCAGGAACAAT
CGGGGTGAGCACTTACCTGTGCCTGGCACCAGACGGAATCTGGGACCCCCAGGGACCAGACCTGAGCAATTGTTCAAG
CCCTTGGGTGAACCATATTACCCAGAAGCTGAAATCCGGCGAGACAGCAGCCAACATCGCTAGGGAAGTGGCAGAGCAG
ACCCGCAATCACCTGAACGCTGGAGATATCACATATAGCGTGAGAGCAATGGATCAGCTGGTCGGACTGTGGACGTGCA
GCTGCGCAATCTGACCCCTGGAGGCAAGACAGCGCCGCACGGTCCCTGAACAAGCTGCAGAAACGGGAAAGAAGCT
GCAGGGCCTACGTGCAGGCTATGGTGGAGACAGTCAACAATCTGCTGCAGCCACAGGCACTGAACGCTGGAGGGATC

```

Figura 20. Secuenciación de LPHN3-D615N generada purificando los fragmentos individuales para la amplificación del fragmento sobrepuesto.

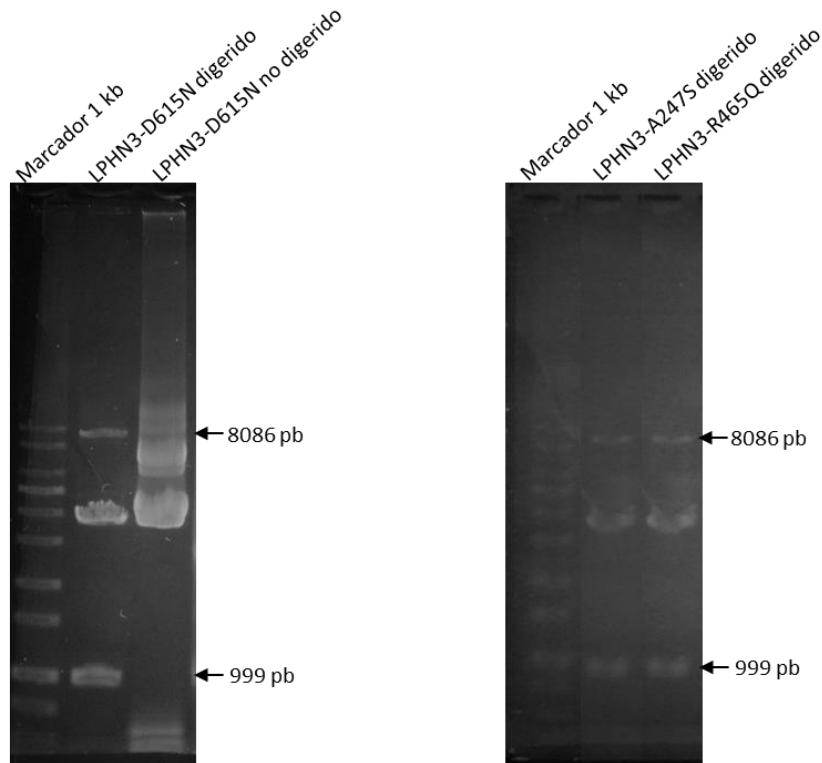


Figura 21. Análisis por restricción de los plásmidos que codifican para LPHN3 con las mutantes D615N, A247S, y R465Q. La digestión se realizó con las enzimas XhoI y XbaI.

6.3 Caracterización de los plásmidos con las mutaciones K561N, A760G, D798H, S810L y E811Q en el gen de LPHN3.

Los plásmidos K561N, A760G, D798H, S810L y E811Q se caracterizaron utilizando las enzimas de restricción XhoI, NotI y PvuI, para verificar su integridad. Después de la digestión de las muestras, se corrieron en un gel de agarosa al 0.8%, y se cargó el producto digerido y el producto no digerido de cada una de las muestras. Las bandas obtenidas de 4,836, 1,665, 1,526 y 1,058 pb corresponden al patrón de bandas predicho por el análisis bioinformático con el programa Serial Cloner, indicando la integridad adecuada de los plásmidos antes mencionados (Fig. 22).

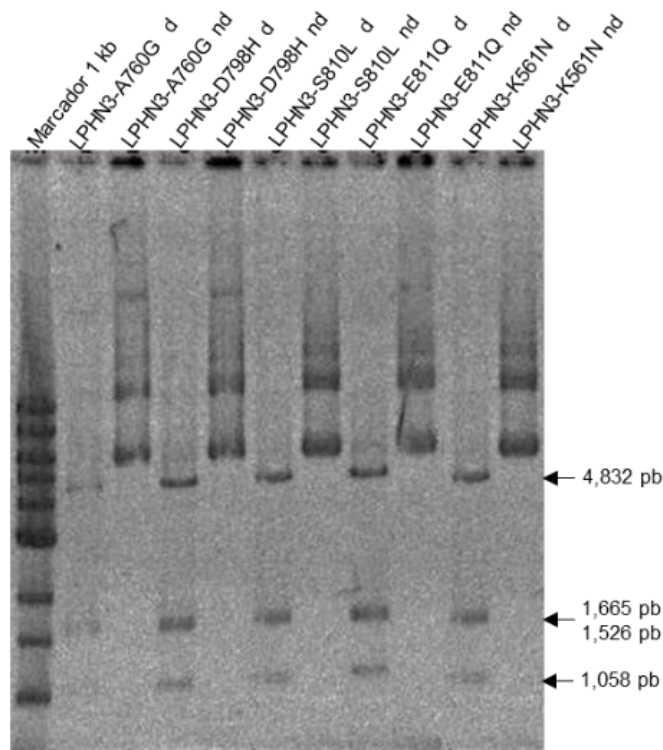


Figura 22. Análisis por restricción de los plásmidos que codifican para LPHN3 con las mutaciones A760G, D798H, S810L, E811Q y K561N. Gel de agarosa al 0.8%. d, digerido; nd, no digerido.

6.4 Generación de los ligandos sintéticos

Para la obtención de Teneurina 2 soluble, el plásmido pcDNA3-LassoB-Flag-Myc se restringió con las enzimas Bgl II y Xba 1, que generaron fragmentos de 4453, 3037, 2135, 1052, 1050, 648, 233 y 53 pb (Fig. 23A). El plásmido pDisplay-FLRT3, que contiene la secuencia completa de FLRT3, se restringió con las enzimas EcoRI y XhoI, generando fragmentos de 4974, 1082, 538 y 208 pb (Fig. 23A). El plásmido pCMV-Ig-Bai-3.2, que se usará como vector para la obtención de los constructos finales de expresión de los ligandos solubles, se restringió con las enzimas Sall y MluI, generándose los fragmentos de 5936 y 2271 pb (Fig. 23B).

Los productos restringidos fueron utilizados como DNA molde para la amplificación de los nuevos constructos solubles con las características mencionadas en los apartados 5.4.1.1 y 5.4.1.2 utilizando los oligonucleótidos que se ilustran en la tabla 11. Los fragmentos obtenidos corresponden a 7236 pb y 1649 pb para Teneurina 2 y FLRT3, respectivamente (Fig. 23C).

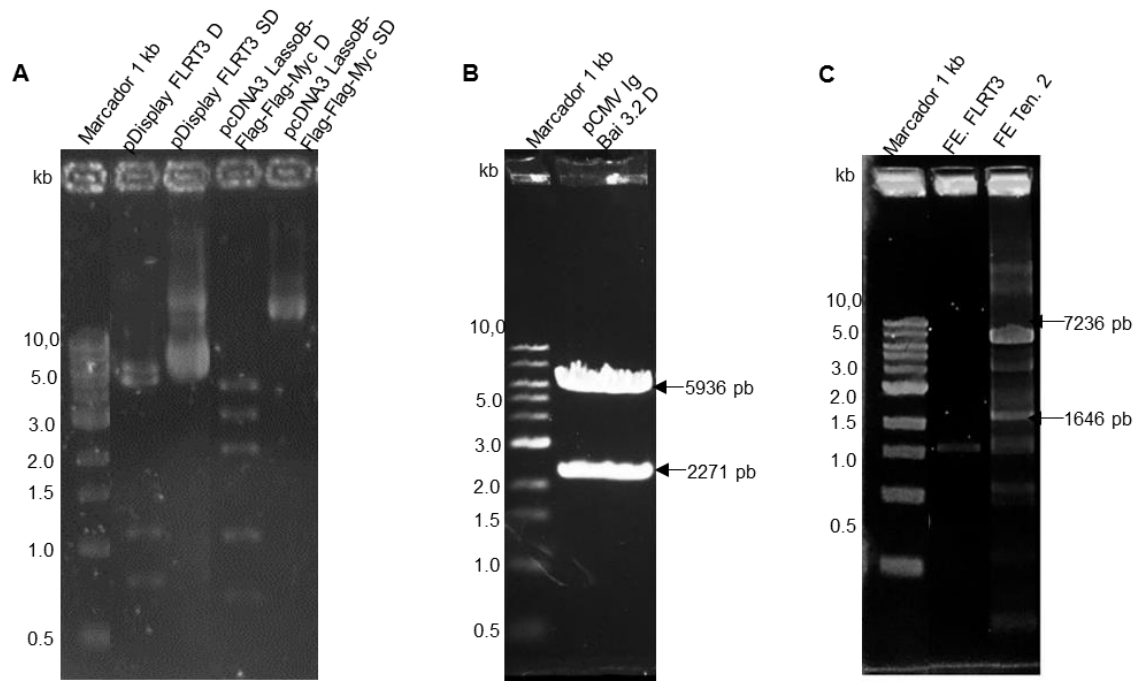


Figura 23. Plásmidos para la generación de los ligandos sintéticos. A. Restricción de los plásmidos pDisplay FLRT3 y pcDNA LassoB para generar los ligandos Teneurina 2 y FLRT3 B. Restricción del plásmido pCMV-Ig-Bai-3.2 digerido. C) Amplificación de Teneurina 2 y FLRT3 solubles.

Utilizando el plásmido pCMV-Ig-Bai-3.2 restringido y las nuevas amplificaciones obtenidas para Teneurina 2 y FLRT3, se realizaron las ligaciones entre los insertos y el vector. Bacterias DH5- α se transformaron con los productos obtenidos, y se realizó la extracción y la purificación del DNA plasmídico. Para verificar que el ADN obtenido correspondía a las nuevas construcciones IgFLRT3^{HA-TEV} e IgTen2^{Flag-TEV}, se realizaron restricciones con las enzimas Sal1 y EcoR1. Las bandas obtenidas para IgFLRT3^{HA-TEV} fueron de 5918, 907 y 746 pb y para IgTen2^{Flag-TEV} se obtuvieron bandas de 5918, 3439, 2882, 657 (Fig. 24). En ambos casos los productos obtenidos correspondían a los esperados.

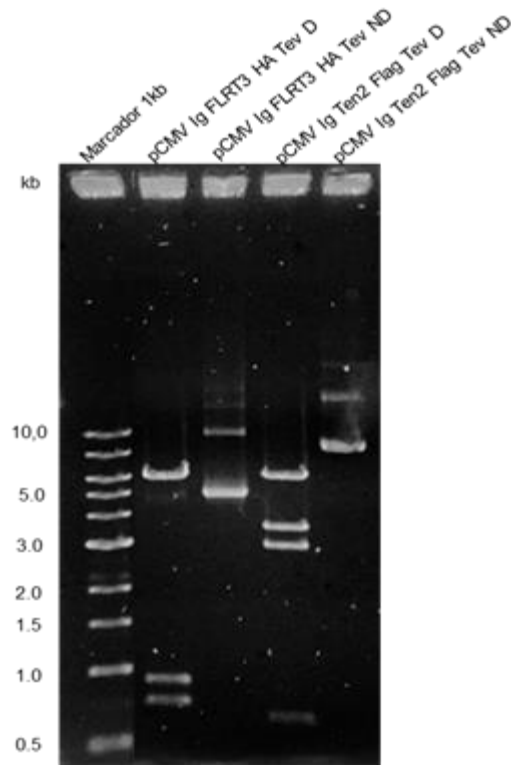


Figura 24. Plásmidos solubles generados: IgFLRT3^{HA-TEV} para FLRT3 e IgTen2^{Flag-TEV} para Teneurina 2 (D digerido, ND no digerido) en gel de agarosa al 1%.

Los nuevos plásmidos generados fueron secuenciados para comprobar que las secuencias poseen las características necesarias para la producción de los plásmidos solubles. Las secuencias mostraron que los ligandos solubles se generaron de forma adecuada (Figuras 25 y 26).


```

ATGGTGGATTCTGTGTGACGACTGTCCTCGTTACCTCTGCTACCCAAGATTACAAGGATGACG
ACGATAAAGGAGGCCAGGATCCCGCGTATTTTCATAGCAATGCATCTGCTCGGACTCAATTGG
CAACTCCAGCCTGCAGATGGGCACACCTTTAACAAATGGGATAAGGACCGGCTTACCAGGAAA
CGATGATGTGGCAACAATGCCATCTGGAGGCAAAGTGCCCTGGTCGTTGAAAAACAGCAGCA
TAGACAGTGGTGAAGCAGAAGTTGGTCGGCGGGTAACACAAGAAGTCCCACCAGGGGTGTTT
TGGAGGTCACAAATTCACATCAGTCAGCCCCAGTTCTTAAAGTTCAACATCTCCCTCGGGAAG
GACGCTCTCTTTGGTGTTCACATAAGAAGAGGACTTCCACCATCTCATGCCAGTATGACTTC
ATGGAACGTCTGGACGGGAAGGAGAAGTGGAGTGTGGTTGAGTCTCCCAGGGAACGCCGGA
GCATACAGACCTTGGTTCAGAATGAAGCCGTGTTTGTGCAGTACCTGGATGTGGGCCTGTGG
CATCTGGCCTTCTACAATGATGGAAAAGACAAAGAGATGGTTTCCTTCAACTGTTGTCTTA
GATTCAGTGCAGGACTGTCCACGTAACGCCATGGGAATGGTGAATGTGTGTCCGGGGTGTG
TCACTGTTTCCCAGGATTTCTAGGAGCAGACTGTGCTAAAGCTGCCTGCCCTGTCTGTGCA
GTGGGAATGGACAATATTCTAAAGGGACGTGCCAGTGCTACAGCGGCTGGAAAGGTGCAGA
GTGCGACGTGCCATGAATCAGTGATCGATCCTTCCCTGCGGGGGCCACGGCTCCTGCATT
GATGGGAAGTGTGTCTGCTCTGCTGGCTACAAAGGCGAGCACTGTGAGGAAGTTGATTGCTT
AGATCCCACCTGCTCCAGCCACGGAGTCTGTGTGAATGGAGAATGCCTGTGCAGCCCTGGCT
GGGGTGGTCTGAACTGTGAGCTGGCGAGGTCCAGTGCCAGACCAGTGCAGTGGCATGGC
AACGTACCTGCCCTGACACGGGCCTCTGCAGCTGCGATCCCAAAGTGAATGGATTCCGACT
GGCTCTGTTGGAAGGTGGTGTCTCAGTAGAACCTTTGTGTGGCCAACTTCCAACG

```

Figura 25. Secuencia de nucleótidos correspondientes a Teneurina-2 en el plásmido IgTen2^{Flag-Tev}. La primera sección (color negro) corresponde al péptido señal, seguido del epítipo FLAG (color rojo) y de sitios de reconocimiento para enzimas de restricción (color azul). El resto de la secuencia (color negro) corresponde a la región extracelular de Teneurina 2. La proteína que corresponde a la parte extracelular de Teneurina 2 se conforma de 2613 aa.

```

GTATGGGAATGCTGCTCTGGGTTCAAGTTCACCTGGTGAATCCATATGATGTTCCAGATTA
TGCTGGGGCCCAGCCGGCCAGATCTTGTCCATCTGTGTGTCGCTGCGATGCGGGTTCATTT
ACTGTAATGATCGCTTTCTGACATCCATTCCAACAGGAATACCAGAGGATGCTACAACTCTCT
ACCTTCAGAACAAACCAATAAATAATGCTGGGATTCCTTCAGATTTGAAAACTTGTGAAAGT
AGAAAGAATATACCTATACCACAACAGTTTAGATGAATTTCCACCAACCTCCCAAGTATGTA
AAAGAGTTACATTTGCAAGAAAATAACATAAAGGACTATCACTTATGATTCACTTTCAAAAATTC
CTATCTGGAAGAATTACATTTAGATGACAACCTCTGTCTCTGCAGTTAGCATAGAAGAGGGAGC
ATTCCGAGACAGCAACTATCTCCGACTGCTTTTCTGTCCCCTAATCACCTTAGCACAAATTC
CTGGGGTTTGGCCAGGACTATAGAAGAACTACGCTTGGATGATAATCGCATATCCACTATTTT
ATCACCATCTCTTCAAGGTCTCACTAGTCTAAAACGCCTGGTTCTAGATGGAAACCTGTTGAA
CAATCATGGTTTAGGTGACAAAAGTTTCTTCAACCTAGTTAATTTGACAGAGCTGTCCCTGGTG
CGGAATCCCTGACTGCTGCACCAGTAAACCTTCCAGGCACAAACCTGAGGAAGCTTTATCTT
CAAGATAACCACATCAATCGGGTGCCCCCAAATGCTTTTCTTATCTAAGGCAGCTCTATCGA
CTGGATATGTCCAATAATAACCTAAGTAATTTACCTCAGGGTATCTTTGATGATTTGGACAATA
TAACACAACCTGATTCTTCGCAACAATCCCTGGTATTGCGGGTGCAAGATGAAATGGGTACGTG
ACTGTTACAATCACTACCTGTGAAGGGTCAACGTGCGTGGGCTCATGTGCCAAGCCCCAGA
AAAGGTTCCGTGGATGGCTATTAAGGATCTCAATGCAGACTGTTTGATTGTAAGACAGTTGGAT
GTAGCACCATTAGATACCCTGCCATTACCCACACAGTGAATCCCTGCCTAGGACCAGGT
GGCCCAGCCTTCCAGTTGTAGC

```

Figura 26. Secuencia de nucleótidos correspondientes a FLRT3 (*Homo Sapiens*) contenida en el plásmido IgFLRT3^{HA-TEV}. La primera región de la secuencia (color negro) corresponde al péptido señal, seguido del epítipo HA (color rojo), de sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción (color verde), y el resto de la secuencia corresponde a la región extracelular de FLRT3 (color negro). La región extracelular de FLRT3 se conforma de 750 aa.

6.4.1 Expresión de los ligandos solubles

Para la obtención de ligandos sintéticos se realizaron pruebas preliminares transfectando células HEK-293 y células HEK-293T con los plásmidos solubles generados previamente codificantes de Teneurina 2 y FLRT3. Las células fueron transfectadas por el método de fosfato de calcio y la purificación de las proteínas se realizó 4 días después de la transfección. A estas proteínas se les realizó electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con azul de Coomassie (Figura 27). La expresión de los plásmidos fue diferente en los dos tipos de células evaluadas. La expresión de IgTen2^{Flag-Tev} (292 KDa) sólo se observó en las células HEK-293, mientras que las células HEK-293T expresaron además IgFLRT3^{HA-TEV} (87.78 kDa) así como el control de transfección (IgG, 26.05 KDa). La cantidad de expresión de cada una de las proteínas se evaluó con una curva de albúmina. Las células HEK-293 produjeron ~0.1 µg/µl de un volumen total de 50 µl; mientras que las células HEK-293T produjeron ~0.5 µg/µl de FLRT3 y ~0.8 µg/µl de Teneurina-2 soluble de un volumen total de 50 µl.

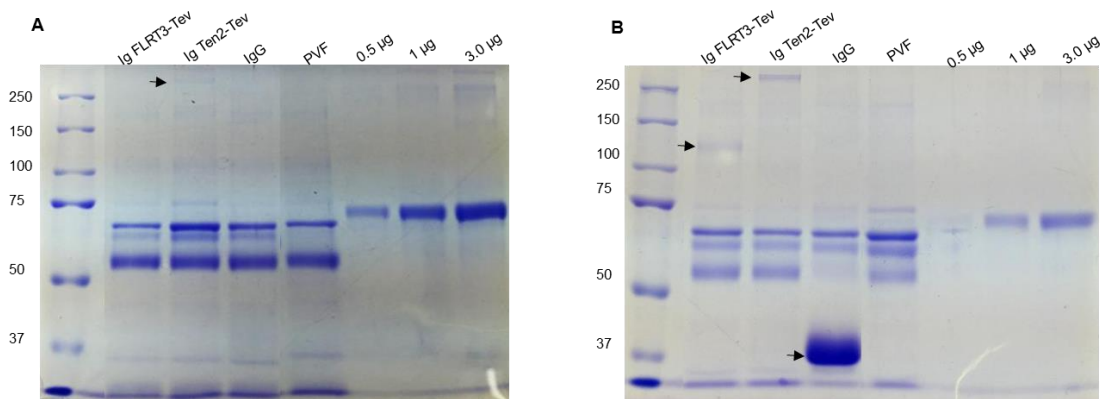


Figura 27. Gel de poliacrilamida que muestra los ligandos solubles para IgFLRT3^{HA-TEV} e IgTen2^{Flag-Tev}. A) Ligandos obtenidos por transfección de células HEK-293, las cuales solo expresaron a teneurina. B) Ligandos solubles obtenidos por transfección de células HEK-293T, las cuales expresaron a IgFLRT3^{HA-TEV}, IgTen2^{Flag-Tev}, y el control de transfección (IgG). En ambos gels se corrió una curva de albúmina para evaluar la expresión proteica.

La identidad de las proteínas se comprobó por inmunodetección (*Western Blot*) utilizando un anticuerpo anti-IgG, observándose la expresión de IgFLRT3^{HA-TEV} (87.7 KDa que se observó en ~112 KDa por probable glicosilación de la proteína) e IgTen2^{Flag-TEV}, (292.3 KDa) así como el control positivo IgG (Fig. 28).

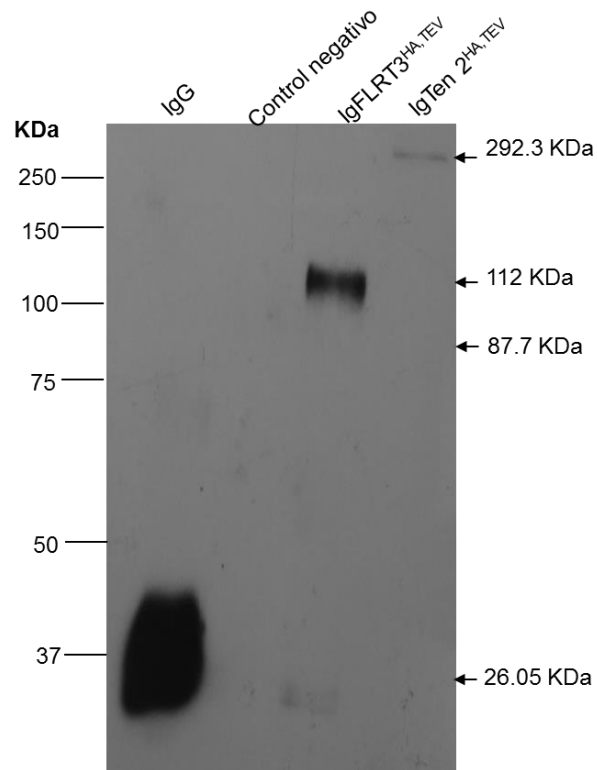


Figura 28. Inmunodetección de los ligandos solubles IgFLRT3^{HA-TEV} e IgTen2^{Flag-TEV} utilizando el anticuerpo Anti-IgG

6.5 Expresión del receptor LPHN3 en células HEK-293T.

6.5.1 Selección de un método de transfección para el receptor LPHN3

Se evaluaron dos métodos diferentes de transfección, utilizando PEI y lipofectamina 2000. Inicialmente se utilizaron células HEK-293T transfectadas con el plásmido pCMV-eGFP y la eficacia de transfección se evaluó por citometría de flujo. Los citogramas obtenidos 24 h después de la transfección se muestran en la figura 29, en la Tabla 14 se muestra el

promedio de 3 determinaciones a las 24 y 48 h después de la transfección. Donde se observa que con PEI la eficacia de transfección mejoró notablemente a las 48 h. Con lipofectamina 2000 se obtuvo una alta eficacia de transfección tanto a las 24 h como a las 48 h post-transfección.

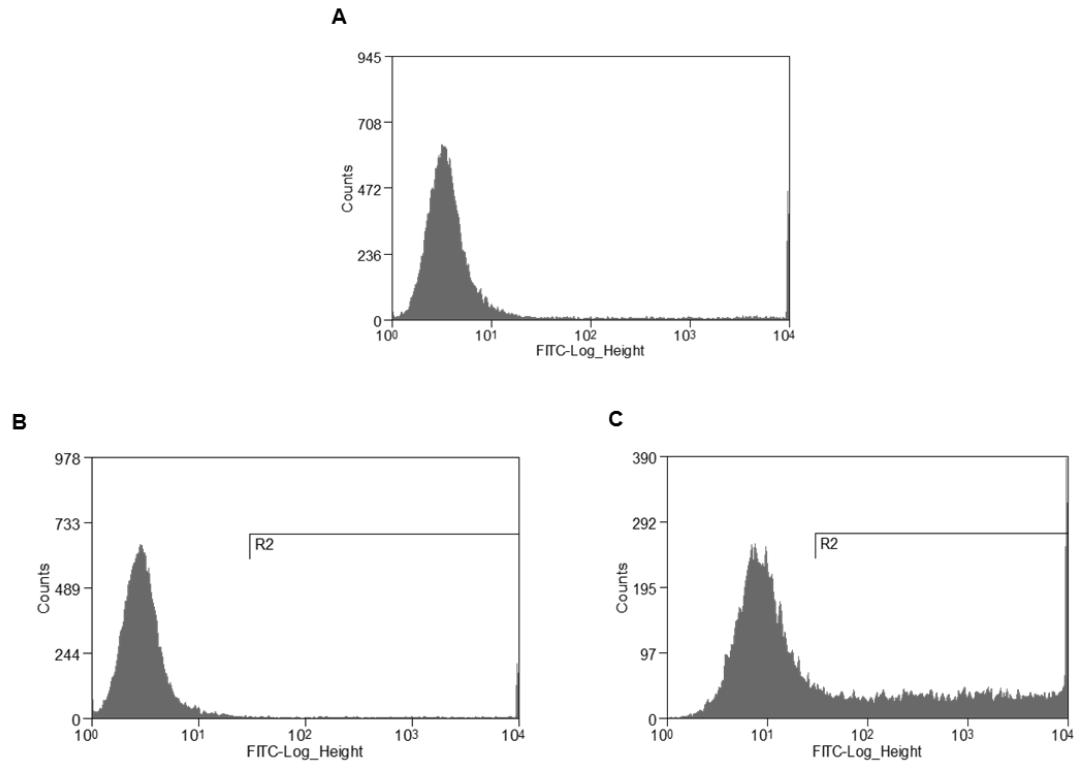


Fig. 29 Citogramas obtenidos por la transfección de células HEK-293T con el plásmido pCMV-eGFP a las 24 h después de la transfección. A) Células sin transfectar. B) Transfección con PEI. C) Transfección con lipofectamina 2000. La región señalada como R2 indica la población positiva para la PVF.

Tabla 14. Transfección de células HEK-293T.

Tiempo	PEI 2.5 µg DNA	Lipofectamina 2000 4 µg DNA
24 h	8.1 ± 1.8%	49.6 ± 0.3%
48 h	25.7 ± 2.5%	51.1 ± 3.7%

Los datos corresponden al promedio ± el error estándar (e.e.) de 3 determinaciones.

Aunque la lipofectamina mostró la mayor eficacia de transfección, con PEI la eficacia mejoró notablemente a las 48 h y tomando en cuenta la relación costo-beneficio, se decidió optimizar el método de transfección con PEI, determinando la eficacia a las 48 h post-transfección y utilizando diferentes concentraciones de DNA. Adicionalmente se realizaron cambios en la preparación de PEI, que se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Modificaciones en la preparación de PEI.

Características	Preparación inicial	Nueva preparación
Concentración	1 mg/ml	1 mg/ml
Disolvente	H ₂ O	PBS, pH 4.5
Disolución	Pulsos de 10 s calentando en microondas	Baño maría (70-80°C) y agitación vigorosa
Almacenamiento	4°C, protegido de la luz	4°C, protegido de la luz

6.5.2 Optimización del método de transfección con PEI.

Se transfectaron células HEK-293T con el plásmido pCMV-eGFP que codifica la proteína verde fluorescente y con el plásmido pCMV-CL1-mV que codifica el receptor latrofilina 1 con la proteína Venus monomérica fusionada, empleando 1.4, 3.5 y 7 µg de DNA (Figuras 30 y 31); la solución de PEI se preparó con las nuevas condiciones, mencionadas en la tabla 15. La eficacia de transfección se determinó por citometría de flujo a las 48 h post-transfección. En la Tabla 16 se muestran los valores obtenidos del promedio de tres determinaciones, observándose que la eficacia de transfección de ambos plásmidos fue alta, la transfección con el plásmido pCMV-eGFP una eficacia mayor al 70% utilizando las diferentes concentraciones de DNA (Fig. 30). Para el plásmido pCMV-CL1-mV se observaron cambios en la eficacia de transfección utilizando 1.4 y 3.5 µg de DNA (Fig 31). Sin embargo, para

las concentraciones de 3.5 y 7.0 μg de DNA no se observaron cambios significativos; por lo tanto, para la transfección del receptor LPHN3, que tiene una alta homología con LPHN1, se utilizaron 3.5 μg de DNA para su transfección en células HEK-293T.

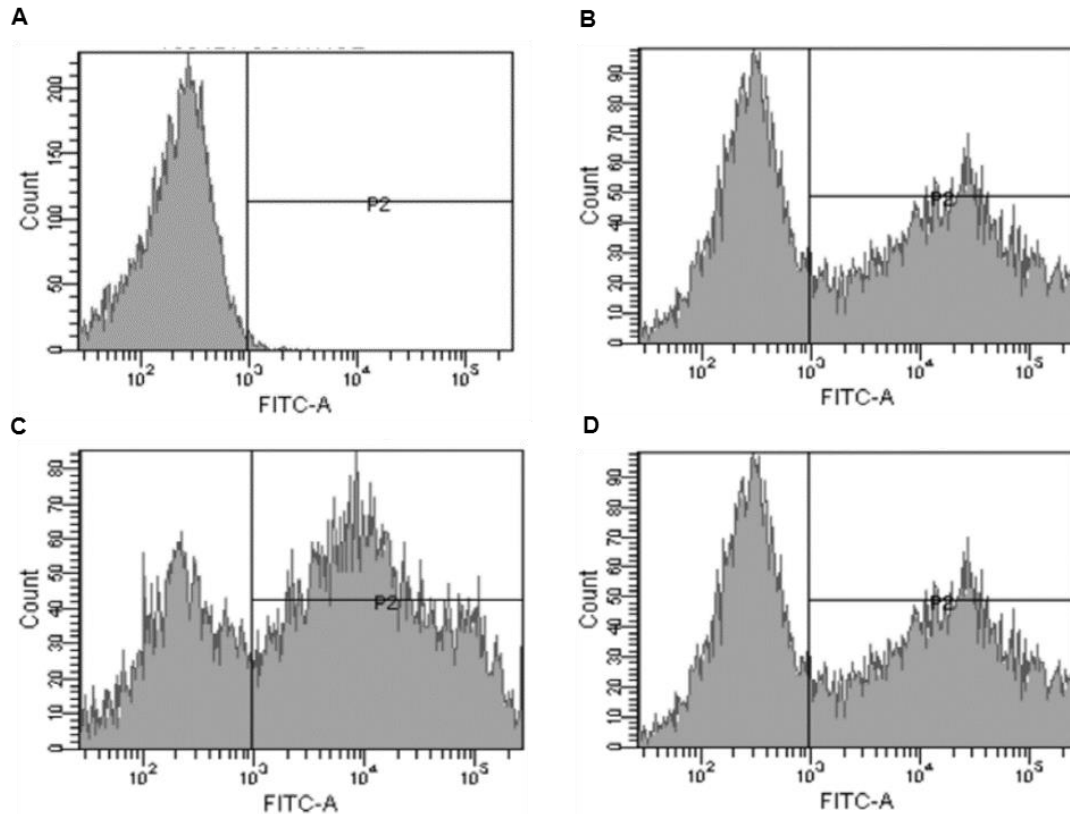


Fig. 30 Citogramas para la transfección de células HEK-293T con el plásmido pCMV-eGFP después de la optimización del método de transfección. A) Células sin transfectar. B) 1.4 μg de DNA. C) 3.5 μg de DNA. D) 7.0 μg de DNA. El eje de las Y corresponde al número de eventos leídos; el eje de las X está dividido en una región correspondiente a células no transfectadas y una región de células que se han transfectado con el plásmido pCMV-eGFP.

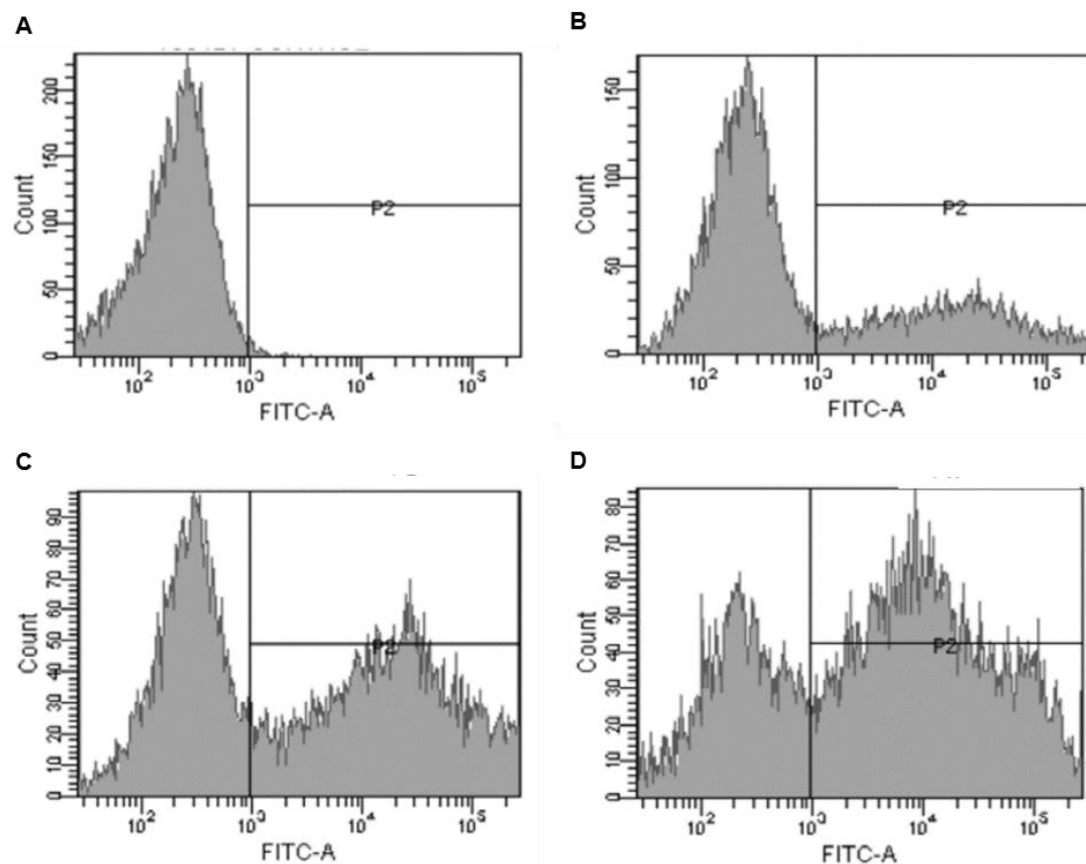


Fig. 31 Citogramas para la transfección de células HEK-293T con el plásmido pCMV-CL1-mV después de la optimización del método de transfección. A) Células sin transfectar. B) 1.4 µg de DNA. C) 3.5 µg de DNA. D) 7.0 µg de DNA. El eje de las Y corresponde al número de eventos leídos; el eje de las X está dividido en una región correspondiente a células no transfectadas y una población positiva para la LPHN1 con proteína venus monomérica fusionada.

Tabla 16. Eficacia de transfección en células HEK-293T a las 48 h post-transfección

DNA	PVF	VENUS-LPHN1
1.4	70 ± 7%	26 ± 4
3.5	75 ± 1 %	51 ± 7
7	70 ± 3 %	56 ± 4

Los valores corresponden al promedio ± e.e. de tres determinaciones.

6.5.3 Expresión transitoria del receptor LPHN3 en células HEK-293T.

Para comprobar la expresión del receptor LPHN3^{Flag,HA} nativo así como de las mutantes LPHN3^{Flag,HA}-A760G, LPHN3^{Flag,HA}-D798H, LPHN3^{Flag,HA}-S810L, LPHN3^{Flag,HA}-E811Q y LPHN3^{Flag,HA}-K561N, los plásmidos correspondientes fueron transfectados en células HEK-293T utilizando PEI. Finalmente las muestras fueron procesadas como se indica en la Metodología (apartado 5.5.3) para realizar *Western blot* utilizando el anticuerpo monoclonal de conejo anti-HA. Todos los receptores de LPHN3 se expresaron de forma eficaz (fig. 32). Como control positivo se utilizaron células transfectadas con la glicoproteína asociada a mielina soluble (IgMAG) fusionada a IgG y que tiene la bandera HA (~88 KDa) y como control negativo se utilizaron células HEK-293T no transfectadas.

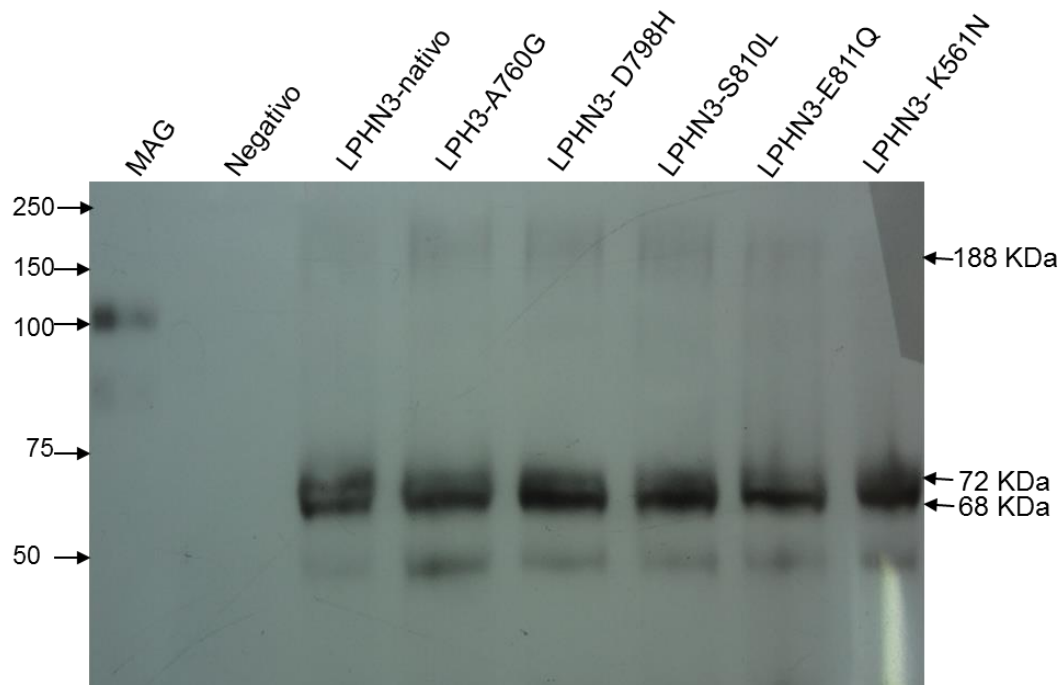


Figura 32. *Western blot* del receptor LPHN3^{Flag-HA} nativo y con las mutaciones A760G, D798H, S810L, E811Q y K561N empleando el anticuerpo monoclonal de conejo anti-HA.

Las imágenes de Western blot muestran dos bandas, de 188 KDa y 68 KDa, estas bandas fueron reportadas por Arac y cols. (2012);²² y corresponden a la proteína completa LPHN3 (188 KDa) y a la región N-terminal de la proteína escindida (68 KDa). Adicionalmente se observó una banda de ~72 KDa, la cual se reportó con anterioridad como un estado de glicosilación del receptor LPHN3 (Volynski y cols., 2004).¹⁰

7. Discusión

7.1 Modelado molecular del receptor LPHN3 nativo y con las mutaciones de interés.

La información disponible en el banco de datos de proteínas (PDB) permitió realizar el modelado molecular del receptor LPHN3 en presencia de las mutaciones con la finalidad de observar los cambios conformacionales generados en el receptor, utilizando el programa Swiss-Pdb Viewer versión 4.1. En este proyecto se abordan diez mutaciones, de las cuales sólo fue posible realizar el modelado de cinco de las mutaciones de interés para este proyecto (K561N, A760G, D798H, N344I, A247S del receptor LPHN3). Como se indica en la tabla 1, siete de las mutaciones de interés se ubican en el dominio GAIN del receptor.

Los dominios GAIN y de unión a hormona de LPHN1 fueron cristalizados por difracción de rayos X por Arac y cols. en el año 2012.²² Sin embargo, aunque LPHN1 tiene una alta homología con LPHN3 la secuencia reportada corresponde a la rata (*Rattus norvegicus*), razón por la que no fue posible identificar las regiones correspondientes a la ubicación de las mutaciones D615N, T783M, S810L y E811Q dentro del dominio GAIN. La mutación D615N se encuentra ubicada en la región rica en serinas y treonina, la cual no ha sido reportada en la actualidad, por lo que no fue posible realizar el modelado. Las mutaciones A247S y N344I se han identificado en el dominio de olfactomedina. Este dominio junto con el dominio de Lectina fueron recientemente cristalizados por difracción de rayos X (Jackson y cols., 2015).⁴¹ Los dominios cristalizados corresponden a LPHN3 de *Homo sapiens*, por lo que fue posible identificar las dos mutaciones localizadas en esta región y realizar el modelado de las mismas.

El cambio de aminoácidos dentro de una secuencia que codifica para una proteína puede o no tener repercusiones en su expresión y/o función. El cambio generado en la mutación N344I se debe a la sustitución de una

asparagina, un aminoácido polar sin carga, por una Isoleucina, un aminoácido no polar. Este cambio genera interacciones débiles en tres regiones en la superficie del receptor, sin embargo aún no ha sido reportado el efecto generado por este cambio. En la mutación A760G ocurre un cambio de los aminoácidos no polares alanina y glicina, sin ningún cambio aparente en el receptor. La mutación D798H ocurre por la sustitución de aspartato por histidina en la posición 798; esta mutación es la que genera el mayor cambio con respecto a las demás abordadas en este proyecto, ya que involucra el cambio de una carga negativa por una carga positiva. El modelado molecular reveló la generación de diferentes puntos de interacción en la superficie del receptor. La mutación K561N involucra el cambio de un aminoácido con carga positiva, lisina, por el aminoácido asparagina un aminoácido polar sin carga, observándose la formación de varios puntos de interacción en la superficie del receptor.

La mutación A247S involucra el cambio de una alanina (no polar) por una serina (polar) en la posición 247; al modelar la mutación se identificó un cambio estructural aparente, con la generación de un enlace débil con otra región extracelular del receptor. De manera interesante, Yue y cols. (2015) reportaron que la mutación A247S es de gran relevancia, dado que el cambio se ubica en la interface de unión de LPHN3 con su ligando FLRT3 y en consecuencia la mutación puede generar un defecto en la interacción entre ambas proteínas⁵⁸, tal como ocurre con la mutación R196C y A278P/T.

Se ha propuesto que la presencia de estas mutaciones en la superficie del receptor podrían modificar la afinidad del receptor hacia sus ligandos, por lo que sería de gran interés evaluar en futuros estudios la interacción de los ligandos IgTen2^{Flag-TEV} e IgFLRT3^{HA-TEV} con el receptor LPHN3, nativo y con cada una de las mutaciones.

7.2 Generación de las mutaciones puntuales A247S, R465Q, D615N, T783M y N344I en el gen de LPHN3.

Para la generación de las mutaciones puntuales A247S, R465Q, D615N, T783M y N344I en el gen de LPHN3, inicialmente se utilizó un método de mutagénesis sitio dirigida empleando la enzima DpnI; no obstante, cuando se analizó la secuencia de cada uno de los receptores se identificó que las mutaciones no habían sido incorporadas en la secuencia del receptor LPHN3.

Se ha reportado que la eficacia de mutagénesis empleando este método es 40-90%; sin embargo, este porcentaje se alcanza utilizando *kits* comerciales como *QuikChange®Site-Directed Mutagenesis Kit*. Dado que son mutaciones con el cambio de una sola base, el análisis con enzimas de restricción no puede indicar la inserción de la mutación en la secuencia. El método que se implementó en este proyecto no es un método comercial y no estaba estandarizado, a lo cual puede atribuirse que las secuencias no hayan incorporado las mutaciones. Por tanto fue necesario implementar un método alternativo de amplificación por PCR de extensión sobrepuesta para obtener los receptores mutantes.

Para esta estrategia se realizó la amplificación inicial de dos fragmentos complementarios entre sí; cada uno de estos fragmentos tiene incorporada la mutación en su secuencia, y utilizando los productos de estas PCR iniciales se amplificó el fragmento de 4507 pb correspondiente a LPHN3. Sin embargo, al analizar las secuencias se observó que las mutaciones no habían sido incorporadas, por lo que se realizó una prueba que consistió en tres reacciones de PCR independientes, utilizando diferente DNA en cada reacción, una con el fragmento E, otra con el fragmento F, y otra reacción con el producto obtenido de ambos fragmentos sobrepuestos (4507 pb). Los resultados obtenidos indicaron que había contaminación del DNA molde en la reacción de PCR que se utilizó para generar los productos sobrepuestos, a

lo que puede atribuirse que la mutación no estuviera presente en las muestras que se secuenciaron.

Por lo anterior se decidió amplificar los fragmentos individuales, los productos de la PCR se corrieron en geles de agarosa al 0.8% y se purificaron; posteriormente se utilizaron para amplificar el fragmento de 4507 pb. La secuenciación de este fragmento permitió confirmar la mutación D615N en LPHN3, y actualmente se han generado también las mutaciones A247S y R465Q las cuales no han sido confirmadas por secuenciación y se continúa con esta estrategia de amplificación para la generación de las mutaciones T783M y N344I.

7.3 Caracterización de los plásmidos con las mutaciones K561N, A760G, D798H, S810L y E811Q en el gen de LPHN3.

La integridad de estos plásmidos, generados previamente,²² se confirmó por ensayos de restricción. Las muestras ya habían sido secuenciadas previamente, por lo que no fue necesario realizar este análisis.

7.4 Generación de ligandos sintéticos solubles.

Los ligandos solubles sintéticos para LPHN3, IgTen2^{Flag-TEV} e IgFLRT3^{HA-TEV}, fueron generados implementando estrategias moleculares. Los ligandos solubles estaban fusionados a la Fc de la IgG de humano con la finalidad de poder purificar estas proteínas de forma sencilla y rápida, y de analizar su expresión por inmunodetección. El sitio de corte por la proteasa Tev se incorporó a la secuencia de los ligandos solubles para separar la región que corresponde a la porción extracelular de los ligandos, dado que existe la posibilidad de que la Fc de IgG pudiera generar interferencia en los ensayos

funcionales de interacción ligando-receptor. La obtención de la secuencia deseada de los ligandos se confirmó por secuenciación.

Los ligandos solubles IgTen2^{Fla-TEV} e IgFLRT3^{HA-TEV} fueron transfectados en dos líneas celulares distintas, HEK-293 y HEK-293T, con la finalidad de determinar la expresión de las proteínas. La presencia de estas proteínas se determinó en un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie y pudo establecerse que mientras las células HEK-293T expresan ambos ligandos IgTen2^{Flag-TEV} e IgFLRT3^{HA-TEV}, las células HEK-293 solo expresan a IgTen2^{Flag-TEV}. La diferencia en la expresión de proteínas puede deberse a las diferencias metabólicas entre ambas líneas celulares.

Las células HEK-293T contienen el gen que codifica para el antígeno T de SV40 (Simian Vacuolating Virus 40 TAg); este antígeno tiene la capacidad de unirse a proteínas supresoras tumorales como p53 y p150 bloqueándolas y evitando que las células entren en la fase G1 del ciclo celular (fase de preparación para la replicación) pasando directamente a la fase S (fase de replicación), permitiendo que la célula pase por un mayor número de ciclos celulares y por lo tanto también que el plásmido transfectado se amplifique en mayor cantidad promoviendo una mayor expresión de proteínas.

De manera interesante tanto en el gel teñido con azul de Coomassie como en los ensayos de *Western blot* la proteína IgFLRT3^{HA-TEV} tuvo una migración relativa de ~120 KDa cuando se esperaba que la banda correspondiente a esta proteína fuera de 87.7 KDa. Al respecto, se considera que la diferencia entre la banda esperada y la obtenida se debe a la glicosilación de la proteína. Recientemente Lu y cols. reportaron la identificación de un sitio de glicosilación en el residuo N226.⁵⁸ Adicionalmente el análisis de la secuencia de FLRT3 reveló que los residuos N282, N508, N555, N626 y N633 son sitios blanco de N-glicosilación.

7.5 Expresión transitoria de los receptores de LPHN3 nativo y con las mutaciones de interés en células HEK-293T.

Los receptores LPHN3 nativo y con las mutaciones A760G, D798H, S810L, E811Q y K561N se expresaron de forma adecuada en las células HEK-293T. El método de transfección fue optimizado para lograr una alta expresión del receptor.

Los resultados obtenidos (Fig. 31), muestran la banda de 188 KDa correspondiente a la proteína completa LPHN3, y una banda de 68 KDa que corresponde a la región extracelular C-terminal de LPHN3, producida por la escisión en el dominio GAIN. Las bandas de 188 y 68 KDa fueron observadas en todas las muestras, lo cual es consistente con lo reportado por Arac y cols., quienes mostraron que la escisión en el dominio GAIN no es afectada por la presencia de las mutaciones A760G, D798H, S10L, E811Q y K561N²². Adicionalmente cuando se realizó el *Western blot* para el receptor LPHN3 nativo, así como con cada una de las mutantes, se observó una banda adicional de ~72 KDa en todas las muestras. Esta banda corresponde al estado glicosilado de la proteína; el sitio potencial de N-glicosilación ha sido identificado por el análisis de la secuencia de LPHN3 en el residuo N1100.

7.6 Optimización de la transfección con PEI

Con la finalidad de obtener un método que permitiera la expresión eficaz del receptor, se evaluaron dos métodos de transfección, uno basado en el uso de PEI y otro utilizando lipofectamina 2000. Ambos métodos de transfección se evaluaron por citometría de flujo a las 24 y 48 h después de la transfección de células HEK-293T con el plásmido pCMV-eGFP. Los resultados obtenidos mostraron que la transfección con Lipofectamina 2000 es eficaz a las 24 y a las 48 h (49% a las 24 h, 51% a las 48 h). La

transfección con PEI mejoró notablemente a las 48 h (8.1% a las 24 h, 25% a las 48 h).

Aunque la lipofectamina inicialmente mostró la mayor eficacia de transfección, PEI mostró una mejoría notable a las 48 h, por lo que tomando en cuenta la relación costo-beneficio, se decidió optimizar el método de transfección con PEI. Se realizaron cambios, los cuales se indican en la Tabla 15, basados en estudios publicados con anterioridad.⁵⁹

Se considera que la modificación de mayor relevancia fue el cambio del solvente de PEI, inicialmente se utilizó agua y se cambió por PBS; dado que el PBS en el que se disolvió el PEI tiene un pH de 4.5, permite ceder sus protones a los nitrógenos libres de las aminas secundarias que contiene el PEI, evitando su oxidación y por tanto le proporciona mayor estabilidad. Los resultados obtenidos mostraron una notable mejoría en la eficacia de transfección con PEI a las 48 h. Adicionalmente se realizaron ensayos empleando diferentes concentraciones de DNA (1.4, 3.5 y 7 μg), transfectando células HEK-293T con los plásmidos pCMV-eGFP y pCMV-CL1-mV. Las células transfectadas con pCMV-eGFP mostraron una eficacia del 70% con las tres concentraciones utilizadas de DNA, mientras que la transfección con pCMV-CL1-mV mostró una eficacia de transfección del 50% utilizando 3.5 y 7 μg de DNA.

Los resultados obtenidos nos permitieron expresar de forma eficaz al receptor 48 h después de la transfección utilizando células HEK-293T transfectadas con PEI, empleando 3.5 μg de DNA, considerándose además que el método optimizado es económico y fácil de realizar.

8. Conclusiones

1. El modelado molecular indica que algunas de las mutaciones modifican las interacciones intramoleculares en el receptor de Lphn3.
2. Se generaron mutaciones (D615N, A247S y R465Q) en los receptores de Lphn3 por PCR de extensión sobrepuesta.
3. Se caracterizaron los receptores Lphn3 mutados previamente generados.
4. Se generaron los ligandos solubles IgTen2^{Flag-TEV} e IgFLRT3^{HA-TEV} específicos para la interacción con LPHN3.
5. Se seleccionó y optimizó un método eficaz de transfección para la expresión del receptor LPHN3 en células HEK-293T.

9. Perspectivas

A. A corto plazo

Optimizar la purificación de los ligandos solubles.

B. A mediano y largo plazo

1. Evaluar la interacción ligando-receptor de los receptores Lphn3 nativo y con cada una de las mutaciones generadas.
2. Realizar ensayos funcionales para determinar la vía de señalización activada por el receptor LPHN3.
3. Determinar el efecto de la expresión de LPHN3 WT y de cada una de las mutaciones en la expresión y señalización del receptor Lphn3 en células HEK-293T.

10. Bibliografía

1. Cimino G. (1999). **Reticular theory versus neuron theory in the work of Camillo Golgi**. *Physica Riv Int Stor Sci.* 36, (2): 431-72.
2. De Carlos JA, and Borrell J. (2007). **A historical reflection of the contributions of Cajal and Golgi to the foundations of neuroscience**. *Brain Res Rev.* 55, (1): 8-16.
3. Margeta MA, and Shen K. (2010). **Molecular mechanisms of synaptic specificity**. *Mol Cell Neurosci.* 43, (3): 261-7.
4. Missler M, Sudhof TC, and Biederer T. (2012). **Synaptic cell adhesion**. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4, (4): a005694.
5. Ritter SL, and Hall RA. (2009). **Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins**. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10, (12): 819-30.
6. Taleisnik S, **Receptores celulares y la transducción de señales**. *Temas de Biología Celular*: Editorial Brujas.
7. Bear MF, Connors BW, and Paradiso MA, **Neuroscience: Exploring the Brain**. 2007: Lippincott Williams & Wilkins 3: 690-702.
8. Strokes N, and Piao X. (2010). **Adhesion-GPCRs in the CNS**. *Adv Exp Med Biol.* 706, 87-97.
9. Tesmer JJ. (2012). **A GAIN in understanding autoproteolytic G protein-coupled receptors and polycystic kidney disease proteins**. *EMBO J.* 31, (6): 1334-5.
10. Volynski KE, Silva JP, Lelianova VG, Atiqur Rahman M, Hopkins C, and Ushkaryov YA. (2004). **Latrophilin fragments behave as independent proteins that associate and signal on binding of LTX(N4C)**. *EMBO J.* 23, (22): 4423-33.
11. Lin HH, Stacey M, Yona S, and Chang GW. (2010). **GPS proteolytic cleavage of adhesion-GPCRs**. *Adv Exp Med Biol.* 706, 49-58.
12. Bohnekamp J, and Schoneberg T. (2011). **Cell adhesion receptor GPR133 couples to Gs protein**. *J Biol Chem.* 286, (49): 41912-6.
13. Mogha A, Benesh AE, Patra C, Engel FB, Schoneberg T, Liebscher I, and Monk KR. (2013). **Gpr126 functions in Schwann cells to control**

differentiation and myelination via G-protein activation. J Neurosci. 33, (46): 17976-85.

14. Liebscher I, Schon J, Petersen SC, Fischer L, Auerbach N, Demberg LM, Mogha A, Coster M, Simon KU, Rothmund S, Monk KR, and Schoneberg T. (2014). **A tethered agonist within the ectodomain activates the adhesion G protein-coupled receptors GPR126 and GPR133.** Cell Rep. 9, (6): 2018-26.

15. Davletov BA, Shamotienko OG, Lelianova VG, Grishin EV, and Ushkaryov YA. (1996). **Isolation and biochemical characterization of a Ca²⁺-independent alpha-latrotoxin-binding protein.** J Biol Chem. 271, (38): 23239-45.

16. Krasnoperov VG, Beavis R, Chepurny OG, Little AR, Plotnikov AN, and Petrenko AG. (1996). **The calcium-independent receptor of alpha-latrotoxin is not a neurexin.** Biochem Biophys Res Commun. 227, (3): 868-75.

17. Sugita S, Ichtchenko K, Khvotchev M, and Sudhof TC. (1998). **alpha-Latrotoxin receptor CIRL/latrophilin 1 (CL1) defines an unusual family of ubiquitous G-protein-linked receptors. G-protein coupling not required for triggering exocytosis.** J Biol Chem. 273, (49): 32715-24.

18. Matsushita H, Lelianova VG, and Ushkaryov YA. (1999). **The latrophilin family: multiply spliced G protein-coupled receptors with differential tissue distribution.** FEBS Lett. 443, (3): 348-52.

19. Petrenko AG, Kovalenko VA, Shamotienko OG, Surkova IN, Tarasyuk TA, Ushkaryov Yu A, and Grishin EV. (1990). **Isolation and properties of the alpha-latrotoxin receptor.** EMBO J. 9, (6): 2023-7.

20. Knipper M, Madeddu L, Breer H, and Meldolesi J. (1986). **Black widow spider venom-induced release of neurotransmitters: mammalian synaptosomes are stimulated by a unique venom component (alpha-latrotoxin), insect synaptosomes by multiple components.** Neuroscience. 19, (1): 55-62.

21. Silva JP, and Ushkaryov YA. (2010). **The latrophilins, "split-personality" receptors.** Adv Exp Med Biol. 706, 59-75.
22. Arac D, Boucard AA, Bolliger MF, Nguyen J, Soltis SM, Sudhof TC, and Brunger AT. (2012). **A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoproteolysis.** EMBO J. 31, (6): 1364-78.
23. Boucard AA, Maxeiner S, and Sudhof TC. (2014). **Latrophilins function as heterophilic cell-adhesion molecules by binding to teneurins: regulation by alternative splicing.** J Biol Chem. 289, (1): 387-402.
24. O'Sullivan ML, Martini F, von Daake S, Comoletti D, and Ghosh A. (2014). **LPHN3, a presynaptic adhesion-GPCR implicated in ADHD, regulates the strength of neocortical layer 2/3 synaptic input to layer 5.** Neural Dev. 9, 7.
25. O'Sullivan ML, de Wit J, Savas JN, Comoletti D, Otto-Hitt S, Yates JR, 3rd, and Ghosh A. (2012). **FLRT proteins are endogenous latrophilin ligands and regulate excitatory synapse development.** Neuron. 73, (5): 903-10.
26. White GR, Varley JM, and Heighway J. (1998). **Isolation and characterization of a human homologue of the latrophilin gene from a region of 1p31.1 implicated in breast cancer.** Oncogene. 17, (26): 3513-9.
27. Meza-Aguilar DG, and Boucard AA. (2014). **Latrophilins updated.** Biomol Concepts. 5, (6): 457-78.
28. Krasnoperov V, Lu Y, Buryanovsky L, Neubert TA, Ichtchenko K, and Petrenko AG. (2002). **Post-translational proteolytic processing of the calcium-independent receptor of alpha-latrotoxin (CIRL), a natural chimera of the cell adhesion protein and the G protein-coupled receptor. Role of the G protein-coupled receptor proteolysis site (GPS) motif.** J Biol Chem. 277, (48): 46518-26.
29. Lelianova VG, Davletov BA, Sterling A, Rahman MA, Grishin EV, Totty NF, and Ushkaryov YA. (1997). **Alpha-latrotoxin receptor, latrophilin, is a**

novel member of the secretin family of G protein-coupled receptors. J Biol Chem. 272, (34): 21504-8.

30. Rahman MA, Ashton AC, Meunier FA, Davletov BA, Dolly JO, and Ushkaryov YA. (1999). **Norepinephrine exocytosis stimulated by alpha-latrotoxin requires both external and stored Ca²⁺ and is mediated by latrophilin, G proteins and phospholipase C.** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 354, (1381): 379-86.

31. Tobin AB. (2008). **G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom.** Br J Pharmacol. 153 Suppl 1, S167-76.

32. Trinidad JC, Barkan DT, Gullledge BF, Thalhammer A, Sali A, Schoepfer R, and Burlingame AL. (2012). **Global identification and characterization of both O-GlcNAcylation and phosphorylation at the murine synapse.** Mol Cell Proteomics. 11, (8): 215-29.

33. Tobaben S, Sudhof TC, and Stahl B. (2000). **The G protein-coupled receptor CL1 interacts directly with proteins of the Shank family.** J Biol Chem. 275, (46): 36204-10.

34. Kreienkamp HJ, Zitzer H, Gundelfinger ED, Richter D, and Bockers TM. (2000). **The calcium-independent receptor for alpha-latrotoxin from human and rodent brains interacts with members of the ProSAP/SSTRIP/Shank family of multidomain proteins.** J Biol Chem. 275, (42): 32387-90.

35. Arcos-Burgos M, Jain M, Acosta MT, Shively S, Stanescu H, Wallis D, Domene S, Velez JI, Karkera JD, Balog J, Berg K, Kleta R, Gahl WA, Roessler E, Long R, Lie J, Pineda D, Londono AC, Palacio JD, Arbelaez A, Lopera F, Elia J, Hakonarson H, Johansson S, Knappskog PM, Haavik J, Ribases M, Cormand B, Bayes M, Casas M, Ramos-Quiroga JA, Hervas A, Maher BS, Faraone SV, Seitz C, Freitag CM, Palmason H, Meyer J, Romanos M, Walitza S, Hemminger U, Warnke A, Romanos J, Renner T, Jacob C, Lesch KP, Swanson J, Vortmeyer A, Bailey-Wilson JE, Castellanos FX, and Muenke M. (2010). **A common variant of the latrophilin 3 gene,**

LPHN3, confers susceptibility to ADHD and predicts effectiveness of stimulant medication. Mol Psychiatry. 15, (11): 1053-66.

36. Xing Y, Nakamura Y, and Rainey WE. (2009). **G protein-coupled receptor expression in the adult and fetal adrenal glands.** Mol Cell Endocrinol. 300, (1-2): 43-50.

37. Silva JP, Lelianova VG, Ermolyuk YS, Vysokov N, Hitchen PG, Berninghausen O, Rahman MA, Zangrandi A, Fidalgo S, Tonevitsky AG, Dell A, Volynski KE, and Ushkaryov YA. (2011). **Latrophilin 1 and its endogenous ligand Lasso/teneurin-2 form a high-affinity transsynaptic receptor pair with signaling capabilities.** Proc Natl Acad Sci U S A. 108, (29): 12113-8.

38. Collins MO, Husi H, Yu L, Brandon JM, Anderson CN, Blackstock WP, Choudhary JS, and Grant SG. (2006). **Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome.** J Neurochem. 97 Suppl 1, 16-23.

39. Lacy SE, Bonnemann CG, Buzney EA, and Kunkel LM. (1999). **Identification of FLRT1, FLRT2, and FLRT3: a novel family of transmembrane leucine-rich repeat proteins.** Genomics. 62, (3): 417-26.

40. Seiradake E, del Toro D, Nagel D, Cop F, Hartl R, Ruff T, Seyit-Bremer G, Harlos K, Border EC, Acker-Palmer A, Jones EY, and Klein R. (2014). **FLRT structure: balancing repulsion and cell adhesion in cortical and vascular development.** Neuron. 84, (2): 370-85.

41. Jackson VA, del Toro D, Carrasquero M, Roversi P, Harlos K, Klein R, and Seiradake E. (2015). **Structural basis of latrophilin-FLRT interaction.** Structure. 23, (4): 774-81.

42. Qian X, Barsyte-Lovejoy D, Wang L, Chewpoy B, Gautam N, Al Chawaf A, and Lovejoy DA. (2004). **Cloning and characterization of teneurin C-terminus associated peptide (TCAP)-3 from the hypothalamus of an adult rainbow trout (Oncorhynchus mykiss).** Gen Comp Endocrinol. 137, (2): 205-16.

43. Woelfle R, D'Aquila AL, Pavlovic T, Husic M, and Lovejoy DA. (2015). **Ancient interaction between the teneurin C-terminal associated peptides (TCAP) and latrophilin ligand-receptor coupling: a role in behavior.** *Front Neurosci.* 9, 146.
44. Doyle SE, Scholz MJ, Greer KA, Hubbard AD, Darnell DK, Antin PB, Klewer SE, and Runyan RB. (2006). **Latrophilin-2 is a novel component of the epithelial-mesenchymal transition within the atrioventricular canal of the embryonic chicken heart.** *Dev Dyn.* 235, (12): 3213-21.
45. Langenhan T, Promel S, Mestek L, Esmaili B, Waller-Evans H, Hennig C, Kohara Y, Avery L, Vakonakis I, Schnabel R, and Russ AP. (2009). **Latrophilin signaling links anterior-posterior tissue polarity and oriented cell divisions in the *C. elegans* embryo.** *Dev Cell.* 17, (4): 494-504.
46. Kan Z, Jaiswal BS, Stinson J, Janakiraman V, Bhatt D, Stern HM, Yue P, Haverty PM, Bourgon R, Zheng J, Moorhead M, Chaudhuri S, Tomsho LP, Peters BA, Pujara K, Cordes S, Davis DP, Carlton VE, Yuan W, Li L, Wang W, Eigenbrot C, Kaminker JS, Eberhard DA, Waring P, Schuster SC, Modrusan Z, Zhang Z, Stokoe D, de Sauvage FJ, Faham M, and Seshagiri S. (2010). **Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers.** *Nature.* 466, (7308): 869-73.
47. Kotepui M, Thawornkuno C, Chavalitshewinkoon-Petmitr P, Punyarit P, and Petmitr S. (2012). **Quantitative real-time RT-PCR of ITGA7, SVEP1, TNS1, LPHN3, SEMA3G, KLB and MMP13 mRNA expression in breast cancer.** *Asian Pac J Cancer Prev.* 13, (11): 5879-82.
48. Bin Sun H, Ruan Y, Xu ZC, and Yokota H. (2002). **Involvement of the calcium-independent receptor for alpha-latrotoxin in brain ischemia.** *Brain Res Mol Brain Res.* 104, (2): 246-9.
49. Tobaben S, Sudhof TC, and Stahl B. (2002). **Genetic analysis of alpha-latrotoxin receptors reveals functional interdependence of CIRL/latrophilin 1 and neurexin 1 alpha.** *J Biol Chem.* 277, (8): 6359-65.

50. Scholz N, Gehring J, Guan C, Ljaschenko D, Fischer R, Lakshmanan V, Kittel RJ, and Langenhan T. (2015). **The adhesion GPCR latrophilin/CIRL shapes mechanosensation.** Cell Rep. 11, (6): 866-74.
51. Wallis D, Hill DS, Mendez IA, Abbott LC, Finnell RH, Wellman PJ, and Setlow B. (2012). **Initial characterization of mice null for Lphn3, a gene implicated in ADHD and addiction.** Brain Res. 1463, 85-92.
52. Franke B, Faraone SV, Asherson P, Buitelaar J, Bau CH, Ramos-Quiroga JA, Mick E, Grevet EH, Johansson S, Haavik J, Lesch KP, Cormand B, Reif A, and International Multicentre persistent AC. (2012). **The genetics of attention deficit/hyperactivity disorder in adults, a review.** Mol Psychiatry. 17, (10): 960-87.
53. Domene S, Stanescu H, Wallis D, Tinloy B, Pineda DE, Kleta R, Arcos-Burgos M, Roessler E, and Muenke M. (2011). **Screening of human LPHN3 for variants with a potential impact on ADHD susceptibility.** Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 156B, (1): 11-8.
54. Lange M, Norton W, Coolen M, Chaminade M, Merker S, Proft F, Schmitt A, Vernier P, Lesch KP, and Bally-Cuif L. (2012). **The ADHD-susceptibility gene lphn3.1 modulates dopaminergic neuron formation and locomotor activity during zebrafish development.** Mol Psychiatry. 17, (9): 946-54.
55. Guex N, and Peitsch MC. (1997). **SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling.** Electrophoresis. 18, (15): 2714-23.
56. Sambrook J, and Russell DW. (2006). **Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Minipreparation.** CSH Protoc. 2006, (1):
57. Sambrook J, and Russell DW. (2006). **Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Midipreparation.** CSH Protoc. 2006, (1):
58. Lu YC, Nazarko OV, Sando R, 3rd, Salzman GS, Sudhof TC, and Arac D. (2015). **Structural Basis of Latrophilin-FLRT-UNC5 Interaction in Cell Adhesion.** Structure.

59. Fukumoto Y, Obata Y, Ishibashi K, Tamura N, Kikuchi I, Aoyama K, Hattori Y, Tsuda K, Nakayama Y, and Yamaguchi N. (2010). **Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine.** Cytotechnology. 62, (1): 73-82.